



**HAL**  
open science

# Régulation directe par les protéines G hétérotrimériques des canaux calciques neuronaux activés par le potentiel électrique de membrane

Norbert Weiss

► **To cite this version:**

Norbert Weiss. Régulation directe par les protéines G hétérotrimériques des canaux calciques neuronaux activés par le potentiel électrique de membrane. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. NNT: . tel-00523501

**HAL Id: tel-00523501**

**<https://theses.hal.science/tel-00523501>**

Submitted on 5 Oct 2010

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1**

SCIENCES, TECHNOLOGIES, SANTÉ

École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

## **THÈSE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER**

Spécialité : Neurosciences - Neurobiologie

# **Régulation directe par les protéines G hétérotrimériques des canaux calciques neuronaux activés par le potentiel électrique de membrane**

Présentée et soutenue publiquement

par

**Norbert WEISS**

le 20 Décembre 2006

Devant le jury composé de

**Président :** Pr. Rémy SADOUL

**Rapporteurs :** Dr. Emmanuel BOURINET

Dr. Patrick DELMAS

**Examineur :** Pr. Anne FELTZ

**Directeur de thèse :** Dr. Michel De WAARD

Thèse réalisée au sein du laboratoire Canaux Calciques, Fonctions et Pathologies

INSERM U607 – DRDC / CEA Grenoble

**RESUME**

Les canaux calciques neuronaux activés par le potentiel électrique de membrane (VGCCs) représentent une des voies majeures d'entrée du calcium dans la cellule nerveuse, où ils participent activement aux processus moléculaires de la transmission synaptique. De ce fait, leur activité est finement régulée, afin de garantir une parfaite coordination entre le flux calcique et les processus cellulaires qui lui sont associés. Aussi, les récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques (RCPGs) occupent un rôle central dans le rétrocontrôle négatif de l'activité des VGCCs suite à la libération de neuromédiateurs. Cette régulation, directe et spatialement délimitée, est conduite par le dimère  $G_{\beta\gamma}$ , dont la fixation sur différents déterminants structuraux de la sous-unité  $Ca_v2.x$  conduit à l'inhibition drastique du courant calcique (régulation "ON"), indépendamment de la présence d'une sous-unité  $\beta$ . Le décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$ , en réponse à l'activation du canal, reverse cette inhibition, et induit un ensemble de modifications phénotypiques apparentes de l'activité du canal (régulation "OFF"). Aussi, nous avons mis en évidence que la notion de "*reluctance*", décrite par le shift dépolarisant de la courbe d'activation du canal, communément accepté comme un caractère de la régulation "ON", ne traduit en définitive qu'une caractéristique particulière de la régulation "OFF". En revanche, la fixation du dimère  $G_{\beta\gamma}$  sur la sous-unité  $Ca_v2.x$ , est à l'origine d'un ralentissement de la cinétique d'inactivation du canal, et représente un caractère nouveau de la régulation "ON". Enfin, nous avons caractérisé l'implication majeure de l'inactivation rapide du canal, dans le caractère "OFF" de cette régulation. L'inactivation se présente comme un catalyseur du décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$ , et délimite une fenêtre temporelle durant laquelle le processus peut avoir lieu. Ensemble, ces résultats permettent une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires à la base de la régulation directe de l'activité synaptique par les récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques.

**Mots clefs :** calcium ;  $Ca^{2+}$  ; canaux calciques ; sous-unité  $Ca_v2.2$  ; type N ; sous-unité  $\beta$  ; récepteur à sept domaines membranaires ; RCPG ; récepteur  $\mu$ -opioïde ; DAMGO ; protéine G hétérotrimérique ; dimère  $G_{\beta\gamma}$  ; électrophysiologie ; double électrode ; ovocyte de Xénope ; activation ; inactivation ; prépulse facilitation ; reluctance ; activité synaptique.

## SUMMARY

### Neuronal voltage-gated calcium channels regulation by heterotrimeric G-proteins

Neuronal voltage-gated calcium channels (VGCCs) represent a major pathway of calcium entry into neuronal cells, where they play a crucial role in the molecular processes of synaptic transmission. With this fact, their activity is finely regulated to guarantee a perfect coordination between calcium influx and associated cellular processes. Hence, G-protein coupled receptors play a critical role in negative feedback to modulate VGCCs activity in response to the neuromediators release. This regulation, direct and spatially delimited, is driven by the binding of the  $G_{\beta\gamma}$  dimer on different structural elements of the  $Ca_v2.x$  subunit, and drastically inhibits calcium currents ("ON" regulation), independently of the presence of the  $\beta$  subunit. The unbinding of the  $G_{\beta\gamma}$  dimer following channel activation, reverse this inhibition, and induce a set of apparent phenotypic modifications of channel activity ("OFF" regulation). We put in evidence that the concept of "*reluctance*", described by a depolarised shift in the voltage-dependence of channel activation, historically associated with the "ON" regulation, is in fact a particular characteristic of the "OFF" regulation. On the other hand, the binding of the  $G_{\beta\gamma}$  dimer directly onto the  $Ca_v2.x$  subunit, induces a slowing of channel inactivation kinetics, which appears as a novel characteristic of the "ON" regulation. Finally, we have characterised the major implication of fast channel inactivation in the "OFF" regulation. Channel inactivation acts as a synergistic factor to channel activation for the  $G_{\beta\gamma}$  removal from the channel, but defined a temporal window in the course of which the process can take place. Taken together, these results provide a better understanding in the molecular mechanisms of the regulation of synaptic activity by G-protein coupled receptors.

**Key words :** calcium ;  $Ca^{2+}$  ; calcium channel ;  $Ca_v2.2$  subunit ; N-type ;  $\beta$  subunit ; G-protein coupled receptor ; GPCR ;  $\mu$ -opioid receptor ; DAMGO ; heterotrimeric G-protein ;  $G_{\beta\gamma}$  dimer ; electrophysiology ; two-electrode voltage-clamp technique ; *Xenopus* oocyte ; channel activation ; channel inactivation ; prepulse facilitation ; channel reluctance ; synaptic activity.

**LISTE des ABREVIATIONS**

<b>aa</b> : acide aminé	<b>Kd</b> : Constance de dissociation
<b>ABP</b> : <i>AID-Binding Pocket</i>	<b>kDa</b> : Kilo Dalton
<b>AC</b> : Adénylate Cyclase	<b>Kir</b> : Canal potassique rectifiant entrant
<b>AID</b> : <i>Alpha Interaction Domain</i>	<b>K<sub>v</sub></b> : Canal potassique activé par le voltage
<b>AKAP</b> : <i>A-Kinase Anchoring Protein</i>	<b>LVA</b> : <i>Low Voltage Activated</i>
<b>AMPA</b> : Acide alpha-amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazole-4-propionique	<b>Mg<sup>2+</sup></b> : Ion magnésium
<b>AMPc</b> : Adénosine Monophosphate Cyclique	<b>MHF</b> : Migraine Hémiplégique Familiale
<b>ARN</b> : Acide Ribonucléique	<b>Na<sup>+</sup></b> : Ion sodium
<b>ARNm</b> : ARN messager	<b>NCA</b> : <i>Nuclear Ca<sup>2+</sup>-ATPase</i>
<b>ATP</b> : Adénosine Triphosphate	<b>NE</b> : Norépinéphrine
<b>Ba<sup>2+</sup></b> : Ion barium	<b>NMDA</b> : N-Méthyl-D-Aspartate
<b>Be<sup>2+</sup></b> : Ion béryllium	<b>NPY</b> : Neuropeptide Y
<b>BID</b> : <i>Beta Interaction Domain</i>	<b>NSF</b> : <i>N-ethylmaleimide Sensitive Fusion</i>
<b>Ca<sup>2+</sup></b> : Ion calcium	<b>Nter</b> : Amino-terminal
<b>CaBPs</b> : <i>Calcium Binding Proteins</i>	<b>ORL1</b> : <i>Opioid Receptor-Like 1</i>
<b>Ca<sub>v</sub></b> : Canal Calcique activé par le voltage	<b>PCR</b> : <i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>CBD</b> : <i>Calcium Binding Domain</i>	<b>PIP<sub>2</sub></b> : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
<b>CCH</b> : Carbachol	<b>PKA</b> : Protéine kinase A
<b>CICR</b> : <i>Calcium-Induced Calcium Release</i>	<b>PKC</b> : Protéine kinase C
<b>CREB</b> : <i>cAMP Response Element Binding</i>	<b>PLCβ</b> : Phospholypase Cβ
<b>CSNB2</b> : <i>Congenital Stationary Night Blindness</i>	<b>PLCγ</b> : Phospholypase Cγ
<b>Cter</b> : Carboxy-terminal	<b>PMCA</b> : <i>Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase</i>
<b>DAG</b> : Diacylglycérol	<b>PTX</b> : Toxine Pertussis
<b>DAMGO</b> : D-Ala <sup>2</sup> ,Me-Phe <sup>4</sup> ,glycinol <sup>5</sup> )-enkephalin	<b>Ra<sup>2+</sup></b> : Ion radium
<b>EA2</b> : <i>Episodic Ataxia type-2</i>	<b>RCPG</b> : Récepteur Couplé aux Protéines G hétérotrimériques
<b>FRET</b> : <i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>	<b>RE</b> : Réticulum Endoplasmique
<b>GABA</b> : Acide γ-Amino-Butyrique	<b>RGK</b> : Rad Gem Kir proteins
<b>GDP</b> : Guanosine Diphosphate	<b>ROC</b> : <i>Receptor Operated Channel</i>
<b>GID</b> : <i>G-protein Interaction Domain</i>	<b>RyR</b> : Récepteur à la Ryanodine
<b>GK</b> : <i>Guanylate Kinase</i>	<b>SCA6</b> : <i>Spino Cerebelar Ataxia type-2</i>
<b>GPBP</b> : <i>G-Protein Binding Pocket</i>	<b>SERCA</b> : <i>Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase</i>
<b>GST</b> : <i>Gluthation-S-Transferase</i>	<b>SH3</b> : <i>Src Homology-3</i>
<b>GTP</b> : Guanosine Triphosphate	<b>SNAP</b> : <i>Soluble NFS Attachment Protein</i>
<b>HEK293</b> : <i>Human Embryonic Kidney 293</i>	<b>SNARE</b> : <i>SNAP Receptor</i>
<b>HVA</b> : <i>High Voltage Activated</i>	<b>SOC</b> : <i>Store Operated Channels</i>
<b>IP<sub>3</sub></b> : Inositol Trisphosphate	<b>SPCA</b> : <i>Secretory-Pathway Ca<sup>2+</sup>-transport ATPase</i>
<b>IP<sub>3</sub>R</b> : Récepteur à l'IP <sub>3</sub>	<b>VGCC</b> : <i>Voltage-Gated Calcium Channel</i>
<b>IVA</b> : <i>Intermediate Voltage Activated</i>	<b>VICR</b> : <i>Voltage-Induced Calcium Release</i>

**CODE des ACIDES AMINES**

<b>Alanine</b>	Ala	A	<b>Cystéine</b>	Cys	C
<b>Acide aspartique</b>	Asp	D	<b>Acide glutamique</b>	Glu	E
<b>Phénylalanine</b>	Phe	F	<b>Glycine</b>	Gly	G
<b>Histidine</b>	His	H	<b>Isoleucine</b>	Ile	I
<b>Lysine</b>	Lys	K	<b>Leucine</b>	Leu	L
<b>Méthionine</b>	Met	M	<b>Asparagine</b>	Asn	N
<b>Proline</b>	Pro	P	<b>Glutamine</b>	Gln	Q
<b>Arginine</b>	Arg	R	<b>Sérine</b>	Ser	S
<b>Thréonine</b>	Thr	T	<b>Valine</b>	Val	V
<b>Tryptophane</b>	Try	W	<b>Tyrosine</b>	Tyr	Y

## **LISTE des ILLUSTRATIONS et TABLEAUX**

**Figure 1.** Tableau périodique des éléments selon la classification de Mendeleïev.

**Figure 2.** Représentation schématique des acteurs moléculaires de la diminution de la concentration calcique cytosolique libre.

**Figure 3.** Représentation schématique des acteurs moléculaires de l'augmentation de la concentration calcique cytosolique libre.

**Figure 4.** Représentation schématique de la composition moléculaire d'un canal calcique activé par le potentiel électrique de membrane.

**Figure 5.** Topologie membranaire présumée de la sous-unité  $Ca_v$ .

**Figure 6.** Topologie membranaire présumée de la sous-unité  $Ca_v$ .

**Figure 7.** Analyse protéique comparative des segments S4 des différentes sous-unités  $Ca_v$ .

**Figure 8.** Modèles hypothétiques des mouvements de charges.

**Figure 9 :** Analyse protéique comparative des boucles P des différentes sous-unités  $Ca_v$ .

**Figure 10.** Représentation schématique de la structure cristallographique d'une sous-unité  $\beta$  complexée avec l'AID d'une sous-unité  $Ca_v$ .

**Figure 11.** Analyse protéique comparative du domaine AID des sous-unités  $Ca_v$ .

**Figure 12.** Modèle hypothétique de couplage entre les canaux calciques activés par le potentiel, la signalisation calcique et la machinerie de libération des vésicules présynaptiques.

**Figure 13.** Mécanismes moléculaires de l'adressage fonctionnel de la sous-unité  $Ca_v$  vers la membrane plasmique.

**Figure 14.** Exemples représentatifs des effets de la sous-unité  $\beta$  sur les propriétés biophysiques de la sous-unité  $Ca_v$ .

**Figure 15.** Topologie membranaire présumée de la sous-unité  $\alpha_2\delta$ .

**Figure 16.** Exemples représentatifs des effets fonctionnels de la sous-unité  $\alpha_2\delta$  sur les propriétés biophysiques de la sous-unité  $Ca_v$ .

**Figure 17.** Topologie membranaire présumée de la sous-unité  $\gamma$ .

**Figure 18.** Arbre phylogénique des RCPGs humains.

**Figure 19.** Illustration des principales modifications biophysiques de l'activité d'un VGCC en réponse à l'activation d'un GPCR.

**Figure 20.** Représentation schématique de l'expérience développée par Forsher mettant en évidence que l'inhibition des VGCCs par les RCPGs est directe et ne fait pas intervenir de seconds messagers.

**Figure 21.** Représentation schématique des déterminants structuraux de la boucle I-II de la sous-unité  $Ca_v2.x$  impliqués dans la régulation directe des VGCCs par les RCPGs.

**Figure 22.** Représentation schématique des déterminants structuraux du domaine amino-terminal de la sous-unité  $Ca_v2.x$  impliqués dans la régulation directe des VGCCs par les RCPGs.

**Figure 23.** Représentation schématique des déterminants structuraux du domaine carboxy-terminal de la sous-unité  $Ca_v2.x$  impliqués dans la régulation directe des VGCCs par les RCPGs.

**Figure 24.** Mise en évidence d'une latence de première ouverture des canaux de type N suite à l'activation des récepteurs M2.

**Figure 25.** Mise en évidence d'ouvertures à faible probabilité du canal N dans le mode "*reluctant*".

**Figure 26.** Courants de *gating* durant l'inhibition directe des courants N par les protéines G hétérotrimériques.

**Figure 27.** Caractéristiques structurales de la sous-unité  $G_{\beta 2}$ .

**Figure 28.** Représentation schématique de la transition "*willing*" ↔ "*reluctant*" suivant le modèle de "transition de modes".

**Figure 29.** Représentation schématique de la transition "*willing*" ↔ "*reluctant*" suivant le modèle de "déplacement de la sous-unité  $\beta$ ".

**Figure 30.** Illustration des régulations "ON" et "OFF" de l'activité d'un VGCC en réponse à l'activation d'un GPCR.

**Figure 31.** Représentation schématique du protocole expérimental de prépulse facilitation.

**Figure 32.** Modèle d'inactivation rapide des VGCCs.

**Figure 33.** Modèle hypothétique du mécanisme moléculaire par lequel le dimère  $G_{\beta\gamma}$  induirait un ralentissement de la cinétique d'inactivation du canal.

**Figure 34.** Modèle hypothétique du mécanisme moléculaire par lequel l'inactivation rapide contribuerait au décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$ .

**Figure 35.** Implication hypothétique de l'inactivation rapide dans l'activité synaptique au cours de la régulation G.



**Tableau I :** Propriétés moléculaires, biophysiques et pharmacologiques de la sous-unité Ca<sub>v</sub>1.1.

**Tableau II :** Propriétés moléculaires, biophysiques et pharmacologiques de la sous-unité Ca<sub>v</sub>1.2.

**Tableau III :** Propriétés moléculaires, biophysiques et pharmacologiques de la sous-unité Ca<sub>v</sub>1.3.

**Tableau IV :** Propriétés moléculaires, biophysiques et pharmacologiques de la sous-unité Ca<sub>v</sub>1.4.

**Tableau V :** Propriétés moléculaires, biophysiques et pharmacologiques de la sous-unité Ca<sub>v</sub>2.1.

**Tableau VI :** Propriétés moléculaires, biophysiques et pharmacologiques de la sous-unité Ca<sub>v</sub>2.2.

**Tableau VII :** Propriétés moléculaires, biophysiques et pharmacologiques de la sous-unité Ca<sub>v</sub>2.3.

**Tableau VIII :** Propriétés moléculaires, biophysiques et pharmacologiques de la sous-unité Ca<sub>v</sub>3.1.

**Tableau IX :** Propriétés moléculaires, biophysiques et pharmacologiques de la sous-unité Ca<sub>v</sub>3.2.

**Tableau X :** Propriétés moléculaires, biophysiques et pharmacologiques de la sous-unité Ca<sub>v</sub>3.3.

**Tableau XI :** Les différents RCPGs et leurs agonistes impliqués dans la régulation directe des VGCCs.

**PREAMBULE**.....p.1

**INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE**.....p.8

**Chapitre I. Les CANAUX CALCIQUES ACTIVES**

**par le POTENTIEL**.....p.8

**I. STRUCTURE MOLECULAIRE des VGCCs** .....p.8

**A. La sous-unité principale  $Ca_v$** .....p.9

1. Diversité des sous-unités  $Ca_v$
2. Structure des sous-unités  $Ca_v$
3. Fonctions des sous-unités  $Ca_v$

**B. La sous-unité auxiliaire  $\beta$**  .....p.15

1. Diversité des sous-unités  $\beta$
2. Structure des sous-unités  $\beta$
3. Fonctions des sous-unités  $\beta$

**C. La sous-unité auxiliaire  $\alpha_2\delta$**  .....p.22

1. Diversité des sous-unités  $\alpha_2\delta$
2. Structure des sous-unités  $\alpha_2\delta$
3. Fonctions des sous-unités  $\alpha_2\delta$

**D. La sous-unité auxiliaire  $\gamma$**  .....p.25

1. Diversité des sous-unités  $\gamma$
2. Structure des sous-unités  $\gamma$
3. Fonctions des sous-unités  $\gamma$

**II. DIVERSITE et FONCTIONS des CANAUX HVA** .....p.27

**A. Les sous-unités  $Ca_v1.x$  et les courants de type L**.....p.27

1.  $Ca_v1.1$  : le "récepteur aux dihydropyridines du muscle squelettique"
2.  $Ca_v1.2$  : le "canal L cardiovasculaire"
3.  $Ca_v1.3$  : le "canal L neuroendocrinien"
4.  $Ca_v1.4$  : le "canal L rétinien"

**B. La sous-unité  $Ca_v2.1$  et les courants de type P/Q**.....p.33

<b>C. La sous-unité <math>Ca_v2.2</math> et les courants de type N</b> .....	p.35
<b>D. La sous-unité <math>Ca_v2.3</math> et les courants de type R</b> .....	p.39
<b>III. DIVERSITE et FONCTIONS des CANAUX LVA</b> .....	p.41
<b>A. Les sous-unités <math>Ca_v3.x</math> et les courants de type T</b> .....	p.41
1. La sous-unité $Ca_v3.1$	
2. La sous-unité $Ca_v3.2$	
3. La sous-unité $Ca_v3.3$	
<b>Chapitre II. REGULATION DIRECTE des VGCCs par les RCPGs</b> .....	p.46
<b>I. REGULATION des VGCCs par les PROTEINES KINASES</b> .....	p.46
<b>A. Régulation par la PKA</b> .....	p.47
<b>B. Régulation par la PKC</b> .....	p.48
<b>II. REGULATION DIRECTE des VGCCs par le DIMERE <math>G_{\beta\gamma}</math></b> .....	p.48
<b>A. Mise en évidence du phénomène</b> .....	p.49
<b>B. Les acteurs moléculaires de l'inhibition</b> .....	p.54
<b>C. Déterminants structuraux de l'interaction <math>Ca_v / G_{\beta\gamma}</math></b> .....	p.56
1. Importance de la boucle I-II de la sous-unité $Ca_v2.x$	
2. Importance du domaine amino-terminal de la sous-unité $Ca_v$	
3. Importance du domaine carboxy-terminal de la sous-unité $Ca_v$	
4. Vers la notion de <i><math>G_{\beta\gamma}</math> Protein-Binding Pocket</i>	
<b>D. Comment le dimère <math>G_{\beta\gamma}</math> inhibe-t-il les courants calciques ?</b> .....	p.65
<b>E. Quels sont les VGCCs affectés par l'inhibition des RCPGs ?</b> .....	p.70
<b>F. Rôle de la sous-unité <math>\beta</math> dans la régulation des VGCCs par les RCPGs</b> .....	p.72
<b>G. Comment se produit la terminaison du signal</b> .....	p.73

<b>H. Conclusion</b> .....	p.74
<b>PROBLEMATIQUE</b> .....	p.76
<b>RESULTATS</b> .....	p.80
<b>I. IMPORTANCE de la RELAXATION de l'INHIBITION des CANAUX N dans la REGULATION DIRECTE des PROTEINES G</b> .....	p.80
<b>A. Introduction</b> .....	p.80
<b>B. Publication N° 1</b> .....	p.82
<b>C. Discussion</b> .....	p.83
1. La sous-unité $\beta$ : agoniste ou antagoniste ?	
2. Simulation de la régulation G	
3. Importance du décrochage du $G_{\beta\gamma}$ dans le phénotype	
4. La " <i>reluctance</i> " : témoin de la régulation "OFF"	
<b>II. DEVELOPPEMENT d'une METHODE D'ANALYSE de la REGULATION DIRECTE des CANAUX N par les PROTEINES G</b> .....	p.88
<b>A. Introduction</b> .....	p.88
<b>B. Publication N° 2</b> .....	p.90
<b>C. Discussion</b> .....	p.91
1. Rôle du dimère $G_{\beta\gamma}$ dans l'inactivation du canal	
2. Vers une nouvelle méthode d'analyse	
3. Conclusion	
<b>III. IMPORTANCE de l'INACTIVATION RAPIDE des CANAUX N dans la REGULATION DIRECTE par les PROTEINES G</b> .....	p.95
<b>A. Introduction</b> .....	p.95
<b>B. Publication N° 3</b> .....	p.97
<b>C. Discussion</b> .....	p.98

1. L'inactivation rapide : un cofacteur de la relaxation
2. Notion de "fenêtre temporelle" de relaxation
3. Implication dans le phénotype de la régulation G
4. Importance physiologique

**CONCLUSION GENERALE et PERSPECTIVES**.....p.104

**I. La "reluctance" : un caractère de la régulation "OFF"**.....p.105

**II. Le dimère  $G_{\beta\gamma}$  : un modulateur de l'inactivation** .....p.106

**III. La sous-unité  $\beta$  : ni agoniste, ni antagoniste  
de la régulation "ON"**.....p.107

**IV. L'inactivation rapide : déterminant de la régulation "OFF"**.....p.107

**V. Deux questions essentielles** .....p.108

**VI. Implications physiopathologiques**.....p.109

**ANNEXES**

**Annexe N° 1** .....p.110

**Annexe N° 2** .....p.111

**Annexe N° 3** .....p.112

**Annexe N° 4** .....p.113

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**.....p.114

## PREAMBULE

Le calcium est le minéral le plus abondant du corps humain, où il représente environ 2% du poids total de l'individu. 99% de ce calcium contribue à la formation et à la solidité des os et des dents. Le calcium non osseux, malgré sa faible part (1%), intervient dans de nombreuses autres fonctions cellulaires. Le calcium appartient à la classe des métaux alcalino-terreux (deuxième groupe du tableau périodique des éléments, au même titre que le béryllium, le magnésium, le strontium, le baryum et le radium) (Figure 1). Aussi, il est capable de former des ions positifs de charge +2 ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (dans la suite de ce manuscrit, le terme "calcium" fera systématiquement référence à l'ion calcium  $\text{Ca}^{2+}$ ). C'est ainsi sous sa forme ionique, que le calcium se révèle être le second messager intracellulaire non métabolisable le plus commun du monde vivant, des procaryotes (Shemarova et Nesterov, 2005a) aux eucaryotes supérieurs (Shemarova et Nesterov, 2005b). Au niveau de la cellule nerveuse, le calcium est impliqué, de manière directe ou indirecte, dans une pléthore de fonctions cellulaires telles que l'excitabilité neuronale, la libération de neuromédiateurs, la croissance neuritique, la synaptogénèse, la régulation de l'expression génique ou encore la prolifération et la mort cellulaire (pour revue voir (Berridge, 1998)).

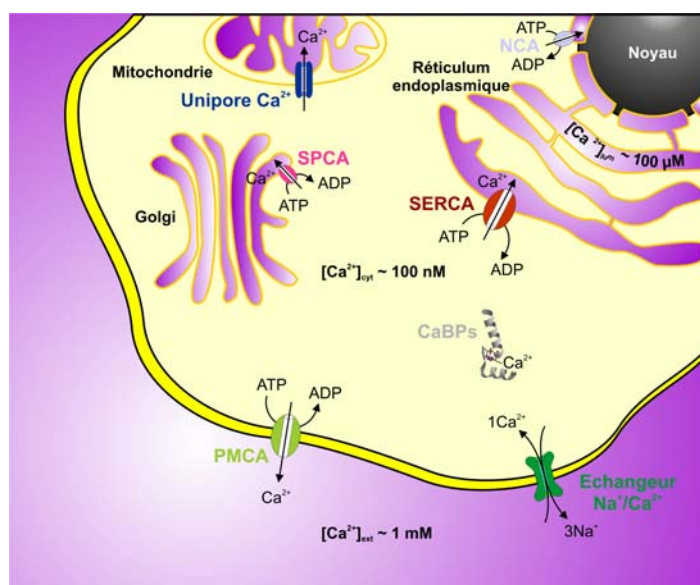
Légende																		
mét. alcalins		alcalino-terreux		métaux		m. de transition		terres rares		non-métaux		gaz rares		métalloïdes				
1	1,0															VIII	4,2	
1	H															2	He	
2	6,9	9,0															20,2	
3	Li	Be															Ne	
3	23,0	24,3															39,9	
4	Na	Mg															Ar	
4	39,1	40,1	45,0	47,9	50,9	52,0	54,9	55,8	58,9	58,7	63,5	65,4	69,7	72,6	74,9	79,0	79,9	83,8
5	K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	(98,6)	101,1	102,9	106,4	107,9	112,4	114,8	118,7	121,8	127,6	126,9
6	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	31	32	32	33	34	35	36
6	85,5	87,6	88,9	91,2	92,9	95,9	(98,6)	101,1	102,9	106,4	107,9	112,4	114,8	118,7	121,8	127,6	126,9	131,3
7	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54
7	132,9	137,3	138,9	178,5	180,9	183,9	186,2	190,2	192,2	195,1	197,0	200,8	204,4	207,2	209,0	(209)	(210)	(222)
8	Cs	Ba	Ac	Rf	Ha	Sg	Ns	Hs	Mt	Unn	Uun							
8	(223)	(226)	(227)	(261)	(262)	(263)	(264)	(265)										
9	87	88	89	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118
Lanthanides																		
	140,1	140,9	144,2	(145)	150,4	152,0	157,3	158,9	162,5	164,9	167,3	168,9	173,0	175,0				
	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71				
Actinides																		
	232,0	231,0	238,0	237,0	(244)	(243)	(247)	(247)	(251)	(254)	(257)	(258)	(259)	(260)				
	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103				

Figure 1. Tableau périodique des éléments selon la classification de Mendeleïev.

Le calcium (Ca) appartient au groupe des métaux alcalino-terreux, constitué également par le béryllium (Be), le magnésium (Mg), le strontium (Sr), le baryum (Ba) et le radium (Ra). Ces éléments présentent la particularité de posséder deux électrons libres sur leur dernière orbitale atomique, et sont ainsi capables de former des cations de charge +2. C'est ainsi sous sa forme ionique  $\text{Ca}^{2+}$  que le calcium se présente comme un messager secondaire ubiquitaire du monde vivant.

Afin que le calcium puisse jouer son rôle de second messager intracellulaire, il est fondamental que sa concentration cytosolique basale soit clairement établie. Généralement, la concentration cytosolique en calcium libre d'une cellule nerveuse au repos se situe au alentour de  $10^{-7}$  M, soit environ 10.000 fois inférieure à sa concentration extracellulaire. Quatre

éléments majeurs permettent de maintenir un tel gradient de concentration (Figure 2) (pour revue voir (Kostyuk et Verkhratsky, 1994)) :



**Figure 2. Représentation schématique des acteurs moléculaires de la diminution de la concentration calcique cytosolique libre.** Adapté de (Kostyuk et Verkhratsky, 1994).

Quatre éléments majeurs permettent de maintenir le gradient de concentration en calcium libre de part et d'autre de la membrane plasmique: (1) la membrane plasmique elle-même, intrinsèquement imperméable au calcium, (2) les protéines CaBPs (pour *Calcium Binding Proteins*) permettant de séquestrer le calcium libre, (3) la pompe calcique ATPase PMCA (pour *Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase*) ainsi que l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  permettant d'extruder le calcium libre vers le milieu extracellulaire, et (4) les organelles intracellulaires grâce aux pompes calciques ATPase SERCA (pour *Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase*), SPCA (pour *Secretory-Pathway Ca<sup>2+</sup>-transport ATPase*) et NCA (pour *Nuclear Ca<sup>2+</sup>-ATPase*) permettant de pomper le calcium libre du cytosol vers le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et l'enveloppe nucléaire respectivement, ainsi que l'unipore calcique mitochondriale.

1. **La membrane plasmique** : De part ses propriétés biochimiques hydrophobes, la membrane plasmique est intrinsèquement imperméable au calcium hydrophile. Cette caractéristique, somme toute assez banale, représente néanmoins très certainement le point de départ évolutif, ayant permis aux cellules vivantes d'utiliser le calcium comme messager intracellulaire (Shemarova et Nesterov, 2005a).

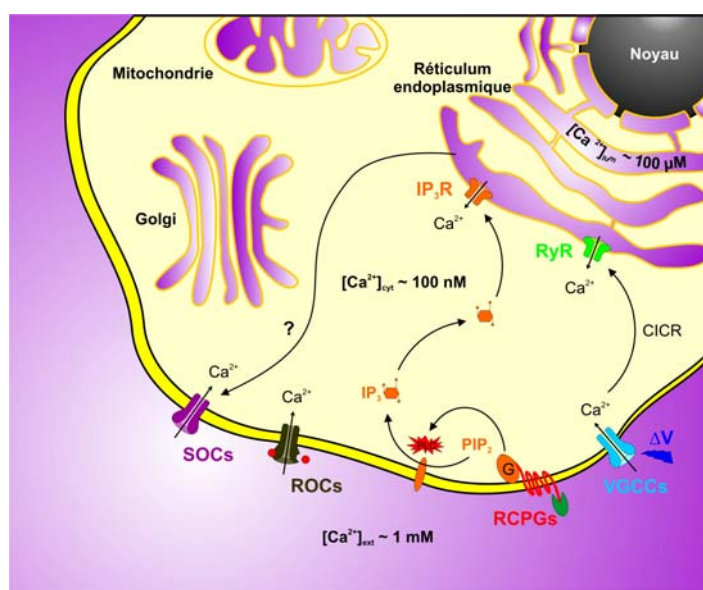
2. **Les protéines liant le calcium** : Il existe au niveau du cytosol un système de "tampon calcique" constitué par les protéines CaBPs (pour *Calcium Binding Proteins*). Ces protéines appartiennent à la famille des protéines à domaines "main EF", et sont capables de lier le calcium libre avec une affinité souvent inférieure à sa concentration basale. Il s'agit par exemple de la calrétinine, de la calbindine ou encore de la parvalbumine (pour revue voir (Schwaller *et al.*, 2002)).

3. **Les protéines de la membrane plasmique** : Elles permettent l'extrusion du calcium cytosolique libre vers le milieu extracellulaire. La pompe calcique ATPase PMCA (pour *Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase*) permet ainsi le transport actif du calcium libre, depuis le cytosol vers le milieu extracellulaire. Ce transport a lieu contre le gradient de concentration, est indépendant du potentiel électrique de membrane, mais nécessite l'hydrolyse de l'ATP comme support énergétique. L'échangeur Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> représente également un moyen pour la cellule d'extruder du calcium libre vers le milieu extracellulaire. Si ce transport présente l'avantage de ne pas être coûteux en énergie, il est cependant électrogénique en raison du ratio 3Na<sup>+</sup>/1Ca<sup>2+</sup>, et de ce fait dépend du potentiel électrique de membrane. Aussi, au potentiel de repos, le calcium est extrudé de la cellule. Pour revues voir (Garcia et Strehler, 1999; Zylinska et Soszynski, 2000; Mata et Sepulveda, 2005).

4. **Les protéines de la membrane des organelles** : Les organelles intracellulaires (le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, les mitochondries et le noyau) possèdent également les éléments nécessaires au pompage du calcium cytosolique libre. De ce fait, ils participent activement au maintien de l'homéostasie calcique intracellulaire. Au niveau du réticulum endoplasmique, la pompe calcique ATPase SERCA (pour *Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase*) permet le transport actif du calcium libre depuis le cytosol vers le réticulum endoplasmique par hydrolyse de l'ATP (pour revue voir (Mata et Sepulveda, 2005)). L'appareil de Golgi présente également la capacité de pomper du calcium cytosolique libre grâce à la pompe calcique ATPase SPCA (pour *Secretory-Pathway Ca<sup>2+</sup>-transport ATPase*) (pour revue voir (Van Baelen *et al.*, 2004)). Au niveau de la mitochondrie, les échanges ioniques entre le cytosol et la matrice mitochondriale sont principalement contrôlés par les canaux et transporteurs de la membrane mitochondriale interne. Ainsi, le calcium cytosolique libre est acheminé vers la matrice mitochondriale via un unipore calcique (pour revue voir (Babcock et Hille, 1998; Simpson et Russell, 1998)). Enfin, le noyau, dont l'enveloppe nucléaire est en continuité avec le lumen du réticulum endoplasmique, est lui aussi capable d'acheminer du calcium libre depuis le cytosol, grâce à une pompe calcique ATPase NCA (pour *Nuclear Ca<sup>2+</sup>-ATPase*) (pour revue voir (Rogue et Malviya, 1999)). Ainsi, l'ensemble de ces organelles, de part leur capacité à pomper puis stocker le calcium cytosolique libre, contribue au maintien de l'homéostasie calcique intracellulaire, et représentent de véritables sources de calcium mobilisable par la cellule, comme nous allons le voir.



Le signal calcique, bien que codé par des caractéristiques spatio-temporelles complexes (pour revue voir (Berridge *et al.*, 1998)), reste avant tout initialisé par une augmentation locale de la concentration cytosolique en calcium libre. Ainsi, de la même façon qu'il existe des systèmes permettant d'abaisser la concentration calcique cytosolique libre, il existe au sein de la cellule des mécanismes moléculaires permettant l'élévation de sa concentration. Deux voies majeures permettent l'élévation de la concentration cytosolique en calcium libre (Figure 3) (pour revues voir (Kostyuk et Verkhratsky, 1994; Missiaen *et al.*, 2000)) :



**Figure 3. Représentation schématique des acteurs moléculaires de l'augmentation de la concentration calcique cytosolique libre.** Adapté de (Kostyuk et Verkhratsky, 1994).

Différents types de canaux calciques assurent l'élévation de la concentration cytosolique en calcium libre dans la cellule nerveuse : (1) les canaux de la membrane plasmique : les VGCCs (pour *Voltage-Gated Calcium Channels*), les ROCs (pour *Receptor Operated Channels*) et les SOCs pour *Store Operated Channels*) permettent l'influx de calcium depuis le milieu extracellulaire vers le cytosol, et (2) les canaux de la membrane plasmique des organelles intracellulaires : le récepteur à la ryanodine (RyR) et le récepteur à l'inositol trisphosphate (IP<sub>3</sub>R), activés respectivement par le calcium suivant un mécanisme de CIRC (pour *Calcium-Induced Calcium Release*) et par l'inositol trisphosphate (IP<sub>3</sub>) permettent le relâchement de calcium depuis le réticulum endoplasmique vers le cytosol. RCPGs, Récepteurs Couplés aux Protéines G hétérotrimériques.

1. **Mobilisation du calcium extracellulaire** : La membrane plasmique étant intrinsèquement imperméable au calcium, l'influx calcique depuis le milieu extracellulaire vers le cytosol se fait donc à travers des protéines canal enchâssées dans la membrane plasmique. Sur la base de leur sélectivité ionique et de leur mode d'activation, ces canaux ont été classés en trois groupes :

a. Les **canaux calciques activés par une modification du potentiel électrique de membrane** ou VGCCs (pour *Voltage-Gated Calcium Channels*). Ces canaux

représentent l'une des voies majeures d'entrée du calcium dans la cellule nerveuse. Nous ne détaillerons pas plus ces canaux à ce stade puisque l'ensemble de ce manuscrit leur sera ensuite consacré.

b. Les **canaux cationiques activés par des ligands extracellulaires** ou ROCs (pour *Receptor Operated Channels*). L'activation de ces canaux fait suite à la fixation de leur ligand extracellulaire sur le canal. C'est le cas par exemple des récepteurs ionotropiques glutamatergiques de type NMDA (pour *N-Méthyl D-Aspartate*) perméables spécifiquement au calcium, ou des récepteurs AMPA (pour *Acide Alpha-amino-3-hydroxy-5-Méthylisoxazole-4-Propionique*) perméables au calcium et au sodium (pour revue voir (Kim *et al.*, 1994)).

c. Les **canaux activés suite à la déplétion des stocks calciques internes** ou SOCs (pour *Store Operated Channels*). Si l'activation de ces canaux fait suite à la déplétion des stocks calciques intracellulaires, les différents mécanismes moléculaires impliqués demeurent à ce jour des sujets de controverse (pour revues voir (Nilius, 2004; Parekh et Putney, 2005)).

**2. Mobilisation des stocks calciques intracellulaires** : Bien que la genèse d'un signal calcique soit généralement déclenchée par l'activation des protéines canal de la membrane plasmique, la mobilisation des stocks calciques intracellulaires occupe toutefois une place importante dans l'amplification et la régénération du signal calcique. Deux familles de canaux sont pour l'essentiel impliquées dans la libération du calcium à partir des compartiments intracellulaires (pour revue voir (Rizzuto, 2001)) :

a. Le **récepteur à l'inositol trisphosphate** (IP<sub>3</sub>R). Il s'agit d'un récepteur canal présent à la surface de la membrane du réticulum endoplasmique (RE). Il permet le relâchement de calcium vers le cytosol en réponse à une élévation de la concentration cytosolique en inositol trisphosphate (IP<sub>3</sub>). La cascade de signalisation conduisant à la production d'IP<sub>3</sub> est très largement décrite. Elle met en jeu soit l'activation de récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques (RCPGs), tels que certains récepteurs aux neuromédiateurs, soit l'activation de récepteurs à activité tyrosine kinase, tels que les récepteurs Trk aux neurotrophines. L'activation de ces récepteurs conduit à l'activation d'une phospholipase C (phospholipase C $\beta$  suite à l'activation d'un RCPG, phospholipase C $\gamma$  suite à l'activation d'un récepteur à activité tyrosine kinase), puis à l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) en diacylglycérol (DAG) et en IP<sub>3</sub> (pour revue voir (Patterson *et al.*, 2004)).

b. Le **récepteur à la ryanodine (RyR)**. Il s'agit également d'un récepteur canal, présent dans de la membrane du réticulum endoplasmique, et permettant le relâchement de calcium vers le cytosol. Initialement décrit dans la cellule musculaire où il occupe un rôle central dans le couplage excitation-contraction, il reste peu documenté à ce jour au niveau de la cellule nerveuse. Son mode d'activation est dépendant du type cellulaire. Au niveau de la cellule musculaire squelettique, le RyR est indirectement activé par une modification du potentiel électrique de membrane de la cellule. En effet, le RyR est en interaction physique avec un VGCC de type L, dont la modification conformationnelle en réponse à une dépolarisation membranaire conduit à l'activation du RyR. Ce mécanisme porte le nom de VICR (pour *Voltage-Induced Calcium Release*). Au niveau de la cellule musculaire cardiaque, le RyR est seulement en vis-à-vis avec le VGCC de type L, et c'est l'entrée de calcium via ce dernier qui provoque l'activation du RyR. On parle alors de mécanisme de CICR (pour *Calcium-Induced Calcium Release*). Il semblerait qu'au niveau de la cellule nerveuse, le relâchement de calcium via le RyR se produise suivant un mécanisme de CICR (pour revue voir (Dirksen, 2002)).

Cet avant-propos expose à la fois l'importance de la signalisation calcique pour la cellule, mais également sa complexité. De nombreux acteurs moléculaires sont ainsi dévoués au maintien de l'homéostasie calcique, toutes altérations étant à l'origine de nombreuses pathologies ou canalopathies (pour revue voir (Missiaen *et al.*, 2000)). De plus, afin de coordonner plus finement le flux calcique aux fonctions cellulaires qui lui sont associées, les acteurs "primaires" (pompes, canaux, ...) sont eux même sous le contrôle d'autres protagonistes. Aussi, vouloir détailler l'ensemble de la signalisation calcique de manière exhaustive en serait illusoire. La suite de ce manuscrit sera donc consacrée à présenter les données bibliographiques actuelles, ayant motivé mon travail de thèse. Ce travail s'est focalisé exclusivement sur les canaux calciques activés par le potentiel électrique de membrane, et leur régulation par les récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques. Plus particulièrement encore, je me suis intéressé aux mécanismes moléculaires à la base de la régulation par le dimère  $G_{\beta\gamma}$  des canaux calciques de type N. Dans un premier temps, je passerais brièvement en revue les différents membres de la famille des canaux calciques activés par le potentiel électrique de membrane, leur structure, leur diversité, ainsi que leurs implications physiologiques et physiopathologiques, en m'attardant davantage sur les isoformes plus spécifiquement neuronales, à savoir les canaux de type N et P/Q. Je ferai ensuite une synthèse des données expérimentales obtenues jusqu'à ce jour concernant leur régulation par les récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques, afin d'en dégager ma

problématique de travail. Les résultats obtenus durant ce travail de thèse seront ensuite présentés sous forme d'articles publiés, ou en cours de publication, et finalement discutés sous la forme d'une conclusion générale.

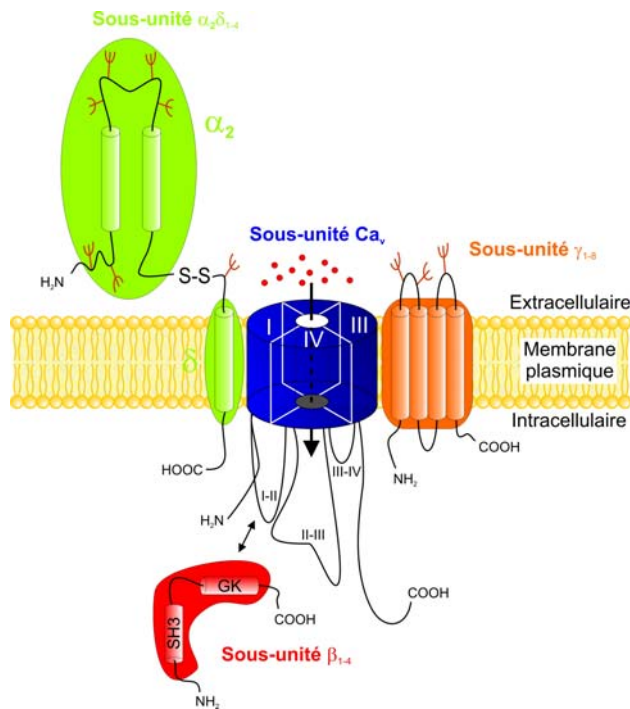
## INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

### Chapitre I. Les CANAUX CALCIQUES ACTIVES par le POTENTIEL

Les canaux calciques activés par le potentiel électrique de membrane ou VGCCs (pour *Voltage-Gated Calcium Channels*), se présentent sous la forme de structures multiprotéiques enchâssées dans la membrane plasmique des cellules excitables. Leur ouverture fait suite à une modification du potentiel électrique de membrane de la cellule, permettant ainsi l'influx de calcium depuis le milieu extracellulaire vers le cytosol, ce flux calcique contrôlant d'importantes fonctions cellulaires comme nous le verrons. Cette section du manuscrit est consacrée à introduire la famille des canaux calciques activés par le potentiel électrique, et présenter leur structure, leur diversité, ainsi que leurs implications physiologiques et physiopathologiques majeures. L'ensemble des membres de la famille des VGCCs sera présenté, mais l'accent sera cependant mis sur les isoformes plus typiquement neuronales, à savoir les canaux de type P/Q et N qui, comme nous pouvons déjà le mentionner, représentent les VGCCs majoritairement affectés par la régulation directe des RCPGs. Nous ne reviendrons pas sur les données historiques relatives à la découverte de ces canaux (pour revue voir (Dolphin, 2006)), seules les données actuelles seront présentées.

#### I. STRUCTURE MOLECULAIRE des VGCCs

Bien que les différents membres de la famille des canaux calciques activés par le potentiel électrique de membrane se différencient de par leurs propriétés biophysiques, pharmacologiques et physiologiques propres, ils possèdent cependant la particularité de présenter une structure moléculaire commune (même si ce concept reste encore à être démontré biochimiquement pour les canaux à bas seuil d'activation comme nous le verrons plus tard). Ainsi, les VGCCs se présentent sous la forme d'une sous-unité principale  $Ca_v$ , responsable entre autre de la perméabilité ionique et de la sensibilité au voltage, centrée autour de sous-unités auxiliaires  $\beta$ ,  $\alpha_2\delta$  et  $\gamma$  (Figure 4) qui modulent d'une part les propriétés biophysiques et pharmacologiques de la sous-unité  $Ca_v$ , et d'autre part son adressage vers la membrane plasmique (pour revue relative aux sous-unités auxiliaires voir (Arikkath et Campbell, 2003)).



**Figure 4. Représentation schématique de la composition moléculaire d'un canal calcique activé par le potentiel électrique de membrane.**

Les VGCCs se présentent sous la forme d'une sous-unité principale  $Ca_v$ , responsable entre autre de la perméabilité ionique, centrée autour de sous-unités auxiliaires  $\beta$ ,  $\alpha_2\delta$  et  $\gamma$ .

### A. La sous-unité principale $Ca_v$

La sous-unité  $Ca_v$  représente le "cœur" du canal calcique sensible au potentiel électrique de membrane. Elle est en effet responsable de la formation du pore ionique, de la sensibilité du canal au voltage, de ses propriétés intrinsèques d'activation et d'inactivation, et enfin de sa sensibilité aux agents pharmacologiques. La sous-unité  $Ca_v$  est en quelque sorte un "canal dans le canal". Toutefois, et comme nous le verrons plus tard, même si la sous-unité  $Ca_v$  est capable, exprimée seule en système d'expression hétérologue (lignées cellulaires ou ovocyte de Xénope), de générer un canal calcique "biophysiquement" fonctionnel (Mori *et al.*, 1991), elle ne suffit pas à former un canal calcique "physiologiquement" performant.

#### 1. Diversité des sous-unités $Ca_v$

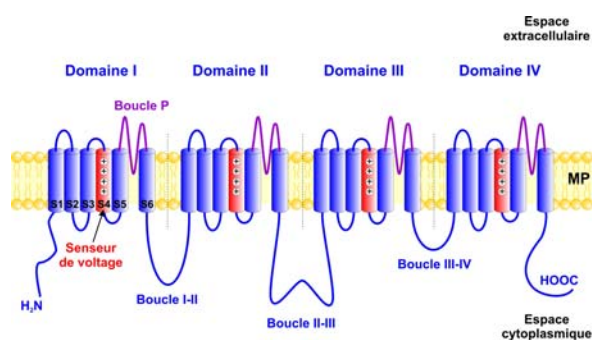
Dix gènes codent pour les différentes sous-unités  $Ca_v$  de Mammifère (Lory et Nargeot, 2004), donnant lieu à dix isoformes distinctes, et à divers types de courants calciques. Ainsi, les canaux calciques activés par le potentiel électrique de membrane se répartissent en trois groupes: (1) le groupe  $Ca_v1.x$  se compose des sous-unités  $Ca_v1.1$ ,  $Ca_v1.2$ ,  $Ca_v1.3$  et  $Ca_v1.4$  et donne lieu aux courants de type L ; (2) le groupe  $Ca_v2.x$  est représenté par les sous-unités  $Ca_v2.1$ ,  $Ca_v2.2$  et  $Ca_v2.3$  et donne lieu aux courants de type P/Q, N et R, respectivement, et enfin (3) le groupe  $Ca_v3.x$  contient les sous-unités  $Ca_v3.1$ ,  $Ca_v3.2$  et  $Ca_v3.3$  et donne lieu aux courants de type T (Ertel *et al.*, 2000). Sur la base de leurs propriétés biophysiques, les sous-

unités  $Ca_v1.x$  et  $Ca_v2.x$  constituent la classe des canaux à haut seuil d'activation ou HVA (pour *High Voltage Activated*), alors que les sous-unités  $Ca_v3.x$  forment la classe des canaux à bas seuil d'activation ou LVA (pour *Low Voltage Activated*). Les propriétés de ces différentes sous-unités  $Ca_v$  seront détaillées plus tard, dans le chapitre consacré aux différents types de VGCCs, à leurs bases moléculaires, à leurs propriétés biophysiques et pharmacologiques, ainsi qu'à leurs implications physiologiques et physiopathologiques. A noter que les sous-unités  $Ca_v$ , au-delà de leurs diversités géniques, présentent un second niveau de diversité par l'existence de variants d'épissage, spécifiques d'un tissu donné (Soong *et al.*, 2002; Bell *et al.*, 2004). Ce second niveau de diversité ouvre des perspectives intéressantes, comme par exemple en terme de stratégies thérapeutiques. Nous en reparlerons dans le cadre des canaux de type N.

## 2. Structure des sous-unités $Ca_v$

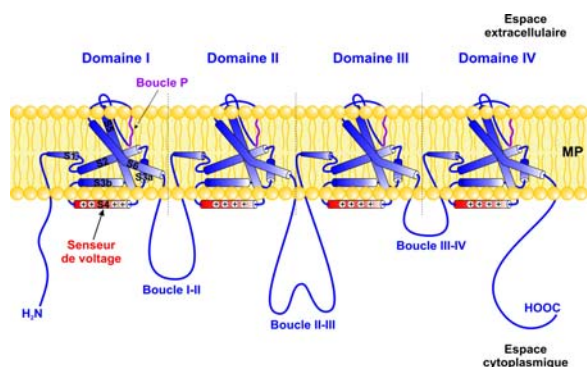
La sous-unité  $Ca_v$  est une protéine membranaire d'environ 2000 acides aminés (aa) chez l'homme (1873 aa pour l'isoforme squelettique  $Ca_v1.1$ , GenBank Q13698 ; 2662 aa pour l'isoforme neuronale  $Ca_v2.1$ , GenBank AF004884), pour un poids moléculaire compris entre 190 et 250 kDa environ. En dépit de données cristallographiques relatives à cette protéine, il a été proposé, sur la base des techniques de prédiction de structure, que la sous-unité  $Ca_v$  pourrait s'organiser sous la forme de quatre domaines transmembranaires (domaines I à IV), constitués chacun de six segments transmembranaires (segments S1 à S6) soit un total de 24 segments transmembranaires (Tanabe *et al.*, 1987). Ces quatre seraient alors reliés entre eux par des boucles cytoplasmiques (boucle I-II reliant les domaines I et II, boucle II-III reliant les domaines II et III et boucle III-IV reliant les domaines III et IV) et encadrés par les extrémités amino-terminale ( $NH_2$ ) et carboxy-terminale ( $COOH$ ), également cytoplasmiques (Figure 5). Cependant, les données cristallographiques relatives à la sous-unité  $K_v$  des canaux potassiques activés par le potentiel électrique de membrane, obtenues ces dernières années par le groupe du Professeur MacKinnon (Jiang *et al.*, 2003b), devraient permettre de réappréhender la topologie membranaire des VGCCs. En effet, les comparaisons de séquences entre les sous-unités  $Ca_v$  et les sous-unités  $K_v$  suggèrent une forte homologie structurale parmi ces deux types de canaux ioniques. Ainsi, bien que l'organisation générale en quatre domaines membranaires soit conservée, il semble désormais possible de préciser l'organisation des segments transmembranaires qui les composent. Les segments S1, bien que toujours membranaires, pourraient être orientés parallèlement à la bicouche lipidique. Les segments S4 quand à eux, seraient non pas transmembranaires mais sous-membranaires, se présentant ainsi

comme des éléments structuraux accessibles à des régulations intracellulaires de la sous-unité  $Ca_v$  (Figure 6). Bien que cette organisation membranaire ne repose pas sur des données cristallographiques propres à la sous-unité  $Ca_v$ , elle présente toutefois le mérite d'intégrer des données structurales, contrairement à la première topologie proposée, qui reposait exclusivement sur l'analyse de séquences et la prédiction de structures. Pour cette raison, nous conserverons dans la suite de ce manuscrit cette dernière topologie, même si elle demeure pour l'heure encore largement controversée (Jones, 2003).



**Figure 5. Topologie membranaire présumée de la sous-unité  $Ca_v$ .** Adapté de (Tanabe *et al.*, 1987).

Sur la base des techniques de prédiction de structure, il a été proposé que la sous-unité  $Ca_v$  pourrait s'organiser sous la forme de quatre domaines transmembranaires (domaines I à IV), constitués chacun de six segments transmembranaires (segments S1 à S6). Les boucles cytoplasmiques I-II, II-III et III-IV relient respectivement les domaines membranaires I et II, II et III, et III et IV. Les extrémités amino-terminale (NH<sub>2</sub>) et carboxy-terminale (COOH), présentent également une orientation cytoplasmique. Les segments S4 (en rouge) de chaque domaine membranaire, riches en résidus basiques (positivement chargés) arginines et lysines constituent le senseur de voltage, alors que les boucles P (en violet) reliant les segments S5 et S6 de chaque domaine membranaire s'organisent pour former le pore ionique.

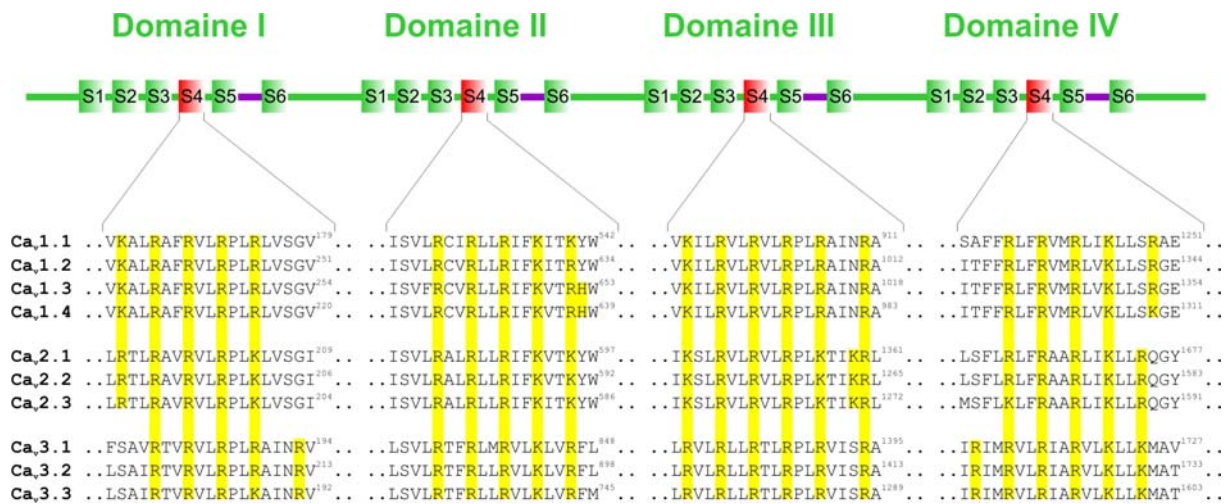


**Figure 6. Topologie membranaire présumée de la sous-unité  $Ca_v$ .** Adapté de (Jiang *et al.*, 2003).

Sur la base des données cristallographiques obtenues sur la sous-unité  $K_v$ , et des comparaisons de séquences entre les sous-unités  $Ca_v$  et  $K_v$ , il est possible de préciser la topologie membranaire présumée de la sous-unité  $Ca_v$ . Ainsi, Les segments S1, toujours membranaires, seraient cependant orientés dans le plan de la bicouche lipidique, alors que les segments S4 seraient non plus transmembranaires mais sous-membranaires.



Comme nous l'avons déjà mentionné, la sous-unité  $Ca_v$  confère au canal calcique sa sensibilité au voltage. Ainsi, les segments S4 de chaque domaine membranaire, de part leur composition riche en résidus basiques arginines (R) et lysines (K) (positivement chargés) (Figure 7), constituent le senseur de voltage et permettraient la détection des changements du potentiel électrique de membrane de la cellule, conduisant à l'ouverture du canal.

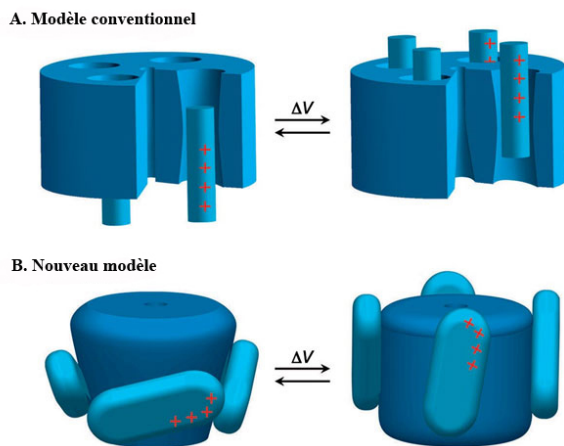


**Figure 7. Analyse protéique comparative des segments S4 des différentes sous-unités  $Ca_v$ .**

Les séquences protéiques humaines des segments S4 des différentes sous-unités  $Ca_v$  ont été comparées grâce au logiciel ClustalW<sup>®</sup>. Le surlignage met en évidence les résidus basiques arginine (R) et lysine (K) positivement chargés, très largement conservés à travers les différentes isoformes des sous-unités  $Ca_v$ . Séquences GenBank relatives:  $Ca_v$ 1.1 (NM000069),  $Ca_v$ 1.2 (NM000719),  $Ca_v$ 1.3 (NM000720),  $Ca_v$ 1.4 (AF201304),  $Ca_v$ 2.1 (X99897),  $Ca_v$ 2.2 (M94172),  $Ca_v$ 2.3 (NM000721),  $Ca_v$ 3.1 (AF134986),  $Ca_v$ 3.2 (AF051946),  $Ca_v$ 3.3 (AF129133).

La mécanistique par laquelle les segments S4 détectent les variations du potentiel électrique de membrane, et permettent l'ouverture du canal, reste mal définie. Là encore, les données obtenues sur la sous-unité  $K_v$  des canaux potassiques permettent d'apporter des précisions. Grâce à l'utilisation de toxines spécifiques des segments S4, il a été mis en évidence que ces derniers pouvaient être exposés au milieu extracellulaire en réponse à une dépolarisation membranaire (Larsson *et al.*, 1996; Yusaf *et al.*, 1996; Swartz et MacKinnon, 1997; Baker *et al.*, 1998). Il a alors été proposé que les segments S4 (transmembranaires dans la première topologie), isolés de la bicouche lipidique par les autres segments transmembranaires (S1, S2 et S3), se déplaceraient à travers la membrane plasmique suivant un mouvement de translation verticale et / ou de rotation, de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule (Figure 8A) (Bezaniilla, 2002; Gandhi et Isacoff, 2002; Horn, 2002). Sur la base des données cristallographiques, il a ensuite été proposé que les segments S4 (sous-membranaires dans la seconde topologie) formeraient un "voltage-sensor paddle", localisé juste sous la membrane plasmique lorsque le

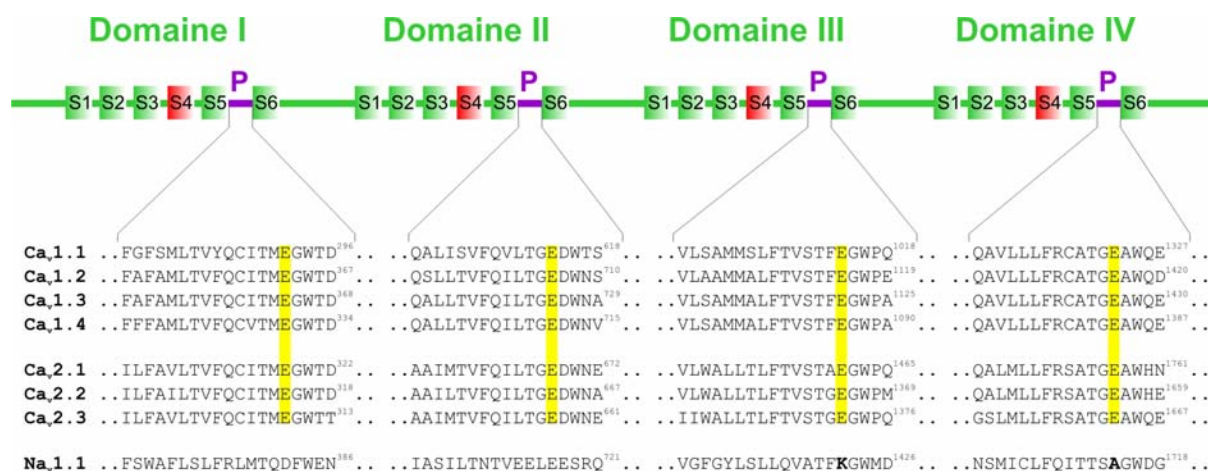
canal est fermé. En réponse à un changement du potentiel électrique de membrane, ce dernier se déplacerait alors à travers la bicouche lipidique, dans le champ électrique, de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule suivant un mouvement de levier, conduisant à l'ouverture du canal (Figure 8B) (Jiang *et al.*, 2003b; Jiang *et al.*, 2003a). A noter que le mouvement du senseur de voltage est responsable d'un courant de porte ou courant de "gating", mesurable par des techniques d'électrophysiologie (nous en reparlerons de ce courant dans le chapitre relatif à la régulation des canaux N par les protéines G hétérotrimériques).



**Figure 8. Modèles hypothétiques des mouvements de charges.** Tiré de (Jiang *et al.*, 2003).

**A.** Modèle conventionnel où les segments S4 transmembranaires, isolés de la bicouche lipidique par les autres segments transmembranaires (S1, S2 et S3), se déplacent à travers la membrane plasmique suivant un mouvement de translation verticale et / ou de rotation de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule. **B.** Nouveau modèle dans lequel les segments S4 sous-membranaires forment un "voltage-sensor paddle", localisé juste sous la membrane plasmique lorsque le canal est fermé, et se déplaçant alors à travers la bicouche lipidique dans le champ électrique, de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule suivant un mouvement de levier conduisant à l'ouverture du canal.

La sous-unité  $Ca_v$  est également responsable de la perméabilité ionique. Les boucles extracellulaires et partiellement transmembranaires, reliant les segments S5 et S6 (boucles P) (Figure 6), s'organisent pour former le pore ionique à proprement parler. Cette structure est également responsable de la sélectivité au calcium. En effet, les boucles P contiennent des acides aminés chargés négativement (acide glutamique, E) (Figure 9), dont la substitution en acides chargés positivement (lysine, K) ou neutres (glycine, G ; ou alanine, A) altère la sélectivité du canal pour le calcium, le rendant alors perméable au sodium (Mikala *et al.*, 1993; Tang *et al.*, 1993). Inversement, la substitution d'une lysine (K) et/ou d'une alanine (A) vers un acide glutamique (E) confère au canal sodique  $Na_v$  une perméabilité au calcium (Heinemann *et al.*, 1992).



**Figure 9 : Analyse protéique comparative des boucle P des différentes sous-unités Ca<sub>v</sub>.**

Les séquences protéiques humaines des boucles P des différentes sous-unités Ca<sub>v</sub> ont été comparées grâce au logiciel ClustalW<sup>®</sup>. Le surlignage met en évidence les acides glutamiques (E) responsables de la sélectivité au calcium, très largement conservés à travers les différentes isoformes des sous-unités Ca<sub>v</sub>. Pour comparaison, la séquence protéique du canal sodique Na<sub>v</sub>1.1 est présentée, dans laquelle les résidus lysine (K) ou alanine (A) (en gras) sont responsables de la sélectivité au sodium. Séquences GenBank relatives: Ca<sub>v</sub>1.1 (NM000069), Ca<sub>v</sub>1.2 (NM000719), Ca<sub>v</sub>1.3 (NM000720), Ca<sub>v</sub>1.4 (AF201304), Ca<sub>v</sub>2.1 (X99897), Ca<sub>v</sub>2.2 (M94172), Ca<sub>v</sub>2.3 (NM000721), Na<sub>v</sub>1.1 (AF225985).

Enfin, les boucles cytoplasmiques représentent des éléments structuraux fondamentaux pour l'activité du canal. Elles comportent des domaines d'interactions avec de nombreuses protéines de régulation (sous-unité β, protéines SNARE,...) (pour revues voir (Walker et De Waard, 1998; Jarvis et Zamponi, 2001; Zamponi, 2003)) et constituent également des éléments d'inactivation du canal (Stotz *et al.*, 2004a). Ces concepts seront abordés dans la suite de ce manuscrit.

### 3. Fonctions des sous-unités Ca<sub>v</sub>

Si les différentes sous-unités Ca<sub>v</sub> possèdent la fonction commune de permettre l'entrée de calcium dans la cellule en réponse à une dépolarisation membranaire, elles sont toutefois à l'origine de divers courants calciques, aux propriétés biophysiques et pharmacologiques distincts, et présentent également des patterns d'expression tissulaire, cellulaire mais également subcellulaire qui leurs sont propres. Pour ces raisons, il apparaît illusoire de vouloir définir une fonction commune aux sous-unités Ca<sub>v</sub>, leurs fonctions respectives seront ainsi détaillées au travers des canaux qu'elles composent.

## B. La sous-unité auxiliaire $\beta$

La sous-unité  $\beta$  représente très certainement la sous-unité régulatrice des VGCCs la plus extensivement étudiée, probablement en raison du fait qu'il s'agit d'une part, de l'une des premières sous-unités auxiliaires clonée (Ruth *et al.*, 1989), et d'autre part, qu'il s'agit d'une protéine entièrement cytosoluble, donc plus facilement manipulable que les protéines membranaires. Pour ces raisons, elle se présente inévitablement comme étant la sous-unité régulatrice majeure des VGCCs. Nous verrons toutefois par la suite que la sous-unité  $\alpha_2\delta$ , longtemps restée en marge de la sous-unité  $\beta$ , apparaît être également fondamentale dans la régulation de la sous-unité  $\text{Ca}_v$ , et plus particulièrement dans la régulation de ses propriétés biophysiques et pharmacologiques.

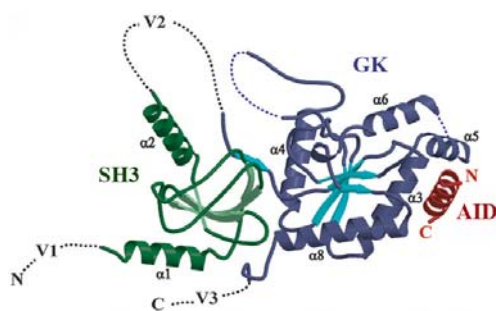
### 1. Diversité des sous-unités $\beta$

Chez les Mammifères, quatre gènes codent pour les différentes sous-unités  $\beta$  des VGCCs, à l'origine des sous-unités  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  et  $\beta_4$  (Birnbaumer *et al.*, 1994). Cette diversité est très largement accrue par l'existence de multiples variants d'épissage, chez l'homme, mais également chez différentes espèces (pour revue voir (Birnbaumer *et al.*, 1998)). Ainsi, quatre variants d'épissage ont été décrits pour la sous-unité  $\beta_1$  ( $\beta_{1a}$ ,  $\beta_{1b}$ ,  $\beta_{1c}$  et  $\beta_{1d}$ ). Le variant  $\beta_{1a}$  (Ruth *et al.*, 1989) est exprimé exclusivement au niveau du muscle squelettique, alors que les variants  $\beta_{1b}$  (Pragnell *et al.*, 1991) et  $\beta_{1c}$  (Williams *et al.*, 1992a; Collin *et al.*, 1993) présentent un pattern d'expression essentiellement neuronal et cardiaque. Quatre variants d'épissage ont également été décrits pour la sous-unité  $\beta_2$  ( $\beta_{2a}$  (Perez-Reyes *et al.*, 1992),  $\beta_{2b}$  (Hullin *et al.*, 1992),  $\beta_{2c}$  et  $\beta_{2d}$  (Castellano et Perez-Reyes, 1994)). Cette isoforme est abondamment exprimée dans le cœur et le cerveau, et en moindre mesure au niveau de l'aorte, de la trachée et des poumons (Ludwig *et al.*, 1997). La sous-unité  $\beta_3$  présente trois variants d'épissage ( $\beta_{3a}$  (Hullin *et al.*, 1992),  $\beta_{3b}$  (Castellano *et al.*, 1993a) et  $\beta_{3c}$  (Castellano et Perez-Reyes, 1994)). Elle est fortement exprimée au niveau du cerveau, et est également présente dans les muscles lisses, la trachée, l'aorte et les poumons (Ludwig *et al.*, 1997). Enfin, la sous-unité  $\beta_4$  présente, quand à elle, deux variants d'épissage ( $\beta_{4a}$  (Castellano *et al.*, 1993b) et  $\beta_{4b}$  (Castellano et Perez-Reyes, 1994)) et est exprimée exclusivement dans le cerveau, avec une prédominance au niveau du cervelet (Ludwig *et al.*, 1997; Vendel *et al.*, 2006b). Ainsi, il apparaît que les quatre isoformes sont présentes dans le cerveau, en plus d'un pattern d'expression tissulaire propre à chacune d'entre elles. A noter que deux homologues de la

sous-unité  $\beta_3$  de Mammifère, ont été décrits dans l'ovocyte de Xénope (Tareilus *et al.*, 1997). Bien que leur fonction dans ce type cellulaire demeure inconnue (ces cellules n'expriment pas de VGCCs), il apparaît toutefois important de prendre en considération leur présence. En effet, l'ovocyte de Xénope est couramment utilisé comme système d'expression hétérologue pour l'étude des canaux ioniques, et des canaux calciques en particulier. Ainsi, bien que l'expression d'une sous-unité  $\beta$  exogène confère à la sous-unité  $\text{Ca}_v$  coexprimée des propriétés biophysiques très caractéristiques comme nous le verrons plus tard, il n'est pas à exclure que la présence de sous-unités  $\beta$  endogènes puisse, lorsque la sous-unité  $\text{Ca}_v$  est exprimée seule, jouer un rôle mineur, le rapport stochiométrique  $\text{Ca}_v / \beta$  restant toutefois très largement en défaveur des protéines endogènes.

## 2. Structure des sous-unités $\beta$

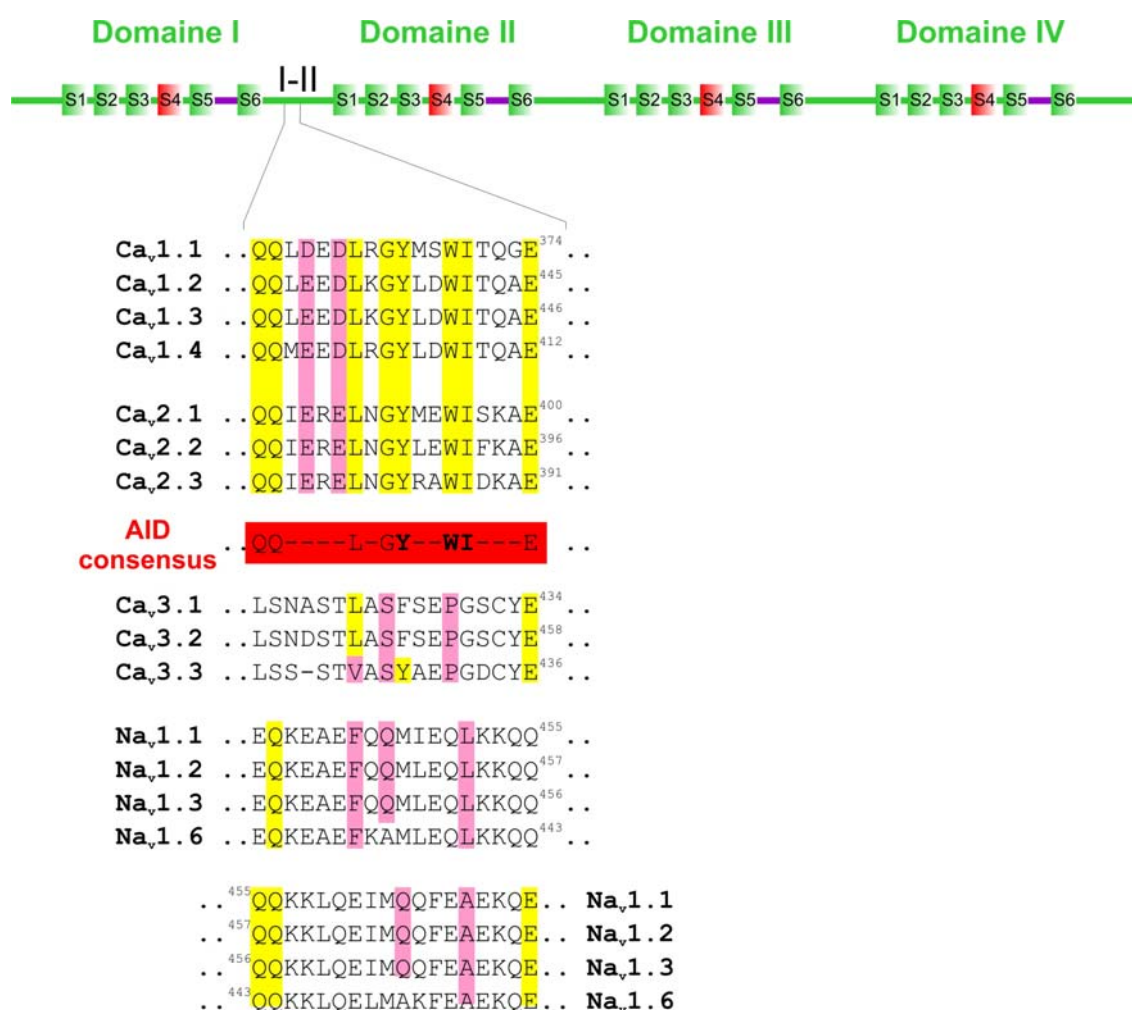
La sous-unité  $\beta$  est une protéine entièrement cytosoluble, et appartient à la famille protéique des guanylates kinases. D'un poids moléculaire compris entre 52 et 76 kDa, elle se compose de cinq domaines distincts (A, B, C, D et E) initialement décrits sur la base des comparaisons de séquences des différentes isoformes (pour revue voir (Dolphin, 2003)). Alors que les domaines A, C et E apparaissent être très variables, les domaines B et D sont, quand à eux, extrêmement conservés, et présentent des homologies structurales avec les motifs SH3 (pour *Src Homology-3*) et GK (pour *Guanylate Kinase*), respectivement, ce dernier ne présentant pas nécessairement une activité enzymatique. La sous-unité  $\beta$  représente la sous-unité des VGCCs pour laquelle nous disposons actuellement du plus d'informations structurales. En effet, 17 ans après la première description d'une sous-unité  $\beta$  dans le complexe protéique formant un VGCC (Takahashi *et al.*, 1987), la structure cristallographique du cœur de la protéine (domaines B-D) a été élucidée (Chen *et al.*, 2004; Opatowsky *et al.*, 2004; Van Petegem *et al.*, 2004) (Figure 10).



**Figure 10. Représentation schématique de la structure cristallographique d'une sous-unité  $\beta$  complexée avec l'AID d'une sous-unité  $\text{Ca}_v$ .** Tiré de (Van Petegem *et al.*, 2004).

La structure cristallographique de la sous-unité  $\beta_{2a}$  complexée avec l'AID (pour *Alpha Interaction Domain*) de la sous-unité  $\text{Ca}_v1.2$  a été déterminée. Le cœur de la sous-unité  $\beta$  consiste en un domaine SH3 (pour *Src Homology-3*) (en vert) et un domaine GK (pour *Guanylate Kinase*) (en bleu). Les domaines V1, V2 et V3, non structurés dans cette représentation, correspondent aux domaines hypervariables. Le domaine AID (en rouge), interagit via une poche électrostatique ou ABP (pour *AID Binding Pocket*) formée par le domaine GK de la sous-unité  $\beta$ .

Ainsi, ces données structurales ont apporté des informations précieuses sur les déterminants moléculaires de l'interaction entre la sous-unité  $\beta$  et la sous-unité  $\text{Ca}_v$ . Il avait initialement été proposé que la sous-unité  $\beta$  interagirait avec la sous-unité  $\text{Ca}_v$  via les domaines BID (pour *Beta Interaction Domain*) de 30 acides aminés (De Waard *et al.*, 1994) et AID (pour *Alpha Interaction Domain*) de 18 acides aminés (Figure 11) (Pragnell *et al.*, 1994), présents respectivement, dans le domaine GK de la sous-unité  $\beta$ , et dans la boucle I-II reliant les domaines membranaires I et II de la sous-unité  $\text{Ca}_v$ .

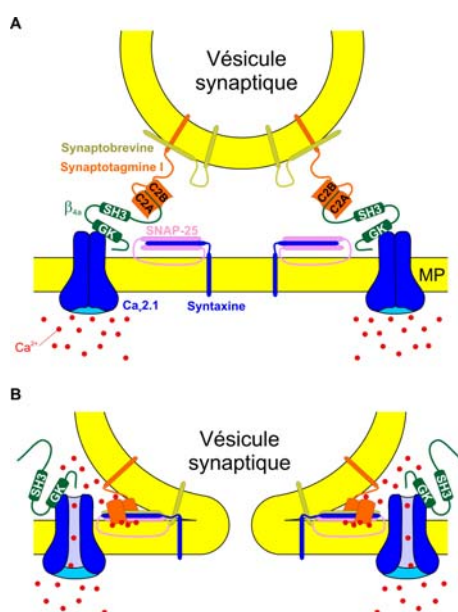


**Figure 11. Analyse protéique comparative du domaine AID des différentes sous-unités  $\text{Ca}_v$ .**

Les séquences protéiques humaines du domaine AID (pour *Alpha Interaction Domain*) présent dans la boucle cytoplasmique I-II des sous-unités  $\text{Ca}_v1.x$  et  $\text{Ca}_v2.x$  ont été comparées grâce au logiciel ClustalW<sup>®</sup>, permettant d'identifier la séquence AID consensus. Cette séquence consensus n'est que partiellement retrouvée dans les sous-unités  $\text{Ca}_v3.x$  ainsi que dans les sous-unités  $\text{Na}_v1.x$  des canaux sodiques. Le surlignage jaune indique une conservation d'identité de l'acide aminé, le surlignage violet indique une conservation de charge. Les acides aminés Y, W et I (en gras dans les séquences consensus) sont essentiels à l'interaction entre le domaine AID et la sous-unité  $\beta$ . Séquences GenBank relatives:  $\text{Ca}_v1.1$  (NM000069),  $\text{Ca}_v1.2$  (NM000719),  $\text{Ca}_v1.3$  (NM000720),  $\text{Ca}_v1.4$  (AF201304),  $\text{Ca}_v2.1$  (X99897),  $\text{Ca}_v2.2$  (M94172),  $\text{Ca}_v2.3$  (NM000721),  $\text{Ca}_v3.1$  (AF134986),  $\text{Ca}_v3.2$  (AF051946),  $\text{Ca}_v3.3$  (AF129133),  $\text{Na}_v1.1$  (AF225985),  $\text{Na}_v1.2$  (NM021007),  $\text{Na}_v1.3$  (NM006922),  $\text{Na}_v1.6$  (AF225988).

Récemment, suite à la co-cristallisation de la sous-unité  $\beta_{2a}$  en présence du peptide AID, le domaine BID a été remplacé par la notion de ABP (pour *AID-Binding Pocket*) (Van Petegem *et al.*, 2004). En effet, si les données structurales ont bien confirmés l'implication du domaine AID dans l'interaction avec la sous-unité  $\beta$ , elles apparaissent en revanche en désaccord partiel avec les données fonctionnelles concernant le domaine BID. Ainsi, il serait intéressant, sur la base des données structurales, de redéfinir par des études fonctionnelles, les acides aminés cruciaux de l'ABP impliqués dans l'interaction avec l'AID.

Enfin, si les sous-unités  $\beta$  présentent toute une structure de base commune, il est important de noter que les domaines hypervariables A, C et E confèrent aux différentes isoformes et variants d'épissage des propriétés structurales et fonctionnelles spécifiques. Par exemple, la sous-unité  $\beta_{2a}$  présente dans son extrémité amino-terminale deux cystéines capables d'être palmitoylées, permettant son ancrage dans la membrane plasmique (Chien *et al.*, 1996). La sous-unité  $\beta_4$  est capable d'interagir également avec les extrémités amino- et carboxy-terminales de la sous-unité  $Ca_v2.1$  via son domaine E (Walker *et al.*, 1998; Walker *et al.*, 1999). Plus récemment, il a été mis en évidence que le domaine A du variant d'épissage humain  $\beta_{4a}$ , présente une structure en hélice  $\alpha$  qui lui est spécifique (Vendel *et al.*, 2006a), à l'origine d'une interaction avec la synaptotagmine I (Vendel *et al.*, 2006b), permettant de proposer que ce variant d'épissage pourrait avoir un rôle particulier dans le couplage des VGCCs avec la machinerie de libération des neuromédiateurs (Figure 12) (Annexe 1) (Weiss, 2006).



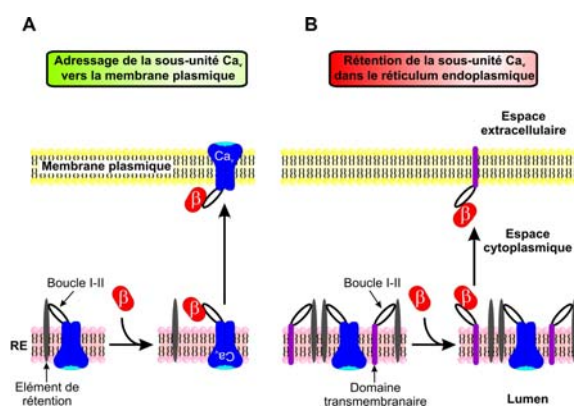
**Figure 12. Modèle hypothétique de couplage entre les canaux calciques activés par le potentiel, la signalisation calcique et la machinerie de libération des vésicules présynaptiques.** Tiré de (Weiss, 2006).

**A.** Au repos, la concentration cytosolique en calcium libre est faible et la sous-unité  $\beta_{4a}$  interagit à la fois avec la sous-unité  $Ca_v2.1$  et la synaptotagmine I (Syt I), permettant de positionner la vésicule synaptique proche du canal afin d'assurer le couplage entre la signalisation calcique et la libération des neuromédiateurs. **B.** L'entrée de calcium dans la cellule via la sous-unité  $Ca_v2.1$  suite à une dépolarisation membranaire rompt l'interaction  $\beta_{4a}$ -Syt I. Le contenu de la vésicule synaptique est alors libéré suite à sa fusion avec la membrane plasmique et après interaction moléculaire entre les protéines v-SNAREs (synaptobrevine et synaptotagmine I) et t-SNAREs (syntaxine et SNAP 25).

Nous verrons dans la section suivante que ces spécificités structurales sont ainsi à l'origine de spécificités fonctionnelles.

### 3. Fonctions des sous-unités $\beta$

Pour l'heure, les fonctions essentielles de la sous-unité  $\beta$  concernent la régulation des VGCCs. Elle est ainsi impliquée dans deux grande voies de régulation de la sous-unité  $Ca_v$  : (1) son adressage vers membrane plasmique depuis le réticulum endoplasmique et, (2) la régulation des ses propriétés biophysiques. Vis-à-vis son implication dans l'adressage de la sous-unité  $Ca_v$  vers la membrane plasmique, il a été proposé que la boucle cytoplasmique reliant les domaines I et II de la sous-unité  $Ca_v$ , contiendrait un signal de rétention dans le réticulum endoplasmique, non identifié à ce jour, qui serait alors masqué suite à la fixation d'une sous-unité  $\beta$  sur le domaine AID, permettant alors l'adressage fonctionnel de la sous-unité  $Ca_v$  vers la membrane plasmique (Figure 13A) (Bichet *et al.*, 2000). Ainsi, la surexpression dans des cellules chromaffines de la protéine de fusion CD8-I-II (contenant le domaine transmembranaire de l'antigène CD8 en fusion avec la boucle I-II de la sous-unité  $Ca_v2.1$ ) permet de réduire considérablement le niveau d'expression des canaux calciques à haut seuil d'activation, par séquestration des sous-unités  $\beta$  endogènes (fonction "dominant négatif") (Figure 13B) (Cuchillo-Ibanez *et al.*, 2003).

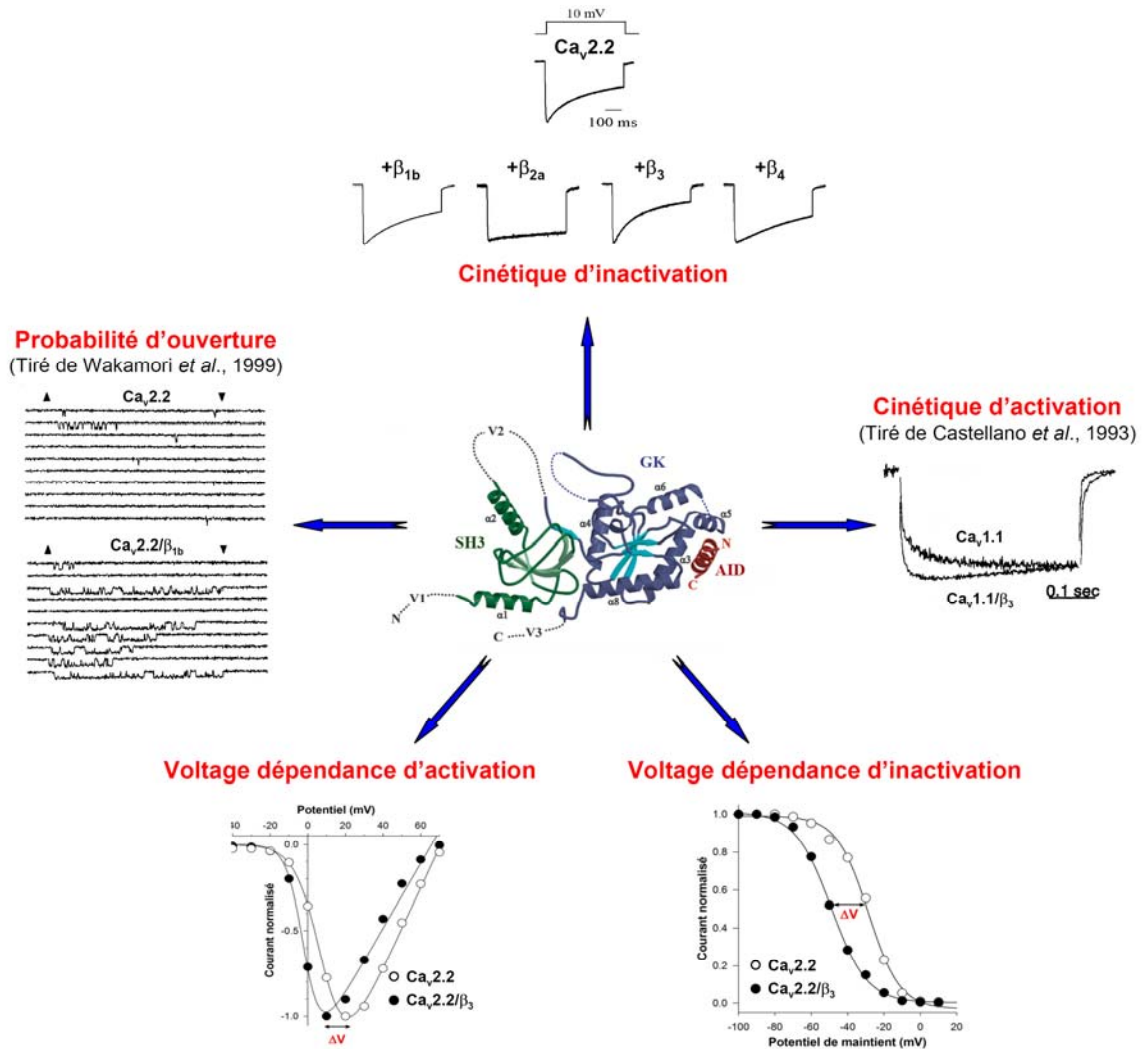


**Figure 13. Mécanismes moléculaires de l'adressage fonctionnel de la sous-unité  $Ca_v$  vers la membrane plasmique.** Tiré de (Weiss et De Waard, 2006) et adapté de (Bichet *et al.*, 2000).

**A.** Après sa synthèse, et en l'absence de sous-unité  $\beta$ , la sous-unité  $Ca_v$  (en bleu) est retenue au niveau du réticulum endoplasmique (RE) via une interaction entre la boucle cytoplasmique I-II et un élément de rétention présumé (en gris). L'expression d'une sous-unité  $\beta$  (en rouge) lève cette rétention par interaction avec la boucle cytoplasmique I-II de la sous-unité  $Ca_v$ , et ceci quelle que soit l'isoforme  $\beta$ . Suite à cette interaction, le complexe  $Ca_v/\beta$  est adressé vers la membrane plasmique. **B.** Il est possible d'interférer avec le processus d'adressage de la sous-unité  $Ca_v$  vers la membrane plasmique en surexprimant une protéine chimère (en violet) constituée d'un domaine transmembranaire et de la boucle cytoplasmique I-II de la sous-unité  $Ca_v$ . Après sa synthèse, la protéine chimère est retenue, au même titre que la sous-unité  $Ca_v$ , au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique via une interaction entre la boucle I-II et l'élément de rétention. La surexpression de la protéine chimère vis-à-vis de la sous-unité  $Ca_v$ , entraîne la séquestration des sous-unités  $\beta$  au niveau de la membrane plasmique, exerçant un rôle de dominant négatif de l'adressage de la sous-unité  $Ca_v$  vers la membrane plasmique.



Au-delà de ses fonctions d'adressage, la sous-unité  $\beta$  joue un rôle majeur dans la modulation des propriétés biophysiques de la sous-unité  $\text{Ca}_v$  (Figure 14) (pour revue voir (Walker et De Waard, 1998)).



**Figure 14. Exemples représentatifs des effets de la sous-unité  $\beta$  sur les propriétés biophysiques de la sous-unité  $\text{Ca}_v$ .**

La sous-unité  $\beta$  exerce un certain nombre de modifications biophysiques sur l'activité de la sous-unité  $\text{Ca}_v$  : (1) hyperpolarisation de la voltage dépendance d'activation et d'inactivation, (2) accélération de la cinétique d'activation, (3) altération de la cinétique d'inactivation de manière isoforme dépendante et (4) augmentation de la probabilité d'ouverture du canal au niveau unitaire. A noter que l'amplitude de ces effets sont variables suivant le couple  $\text{Ca}_v / \beta$  considéré.

Aussi, l'ensemble des sous-unités  $\beta$  hyperpolarise la courbe d'activation des sous-unités  $\text{Ca}_v1.x$  et  $\text{Ca}_v2.x$ , ainsi que la courbe d'inactivation à l'état stable des sous-unités  $\text{Ca}_v2.x$ . La sous-unité  $\beta$  est également responsable de l'accélération de la cinétique d'activation des sous-unités  $\text{Ca}_v1.x$  (Castellano et al., 1993a), et affecte la cinétique d'inactivation des sous-unités

Ca<sub>v</sub>1.x et Ca<sub>v</sub>2.x de manière dépendante de l'isoforme  $\beta$  considérée. Aussi, leur cinétique d'inactivation est accélérée en présence des sous-unités  $\beta_1$ ,  $\beta_3$  et  $\beta_4$ , alors qu'elle est drastiquement ralentie en présence de la sous-unité  $\beta_{2a}$ . A noter que le domaine aminoterminal de la sous-unité  $\beta$  est un élément majeur par lequel elle module l'inactivation de la sous-unité Ca<sub>v</sub>, indépendamment de ses effets sur la cinétique d'activation (Olcese *et al.*, 1994). Enfin, au niveau unitaire, la sous-unité  $\beta$  est également à l'origine d'une augmentation de la probabilité d'ouverture du canal (Wakamori *et al.*, 1999), en partie due au shift hyperpolarisant de sa courbe d'activation.

Comme nous venons de le voir, différents éléments structuraux de la sous-unité  $\beta$  sont à l'origine de différents effets fonctionnels. Toutefois, toute régulation de la sous-unité Ca<sub>v</sub> nécessite en premier lieu la fixation de la sous-unité  $\beta$  sur le domaine AID de la boucle I-II. L'analyse des séquences protéiques des différentes sous-unités Ca<sub>v</sub> révèle que seules les sous-unités Ca<sub>v</sub>1.x et Ca<sub>v</sub>2.x possèdent ce domaine, les sous-unités Ca<sub>v</sub>3.x ne présentant qu'une faible homologie (Figure 11). Ainsi, il apparaît que seuls les canaux calciques de type HVA peuvent être soumis à la régulation de la sous-unité  $\beta$ , et aucune évidence biochimique n'a permis de mettre en évidence une interaction entre une sous-unité  $\beta$  et une sous-unité Ca<sub>v</sub>3.x. Il a toutefois été montré que la sous-unité  $\beta_{1b}$  est capable d'augmenter l'expression fonctionnelle des sous-unités Ca<sub>v</sub>3.1 (Dolphin *et al.*, 1999), Ca<sub>v</sub>3.2 et Ca<sub>v</sub>3.3 (Dubel *et al.*, 2004), en facilitant leur adressage à la membrane plasmique, sans pour autant en affecter les caractéristiques biophysiques. Il est bien difficile à l'heure actuelle de trouver une explication rationnelle de l'effet de la sous-unité  $\beta$  sur la sous-unité Ca<sub>v</sub>3.x. Il est possible d'imaginer qu'il existe un second mécanisme moléculaire d'adressage des sous-unités Ca<sub>v</sub>3.x différent de celui des sous-unités Ca<sub>v</sub>1.x et Ca<sub>v</sub>2.x, ne nécessitant pas la fixation de la sous-unité  $\beta$  sur la boucle I-II. Le fait que seule la sous-unité  $\beta_{1b}$  soit capable de moduler l'adressage des sous-unités Ca<sub>v</sub>3.x suggère qu'elle interagit via une séquence présente dans un domaine hypervariable (A, C ou E) qui lui est spécifique, ne mettant ainsi pas en jeu l'interaction ABP / AID. Mais il est également possible que la "pseudo" séquence AID des sous-unités Ca<sub>v</sub>3.x, malgré sa faible homologie, soit suffisante pour interagir avec l'ABP et faciliter ainsi l'adressage des sous-unités Ca<sub>v</sub>3.x vers la membrane plasmique. En effet, une étude récente suggère que la sous-unité  $\beta$  exercerait ses effets modulateurs indépendamment d'une interaction de forte affinité avec le domaine AID, seule l'occupation du site d'interaction semblant nécessaire (Butcher *et al.*, 2006). En effet, la mutation de la tyrosine (Y) en sérine (S) dans le domaine AID de la sous-unité Ca<sub>v</sub>2.2 diminue l'affinité de la sous-unité  $\beta_{1b}$  d'un

facteur 20 environ, ses effets fonctionnels n'étant pas altérés pour autant. Dans ce contexte, il serait alors intéressant de regarder si la sous-unité  $\beta$  des VGCCs ne serait pas également capable de moduler les canaux sodiques ( $\text{Na}_v$ ) sensibles au potentiel électrique de membrane. Ces canaux présentent en effet une "pseudo" séquence AID, avec trois acides aminés conservés et deux acides aminés de même homologie (Figure 11).

Enfin, si les fonctions de la sous-unité  $\beta$  étaient jusqu'à ce jour centrées sur la structure et la régulation des VGCCs, des études récentes suggèrent désormais qu'elle serait également impliquée dans des fonctions plus générales de régulation génique (Hibino *et al.*, 2003).

### C. La sous-unité $\alpha_2\delta$

La sous-unité  $\alpha_2\delta$  représente, au même titre que la sous-unité  $\beta$ , un élément structural et fonctionnel des VGCCs, même si là encore, aucune évidence biochimique n'a permis de mettre en évidence son association avec les canaux calciques de type LVA. Cette sous-unité n'ayant pas fait l'objet de cette thèse, seules quelques données structurales et fonctionnelles seront brièvement présentées.

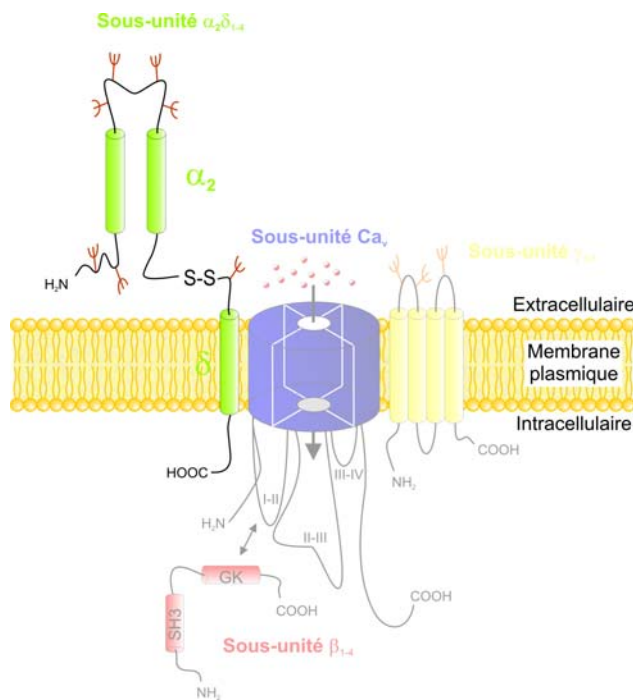
#### 1. Diversité des sous-unités $\alpha_2\delta$

Quatre gènes localisés sur les chromosomes humains 7q21-q22, 3p21.3, 3p21.1 et 12p13.3 codent respectivement pour les sous-unités  $\alpha_2\delta_1$ ,  $\alpha_2\delta_2$ ,  $\alpha_2\delta_3$  (Klugbauer *et al.*, 1999) et  $\alpha_2\delta_4$  (Qin *et al.*, 2002). Les sous-unités  $\alpha_2\delta_1$  et  $\alpha_2\delta_3$  sont exprimées essentiellement dans le cerveau, le coeur et le muscle squelettique, alors que la sous-unité  $\alpha_2\delta_2$  se distribue également dans les poumons, le pancréas, les testicules, la prostate et la moelle épinière. La sous-unité  $\alpha_2\delta_4$  ne présente quand à elle pas d'expression neuronale, et se localise dans le coeur, le muscle squelettique, l'intestin, le foie foetal, les érythroblastes, les reins et la glande pituitaire (pour revues voir (Arikkath et Campbell, 2003; Klugbauer *et al.*, 2003)).

#### 2. Structure des sous-unités $\alpha_2\delta$

Il s'agit d'une protéine d'un poids moléculaire d'environ 125 kDa, qui présente la particularité de subir un clivage post-traductionnel entre la sous-unité  $\alpha_2$  et  $\delta$ , les deux sous-unités restant alors liées entre elles par l'intermédiaire de ponts dissulfures. Cette protéine, ancrée dans la membrane plasmique par l'intermédiaire du domaine  $\delta$ , présente une

orientation extracellulaire du domaine  $\alpha_2$ , lequel peut être fortement glycosylé (Figure 15) (pour revue voir (Walker et De Waard, 1998)).

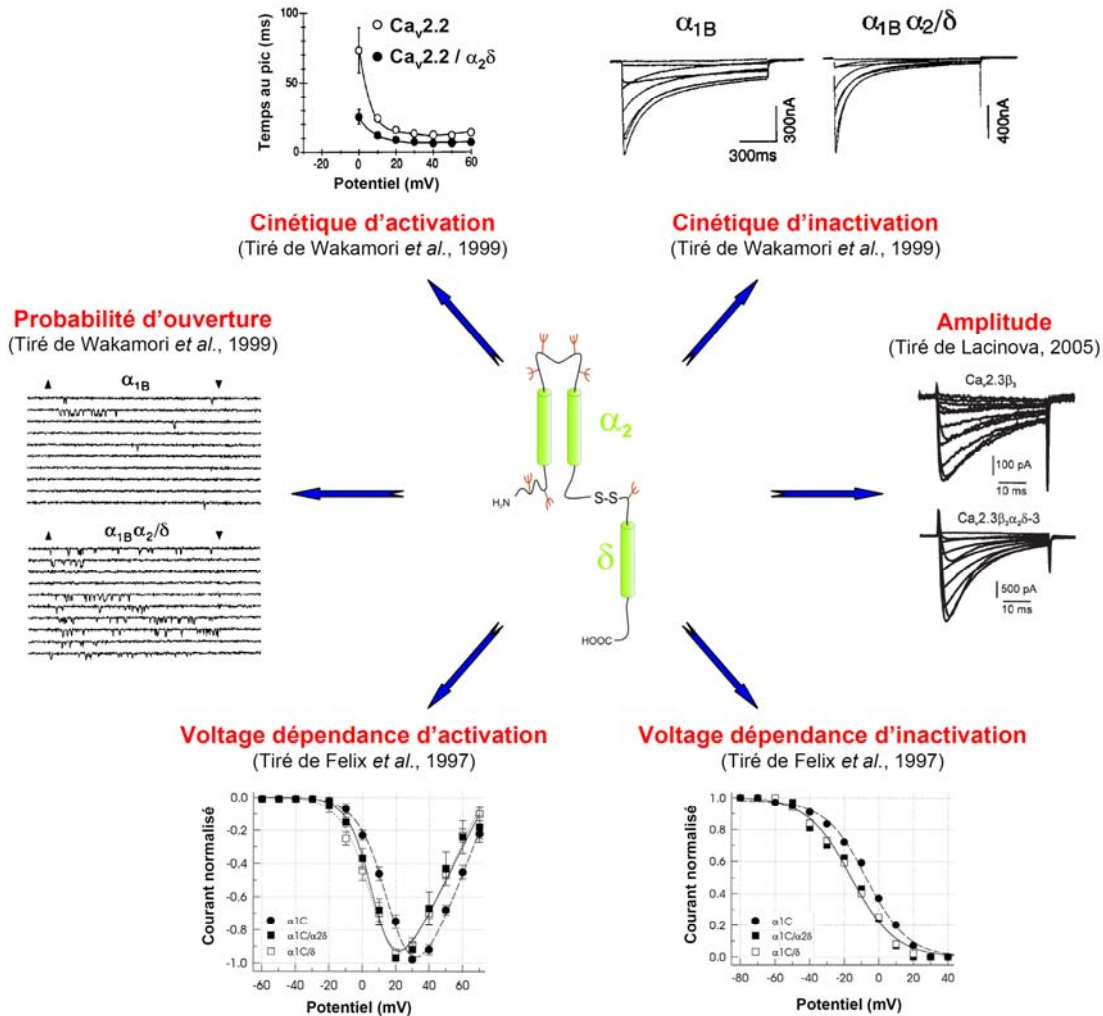


**Figure 15. Topologie membranaire présumée de la sous-unité  $\alpha_2\delta$ .**

Suite à un clivage post-traductionnel, la sous-unité  $\alpha_2\delta$  se présente sous la forme d'une sous-unité  $\delta$  transmembranaire reliée par l'intermédiaire de ponts dissulfures à une sous-unité  $\alpha_2$  extracellulaire et fortement glycosylée.

### 3. Fonctions des sous-unités $\alpha_2\delta$

Au même titre que la sous-unité  $\beta$ , la sous-unité  $\alpha_2\delta$  participe à l'adressage membranaire de la sous-unité  $\text{Ca}_v$  (Shistik *et al.*, 1995; Lacinova, 2005), et joue également un rôle important dans la modulation de ses propriétés biophysiques (Figure 16). Ainsi, suivant l'isoforme considérée, il a été relevé une accélération des cinétiques d'activation et d'inactivation (Wakamori *et al.*, 1999) de la sous-unité  $\text{Ca}_v$ , ainsi qu'une hyperpolarisation de ses courbes d'activation et d'inactivation à l'état stable (Felix *et al.*, 1997; Klugbauer *et al.*, 1999). La sous-unité  $\alpha_2\delta$  augmente également la probabilité d'ouverture de la sous-unité  $\text{Ca}_v2.2$ , indépendamment de la présence ou non d'une sous-unité  $\beta$  (Wakamori *et al.*, 1999). A noter que l'ensemble de ces modulations biophysiques sont très largement dépendantes du couple  $\text{Ca}_v / \alpha_2\delta$  considéré (pour revue voir (Arikkath et Campbell, 2003)).



**Figure 16. Exemples représentatifs des effets fonctionnels de la sous-unité  $\alpha_2\delta$  sur les propriétés biophysiques de la sous-unité  $Ca_v$ .**

La sous-unité  $\alpha_2\delta$  exerce un certain nombre de modifications biophysiques sur l'activité de la sous-unité  $Ca_v$  : (1) augmentation de l'amplitude du courant, (2) altération de la voltage dépendance d'activation et d'inactivation, (3) accélération de la cinétique d'activation, (4) altération de la cinétique d'inactivation et (5) augmentation de la probabilité d'ouverture du canal au niveau unitaire. A noter que l'existence et l'amplitude de ces effets sont variables suivant le couple  $Ca_v / \alpha_2\delta$  considéré.

Toutefois, ce qui fait aujourd'hui l'intérêt de la sous-unité  $\alpha_2\delta$ , est sa potentielle implication dans la nociception. Il a ainsi été relevé une augmentation de l'expression de la sous-unité  $\alpha_2\delta_1$  au niveau des neurones sensoriels des ganglions spinaux de la moelle épinière, en réponse à une lésion du système nerveux périphérique, associée au développement de douleurs allodyniques (Newton *et al.*, 2001). Cette surexpression n'affectant ni l'expression de la sous-unité  $Ca_v2.2$ , ni celle des sous-unités  $\beta$  (Luo *et al.*, 2001). L'injection intrathécale d'oligonucléotides antisens, visant à diminuer le niveau d'expression de la sous-unités  $\alpha_2\delta_1$ , confère aux animaux un effet anti-allodynie (Li *et al.*, 2004). De plus, l'injection intrathécale de gabapentine (un anticonvulsif et antiépileptique), capable d'interagir *in vitro* avec les sous-

unités  $\alpha_2\delta$  (Gee *et al.*, 1996; Davies *et al.*, 2006), diminue également les douleurs allodyniques sur ces modèles animaux. Ces données suggèrent que les sous-unités  $\alpha_2\delta$  sont impliquées dans le développement des douleurs allodyniques indépendamment de leur fonction de régulation des VGCCs. Dans ce contexte, la sous-unité  $\alpha_2\delta$  se présente comme une protéine à fort intérêt thérapeutique, et fait désormais l'objet de nombreuses études. Aussi, il est intéressant de noter que les sous-unités  $\beta$  et  $\alpha_2\delta$ , après avoir été extensivement étudiées dans le cadre de la régulation des VGCCs, se révèlent également être impliquées dans d'autres fonctions cellulaires, permettant de reconsidérer ces protéines dans d'autres contextes.

#### **D. La sous-unité $\gamma$**

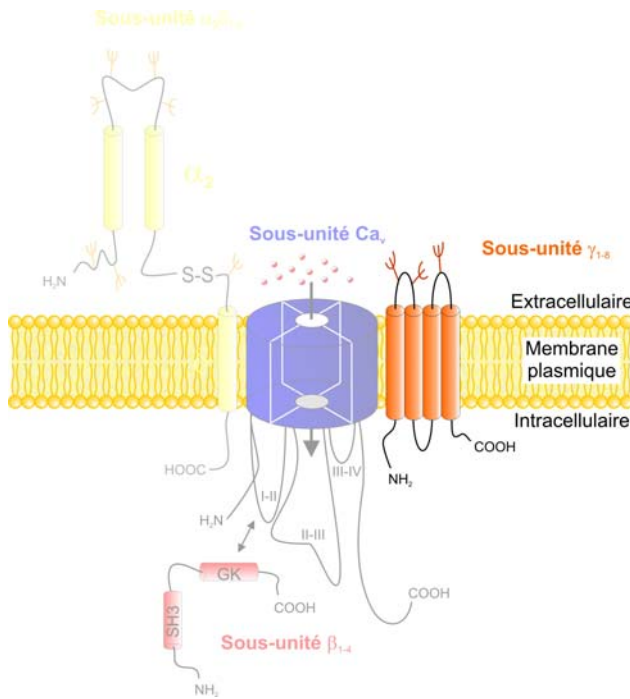
Initialement, la sous-unité  $\gamma$  a été décrite comme étant associée uniquement à la sous-unité  $\text{Ca}_v1.1$  du muscle squelettique (Jay *et al.*, 1990). Depuis, de nombreuses isoformes ont été clonées, et il apparaît que cette sous-unité fasse désormais partie intégrante de la composition moléculaire des VGCCs (même si leurs implications dans la composition des canaux LVA prêtent à discussion) au même titre que les sous-unités  $\beta$  et  $\alpha_2\delta$ .

##### **1. Diversité des sous-unités $\gamma$**

Pour l'heure, huit gènes répartis sur les chromosomes humains 16, 17, 19 et 22 codent pour les sous-unités  $\gamma_1$  à  $\gamma_8$ . Comme les sous-unités  $\alpha_2\delta$ , elles sont exprimées dans de nombreux tissus, incluant le cerveau, la moelle épinière, le muscle squelettique, le muscle lisse, le cœur, les poumons, la prostate ou encore les testicules (pour revue voir (Arikkath et Campbell, 2003; Black, 2003)).

##### **2. Structure des sous-unités $\gamma$**

La sous-unité  $\gamma$  est une protéine d'un poids moléculaire compris entre 25 kDa et 45 kDa suivant l'isoforme considérée (pour revue voir (Kang et Campbell, 2003)). D'un point de vue structural, les analyses de séquences suggèrent qu'elle pourrait s'organiser sous la forme de quatre hélices transmembranaires (cinq pour les isoformes  $\gamma_5$  et  $\gamma_7$  (Moss *et al.*, 2002)) avec des extrémités amino et carboxy-terminales orientées du côté cytoplasmique (Figure 17).



**Figure 17. Topologie membranaire présumée de la sous-unité  $\gamma$ .**

La sous-unité  $\gamma$  pourrait s'organiser sous la forme de quatre hélices transmembranaires (cinq pour les isoformes  $\gamma_5$  et  $\gamma_7$ ) avec des extrémités amino- et carboxy-terminales orientées du côté cytoplasmique.

### 3. Fonctions des sous-unités $\gamma$

Contrairement aux sous-unités  $\beta$  et  $\alpha_2\delta$ , la sous-unité  $\gamma$  n'affecte pas l'adressage membranaire de la sous-unité  $\text{Ca}_v$ , seules des effets sur la modulation des propriétés biophysiques de la sous-unité  $\text{Ca}_v$  ont été relevés. Ainsi, les sous-unités  $\gamma_1$  et  $\gamma_2$  sont à l'origine d'une inhibition des courants calciques soutenus par les sous-unités  $\text{Ca}_v2.1$  et  $\text{Ca}_v2.2$ , ainsi que d'une altération de leurs cinétiques d'activation et d'inactivation (Kang *et al.*, 2001). La sous-unité  $\gamma_7$  est également responsable d'une réduction drastique des courants soutenus par la sous-unité  $\text{Ca}_v2.2$  (Moss *et al.*, 2002). Il apparaît ainsi que la sous-unité  $\gamma$  exercerait plutôt des effets de type "perte de fonctions", contrairement aux sous-unités régulatrices  $\beta$  et  $\alpha_2\delta$ . Ainsi, si les sous-unités  $\beta$  et  $\alpha_2\delta$  se présentent généralement comme la régulation "On" de la sous-unité  $\text{Ca}_v$ , la sous-unité  $\gamma$  exercerait plutôt une régulation de type "Off", permettant ensemble de contrôler plus finement l'entrée de calcium dans la cellule via les VGCCs.

## II. DIVERSITE et FONCTIONS des CANAUX HVA

La sous-famille des canaux calciques à haut seuil d'activation (HVA) se compose des canaux de type L, P/Q, N et R. Ces canaux présentent la particularité commune de s'activer pour de fortes dépolarisations membranaires, par opposition aux canaux à bas seuil d'activation (LVA). Ce chapitre sera consacré essentiellement à présenter les différents membres composants ce groupe, ainsi que leurs implications respectives majeures dans les processus physiologiques et physiopathologiques. Lorsque cela sera possible, leur implication dans les processus cellulaires neuronaux sera plus largement développée. Leurs propriétés moléculaires, biophysiques et pharmacologiques seront synthétisées sous la forme de tableaux, tirés d'une excellente revue du Professeur Catterall (Catterall *et al.*, 2005).

### A. Les sous-unités $Ca_v1.x$ et les courants de type L

Les canaux de type L (pour *Long Lasting*) doivent leur nom au fait qu'ils présentent une cinétique d'inactivation très lente. Initialement décrits dans le muscle squelettique où ils participent au couplage excitation-contraction suivant un mécanisme de VICR, ces canaux se sont par la suite révélés être présents dans la majorité des cellules excitables au regard de l'isoforme considérée, à l'origine de fonctions cellulaires multiples, telles que la plasticité synaptique, la vision, l'expression génique ou la libération hormonale. Quatre sous-unités sont responsables des courants de type L :  $Ca_v1.1$ ,  $Ca_v1.2$ ,  $Ca_v1.3$  et  $Ca_v1.4$ , chacune présentant des propriétés biophysiques et fonctionnelles propres. D'un point de vue pharmacologique, ces sous-unités présentent la particularité commune d'être inhibées par les dihydropyridines.

#### 1. $Ca_v1.1$ : le "récepteur aux dihydropyridines du muscle squelettique"

La sous-unité  $Ca_v1.1$  (Tableau I) est spécifiquement exprimée dans le muscle squelettique, où elle participe au couplage excitation-contraction par mobilisation des stocks calciques du réticulum sarcoplasmique via le récepteur à la ryanodine (RyR), suivant un mécanisme de VICR (Tanabe *et al.*, 1990). Au-delà de sa fonction de senseur de voltage du RyR, la sous-unité  $Ca_v1.1$  est également à l'origine de conductances calciques, probablement impliquées dans l'homéostasie calcique du muscle squelettique (Tanabe *et al.*, 1991).



**Tableau I : Propriétés moléculaires, biophysiques et pharmacologiques de la sous-unité Ca<sub>v</sub>1.1.** Tiré de (Catterall *et al.*, 2005).

<b>Canal</b>	Ca <sub>v</sub> 1.1
<b>Description</b>	Canal calcique sensible au potentiel de membrane
<b>Autres noms</b>	α <sub>1S</sub> , canal calcique de type L du muscle squelettique, récepteur aux dihydropyridines du muscle squelettique
<b>Informations moléculaires</b>	Homme: 1873aa, L33798, chr.1q31-q32, <i>CACNA1S</i> Rat: 1146aa (séquence partielle), L04684, chr.13, <i>Cacna1s</i> Souris: 1861aa, L06234, chr.1, <i>Cacna1s</i> (voir "Commentaires")
<b>Sous-unités associées</b>	α <sub>2δ</sub> , β, γ
<b>Etudes fonctionnelles</b>	Patch-clamp (cellule entière, canal unitaire), imagerie calcique, mouvements de charges, contraction du muscle squelettique
<b>Courant</b>	I <sub>Ca,L</sub>
<b>Conductance</b>	13-17 pS (90-110 mM Ba <sup>2+</sup> )
<b>Sélectivité ionique</b>	Ca <sup>2+</sup> > Sr <sup>2+</sup> > Mg <sup>2+</sup> > Ba <sup>2+</sup>
<b>Activation</b>	V <sub>a</sub> = 8-14 mV, τ <sub>a</sub> > 50 ms à 10 mV (10 mM Ca <sup>2+</sup> )
<b>Inactivation</b>	V <sub>h</sub> = -8 mV, 40% du courant inactive après 5 sec à -5 mV
<b>Activateurs</b>	BayK8644, agonistes dihydropyridines, FPL64176
<b>Modulateurs de gating</b>	Antagonistes dihydropyridines (e.g., (+)- isradipine, IC <sub>50</sub> = 13 nM à -90 mV et 0.15 nM à -65 mV
<b>Bloqueurs</b>	Non sélectifs: cadmium (IC <sub>50</sub> = 0.5 mM) Sélectifs de Ca <sub>v</sub> 1.x: verapamil, devapamil (IC <sub>50</sub> < 1 μM) et autres phénylalkylamines, (+)- <i>cis</i> -diltiazem (IC <sub>50</sub> < 80 μM)
<b>Radioligands</b>	(+)-[ <sup>3</sup> H]isradipine (K <sub>d</sub> = 0.2-0.7 nM) et autres dihydropyridines; (-)-[ <sup>3</sup> H]devapamil (K <sub>d</sub> = 2.5 nM), (+)- <i>cis</i> -[ <sup>3</sup> H]diltiazem (K <sub>d</sub> = 50 nM)
<b>Commentaires</b>	Le gène codant pour la sous-unité Ca <sub>v</sub> 1.1 a été isolé et caractérisé pour la première fois chez le lapin (1873aa, M23919, X05921)

D'un point de vue physiopathologique, différentes mutations ponctuelles dans la sous-unité Ca<sub>v</sub>1.1 sont, chez l'homme, à l'origine de paralysie périodique hypokaliémique (ou maladie de Westphal) et d'hyperthermie maligne (pour revue voir (Striessnig *et al.*, 2004)).

## 2. Ca<sub>v</sub>1.2 : le "canal L cardiovasculaire"

Contrairement à la sous-unité Ca<sub>v</sub>1.1, la sous-unité Ca<sub>v</sub>1.2 (Tableau II) présente un pattern d'expression beaucoup plus généralisé. Initialement clonée à partir du tissu cardiaque (Mikami *et al.*, 1989), elle représente la sous-unité Ca<sub>v</sub> majoritairement exprimée dans le système cardiovasculaire (cœur et muscles lisses vasculaires). De ce fait, elle est indispensable au cours du développement embryonnaire (Seisenberger *et al.*, 2000; Rottbauer *et al.*, 2001). Elle est également la cible pharmacologique des antagonistes calciques à effets cardiomodulateurs. La sous-unité Ca<sub>v</sub>1.2 a ensuite été décrite dans les tissus endocriniens et neuroendocriniens (cellules β pancréatiques, glande pituitaire) où elle participe à la sécrétion hormonale (Schulla *et al.*, 2003; Sinnegger-Brauns *et al.*, 2004). Elle contribue ainsi à l'exocytose des vésicules d'insuline par les cellules β pancréatiques (Bokvist *et al.*, 1995).

**Tableau II: Propriétés moléculaires, biophysiques et pharmacologiques de la sous-unité Ca<sub>v</sub>1.2.** Tiré de (Catterall *et al.*, 2005).

<b>Canal</b>	Ca <sub>v</sub> 1.2
<b>Description</b>	Canal calcique sensible au potentiel de membrane
<b>Autres noms</b>	α <sub>1C</sub> , canal calcique de type L du muscle cardiaque / lisse, récepteur aux dihydropyridines du muscle cardiaque / lisse
<b>Informations moléculaires</b>	Homme: 2169aa, L29529 (cardiaque) ; 2138aa, Z34815 (fibroblaste) ; 2138aa, AF465484 (jéjunum), chr.12p13.3, <i>CACNA1C</i> Rat: 1146aa (sequence partielle), L04684, chr.13, <i>Cacna1s</i> Souris: 1861aa, L06234, chr.1, <i>Cacna1s</i> (voir "Commentaires")
<b>Sous-unités associées</b>	α <sub>2δ</sub> , β, γ
<b>Etudes fonctionnelles</b>	Patch-clamp (cellule entière, canal unitaire), imagerie calcique, contraction du muscle cardiaque / lisse, sécrétion hormonale
<b>Courant</b>	I <sub>CaL</sub>
<b>Conductance</b>	Ba <sup>2+</sup> (25 pS) > Sr <sup>2+</sup> = Ca <sup>2+</sup> (pS)
<b>Sélectivité ionique</b>	Ca <sup>2+</sup> > Sr <sup>2+</sup> > Ba <sup>2+</sup> >> Mg <sup>2+</sup>
<b>Activation</b>	V <sub>a</sub> = -17 mV (2 mM Ca <sup>2+</sup> , HEK293) ; -4 mV (15 mM Ba <sup>2+</sup> , HEK293) à -18.8 mV (5 mM Ba <sup>2+</sup> , HEK293 et ovocyte de Xénope) ; τ <sub>a</sub> 1 ms à 10 mV
<b>Inactivation</b>	V <sub>h</sub> = -50 à -60 mV (2 mM Ca <sup>2+</sup> , HEK293) ; -18 à -42 mV (5-15 mM Ba <sup>2+</sup> , HEK293) ; τ <sub>fast</sub> = 150 ms, τ <sub>slow</sub> = 1100 ms ; 61% du courant inactive après 250 ms (à V <sub>max</sub> , 15 mM Ba <sup>2+</sup> , HEK293) ; ~70% d'inactivation après 1 sec (à V <sub>max</sub> , 2 mM Ca <sup>2+</sup> ) ; l'inactivation est accélérée en présence de Ca <sup>2+</sup> (inactivation dépendante du Ca <sup>2+</sup> : 86% d'inactivation après 250 ms)
<b>Activateurs</b>	BayK8644, agonistes dihydropyridines, FPL64176
<b>Modulateurs de gating</b>	Antagonistes dihydropyridines (e.g., (+)- isradipine, IC <sub>50</sub> = 7 nM à -60 mV ; nimodipine, IC <sub>50</sub> = 139 nM à -80 mV)
<b>Bloqueurs</b>	Non sélectifs: cadmium Sélectifs de Ca <sub>v</sub> 1.x: devapamile (IC <sub>50</sub> = 50 nM en 10 mM Ba <sup>2+</sup> à -60 mV) et autres phénylalkylamines ; (+)- <i>cis</i> -diltiazem (IC <sub>50</sub> = 33 μM en 10 mM Ba <sup>2+</sup> à -60 mV et 0.05Hz)
<b>Radioligands</b>	(+)-[ <sup>3</sup> H]isradipine (K <sub>d</sub> < 0.1 nM) et autres dihydropyridines ; (-)-[ <sup>3</sup> H]devapamile (K <sub>d</sub> = 2.5 nM), (+)- <i>cis</i> -[ <sup>3</sup> H]diltiazem (K <sub>d</sub> = 50 nM)
<b>Commentaires</b>	Le gène codant pour la sous-unité Ca <sub>v</sub> 1.2 a été isolé et caractérisé pour la première fois dans le cœur de lapin (2171aa, P15381, X15539). En plus de l'isoforme cardiaque, des variants d'épissage ont été clonés dans le muscle lisse et le cerveau.

Au niveau neuronal, la sous-unité Ca<sub>v</sub>1.2 compose près de 80% des canaux de type L du système nerveux central (les 20% restant étant formés par la sous-unité Ca<sub>v</sub>1.3 que nous décrirons par la suite) (Hell *et al.*, 1993). Bien que décrits au niveau des terminaisons présynaptiques où ils pourraient avoir un rôle dans la libération des neuromédiateurs en conditions d'hyperactivité neuronale (Zakharenko *et al.*, 2001), ces canaux se localisent majoritairement au niveau des dendrites et des corps cellulaires, où ils participent au contrôle de l'activité génique de la cellule nerveuse (Graef *et al.*, 1999; Dolmetsch *et al.*, 2001). D'un point de vue pharmacologique, l'utilisation chez le rat et la souris de nimodipine (un inhibiteur des canaux L) et de Bay K 8644 (un activateur des canaux L) conduit respectivement à une diminution et à une augmentation de la sensibilité des animaux à la cocaïne (Kuzmin *et al.*, 1996). Il a également été relevé une diminution de l'accoutumance à

l'alcool chez les souris traitées à la felodipine ou à la nitrendipine (tous deux des inhibiteurs des canaux L) (Watson *et al.*, 1994). Enfin, l'administration de nifedipine confère aux souris traitées un effet antidépresseur (Cohen *et al.*, 1997). Ces résultats montrent clairement l'implication des canaux calciques de type L dans un certain nombre de processus cognitifs centraux. Toutefois, l'utilisation d'agents pharmacologiques ne permet pas de discriminer s'il s'agit de la sous-unité Ca<sub>v</sub>1.2 et/ou de la sous-unité Ca<sub>v</sub>1.3 qui en est responsable, ces molécules n'étant pas spécifique d'une isoforme particulière. Il a cependant été relevé qu'un certain nombre de fonctions centrales affectées par l'utilisation d'agents pharmacologiques des canaux L, nécessitent l'activation de la protéine CREB (pour *cAMP Response Element Binding*). Or il a été montré récemment que seule l'expression de la sous-unité Ca<sub>v</sub>1.2 était capable de contrôler l'activité de CREB (Weick *et al.*, 2003), suggérant que cette sous-unité est probablement à la base des fonctions centrales contrôlée par les courants de type L.

L'implication physiopathologique de la sous-unité Ca<sub>v</sub>1.2 a été mise en évidence par la mutation G406R, premier acide aminé présumé de la boucle I-II, à l'origine du syndrome de Timothy, une maladie génétique rare mais sévère, impliquant des troubles de la conduction cardiaque, une syndactylie des mains et des pieds, des caractéristiques morphologiques faciales ainsi que des troubles psychiatriques (Splawski *et al.*, 2004; Splawski *et al.*, 2005).

### 3. Ca<sub>v</sub>1.3 : le "canal L neuroendocrinien"

La sous-unité Ca<sub>v</sub>1.3 (Tableau III) a été décrite comme étant la composante majeure des canaux calciques de type L des cellules endocriniennes, où elle participe à la sécrétion hormonale (Namkung *et al.*, 2001). Son implication dans la libération d'insuline par les cellules pancréatiques  $\beta$  restant toutefois controversée (Schulla *et al.*, 2003; Sinnegger-Brauns *et al.*, 2004). Elle présente un pattern d'expression similaire à la sous-unité Ca<sub>v</sub>1.2, mais possède la particularité biophysique de s'activer pour de plus faibles dépolarisations membranaires (Koschak *et al.*, 2001), et de s'inactiver suivant une cinétique encore plus lente. Au niveau cardiaque, la sous-unité Ca<sub>v</sub>1.3 est impliquée dans le contrôle de l'activité pacemaker (Platzer *et al.*, 2000; Mangoni *et al.*, 2003), où elle pourrait également être la cible pharmacologique des cardiomodulateurs.

Au niveau neuronal, ces canaux joueraient un rôle important dans la physiologie des cellules de la cochlée (Platzer *et al.*, 2000). De plus, en raison de leur seuil d'activation bas et de leur cinétique d'inactivation lente, ces canaux pourraient générer le courant à l'origine du plateau dépolarisant des motoneurones ou des neurones des ganglions spinaux de la moelle épinière. Il a également été relevé une augmentation de l'expression de la sous-unité Ca<sub>v</sub>1.3 au cours

du vieillissement, associée à des phénomènes de toxicité cellulaire, ayant conduit les auteurs à proposer que la sous-unité  $Ca_v1.3$  serait impliquée dans les pertes de fonctions cognitives liées au vieillissement (Campbell *et al.*, 1996; Thibault et Landfield, 1996).

**Tableau III : Propriétés moléculaires, biophysiques et pharmacologiques de la sous-unité  $Ca_v1.3$ .** Tiré de (Catterall *et al.*, 2005).

<b>Canal</b>	$Ca_v1.3$
<b>Description</b>	Canal calcique sensible au potentiel de membrane
<b>Autres noms</b>	$\alpha_{1D}$ , canal calcique « neuroendocrinien » de type L
<b>Informations moléculaires</b>	Homme: 2161aa, M76558 (cerveau); 2181aa, M83566 (cellules pancréatiques $\beta$ ); chr.3p14.3, <i>CACNA1D</i> Rat: 1646aa, M57682 (cerveau); 2203aa, D38101 (cellules pancréatiques $\beta$ ); chr.16p16, <i>Cacna1d</i> Souris: 2144aa, AJ437291 (Coeur embryonnaire); chr.14, <i>Cacna1d</i> (voir "Commentaires")
<b>Sous-unités associées</b>	Probablement $\alpha_2\delta$ , $\beta$ , $\gamma$
<b>Etudes fonctionnelles</b>	Patch-clamp (cellule entière, canal unitaire), imagerie calcique
<b>Courant</b>	$I_{Ca,L}$
<b>Conductance</b>	Pas déterminé
<b>Sélectivité ionique</b>	Pas déterminé
<b>Activation</b>	$V_a = -15$ à $-20$ mV (cellules de la cochlée de souris, 10 mM $Ba^{2+}$ ); $-18$ mV (15 mM $Ba^{2+}$ , HEK293) à $-37$ mV (5 mM $Ba^{2+}$ / 2 mM $Ca^{2+}$ , HEK293 et ovocyte de Xénope); $\tau_a < 1$ ms à 10 mV
<b>Inactivation</b>	$V_h = -36$ to $-43$ mV; $\tau_{fast} = 190$ ms, $\tau_{slow} = 1700$ ms (à $V_{max}$ , HEK293); L'inactivation calcium dépendante est observée en EK293 ainsi que dans les cellules ciliées externes de la cochlée (pas dans les cellules internes)
<b>Activateurs</b>	BayK8644,
<b>Modulateurs de gating</b>	Antagonistes dihydropyridines (e.g., (+)- isradipine, $IC_{50} = 30$ nM à $-50$ mV et 300 nM à $-90$ mV ; nimodipine, $IC_{50} = 3$ $\mu$ M à $-80$ mV
<b>Bloqueurs</b>	Non sélectifs: cadmium
<b>Radioligands</b>	(+)-[3H]isradipine ( $K_d < 0.5$ nM) ; <i>in vitro</i> les cellules HEK293 exprimant $Ca_v1.2$ ou $Ca_v1.3$ lient l'(+)-[3H]isradipine suivant un même $K_d$ ; Cependant, des études fonctionnelles montrent que $Ca_v1.2$ possède une meilleure affinité pour les DHPs. Ceci s'explique par le fait que les DHPs fixent préférentiellement l'état inactivé. $Ca_v1.3$ s'inactivant plus lentement, présente donc une plus faible affinité pour les DHPs
<b>Commentaires</b>	En plus de l'isoforme cérébrale, des variants d'épissage ont été clonés dans les cellules pancréatiques $\beta$ et les cellules de la cochlée ; il est probable que $Ca_v1.3$ soit à l'origine des courants L à « bas seuil d'activation » enregistrés dans le cerveau et le sinus atrial bien que certains variants d'épissage de $Ca_v1.2$ puissent également s'activer pour de faibles dépolarisations et participer à ce courant.

Bien que des résultats obtenus sur les animaux suggèrent que la sous-unité  $Ca_v1.3$  pourrait être à l'origine de troubles cardiaques (Platzer *et al.*, 2000; Mangoni *et al.*, 2003), elle n'a pour l'heure, jamais été associée à des pathologies humaines, et aucune mutation n'a été relevée dans le gène *CACNA1D* codant pour cette protéine.

#### 4. Ca<sub>v</sub>1.4 : le « canal L rétinien »

Cette sous-unité a été mise en évidence chez des patients atteints de cécité nocturne congénitale stationnaire ou CSNB2 (pour *Congenital Stationary Night Blindness*). La présence de mutations dans le gène *CACNA1F* codant pour la sous-unité Ca<sub>v</sub>1.4 (Tableau IV), a conduit à la conclusion qu'une activité anormale de ce canal pourrait être à l'origine d'une altération des conductances calciques nécessaires à la communication synaptique entre les cellules photoréceptrices de la rétine et les cellules bipolaires (Bech-Hansen *et al.*, 1998; Strom *et al.*, 1998). En effet, la libération de glutamate par les cellules photoréceptrices met en jeu un influx calcique à travers des VGCCs sensibles aux dihydropyridines (Wilkinson et Barnes, 1996; Schmitz et Witkovsky, 1997).

**Tableau IV : Propriétés moléculaires, biophysiques et pharmacologiques de la sous-unité Ca<sub>v</sub>1.4.** Tiré de (Catterall *et al.*, 2005).

<b>Canal</b>	Ca <sub>v</sub> 1.4
<b>Description</b>	Canal calcique sensible au potentiel de membrane
<b>Autres noms</b>	α <sub>1F</sub> , canal calcique « rétinien » de type L
<b>Informations moléculaires</b>	Homme: 1966aa, AJ224874; chr.Xp11.23, <i>CACNA1F</i> Rat: 1981aa, AF365975; chr.Xq22, <i>Cacna1f</i> Souris: 1985aa, AF192497; chr.X, <i>Cacna1f</i>
<b>Sous-unités associées</b>	Pas établis ; évidence fonctionnelle pour une association avec β <sub>2</sub> dans les neurones rétiniens
<b>Etudes fonctionnelles</b>	Patch-clamp (cellule entière, canal unitaire), imagerie calcique
<b>Courant</b>	I <sub>Ca,L</sub>
<b>Conductance</b>	Evidence préliminaire pour une très faible conductance unitaire (au minimum deux fois plus faible que la conductance de Ca <sub>v</sub> 1.2) ; Ba <sup>2+</sup> > Ca <sup>2+</sup>
<b>Sélectivité ionique</b>	Pas déterminé
<b>Activation</b>	V <sub>a</sub> = -2.5 à -12 mV (2-20 mM Ca <sup>2+</sup> ou 15-20 mM Ba <sup>2+</sup> , HEK293); τ <sub>a</sub> < 1 ms à V <sub>max</sub> (il a également été observé des composantes plus lentes)
<b>Inactivation</b>	V <sub>h</sub> = -9 to -27 mV (10-20 mM Ba <sup>2+</sup> , HEK293); Cinétiques d'inactivation encore plus lentes que celles observées pour Ca <sub>v</sub> 1.3 (inactivation incomplète après 10s de dépolarisation à V <sub>max</sub> ) ; l'inactivation calcium dépendante est observée uniquement dans l'ovocyte de Xénope exprimant Ca <sub>v</sub> 1.4 (pas en HEK293)
<b>Activateurs</b>	BayK8644
<b>Modulateurs de gating</b>	Antagonistes dihydropyridines : nifédipine (IC <sub>50</sub> = 944 nM à -100 mV, ~300 nM à -50 mV ; isradipine : ~80% d'inhibition par 100 nM à -50 mV et 1 μM à -90 mV) ; D- <i>cis</i> -diltiazem (IC <sub>50</sub> = 92 μM) ; verapamil : 69% d'inhibition à 100 μM (0.2 Hz, -80 mV)
<b>Bloqueurs</b>	Non sélectifs: cadmium
<b>Radioligands</b>	Contrairement à Ca <sub>v</sub> 1.2 et Ca <sub>v</sub> 1.3, pas d'affinité pour l'(+)-[3H]isradipine (HEK293)
<b>Commentaires</b>	Les propriétés biophysiques de la sous-unité Ca <sub>v</sub> 1.4 en système d'expression hétérologue ressemblent à celles enregistrées sur des neurones rétiniens, suggérant que cette sous-unité est à l'origine des courants calciques de type L enregistrés sur ces cellules. Cependant il n'est pas impossible que la sous-unité Ca <sub>v</sub> 1.3 qui s'active rapidement et s'inactive lentement ne participe pas elle aussi à ce courant.

Il a ensuite été confirmé que la sous-unité  $Ca_v1.4$  forme le canal calcique synaptique de type L, majoritairement impliqué dans la libération des neuromédiateurs par les cellules photoréceptrices (Taylor et Morgans, 1998; Morgans, 2001; Morgans *et al.*, 2001).

### **B. La sous-unité $Ca_v2.1$ et les courants de type P/Q**

Les canaux P et Q ont pendant longtemps été considéré comme étant des canaux distincts en raison du fait que les courants de type P, initialement observés dans les cellules de Purkinje du cervelet (Llinas *et al.*, 1989) présentaient des propriétés biophysiques et pharmacologiques différentes des courants de type Q enregistrés dans les cellules granulaires (Sather *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1993). Toutefois, l'invalidation génique chez la souris du gène *Cacna1A*, codant pour la sous-unité  $Ca_v2.1$ , a donné fin au débat. En effet, la souris  $Ca_v2.1^{-/-}$  ne présente plus de courant de type P, ni de courant de type Q (Jun *et al.*, 1999; Fletcher *et al.*, 2001), confirmant l'hypothèse que les courants P et Q ne sont finalement que le résultat de l'expression de différents variants d'épissage d'une même sous-unité  $Ca_v2.1$  (Bourinet *et al.*, 1999). Les canaux P et Q sont ainsi regroupés sous la dénomination de canaux de type P/Q (Tableau V).

Les canaux P/Q sont très largement présents au niveau du cervelet où ils sont responsables de 87% et 41% du courant calcique total, généré par le potentiel électrique, des cellules de Purkinje et des cellules granulaires, respectivement (Mori *et al.*, 1991; Starr *et al.*, 1991). L'expression de la sous-unité  $Ca_v2.1$  n'est toutefois pas limitée à cette structure, et s'étend à l'ensemble du système nerveux central et périphérique. La sous-unité  $Ca_v2.1$  présente une localisation subcellulaire importante au niveau des terminaisons présynaptiques (Westenbroek *et al.*, 1995). L'utilisation d' $\omega$ -agatoxine IVA et d' $\omega$ -conotoxine MVIIC (deux toxines peptidiques isolées à partir des venins de l'araignée *Agelenopsis aperta* et du mollusque marin *Conus magnus* et capables de bloquer les conductances calciques soutenues par les canaux P/Q), dans le blocage de la transmission glutamatergique, a permis de démontrer l'implication majeure des canaux P/Q dans la libération des neurotransmetteurs au niveau du système nerveux central (Turner *et al.*, 1992; Takahashi et Momiyama, 1993; Dunlap *et al.*, 1995). Leur implication dans la transmission synaptique a également été étendue plus tard à un niveau périphérique (pour revue voir (Meir *et al.*, 1999)). Les canaux P/Q jouent également un rôle important au niveau de la jonction neuromusculaire, où ils contrôlent la libération d'acétylcholine (Sugiura *et al.*, 1995). Leur implication a été confirmée chez des patients atteints du syndrome de Lambert-Eaton, une maladie auto-immune, où la présence élevée

d'anticorps dirigés contre les canaux P/Q altère la libération d'acétylcholine, conduisant progressivement à une myopathie (Lennon *et al.*, 1995). Les souris  $Ca_v2.1^{-/-}$ , chez lesquelles le gène codant pour la sous-unité  $Ca_v2.1$  à été invalidé, présentent une atrophie cérébelleuse, de sévères spasmes musculaires ainsi qu'une ataxie, et meurent généralement dans les trois à quatre semaines postnatales (Jun *et al.*, 1999; Fletcher *et al.*, 2001).

**Tableau V : Propriétés moléculaires, biophysiques et pharmacologiques de la sous-unité  $Ca_v2.1$ .** Tiré de (Catterall *et al.*, 2005).

<b>Canal</b>	$Ca_v2.1$
<b>Description</b>	Canal calcique sensible au potentiel de membrane
<b>Autres noms</b>	$\alpha_{1A}$ , canal calcique de type P/Q, rbA-I (chez le rat); BI-1, BI-2 (chez le lapin)
<b>Informations moléculaires</b>	Homme: 2510aa, AF004883; 2662aa, AF004884; chr.19p13, <i>CACNA1A</i> Rat: 2212aa, M64373 Souris: 2165aa, NM007578, NP031604 Lapin: 2273aa, X57476 (voir "Commentaires")
<b>Sous-unités associées</b>	$\alpha_2\delta$ , $\beta$ , probable avec $\delta$
<b>Etudes fonctionnelles</b>	Patch-clamp (cellule entière, canal unitaire), imagerie calcique, libération de neuromédiateurs
<b>Courant</b>	$I_{Ca,P}$ ; $I_{Ca,Q}$
<b>Conductance</b>	9, 14, 19 pS (courants P, cellules de Purkinje); 16-17pS (pour $\alpha_{1A}/\alpha_2\delta/\beta$ dans l'ovocyte de Xénope)
<b>Sélectivité ionique</b>	$Ba^{2+} > Ca^{2+}$
<b>Activation</b>	$V_a = -5$ mV (courants P natifs), $V_a = -11$ mV (courants Q natifs) (5 mM $Ba^{2+}$ ) $V_a = -4.1$ mV (rat $\alpha_{1A-a}/\alpha_2\delta/\beta_4$ ) $V_a = 2.1$ mV (rat $\alpha_{1A-b}/\alpha_2\delta/\beta_4$ ) (5 mM $Ba^{2+}$ ) $V_a = 9.5$ mV, $\tau_a = 2.2$ ms à 10 mV (humain $\alpha_{1A-1}/\alpha_2\delta/\beta_{1b}$ en HEK293, 15 mM $Ba^{2+}$ )
<b>Inactivation</b>	$V_h = -17.2$ mV ( $\alpha_{1A-a}/\alpha_2\delta/\beta_4$ ); $V_h = -1.6$ mV ( $\alpha_{1A-b}/\alpha_2\delta/\beta_4$ ) (5 mM $Ba^{2+}$ ) $V_h = -17$ mV, $\tau_h = 690$ ms à 10 mV (humain $\alpha_{1A-1}/\alpha_2\delta/\beta_{1b}$ en HEK293, 15 mM $Ba^{2+}$ ); $\tau_h > 1$ sec à 0 mV (courants P natifs, 5 mM $Ba^{2+}$ ) (voir "Commentaires")
<b>Activateurs</b>	Aucun
<b>Modulateurs de gating</b>	$\omega$ -agatoxine IVA (courants P, $K_d = 1-3$ nM; courants Q, $K_d \sim 100-200$ nM), $\omega$ -agatoxine IVB
<b>Bloqueurs</b>	$\omega$ -conotoxine MVIIC; autres bloqueurs tels que piperidines, diphenylbutylpiperidines, piperazines, anesthésiques volatils, gabapentines, mibefradil, toxines DW13.3 et $\omega$ -conotoxine SVIB (voir "Commentaires")
<b>Radioligands</b>	$[^{125}I]\omega$ -conotoxine MVIIC
<b>Commentaires</b>	Il existe différents variants d'épissage au niveau les boucles I-II, II-III et IVS3-IVS4, ainsi que la région carboxy-terminale, présentant des propriétés biophysiques spécifiques. Les variants $\alpha_{1A-b}$ exprimé avec l'une des quatre $\beta$ , ou $\alpha_{1A-a}$ exprimé avec la $\beta_{2a}$ semblent être à l'origine des courant présentant une cinétique de type P, alors que $\alpha_{1A-a}$ exprimée avec la $\beta_{1b}$ , $\beta_3$ ou $\beta_4$ semble être à l'origine des courant présentant une cinétique de type Q. Les courants présentant une pharmacologie de type Q semblent être conduits par un variant d' $\alpha_{1A}$ contenant des résidus Asp et Pro dans la boucle IVS3-S4, alors que les courants présentant une pharmacologie de type P semblent être conduits par un variant dépourvu de ces résidus.

Chez l'homme, de nombreuses mutations (à ce jour, 17 mutations faux sens) ont été décrites dans le gène *CACNA1A* codant pour la sous-unité  $Ca_v2.1$  à l'origine de la migraine hémiplésique familiale (MHF) de type I, une forme rare de migraine avec aura. Ces mutations se répartissent entre les segments S4, S5, S6 et les boucles P des quatre domaines membranaires, et sont généralement à l'origine d'un phénotype "gain de fonction", le canal P/Q s'activant à des potentiels plus hyperpolarisés. L'implication des canaux calciques de type P/Q dans la physiopathologie de la MHF de type I est plus largement détaillée en [Annexe 2](#) (Weiss *et al.*, 2006). De plus, certaines de ces mutations sont, en sus de leur phénotype MHF, associées à une ataxie cérébelleuse (Ducros *et al.*, 2002). D'autres mutations de la sous-unité  $Ca_v2.1$ , d'une nature différente de celles observées dans la MHF, ont également été relevées dans deux autres affections neurologiques différentes sur le plan clinique (pour revue voir (Pietrobon, 2005)). L'ataxie épisodique de type 2 (EA2) est en effet liée essentiellement à des mutations tronquantes de la sous-unité  $Ca_v2.1$  et l'ataxie spinocérébelleuse SCA6 à une amplification du triplet CAG situé dans la partie 3' du gène *CACNA1A* (Ophoff *et al.*, 1996; Zhuchenko *et al.*, 1997).

### C. La sous-unité $Ca_v2.2$ et les courants de type N

Les canaux calciques de type N (pour *Neither transient, Nor long lasting*) tirent leur nom du fait qu'ils ont été décrits pour la première fois dans les neurones des ganglions spinaux de poulet, lors de la mise en évidence des canaux de type T (qui seront décrits plus tard dans ce manuscrit) et L (Nowycky *et al.*, 1985). Du point de vue moléculaire, ces courants sont soutenus par la sous-unité  $Ca_v2.2$  (Williams *et al.*, 1992b) ([Tableau VI](#)).

Bien que décrits initialement dans les cellules neuronales, leur localisation n'est toutefois pas exclusive. Les canaux de type N sont également présents dans les cellules chromaffines surrénaliennes (Sher *et al.*, 1988), dans les cellules  $\beta$  pancréatiques (Sher *et al.*, 1992) ainsi que dans les cellules de Sertoli (D'Agostino *et al.*, 1992).



**Tableau VI : Propriétés moléculaires, biophysiques et pharmacologiques de la sous-unité Ca<sub>v</sub>2.2.** Tiré de (Catterall *et al.*, 2005).

<b>Canal</b>	Ca <sub>v</sub> 2.2
<b>Description</b>	Canal calcique sensible au potentiel de membrane
<b>Autres noms</b>	$\alpha_{1B}$ , canal de type N, rbB-I, rbB-II (chez le rat), BIII (chez le lapin)
<b>Informations moléculaires</b>	Homme: 2339aa, M94172; 2237aa, M94173; chr.9q34, <i>CACNA1B</i> Rat: 2336aa, M929051 Souris: 2329aa, NM007579, NP031605
<b>Sous-unités associées</b>	$\alpha_2\delta$ , $\beta_1$ , $\beta_2$ , $\beta_3$ , probable avec $\delta$
<b>Etudes fonctionnelles</b>	Patch-clamp (cellule entière, canal unitaire), imagerie calcique, libération de neuromédiateurs, entrée calcique sur synaptosomes
<b>Courant</b>	$I_{Ca,N}$
<b>Conductance</b>	20 pS (neurones sympathiques de Bullfrog); 14.3 pS (ADNc de lapin codant pour BIII exprimé en myotubes de muscle squelettique)
<b>Sélectivité ionique</b>	$Ba^{2+} > Ca^{2+}$
<b>Activation</b>	$V_a = 7.8$ mV, $\tau_a = 3$ ms à 10 mV (humain $\alpha_{1B}/\alpha_2\delta/\beta_{1-3}$ en HEK293, 15 mM $Ba^{2+}$ ); $V_a = 9.7$ mV, $\tau_a = 2.8$ ms à 20 mV (rat $\alpha_{1B-II}/\beta_{1b}$ dans l'ovocyte de Xénope, 40 mM $Ba^{2+}$ )
<b>Inactivation</b>	$V_h = -61$ mV, $\tau_h \sim 200$ ms à 10 mV (humain $\alpha_{1B}/\alpha_2\delta/\beta_{1-3}$ en HEK293, 15 mM $Ba^{2+}$ ); $V_h = -67.5$ mV; $\tau_h = 112$ ms à 20 mV (rat $\alpha_{1B-II}/\beta_{1b}$ dans l'ovocyte de Xénope, 40 mM $Ba^{2+}$ )
<b>Activateurs</b>	Glycerotoxine
<b>Modulateurs de gating</b>	Aucun
<b>Bloqueurs</b>	$\omega$ -conotoxine GVIA (1-2 $\mu$ M, blocage irréversible), $\omega$ -conotoxine MVIIA (SNX-111, Ziconotide/Prialt), $\omega$ -conotoxine MVIIC8; autres bloqueurs tels que piperidines, tetrandine, gabapentines, peptidylamines, anesthésiques volatils, toxines peptidiques SNX-325 et DW13.3, ainsi que les $\omega$ -conotoxines SVIA, SVIB et CVID
<b>Radioligands</b>	[ <sup>125</sup> I] $\omega$ -conotoxine GVIA ( $K_d = 55$ pM, humain $\alpha_{1B}/\alpha_2\delta/\beta_{1-3}$ en HEK293)
<b>Commentaires</b>	Différentes régions d'épissage alternatif ont été identifiées dans les boucles I-II, II-III, III-S3-S4, IVS3-S4 ainsi que la région carboxy-terminale. Ces différents variants présentent des propriétés biophysiques propres ainsi que des patterns d'expression spécifiques. Ils présentent également des spécificités vis-à-vis des interactions avec les protéines synaptiques.

Au niveau neuronal, les canaux de type N se localisent essentiellement au niveau des terminaisons présynaptiques des synapses centrales et périphériques, ainsi que le long des dendrites (Westenbroek *et al.*, 1992). Là encore, comme pour les canaux calciques de type P/Q, c'est l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques, qui a permis de mettre en évidence la fonction des canaux de type N. Ainsi, dès 1984, l' $\omega$ -conotoxine est décrite pour son action inhibitrice sur la sécrétion des neurotransmetteurs, au niveau de la jonction neuromusculaire de grenouille (Kerr et Yoshikami, 1984), ou de synaptosomes isolés (Reynolds *et al.*, 1986). Elle agit aux niveaux central et périphérique, où elle bloque la libération de noradrénaline par les neurones hippocampiques (Dooley *et al.*, 1988) et sympathiques (Hirning *et al.*, 1988), respectivement. Ces données pharmacologiques, associées aux enregistrements des courants N au niveau des terminaisons présynaptiques (Stanley, 1991; Stanley et Cox, 1991; Stanley et Goping, 1991), ont permis de révéler le rôle

déterminant de ces canaux dans l'entrée calcique responsable de la libération rapide des neuromédiateurs (Smith et Augustine, 1988; Wheeler *et al.*, 1994; Dunlap *et al.*, 1995). Toutefois, il est important de noter que l'inhibition des canaux de type N n'est pas suffisante pour abolir totalement la transmission synaptique. Comme nous l'avons vu précédemment, les canaux de type P/Q jouent également un rôle important, ainsi que les canaux de type R que nous verrons dans la section suivante. Il a par ailleurs été démontré que le contrôle de la libération des neurotransmetteurs par les canaux de type N suppose leur interaction physique avec les protéines de l'exocytose, notamment la syntaxine (Saisu *et al.*, 1991) et la synaptotagmine (Sheng *et al.*, 1997). Leur présence au niveau dendritique suggère également un rôle des canaux de type N à un niveau post synaptique (Mills *et al.*, 1994). De plus, l'invalidation génique chez la souris du gène codant pour la sous-unité  $Ca_v2.2$ , a permis de mettre en évidence l'implication des canaux de type N dans la régulation sympathique du système circulatoire (Ino *et al.*, 2001; Mori *et al.*, 2002), ainsi que dans le contrôle de l'activité et de l'état de vigilance (Beuckmann *et al.*, 2003). Pour l'heure, aucune mutation dans le gène *CACNA1B* codant pour la sous-unité  $Ca_v2.2$  n'a été rapportée.

D'un point de vue physiopathologique, les canaux de type N occupent une place centrale dans les mécanismes moléculaires de la nociception. Deux approches ont permis de mettre en évidence leur implication : (1) l'invalidation génique chez l'animal de la sous-unité  $Ca_v2.2$  et (2) l'injection locale ou systémique d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques. L'invalidation génique de la sous-unité  $Ca_v2.2$  chez l'animal témoigne de l'implication des canaux N aussi bien dans des douleurs nociceptives (thermique et inflammatoire) que neuropathiques (Hatakeyama *et al.*, 2001; Saegusa *et al.*, 2001). De manière intéressante, la nociception mécanique ne semble pas être affectée chez ces animaux, suggérant une certaine sélectivité dans le traitement de l'information nociceptive par ces canaux. Cette approche d'invalidation génique, bien que très informative chez l'animal, est cependant illusoire en terme de stratégie thérapeutique chez l'homme. Ainsi, l'utilisation de bloqueurs pharmacologiques, spécifiques des canaux N, représente sans conteste une stratégie plus rationnelle. Les inhibiteurs les plus spécifiques sont l' $\omega$ -conotoxine GVIA (ou SNX-124) (Kerr et Yoshikami, 1984) et l' $\omega$ -conotoxine MVIIA (ou SNX-111) (Olivera *et al.*, 1987). Isolés à partir du venin des mollusques marins *Conus geographus* et *Conus magus*, respectivement, ces inhibiteurs appartiennent à la classe des peptides neurotoxiques. L'administration de ces peptides par voie intrathécale chez l'animal témoigne de propriétés analgésiques intéressantes. Plus particulièrement, l'injection intrathécale d' $\omega$ -conotoxine

MVIIA produit un effet antinociception (Malmberg et Yaksh, 1995) et anti-allodynie tactile (Chaplan *et al.*, 1994). Au niveau clinique, l'injection intrathécale de Ziconotide (Prialt®), un analogue synthétique de l' $\omega$ -conotoxine MVIIA, réalisée chez des patients cancéreux ou atteints du syndrome d'immunodéficience acquise et pour lesquels l'utilisation d'analgésiques classiques de types morphiniques s'était révélé inefficace, a confirmé ses puissantes propriétés analgésiques (Staats *et al.*, 2004). Toutefois, des effets secondaires non négligeables nécessitent fréquemment l'arrêt du traitement (Penn et Paice, 2000). Bien que difficile à gérer en terme de dosage, le Ziconotide reste cependant une molécule intéressante. Actuellement, l' $\omega$ -conotoxine CVID (ou AM-336) (Adams *et al.*, 2003), isolée à partir du venin de *Conus catus*, semble plus adaptée à une utilisation thérapeutique. En effet, ce peptide présente une toxicité amoindrie par rapport à l' $\omega$ -conotoxine MVIIA tout en conservant des propriétés analgésiques similaires (Smith *et al.*, 2002). Une étude récente réalisée chez l'animal montre que l'utilisation d' $\omega$ -conotoxine CVID, combinée avec le dexmedetomidine (un agoniste adrénergique également utilisé pour ses propriétés analgésiques), produit une analgésie améliorée (Blake *et al.*, 2005). L'utilisation combinée de différents analgésiques présente l'avantage de réduire les doses traitantes, diminuant ainsi les effets indésirables liés à chacune des molécules, tout en conservant un effet analgésique satisfaisant. Toutefois, l'administration de ces molécules ne peut se faire que par voie intrathécale en raison d'un risque hypotensif trop important par d'autres voies d'administration. Actuellement, l'industrie pharmaceutique développe de nouvelles molécules visant à bloquer sélectivement les canaux N. Des dérivés de L-cystéine (Seko *et al.*, 2002) ou de 4-aminopiperidine (Teodori *et al.*, 2004), administrés par voie orale chez l'animal, semblent posséder des propriétés analgésiques intéressantes tout en restant dénués de tout effet secondaire. Leur efficacité doit à présent être évaluée chez l'homme. Enfin, la mise en évidence récente d'une isoforme de la sous-unité Ca<sub>v</sub>2.2 (variant d'épissage), présente exclusivement au niveau des neurones sensitifs des ganglions spinaux de la moelle épinière, indique qu'elle pourrait être une cible pharmacologique particulièrement intéressante (Bell *et al.*, 2004). En effet, la sélection d'inhibiteurs spécifiques de cette isoforme, serait susceptible de produire, à terme, des molécules analgésiques tout aussi performantes et potentiellement administrables par voie orale en raison d'une plus grande spécificité d'action.

L'implication des autres VGCCs dans la physiopathologie de la nociception est présentée en [Annexe 3](#) (Weiss et De Waard, 2006).

### D. La sous-unité $Ca_v2.3$ et les courants de type R

Le courant de type R (pour *Residual*) tire son nom du fait qu'il représente le courant calcique résiduel, enregistré dans les cellules après blocage des courants de type L, P/Q, N et T par leurs antagonistes respectifs (Randall et Tsien, 1995; Randall et Tsien, 1997). Cette méthode simple et efficace, permettant de mettre en évidence les courants de type R, reflète malheureusement l'existence d'une pharmacologie restreinte pour ces canaux, et pourtant nécessaire à leur étude. Identifiés pour la première fois dans les cellules granulaires du cervelet, les courants de type R ont été classés parmi les courants de type HVA en raison de leur seuil d'activation supérieur à -40 mV (Randall et Tsien, 1995). Cependant, leurs cinétiques d'inactivation rapide ainsi que leur sensibilité relative au nickel, rappellent certaines caractéristiques biophysiques et pharmacologiques des canaux de type T, ayant conduit certains auteurs à classer les canaux R comme IVA (pour *Intermediate Voltage Activated*) (Bourinet *et al.*, 1996b). Il a été proposé que la sous-unité  $Ca_v2.3$  (Tableau VII) serait le support moléculaire des courants de type R, car son expression en système hétérologue induit des courants insensibles aux inhibiteurs des autres VGCCs (Williams *et al.*, 1994), mais sensible à la toxine SNX-482, un peptide issu du venin d'une tarentule africaine *Hysteroocrates gigas* (Newcomb *et al.*, 1998). De plus, l'injection d'ARN antisens dirigés contre la sous-unité  $Ca_v2.3$  réduit le courant calcique de type R dans les cellules granulaires du cervelet (Piedras-Renteria et Tsien, 1998). Toutefois, l'utilisation de SNX-482 sur les courants calciques de type R endogènes (Tottene *et al.*, 2000), ainsi que l'inactivation génétique chez la souris du gène codant pour la sous-unité  $Ca_v2.3$  (Wilson *et al.*, 2000), ne sont pas suffisantes à abolir la totalité du courant calcique de type R, suggérant qu'au niveau endogène, ce courant pourrait être soutenu par une population mixte de canaux.

En dépit d'une pharmacologie efficace, le rôle physiologique des courants de type R a été en partie apporté par l'étude de la souris  $Ca_v2.3^{-/-}$ . Ces souris sont viables et fertiles, mais présentent une réduction de l'activité locomotrice spontanée. Les tests comportementaux ont permis de mettre en évidence un comportement émotif suspect, associé à une augmentation du niveau d'anxiété (Saegusa *et al.*, 2000; Wilson *et al.*, 2000). Plus récemment, il a été proposé que les canaux de type R joueraient un rôle important dans le développement de la potentialisation à long terme (LTP) au niveau des fibres moussues de l'hippocampe (Dietrich *et al.*, 2003), apportant une explication moléculaire aux altérations cognitives relevées chez les animaux  $Ca_v2.3^{-/-}$ . Toutefois, contrairement aux canaux de type P/Q et N, les canaux de type R ne semblent pas être impliqués dans la transmission synaptique rapide. Il a également

été relevé chez les souris  $Ca_v2.3^{-/-}$  une hyperglycémie, suggérant l'implication des canaux de type R dans la régulation de l'homéostasie glucidique par les cellules  $\beta$  pancréatiques (Matsuda *et al.*, 2001). Cette observation a été confirmée très récemment par la mise en évidence de l'implication des courants calciques de type R dans la sécrétion d'insuline (Jing *et al.*, 2005; Pereverzev *et al.*, 2005). Enfin, les canaux de type R semblent aussi être impliqués dans le développement des douleurs somatiques (Saegusa *et al.*, 2000), leur implication à un niveau spinal ou supraspinal étant encore mal caractérisé. A noter également que l'invalidation génique chez l'animal, de la sous-unité  $Ca_v2.3$ , semble potentialiser les effets analgésiques de la morphine, tout en diminuant l'instauration de la tolérance qui lui est associée (Yokoyama *et al.*, 2004). Ces effets sont très certainement le reflet de l'implication des courants R dans les phénomènes de LTP (Dietrich *et al.*, 2003). Chez l'homme, les canaux de type R n'ont pour l'heure pas été associés à une pathologie donnée, et aucune mutation dans le gène *CACNA1E*, codant pour la sous-unité  $Ca_v2.3$ , n'a été identifiée.

**Tableau VII : Propriétés moléculaires, biophysiques et pharmacologiques de la sous-unité  $Ca_v2.3$ .** Tiré de (Catterall *et al.*, 2005).

<b>Canal</b>	$Ca_v2.3$
<b>Description</b>	Canal calcique sensible au potentiel de membrane
<b>Autres noms</b>	$\alpha_{1E}$ , canal de type R, rBII-II (chez le rat); BII-1, BII-2 (chez le lapin)
<b>Informations moléculaires</b>	Homme: 2251aa, L29384 ; 2270aa, L29385 ; chr1q25-q31, <i>CACNA1E</i> Rat: 2222aa, L15453 Souris: 2272aa, Q61290
<b>Sous-unités associées</b>	$\alpha_2\delta$ , $\beta$ , probable avec $\delta$
<b>Etudes fonctionnelles</b>	Patch-clamp, imagerie calcique, libération de neuromédiateurs
<b>Courant</b>	$I_{Ca,R}$
<b>Conductance</b>	Pas déterminé
<b>Sélectivité ionique</b>	$Ba^{2+} \sim Ca^{2+}$ (rat) ; $Ba^{2+} > Ca^{2+}$ (homme)
<b>Activation</b>	$V_a = 3.5$ mV, $\tau_a = 1.3$ ms à 0 mV (humain $\alpha_{1E}/\alpha_2\delta/\beta_{1-3}$ , 15 mM $Ba^{2+}$ , en HEK293) $V_a = -29.1$ mV, $\tau_a = 2.1$ ms à -10 mV (rat $\alpha_{1E}/\alpha_2\delta/\beta_{1b}$ , 4 mM $Ba^{2+}$ , dans l'ovocyte de Xénope)
<b>Inactivation</b>	$V_h = -71$ mV, $\tau_h = 74$ ms à 0 mV (humain $\alpha_{1E}/\alpha_2\delta/\beta_{1-3}$ , 15 mM $Ba^{2+}$ , en HEK293) $V_h = -78.1$ mV, $\tau_h = 100$ ms à -10 mV (rat $\alpha_{1E}/\alpha_2\delta/\beta_{1b}$ , 4 mM $Ba^{2+}$ , dans l'ovocyte de Xénope)
<b>Activateurs</b>	Aucun
<b>Modulateurs de gating</b>	Aucun
<b>Bloqueurs</b>	SNX-482, $Ni^{2+}$ ( $IC_{50} = 27$ $\mu$ M), $Cd^{2+}$ ( $IC_{50} = 0.8$ $\mu$ M), mibefradil ( $IC_{50} = 0.4$ $\mu$ M), anesthésiques volatils
<b>Radioligands</b>	Aucun
<b>Commentaires</b>	Différentes régions d'épissage alternatif ont été identifiées dans la boucle I-II de la sous-unité $Ca_v2.3$ ainsi que dans la partie carboxy-terminale, affectant les cinétiques des courants R ainsi que leur modulation par le calcium.

### III. DIVERSITE et FONCTIONS des CANAUX LVA

La sous-famille des canaux calciques à bas seuil d'activation (LVA) se compose exclusivement des canaux de type T (pour *Transient*). Ils présentent la particularité de s'activer pour de faibles dépolarisations membranaires, par opposition aux canaux HVA, et tirent leur nom du fait qu'ils présentent une cinétique d'inactivation très rapide. Ces canaux sont longtemps restés en marge des canaux HVA, en raison de l'absence d'agents pharmacologiques spécifiques, nécessaires à leur étude. La mise en évidence en 1994 des effets inhibiteurs du mibefradil sur les courants de type T, ainsi que le clonage à partir de 1998 des différents gènes codants pour les sous-unités  $Ca_v3.x$ , a alors permis la caractérisation extensive de ces courants (pour revue relative à la découverte des canaux T voir (Nilius *et al.*, 2006)). Comme nous le verrons plus tard, les canaux T ne semblent que très faiblement concernés par la régulation directe des protéines G hétérotrimériques. Ainsi, seules quelques notions très générales relatives à ces canaux T seront présentées ici. Pour plus de détails sur la physiologie moléculaire des canaux calciques de type T voir (Perez-Reyes, 2003).

#### A. Les sous-unités $Ca_v3.x$ et les courants de type T

Les courants calciques de type T ont été décrits pour la première fois en 1981 dans les neurones de l'olive inférieure (Llinas et Yarom, 1981). Ils ont ensuite été enregistrés dans de nombreux types cellulaires, incluant les cellules neuronales, les cardiomyocytes, les cellules musculaires squelettiques et vasculaires ainsi que les cellules  $\beta$  pancréatiques. Trois sous-unités génèrent les courants de type T :  $Ca_v3.1$ ,  $Ca_v3.2$  et  $Ca_v3.3$ . Elles possèdent des propriétés biophysiques spécifiques, sorte de signature électrophysiologique, ainsi que des fonctions physiologiques qui leurs sont propres.

##### 1. La sous-unité $Ca_v3.1$

La sous-unité  $Ca_v3.1$  (Tableau VIII) est largement exprimée dans le cerveau, où différentes études ont permis de mettre en évidence sa présence (ou celle de l'ARNm) au niveau du bulbe olfactif, de l'amygdale, du cortex, de l'hippocampe, du thalamus, de l'hypothalamus, du cervelet ou encore au niveau du tronc cérébral (Craig *et al.*, 1999; Talley *et al.*, 1999). Elle est exprimée également dans l'ovaire, le placenta et le cœur (Bohn *et al.*, 2000).

Elle est en partie responsable de l'activité oscillatoire du thalamus (Perez-Reyes, 2003), et pourrait être une des cibles pharmacologiques par laquelle les molécules antiépileptiques, telle que l'éthosuximide (Gomora *et al.*, 2001), exerceraient leurs effets.

**Tableau VIII : Propriétés moléculaires, biophysiques et pharmacologiques de la sous-unité Ca<sub>v</sub>3.1.** Tiré de (Catterall *et al.*, 2005).

<b>Canal</b>	Ca <sub>v</sub> 3.1
<b>Description</b>	Canal calcique sensible au potentiel de membrane
<b>Autres noms</b>	α <sub>1G</sub> , canal de type T
<b>Informations moléculaires</b>	Homme: 2377aa, O43497, NM018896; chr.17q22, <i>CACNA1G</i> Rat: 2254aa, O54898, AF027984 Souris: 2288aa, CAI25956, NM009783 (voir "Commentaires")
<b>Sous-unités associées</b>	Pas d'évidence biochimiques, légères modifications induites par α <sub>2</sub> δ <sub>1</sub> et α <sub>2</sub> δ <sub>2</sub>
<b>Etudes fonctionnelles</b>	Patch-clamp, imagerie calcique
<b>Courant</b>	I <sub>Ca,T</sub>
<b>Conductance</b>	7.5 pS
<b>Sélectivité ionique</b>	Sr <sup>2+</sup> > Ba <sup>2+</sup> = Ca <sup>2+</sup>
<b>Activation</b>	V <sub>a</sub> = -46 mV, τ <sub>a</sub> = 1 ms at -10 mV
<b>Inactivation</b>	V <sub>h</sub> = -73 mV, τ <sub>h</sub> = 11 ms at -10 mV
<b>Activateurs</b>	Aucun
<b>Modulateurs de gating</b>	Kurtoxine (IC <sub>50</sub> = 15 nM)
<b>Bloqueurs</b>	Pas de bloqueur spécifique Sélectifs pour Ca <sub>v</sub> 3.x et relatifs pour Ca <sub>v</sub> 1.x et Ca <sub>v</sub> 2.x: mibefradil, U92032, penfluridol et pimizide Non sélectif: nickel (IC <sub>50</sub> = 250 μM), amiloride
<b>Radioligands</b>	Aucun
<b>Commentaires</b>	Différents variants d'épissage ont été cloné et différent de part leur sensibilité au voltage.

## 2. La sous-unité Ca<sub>v</sub>3.2

Comme pour la sous-unité Ca<sub>v</sub>3.1, l'ARNm codant pour la sous-unité Ca<sub>v</sub>3.2 (Tableau IX) est présent dans de nombreux tissus, incluant le rein (Cribbs *et al.*, 1998), le muscle lisse (Hansen *et al.*, 2001), le foie (Cribbs *et al.*, 1998), le cortex surrénal (Schrier *et al.*, 2001), le cœur (Bohn *et al.*, 2000), ou encore dans les cellules spermatogéniques (Stambouljian *et al.*, 2004). Au niveau neuronal, il est présent principalement dans le bulb olfactif, le striatum, le cortex, l'hippocampe et le noyau thalamique (Talley *et al.*, 1999).

Ce courant T est impliqué dans la prolifération (Schmitt *et al.*, 1995) et la contraction (Sarsero *et al.*, 1998) du muscle lisse, ainsi que dans la sécrétion d'aldostérone par les cellules glomérulaires surrénales (Rossier *et al.*, 1998), et de cortisol par les cellules corticales surrénales (Gomora *et al.*, 2000).

**Tableau IX : Propriétés moléculaires, biophysiques et pharmacologiques de la sous-unité Ca<sub>v</sub>3.2.** Tiré de (Catterall *et al.*, 2005).

<b>Canal</b>	Ca <sub>v</sub> 3.2
<b>Description</b>	Canal calcique sensible au potentiel de membrane
<b>Autres noms</b>	α <sub>1H</sub> , canal de type T
<b>Informations moléculaires</b>	Homme: 2353aa, O95180, AF051946; chr16p13.3, <i>CACNA1H</i> Rat: 2359aa, AAG35187, AF290213 Souris: 2365aa, NP067390, NM021415
<b>Sous-unités associées</b>	Pas déterminé
<b>Etudes fonctionnelles</b>	Patch-clamp, imagerie calcique
<b>Courant</b>	I <sub>Ca,T</sub>
<b>Conductance</b>	9 pS
<b>Sélectivité ionique</b>	Ba <sup>2+</sup> = Ca <sup>2+</sup>
<b>Activation</b>	V <sub>a</sub> = 46 mV, τ <sub>a</sub> = 2 ms à -10 mV
<b>Inactivation</b>	V <sub>h</sub> = 72 mV, τ <sub>h</sub> = 16 ms at -10 mV
<b>Activateurs</b>	Aucun
<b>Modulateurs de gating</b>	Kurtoxine
<b>Bloqueurs</b>	Ca <sub>v</sub> 3.2 est plus sensible au nickel que Ca <sub>v</sub> 3.1 (IC <sub>50</sub> = 12 μM) et probablement à la phénytoïne et à l'amiloride Sélectifs pour Ca <sub>v</sub> 3.x et relatifs pour Ca <sub>v</sub> 1.x et Ca <sub>v</sub> 2.x: mibefradil, U92032, penfluridol, pimozide et amiloride Non sélectifs: nimodipine, anesthésiques
<b>Radioligands</b>	Aucun
<b>Commentaires</b>	Variants d'épissage dans la boucle III-IV

Au niveau physiopathologique, les courants de type T ont été récemment mis en évidence dans les mécanismes de nociception thermique et mécanique, par l'injection systémique de mibefradil (Todorovic *et al.*, 2002). L'injection intrathécale d'oligonucléotides antisens, visant à diminuer l'expression des canaux T au niveau du système nerveux périphérique, a finalement révélée le rôle majeur de la sous-unité Ca<sub>v</sub>3.2 (Bourinet *et al.*, 2005) (l'implication des canaux de type T dans la physiopathologie de la nociception est plus largement détaillée en [Annexe 3](#)). Enfin, différentes mutations faux sens (R212C, R902W, W962C, A1871Q et A1874V) dans le gène *CACNA1H*, codant pour la sous-unité Ca<sub>v</sub>3.2, viennent d'être identifiées (Splawski *et al.*, 2006) et pourraient être à l'origine de troubles neurologiques tels que l'autisme. De manière intéressante, ces mutations se localisent dans les segments S4, S6 des différents domaines membranaires, ainsi que dans la boucle P, c'est à dire sur les mêmes éléments structuraux affectés sur la sous-unité Ca<sub>v</sub>2.1 par les mutations MHF-1. Toutefois, contrairement aux mutations de la sous-unité Ca<sub>v</sub>2.1, les mutations affectant la sous-unité Ca<sub>v</sub>3.2 sont de type "perte de fonction", et conduisent à une diminution des courants calciques qu'elle supporte (Splawski *et al.*, 2006). Aussi, la sous-unité Ca<sub>v</sub>3.2 se présente, comme la sous-unité Ca<sub>v</sub>1.2, un candidat potentiel à la base de la physiopathologie moléculaire de l'autisme.



### 3. La sous-unité Ca<sub>v</sub>3.3

L'ARNm codant pour la sous-unité Ca<sub>v</sub>3.3 (Tableau X) a été mis en évidence essentiellement dans le cerveau, en particulier dans le bulbe olfactif, le striatum, le cortex, l'hippocampe, le noyau réticulé et le cervelet (Talley *et al.*, 1999; Monteil *et al.*, 2000).

D'un point de vue fonctionnel, comme le courant soutenu par la sous-unité Ca<sub>v</sub>3.1, le courant généré par la sous-unité Ca<sub>v</sub>3.3 pourrait être impliqué dans l'activité oscillatoire du thalamus (Perez-Reyes, 2003), et pourrait être également une des cibles pharmacologiques des molécules antiépileptiques (Llinas *et al.*, 1999; Gomora *et al.*, 2001).

**Tableau X : Propriétés moléculaires, biophysiques et pharmacologiques de la sous-unité Ca<sub>v</sub>3.3.** Tiré de (Catterall *et al.*, 2005).

<b>Canal</b>	Ca <sub>v</sub> 3.3
<b>Description</b>	Canal calcique sensible au potentiel de membrane
<b>Autres noms</b>	α <sub>1I</sub> , canal de type T
<b>Informations moléculaires</b>	Homme: 2251aa, AAM67414, AF393329; chr.22q13.1, <i>CACNA1I</i> Rat: 1835aa, AF086827, AAD17796 Souris: 2753aa, XP139476, XM139476
<b>Sous-unités associées</b>	Pas d'évidence biochimiques, légères modifications induites par γ <sub>2</sub>
<b>Etudes fonctionnelles</b>	Patch-clamp, imagerie calcique
<b>Courant</b>	I <sub>Ca,T</sub>
<b>Conductance</b>	11 pS
<b>Sélectivité ionique</b>	Ba <sup>2+</sup> = Ca <sup>2+</sup>
<b>Activation</b>	V <sub>a</sub> = -44 mV, τ <sub>a</sub> = 7 ms à -10 mV
<b>Inactivation</b>	V <sub>h</sub> = -72 mV, τ <sub>h</sub> = 69 ms à -10 mV
<b>Activateurs</b>	Aucun
<b>Modulateurs de gating</b>	Aucun
<b>Bloqueurs</b>	Pas de bloqueur spécifique à Cav3.3. Sélectifs pour Ca <sub>v</sub> 3.x et relatifs pour Ca <sub>v</sub> 1.x et Ca <sub>v</sub> 2.x: mibefradil, U92032, penfluridol, pimozide. Non sélectif: nickel (IC <sub>50</sub> = 216 μM)
<b>Radioligands</b>	Aucun
<b>Commentaires</b>	Différents variants d'épissage ont été décrits.

Comme nous venons de le voir à travers ce chapitre, les courants calciques activés par le potentiel électrique de membrane de la cellule, ont pour base différents supports moléculaires, aux propriétés biophysiques propres, et spécialisés dans des fonctions cellulaires spécifiques. Le tissu nerveux est particulièrement riche en conductances calciques, les cinq types de courants étant présents au niveau de la cellule neuronale.

Afin de garantir une parfaite coordination entre l'entrée calcique et les fonctions cellulaires qui lui sont associées, les VGCCs sont sous le contrôle de nombreuses régulations. Aussi, les récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques (RCPGs) occupent un rôle central dans le rétrocontrôle négatif de l'activité des VGCCs suite à la libération de neuromédiateurs. C'est

également via cette régulation que les dérivés morphiniques exercent leurs effets analgésiques. Le chapitre suivant sera consacré à présenter et discuter les bases moléculaires de cette régulation.

## **Chapitre II. REGULATION DIRECTE des VGCCs par les RCPGs**

De nombreux neurotransmetteurs et hormones sont capables de moduler l'activité des canaux calciques activés par le potentiel électrique de membrane (VGCCs). Ils agissent via l'activation des récepteurs à sept domaines transmembranaires, couplés aux protéines G hétérotrimériques (RCPGs), tels que le récepteur muscarinique de l'acétylcholine, les récepteurs au GABA, le récepteur  $\alpha_2$ -adrénergique à la noradrénaline, les récepteurs aux opiacés ou encore aux prostaglandines. L'activation d'un RCPG suite à la fixation de son ligand extracellulaire, conduit à la dissociation du complexe  $G_\alpha/G_{\beta\gamma}$  par échange du GDP en GTP de la sous-unité  $G_\alpha$ . Dès lors, deux voies distinctes de régulation peuvent avoir lieu : l'une faisant intervenir la sous-unité  $G_\alpha$ , l'autre mettant en jeu le dimère  $G_{\beta\gamma}$ . La voie de régulation faisant intervenir la sous-unité  $G_\alpha$  nécessite l'activation de messagers secondaires, et conduit généralement à une potentialisation de l'activité des VGCCs, suite à leur phosphorylation par des protéines kinases, telles que la protéine kinase A dépendante de l'AMPc (PKA) ou la protéine kinase C dépendante du calcium (PKC). Inversement, la voie de régulation faisant intervenir le dimère  $G_{\beta\gamma}$  est directe et conduit à une inhibition drastique de l'activité des VGCCs, et représente une des voies majeures de régulation des canaux calciques neuronaux au niveau des terminaisons présynaptiques, comme nous le verrons plus tard. Nous allons rapidement passer en revue les régulations dépendantes de la sous-unités  $G_\alpha$ , à savoir les régulations mettant en jeu les protéines kinases A et C, puis nous verrons plus extensivement la régulation directe dépendante du dimère  $G_{\beta\gamma}$ , qui a plus particulièrement fait l'objet de mon travail de thèse.

### **I. REGULATION des VGCCs par les PROTEINES KINASES**

La phosphorylation représente une des voies importantes de modulation des canaux calciques activés par le potentiel électrique de membrane. Il s'agit d'une modification post-traductionnelle, dynamique (c'est-à-dire réversible) concernant l'ensemble des VGCCs natifs. Elle résulte de l'activation de protéines kinases, capables de catalyser l'incorporation d'un groupement phosphate sur des résidus sérine, thréonine ou tyrosine, présents dans des séquences particulière de la protéine cible. On distingue ainsi les tyrosines kinases, des

sérine/thréonine kinases A et C, respectivement activés par l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et le diacylglycérol (DAG).

### A. Régulation par la PKA

La protéine kinase A se présente sous la forme d'un tétramère, formé de deux sous-unités catalytiques, auxquelles s'associent deux sous-unités régulatrices. L'activation de la PKA fait suite à la fixation d'AMPC sur les sous-unités régulatrices, l'AMPC étant produit par hydrolyse de l'ATP par l'adénylate cyclase (AC), laquelle ayant été activée par la sous-unité  $G_{\alpha s}$  suite à l'activation du RCPG (Krebs et Beavo, 1979). La PKA ainsi activée est capable de phosphoryler des résidus sérine ou thréonine présents dans des séquences consensus de type **Arg-Arg-X-Ser/Thr**.

La régulation des VGCCs par la PKA a été particulièrement étudiée sur les canaux de type L au niveau des cellules musculaires squelettiques, où elle a été incriminée dans la stimulation de ces canaux par les agonistes  $\beta$ -adrénergiques tel que l'isoprénaline. En effet, l'application d'isoprénaline sur des cellules musculaires squelettiques, conduit à une augmentation drastique de l'amplitude des courants calciques activés par la dépolarisation (Arreola *et al.*, 1987), ce phénomène étant lié à la phosphorylation de la sous-unité  $Ca_v1.1$  par la PKA (Sculptoreanu *et al.*, 1993b; Sculptoreanu *et al.*, 1993a), conduisant à une augmentation de la probabilité d'ouverture du canal (Tsien *et al.*, 1986). Une régulation similaire a également été mise en évidence au niveau des canaux de type L du muscle cardiaque, à l'origine de l'effet ionotrope positif induit par les catécholamines (Hartzell et Fischmeister, 1992; Yoshida *et al.*, 1992).

Bien que la régulation des VGCCs par la PKA ait été initialement décrite au niveau des canaux de type L, elle concerne également les canaux neuronaux. Ainsi, l'injection dans l'ovocyte de Xénope d'ARNm totaux extrait du cerveau de rat, conduit à l'expression d'un courant calcique de type P, caractérisé par ses caractéristiques biophysiques et pharmacologiques. Ce courant est fortement potentialisé par l'injection d'AMPC, ce phénomène étant abolit par des inhibiteurs de la PKA (Fournier *et al.*, 1993).

A noter que la localisation spécifique de la PKA dans un rayon de 150 nm autour du canal calcique est rendue possible grâce aux protéines AKAPs (pour *A-Kinase Anchoring Protein*), nécessaires aux phénomènes de potentialisation des canaux de type L (Johnson *et al.*, 1994; Gao *et al.*, 1997).

## B. Régulation par la PKC

L'activation de la protéine kinase C (PKC) nécessite la production de diacylglycérol (DAG) par l'hydrolyse du  $\text{PIP}_2$  en DAG et en  $\text{IP}_3$  par la  $\text{PLC}\beta$ , laquelle étant activée par la sous-unité  $G_{\alpha q}$  en réponse à l'activation d'un RCPG. La production d' $\text{IP}_3$  conduit à une augmentation de la concentration calcique cytosolique suite au relâchement de  $\text{Ca}^{2+}$  du RE via l' $\text{IP}_3\text{R}$ , permettant l'ancrage de la PKC à la membrane plasmique et son activation par le DAG. La PKC ainsi activée est capable de phosphoryler des résidus sérine ou thréonine appartenant à des séquences consensus de type X-Ser/Thr-X-Lys/Arg-X.

La première mise en évidence d'une régulation des courants calciques sensibles au potentiel électrique de membrane par la PKC a été réalisée sur des neurones du ganglion abdominal d'aplysie où l'application de TPA (un ester de phorbol capable d'activer la PKC) induit une augmentation des conductances calciques (Strong *et al.*, 1987). Ce phénomène a par la suite été décrit pour les courants calciques de type L au niveau neuronal (Yang et Tsien, 1993), ainsi qu'au niveau des muscles cardiaques (Lacerda *et al.*, 1988) et lisses (Schuhmann et Groschner, 1994), où l'augmentation de la probabilité d'ouverture du canal est en partie responsable de l'augmentation de la conductance calcique (Yang et Tsien, 1993). L'activation de la PKC provoque généralement une réponse biphasique, caractérisée par une phase d'augmentation de l'amplitude du courant calcique, immédiatement suivie d'une phase de décroissance (Lacerda *et al.*, 1988; Singer-Lahat *et al.*, 1992; Schuhmann et Groschner, 1994). Cette réponse biphasique étant très largement dépendante de la partie amino-terminale de la sous-unité  $\text{Ca}_v$  (Bouron *et al.*, 1995). Outre les canaux de type L, la PKC est également capable de potentialiser les courants de type N et P/Q (Swartz, 1993; Yang et Tsien, 1993).

Au niveau des canaux de type N, la régulation par la PKC passe par la phosphorylation des boucles cytoplasmiques I-II et II-III (Stea *et al.*, 1995; Yokoyama *et al.*, 1997; Zamponi *et al.*, 1997), l'"effet PKC" pouvant être mimé par la mutation de la thréonine 422 ou de la sérine 425 en acide glutamique (Hamid *et al.*, 1999).

## II. REGULATION DIRECTE des VGCCs par le DIMERE $G_{\beta\gamma}$

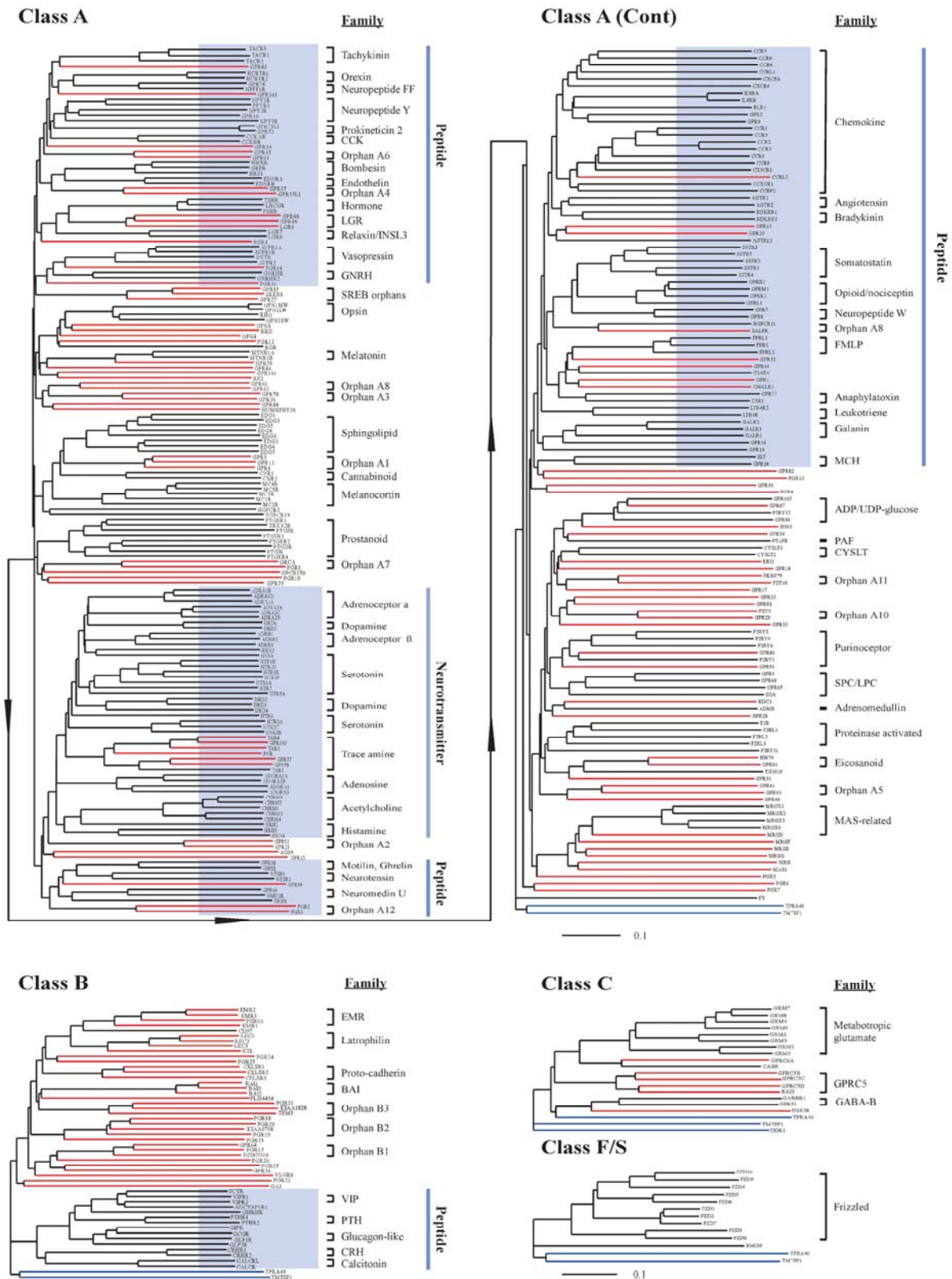
Alors que l'activation des protéines kinases A et C exerce généralement un effet potentiateur de l'activité des VGCCs, la régulation par le dimère  $G_{\beta\gamma}$  représente une puissante

modulation négative de l'influx calcique, en particulier au niveau neuronal, où elle représente un rétrocontrôle négatif de l'activité synaptique en réponse à la libération des neuromédiateurs. Nous allons voir à travers ce chapitre quels sont les acteurs moléculaires mis en jeu par cette régulation. Nous verrons également quels sont les éléments structuraux des sous-unités  $Ca_v / G_{\beta\gamma}$  impliqués, ainsi que leurs contributions relatives à l'inhibition des courants calciques par les RCPGs. Le rôle de la sous-unité  $\beta$  dans cette régulation sera également abordé. Nous discuterons enfin des mécanismes moléculaires conduisant finalement à la terminaison du signal.

### A. Mise en évidence du phénomène

La première mise en évidence d'un mécanisme d'inhibition de l'activité synaptique par les neuromédiateurs remonte aux années 1978 avec les travaux de Dunlap et Fischbach, qui montrèrent que les neurotransmetteurs étaient capables de diminuer la composante calcique des potentiels d'actions des neurones sensoriels (Dunlap et Fischbach, 1978). Ces effets ayant ensuite été attribués à l'inhibition des canaux calciques activés par le potentiel électrique de membrane (Dunlap et Fischbach, 1981).

Parmi les quelques 600 RCPGs décrits chez l'homme (Vassilatis *et al.*, 2003) (Figure 18), pour l'heure, une vingtaine ont été caractérisés comme étant capable de moduler l'activité des VGCCs (Tableau XI). Nous pouvons citer à titre d'exemple les récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques à la noradrénaline (Bean, 1989; Docherty et McFadzean, 1989; Lipscombe *et al.*, 1989; McFadzean et Docherty, 1989), les récepteurs SS-R à la somatostatine (Bean, 1989; Ikeda et Schofield, 1989b; Ikeda et Schofield, 1989a), les récepteurs GABA B au GABA (Deisz et Lux, 1985; Dolphin et Scott, 1987; Grassi et Lux, 1989), les récepteurs muscariniques à l'acétylcholine (Bernheim *et al.*, 1991; Shapiro *et al.*, 1999), ou encore les récepteurs aux opiacés de type  $\mu$  (Bean, 1989; Kasai, 1991; Bourinet *et al.*, 1996a).



**Figure 18. Arbre phylogénique des RCPGs humains.** Tiré de (Vassilatis *et al.*, 2003).

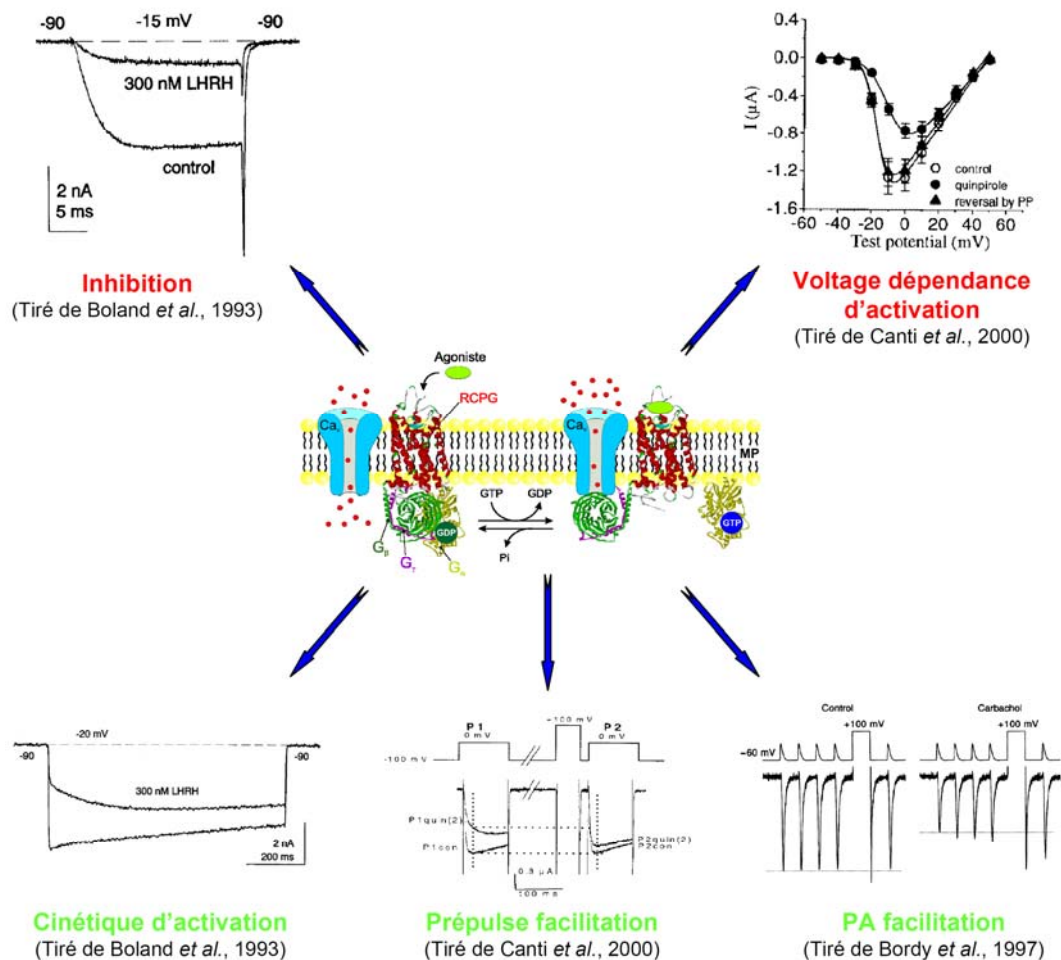
Les lignes noires correspondent aux récepteurs dont le ligand a été caractérisé, les lignes rouges représentent les récepteurs aux orphanines, et les lignes bleues indiquent les protéines à sept domaines transmembranaires ne présentant pas d'homologie avec des RCPGs connus.

**Tableau XI : Les différents RCPGs et leurs agonistes impliqués dans la régulation directe des VGCCs.**  
Obtenu du Pr. Anne Feltz (Ecole Normale Supérieure, Paris, France).

Neuromédiateur	Récepteur	Canal Ca <sup>2+</sup> (Ca <sub>v</sub> 2.x)	Tissu, espèce	Référence
<b>Ach</b>	m4	Ca <sub>v</sub> 2.2	SCG, rat	(Bernheim <i>et al.</i> , 1991)
	m2	Ca <sub>v</sub> 2.1 & Ca <sub>v</sub> 2.2	SCG, souris	(Shapiro <i>et al.</i> , 1999)
<b>Adénosine</b>	A1	Ca <sub>v</sub> 2.2	Ganglion ciliaire, poulet	(Yawo et Chuhma, 1993)
		Ca <sub>v</sub> 2.2	DRG, poulet	(Kasai et Aosaki, 1989)
		Ca <sub>v</sub> 2.1 & Ca <sub>v</sub> 2.2	Cervelet, rat	(Dittman et Regehr, 1996)
		Ca <sub>v</sub> 2.2 & Ca <sub>v</sub> 2.3	Hippocampe (CA3→CA1), rat	(Wu et Saggau, 1994)
<b>ATP / ADP</b>	P2Y	Ca <sub>v</sub> 2.2	SCG, rat	(Brown <i>et al.</i> , 2000)
<b>Dopamine</b>	D2	HVA	DRG, poulet	(Marchetti <i>et al.</i> , 1986)
<b>Endocannabinoïdes</b>	CB1	Ca <sub>v</sub> 2.1	SCG, rat	(Garcia <i>et al.</i> , 1998a)
		Ca <sub>v</sub> 2.1, Ca <sub>v</sub> 2.2 & Ca <sub>v</sub> 2.3	Cervelet,	(Brown et Russell, 2004)
<b>GABA</b>	GABA B	Ca <sub>v</sub> 2.1 & Ca <sub>v</sub> 2.2	DRG, rat	(Dolphin et Scott, 1987)
			DRG, poulet	(Deisz et Lux, 1985) (Grassi et Lux, 1989)
			Cervelet, rat	(Dittman et Regehr, 1996)
		Ca <sub>v</sub> 2.2 & Ca <sub>v</sub> 2.3	Hippocampe (CA3→CA1), rat	(Wu et Saggau, 1995)
		Ca <sub>v</sub> 2.2	SCG, rat	(Filippov <i>et al.</i> , 2000)
<b>Galanine</b>	GalR1	Ca <sub>v</sub> 2.2	Hypothalamus	(Simen <i>et al.</i> , 2001)
<b>Glutamate</b>	mGluR1	Ca <sub>v</sub> 2.2	SCG, rat	(Kammermeier et Ikeda, 1999)
<b>LHRH</b>	LHRH-R	Ca <sub>v</sub> 2.2	SCG, Bullfrog	(Elmslie <i>et al.</i> , 1990) (Boland et Bean, 1993) (Kuo et Bean, 1993)
<b>Noradrénaline</b>	α <sub>2</sub> -adrénergique	Ca <sub>v</sub> 2.2	SCG, bullfrog	(Bean, 1989)
		Ca <sub>v</sub> 2.2	SCG, rat	(Garcia <i>et al.</i> , 1998b)
		Non-L	NG108-15	(Docherty et McFadzean, 1989)
<b>NPY</b>	Y2	Non-L	SCG, rat	(Plummer <i>et al.</i> , 1991)
		Ca <sub>v</sub> 2.2	SCG, rat	(Toth <i>et al.</i> , 1993)
<b>Opiïdes / enképhalines</b>	μ	Ca <sub>v</sub> 2.2	NG108-15	(Kasai, 1992)
<b>Opiïdes / dynorphines</b>	κ	Non-L	DRG, rat	(Bean, 1989)
<b>Sérotonine</b>	5HT-1A	Non-L	Neurones spinaux, lamproie	(Hill <i>et al.</i> , 2003)
<b>Somatostatine</b>	SS-R	Ca <sub>v</sub> 2.2	DRG, rat	(Ikeda et Schofield, 1989)
			SCG, rat	(Bean, 1989)
<b>Substance P</b>	NK1	Ca <sub>v</sub> 2.2	SCG, rat	(Shapiro et Hille, 1993)
<b>VIP</b>	VIP-R	Ca <sub>v</sub> 2.2	SCG, rat	(Zhu et Ikeda, 1994)



L'activation des RCPGs se traduit par un certain nombre de modification biophysiques de l'activité des VGCCs régulés (Figure 19).



**Figure 19. Illustration des principales modifications biophysiques de l'activité d'un VGCC en réponse à l'activation d'un GPCR.**

L'activation d'un GPCR par la fixation de son ligand extracellulaire entraîne un certain nombre de modifications biophysiques de l'activité de la sous-unité  $Ca_v2.x$  : (1) inhibition du courant calcique, (2) shift dépolarisant de la voltage dépendance d'activation du canal, (3) ralentissement de la cinétique d'activation, (4) facilitation du courant en réponse à l'application d'un prépulse dépolarisant, (5) facilitation en réponse à l'application d'un train de potentiels d'action. Les effets indiqués en rouge traduisent la fixation des protéines G sur la sous-unité  $Ca_v$ , alors que les effets indiqués en vert sont, selon la littérature, la conséquence du décrochage des protéines G en réponse à l'activation de la sous-unité  $Ca_v$ . A noter que ces différents effets ne sont pas nécessairement tous représentés pour une condition donnée.

Comme nous l'avons déjà mentionné, l'inhibition de la conductance calcique est sans conteste l'effet le plus marquant, son amplitude, généralement mesurée aux pics des courants, étant très largement dépendante du couple  $Ca_v$  / RCPG (inhibition variable de 15 à 80%). Cette inhibition est également accompagnée d'un shift dépolarisant de la courbe d'activation du canal, attribué à une altération de la sensibilité du canal au voltage. Il a alors été proposé que le canal calcique au repos, serait dans un mode dit "willing" (ou facilement activable) et que

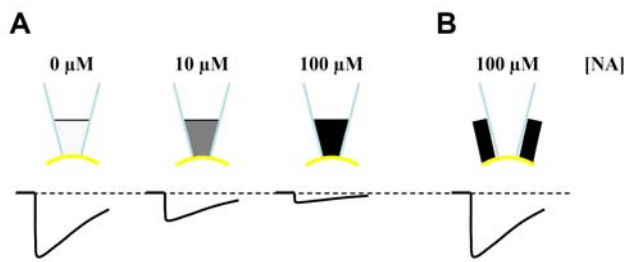
l'activation des RCPGs le conduirait dans un mode dit "*reluctant*" (ou difficilement activable) (Bean, 1989). A ce stade, nous pouvons donc déjà mentionner qu'il est communément admis à ce jour, que l'inhibition du courant calcique, ainsi que le shift dépolarisant de la courbe d'activation du canal vers des potentiels plus dépolarisants, représentent des caractéristiques de la régulation "ON" des VGCCs par les RCPGs. Nous reviendrons plus tard sur la notion de "*reluctance*", en particulier dans la première partie des résultats. L'inhibition des courants calciques suite à l'activation des RCPGs, présente également la particularité d'être levée en réponse à une dépolarisation membranaire. En effet, si l'inhibition du courant calcique est généralement clairement observable aux pics des courants, elle disparaît sensiblement au cours de la dépolarisation, pour disparaître totalement dans certaines conditions. On parle alors de phénomène de convergence (Patil *et al.*, 1996), le courant enregistré après l'activation du RCPG tant à converger vers le courant control, enregistré avant son activation. Il a été proposé que ce phénomène de convergence soit le résultat d'une relaxation de l'inhibition provoquée par la dépolarisation (Boland et Bean, 1993), à l'origine également d'un ralentissement apparent de la cinétique d'activation du courant calcique (Elmslie et Jones, 1994; Stephens *et al.*, 1998). De ce fait, l'inhibition des courants calciques par les RCPGs est qualifiée d'inhibition "dépendante du voltage", car levée par la dépolarisation membranaire. Nous verrons plus tard que si la modification du potentiel de membrane de la cellule est bien l'élément premier permettant la levée de l'inhibition, elle ne représente cependant pas son moteur moléculaire.

L'inhibition "dépendante du voltage" a également été illustrée expérimentalement par l'application d'une prépulse dépolarisante. En effet, suite à l'activation d'un RCPG, un courant calcique produit par une dépolarisation (pulse), test classiquement utilisée pour activer les VGCCs, est fortement augmenté si cette dépolarisation test est précédée d'une stimulation fortement dépolarisante, de l'ordre de 100 mV (prépulse) (Scott et Dolphin, 1990; Ikeda, 1991). Cette potentialisation du courant calcique liée à la relaxation de l'inhibition induite par l'activation du RCPG est qualifiée de "prépulse facilitation". Cet artifice expérimental est classiquement utilisé pour étudier la relaxation de l'inhibition "dépendante du voltage" des VGCCs, et permet, entre autres, d'extraire sa dépendance au potentiel de membrane, sa cinétique ou encore son degré de facilitation. Toutefois, l'utilisation de prépulses dépolarisantes peut être à l'origine de biais expérimentaux non négligeables, nous ayant conduit à développer une nouvelle méthode d'analyse comme nous le verrons dans la seconde partie des résultats.

Enfin, il a également été mis en évidence qu'un train de potentiels d'actions (PA) était pareillement capable de lever, au moins en partie, l'inhibition du courant calcique induite par l'activation d'un RCPG, cette facilitation étant dépendante de la durée des PA (Brody *et al.*, 1997) ainsi que de leur fréquence (Penington *et al.*, 1991; Williams *et al.*, 1997). Ceci ouvre d'intéressantes questions sur l'importance physiologique de la régulation des VGCCs par les RCPGs au niveau des terminaisons présynaptiques. En effet, l'activation des RCPGs induit une inhibition des VGCCs conduisant à une diminution des entrées calciques via ces canaux, et ainsi à une diminution de l'activité synaptique. Cette régulation se présente ainsi comme un inhibiteur de l'activité neuronale. Toutefois, elle est elle-même modulée par l'activité des neurones afférents, faisant de cette régulation, non pas un simple mécanisme d'inhibition mais un puissant moyen de codage des phénomènes de potentialisation ou de dépression synaptique (Bertram *et al.*, 2003).

### **B. Les acteurs moléculaires de l'inhibition**

Si l'activation des RCPGs représente la première étape conduisant à l'inhibition des courants calciques soutenus par les VGCCs, ce n'est que quelques années après la première description du phénomène (Dunlap et Fischbach, 1978) que l'implication des protéines G hétérotrimériques a réellement été mise en évidence. L'application de toxine pertussis (PTX, une toxine bactérienne capable de catalyser la ribosylation du GDP rendant les protéines G inhibitrices inactives) ou l'administration intracellulaire de GDP $\beta$ S (un analogue non hydrolysable du GDP qui inhibe de manière compétitive la fixation de GTP sur les protéines G hétérotrimériques) sur des neurones sensoriels de ganglions spinaux de la moelle épinière, est capable de bloquer l'inhibition des courants calciques induit par la noradrénaline ou le GABA (Holz *et al.*, 1986; Scott et Dolphin, 1986). Ces résultats mettent clairement en évidence l'implication des protéines G hétérotrimériques dans la modulation des VGCCs par les RCPGs. Il a ensuite été précisé que cette régulation ne faisait pas intervenir de seconds messagers intracellulaires, mais qu'elle était directe et spatialement délimitée. En effet, des enregistrements effectués sur des neurones sensoriels de poulet en configuration "cellule attachée" (c'est-à-dire que seuls les canaux présents sous la pipette de patch sont enregistrés) ont permis de mettre en évidence que l'inhibition des courants calciques par la noradrénaline n'avait lieu que lorsque le neuromédiateur était présent dans la pipette de patch, et non lorsqu'il était ajouté dans le milieu extracellulaire d'enregistrement (Forscher *et al.*, 1986) (Figure 20).



**Figure 20. Représentation schématique de l'expérience développée par Forscher mettant en évidence l'inhibition directe des VGCCs par les RCPGs.** Adapté de (Forscher *et al.*, 1986).

L'enregistrement des courants calciques de type N sur des neurones sensoriels de poulet en configuration "cellule attachée" permet de mettre en évidence que l'inhibition des courants par la noradrénaline n'a lieu que lorsque celle-ci est présente dans la pipette de patch (A) et non lorsqu'elle est présente dans le milieu extracellulaire (B).

Ceci suggère qu'il doit exister une très forte promiscuité entre le canal calcique et le RCPG, pour que l'inhibition puisse avoir lieu. Cette promiscuité a été mise en évidence très récemment dans le cas du canal calcique de type N et du récepteur ORL1 à la nociceptine, ces deux protéines étant capables d'interagir entre elles via leurs domaines carboxy- et amino-terminals, respectivement (Beedle *et al.*, 2004).

Un certain nombre d'études se sont ensuite attachées à déterminer quelles étaient les sous-unités des protéines G hétérotrimériques impliquées dans l'inhibition des VGCCs par les RCPGs. L'utilisation d'anticorps et d'oligonucléotides antisens, visant à bloquer ou diminuer le niveau d'expression des différentes sous-unités  $G_{\alpha}$ , a initialement mis en évidence que la sous-unité  $G_{\alpha o}$  était responsable de cette inhibition (McFadzean *et al.*, 1989; Baertschi *et al.*, 1992; Campbell *et al.*, 1993; Menon-Johansson *et al.*, 1993). Cependant, dans cette même période, d'autres études ont mis en évidence l'implication de la sous-unité  $G_{\alpha i}$  (Ewald *et al.*, 1989), puis des sous-unités  $G_{\alpha s}$  et  $G_{\alpha q}$  (Shapiro et Hille, 1993; Golard *et al.*, 1994; Zhu et Ikeda, 1994). Devant ces résultats divergents, il a alors été émis l'hypothèse que l'inhibition des VGCCs par les RCPGs n'était pas gouvernée par la sous-unité  $G_{\alpha}$ , mais probablement par un déterminant commun aux différentes protéines G hétérotrimériques, à savoir le dimère  $G_{\beta\gamma}$ . Ainsi, la surexpression de dimères  $G_{\beta_1\gamma_2}$  ou  $G_{\beta_2\gamma_3}$  dans des neurones sympathiques est nécessaire et suffisante pour mimer l'inhibition des courants calciques de type N par la noradrénaline, cette inhibition étant également réversible par l'application d'un prépulse dépolarisant (Herlitze *et al.*, 1996; Ikeda, 1996). La surexpression de dimères  $G_{\beta\gamma}$  empêchant par ailleurs toute inhibition subséquente des courants calciques par la noradrénaline. Toutefois, comment expliquer les résultats obtenus par ces différents groupes suggérant que la sous-unité  $G_{\alpha o}$  était impliquée dans l'inhibition des VGCCs par les RCPGs (McFadzean *et al.*, 1989)? Il apparaît que si le dimère  $G_{\beta\gamma}$  est bien responsable de l'inhibition des courants calciques suite à l'activation des RCPGs, la sous-unité  $G_{\alpha}$  aurait un rôle majeur dans la

spécificité des RCPGs à réguler les VGCCs. Ainsi, l'inhibition des canaux calciques neuronaux est généralement produite par l'activation de RCPGs couplés aux protéines  $G_{\alpha i}$  ou  $G_{\alpha o}$  (Holz *et al.*, 1986; Scott et Dolphin, 1986) tels que les récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques, expliquant pourquoi la déplétion de la sous-unité  $G_{\alpha o}$  dans les cellules NG108-15 empêche l'inhibition des courants calciques par la noradrénaline (McFadzean *et al.*, 1989). Nous reviendrons plus tard sur la capacité des différentes combinaisons de dimères  $G_{\beta_x\gamma_y}$  à réguler les VGCCs. Le dimère  $G_{\beta\gamma}$  étant le médiateur de l'inhibition, il est communément accepté que la relaxation de l'inhibition en réponse à un prépulse dépolarisant ou à un train de potentiels d'action, est une conséquence du décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  de la sous-unité  $Ca_v$  (Jones et Elmslie, 1997). Nous allons donc maintenant voir quels sont les déterminants structuraux de la sous-unité  $Ca_v$  impliqués dans l'interaction avec le dimère  $G_{\beta\gamma}$ , ainsi que leur contribution relative dans le mécanisme d'inhibition.

### C. Déterminants structuraux de l'interaction $Ca_v / G_{\beta\gamma}$

Pour l'heure, différents déterminants structuraux de la sous-unité  $Ca_v2.x$  ont été caractérisés comme étant des sites d'interactions directs du dimère  $G_{\beta\gamma}$  avec la sous-unité  $Ca_v$ , ou tout simplement important, d'un point de vue fonctionnel, à la régulation directe des VGCCs par les GPCRs. Ces déterminants se localisent à travers la boucle I-II, ainsi que dans les régions amino- et carboxy-terminales de la sous-unité  $Ca_v$ . Leurs contributions relatives dans la régulation des courants calciques par le dimère  $G_{\beta\gamma}$  restant pour l'heure mal comprise. Toutefois, cohérent avec l'idée qu'un seul dimère  $G_{\beta\gamma}$  soit capable de se lier à une sous-unité  $Ca_v$  (Zamponi et Snutch, 1998), il a été proposé que ces différents sites d'interactions pourraient se structurer pour former un seul et unique domaine appelé GPBP (pour *G-Protein Binding Pocket*) (De Waard *et al.*, 2005) (voir également [Annexe 4](#)).

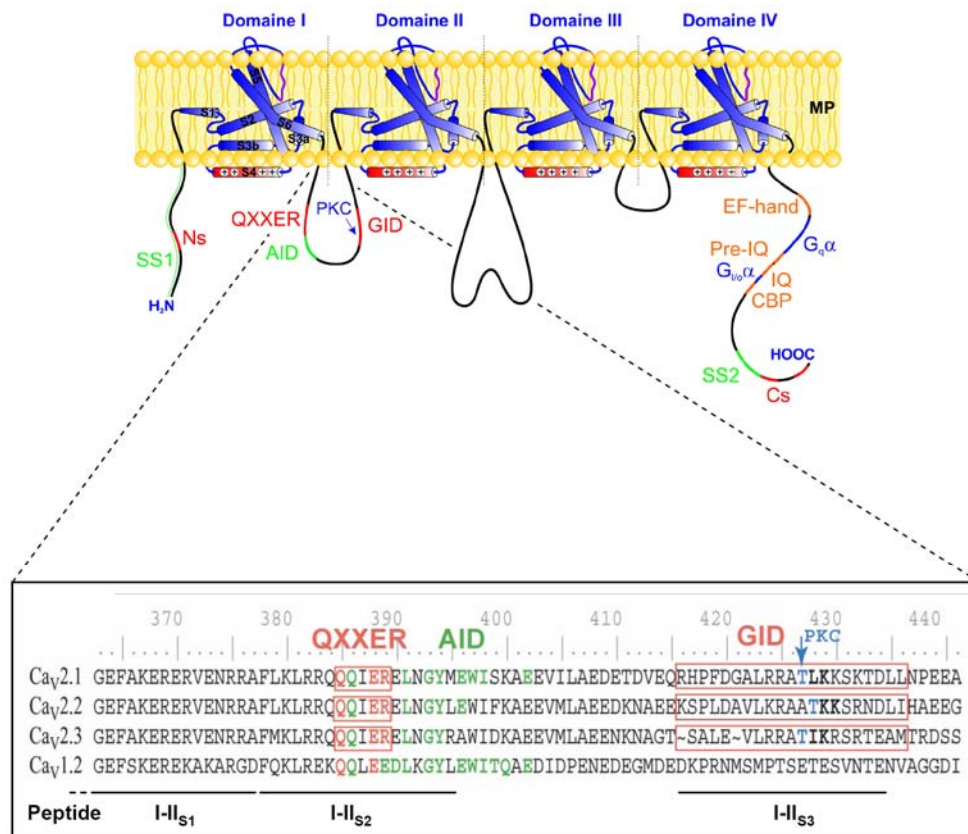
#### 1. Importance de la boucle I-II de la sous-unité $Ca_v2.x$

Le fait que le dimère  $G_{\beta\gamma}$  soit le médiateur de l'inhibition des courants calciques par les RCPGs, et que ce dernier soit capable d'interagir fonctionnellement avec la sous-unité  $\beta$  (Campbell *et al.*, 1995), a rapidement conduit certains groupes à s'interroger sur l'importance de la boucle I-II de la sous-unité  $Ca_v$  dans cette régulation. Le dimère  $G_{\beta\gamma}$  est capable d'interagir avec l'adénylate cyclase de type 2 ainsi qu'avec la phospholypase  $C\beta_2$  via un motif

consensus QXXER (Chen *et al.*, 1995). De manière intéressante, ce site consensus est également présent au sein la boucle I-II des sous-unités  $Ca_v2.x$ , et se localise dans la région proximale de la séquence AID de 18 acides aminés initialement décrite comme le domaine principal d'interaction de la sous-unité  $\beta$  (QQUIERELNGY--WI--AE) (Pragnell *et al.*, 1994), suggérant ainsi une possible interaction entre la boucle I-II et le dimère  $G_{\beta\gamma}$ . Cette interaction a été mise en évidence par différents groupes (De Waard *et al.*, 1997; Herlitze *et al.*, 1997; Zamponi *et al.*, 1997). Ainsi, l'injection dans des cellules HEK293 du peptide synthétique FLKRRQQQUIERELNGYL de la sous-unité  $Ca_v2.2$  (peptide I-II<sub>S2</sub>, Figure 21), supprime l'inhibition des courants  $Ca_v2.2/\alpha_2/\beta_{1b}$  induite par l'injection de  $G_{\beta\gamma}$ , suggérant une interaction entre ce peptide et le dimère (Zamponi *et al.*, 1997). Cette interaction a été mise en évidence *in vitro*, où le dimère  $G_{\beta_{1\gamma_2}}$  est capable d'interagir avec la protéine de fusion GST-AID<sub>A</sub>, avec une constante d'affinité de 63 nM (De Waard *et al.*, 1997), soit 10 à 20 fois inférieure à celle de la sous-unité  $\beta$  (De Waard *et al.*, 1995). L'importance du domaine consensus QXXER dans cette interaction a été précisée par mutagenèse. Ainsi, la substitution de l'arginine (R) par un acide glutamique (E), abolie l'interaction entre le dimère  $G_{\beta_{1\gamma_2}}$  et la protéine de fusion GST-AID<sub>A</sub> (De Waard *et al.*, 1997), et bloque totalement l'inhibition des courants  $Ca_v2.1/\beta_4$  induite par l'injection dans l'ovocyte de Xénope de GTP $\gamma$ S (De Waard *et al.*, 1997). Ce résultat fonctionnel étant toutefois contradictoire avec celui d'un autre groupe, où cette mutation n'abolie pas, mais au contraire potentialise l'inhibition des courants  $Ca_v2.1/\beta_{1b}$  induite par l'injection de GTP $\gamma$ S dans les cellules tsA-201 (Herlitze *et al.*, 1997). De plus, il est important de noter que la mutation R→E est également à l'origine d'un ralentissement drastique de la cinétique d'inactivation des courants  $Ca_v2.1/\beta_{1b}$  (Herlitze *et al.*, 1997). Le domaine QXXER se présente ainsi comme un déterminant moléculaire impliqué à la fois dans la fixation du dimère  $G_{\beta\gamma}$  sur la boucle I-II de la sous-unité  $Ca_v$  (De Waard *et al.*, 1997), et également dans l'inactivation rapide du canal (Herlitze *et al.*, 1997). Dans ce contexte, il apparaît difficile de conclure sur l'importance fonctionnelle de ce motif dans la régulation des VGCCs par les GPCRs, l'altération de ce motif affectant à la fois l'interaction du dimère  $G_{\beta\gamma}$  et l'inactivation du canal. Nous reviendrons sur l'importance de l'inactivation dans cette régulation dans la troisième partie des résultats. Il a également été observé que la substitution de l'isoleucine (I) par une leucine (L) dans le domaine QQIER de la sous-unité  $Ca_v2.1$ , entraîne une diminution de l'inhibition des courants  $Ca_v2.1/\beta_{1b}$  par l'injection de GTP $\gamma$ S (Herlitze *et al.*, 1997). L'ensemble de ces résultats expliquent en partie pourquoi les canaux

Ca<sub>v</sub>1.x, présentant la séquence QQLEE, ne sont que faiblement affectés par l'inhibition directe des RCPGs (Bell *et al.*, 2001). L'insertion de la séquence consensus QXXER dans la sous-unité Ca<sub>v</sub>1.2 n'est cependant pas suffisante pour restaurer cette régulation (Herlitze *et al.*, 1997), suggérant que, bien que ce domaine joue un rôle important dans la fixation du dimère G<sub>βγ</sub> sur la sous-unité Ca<sub>v</sub>, il ne permet pas à lui seul de traduire l'inhibition fonctionnelle du courant calcique.

D'autres déterminants moléculaires de la boucle I-II ont alors été caractérisés comme pouvant également être impliqués dans cette régulation. L'injection du peptide GVLGEFAKERERVENRRA de la sous-unité Ca<sub>v</sub>2.2 (peptide I-II<sub>S1</sub>, [Figure 21](#)), localisé juste en amont du domaine AID, à cheval entre le sixième segment transmembranaire du domaine I (IS6) et la boucle I-II, est capable de bloquer l'inhibition des courants Ca<sub>v</sub>2.2/α<sub>2</sub>/β<sub>1b</sub>, induite par l'injection de G<sub>βγ</sub>, suggérant un second site d'interaction de ce dimère (Zamponi *et al.*, 1997). Enfin, le domaine GID (pour *G-protein Interaction Domain*) (Jarvis et Zamponi, 2001), localisé 13 acides aminés en aval du domaine AID, a lui aussi été identifié comme étant un site potentiel de fixation du dimère G<sub>βγ</sub> sur la boucle I-II des sous-unité Ca<sub>v</sub>2.x. En effet, le peptide synthétique contenant cette séquence (peptide I-II<sub>S3</sub>, [Figure 21](#)) est lui aussi capable de bloquer l'inhibition des courants Ca<sub>v</sub>2.2/α<sub>2</sub>/β<sub>1b</sub> par l'injection de G<sub>βγ</sub> (Zamponi *et al.*, 1997), suggérant là encore une interaction du dimère G<sub>βγ</sub> sur le domaine GID. Cette interaction ayant été confirmée *in vitro* avec le dimère G<sub>β<sub>1</sub>γ<sub>2</sub></sub> et présente une constante d'affinité de 20 nM (De Waard *et al.*, 1997). A noter que la phosphorylation du domaine GID par la PKC sur un résidu thréonine ([Figure 21](#)) prévient la fixation du dimère G<sub>βγ</sub>, suggérant une interaction fonctionnelle entre les régulations directe et indirecte des VGCCs par les RCPGs (Zamponi *et al.*, 1997).



**Figure 21. Représentation schématique des déterminants structuraux de la boucle I-II de la sous-unité  $Ca_v.2.x$  impliqués dans la régulation directe des VGCCs par les RCPGs.** Adapté de (De Waard *et al.*, 2005). Les différents déterminants structuraux de la boucle I-II de la sous-unité  $Ca_v.2.x$  impliqués dans l'interaction avec le dimère  $G_{\beta\gamma}$  sont indiqués en rouge. Ils se composent du domaine QXXER localisé au sein du domaine AID (pour *Alpha Interaction Domain*) impliqué dans l'interaction avec la sous-unité  $\beta$ , ainsi que le domaine GID (pour *G-protein Interaction Domain*) localisé 13 acides aminés en aval du domaine AID. Les différents peptides (I-II<sub>S1</sub>, I-II<sub>S2</sub> et I-II<sub>S3</sub>) ayant permis de mettre en évidence ces interactions (Zamponi *et al.*, 1997) sont indiqués. Le site de phosphorylation du domaine GID par la PKC est représenté en bleu. Séquences SwissProt relatives :  $Ca_v.2.1$  (P54282, rat),  $Ca_v.2.2$  (Q02294, rat),  $Ca_v.2.3$  (Q15878, homme) et  $Ca_v.1.2$  (P22002, rat).

La boucle cytoplasmique reliant les domaines I et II des sous-unités  $Ca_v.2.x$  présente donc différents déterminants structuraux impliqués dans la fixation du dimère  $G_{\beta\gamma}$  sur la sous-unité  $Ca_v$ . Toutefois, comme nous l'avons mentionné, l'importance fonctionnelle de cette interaction dans la régulation des courants calciques par le dimère  $G_{\beta\gamma}$  demeure largement discutée. Aussi, d'autres groupes ont suggéré que la boucle I-II n'était pas l'élément essentiel de l'inhibition (Zhang *et al.*, 1996; Page *et al.*, 1997; Canti *et al.*, 1999). En effet, il a été mis en évidence que la substitution de la boucle I-II de la sous-unité  $Ca_v.2.2$  par la boucle I-II des sous-unités  $Ca_v.2.1$  (dont l'inhibition est plus faible) ou  $Ca_v.1.2$  (non inhibée) n'affectait pas l'inhibition des courants calciques  $Ca_v.2.2/\beta_{1b}$  par la somatostatine (Zhang *et al.*, 1996). Inversement, la substitution de la boucle I-II de la sous-unité  $Ca_v.1.2$  par la boucle I-II de la sous-unité  $Ca_v.2.2$  ne permet pas de restaurer la régulation directe des courants  $Ca_v.1.2/\beta_{2a}$  par

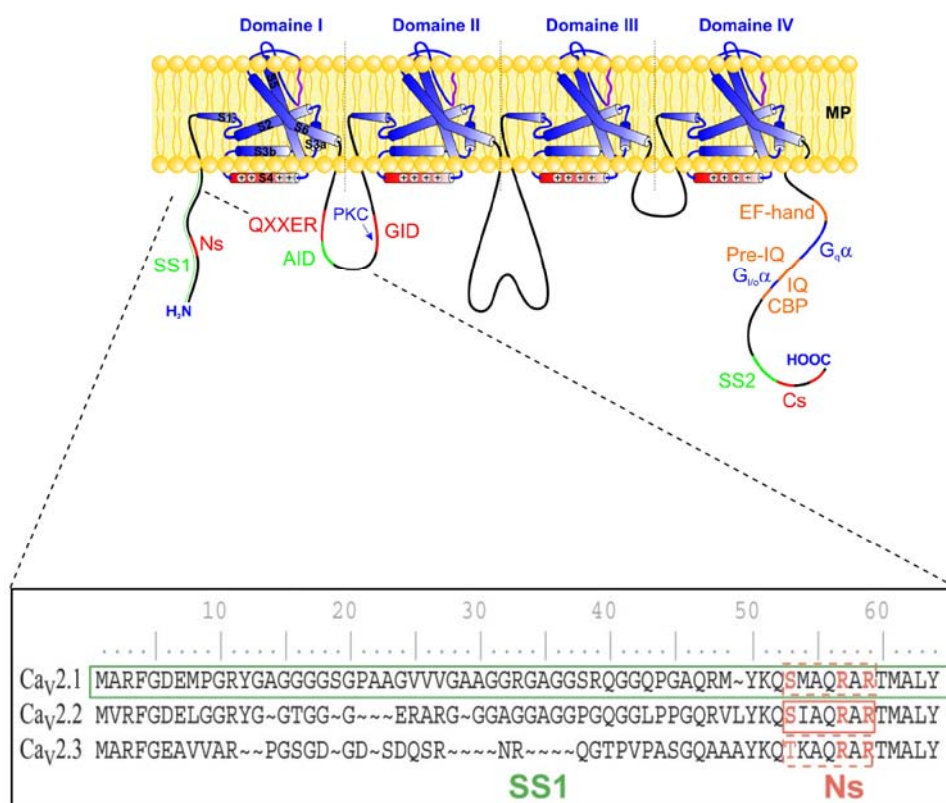


le quinpirole, un agoniste des récepteurs dopaminergiques D2 (Canti *et al.*, 1999). Enfin, la substitution de la boucle I-II de la sous-unité  $Ca_v2.3$  (isoforme rbE-II de rat (Soong *et al.*, 1993), cf. [tableau VII](#)), peu sensible à la régulation directe par les protéines G hétérotrimériques, par la boucle I-II de la sous-unité  $Ca_v2.2$ , entraîne un ralentissement de la cinétique d'activation des courants  $Ca_v2.3/\beta_{2a}$  suite à l'injection de  $GTP\gamma S$ , mais pas d'inhibition nette du courant calcique lorsqu'elle est mesurée aux pics des courants (Page *et al.*, 1997). Il a alors été proposé que la boucle I-II pourrait être l'élément responsable du ralentissement de la cinétique d'activation des courants calciques en réponse à l'activation des RCPGs, et que l'inhibition du courant à proprement parlé ferait intervenir d'autres déterminants moléculaires (Page *et al.*, 1997). Le ralentissement de la cinétique d'activation ayant été attribué à la relaxation de l'inhibition (Elmslie et Jones, 1994; Stephens *et al.*, 1998), la boucle I-II pourrait ainsi être impliquée dans le décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  de la sous-unité  $Ca_v$ . Ce concept sera également abordé dans la troisième partie des résultats lorsque nous traiterons de l'importance de l'inactivation dans la régulation directe des VGCCs par les RCPGs. Ces résultats soulèvent toutefois une question importante quand à la pertinence d'associer l'absence de prépulse facilitation à l'absence de régulation directe par les protéines G. En effet, si la boucle I-II est responsable de la levée de l'inhibition induite par le dimère  $G_{\beta\gamma}$ , alors l'absence partielle de ce déterminant moléculaire, induite par exemple par la mutation R→E, entraînera une diminution du phénomène de prépulse facilitation, sans nécessairement affecter l'inhibition du courant calcique (d'autres déterminants structuraux de la sous-unité  $Ca_v2.x$  étant disponibles pour l'interaction du dimère  $G_{\beta\gamma}$  comme nous allons le voir). Ainsi, d'un point de vue pratique, il apparaît fondamental de se placer dans des conditions expérimentales permettant l'enregistrement du courant calcique avant et après activation du RCPG, pour ne pas avoir besoin de mettre en évidence l'inhibition de manière indirecte par la mesure de la prépulse facilitation.

## **2. Importance du domaine amino-terminal de la sous-unité $Ca_v$**

Alors que les courants calciques générés par l'isoforme BII-2 de la sous-unité  $Ca_v2.3$  (variant du cerveau de lapin, cf. [Tableau VII](#)) sont sensiblement affectés par l'application de somatostatine (Yassin *et al.*, 1996), ou directement par l'injection de  $GTP\gamma S$  (Meza et Adams, 1998), ceux générés par l'isoforme rbE-II (variant de rat, cf. [Tableau VII](#)) sont quand à eux insensibles à cette régulation (Page *et al.*, 1997). L'analyse des séquences protéiques de ces

deux variants révèle que l'isoforme rbE-II présente un domaine amino-terminal tronqué comparé à celui de l'isoforme BII-2. Il a alors été suggéré que le domaine amino-terminal de la sous-unité  $Ca_v$  pourrait être impliqué dans la régulation directe des RCPGs. Ainsi, l'extension par PCR (pour *Polymerase Chain Reaction*) de la région amino-terminale de l'isoforme rbE-II, conduisant à une protéine homologue aux isoformes humaine et de lapin, permet de restaurer l'inhibition par le quinpirole des courants calciques qu'elle génère (Page *et al.*, 1998). De plus, contrairement aux expériences de substitution des boucles cytoplasmiques I-II, la substitution de la région amino-terminale de la sous-unité  $Ca_v1.2$  par celle de la sous-unité  $Ca_v2.2$  est suffisante pour conférer au canal calcique de type L une sensibilité au quinpirole (Canti *et al.*, 1999). Le domaine critique de la région amino-terminale de la sous-unité  $Ca_v2.x$  a été précisé, et se localise dans une séquence de 11 acides aminés **YKQSIAQRART** hautement conservés parmi les différentes sous-unités  $Ca_v2.x$  (Canti *et al.*, 1999) (Figure 22).



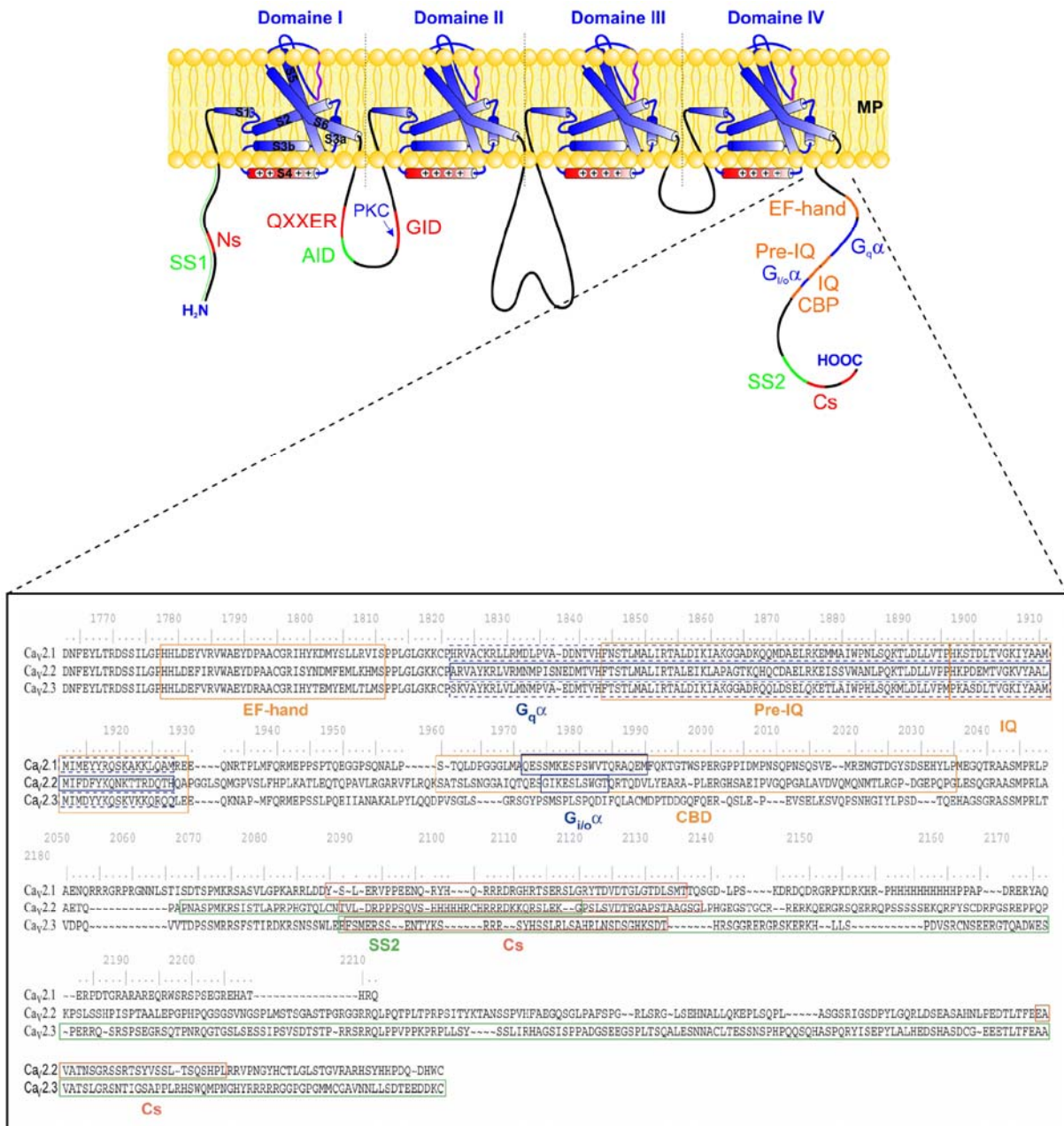
**Figure 22. Représentation schématique des déterminants structuraux du domaine amino-terminal de la sous-unité  $Ca_v2.x$  impliqués dans la régulation directe des VGCCs par les RCPGs.** Adapté de (De Waard *et al.*, 2005).

La séquence amino-terminale (Ns) impliquée dans l'interaction avec le dimère  $G_{\beta\gamma}$  est indiquée en rouge. Le domaine secondaire (SS1) d'interaction avec la sous-unité  $\beta$  est indiqué en vert. Séquences SwissProt relatives :  $Ca_v2.1$  (P54282, rat),  $Ca_v2.2$  (Q02294, rat) et  $Ca_v2.3$  (Q15878, homme).

Les mutations YKQ→AAA et RAR→AAA abolissant totalement l'inhibition des courants calciques  $Ca_v2.3/\beta_{2a}/\alpha_2\delta$  par le quinpirole (Canti *et al.*, 1999). A noter que ce domaine traduit également les altérations de l'inactivation rapide des canaux  $Ca_v2.2$  induites par les sous-unités  $\beta$  (Stephens *et al.*, 2000). De manière intéressante, il semble là encore émerger un lien entre l'inactivation rapide des canaux calciques et leur régulation directe par les protéines G hétérotrimériques. En effet, la mutation R387E du domaine QXXER de la boucle I-II (De Waard *et al.*, 1997; Herlitze *et al.*, 1997) ou celles du domaine amino-terminale, modifient certes la régulation directe des courants calciques par les RCPGs, mais affectent également l'inactivation des canaux. Ainsi, nous sommes en mesure de nous demander si l'implication de la boucle I-II et de la région amino-terminale dans cette régulation passe directement par une interaction avec le dimère  $G_{\beta\gamma}$ , ou bien via leur implication dans le contrôle de l'inactivation rapide des canaux calciques.

### 3. Importance du domaine carboxy-terminal de la sous-unité $Ca_v$

L'implication de la région carboxy-terminale dans la régulation des VGCCs par les RCPGs a également été investigué. Un site de fixation du dimère  $G_{\beta\gamma}$  a été décrit dans la région distale du domaine carboxy-terminal de la sous-unité  $Ca_v2.3$  (Qin *et al.*, 1997), et présente une certaine homologie avec celui des sous-unités  $Ca_v2.1$  et  $Ca_v2.2$  (Simen *et al.*, 2001) (Figure 23). Ainsi, la substitution de la partie carboxy-terminale de la sous-unité  $Ca_v2.3$  par celle de la sous-unité  $Ca_v1.2$  est suffisante pour abolir l'inhibition des courants  $Ca_v2.3/\beta_{2a}$  induite par l'activation du récepteur muscarinique M2 (Qin *et al.*, 1997). De manière intéressante, le domaine de fixation du dimère  $G_{\beta\gamma}$  dans la région carboxy-terminale de la sous-unité  $Ca_v2.x$  est localisé proche du domaine de fixation des sous-unités  $G_{\alpha o}$  sur les sous-unités  $Ca_v2.1$  et  $Ca_v2.2$  (Furukawa *et al.*, 1998a) et  $G_{\alpha q}$  sur la sous-unité  $Ca_v2.2$  (Simen *et al.*, 2001) (Figure 23). Ces résultats suggèrent que la région carboxy-terminale des sous-unités  $Ca_v2.x$  pourrait être impliquée dans le couplage fonctionnel entre la sous-unité  $Ca_v$  et le RCPG via le trimère  $G_{\alpha/\beta\gamma}$  (Kitano *et al.*, 2003; Beedle *et al.*, 2004). Ainsi, il n'est pas surprenant que la délétion de la région carboxy-terminale de la sous-unité  $Ca_v2.2$  contenant le domaine d'interaction avec le dimère  $G_{\beta\gamma}$ , n'affecte pas l'inhibition des courants calcique induite par l'injection de GTP $\gamma$ S (Meza et Adams, 1998), cette inhibition étant indépendante de l'activation d'un RCPG. En revanche, cette délétion est bien à l'origine d'une diminution de l'inhibition des courants de type N par la somatostatine (Hamid *et al.*, 1999).



**Figure 23. Représentation schématique des déterminants structuraux du domaine carboxy-terminal de la sous-unité Ca<sub>2.x</sub> impliqués dans la régulation directe des VGCCs par les RCPGs.** Adapté de (De Waard *et al.*, 2005).

Les séquences carboxy-terminales (Cs) impliquées dans l'interaction avec le dimère G<sub>βγ</sub> sont indiquées en rouge. Le domaine secondaire (SS2) d'interaction avec la sous-unité β est indiqué en vert. Les sites de fixation des sous-unités G<sub>αq</sub> et G<sub>αi/o</sub> sont indiqués en bleu. Enfin, les domaines impliqués dans la liaison du calcium (EF-hand, pre-IQ/IQ et CBD (pour *Calcium Binding Domain*)) sont indiqués en orange. Séquences SwissProt relatives : Ca<sub>v</sub>2.1 (P54282, rat), Ca<sub>v</sub>2.2 (Q02294, rat) et Ca<sub>v</sub>2.3 (Q15878, homme).

Paradoxalement, l'importance de la région carboxy-terminale dans la régulation des VGCCs par les RCPGs n'a été que peu étudiée comparé au nombre de travaux réalisés sur la boucle I-II et sur la région amino-terminale. Et pour cause, les travaux basés sur l'injection de GTPγS ou sur la surexpression de dimères G<sub>βγ</sub> n'étaient pas en mesure de mettre en évidence

l'importance fonctionnelle de ce domaine. Il s'agit là d'un réel biais expérimental, ce domaine carboxy-terminal, de part sa probable fonction de couplage entre la sous-unité  $Ca_v$  et le RCPG étant finalement le premier déterminant moléculaire mis en jeu dans la régulation directe des VGCCs par les RCPGs en conditions physiologiques. Ainsi, autant l'importance du domaine carboxy-terminal ne présente que peu de doute dans cette régulation, autant l'implication de la boucle I-II devrait être réinvestiguée.

#### 4. Vers la notion de $G_{\beta\gamma}$ *Protein-Binding Pocket*

Comme nous venons de le voir, les sous-unités  $Ca_v2.x$  présentent un pattern d'interaction pour le dimère  $G_{\beta\gamma}$ , rendant difficile l'interprétation fonctionnelle de l'interaction  $Ca_v2.x / G_{\beta\gamma}$ . Devant cette difficulté, a été proposé la notion de GPBP (pour  $G_{\beta\gamma}$  *Protein-Binding Pocket*), à savoir un domaine unique d'interaction entre la sous-unité  $Ca_v$  et le dimère  $G_{\beta\gamma}$ , spatialement structuré et constitué par l'ensemble des différents déterminants décrits précédemment (De Waard *et al.*, 2005) (Annexe 4). Cette notion est supportée par le fait que la réassociation du dimère  $G_{\beta\gamma}$  sur la sous-unité  $Ca_v2.2$ , suite à un prépulse dépolarisant ayant préalablement conduit à sa dissociation, suit un décours temporel de type mono-exponentiel, dont la constante de temps est directement corrélée à la concentration libre en  $G_{\beta\gamma}$ , suggérant qu'une seule molécule de  $G_{\beta\gamma}$  est capable d'interagir avec la sous-unité  $Ca_v$  (Zamponi et Snutch, 1998). A noter toutefois que des travaux initiaux suggéraient que l'interaction  $Ca_v / G_{\beta\gamma}$  pouvait impliquer plusieurs dimères  $G_{\beta\gamma}$  dont la fixation sur la sous-unité  $Ca_v$  se ferait de manière coopérative (Boland et Bean, 1993). Ainsi, le dimère  $G_{\beta\gamma}$  pourrait interagir avec les sous-unités  $Ca_v2.x$  via le domaine GPBP, où les différents déterminants structuraux composant ce domaine seraient responsables d'un caractère particulier de la régulation des VGCCs par les RCPGs. Aussi, le domaine carboxy-terminal de la sous-unité  $Ca_v2.x$  jouerait un rôle majeur dans l'inhibition des courants calciques via l'activation des RCPGs (Qin *et al.*, 1997; Furukawa *et al.*, 1998b; Furukawa *et al.*, 1998a) en favorisant le couplage fonctionnel entre le récepteur et le canal à travers le trimère  $G_{\alpha/\beta\gamma}$  (Kitano *et al.*, 2003; Beedle *et al.*, 2004). Dans ce contexte, le domaine carboxy-terminal ne serait donc pas impliqué de manière directe dans l'inhibition des courants calciques, mais permettrait le rapprochement spatial de la sous-unité canal et du RCPG, nécessaire à cette régulation (Forscher *et al.*, 1986).

La boucle cytoplasmique I-II, représente un élément important d'interaction avec le dimère  $G_{\beta\gamma}$ , via trois motifs clairement établis. Cependant, la fixation du dimère  $G_{\beta\gamma}$  sur la boucle I-II

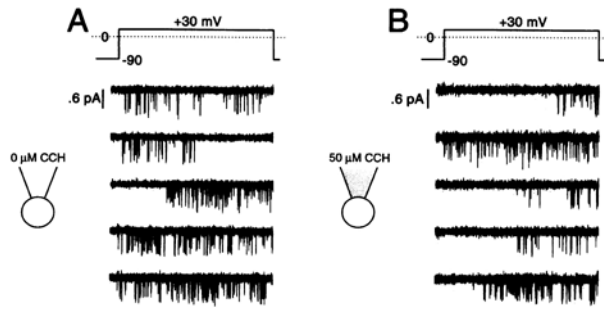
ne semble pas jouer un rôle majeur dans le mécanisme d'inhibition du courant calcique via l'activation du RCPG (régulation "ON") (Zhang *et al.*, 1996; Qin *et al.*, 1997), mais serait plutôt impliqué dans le phénomène de relaxation de l'inhibition (régulation "OFF"), c'est-à-dire dans le décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  de la sous-unité  $Ca_v$ , en réponse par exemple à un prépulse dépolarisant (Herlitze *et al.*, 1997; Simen et Miller, 2000). Nous reparlerons de l'importance de la boucle I-II dans ce phénomène de relaxation dans la troisième partie des résultats.

Enfin, la région amino-terminale de la sous-unité  $Ca_v$  se présente quand à elle comme le déterminant moléculaire le plus sérieux à l'origine de l'inhibition directe des courants calciques par le dimère  $G_{\beta\gamma}$  (Page *et al.*, 1998; Canti *et al.*, 1999).

Dans ce contexte, la GPBP se présente comme une structure dynamique, dont les différents déterminants moléculaires qui la composent seraient à l'origines de la régulation des VGCCs par les RCPGs, en permettant d'une part l'organisation spatiale des complexes  $Ca_v$  / RCPG, et en contrôlant d'autre part les événements "ON" et "OFF" de cette régulation.

#### **D. Comment le dimère $G_{\beta\gamma}$ inhibe-t-il les courants calciques ?**

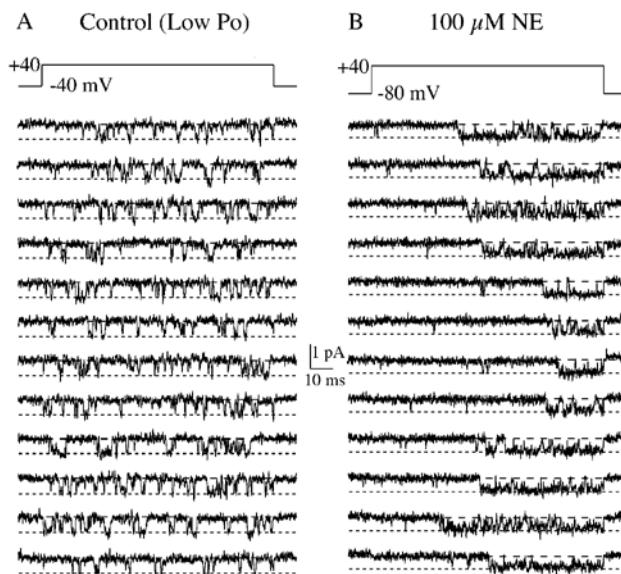
Bien que de nombreux travaux se sont attachés à élucider les bases moléculaires de la régulation directe des VGCCs par les RCPGs (un minimum de 400 publications d'après une estimation réalisée via PubMed), force est de constater qu'à ce jour, le (ou les) mécanisme(s) moléculaire(s) à l'origine de l'inhibition du courant calcique par le dimère  $G_{\beta\gamma}$ , demeure(nt) inconnu(s). L'observation d'un shift dépolarisant de la voltage dépendance d'activation des canaux sous régulation directe des protéines G hétérotrimériques, a initialement conduit Bean à proposer que le canal passerait d'un mode "*willing*" (facilement activable) à un mode "*reluctant*" (plus difficilement activable) suite à l'activation des RCPGs (Bean, 1989). Le retour vers le mode "*willing*" nécessiterait le décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  de la sous-unité  $Ca_v$  (Bean, 1989; Elmslie *et al.*, 1990). Des résultats obtenus au niveau du canal unitaire ont renforcé cette idée. Il a été observé une latence de première ouverture de la sous-unité  $Ca_v2.2$  suite à l'activation du récepteur muscarinique M2, le canal présentant ensuite une activité comparable à celle d'un canal non régulé (Patil *et al.*, 1996) (Figure 24).



**Figure 24. Mise en évidence d'une latence de première ouverture des canaux de type N suite à l'activation des récepteurs M2.** Tiré de (Patil *et al.*, 1996).

L'application de carbachol (CCH) sur des cellules HEK293 induit une latence de première ouverture des canaux  $Ca_v2.2/\alpha_2/\beta_{1b}$  au niveau unitaire. Sont représentés 5 patches en absence (A) ou en présence (B) de 50  $\mu$ M de carbachol dans le milieu intra pipette.

Il a ainsi été proposé que cette latence de première ouverture correspondrait au temps nécessaire au dimère  $G_{\beta\gamma}$  pour se dissocier de la sous-unité  $Ca_v$  en réponse à la dépolarisation membranaire (Patil *et al.*, 1996). L'ouverture ionique du canal, c'est-à-dire l'ouverture conduisant à l'apparition d'un courant calcique, nécessitant le décrochage préalable du dimère  $G_{\beta\gamma}$  de la sous-unité  $Ca_v$  (Patil *et al.*, 1996). Un autre groupe a quant à lui suggéré des ouvertures ioniques du canal de type N, à faible probabilité, dans le mode "*reluctant*", c'est-à-dire en présence du dimère  $G_{\beta\gamma}$  sur la sous-unité  $Ca_v$ , pour des sauts de potentiels supérieurs ou égales à 30 mV (Lee et Elmslie, 2000) (Figure 25).

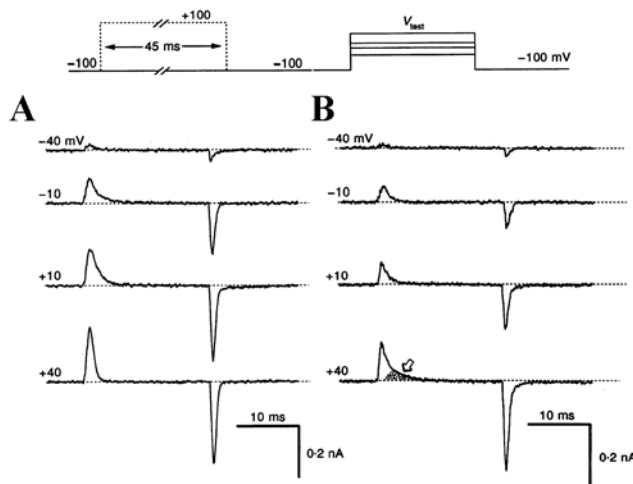


**Figure 25. Mise en évidence d'ouvertures à faible probabilité du canal N dans le mode "*reluctant*".** Tiré de (Lee et Elmslie, 2000).

L'application de norépinéphrine (NE) sur des neurones de ganglions sympathiques de grenouille-taureau (*Bullfrogs*) conduit les canaux de type N dans un mode à faible probabilité d'ouverture ( $P_o$ ) en réponse à un saut de dépolarisation de -80 mV à 40 mV. Pour comparaison, l'activité de canaux N à faible  $P_o$  en condition control est représentée pour un saut de potentiel de -40 mV à +40 mV. A noter qu'en présence de NE, le mode de faible  $P_o$  est ensuite suivie d'un mode à haute  $P_o$ .

Toutefois, aucune évidence expérimentale n'est apporté sur le fait que le dimère  $G_{\beta\gamma}$  est toujours lié au canal durant ces ouvertures ioniques. Quoi qu'il en soit, ce modèle simple de régulation, peut en effet se suffire à expliquer d'une part l'inhibition du courant calcique, mais également le shift dépolarisant de la courbe d'activation du canal.

Il a également été proposé que la modulation de l'activité de la sous-unité  $Ca_v2.x$  passerait par une altération de ses propriétés de *gating* en présence de  $G_{\beta\gamma}$  (Kasai et Aosaki, 1989; Delcour *et al.*, 1993; Delcour et Tsien, 1993). En effet, l'injection de  $GTP\gamma S$  produit une diminution de l'amplitude des courants de *gating* des canaux  $Ca_v2.2/\alpha_2/\beta_{1b}$  exprimés en système hétérologue (Figure 26), ainsi qu'un shift dépolarisant de la courbe d'activation du canal (Jones *et al.*, 1997).



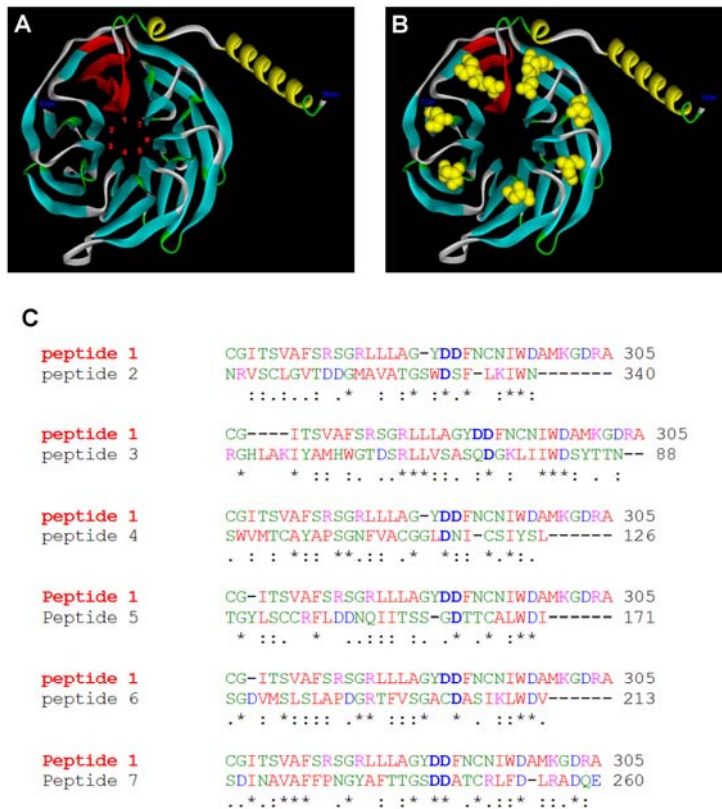
**Figure 26. Courants de *gating* durant l'inhibition directe des courants de type N par les protéines G hétérotrimériques.** Tiré de (Jones *et al.*, 1997).

Représentation des courants de *gating* des canaux de type N, enregistrés en HEK293, avant (A, perfusion de  $GDP\beta S$ ) et après (B, perfusion de  $GTP\gamma S$ ) inhibition directe par les protéines G hétérotrimériques.

Il a alors été proposé que le dimère  $G_{\beta\gamma}$  modulerait l'activité de la sous-unité  $Ca_v2.2$  en altérant d'une part le mouvement du senseur de voltage, et d'autre part son couplage moléculaire avec l'ouverture du canal (Jones *et al.*, 1997). Comme nous l'avons vu dans la première partie de ce manuscrit, le senseur de voltage est représenté par les quatre segments S4 de la sous-unité  $Ca_v$ , formant le "*voltage-sensor paddle*", et dont le mouvement à travers la bicouche lipidique, en réponse à une dépolarisation membranaire, conduit à l'ouverture du canal. S'il est vrai que le dimère  $G_{\beta\gamma}$  agit en altérant le mouvement du "*voltage-sensor paddle*", il serait alors intéressant de tester s'il existe une interaction entre les différents segments S4 et le dimère  $G_{\beta\gamma}$ . Ceci n'a jamais été réalisé, probablement en raison du fait que ces segments S4, de part leur localisation transmembranaire présumée, ne semblaient pas être accessibles pour des interactions interprotéiques. Si tel était le cas, nous pourrions imaginer de manière totalement spéculative, que la sous-unité  $G_{\beta}$ , de part sa structure relativement symétrique et circulaire, pourrait se placer sous le canal, interagissant avec les quatre segments S4, ralentissant ainsi leur mobilité à travers la membrane plasmique. Une étude récente met en évidence qu'un peptide de 35 acides aminés (résidus 271-305) dérivé de la sous-unité  $G_{\beta_2}$ , est suffisant pour induire l'inhibition des courants calciques de type P/Q (Li *et*



*al.*, 2005). L'observation de la structure cristallographique de la sous-unité  $G_{\beta_2}$  révèle que ce peptide forme un motif spatialement structuré et approximativement répété sept fois de manière circulaire dans la protéine (Figure 27). Les comparaisons de séquences de ces différents peptides révèlent la présence d'un (ou deux) acide(s) aspartique(s) (D) hautement conservé(s) sur chacun de ces éléments structuraux, formant un anneau de charges négatives à la surface de la sous-unité  $G_{\beta_2}$  (Figure 27).



**Figure 27. Caractéristiques structurales de la sous-unité  $G_{\beta_2}$ .**

Les hélices  $\alpha$  sont représentées en jaune, les feuillets  $\beta$  en bleu. Le domaine en rouge correspond au peptide de 35 acides aminés (résidus 271-305) impliqué dans l'inhibition directe des courants P/Q (A). Ce motif structural semble se répéter 7 fois à travers la protéine (numérotés de 1 à 7). Les alignements de séquences des sept peptides (C) révèlent la présence d'un ou deux acides aspartiques (Asp, D) hautement conservés sur chacun d'eux (indiqué en bleu et en gras), formant un cluster de charges négatives à la surface de la sous-unité  $G_{\beta_2}$  (B, représentation atomique en jaune des résidus Asp). Référence *Protein Data Bank* : 1TBG (AAM15219).

Aussi, ces charges négatives répétées, pourraient constituer les déterminants moléculaires d'une éventuelle interaction entre le dimère  $G_{\beta\gamma}$  et les charges positives du "voltage-sensor paddle" de la sous-unité  $Ca_v$ . Un argument expérimental à cette vision théorique viendrait de la mutation ponctuelle G177E, localisée dans le troisième segment du premier domaine membranaire (IS3) de la sous-unité  $Ca_v2.2a$  (isoforme rbB-I de rat) qui confère au canal une inhibition constante en l'absence de toute modulation par les protéines G hétérotrimériques, cette inhibition étant reversée par l'application d'un prépulse dépolarisant (Zhong *et al.*, 2001). A noter que l'activation des protéines G n'a pas d'effet supplémentaire sur l'activité du canal. La mutation reverse E177G, permet d'une part de lever l'inhibition tonique du canal, et d'autre part de restaurer une régulation directe par les protéines G hétérotrimériques.

Inversement, la mutation G177E introduite dans la sous-unité Ca<sub>v</sub>2.2b (isoforme rbB-II de rat), initialement sensible à la régulation directe des protéine G, abolie cette régulation et instaure une inhibition tonique du canal (Zhong *et al.*, 2001). Aussi, il a été proposé que l'introduction d'une charge négative par la mutation G177E pourrait interagir avec un résidu positif du segment S4 du premier domaine membranaire lorsque le canal est dans son état fermé, faisant alors passer le canal dans un mode "*reluctant*" suivant un mécanisme de "*voltage-sensor trapping*", suggérant que le dimère G<sub>βγ</sub> pourrait réguler l'activité des VGCCs suivant un mécanisme similaire (Zhong *et al.*, 2001). Comme nous le verrons dans la première partie des résultats, si le mode "*reluctant*" caractérisé par le shift dépolarisant de la courbe d'activation du canal est remis en cause, le mécanisme de "*voltage-sensor trapping*" représente malgré tout une hypothèse séduisante sur le mécanisme moléculaire à la base de l'inhibition des courants calciques par les protéines G hétérotrimériques. Fait intéressant, la protéine Gem2, appartenant à la famille des petites protéines G de type RGK (pour *Rad*, *Gem* et *Kir*) est également capable d'induire une inhibition des courants calciques de type N. Cependant, contrairement à l'inhibition produite par les protéines G hétérotrimériques, l'inhibition induite par Gem2 n'est pas réversible par l'application d'un prépulse dépolarisant (Chen *et al.*, 2005). L'observation de la structure cristallographique de Rad, un homologue de Gem, révèle la présence d'un motif structuré de même type que les sept "motifs répétés" observés dans la sous-unité G<sub>β</sub>. Ainsi, il n'est pas impossible qu'il existe une similarité dans les mécanismes moléculaires conduisant à l'inhibition des courants calciques induite par le dimère G<sub>βγ</sub> et par les petites protéines G de type RGK.

Enfin, il avait également été proposé que l'inhibition des courants calciques suite à la fixation du dimère G<sub>βγ</sub> sur la sous-unité Ca<sub>v</sub>2.2 passerait par une altération de la sélectivité ionique du canal. En effet, il a été mis en évidence que les courants entrants sodiques à travers les canaux de type N ne sont que très faiblement affectés par les protéines G hétérotrimériques, alors que les courants entrants bariques sont largement inhibés (Kuo et Bean, 1993). Aussi, à la vue des résultats obtenus par le groupe d'Herlitze (Li *et al.*, 2005) avec le peptide de 35 acides aminés de la sous-unité G<sub>β2</sub>, il n'est pas impossible que le dimère G<sub>βγ</sub> puisse inhiber les courants calciques via un simple mécanisme de pore bloqueur. Ces différentes hypothèses restant à être démontrées expérimentalement.

### E. Quels sont les VGCCs affectés par l'inhibition des RCPGs ?

La majorité des travaux cités précédemment impliquaient les sous-unités  $Ca_v2.x$ , c'est-à-dire les canaux de type P/Q, N et R. En effet, ces canaux constituent sans conteste les structures majoritairement affectées par la régulation directe des protéines G hétérotrimériques, confinant ainsi cette régulation à un niveau essentiellement présynaptique. Mais quand est-il des autres membres de la famille des VGCCs ?

Un certain nombre d'études ont clairement mis en évidence une inhibition des courants calciques de type L, faisant intervenir les protéines G hétérotrimériques, et ce dans différents types cellulaires. Ainsi, au niveau neuronal, l'application de baclofen (un agoniste des récepteurs GABA-B) sur des neurones bipolaires de la rétine, entraîne une inhibition des courants calciques de type L, potentialisée par l'injection de  $GTP\gamma S$  (Maguire *et al.*, 1989). L'injection de  $GTP\gamma S$ , dans des cellules granulaires du cervelet, entraîne également une inhibition des courants calciques de type L (et N), cette inhibition étant en partie levée par l'application de  $+(S)-202-791$ , un agoniste dihydropyridinergique, soit en réponse à l'activation des canaux L, suggérant un mécanisme d'inhibition direct (Haws *et al.*, 1993). Toujours au niveau des grains du cervelet, les courants de type L sont également bloqués par l'application de  $(2S,1'S,2'S)-2-(\text{carboxycyclopropyl})$  glycine (L-CCG-I), un agoniste des récepteurs mGluR2/R3 (Chavis *et al.*, 1994). L'inhibition des courants de type L via l'activation d'un RCPG a également été mise en évidence au niveau des cellules musculaires. Ainsi, l'application d'isoproterenol, un agoniste  $\beta$ -adrénergique, supprime les courants calciques de type L des cellules musculaires squelettiques, cet effet étant également mimé par l'injection de  $GTP\gamma S$  (Somasundaram et Tregear, 1993). L'application du neuropeptide Y (NPY), un agoniste des récepteurs Y2, produit un effet similaire sur des cardiomyocytes isolés du porc de guinée (Bryant et Hart, 1996). A noter que l'inhibition des courants L, décrite dans l'ensemble des travaux cités précédemment, est totalement abolie par la PTX. Ainsi, bien qu'aucune évidence expérimentale ne permette de proposer que cette inhibition passe par le dimère  $G_{\beta\gamma}$ , il est cependant certain qu'elle met en jeu l'activation des protéines G hétérotrimériques de type Gi/o. Enfin, fait plus intéressant, l'injection de  $GTP\gamma S$  dans des cellules  $\beta$ -pancréatiques, entraîne une inhibition des courants de type L, réversée par l'application d'une prépulse de dépolarisation, suggérant un mécanisme d'inhibition directe par le dimère  $G_{\beta\gamma}$  (Ammala *et al.*, 1992). Toutefois, aucune étude n'a permis de mettre en évidence une inhibition directe des canaux de type L par le dimère  $G_{\beta\gamma}$  en système d'expression

hétérologue (Roche *et al.*, 1995; Bourinet *et al.*, 1996a; Zhang *et al.*, 1996; Meza et Adams, 1998). De plus, les déterminants structuraux impliqués dans l'interaction entre la sous-unité  $Ca_v$  et le dimère  $G_{\beta\gamma}$ , tel que le motif QXXER de la boucle I-II, ne sont pas présents dans les sous-unités  $Ca_v1.x$  (Herlitze *et al.*, 1997) (Figure 21). Ainsi, il apparaît difficile de conclure sur les mécanismes moléculaires à la base de l'inhibition des courants calciques de type L endogènes suite à l'activation des RCPGs. L'inhibition directe par le dimère  $G_{\beta\gamma}$  est généralement établie par la présence d'une prépulse facilitation. Toutefois, comme nous l'avons vu précédemment, l'importance fonctionnelle des différents sites d'interaction du dimère  $G_{\beta\gamma}$  sur la sous-unité  $Ca_v$  reste largement discutée. En particulier, nous avons vu que la boucle I-II ne semblait par particulièrement impliquée dans l'inhibition du courant, mais jouerait plutôt un rôle dans la terminaison du signal. Ainsi, il est tout à fait concevable d'imaginer que le phénomène de facilitation puisse être dissocié du mécanisme d'inhibition du courant calcique, si certains déterminants moléculaires ne sont pas présents. De plus, il n'est pas à exclure qu'il existe, comme dans le cas des canaux de type T que nous allons voir, une certaine spécificité vis-à-vis du dimère  $G_{\beta\gamma}$  mis en jeu. En effet, cinq et douze gènes codent respectivement pour les sous-unités  $G_\beta$  et  $G_\gamma$  (Jones *et al.*, 2004), faisant du dimère  $G_{\beta\gamma}$  une importante source de diversité.

La situation est un peu similaire avec les canaux calciques de type T. Il a été mis en évidence une inhibition des courants T par l'application de baclofen sur des neurones sensoriels de la moelle épinière (Scott *et al.*, 1990), cette inhibition pouvant toutefois être contrebalancée par la présence concomitante d'un phénomène de potentialisation. L'application de dopamine sur des cellules surrénales glomérulaires entraîne également une inhibition des courants calciques de type T, cette inhibition étant dépendante de la présence du dimère  $G_{\beta\gamma}$  et de l'AMPC (Drolet *et al.*, 1997). Plus récemment, ce mécanisme d'inhibition a été précisé. Il a été mis en évidence que les courants de type T, générés par la sous-unité  $Ca_v3.2$ , et non ceux générés par la sous-unité  $Ca_v3.1$ , étaient spécifiquement inhibés par le dimère  $G_{\beta_2\gamma_2}$ , mais pas par le dimère  $G_{\beta_1\gamma_2}$  (Wolfe *et al.*, 2003). Cette inhibition met en jeu la fixation du dimère  $G_{\beta_2\gamma_2}$  sur la boucle II-III de la sous-unité  $Ca_v3.2$ , la substitution de cette boucle par celle de la sous-unité  $Ca_v3.1$  abolissant cette régulation. Cette inhibition est le résultat d'une diminution de la probabilité d'ouverture de la sous-unité  $Ca_v3.2$ , qui n'est pas accompagnée d'une diminution de l'expression membranaire du canal, ni d'une altération des propriétés de *gating* des canaux actifs (Depuy *et al.*, 2006). A noter enfin que cette inhibition, bien que directe, n'est pas levée par l'application d'une prépulse dépolarisant.

En conclusion, il est fort probable que l'ensemble des VGCCs soit affecté par la régulation directe des protéines G hétérotrimériques. Toutefois, les nombreux déterminant structuraux de la sous-unité  $Ca_v$  impliqués dans cette régulation, et dont la présence dépend de la sous-unité  $Ca_v$  considérée, ainsi que la diversité des dimères  $G_{\beta\gamma}$  mis en jeu, font que le phénotype de cette régulation semble être très largement dépendant du couple  $Ca_v / G_{\beta\gamma}$  concerné. Aussi, fait intéressant, l'inhibition des canaux de type L et T, généralement irréversible par l'application d'un prépulse dépolarisant, n'est pas associée au shift dépolarisant de la courbe d'activation de ces canaux (Depuy *et al.*, 2006), posant d'intéressantes questions sur la réelle signification moléculaire du mode "*reluctant*". Nous en reparlerons longuement dans la première partie des résultats.

### **F. Rôle de la sous-unité $\beta$ dans la régulation des VGCCs par les RCPGs**

L'implication de la sous-unité  $\beta$  dans la régulation directe des VGCCs par les RCPGs a été extensivement étudiée. Et pour cause, la mise en évidence de la fixation du dimère  $G_{\beta\gamma}$  sur le motif QXXER, présent dans le domaine AID de la sous-unité  $Ca_v$ , suggérait une possible implication de la sous-unité  $\beta$  dans la régulation directe des VGCCs par les protéines G hétérotrimériques. Bien qu'une étude suggère que la sous-unité  $\beta$  soit un élément nécessaire à cette régulation (Meir *et al.*, 2000), la majorité des travaux tendent à montrer qu'elle aurait plutôt un effet antagoniste sur l'inhibition directe des courants calciques par les protéines G hétérotrimériques. En effet, il a été mis en évidence une diminution de l'inhibition des courants de type P/Q et N, exprimés dans l'ovocyte de Xénope, par la présence de la sous-unité  $\beta_3$  (Roche *et al.*, 1995). De plus, l'inhibition des courants de type P/Q par le DAMGO, un agoniste des récepteurs  $\mu$ -opioïdes, est augmentée d'un facteur trois en l'absence de sous-unité  $\beta$  (Bourinet *et al.*, 1996a). Des résultats similaires ont également été obtenus avec le récepteur muscarinique M2 (Roche et Treisman, 1998b). Ces résultats ont alors conduits les auteurs à proposer qu'il existerait un mécanisme de compétition entre la sous-unité  $\beta$  et le dimère  $G_{\beta\gamma}$  pour la fixation sur la sous-unité  $Ca_v$  (Bourinet *et al.*, 1996a). Il a également été mis en évidence que l'interaction du dimère  $G_{\beta\gamma}$  sur le domaine carboxy-terminal de la sous-unité  $Ca_v2.x$  était abolie par la présence du domaine GK de la sous-unité  $\beta_{2a}$ , apportant une explication fonctionnelle à l'antagonisme  $\beta$  (Qin *et al.*, 1997). Toutefois, il est probable que

l'antagonisme  $\beta$  mettant en jeu le domaine carboxy-terminal de la sous-unité  $Ca_v$ , ne passe pas directement par une altération de l'interaction avec le dimère  $G_{\beta\gamma}$ , mais plutôt par un découplage fonctionnel entre le canal et le récepteur muscarinique M2 utilisé dans cette étude (Qin *et al.*, 1997). Il a également été mis en évidence une accélération de la cinétique de relaxation de l'inhibition des courants de type N induite par les récepteurs M2, en présence de la sous-unité  $\beta_3$  (Roche et Treisman, 1998a), cet effet étant dépendant de la sous-unité  $\beta$  considérée ( $\beta_3 > \beta_4 > \beta_{1b} \gg \beta_{2a}$ ) (Canti *et al.*, 2000). A noter enfin, quand une sous-unité  $\beta$  est présente, l'amplitude de la prépulse facilitation est diminuée, et ce en dépit du fait que la cinétique de décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  soit accélérée (Canti *et al.*, 2000). Ces résultats à première vue contradictoires posent une question intéressante sur la signification de l'absence de prépulse facilitation dans la régulation directe des VGCCs par les protéines G, ainsi que sur la "validité" du prépulse dépolarisant. Cette notion sera en partie débattue dans la seconde partie des résultats.

Ainsi, il n'est pas encore clairement établi quelle est la réelle implication de la sous-unité  $\beta$  dans la régulation directe des VGCCs par les protéines G. Bien qu'elle semble potentialiser le décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  de la sous-unité  $Ca_v$ , le mécanisme moléculaire mis en jeu reste obscur. Il est toutefois probable qu'il ne s'agisse pas d'un simple mécanisme de compétition entre la sous-unité  $\beta$  et le dimère  $G_{\beta\gamma}$ . En particulier, il a été mis en évidence par des expériences de FRET (pour *Fluorescence Resonance Energy Transfert*) entre les sous-unités  $Ca_v2.1$  et  $\beta_{1b}$ , que les sous-unités  $\beta_{1b}$  et  $G_\beta$  étaient capables d'interagir avec la sous-unité  $Ca_v$  en même temps (Hummer *et al.*, 2003). La co-expression de la sous-unité  $G_\beta$  étant même à l'origine d'une augmentation du FRET, ce phénomène mettant en jeu le domaine carboxy-terminal de la sous-unité  $Ca_v2.1$ , suggérant un changement conformationnel du canal en réponse à la fixation de la sous-unité  $G_\beta$  (Hummer *et al.*, 2003). Ainsi, il est probable que la sous-unité  $\beta$  affecte la régulation directe des VGCCs par les protéines G non pas de manière compétitive avec le dimère  $G_{\beta\gamma}$ , mais plutôt de manière indirecte à travers les modifications biophysiques qu'elle exerce sur la sous-unité  $Ca_v$ . Ceci sera abordé dans la troisième partie des résultats.

### G. Comment se produit la terminaison du signal

Pour être efficace, toute régulation doit pouvoir être déclenchée à un moment donné, mais également s'arrêter de manière contrôlée. Ainsi, nous avons vu que la régulation directe

des VGCCs par les protéines G hétérotrimériques nécessite (1) l'activation d'un GPCR par la fixation de son ligand extracellulaire, (2) la fixation du dimère  $G_{\beta\gamma}$  sur différents éléments structuraux de la sous-unité  $Ca_v$  conduisant à un phénotype de régulation, et enfin (3) que cette régulation peut être temporairement levée en réponse par exemple à un train de potentiels d'action, et ce même en présence de l'agoniste extracellulaire. Mais comment se termine "définitivement" cette régulation ? Si l'arrêt de la stimulation du RCPG se produit par la recapture ou la dégradation de l'agoniste, comment se produit la recapture du dimère  $G_{\beta\gamma}$  par la sous-unité  $G_\alpha$  ? D'un point de vue physiologique, la sous-unité  $G_\alpha$  repasse dans un état de forte affinité pour le dimère  $G_{\beta\gamma}$  suite à l'hydrolyse du GTP en GDP. Ainsi, il est possible que la sous-unité  $G_\alpha$ -GDP agisse alors comme un chélateur de  $G_{\beta\gamma}$  libre, lorsque celui-ci se dissocie et s'associe à la sous-unité  $Ca_v$  selon un équilibre de type on/off. Il est également possible que la sous-unité  $G_\alpha$ -GDP soit capable de fixer directement le dimère  $G_{\beta\gamma}$  alors même que celui-ci est encore lié à la sous-unité  $Ca_v$ . Ceci impose que les déterminants moléculaires impliqués dans l'interaction entre la sous-unité  $G_\alpha$  et le dimère  $G_{\beta\gamma}$  demeurent accessibles. Dans cette situation, la fixation de la sous-unité  $G_\alpha$ -GDP pourrait entraîner une modification conformationnelle du complexe  $Ca_v / G_{\beta\gamma}$ , conduisant à la perte d'un déterminant moléculaire impliqué dans l'interaction entre le dimère et le canal. Il est possible que ce déterminant moléculaire soit également celui impliqué dans le décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  en réponse à un prépulse dépolarisant. Pour l'heure, cet élément structural n'a pas été identifié, mais il est probable qu'il s'agisse d'un élément sensible au potentiel, tel que les segments S4 par exemple, et dont le changement conformationnel en réponse à une dépolarisation membranaire conduirait au décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$ . Cette notion restant à être démontrée.

## H. Conclusion

La régulation directe des canaux  $Ca_v2.x$  par les RCPGs met en jeu le dimère  $G_{\beta\gamma}$ , dont la fixation sur différents déterminants structuraux de la sous-unité  $Ca_v$  conduit le canal d'un mode "*willing*" vers un mode "*reluctant*", le mode "*reluctant*" étant caractérisé par une inhibition du courant calcique associée à un shift dépolarisant de la courbe d'activation du canal (Bean, 1989). Le retour vers le mode "*willing*" se produit suite au décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  de la sous-unité  $Ca_v$  en réponse à une dépolarisation membranaire, et se caractérise par une relaxation de l'inhibition, associée à un ralentissement apparent de la cinétique d'activation du canal. Aussi, la transition du mode "*willing*" vers le mode "*reluctant*"

représente la régulation "ON", alors que la transition du mode "*reluctant*" vers le mode "*willing*" caractérise la régulation "OFF". Pour l'heure, les mécanismes moléculaires par lesquels la fixation du dimère  $G_{\beta\gamma}$  sur la sous-unité  $Ca_v$  induit le mode "*reluctant*" restent obscures, de même que les mécanismes moléculaires conduisant au décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  en réponse à une dépolarisation membranaire.



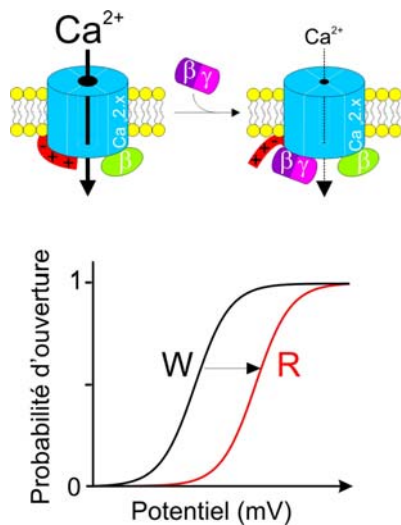
## PROBLEMATIQUE

Une récente revue du Professeur Jones SW (Jones, 2003) intitulée "*Calcium channels : unanswered questions*" faisait état des différentes questions, non résolues à ce jour, au regard des relations structure / fonction des canaux calciques activés par le potentiel électrique de membrane. Ainsi sont abordés les questions du type : "*Where is the activation gate ? Where are the inactivation gates? How are the voltage sensors coupled to the gates? Are bacterial  $K^+$  channels good models for the  $Ca^{2+}$  channel pore? Are protein-protein interactions fundamental to  $Ca^{2+}$  channel function? Do voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels regulate basal intracellular  $Ca^{2+}$ ? Are N and P/Q channels specialized for fast neurotransmitter release?*". Etonnamment, la régulation directe des VDCCs par les protéines G hétérotrimériques n'est pas abordée... Pourtant, depuis la première description du phénomène en 1978 par Dunlap et Fischbach (Dunlap et Fischbach, 1978), d'importantes questions sur les bases moléculaires de cette régulation restent à ce jour que partiellement élucidées, ou même sans réponse.

Comme nous l'avons déjà mentionné au cours de cette introduction, la régulation "ON" des VGCCs par les protéines G hétérotrimériques, caractérisée d'une part par l'inhibition du courant calcique, et d'autre part par le passage du mode "*willing*" vers le mode "*reluctant*", se produit suite la fixation du dimère  $G_{\beta\gamma}$  sur la sous-unité  $Ca_v$ , alors que la régulation "OFF", caractérisée par le retour du mode "*reluctant*" vers le mode "*willing*" se caractérise au contraire par la dissociation du dimère  $G_{\beta\gamma}$ . Toutefois, les mécanismes moléculaires à la base de ces transitions demeurent très largement controversés. Pour l'heure, deux mécanismes moléculaires ont été proposés :

1. **La transition de modes** : ce modèle assume que les modes "*willing*" et "*reluctant*" sont des modes intrinsèques à la sous-unité  $Ca_v$ , caractérisés par des différences de sensibilité au voltage, probablement par la modification d'un senseur de potentiel électrique de membrane. La fixation du dimère  $G_{\beta\gamma}$  sur la sous-unité  $Ca_v$  déplacerait l'équilibre "*willing*" ↔ "*reluctant*" vers le mode "*reluctant*" (Figure 28). Ce modèle est soutenu par la mutation G177E localisée dans le domaine IS3 de la sous-unité  $Ca_v2.2a$ , capable à elle seule de conduire le canal dans un mode "*reluctant*", et ce en l'absence de protéines G hétérotrimériques (Zhong *et al.*, 2001). Aussi, ce modèle est intrinsèquement indépendant de la présence d'une sous-unité  $\beta$ , mais n'exclut pas une interaction concomitante de la sous-unité

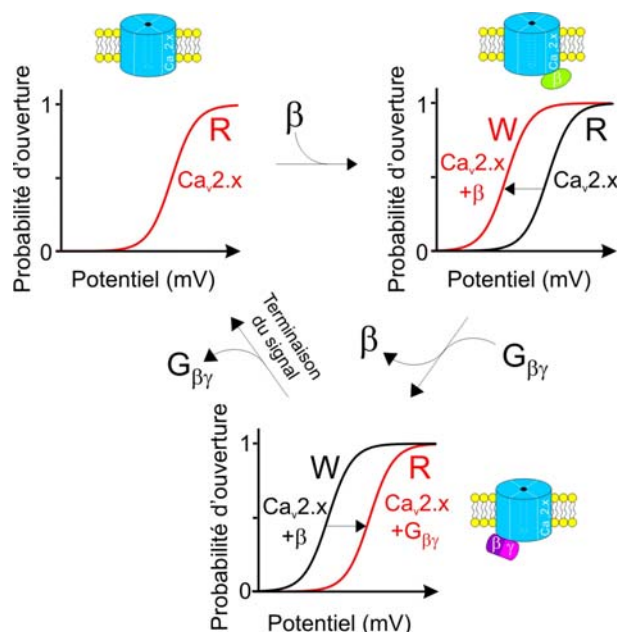
$\beta$  et du dimère  $G_{\beta\gamma}$  sur le canal. Toutefois, le déterminant moléculaire sensible au potentiel électrique de membrane et impliqué dans cette transition n'a pour l'heure pas été identifié.



**Figure 28. Représentation schématique de la transition "willing" ↔ "reluctant" suivant le modèle de "transition de modes".** Tiré de (De Waard *et al.*, 2005).

Dans ce modèle, les modes "willing" (W) et "reluctant" (R) sont des modes intrinsèques au canal. La fixation du dimère  $G_{\beta\gamma}$  sur la sous-unité  $Ca_v2.x$  induirait un shift de l'équilibre "willing" ↔ "reluctant" vers le mode "reluctant".

2. **Le déplacement de la sous-unité  $\beta$**  : très récemment, a été proposé un modèle fondamentalement différent, avec un rôle central de la sous-unité  $\beta$  dans la transition "willing" ↔ "reluctant". Aussi, la fixation du dimère  $G_{\beta\gamma}$  sur la sous-unité  $Ca_v$  serait à l'origine d'un déplacement de la sous-unité  $\beta$ , conduisant le canal dans un mode "reluctant" (Figure 29).



**Figure 29. Représentation schématique de la transition "willing" ↔ "reluctant" suivant le modèle de "déplacement de la sous-unité  $\beta$ ".** Tiré de (De Waard *et al.*, 2005).

Dans ce modèle, le canal est initialement dans un mode "reluctant" (R), la fixation de la sous-unité  $\beta$  le conduisant dans un mode "willing" (W). La fixation du dimère  $G_{\beta\gamma}$  sur la sous-unité  $Ca_v$  conduit à un déplacement de la sous-unité  $\beta$ , faisant repasser le canal vers un mode "reluctant".

Le mode "*reluctant*" ne serait donc pas intrinsèque au canal, mais simplement la conséquence de la perte du shift hyperpolarisant de la courbe d'activation du canal induit par la sous-unité  $\beta$  (Sandoz *et al.*, 2004b). Contrairement au modèle précédent, l'induction du mode "*reluctant*" par les protéines G hétérotrimériques ne peut avoir lieu qu'en présence de la sous-unité  $\beta$ . La fixation du dimère  $G_{\beta\gamma}$  sur le canal exclurait la fixation de la sous-unité  $\beta$ . Cependant, de nombreux travaux restent en défaveur de ce modèle, essentiellement en raison du fait que la "*réreluctance*" a été à de multiples reprises observée en système d'expression hétérologue en l'absence de sous-unité  $\beta$  (Bourinet *et al.*, 1996a; Roche et Treistman, 1998b; Canti *et al.*, 2000).

Devant ces résultats divergents, il apparaît légitime de se demander quelle est finalement la réelle signification moléculaire du mode "*reluctant*", caractérisé par un shift dépolarisant de la courbe d'activation du canal. Aussi, nous avons choisi de préciser l'importance de la régulation "OFF" dans le phénotype de l'activité des VGCCs sous régulation directe des protéines G hétérotrimériques. Plus particulièrement, le décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  de la sous-unité  $Ca_v$  étant à l'origine d'un ralentissement apparent de la cinétique d'activation du courant, nous nous sommes attaché à quantifier l'impact de la régulation "OFF" dans la "*reluctance*" du canal. Comme nous allons le voir dans la première partie des résultats, les données obtenues sur le canal calcique de type N, exprimé dans l'ovocyte de Xénope, nous ont conduits à proposer que le mode "*reluctant*" ne reflète pas un état moléculaire particulier du canal, mais traduit simplement un caractère apparent de la régulation "OFF", au même titre que le ralentissement apparent de la cinétique d'activation du canal.

Les données obtenues au cours de cette première analyse, nous ont ensuite conduit à développer une nouvelle méthode d'analyse biophysique de la régulation directe des VGCCs par les protéines G hétérotrimériques, indépendamment de l'utilisation de préimpulsions dépolarisantes. Cette méthode sera présentée dans la seconde partie des résultats. Aussi, sur la base de cette nouvelle technique d'analyse, nous nous sommes interrogés sur l'importance de l'inactivation rapide du canal dans cette régulation. Il a initialement été proposé que le décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  de la sous-unité  $Ca_v$  se produit au cours du processus moléculaire conduisant à l'ouverture du canal (Patil *et al.*, 1996). Toutefois, comme nous l'avons vu au cours de cette introduction, certaines évidences expérimentales suggèrent que l'inactivation du canal pourrait avoir un rôle dans ce processus. En effet, la mutation R387E du domaine QXER de la sous-unité  $Ca_v2.2$  affecte certes l'interaction du dimère  $G_{\beta\gamma}$  avec ce déterminant

structural, mais modifie également de manière drastique la cinétique d'inactivation rapide du canal (Herlitze *et al.*, 1997). De plus, il a également été mis en évidence que les différentes sous-unités  $\beta$  accélèrent la relaxation de l'inhibition des courant de type N (rapide-  $\beta_3 > \beta_4 > \beta_{1b} \gg \beta_{2a}$  -lent) (Canti *et al.*, 2000). Curieusement, les différentes sous-unités  $\beta$  influencent la cinétique d'inactivation du canal suivant un ordre similaire (rapide-  $\beta_3 > \beta_4 > \beta_{1b} \gg \beta_{2a}$  -lent) (Stephens *et al.*, 2000), suggérant là encore une possible implication de l'inactivation dans la régulation des VGCCs par les protéines G hétérotrimériques. Nous avons ainsi montré que l'inactivation rapide des canaux de type N constitue un cofacteur du décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  de la sous-unité  $Ca_v$ , mais délimite une fenêtre temporelle durant laquelle ce processus peut avoir lieu. Ces données seront présentées dans la troisième partie des résultats.

## RESULTATS

### I. IMPORTANCE de la RELAXATION de l'INHIBITION des CANAUX N dans la REGULATION DIRECTE des PROTEINES G

#### A. Introduction

Comme nous l'avons vu en introduction, la régulation directe des canaux calciques de type N par les récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques (RCPGs), représente une des régulations majeures de l'entrée calcique au niveau neuronal (Dunlap et Fischbach, 1981). Cette régulation met en jeu l'interaction du dimère  $G_{\beta\gamma}$  (Herlitze *et al.*, 1996; Ikeda, 1996) avec différents éléments structuraux de la sous-unité  $Ca_v2.x$  (De Waard *et al.*, 1997; Herlitze *et al.*, 1997; Qin *et al.*, 1997; Zamponi *et al.*, 1997; Canti *et al.*, 1999). Au niveau de la cellule entière, la régulation directe des canaux de type N par le dimère  $G_{\beta\gamma}$  se caractérise par un ensemble de modifications phénotypiques de l'activité du canal. Ainsi, il est communément admis que l'interaction du dimère  $G_{\beta\gamma}$  sur la sous-unité  $Ca_v2.2$  se caractérise par (1) une inhibition du courant calcique (Boland et Bean, 1993; Wu et Saggau, 1997), associée à (2) un shift dépolarisant de la courbe d'activation du canal (Bean, 1989; Canti *et al.*, 2000) (effets "ON"). Inversement, le décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  de la sous-unité  $Ca_v2.2$  conduit (3) au ralentissement apparent de la cinétique d'activation du canal (Marchetti *et al.*, 1986; Boland et Bean, 1993), ainsi qu'au phénomène de (4) facilitation suite à l'application d'un prépulse dépolarisant (Scott et Dolphin, 1990; Ikeda, 1991; Canti *et al.*, 2000) ou d'un train de potentiels d'action (Penington *et al.*, 1991; Brody *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 1997) (effets "OFF"). Aussi, l'ensemble des effets "ON" traduirait le passage du canal d'un mode "*willing*" vers un mode "*reluctant*", alors les effets "OFF" traduiraient le retour du canal vers le mode "*willing*" (Bean, 1989). Le retour vers le mode "*willing*" a été précisé au niveau du canal unitaire et se produit suite au décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  de la sous-unité  $Ca_v2.2$  au cours du processus moléculaire conduisant à l'ouverture du canal en réponse à une dépolarisation membranaire (Patil *et al.*, 1996). Cette étude se voulait de préciser la contribution du décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  sur le phénotype des canaux de type N, d'une part au niveau des effets "OFF", mais également au niveau des effets "ON", c'est-à-dire dans le concept de la "*reluctance*" du canal calcique.

Aussi, à l'aide d'une approche de simulation des courants ioniques basée sur les paramètres biophysiques caractérisant le décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  (constante de temps et amplitude du phénomène), nous montrons que l'ensemble des modifications phénotypiques du canal de type N peut être décrites. Ces résultats suggèrent que la régulation "ON" des canaux N par les RCPGs se caractérise uniquement par l'inhibition du courant calcique, alors que l'ensemble des autres modifications caractérise la régulation "OFF".

**B. Publication № 1**

**Contribution of the kinetics of G protein dissociation to the characteristic modifications of N-type calcium channel activity**

Norbert Weiss, Christophe Arnoult, Anne Feltz & Michel De Waard

*Neuroscience Research* (2006) **56**: 332-34

# Contribution of the kinetics of G protein dissociation to the characteristic modifications of N-type calcium channel activity

Norbert Weiss<sup>a</sup>, Christophe Arnoult<sup>a</sup>, Anne Feltz<sup>b</sup>, Michel De Waard<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>*Inserm U607, Laboratoire Canaux Calciques, Fonctions et Pathologies, 17 Rue des Martyrs, Bâtiment C3, 38054 Grenoble Cedex 09, France; CEA, Grenoble, France; Université Joseph Fourier, Grenoble, France*

<sup>b</sup>*Laboratoire de Neurobiologie, UMR 8544, Ecole Normale Supérieure, Paris 75230, France*

Received 7 June 2006; accepted 2 August 2006

Available online 12 September 2006

## Abstract

Direct G protein inhibition of N-type calcium channels is recognized by characteristic biophysical modifications. In this study, we quantify and simulate the importance of G protein dissociation on the phenotype of G protein-regulated whole-cell currents. Based on the observation that the voltage-dependence of the time constant of recovery from G protein inhibition is correlated with the voltage-dependence of channel opening, we depict all G protein effects by a simple kinetic scheme. All landmark modifications in calcium currents, except inhibition, can be successfully described using three simple biophysical parameters (extent of block, extent of recovery, and time constant of recovery). Modifications of these parameters by auxiliary  $\beta$  subunits are at the origin of differences in N-type channel regulation by G proteins. The simulation data illustrate that channel reluctance can occur as the result of an experimental bias linked to the variable extent of G protein dissociation when peak currents are measured at various membrane potentials. To produce alterations in channel kinetics, the two most important parameters are the extents of initial block and recovery. These data emphasize the contribution of the degree and kinetics of G protein dissociation in the modification of N-type currents.

© 2006 Elsevier Ireland Ltd and the Japan Neuroscience Society. All rights reserved.

**Keywords:** Calcium channel; N-type channel; G protein regulation;  $\mu$ -Opioid receptor;  $\beta$ -Subunit; Prepulse facilitation; Channel reluctance

## 1. Introduction

N-type voltage-dependent calcium channels are strongly regulated by G protein coupled receptors (GPCR) (Dunlap and Fischbach, 1981). The  $\text{Ca}_v2.2$  pore-forming subunit is a target for direct G protein inhibition (Bourinet et al., 1996). The regulation occurs through binding of the  $\text{G}_{\beta\gamma}$  dimer (Herlitze et al., 1996; Ikeda, 1996) on various  $\text{Ca}_v$  structural elements (De Waard et al., 1997; Qin et al., 1997; Zamponi et al., 1997). Various biophysical modifications are used for the identification of direct G protein regulation including: (i) current inhibition (Boland and Bean, 1993), (ii) slowing of activation kinetics (Marchetti et al., 1986), (iii) depolarizing shift of the voltage-dependence of activation (Bean, 1989), (iv) current

facilitation following strong prepulse depolarization (Ikeda, 1991), and (v) slowing of inactivation kinetics (Zamponi, 2001). At the single channel level, activated G proteins induce an increase in the first latency to channel opening and in the occurrence of sweeps without openings (Carabelli et al., 1996; Patil et al., 1996). Reduced prevalence of high opening probability gating modes has also been reported without delay in first latency opening (Delcour and Tsien, 1993). Finally, in order for the channel to recuperate full activity,  $\text{G}_{\beta\gamma}$  dimer must first dissociate from the channel. This occurs during channel opening following membrane depolarization (Patil et al., 1996). However, the importance of the  $\text{G}_{\beta\gamma}$  dissociation in the phenotype of N-type channels under G protein regulation requires further description. Notably, the role of G protein dissociation in producing kinetic modifications has not been simulated. Also, the contribution of G protein dissociation to the concept of channel reluctance has not been evaluated.

Here, we analyze how  $\text{G}_{\beta\gamma}$  dissociation contributes to each biophysical effect. Experimental evidence is provided that the time constant of  $\text{G}_{\beta\gamma}$  dissociation follows the voltage-

*Abbreviations:* GPCR, G protein coupled receptors; DAMGO, D-Ala<sup>2</sup>,Me-Phe<sup>4</sup>,glycinol<sup>5</sup>-enkephalin

\* Corresponding author. Tel.: +33 4 38 78 68 13; fax: +33 4 38 78 50 41.

E-mail address: [mdewaard@cea.fr](mailto:mdewaard@cea.fr) (M. De Waard).



dependence of channel opening. With a simulation approach based on three biophysical parameters of the time-dependent recovery from G protein inhibition, all landmark modifications can be described. These data suggest that current inhibition is the sole “On” effect of G proteins regulation, whereas all other effects are due to a time-dependent dissociation of  $G_{\beta\gamma}$  dimer from the channel and thus are “Off” effects. These findings simplify the interpretation of calcium channel regulation by G proteins and emphasize the importance of the kinetics of G protein unbinding from the channel.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

The cDNAs used in this study were rabbit  $Ca_v2.2$  (accession number D14157), rat  $\beta_{2a}$  (M80545), rat  $\beta_3$  (M88751) and rat  $\mu$ -opioid receptor (rMOR, kindly provided by Dr. P. Charnet). D-Ala<sup>2</sup>,Me-Phe<sup>4</sup>,glycinol<sup>5</sup>)-enkephalin (DAMGO) was from Bachem (Bubendorf, Germany).

### 2.2. Transient expression in *Xenopus oocytes*

Stages V and VI oocytes were surgically removed from anesthetized adult *Xenopus laevis* and treated for 2–3 h with 2 mg/ml collagenase type 1A (Sigma). Cytoplasmic injection of cells was performed with 46 nl of cRNA mixture ( $Ca_v2.2$  and rMOR at  $0.3 \pm 0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  of  $\beta_{2a}$  or  $\beta_3$ ) *in vitro* transcribed using the SP6 or T7 mMessage mMachine Kit (Ambion, Cambridgeshire, UK). Cells were incubated at 19 °C in defined nutrient oocyte medium as described (Eppig and Dumont, 1976).

### 2.3. Electrophysiological recording

After 2–4 days of incubation, macroscopic currents were recorded at room temperature using Digidata 1322A and GeneClamp 500B amplifier (Axon Instruments, Union City, CA) by the two-electrode voltage-clamp technique in a bathing medium containing (in mM): Ba(OH)<sub>2</sub> 40, NaOH 50, KCl 3, HEPES 10, niflumic acid 0.5, pH 7.4 with methanesulfonic acid. Niflumic acid was used since it behaved as a voltage-independent blocker of calcium-activated chloride currents (Qu and Hartzell, 2001). Electrodes filled with (in mM): KCl 140, EGTA 10 and HEPES 10 (pH 7.2) had resistances between 0.5 and 1 MΩ. Acquisition and analyses were performed using the pClamp 8 software (Axon Instruments). Recording were filtered at 2 kHz. Leak subtraction was performed on-line by a P/4 protocol. The holding potential was –90 mV throughout. For prepulse facilitation experiments, a 20 ms interpulse to –90 mV was used. DAMGO was applied at 10 μM by superfusion of the cells at 1 ml/min. All recordings were performed within 1 min after DAMGO reached its maximum effects. By this approach, we greatly minimized voltage-independent G protein regulation that took place between 5 and 10 min after DAMGO application (data not shown). Only the voltage-dependent component was studied by prepulse applications.

### 2.4. Data analysis

Only cells that lacked tonic G protein inhibition and showing current densities less than 2 μA/μF were included in these analyses. Furthermore, we used cells that possessed similar current densities whether expressing  $Ca_v2.2$  alone or in combination with  $\beta_3$  subunit. Current–voltage relationships (*I/V*) were fitted with a modified Boltzmann equation  $I_{(V)} = G_{\text{max}} \times (V - E) / (1 + \exp(-(V - V_{1/2})/k))$  where  $G_{\text{max}}$  is the maximal conductance,  $E$  the inversion potential of the Ba<sup>2+</sup> current,  $V_{1/2}$  the half-activation potential and  $k$  is the slope factor. Prepulse-induced relief of G protein inhibition was obtained by normalizing DAMGO-inhibited currents to control currents in order to eliminate prepulse-induced inactivation, such that:

$$R_{I(t)} = 100 - [(I_{C(t)} - I_{\text{DAMGO}(t)})/I_{C(t)}] / [(I_{C(t_0)} - I_{\text{DAMGO}(t_0)})/I_{C(t_0)}]$$

where  $R_{I(t)}$  represents the percentage of inhibition relief by a prepulse application of variable amplitude and duration,  $I_{C(t)}$ , control current,  $I_{\text{DAMGO}(t)}$ , DAMGO-inhibited current,  $t$  the duration of the prepulse, and  $t_0$ , the start of depolarization. All data are presented as mean ± S.E.M. for  $n$  number observations and statistical significance ( $p$ ) was calculated using unpaired Student's *t*-test.

## 3. Results

### 3.1. The time constant of $Ca_v2.2$ current recovery from G protein inhibition correlates with channel opening

Parameters for  $Ca_v2.2$  currents recovery from G protein inhibition were determined by comparing current amplitudes during a 500 ms test pulse at 10 mV in control and DAMGO condition after application of depolarizing prepulses of variable amplitude and duration (Fig. 1). In one representative example with prepulses at 60 mV, increasing prepulse duration increases  $Ca_v2.2$  currents facilitation (Fig. 1A). The prepulse-induced relief from G protein inhibition ( $R_I$ ) was plotted as a function of prepulse voltage and duration indicating a maximal recovery from DAMGO inhibition of  $45.4 \pm 8.8\%$  ( $n = 7$ , prepulse of 100 mV) (Fig. 1B). Time constants of recovery were plotted as a function of prepulse potentials (Fig. 1C). The fastest time constant of recovery is observed for prepulse potential values equal or above 60 mV ( $70 \pm 17$  ms,  $n = 7$ , prepulse potential of 80 mV), whereas the slowest time constant is observed at –20 mV ( $1101 \pm 447$  ms,  $n = 7$ ), with a half maximal current recovery time constant prepulse potential value ( $PP_{1/2}$ ) of  $10.4 \pm 1.1$  mV ( $n = 56$ ). The facilitated current being linked to channels no longer under G protein inhibition, we investigated the voltage-dependence of control channel conductance, which reflects both the recruitment of channels and the increased opening probability (Fig. 1D). The half-maximal increase in conductance is  $8.7 \pm 1.2$  mV ( $n = 19$ ), a value, which is very closely related to the estimated  $PP_{1/2}$  value of 10.4 mV. Interestingly, the time constant of current recovery was well correlated to the relative conductance value of the channel (Fig. 1E, linear regression coefficient of 0.998). These data confirm the proposal that it is channel opening, and not voltage, which represents the motor of G protein dissociation (Patil et al., 1996). We further extend these initial observations by linking the kinetics of G protein dissociation to the relative conductance of the channels. As we shall see later, this observation is crucial to readdress the question of channel reluctance (Fig. 5). With such a correlation, one would also predict that a shift in the voltage-dependence of channel opening should also induce a shift in the voltage-dependence of the time constant of current recovery from G protein inhibition. Auxiliary  $\beta$  subunits are known to produce such shifts in the voltage-dependence of channel activation. An endogenous  $\beta$  subunit (similar to  $\beta_3$ ) has been described at the mRNA level in oocytes (Tareilus et al., 1997). However, it appears to be at levels too low to be detected at the protein level as assessed by metabolic labelling or Western blot experiments (data not shown). The levels were obviously also too low to affect the biophysical parameters of  $Ca_v2.2$ . To assess the effects of  $\beta_3$  subunit, it was thus expressed exogenously.

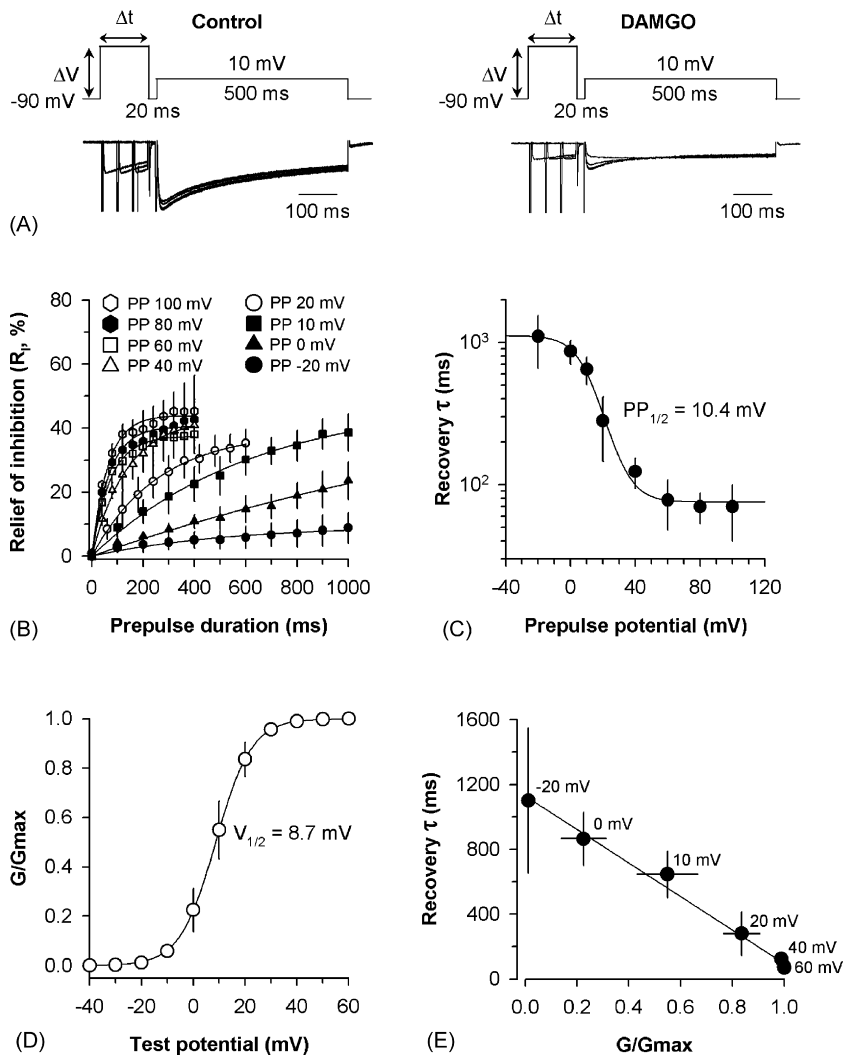


Fig. 1. The time constant of relief from G protein inhibition is correlated to channel opening. (A) Experimental protocol to measure prepulse facilitation as a function of prepulse duration and voltage (see Section 2 for details). Representative current traces recorded at 60 mV prepulse potentials are shown for  $Ca_v2.2$  channels for control (left panel) and DAMGO (right panel) conditions at various prepulse durations. (B) The proportion of inhibition relief was calculated as a function of prepulse duration for many different prepulse potentials (from -20 to 100 mV,  $n = 56$  cells) (see Section 2 for details). The data were fitted by an exponential growth according to  $R_1 = R_{I(max)} \times (1 - \exp(-(1/\tau)t_{PP}))$  where  $\tau$  is the time constant of inhibition relief,  $R_{I(max)}$  the maximal proportion of relief and  $t_{PP}$  the prepulse duration. (C) Time constant  $\tau$  as a function of prepulse potential value ( $n = 56$  cells) with a test pulse at 10 mV. A sigmoid fit of the data yield a half-maximal acceleration of the time constant at  $PP_{1/2} = 10.4 \pm 1.1$  mV. The sigmoid equation used for the fit is  $\tau = \tau_0 + (a/(1 + \exp(-(PP - PP_{1/2})/b)))$  where  $a = 1038$  ms and  $b = -7.9$  mV. (D) Increase in the macroscopic conductance of  $Ca_v2.2$  as a function of test potential in control condition ( $n = 56$  cells). A Boltzmann fit of the data yield a half-activation potential of  $8.7 \pm 1.2$  mV ( $n = 19$  cells). (E) Correlation between the time constant of inhibition relief and the relative conductance of  $Ca_v2.2$  at potential values between -20 and 60 mV. The data were fitted by a linear regression ( $r = 0.998$ ).

### 3.2. The $\beta_3$ subunit shifts the voltage dependence of the time constant of $Ca_v2.2$ current recovery from G protein inhibition

Auxiliary  $\beta$  subunits are known to displace the voltage dependence of N-type channel opening (Stea et al., 1993). We determined the effect of  $\beta_3$  subunit on the time constant of  $Ca_v2.2$  current recovery from G protein inhibition. A representative example of the effect of prepulse duration increase at 50 mV is shown for  $Ca_v2.2/\beta_3$  currents (Fig. 2A). The prepulse-induced relief of G protein inhibition was quantified by measuring  $R_1$  values (Fig. 2B). The maximal relief of DAMGO inhibition, observed for  $Ca_v2.2/\beta_3$ , was

$48.1 \pm 11.5\%$  ( $n = 6$ , prepulse of 100 mV), which is comparable to the relief observed for  $Ca_v2.2$  alone cells. Moreover, the faster time constant of recovery is observed for prepulse potential values equal or above 40–60 mV ( $17 \pm 2$  ms at a prepulse potential of 100 mV,  $n = 4$ ), a time constant which is 4.1 faster than the one observed for  $Ca_v2.2$  channels alone (Fig. 2C). The ratios of recovery time constants for  $Ca_v2.2$  and  $Ca_v2.2/\beta_3$  channels as a function of prepulse potential illustrate that  $\beta_3$  induces a faster recovery from G protein inhibition with a maximal effect of 6.1-fold at 22 mV (Fig. 2C inset). Similar acceleration of recovery was observed previously (Roche and Treistman, 1998). However, it is the first time that it is shown that this effect of  $\beta$  subunit

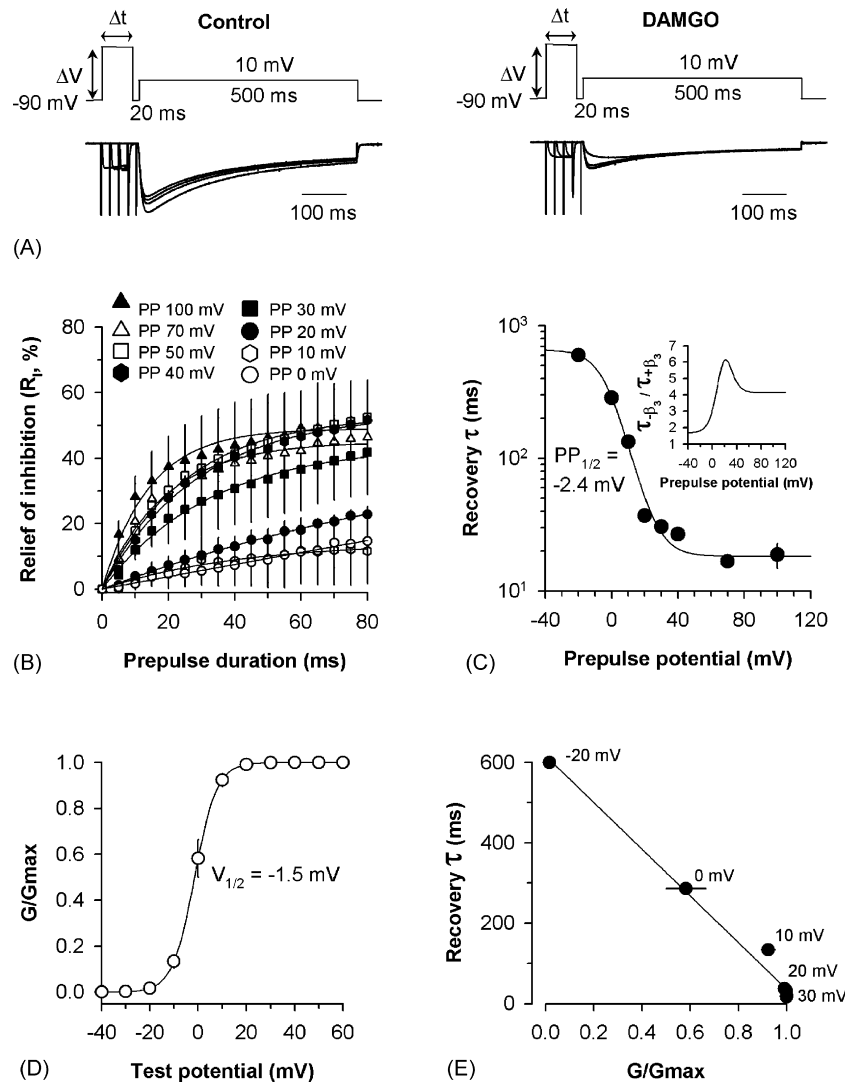


Fig. 2. The auxiliary  $\beta_3$  subunit displaces similarly the voltage-dependence of  $Ca_v2.2$  activation and the acceleration of the time constant of recovery from G protein inhibition. (A) Experimental protocol to measure prepulse facilitation as a function of prepulse duration and voltage (see Section 2 for details). Representative current traces recording at 50 mV prepulse potentials are shown for  $Ca_v2.2/\beta_3$  channels for control (left panel) and DAMGO (right panel) conditions at various prepulse durations. (B) Proportion of recovery from DAMGO inhibition as a function of prepulse duration for many different prepulse potentials (from 0 to 100 mV,  $n = 22$  cells). (C) Time constant  $\tau$  as a function of prepulse potential value ( $n = 22$  cells). A sigmoid fit of the data with the equation  $\tau = \tau_0 + (a/(1 + \exp(-(PP - PP_{1/2})/b)))$  yield a half-maximal acceleration of the time constant at  $PP_{1/2} = -2.4 \pm 1.0$  mV,  $a = 641$  ms and  $b = -7.7$  mV. Inset: modification of the time constant of recovery by  $\beta_3$  subunit. (D) Macroscopic conductance of  $Ca_v2.2/\beta_3$  as a function of test potential in control condition ( $n = 10$  cells). A Boltzmann fit of the data yield a half-activation potential of  $-1.5 \pm 1.5$  mV. (E) Correlation between the time constant of recovery from inhibition and the relative conductance of  $Ca_v2.2/\beta_3$  channels at various potential values. The data were fitted by a linear regression ( $r = 0.98$ ).

on the time constant is not stable over the range of potentials known to activate N-type channels. The half maximal current recovery time constant prepulse potential value ( $PP_{1/2}$ ) for  $Ca_v2.2/\beta_3$  channels is  $-2.4 \pm 1.0$  mV ( $n = 22$ ), which is shifted by  $-12.8$  mV compared to  $Ca_v2.2$  channels (Fig. 2C). This shift is reminiscent of the shift produced by  $\beta$  subunits on the voltage dependence of  $Ca_v2.2$  channel activation (Steat et al., 1993). Indeed, half-maximal increase in conductance of  $Ca_v2.2/\beta_3$  channels occurs at  $-1.5 \pm 1.5$  mV ( $n = 10$ , Fig. 2D), which is thus shifted by  $-10.2$  mV compared to the half-maximal conductance of  $Ca_v2.2$  channels. The time constant of current recovery was indeed correlated to the relative conductance value of the channel (Fig. 2E,  $r = 0.98$ ).

### 3.3. The $\beta_3$ subunit does neither antagonize nor promote G protein inhibition

One main problem in examining the effect of  $\beta$  subunits on G protein regulation is that it also affects channel expression levels. With higher expression levels, the bioavailability of endogenous G proteins becomes limiting (data not shown). Here, we deliberately avoided this pitfall by recording from cells possessing low (maximal bioavailability of G proteins) and similar currents densities ( $1.41 \pm 0.33$   $\mu A/\mu F$  for  $Ca_v2.2$  and  $1.39 \pm 0.50$   $\mu A/\mu F$  for  $Ca_v2.2/\beta_3$ ). In spite of this precaution, the inhibition at the peak of the currents is less pronounced in the presence of  $\beta_3$  subunit (mean inhibition of

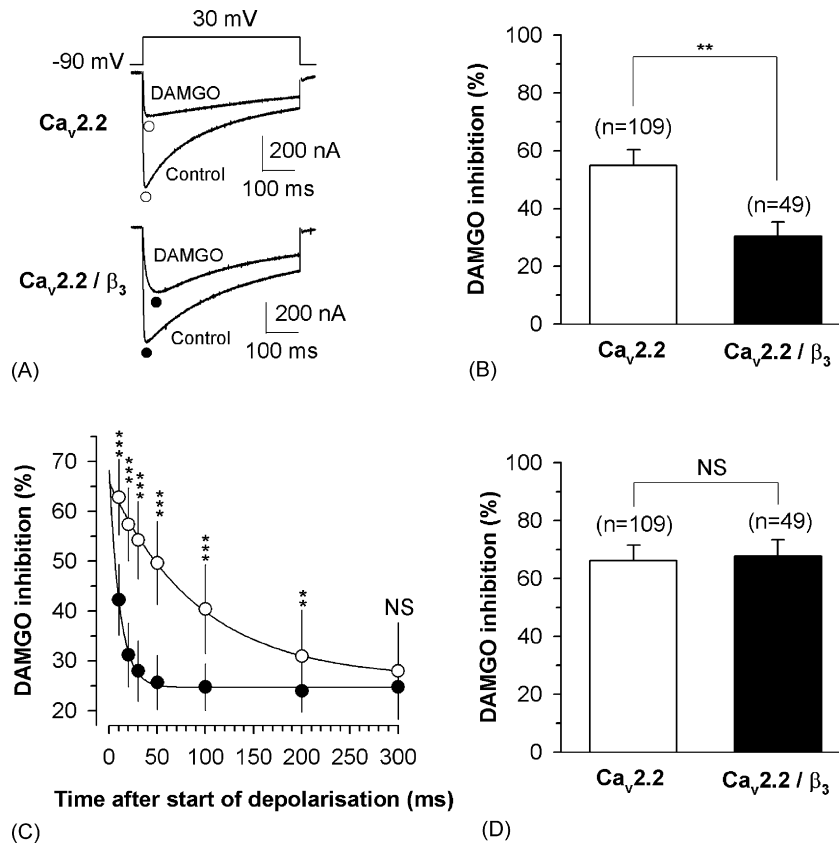


Fig. 3. Faster recovery from G protein inhibition with  $\beta_3$  subunit explains  $\beta$  antagonism on DAMGO inhibition. (A) Representative current traces at 30 mV for  $\text{Ca}_v2.2$  (top panel) and  $\text{Ca}_v2.2/\beta_3$  (bottom panel) before and after 10  $\mu\text{M}$  DAMGO application. (B) Average current inhibition measured at the peak of the currents at 30 mV for cells expressing  $\text{Ca}_v2.2$  alone or  $\text{Ca}_v2.2$  in combination with  $\beta_3$ . The difference in inhibition is statistically significant ( $p = 0.005$ ). (C) Average DAMGO inhibitions as a function of time after the start of the 30 mV depolarization. Data were fitted with decreasing exponential. (D) Average DAMGO inhibition evaluated at the start of depolarization for  $\text{Ca}_v2.2$  and  $\text{Ca}_v2.2/\beta_3$  channels. NS, non statistical significant.

$30.4 \pm 4.9\%$  at 30 mV ( $n = 49$ ) with  $\beta_3$  versus  $54.3 \pm 5.5\%$  ( $n = 109$ ) without  $\beta_3$  (Fig. 3A and B). Such a reduction has often been interpreted as due to an antagonistic effect of  $\beta$  subunit (Bourinet et al., 1996). It is known that a faster recovery from inhibition (5.6-fold at 30 mV with  $\beta_3$  subunit (Fig. 2C, inset)) may strongly diminish the DAMGO inhibition when measured at the peak current ((Roche and Treisman, 1998); and present data). In order to evaluate whether  $\beta_3$  subunit influences the G protein inhibition in our conditions of similar expression levels, we followed the percentage of DAMGO inhibition as a function of depolarization time at 30 mV both for  $\text{Ca}_v2.2$  and  $\text{Ca}_v2.2/\beta_3$  channels (Fig. 3C). Extrapolating the curves to the start of depolarization, provides an indication of what the real DAMGO inhibition should be before the start of the recovery process. It appears that the DAMGO inhibition at the start of depolarization for  $\text{Ca}_v2.2$  and  $\text{Ca}_v2.2/\beta_3$  channels is not statistically different ( $66.2 \pm 5.4\%$  versus  $67.8 \pm 5.7\%$ , respectively) (Fig. 3D). DAMGO inhibition at the peak of the current is thus considerably under-evaluated by 11.9% and 37.4% for  $\text{Ca}_v2.2$  and  $\text{Ca}_v2.2/\beta_3$  channels, respectively. These data extend earlier observations by demonstrating that  $\beta_3$  subunit is neither an antagonist nor an agonist of G protein current inhibition. However, faster recovery at lower voltages significantly boosts G protein dissociation.

#### 3.4. Simulation of current kinetics with parameters affecting the recovery from DAMGO inhibition

Recovery from G protein inhibition takes place during channel opening and this recovery is known to affect the activation kinetics of the current (Elmslie and Jones, 1994). However, little has been done so far to simulate how G protein dissociation may influence channel activation kinetics and inactivation kinetics alike. We therefore simulated the type of modifications introduced in the current by the progressive recovery from G protein inhibition during membrane depolarization. In our simulation studies, we made one reasonable assumption: blocked channels are non-permeable channels and should contribute to a control-like current after G protein dissociation. This assumption is supported by the single channel data from the group of Dr. Yue (Patil et al., 1996). Hence, non-blocked currents at the start of the depolarization are supported by non-regulated channels. The concept that channels may open with low probability in a reluctant mode while G proteins are presumably bound onto the channel (Lee and Elmslie, 2000) is not introduced in our simulation work for reasons that will be discussed latter on. Thus, currents recorded under DAMGO inhibition should represent the sum of currents flowing through two different populations of channels: current from non-regulated channels ( $I_{NR}$ ), which possess similar properties

than control channels, and current from channels undergoing a progressive relief from G protein inhibition ( $I_{PR}$ ). Thus:

$$I_{DAMGO} = I_{NR} + I_{PR} \quad (1)$$

where  $I_{NR}$  represents a fraction of the control current such that:

$$I_{NR} = I_{control} \left( \frac{100 - DI}{100} \right) \quad (2)$$

where DI is the percentage of DAMGO inhibition (DI = 54.3% for  $Ca_v2.2$  alone and 30.4% for  $Ca_v2.2/\beta_3$  channels at 30 mV; both values being under-estimated as we have quantified above).

We next described  $I_{PR}$  as the blocked fraction of  $I_{control}$

$$I_{blocked} = I_{control} \left( \frac{DI}{100} \right) \quad (3)$$

that would progressively recover from G protein inhibition with the following time course:

$$\text{time course of recovery from block} = 1 - \exp\left(-\left(\frac{1}{\tau}\right)t\right) \quad (4)$$

where  $t$  is the time after depolarization and  $\tau$  is the time constant of inhibition relief.

Since only a fraction  $R_I$  of the blocked current really recovers, then:

$$I_{PR} = I_{blocked} \left( 1 - \exp\left(-\left(\frac{1}{\tau}\right)t\right) \right) \times \left( \frac{R_I}{100} \right) \quad (5)$$

We thus can propose Eq. (6) with:

$$I_{DAMGO} = \left[ I_{control} \left( \frac{100 - DI}{100} \right) \right] + \left[ I_{control} \left( \frac{DI}{100} \right) \left( 1 - \exp\left(-\left(\frac{1}{\tau}\right)t\right) \right) \left( \frac{R_I}{100} \right) \right] \quad (6)$$

This equation has thus three different parameters that can be modulated to describe  $I_{DAMGO}$ : DI,  $\tau$  and  $R_I$ . In Fig. 4A–C, we illustrate how varying each of these three parameters influences the kinetics of a representative  $Ca_v2.2/\beta_3$  currents at 30 mV. When one parameter was varied, the two others were fixed at their mean experimental values (i.e.,  $\tau = 27$  ms (Fig. 2C),  $R_I = 48\%$  (Fig. 2B) and DI = 31% (Fig. 3B)). In Fig. 4A(a), DI was fixed at 30, 50 or 70%. As expected with such a time constant, 48% of the blocked channels would recover from inhibition at the end of a 500 ms pulse. We also noticed that the greater the fraction of inhibited channels, the greater the shift of the time to peak (by 13.3 ms for 30% inhibition, 26.5 ms for 50% inhibition, and 37.8 ms for 70% inhibition in this representative example). This tendency was illustrated by plotting the simulated shift of time to peak as a function of DAMGO inhibition (Fig. 4A(b)). With our representative control  $Ca_v2.2/\beta_3$  current trace at 30 mV, the maximal shift of time to peak that can theoretically be predicted is 54.9 ms considering 100% of inhibition by DAMGO (fixed parameters

of  $\tau = 27$  ms and  $R_I = 48\%$ ). In Fig. 4B(a), we fixed  $R_I$  at 30, 50 or 70%. Interestingly, in this configuration, this parameter has a smaller impact on the shift of the time to peak of the current (shift of 13.3 ms for  $R_I = 30\%$ , 16.4 ms for  $R_I = 50\%$ , and 24.5 ms for  $R_I = 70\%$ ). Plotting the theoretical shift of time to peak as a function of  $R_I$  values illustrates that a maximal shift of 26.5 ms can be expected (Fig. 4B(b); fixed parameters  $\tau = 27$  ms and DI = 31%). In Fig. 4C(a), we fixed the time constant of recovery from inhibition at  $\tau = 10, 50$  and 250 ms (incremental five-fold changes). We observed that this time constant has also an incidence on the time to peak of the current (shifts of 6.6 ms for  $\tau = 10$  ms, 13.3 ms for  $\tau = 50$  ms, and 0 ms for  $\tau = 250$  ms). Again, we plotted the theoretical shift of the time to peak as a function of the time constant of inhibition relief. Fig. 4C(b) illustrates a bell-shaped curve for the shift of the time to peak with an optimum at  $\tau = 55.7$  ms (fixed parameters of  $R_I = 48\%$  and DI = 31%). Very slow recovery time constants, above 250 ms, result in no shift at all. In contrast, such time constants affect the rate of inactivation of the channel (Fig. 4C(a)). Such an effect may explain the mild G protein effects reported on inactivation kinetics (Zamponi, 2001). The rising phase of the curve illustrates that recovery  $\tau$  from G protein inhibition should be slower than the activation time constant to observe a slowing of activation kinetic, whereas the descending phase illustrates that  $\tau$  should be faster than inactivation. We would predict that this descending phase would not exist if the channel did not undergo inactivation. This was indeed confirmed when using a  $Ca_v2.2/\beta_{2a}$  combination of channel subunits that has very slow inactivation (data not shown). We thus conclude that the optimal conditions to observe an important shift of the time to peak should be: (i) a maximal inhibition by DAMGO, (ii) a maximal relief from inhibition during depolarization, (iii) a time constant of relief ideally placed between the rates of channel activation and inactivation, and (iv) no or little channel inactivation. The same conditions result in the maximum gain of current compared to traces that would theoretically not undergo recovery from inhibition. At this stage, it is important to notice that a slower time constant of recovery from inhibition results in less gain of current. Such a difference may produce drastic differences in current recovery between  $Ca_v2.2$  and  $Ca_v2.2/\beta_3$  channels since the latter has faster recovery from inhibition.

The simulated DAMGO current should describe the experimental DAMGO trace regardless of the inactivation properties. To illustrate this point, we used two extreme inactivation conditions, one using a +30 mV trace from a  $Ca_v2.2/\beta_3$  combination (fast inactivating current), and another from a  $Ca_v2.2/\beta_{2a}$  combination (slow inactivating current). Fig. 4D(a) illustrates an experimental  $Ca_v2.2/\beta_3$  DAMGO current (along with the control trace) (left panel), that is compared to the simulated current without recovery from G protein inhibition (blue current trace) and to the simulated current with recovery from G protein inhibition (red trace). The parameters used for the latest trace are within the fluctuation range of observed individual values for experimental current traces at 30 mV ( $R_I = 52\%$  and  $\tau = 45$  ms) or coherent with the example chosen (DI = 63%). Fig. 4D(b) similarly illustrates a

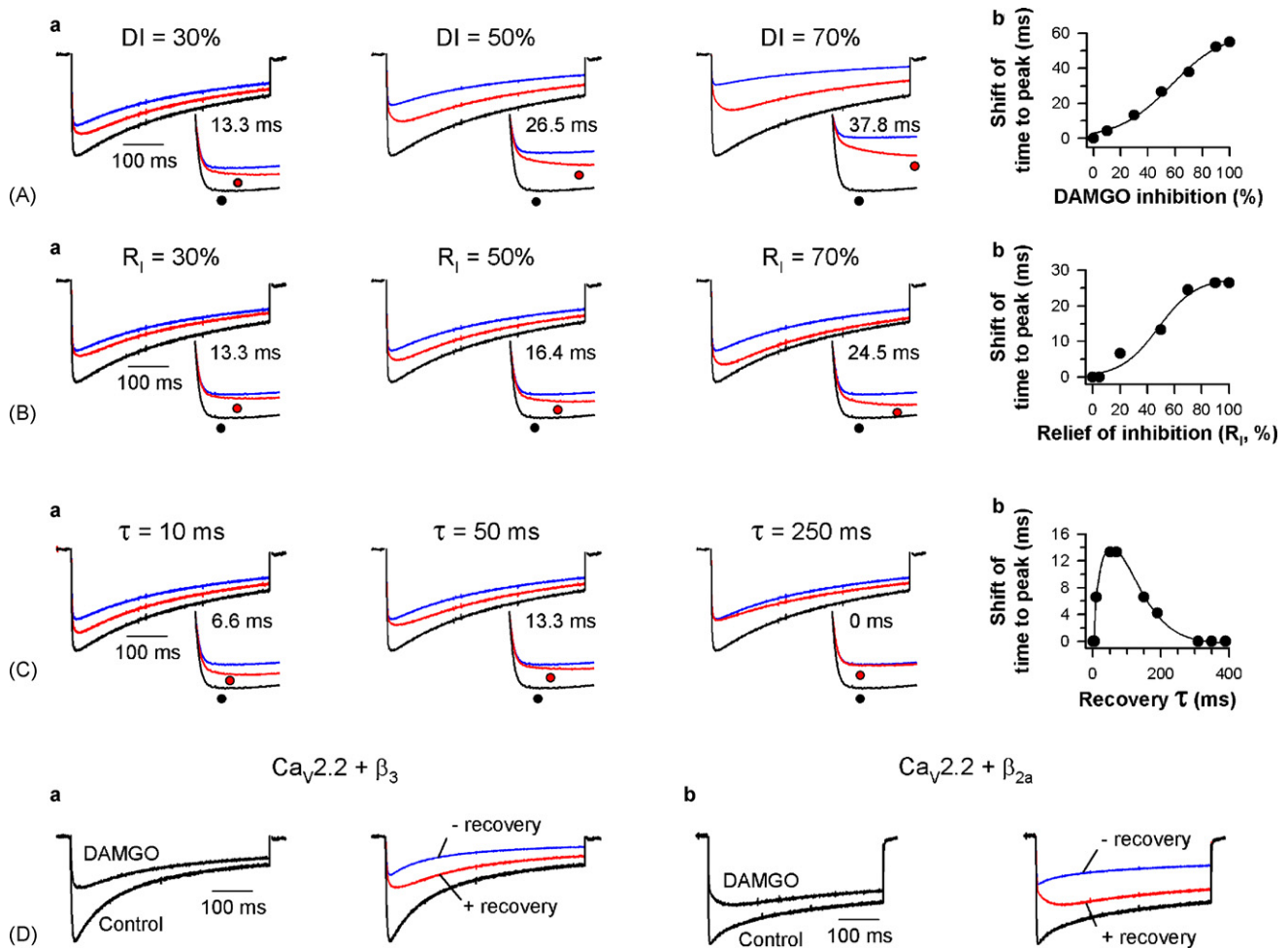


Fig. 4. Simulated impact of recovery from G protein inhibition on current kinetics. (A) Effect of DI variation on current kinetics. Other parameters remained constant ( $R_1 = 48\%$  and  $\tau = 27$  ms): (a) representative examples are shown on a simulated  $\text{Ca}_v2.2/\beta_3$  current at 30 mV. Black trace is the control trace without DAMGO; blue, simulated trace without recovery from G protein inhibition; red, modeled DAMGO trace with current recovery. Inset: expanded traces showing the first 40 ms of the depolarization. Symbol positions indicate the time to peak of the current and, upper values, the shift of the time to peak and (b) effect of DI variation on the shift of the time to peak is shown. Data are issued from arbitrary DI values. (B) Effect of  $R_1$  variation on current kinetics (with fixed DI = 31% and  $\tau = 27$  ms): (a) representative traces and (b) effect of  $R_1$  variation on the shift of the time to peak. (C) Effect of  $\tau$  variation on current kinetics (with fixed DI = 31% and  $R_1 = 48\%$ ): (a) representative traces and (b) effect of  $\tau$  variation on the shift of the time to peak. (D) Quality of the simulation in various conditions of channel inactivation: (a) experimental  $\text{Ca}_v2.2/\beta_3$  traces at 30 mV (control and DAMGO-inhibited, left panel) and modeled traces (right panel) showing a good fit by the model (DI = 63%,  $R_1 = 52\%$  and  $\tau = 45$  ms) and (b) similar simulation but with a  $\text{Ca}_v2.2/\beta_{2a}$  trace at 30 mV (DI = 55%,  $R_1 = 65\%$  and  $\tau = 38$  ms). The times to peak are significantly higher with slowly inactivating channels (14.1 ms of shift with  $\beta_3$  and 72.2 ms with  $\beta_{2a}$ ). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

comparison between experimental (left panel) and simulated (right panel) DAMGO inhibited  $\text{Ca}_v2.2/\beta_{2a}$  current at 30 mV. Although the experimental value for the time constant of recovery from G protein inhibition is unknown, all the parameters used here to construct the simulated DAMGO inhibited  $\text{Ca}_v2.2/\beta_{2a}$  current are compatible with the observations made on  $\text{Ca}_v2.2/\beta_3$  channels (DI = 55%,  $R_1 = 65\%$  and  $\tau = 38$  ms). Overall, this model, which is based on these three parameters, is able to describe real DAMGO inhibited currents regardless of the kinetics of inactivation.

### 3.5. Increasing extent of recovery from G protein inhibition during increasing depolarizing steps induces an apparent reluctant state of the channel

According to Figs. 1 and 2, faster G protein dissociations are expected for voltages that induce greater opening channel

probabilities rendering the gain of current non-homogenous over a range of studied potentials. Current–voltage relationships constructed under DAMGO inhibition should contain two different components: residual, non-blocked currents, with properties similar to control currents, and a variable fraction of currents that have recovered from G protein inhibition. The problem with building such current–voltage relationships is that current measures are generally performed at variable times after the start of the depolarization (peak values) and thus also with variable proportions of recovered currents. These factors have the potential to alter the shape of the current–voltage relationship. Here, we used our simulation to investigate how current recovery from G protein inhibition could affect the shape of the current–voltage relationship (Fig. 5). To illustrate this point, we investigated the voltage-dependence of recovered  $\text{Ca}_v2.2/\beta_3$  currents. Qualitatively similar results were obtained in the absence of

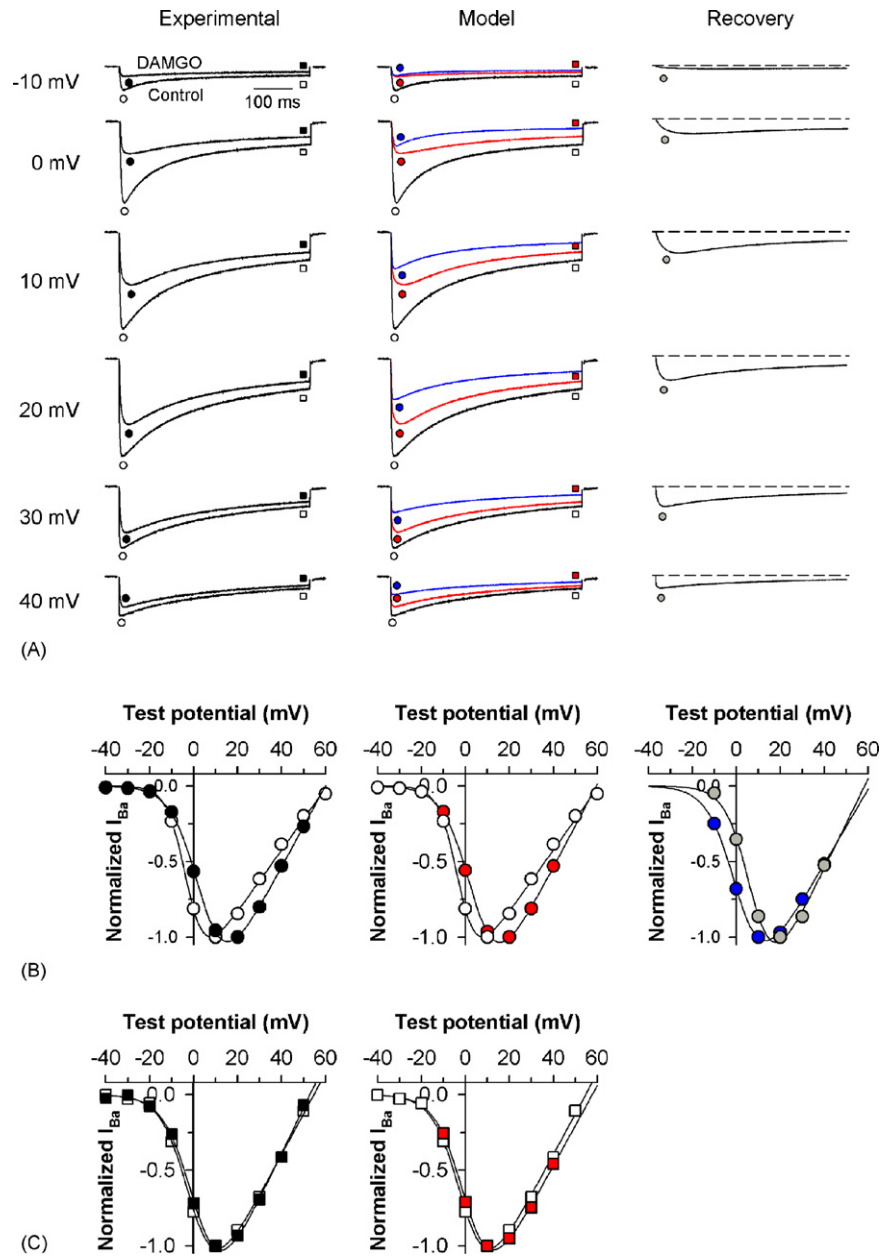


Fig. 5. Effect of current recovery from G protein inhibition on the current–voltage relationship. (A) Experimental  $Ca_v2.2/\beta_3$  current traces at various potentials (control and DAMGO inhibition, left panel), simulated traces (without (blue) and with recovery (red), middle panel) and subtracted simulated traces (red–blue = grey, right panel) illustrating the total recovered current. Symbols are positioned at the peak of the current (left and middle panel). Filled grey symbols in right panel are positioned at the time to peak of the DAMGO inhibited current traces, and not at their own peak values. Simulated curves in red were obtained with the following parameters (DI in %/ $\tau$  in ms/ $R_1$  in %): –10 mV (63/87/35), 0 mV (70/68/50), 10 mV (62/32/53), 20 mV (58/15/57), 30 mV (58/8/62) and 40 mV (54/4/60). (B) Corresponding current–voltage relationships. In the right panel, we also plotted the current–voltage relationship for DAMGO inhibited currents that would not recover from G protein inhibition (blue symbol) and for recovered current (grey symbol). Data were fitted with Boltzmann equations and provide the following  $V_{1/2}$  half-activation potentials (–2.8 mV for experimental control, 4.1 mV for experimental DAMGO, 4.4 mV for simulated DAMGO, 7.8 mV for recovered current and 1.3 mV for non-recoverable blocked current measured at the peak of experimental DAMGO current traces). (C) Current–voltage relationships in control and experimental (left panel) or simulated (right panel) DAMGO condition for measures at the end of the depolarisation (500 ms). Half activation values are  $V_{1/2}$  of –0.4 mV (control, open square), 1.7 mV respectively (experimental DAMGO, black square) and 1.2 (simulated DAMGO, red square). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

$\beta_3$  subunit (data not shown). Fig. 5A illustrates an example of representative control and DAMGO-inhibited currents for a set of depolarization values (from –10 to 40 mV by 10 mV steps; left panel). The DAMGO-inhibited currents were simulated with progressively smaller values of time constants of recovery when membrane depolarization was increased

(values provided in legend of Fig. 5). Simulated DAMGO-inhibited currents all describe accurately their real counterparts (middle panel). For a range of potential values (0–10 mV), the slow time constants of recovery (Fig. 2C) all produce a slowing of inactivation kinetics, consistent with our former conclusion (Fig. 4C). The recovered currents are also

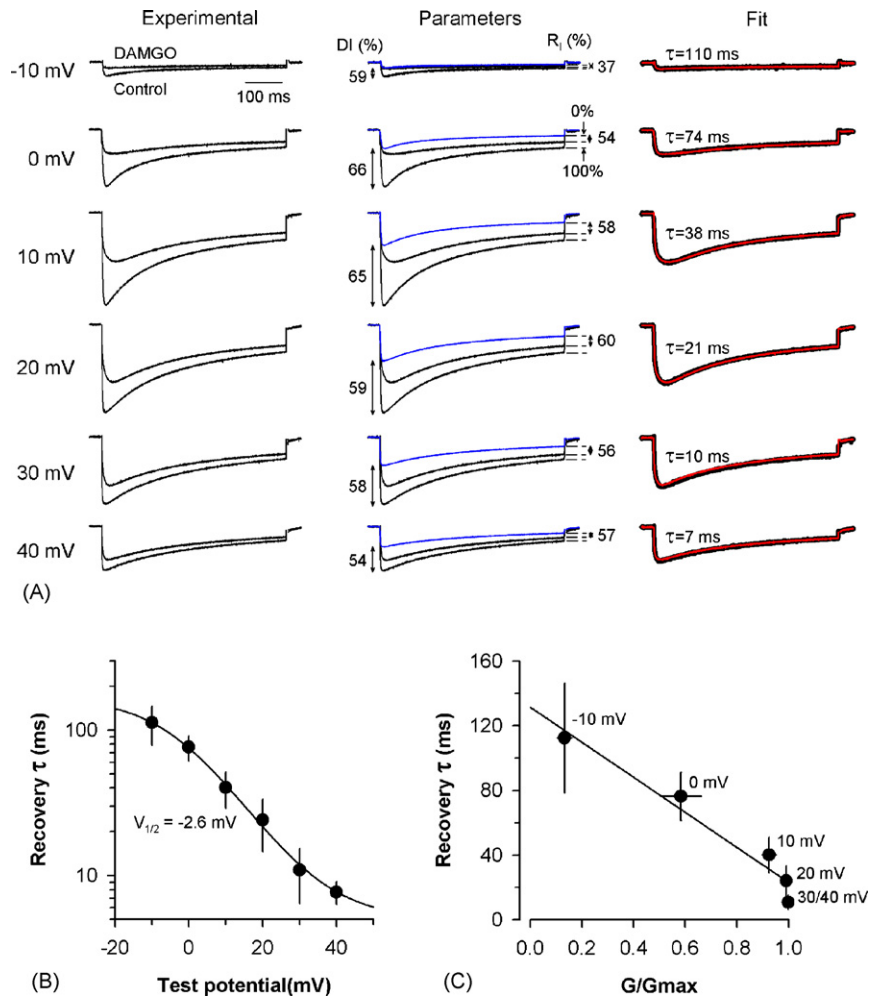


Fig. 6. Extracting the time constant of G protein dissociation from DAMGO-inhibited traces using the simulation model. (A) Left panel: representative experimental  $Ca_v2.2/\beta_3$  current traces at various potentials (control and DAMGO inhibition). Middle panel: experimental traces superimposed with the simulated traces without recovery (blue). DI values were measured as defined in Fig. 3C.  $R_1$  values were extracted at the end of pulse by measuring the percentage of recovery as estimated by the position of the DAMGO trace between the blue simulated trace and the control experimental trace. Right panel: fit (red trace) of the DAMGO trace (black enlarged trace) by using equation  $I_{DAMGO} = [I_{control} \times (100 - DI)/100] + [I_{control} \times (DI/100) \times (1 - \exp(-(1/\tau)t)) \times (R_1/100)]$  in which the experimental DI and  $R_1$  values were introduced as fixed parameters for each potential value and  $\tau$  was the variable to extract. (B) Time constant  $\tau$  as a function of potential value ( $n = 10$  cells). A sigmoid fit of the data with the equation  $\tau = \tau_0 + (a/(1 + \exp(-(PP - PP_{1/2})/b)))$  yield a half-maximal speeding up of the time constant at  $V_{1/2} = -2.6 \pm 1.3$  mV,  $a = 161$  ms and  $b = -10.5$  mV. (C) Correlation between the time constant of inhibition relief and the relative conductance of  $Ca_v2.2/\beta_3$  at potential values between  $-10$  and  $40$  mV. The data were fitted by a linear regression ( $r = 0.992$ ). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

illustrated as a function of test potentials (Fig. 5A, right panel). It is clearly apparent that the maximal currents in response to recovery occur at potentials of 10 and 20 mV. Symbols illustrate the time position at which maximal DAMGO-inhibited currents were measured (see corresponding symbols in middle panel). We next constructed the current–voltage relationships in a conventional manner (i.e. at the time to peak of the current; Fig. 5B). Fig. 5B left panel illustrates the experimental control and DAMGO-inhibited currents for this representative  $Ca_v2.2/\beta_3$  example. Half-activation potentials were  $-2.8$  mV (control) and  $4.1$  mV (DAMGO) showing the classical depolarizing shift observed with direct G protein inhibition. Similarly, the simulated DAMGO-inhibited current has a half-activation potential of  $4.4$  mV (Fig. 5B middle panel). We next extracted the

current–voltage relationship for currents that recovered from DAMGO inhibition (symbols in right panel of Fig. 5A). Interestingly, the current–voltage relationship of this recovered current is shifted towards depolarized values with a half-activation potential of  $7.8$  mV (Fig. 5B, right panel). We thus conclude that the shift observed under DAMGO inhibition is largely the result of a current recovery from G protein inhibition. We term this effect “apparent reluctance” since it is not correlated to any particular state of the channel. One prediction of this  $G_{\beta\gamma}$  dissociation mechanism is that the “reluctance” observed at the peak of the current should have almost disappeared if current–voltage relationships are constructed after maximal recovery from inhibition. This was indeed the case for experimental and modeled currents when measured at the end of the 500 ms pulses (Fig. 5C).



### 3.6. Fit of the G protein inhibited currents permits the extraction of the time constant of recovery from inhibition

Since DAMGO traces can be simulated by Eq. (6), we determined whether G protein inhibited currents could also be fit by this equation. Two of the parameters of G protein inhibition can be readily extracted from the experimental traces from expressed  $Ca_v2.2/\beta_3$  channels (Fig. 6A). At each voltage, DI values were estimated according to the method shown in Fig. 3C. As expected, since DI represents the total inhibition before depolarization, the values measured for DI were voltage-independent. The  $R_1$  values were estimated at the end of the 500 ms depolarization as the percentage of recovery from G protein inhibition according to the position of the DAMGO trace with regard to the position of control current (maximal recovery) and that of the theoretical trace without recovery from inhibition (blue traces). These two measured parameters were then introduced into Eq. (6) in order to extract the time constant of recovery  $\tau$  by fitting the experimental DAMGO traces at each voltage. An example of the good adequacy of the fit is provided in Fig. 6A (right panel). Average time constant of recovery were then plotted as a function of test potential (Fig. 6B). Fitting the data with a sigmoid curve provides a potential of half-maximal time constant of  $-2.6 \pm 1.3$  mV ( $n = 10$ ), which is not significantly different than the value obtained in Fig. 2C with the prepulse method. Similarly, a plot of the time constant of recovery from inhibition as a function of the relative channel conductance indicates a linear correlation ( $r = 0.992$ ). Interestingly, extracting the time constant of recovery according to this fit yields smaller values than with the prepulse method. These differences in absolute values appear to be linked to two potential problems that may occur

with the prepulse method. First, the control DAMGO current (without prepulse application) is already a facilitated current since recovery from inhibition occurs at low potentials. Second, reassociation of G proteins may occur to some extent during application of the interpulse potential at  $-90$  mV. Taken together, these two factors contribute to underestimate the amount of recovery and its kinetics.

## 4. Discussion

This study illustrates that, besides slowing of activation kinetics (Elmslie and Jones, 1994) and prepulse facilitation (Ikeda, 1991), the shift of the voltage-dependence of activation and the changes in inactivation kinetics can also be attributed to a recovery from G protein inhibition. Fig. 7 illustrates under the form of a diagram the various molecular states of the G protein regulated channel that may be at the origin of the biophysical modifications induced by G proteins. The diagram emphasizes the importance of an open-non-conducting G protein-bound state of the channel for G protein regulation. The data on the shift of the voltage-dependence of activation and on the changes in inactivation kinetics represent interesting new findings since these effects are generally attributed to G protein association (“On” effects) linked to the promotion of a channel reluctant mode, rather than to G protein dissociation (“Off” effects). Recovery from inhibition is shown to occur with a time constant that is directly correlated with the channel opening state. Thus, the voltage-dependence of this recovery time constant is largely due to the voltage-dependence of channel opening, making  $G_{\beta\gamma}$  dissociation mechanistically voltage-independent. The  $\beta_3$  subunit shifts the voltage-dependence of this time constant of recovery towards hyperpolarized

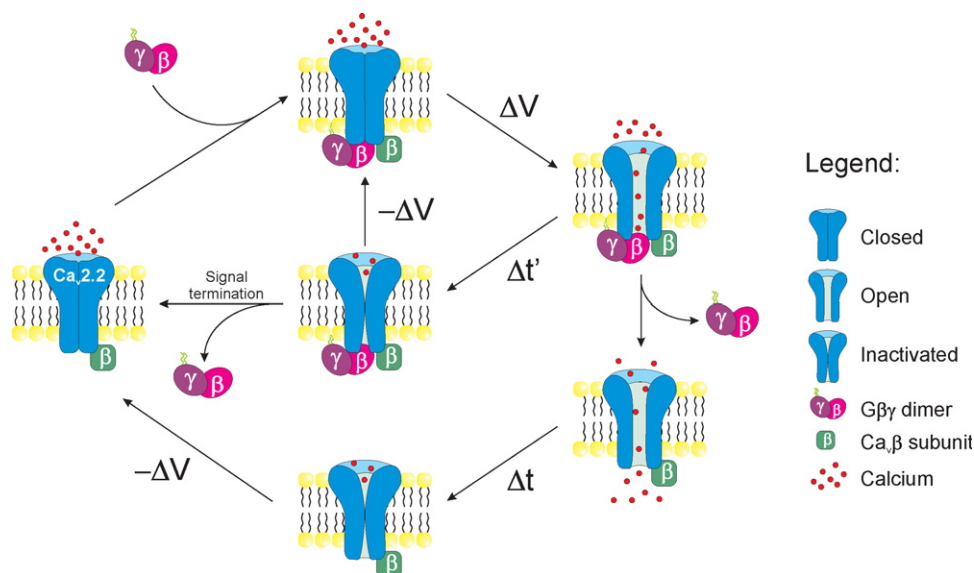


Fig. 7. Kinetic diagram illustrating the various steps involved in G protein dissociation from the channel. In this scheme, the only conducting state of the channel is the one in which  $G_{\beta\gamma}$  dissociation has occurred while the channel is still open. The transition from a  $G_{\beta\gamma}$  bound state of the channel in its closed configuration to a  $G_{\beta\gamma}$  unbound state in its open transition requires the passage through an additional transient  $G_{\beta\gamma}$  bound open- and non-conducting state of the channel. The passage through this state explains the delay in the time to peak of the current and the slowing of inactivation kinetics. Inactivation can occur in the presence of  $G_{\beta\gamma}$ , not necessarily with the same rate constant as in the absence of  $G_{\beta\gamma}$ .  $G_{\beta\gamma}$  dissociation is intrinsically voltage-independent, but the rate of dissociation becomes voltage-dependent as the result of the voltage-dependence of channel open probability.

potentials and increases the fastest time constant of recovery by a factor of 4.1. The shift of the voltage-dependence is readily explained by the effect of  $\beta_3$  subunit on the voltage-dependence of activation. The acceleration of the time constant of recovery produced by  $\beta_3$  subunit is probably linked to the promotion of a greater channel opening probability (Wakamori et al., 1999). Looking at current traces under DAMGO application, landmark effects, other than current inhibition, can be simulated by the combination of three parameters: DI, percentage of real DAMGO inhibition,  $R_1$ , the extent of current recovery from inhibition, and  $\tau$ , the time constant of recovery. DI value is often under-evaluated since current inhibition is usually assessed at the peak of the inhibited current. This was particularly the case in the presence of  $\beta_3$  subunit, which dramatically speeds the time constants of recovery at intermediate potentials, thereby leading to an apparent antagonism when measured at the peak of the current (Fig. 3A and B and see conclusions by Roche and Treisman, 1998). Indeed, measuring currents at their peak can severely affect the evaluation of the real extent of G protein inhibition in particular if  $\tau$  is fast or if the channel has slow inactivation kinetics (like in the presence of a  $\beta_{2a}$  subunit). To observe marked landmark effects, the best conditions are a strong current inhibition (DI), an important relief of inhibition ( $R_1$ ) and a fast recovery  $\tau$ , comprised between the rates of channel activation and inactivation. The two latter parameters cannot be controlled experimentally, since they are intrinsic channel and G protein properties.  $R_1$  is probably linked to inactivation since this process is expected to prematurely stop the recovery from inhibition. These two parameters thus appear as crucial for the bioengineering of G protein mimicking peptides with desirable N-type channel blocking properties.

#### 4.1. G protein unbinding is a crucial step for the biophysical changes in current properties

It is thus clear that all landmark effects used to identify direct G protein regulation are due to G protein dissociation from the channel, with the notable exception of current inhibition. Here, the willing mode is a non-inhibited channel with unbound G protein (no different than control channel). The channel is in a fully blocked state when a G protein is bound onto it. The reluctance of opening only reflects the time course of G protein unbinding, but without any modification in the voltage-dependence of the channel. An additional degree of complexity could be introduced in our simulation data by assuming that some of the G protein bound channels can enter a low probability mode of opening (Lee and Elmslie, 2000). This degree of complexity was not introduced because we believe that the single channel activities recorded at intermediate and high potentials result from the faster G protein dissociation that occurs at these potentials. The problem with the concept of a low opening probability mode of the channel in the G protein bound state is that no proof can be provided that the channels still bind the G proteins in question. In addition, the level of consensus on this matter is rather low since contradictory reports are numerous. In particular, evidence for channel openings in a “reluctant

mode” at low potential values is inexistent, most probably because G protein dissociation is very slow (Carabelli et al., 1996; Patil et al., 1996).

The question remains on what triggers G protein unbinding? The strict correlation, demonstrated here for the first time, between the voltage-dependence of G protein dissociation time constant and channel opening indicates that it is either: (i) any step in the complex molecular process of opening, or (ii) opening itself, which leads to G protein dissociation. Possibility is left for G proteins to act as “gating modifiers” to inhibit channel activity as former evidence possibly indicate (Delcour and Tsien, 1993; Colecraft et al., 2000). However, G proteins may also act as “pore blockers”, a hypothesis supported by the observation that G proteins alter the permeation pathway of N-type channels (Kuo and Bean, 1993). Since a 35 amino acid truncated version of  $G_\beta$  protein is sufficient to confer channel inhibition, complex patterns of protein interactions do not seem necessary to provide regulation (Li et al., 2005). Nevertheless, because recovery from inhibition occurs also at potential above the reversal potential, ion influx is not the driving force for G protein dissociation.

#### 4.2. The time constant of recovery from G protein inhibition can be readily extracted by fitting DAMGO traces with the simulation equation

Since DI and  $R_1$  values can be extracted directly from the comparison of experimental control and DAMGO-inhibited traces, the entire DAMGO trace can be fitted using our simulation equation thereby providing an estimate of the time constant of recovery. Using this method, the linear correlation observed between the time constant of recovery and the relative conductance is well conserved as well as the voltage dependence of the process. As discussed in Section 3, differences are however noted with regard to the absolute values that should be linked to some of the artifacts introduced by the prepulse method. Globally, much faster recovery appears to exist during a depolarization suggesting that the parameters extracted from the prepulse method may have to be interpreted cautiously. In any case, it should be emphasized that the simulation method introduced herein is an alternative method for the quantitative evaluation of G protein regulation parameters.

#### 4.3. Predictions for atypical direct G protein regulations

Our data raise intriguing new scenarios. Firstly, a case in which  $G_{\beta\gamma}$  would dissociate with the same rate than the activation time constant of the channel. One would conclude to the lack of G protein regulation since no landmark modification should be observed (not even current inhibition) despite the presence of proven binding elements. L-type channels may belong to this category since they possess  $G_{\beta\gamma}$  binding sites (Ivanina et al., 2000). This point will merit further investigation to assess whether current recovery from inhibition varies to a great extent depending on G protein and calcium channel isoforms. Secondly, a case in which the time constant of

recovery from G protein inhibition is ultra-slow. Here also, all landmark effects, except current inhibition, would be absent. Prepulse facilitation would be lacking though the inhibition is direct by essence. As such, some forms of voltage-independent G protein regulation thought to be indirect may also have to be reinterpreted.

#### 4.4. Concluding remarks

Providing a simple and easy to understand mechanistic frame of N-type channel regulation by G proteins, that can accommodate former models of regulation, will be useful for defining rationale structure-function studies. Considering the increased importance taken by  $G_{\beta\gamma}$  dissociation in G protein regulation, it will be essential to identify the molecular determinants that drive  $G_{\beta\gamma}$  off from the channel. These determinants are not voltage-dependent but are linked to the transition steps leading to channel opening.

#### Acknowledgements

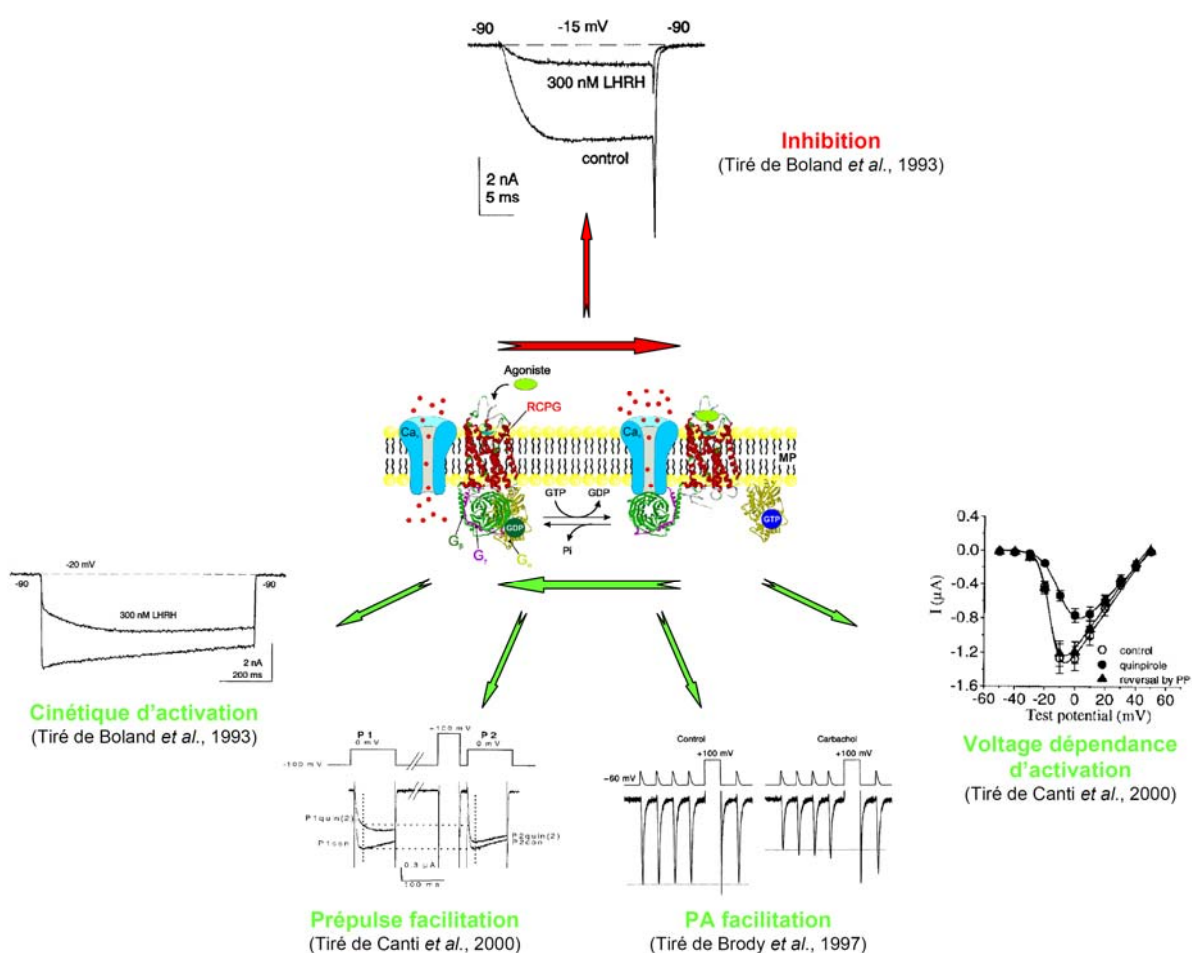
We acknowledge financial support from Inserm and the French Ministry of Research and Technology. The clone coding for rat  $\mu$ -opioid receptor was kindly provided by Dr. Pierre Charnet (CNRS, Montpellier, France).

#### References

- Bean, B.P., 1989. Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage dependence. *Nature* 340, 153–156.
- Boland, L.M., Bean, B.P., 1993. Modulation of N-type calcium channels in bullfrog sympathetic neurons by luteinizing hormone-releasing hormone: kinetics and voltage dependence. *J. Neurosci.* 13, 516–533.
- Bourinet, E., Soong, T.W., Stea, A., Snutch, T.P., 1996. Determinants of the G protein-dependent opioid modulation of neuronal calcium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 1486–1491.
- Carabelli, V., Lovallo, M., Magnelli, V., Zucker, H., Carbone, E., 1996. Voltage-dependent modulation of single N-Type  $Ca^{2+}$  channel kinetics by receptor agonists in IMR32 cells. *Biophys. J.* 70, 2144–2154.
- Colecraft, H.M., Patil, P.G., Yue, D.T., 2000. Differential occurrence of reluctant openings in G-protein-inhibited N- and P/Q-type calcium channels. *J. Gen. Physiol.* 115, 175–192.
- De Waard, M., Liu, H., Walker, D., Scott, V.E., Gurnett, C.A., Campbell, K.P., 1997. Direct binding of G-protein  $\beta\gamma$  complex to voltage-dependent calcium channels. *Nature* 385, 446–450.
- Delcour, A.H., Tsien, R.W., 1993. Altered prevalence of gating modes in neurotransmitter inhibition of N-type calcium channels. *Science* 259, 980–984.
- Dunlap, K., Fischbach, G.D., 1981. Neurotransmitters decrease the calcium conductance activated by depolarization of embryonic chick sensory neurones. *J. Physiol.* 317, 519–535.
- Elmslie, K.S., Jones, S.W., 1994. Concentration dependence of neurotransmitter effects on calcium current kinetics in frog sympathetic neurones. *J. Physiol.* 481, 35–46.
- Eppig, J.J., Dumont, J.N., 1976. Defined nutrient medium for the in vitro maintenance of *Xenopus laevis* oocytes. *In Vitro* 12, 418–427.
- Herlitzte, S., Garcia, D.E., Mackie, K., Hille, B., Scheuer, T., Catterall, W.A., 1996. Modulation of  $Ca^{2+}$  channels by G-protein  $\beta\gamma$  subunits. *Nature* 380, 258–262.
- Ikeda, S.R., 1991. Double-pulse calcium channel current facilitation in adult rat sympathetic neurones. *J. Physiol.* 439, 181–214.
- Ikeda, S.R., 1996. Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein  $\beta\gamma$  subunits. *Nature* 380, 255–258.
- Ivanina, T., Blumenstein, Y., Shistik, E., Barzilai, R., Dascal, N., 2000. Modulation of L-type  $Ca^{2+}$  channels by  $G_{\beta\gamma}$  and calmodulin via interactions with N and C termini of  $\alpha_{1C}$ . *J. Biol. Chem.* 275, 39846–39854.
- Kuo, C.C., Bean, B.P., 1993. G-protein modulation of ion permeation through N-type calcium channels. *Nature* 365, 258–262.
- Lee, H.K., Elmslie, K.S., 2000. Reluctant gating of single N-type calcium channels during neurotransmitter-induced inhibition in bullfrog sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 20, 3115–3128.
- Li, X., Hummer, A., Han, J., Xie, M., Melnik-Martinez, K., Moreno, R.L., Buck, M., Mark, M.D., Herlitzte, S., 2005. G protein  $\beta_2$  subunit-derived peptides for inhibition and induction of G protein pathways. Examination of voltage-gated  $Ca^{2+}$  and G protein inwardly rectifying  $K^+$  channels. *J. Biol. Chem.* 280, 23945–23959.
- Marchetti, C., Carbone, E., Lux, H.D., 1986. Effects of dopamine and noradrenaline on Ca channels of cultured sensory and sympathetic neurons of chick. *Pflügers Arch.* 406, 104–111.
- Patil, P.G., de Leon, M., Reed, R.R., Dubel, S., Snutch, T.P., Yue, D.T., 1996. Elementary events underlying voltage-dependent G-protein inhibition of N-type calcium channels. *Biophys. J.* 71, 2509–2521.
- Qin, N., Platano, D., Olcese, R., Stefani, E., Birnbaumer, L., 1997. Direct interaction of  $G\beta\gamma$  with a C-terminal  $G\beta\gamma$ -binding domain of the  $Ca^{2+}$  channel  $\alpha_1$  subunit is responsible for channel inhibition by G protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 8866–8871.
- Qu, Z., Hartzell, H.C., 2001. Functional geometry of the permeation pathway of  $Ca^{2+}$ -activated  $Cl^-$  channels inferred from analysis of voltage-dependent block. *J. Biol. Chem.* 276, 18423–18429.
- Roche, J.P., Treistman, S.N., 1998.  $Ca^{2+}$  channel  $\beta_3$  subunit enhances voltage-dependent relief of G-protein inhibition induced by muscarinic receptor activation and  $G\beta\gamma$ . *J. Neurosci.* 18, 4883–4890.
- Stea, A., Dubel, S.J., Pragnell, M., Leonard, J.P., Campbell, K.P., Snutch, T.P., 1993. A  $\beta$ -subunit normalizes the electrophysiological properties of a cloned N-type  $Ca^{2+}$  channel  $\alpha_1$ -subunit. *Neuropharmacology* 32, 1103–1116.
- Tareilus, E., Roux, M., Qin, N., Olcese, R., Zhou, J., Stefani, E., Birnbaumer, L., 1997. A *Xenopus* oocyte  $\beta$  subunit: evidence for a role in the assembly/expression of voltage-gated calcium channels that is separate from its role as a regulatory subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 1703–1708.
- Wakamori, M., Mikala, G., Mori, Y., 1999. Auxiliary subunits operate as a molecular switch in determining gating behaviour of the unitary N-type  $Ca^{2+}$  channel current in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* 517, 659–672.
- Zamponi, G.W., 2001. Determinants of G protein inhibition of presynaptic calcium channels. *Cell. Biochem. Biophys.* 34, 79–94.
- Zamponi, G.W., Bourinet, E., Nelson, D., Nargeot, J., Snutch, T.P., 1997. Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel  $\alpha_1$  subunit. *Nature* 385, 442–446.

### C. Discussion

Cette étude illustre l'importance du décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  de la sous-unité  $Ca_v2.2$  dans le phénotype de la régulation directe par les RCPGs. Il apparaît que le shift dépolarisant de la courbe d'activation du canal (Bean, 1989) peut être largement généré par la relaxation de l'inhibition, et représente avec le ralentissement apparent de la cinétique d'activation du canal (Marchetti *et al.*, 1986; Boland et Bean, 1993) et le phénomène de facilitation (Scott et Dolphin, 1990; Ikeda, 1991; Brody *et al.*, 1997) les effets "OFF" de cette régulation (Figure 30). L'inhibition du courant calcique (Boland et Bean, 1993; Wu et Saggau, 1997) étant finalement le seul effet "ON" induit par la fixation du dimère  $G_{\beta\gamma}$  sur la sous-unité  $Ca_v2.2$ .



**Figure 30. Illustration des régulations "ON" et "OFF" de l'activité d'un VGCC en réponse à l'activation d'un GPCR.**

La fixation du dimère  $G_{\beta\gamma}$  sur la sous-unité  $Ca_v2.x$  conduit à l'inhibition du courant calcique (régulation "ON", indiquée en rouge), alors que son décrochage suite à l'ouverture du canal induit un ensemble de modifications biophysiques apparentes telles qu'un ralentissement de la cinétique d'activation du courant, un phénomène de facilitation en réponse à un prépulse dépolarisant ou un train de potentiels d'action, et enfin à un shift dépolarisant de la courbe d'activation du canal (régulation "OFF", indiquées en vert).

Aussi, le concept de "*reluctance*" observé dans la régulation directe des protéines G hétérotrimériques ne semble pas avoir de signification moléculaire particulière, et ne traduit pas un changement de mode du canal suite à la fixation du dimère  $G_{\beta\gamma}$  (Bean, 1989). De plus, cette "*reluctance*" apparente se produit aussi bien en présence qu'en absence de sous-unité  $\beta$ , contrairement au modèle proposé de déplacement de la sous-unité  $\beta$  du canal par le dimère  $G_{\beta\gamma}$  (Sandoz *et al.*, 2004b).

### 1. La sous-unité $\beta$ : agoniste ou antagoniste ?

Cette étude révèle que la cinétique de décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  de la sous-unité  $Ca_v2.2$  est directement corrélée à l'ouverture ionique du canal. Ces résultats suggèrent que la voltage dépendance de cette relaxation serait le reflet de la voltage dépendance de l'ouverture du canal, faisant du mécanisme moléculaire de décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  un phénomène intrinsèquement indépendant du voltage. Aussi, le shift hyperpolarisant de la courbe d'activation des canaux de type N induit par la sous-unité  $\beta_3$  se traduit également par un shift hyperpolarisant de la voltage dépendance de la cinétique de décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$ . Toutefois, la sous-unité  $\beta_3$  n'affecte pas seulement la relation au voltage, mais accélère également la cinétique de décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$ . Cet effet étant très certainement lié à l'augmentation de la probabilité d'ouverture des canaux de type N induit pas la présence de la sous-unité  $\beta_3$  (Wakamori *et al.*, 1999). Il n'est pas à exclure non plus que la sous-unité  $\beta$  puisse induire, de part son encombrement stérique, une perte d'affinité supplémentaire du dimère  $G_{\beta\gamma}$  sur la sous-unité  $Ca_v2.2$ .

Il est à noter que l'accélération de la cinétique de décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  induit par la sous-unité  $\beta$ , interfère directement avec la régulation "ON". En effet, l'inhibition du courant calcique induit par les protéines G hétérotrimériques est généralement quantifiée aux pics des courants, temps durant lequel une partie de la relaxation se produit. Ceci est particulièrement vrai en présence de la sous-unité  $\beta_3$  qui accélère de manière drastique la cinétique de décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  à des potentiels intermédiaires. De plus, la relaxation de l'inhibition étant elle-même à l'origine d'un ralentissement apparent de la cinétique d'activation du courant, contribue également à amplifier ce phénomène. Ainsi, l'inhibition mesurée aux pics des courants calciques est très largement sous-estimée, cette erreur d'évaluation étant d'autant plus importante que la cinétique de décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  est rapide (tel est le cas en présence de la sous-unité  $\beta_3$ ), ou que le ralentissement apparent de la

cinétique d'activation du canal est prononcé (phénomène particulièrement visible en présence de la sous-unité  $\beta_{2a}$ ). L'estimation de l'inhibition au début de la dépolarisation, c'est-à-dire avant que le phénomène de relaxation n'a pris place, permet ainsi une meilleure quantification de la régulation "ON", et révèle que l'inhibition des courants de type N est similaire en l'absence ou en présence de sous-unité  $\beta$ . Aussi, il apparaît que la sous-unité  $\beta$  n'induit qu'un antagonisme apparent de l'inhibition directe des courants calcique par les protéines G. Toutefois, en raison du fait qu'elle accélère la cinétique de décrochage du  $G_{\beta\gamma}$  en réponse à l'activation du canal, suggère que la sous-unité  $\beta$  pourrait cependant induire une diminution de l'affinité du dimère  $G_{\beta\gamma}$  pour la sous-unité  $Ca_v2.2$ , peut être via la réduction du nombre de sites d'interaction disponibles sur la GPBP.

## 2. Simulation de la régulation G

La simulation des courants calciques sous régulation par les protéines G hétérotrimériques a été réalisée sur la base de trois paramètres : DI, le pourcentage d'inhibition réel du courant, RI, le pourcentage de récupération de l'inhibition en réponse à la dépolarisation membranaire, et  $\tau$ , la constante de temps de décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  de la sous-unité  $Ca_v2.2$ . Le courant enregistré sous régulation G se compose d'une fraction de courant contrôle, généré par des canaux non affectés par la régulation, à laquelle se rajoute une fraction de courant issu de canaux initialement inhibés et récupérant progressivement de l'inhibition. Aussi, les canaux liés au dimère  $G_{\beta\gamma}$  sont totalement inhibés, la "*reluctance*" ne reflétant que le temps nécessaire au décrochage du dimère, sans modification de la relation du canal au voltage. Le courant total enregistré sous régulation G étant finalement généré uniquement par des canaux "contrôles". Cette simulation ne prend pas en compte le concept proposé par Lee et Elmslie d'ouverture ionique des canaux liés au dimère  $G_{\beta\gamma}$  (Lee et Elmslie, 2000), car comme nous l'avons déjà mentionné dans l'introduction, aucune évidence expérimentale ne permet de confirmer que le dimère est toujours présent sur le canal durant ces ouvertures.

## 3. Importance du décrochage du $G_{\beta\gamma}$ dans le phénotype

Sur la base de cette simulation, il apparaît que le décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  de la sous-unité  $Ca_v2.2$  est à l'origine de l'ensemble du phénotype de la régulation directe des canaux de type N par les protéines G, excepté l'inhibition du courant. L'ensemble de ces modifications phénotypiques de l'activité du canal étant généré par la fraction de courant issu des canaux initialement inhibés et récupérant progressivement de l'inhibition. Aussi, la régulation "OFF"

est particulièrement spectaculaire pour des valeurs de DI et de RI élevées, associées à une cinétique de décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  comprise entre la cinétique d'activation et d'inactivation du canal. A noter que si la valeur de DI peut être contrôlée expérimentalement par la concentration en agoniste, la valeurs de RI et  $\tau$  ne peuvent être modulées car intrinsèques au canal. Il est possible d'imaginer deux scénarii extrêmes. Une cinétique de décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  similaire ou plus rapide que la cinétique d'activation du canal control conduira à une absence de régulation G, en dépit de la présence sur la sous-unité  $Ca_v$  des déterminants structuraux d'interaction avec le dimère  $G_{\beta\gamma}$ . Ce peut être le cas pour les canaux de type L, qui possèdent certains de ces déterminants (Ivanina *et al.*, 2000) mais dont l'inhibition en système d'expression hétérologue n'a pu être mise en évidence (Roche *et al.*, 1995; Bourinet *et al.*, 1996a; Zhang *et al.*, 1996; Meza et Adams, 1998). Inversement, si la cinétique de décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  est très lente, seule la régulation "ON" pourra être observée. Dans ce contexte, l'utilisation d'un prépulse dépolarisant classiquement utilisée pour révéler l'existence d'une régulation directe par le dimère  $G_{\beta\gamma}$  n'a pas de fondement. Il est fondamental de se placer dans des conditions expérimentales permettant de mettre en évidence directe la régulation "ON", seule témoin d'une régulation.

#### 4. La "reluctance" : témoin de la régulation "OFF"

Le fait que le concept de "reluctance" ne reflète finalement qu'un caractère particulier de la régulation "OFF" représente sans conteste le résultat le plus marquant de cette étude. En effet, sur la base de la simulation des courants sous régulation G, à différents potentiels, il apparaît que le shift dépolarisant de la courbe d'activation du canal traduit uniquement l'évolution au regard du potentiel de la fraction de courant issu de canaux inhibés et récupérant progressivement de l'inhibition. Aussi, comme nous l'avons mentionné dans le paragraphe précédent, une condition dans laquelle le décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  de la sous-unité  $Ca_v$  serait rendue impossible devrait se caractériser par la présence d'une régulation "ON" en l'absence de tout signe de "reluctance". Toutefois, cette condition expérimentale est difficile à mettre en œuvre, et nécessiterait très certainement une meilleure compréhension des mécanismes et déterminants moléculaires impliqués dans le décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  en réponse à l'ouverture du canal. Un début de réponse provient toutefois des travaux récents réalisés sur la sous-unité  $Ca_v3.2$ , où l'inhibition des courants de type H par le dimère  $G_{\beta_2\gamma_2}$ , non réversée par l'application d'un prépulse dépolarisant, n'est pas associée au shift dépolarisant de la courbe d'activation du canal (Depuy *et al.*, 2006).

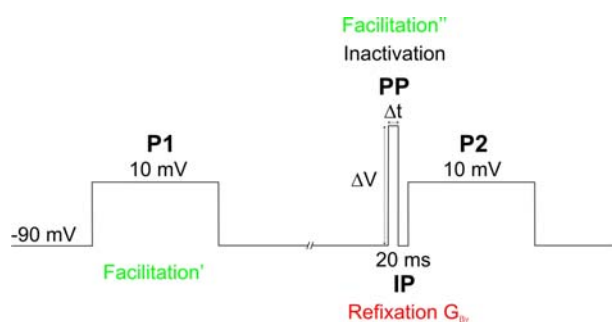
Ainsi, cette conception de la "*reluctance*" du canal de type N, simple conceptuellement, se présente comme une alternative séduisante aux deux modèles initialement proposés. En effet, la "*reluctance*" comme caractère de la régulation "OFF" ne nécessite pas une transition de mode par l'altération d'un senseur de voltage (Bean, 1989), ni l'implication d'une sous-unité  $\beta$  (Sandoz *et al.*, 2004b). En revanche, tout élément susceptible d'altérer la cinétique de décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  et l'amplitude de la relaxation de l'inhibition, aura une influence indirecte sur le phénotype de la "*reluctance*" apparente.



## II. DEVELOPPEMENT d'une METHODE D'ANALYSE de la REGULATION DIRECTE des CANAUX N par les PROTEINES G

### A. Introduction

L'étude de la régulation directe des VGCCs par les RCPGs est généralement basée sur l'utilisation de prépulses dépolarisants. Comme nous l'avons vu au cours de l'étude précédente, la prépulse facilitation ne reflète que partiellement la régulation "OFF". De plus, elle présente un certain nombre d'imprécisions et de biais expérimentaux. Ce protocole consiste à réaliser un enregistrement pour une dépolarisation test P1 en l'absence de prépulse dépolarisant (contrôle), suivie d'un second enregistrement test P2 précédé cette fois-ci d'un prépulse dépolarisant (PP). La facilitation induite par le prépulse dépolarisant étant alors estimée comme le rapport des courants P2 / P1 (Scott et Dolphin, 1990; Ikeda, 1991) (Figure 31).



**Figure 31. Représentation schématique du protocole expérimental de prépulse facilitation.**

La facilitation prépulse repose sur la capacité du dimère  $G_{\beta\gamma}$  à se dissocier de la sous-unité  $Ca_v2.x$  en réponse à une forte dépolarisation membranaire. Aussi, le courant est enregistré une première fois pour une dépolarisation teste (P1, 10 mV), puis une seconde fois (P2, 10 mV) précédée d'un prépulse dépolarisant (PP) et d'un interpulse (IP, 20 ms). L'amplitude de la prépulse facilitation est alors établie comme le rapport entre le courant enregistré en P2 et celui enregistré en P1 en l'absence de PP. A noter que la dépendance de la prépulse facilitation au voltage et au temps est mise en évidence en faisant varier le voltage et la durée du PP.

Or, le courant contrôle enregistré en P1 se trouve être déjà un courant déjà facilité en raison de la relaxation de l'inhibition induite par la dépolarisation test, conduisant à une sous-estimation de la prépulse facilitation. Cette erreur sera d'autant plus importante que la cinétique de décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  sera rapide. Aussi, il est possible d'envisager le cas extrême où la dissociation du dimère  $G_{\beta\gamma}$  de la sous-unité  $Ca_v$  est très rapide. Dans cette situation, la majorité de la relaxation se produirait alors de manière silencieuse durant les dépolarisations tests, conduisant à une absence de prépulse facilitation. Ceci serait alors interprété comme une absence de régulation directe des protéines G hétérotrimériques. De plus, le PP, généralement appliqué à des potentiels très dépolarisants, produit une inactivation

drastique du canal, conduisant à masquer le gain de courant généré par le PP. Aussi, la dépolarisation test P2 qui succède au PP est précédée d'un court interpulse (IP), nécessaire à la dé-inactivation du canal. Cette étape de retour au potentiel de repos est toutefois l'occasion pour le dimère  $G_{\beta\gamma}$  de se réassocier à la sous-unité  $Ca_v$ , abolissant ainsi partiellement l'effet du PP. Enfin, malgré la présence d'un IP, ce dernier n'est pas suffisant pour se libérer de l'inactivation induite par le PP, qui est d'autant plus importante que la durée du PP est longue. Aussi, la prépulse facilitation mesurée sous régulation G ( $P2_{Prot\ G}/P1_{Prot\ G}$ ) est généralement rapportée à la prépulse facilitation mesurée avant l'activation des protéines G ( $P2_{Contrôle}/P1_{Contrôle}$ ), afin de s'affranchir de l'inactivation induite par le PP. Cette stratégie d'analyse assume alors que la fixation du dimère  $G_{\beta\gamma}$  sur la sous-unité  $Ca_v2.x$  ne modifie pas l'inactivation des canaux, et que ces derniers s'inactivent suivant la même cinétique que les canaux contrôles. Toutefois, aucune évidence expérimentale ne permet de confirmer ce postulat. Aussi, comme nous allons le voir à travers cette seconde étude, ce principe semble même être fortement remis en question. Nous avons ainsi développé une nouvelle méthode d'analyse des paramètres de la régulation G, non affectée par les éventuelles altérations des propriétés d'inactivation des canaux sous régulation G, et indépendante de l'utilisation de prépulses dépolarisants. Elle permet la quantification des paramètres des régulations "ON" et "OFF", et consiste à extraire la fraction de courant résultant de la relaxation des canaux inhibés, directement à partir de l'analyse des courants ioniques contrôles et sous régulation G.

**B. Publication № 2**

**Introducing an alternative biophysical method to analyse direct G protein  
regulation of voltage-dependent calcium channels**

Norbert Weiss & Michel De Waard

*Journal of Neuroscience Methods* (2006) **160**: 26-36

# Introducing an alternative biophysical method to analyze direct G protein regulation of voltage-dependent calcium channels

Norbert Weiss<sup>a,b,c</sup>, Michel De Waard<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> *Inserm U607, Laboratoire Canaux Calciques, Fonctions et Pathologies, 17 Rue des Martyrs, Bâtiment C3, 38054 Grenoble Cedex 09, France*

<sup>b</sup> *Commissariat à l’Energie Atomique, Grenoble, France*

<sup>c</sup> *Université Joseph Fourier, Grenoble, France*

Received 7 April 2006; received in revised form 27 July 2006; accepted 9 August 2006

## Abstract

Direct G protein inhibition of voltage-dependent calcium channels is currently indirectly assessed by the gain of current produced by depolarizing prepulse potentials (PP). Indeed, PPs produce a channel opening- and time-dependent dissociation of G proteins from the channel that is responsible for the increase in Ca<sup>2+</sup> permeation. Parameters of G protein dissociation are essential to describe the characteristic landmark modifications in channel activities that underlie G protein regulation. From the kinetics and opening-dependence of this dissociation, crucial biophysical parameters are extracted such as the extent and the rate of G protein unbinding from the channel. Unfortunately, the method used so far assumes that G protein regulated channels undergo the same inactivation kinetics than control channels. Herein, we demonstrate for the first time that G protein-bound channels undergo a much slower inactivation than control channels. We thus introduce a novel simple-to-use method that avoids the use of PPs and that is not affected by potential changes in channel inactivation kinetics conferred by G protein binding. This method extracts G protein unbinding parameters from ionic currents induced by regular depolarizing pulses by separating the ionic currents due to non-regulated channels from the ionic currents that result from a progressive departure of G proteins from regulated channels.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Calcium channel; Ca<sub>v</sub>2.2 channel; Mu-opioid receptor; β-Subunit; G protein regulation; Prepulse facilitation; Biophysical method

## 1. Introduction

Many neuronal voltage-dependent calcium channels are strongly regulated by G protein coupled receptors (GPCR) (Bean, 1989; Dunlap and Fischbach, 1981; Lipscombe et al., 1989; Marchetti et al., 1986). Direct current inhibition occurs through binding of the G<sub>βγ</sub> dimer of G proteins onto one of the three potential Ca<sub>v</sub>2.x pore-forming subunits (Ca<sub>v</sub>2.1, Ca<sub>v</sub>2.2, and Ca<sub>v</sub>2.3) (Bourinet et al., 1996; Roche et al., 1995). Many modifications in channel activity have been used for the identification of direct G protein regulation. At the whole-cell level, these modifications include: (i) current inhibition (Boland and Bean, 1993; Wu and Saggau, 1997), (ii) slowing of activation

kinetics (Marchetti et al., 1986), (iii) current facilitation following membrane depolarization with strong prepulse application (Ikeda, 1991; Scott and Dolphin, 1990), and (iv) shift in the voltage-dependence of activation towards depolarized values (Bean, 1989). The current inhibition is definitively linked to G protein association onto the channel, whereas the slowing of activation kinetics as well as the current prepulse facilitation are interpreted as due to G protein dissociation (Elmslie and Jones, 1994; Stephens et al., 1998). The interpretation of the shift of the voltage-dependence of activation is possibly less clear, but it might also be linked to the process of G protein dissociation during membrane depolarization (De Waard et al., 2005; Weiss et al., 2006). Single channel recordings have shown that G proteins produce an increase in the first latency to channel opening and in the occurrence of sweeps without openings (Carabelli et al., 1996; Patil et al., 1996). For N-type calcium channels, some manuscripts have reported openings in a reluctant mode (Colecraft et al., 2000; Lee and Elmslie, 2000), while others show no evidence (Carabelli et al., 1996; Patil et al., 1996). It has been concluded that the channel can recuperate a normal

*Abbreviations:* GPCR, G protein coupled receptors; DAMGO, D-Ala<sup>2</sup>,Me-Phe<sup>4</sup>,glycino<sup>5</sup>-enkephalin

\* Corresponding author at: Inserm U607, CEA, 17 Rue des Martyrs, Bâtiment C3, 38054 Grenoble Cedex 09, France. Tel.: +33 4 38 78 68 13; fax: +33 4 38 78 50 41.

E-mail address: mdewaard@cea.fr (M. De Waard).

activity only once the  $G_{\beta\gamma}$  dimer has physically dissociated from the channel. Early steps in channel openings produced during membrane depolarization represent the incentive for this dissociation (Jones and Elmslie, 1997; Patil et al., 1996). Thus, since  $G_{\beta\gamma}$  dissociation from the channel is at the onset of major biophysical changes in calcium currents, studying the parameters that underlie  $G_{\beta\gamma}$  dissociation appears particularly important to understand channel regulation by G proteins. In particular, the extent of inhibition at resting potential, the rate at which G proteins unbind from the channel during membrane depolarization, as well as the extent at which this dissociation occurs require a precise quantification. Classically, the two last parameters are extracted by the use of depolarizing prepulse potentials (Roche and Treistman, 1998). However, using depolarizing prepulses also induces channel inactivation, which partly masks the net current facilitation component making it difficult to measure G protein dissociation parameters. In order to eliminate this component of prepulse-induced inactivation and to better extract these G protein dissociation parameters, the facilitated current under G protein regulation is normalized to the values observed in the absence of G protein regulation. This strategy of analysis assumes that calcium channels under the control of G proteins inactivate to a similar extent and with the same rate than control channels. As we will show here in this study, this assumption is put into question. Also, this method assumes that G protein dissociation occurs only during the depolarizing prepulse application and not during the pulse test which is not supported by the experimental evidences. In this context, we propose an alternative method that is not based on these assumptions, thereby allowing a description of the critical parameters supporting G protein regulation of voltage-dependent calcium channels.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

cDNAs coding for rabbit  $Ca_v2.2$  (accession number D14157), rat  $\beta_3$  (M88751) and rat  $\mu$ -opioid receptor (rMOR) were used in this study. (D-Ala<sup>2</sup>,Me-Phe<sup>4</sup>,glycinol<sup>5</sup>)-Enkephalin (DAMGO) was purchased from Bachem (Bubendorf, Germany).

### 2.2. Transient expression in *Xenopus* oocytes

Stages V and VI oocytes were surgically removed from anesthetized adult female *Xenopus laevis* and treated for 2–3 h with 2 mg/ml collagenase type 1A (Sigma). Cytoplasmic injection of cells was performed with 46 nl of cRNA mixture ( $Ca_v2.2$  and rMOR cRNA at 0.3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  + 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  of  $\beta_3$  cRNA) *in vitro* transcribed using the SP6 or T7 mMessage mMachine Kit (Ambion, Cambridgeshire, UK). Cells were incubated at 19 °C in defined nutriment oocyte medium as described (Eppig and Dumont, 1976). Surgeries on frogs were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC). Formal approval was obtained from the animal subjects review board of Inserm. Minimal numbers of animals were used for this study.

### 2.3. Electrophysiological recording

After 2–4 days incubation, macroscopic currents were recorded at room temperature using the Digidata 1322A and GeneClamp 500B amplifier (Axon Instruments, Union City, CA) by the two-electrode voltage-clamp technique in a bathing solution containing (in mM): Ba(OH)<sub>2</sub> 40, NaOH 50, KCl 3, HEPES 10, niflumic acid 0.5, pH 7.4 with methanesulfonic acid. Niflumic acid was used because it is one of the rare known voltage-independent blocker of calcium-activated chloride currents (Qu and Hartzell, 2001). Electrodes were filled with (in mM): KCl 140, EGTA 10 and HEPES 10 (pH 7.2) and had resistances comprised between 0.5 and 1 M $\Omega$ . All electrophysiological acquisition and analyses were performed with the pClamp 8 software (Axon Instruments). Recordings were low-pass filtered at 2 kHz and acquired at 10 kHz. Leak subtraction was performed on-line by a P/4 protocol. The holding potential was  $-90$  mV throughout. For prepulse facilitation experiments, a 20 ms interpulse to  $-90$  mV was used. DAMGO was applied at a saturating concentration of 10  $\mu\text{M}$  by superfusion of cells at 1 ml/min. All recordings were performed within 1 min after DAMGO produced maximal current inhibition. We observed that this procedure greatly minimized voltage-independent G protein regulation that took place later, 5–10 min after DAMGO application (data not shown). Only the voltage-dependent component was studied by prepulse applications. The inhibition by DAMGO was fully reversible as assessed by washout experiments. Also, no run-down was observed during the time course of these experiments.

### 2.4. Data analysis

Cells lacking tonic G protein inhibition with current densities less than 2  $\mu\text{A}/\mu\text{F}$  were selected for our analyses. All data are presented as mean  $\pm$  S.E.M. for  $n$  number observations and statistical significance ( $p$ ) was calculated using the unpaired Student's  $t$ -test.

## 3. Results

### 3.1. Biophysical parameters of G protein regulation extracted by the classical prepulse method

The electrophysiological protocol used in the prepulse method is shown in Fig. 1A. Basically, kinetics and extent of recovery from G protein inhibition are determined by comparing peak current amplitudes at a test pulse before (P1) and after (P2) application of depolarizing prepulses of variable voltages and durations both in control and DAMGO conditions. Representative examples are shown for  $Ca_v2.2/\beta_3$  channels with a 500 ms test pulse at 10 mV and a prepulse at 70 mV of variable duration (Fig. 1B). Notably, a significant extent of current inactivation is produced by application of 70 mV prepulses (see current amplitude decline in control conditions). Under G protein inhibition, prepulse applications of increasing durations induce a current facilitation that progressively declines with longer depolarizing prepulses. Since depolarizing prepulses induce both current

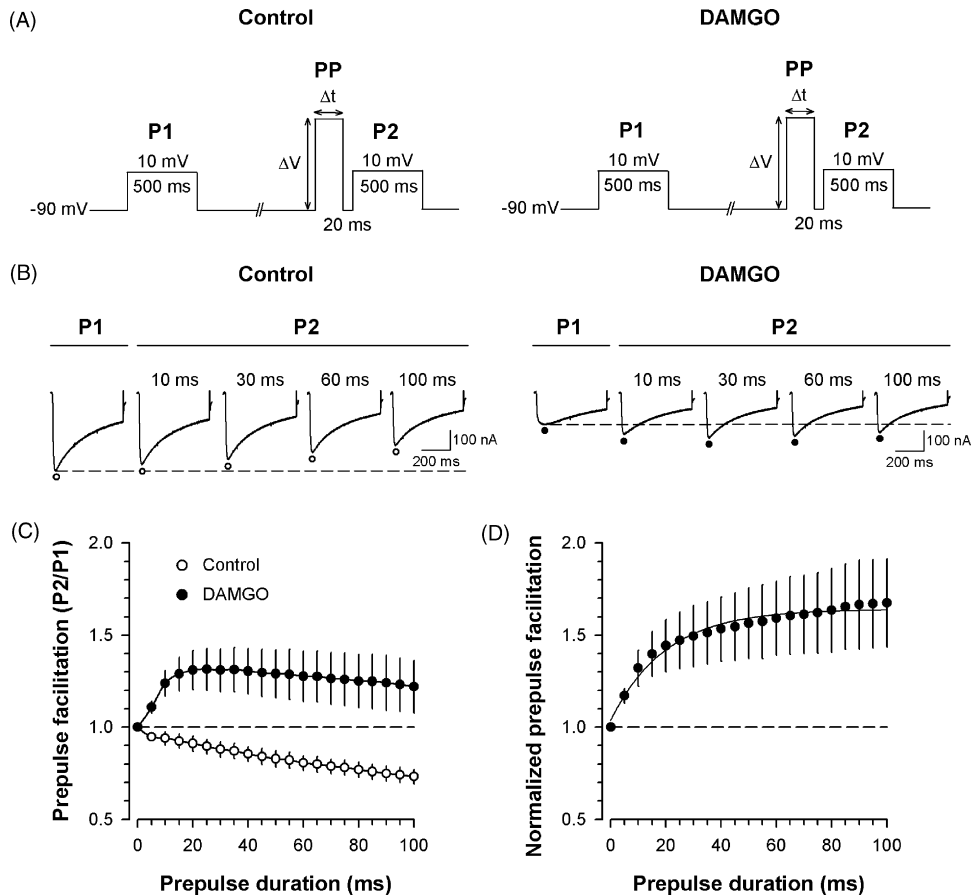


Fig. 1. Analysis of G protein regulation by the prepulse method. (A) Experimental protocol to measure prepulse-induced facilitation of  $Ca_v2.2/\beta_3$  currents as a function of prepulse duration and voltage for control and DAMGO-inhibited currents. P1, pulse without prepulse PP, and P2, pulse following a PP application. (B) Representative current traces for control and DAMGO conditions elicited by 500 ms P1 at 10 mV and 500 ms P2 at 10 mV following PP at 70 mV of variable durations. (C) P2/P1 peak current amplitude ratio for control (open circles,  $n=7$ ) and DAMGO (filled circles,  $n=7$ ) conditions. (D) Normalized prepulse facilitation  $(P2/P1_{DAMGO})/(P2/P1_{control})$  to eliminate prepulse-induced inactivation component. Results were fitted by a single exponential rise to maximum yielding an average time constant  $\tau = 19.6 \pm 2.6$  ms and a maximal facilitation of  $1.6 \pm 0.2$ -fold.

facilitation and channel inactivation, P2 currents are affected by a gain of current due to G protein dissociation from the channel and a loss of current resulting from channel inactivation. For short prepulses, the gain of current is predominant, whereas the tendency is inverted by increasing prepulse duration, at time points where G protein dissociation saturates but channel inactivation increases. The control condition contains only the prepulse-induced inactivation component, whereas the DAMGO condition contains both the facilitation component and the inactivation component. The average behaviour of normalized peak currents (P2/P1) are plotted as a function of prepulse duration for both control and DAMGO conditions for a prepulse potential of 70 mV (Fig. 1C). The inactivation component is evident in control condition, whereas it appears more lately in the DAMGO condition. In order to isolate the net facilitation component in the DAMGO condition, the evolution of P2/P1 in DAMGO condition is normalized with regard to the evolution of P2/P1 in control condition. The result of this procedure is shown in Fig. 1D. Fitting the results by a single exponential rise to max provides the following parameters: the time constant of G protein dissociation ( $\tau = 19.6 \pm 2.6$  ms at 70 mV,  $n=7$ ) as well as the extent of facilitation ( $1.6 \pm 0.2$ -fold,  $n=7$ ). Extract-

ing G protein dissociation parameters with the prepulse method implies that control and G protein-inhibited channels inactivate similarly (same rate and same extent of inactivation). If this condition is not fulfilled, then the last normalization procedure is flawed by approximation.

### 3.2. Activated G proteins modify the inactivation behaviour of $Ca_v2.2/\beta_3$ channels

Examining whether G proteins alter channel inactivation is particularly difficult because G protein-inhibited channels do not carry currents and hence the inactivation of non-conducting channels is difficult to follow. Examining this matter thus requires an indirect approach. In our conditions, at a test potential of 20 mV, application of 10  $\mu$ M DAMGO induces different characteristic effects of direct G protein inhibition as shown in the representative current traces (Fig. 2A(a)). The maximal G protein inhibition of  $Ca_v2.2/\beta_3$  currents by DAMGO is  $61.4 \pm 2.3\%$  (measure at peak currents,  $n=7$ ) (Fig. 2A(b)). Two other hallmarks of G protein regulation are a slowing of activation kinetics reflected by a shift in the time to peak of the current ( $39.8 \pm 4.6$  ms,  $n=7$ ) (Fig. 2A(c)) and the slowing of

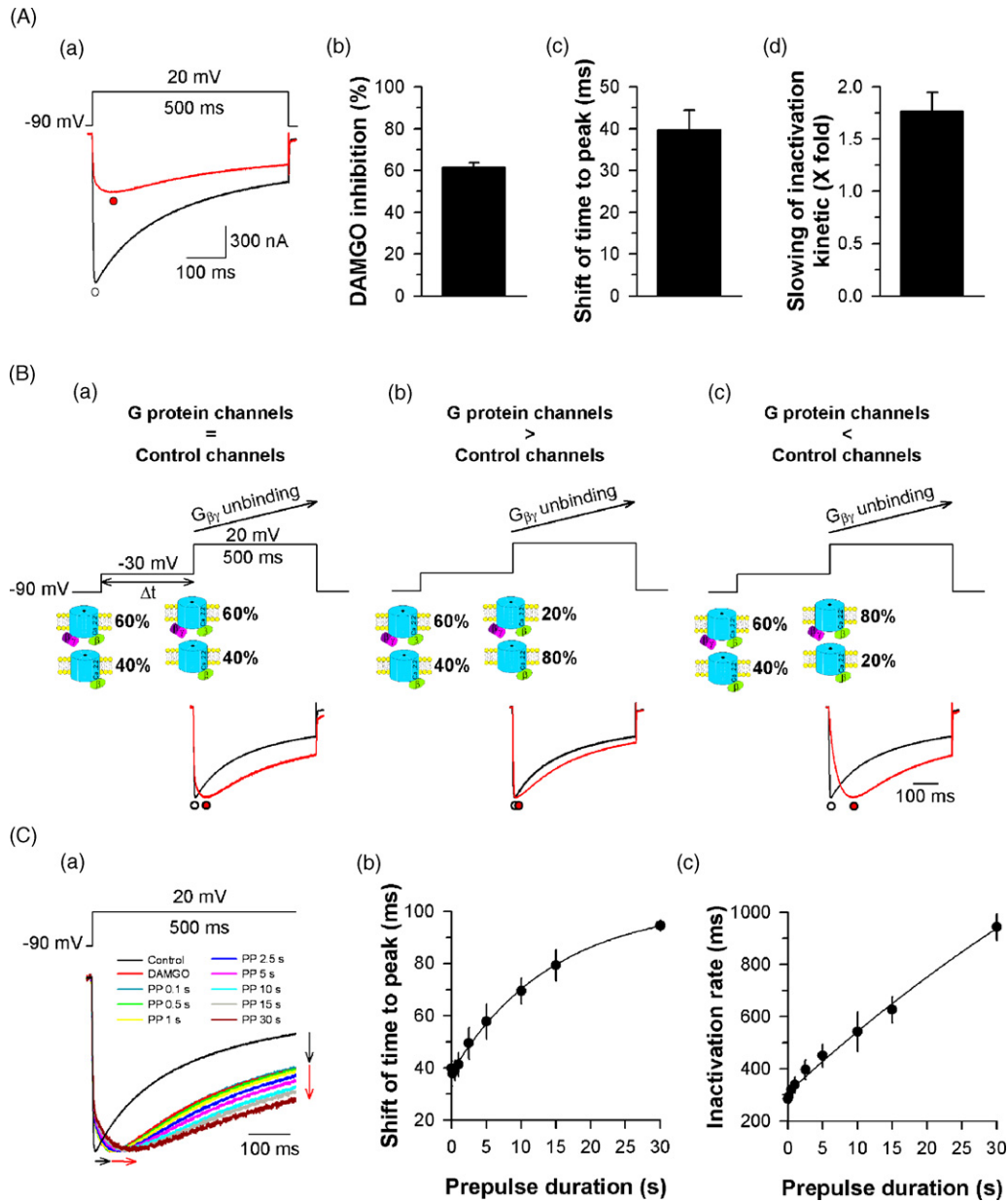


Fig. 2. Experimental evidence that G proteins alter the inactivation time course of  $Ca_v2.2/\beta_3$  channels. (A): (a) Representative current traces obtained at 20 mV for control (black trace) and DAMGO (red trace) conditions. Symbols under traces indicate the peaks of the currents. (b) Average DAMGO inhibition at peak currents ( $n=7$ ). (c) Average shift of the current time to peak induced by DAMGO application ( $n=7$ ). (d) DAMGO-induced slowing factor of inactivation kinetics when fitted by a single exponential decay ( $n=7$ ). (B) Simulated evolution of channel population fraction (ratio between control channels and G protein-inhibited channels that are not yet inactivated) as a function of time of an inactivating prepulse at  $-30$  mV and resulting consequences on DAMGO-inhibited current kinetics. (a) First case scenario where both channel populations inactivate with the same rate. The ratio of channel populations able to undergo activation before and during the inactivating prepulse remains constant. The kinetics of DAMGO-inhibited current remains unchanged at any given time  $t$  of the inactivating prepulse. (b) Second case scenario where G protein inhibited channels inactivate faster than control channels. The ratio between these two channel populations becomes progressively in favour of control channels. The resulting DAMGO-inhibited current kinetics gets faster. (c) Third case scenario where G protein inhibited channels inactivate slower than control channels. The ratio between these two channel populations becomes progressively in favour of G protein-inhibited channels. The resulting DAMGO-inhibited current kinetics becomes slower. The traces shown are from a representative experimental control traces, whereas the DAMGO-inhibited currents were simulated by the following equation  $I_{DAMGO} = [I_{Control} \times (100 - GI)/100] + [I_{Control} \times (GI/100) \times (1 - \exp(-(1/\tau) \times t)) \times (RI/100)]$  (Weiss et al., 2006) where GI is the percentage of G protein inhibition at the peak of the current,  $\tau$  the time constant of recovery from G protein inhibition at 20 mV ( $\tau = 52$  ms in this example), and RI the percentage of relief from G protein inhibition at 20 mV (RI = 42% in this example). Only GI values were varied (60% in (a) 20% in (b) and 80% in (c)). (C): (a) Representative current traces elicited at 20 mV for control condition (black trace with fast kinetics) and DAMGO condition without (red trace) or following an inactivating prepulse at  $-30$  mV of variable duration (coloured traces). The current traces were normalized at their peak amplitude. Note the slowing of activation and inactivation kinetics induced by DAMGO (black arrow) and then by the inactivating prepulse (red arrow). (b) Average shift of the current time to peak of DAMGO-inhibited currents as a function of the  $-30$  mV inactivating prepulse duration ( $n=7$ ). (c) Evolution of the time constant of current inactivation for DAMGO-inhibited currents as a function of the  $-30$  mV inactivating prepulse duration ( $n=7$ ).

inactivation kinetics ( $1.8 \pm 0.2$  fold,  $n=7$ ) (Fig. 2A(d)). Alterations in current kinetics are due to a population of channels that progressively recover from G protein inhibition (Elmslie and Jones, 1994). This recovery is linked to channel opening following membrane depolarization (Patil et al., 1996). Hence, the shape of the current is representative of a defined proportion of channel populations, a group of control channels (with unmodified activation and inactivation kinetics) and a group of G protein-inhibited channels that undergo recovery from inhibition and contributes to the slowing of current kinetics. Modifying the proportion of these two channel populations should result in a modification of the shape of this current. Faster kinetics would suggest a greater proportion of control channels, and slower kinetics would imply a greater proportion of G protein-inhibited channels. If G proteins alter the kinetics of channel inactivation, then one would expect that an inactivating conditioning pulse of variable duration should alter the proportion of channel populations during the time course of this conditioning pulse, and, therefore, the shape of the current under DAMGO (as shown in the protocol of Fig. 2B). There are three possibilities:

1. G protein-inhibited channels inactivate at the same rate as control channels: the ratio between the two populations of channels remains constant during this conditioning pulse and the shape of the current induced by the test pulse at 20 mV remains unaltered (Fig. 2B(a)).
2. G protein-inhibited channels inactivate faster than control channels: the ratio progressively becomes in favour of control channels, and the kinetics of the test pulse current is accelerated to converge towards control current (Fig. 2B(b)).
3. G protein-inhibited channels inactivate slower than control channels: the ratio becomes in favour of G protein-inhibited channels, and the kinetics of the test pulse current is further slowed (Fig. 2B(c)).

Fig. 2C(a) illustrates representative current traces obtained at a test pulse of 20 mV following an inactivating conditioning pulse at  $-30$  mV. This conditioning pulse was chosen because it produces maximal inactivation without any activation (activation threshold is at  $-10$  mV for  $Ca_v2.2/\beta_3$  channels). Varying the duration of this inactivating pulse, to alter the amount of inactivation of both channel populations, results in a slowing of activation and inactivation kinetics of DAMGO regulated currents. Activation and inactivation parameters were quantified by measuring, respectively, the time to peak of the currents (Fig. 2C(b)) and the rate of inactivation (Fig. 2C(c)) as a function of inactivating pulse duration. These data indicate that G protein-inhibited channels inactivate slower than control channels and thus invalidate the intrinsic postulate of the prepulse method. However, we can't exclude the unexplored possibility that if channels inactivate preferentially from a partially-activated closed state, which may occur at  $-30$  mV, the action of G protein to favour a deeper closed-state could slow inactivation in spite of equal inactivation kinetics for both G protein bound and unbound channels.

To further illustrate the effect of G proteins on inactivation, the amplitude of control and DAMGO-inhibited currents were also followed for prepulses of various durations (Fig. 3).

Fig. 3A illustrates a representative example of the evolution of current amplitudes over prepulse duration. As indicated, the control currents decrease much faster than DAMGO-inhibited currents and an interesting convergence in current amplitude is observed by increasing the prepulse duration at  $-30$  mV. A quantification of this phenomenon indicates a far greater propensity of control currents to inactivate, whereas DAMGO-inhibited currents inactivate only mildly (Fig. 3B). For a prepulse duration of 30 s, control currents inactivate by a factor of 6.25-fold from  $4.25 \pm 1.25 \mu\text{A}/\mu\text{F}$  to  $0.68 \pm 0.30 \mu\text{A}/\mu\text{F}$  (84% of inactivation). In contrast, for the same duration of inactivation, DAMGO-inhibited currents inactivate by a factor of 2.78-fold from  $1.64 \pm 0.52$  to  $0.59 \pm 0.23 \mu\text{A}/\mu\text{F}$  (64% of inactivation). The kinetics of inactivation was quantified for both control and DAMGO-inhibited currents (Fig. 3C). As shown, DAMGO-inhibited currents inactivate far slower than control currents. Data were fitted by a monoexponential decrease with time constants of  $\tau=2.5$  s (control currents) and  $\tau=11.4$  s (DAMGO-inhibited currents). Of note, the kinetics of DAMGO-inhibited currents reflects the net kinetics of inactivation of a mixed population of channels (at least control and G protein bound channels) and it is expected that the kinetics of inactivation of G protein bound channels is still slower than that of DAMGO-inhibited currents. Taken together, these data indicate that G protein-inhibited channels inactivate far slower than control channels.

At this stage, it is worth mentioning the possibility that a prepulse application to  $-30$  mV could promote an intermediate closed state of the channel with greater affinity for  $G\beta\gamma$  complexes, thereby enhancing the proportion of G protein bound channels available for channel opening. However nothing in the literature suggests that such a channel state may exist. On the contrary, it has been proposed that gating charge movements at potentials unable to produce channel openings may destabilize G proteins from the channels, an event that would increase the proportion of control channels and thus rather produce the opposite result (case scenario of Fig. 2B(b)).

Since our data indicate differences in inactivation kinetics between control and G protein-inhibited channels, we developed an alternative method to study direct G protein regulation at the quantitative level.

### 3.3. Introduction of a novel method to study G protein regulation of $Ca_v2.2/\beta_3$ channels

We present a step-by-step illustration of the method we developed using a representative example of a  $Ca_v2.2/\beta_3$  current inhibited by DAMGO application (Fig. 4). Control ( $I_{\text{Control}}$ ) and DAMGO-inhibited ( $I_{\text{DAMGO}}$ ) currents, recorded before and after G protein activation, respectively, were elicited by a test pulse at 10 mV as shown in Fig. 4A. Subtracting  $I_{\text{DAMGO}}$  from  $I_{\text{Control}}$  provides  $I_{\text{Lost}}$ , the lost current following G protein activation (Fig. 4B, red trace). The time course of  $I_{\text{Lost}}$  is affected by both the recovery from G protein inhibition following channel activation (conversion of G protein inhibited channels towards control channels) and by the inactivation process. We cannot exclude that the time course of  $I_{\text{Lost}}$  is also affected by a



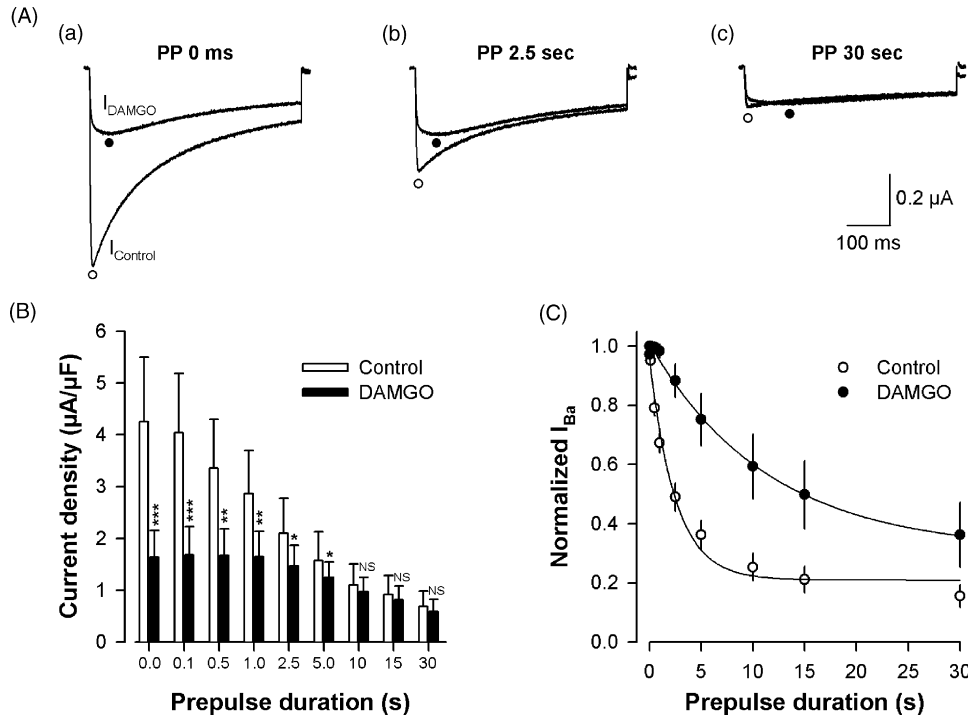


Fig. 3. G protein-inhibited  $Ca_v2.2/\beta_3$  channels inactivate slower than control channels. (A) Representative traces of control and DAMGO-inhibited currents before (a) and after 2.5 s (b) and 30 s (c) application of an inactivating prepulse at  $-30$  mV. The circles indicate the time to peak of the currents. (B) Evolution of average current densities for control (black bars,  $n = 7$ ) and DAMGO (open bars,  $n = 7$ ) conditions as a function of inactivating prepulse duration at  $-30$  mV. Currents measured at peak amplitudes. Statistical paired  $t$ -test with NS (non-significant),  $*p \leq 0.05$ ,  $**p \leq 0.01$ , and  $***p \leq 0.001$ . (C) Average normalized current amplitudes for control (black circles,  $n = 7$ ) and DAMGO (open circles,  $n = 7$ ) conditions as a function of inactivating prepulse duration at  $-30$  mV. Data were fitted with monoexponential equations.

third component, i.e. ion-conducting openings of presumably G protein-bound channels. In this study, the method we develop is based on the assumption that the channels do not undergo reluctant openings or that kinetic alterations introduced by these reluctant openings only mildly affect the data at the quantitative level, two assumptions that are difficult to test directly. At the start of the depolarization ( $t = 0$  ms), there has been no recovery from G protein inhibition, no opening from G protein bound channels and inactivation has not taken place. Therefore, to estimate the maximal G protein inhibition,  $I_{Control}$  and  $I_{Lost}$  traces were extrapolated to  $t = 0$  ms. These current traces were best fitted with a single and a double exponential, respectively (Fig. 4C, fits in red). A first parameter of G protein regulation is extracted and termed  $GI_{t0}$  for G protein-induced current inhibition at the start of the depolarization ( $GI_{t0} = I_{Lost0}/I_{Control0} \times 100$  when expressed as a percentage). Applying this percentage of G protein inhibition to  $I_{Control}$  results in  $I_{DAMGO}$  without unbinding, the theoretical current that would result from DAMGO inhibition if G protein dissociation did not occur at all (Fig. 4D, red trace). Subtracting  $I_{DAMGO}$  without unbinding from  $I_{DAMGO}$  provides  $I_{G\text{-protein unbinding with inactivation}}$ . This current reflects both the gain of current due to G protein dissociation from the inhibited channels and inactivation of the gained current (Fig. 4E, red trace). The kinetics of the gain in current and inactivation are both apparent since the gain of current is affected by inactivation, whereas inactivation is altered by the gain in current. Since the gained current results from

the conversion of G protein inhibited channels towards control channels, the real inactivation kinetics should be similar than control channels. In order to extract the net G protein dissociation component,  $I_{G\text{-protein unbinding with inactivation}}$  is divided by a normalized curve that depicts the inactivation of control channels (control inactivation, dashed line, obtained by fitting  $I_{Control}$  by a single exponential) (Fig. 4F). The resulting current  $I_{G\text{-protein unbinding}}$  is shown in red and reflects the net kinetics of G protein dissociation from the channel. As expected if  $I_{G\text{-protein unbinding with inactivation}}$  and  $I_{Control}$  inactivate at the same rate,  $I_{G\text{-protein unbinding}}$  reaches a stable plateau value, something that would not be observed if the real inactivation kinetics of these two currents were different. Fitting this trace by a decreasing single exponential provides the time constant  $\tau$  of G protein dissociation (Fig. 4G, fit in red). This time constant represents the second critical parameter of G protein regulation of voltage-dependent calcium channel. This trace illustrates that the maximal G protein dissociation occurs well before the end of the 500 ms test pulse at 10 mV. Finally, to get an estimate of the total fraction of G protein inhibited channels that recover from inhibition during the test pulse, we measured the percentage of current that had recovered from inhibition (RI) such that:  $RI = 100 \times (I_{DAMGO} - I_{DAMGO \text{ without unbinding}}) / (I_{Control} - I_{DAMGO \text{ without unbinding}})$  at  $t = 500$  ms after the start of the depolarization, a time point where maximal recovery has occurred (Fig. 4H). RI represents the third important parameter that describes the calcium channel regulation by G proteins.

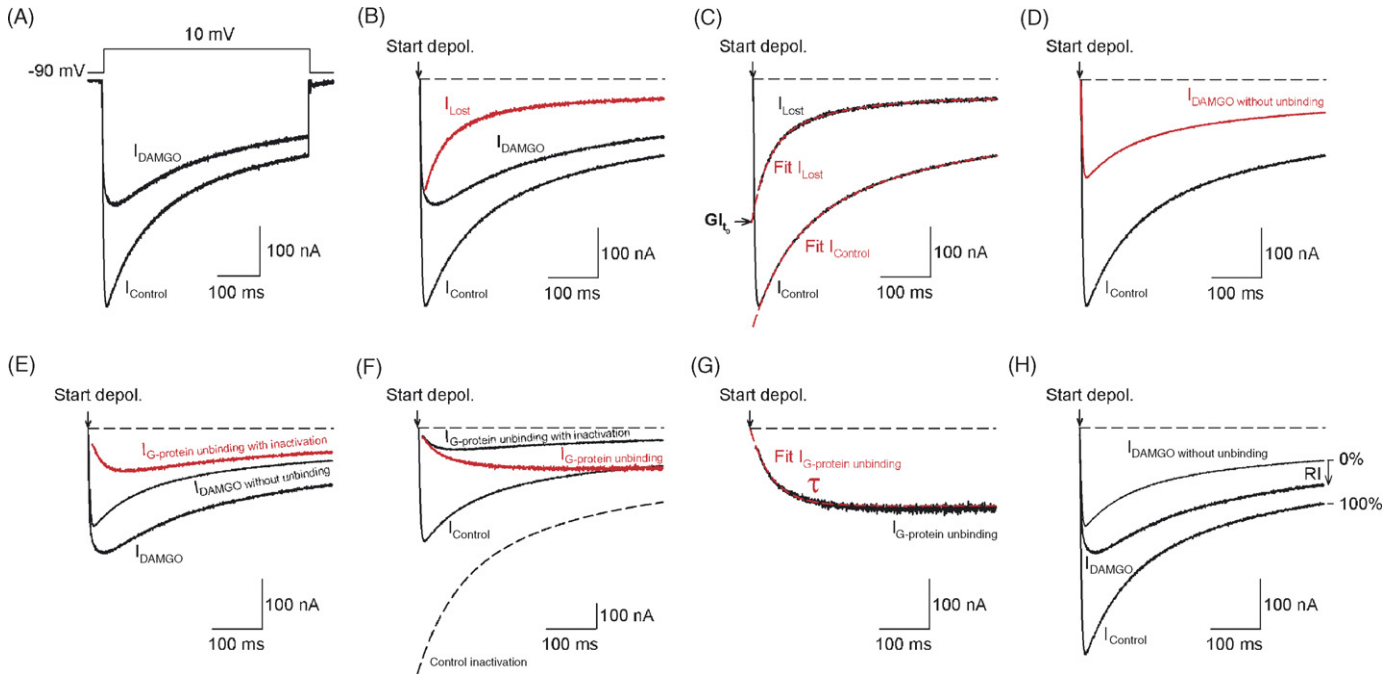


Fig. 4. Illustration of an alternative method for the analysis of  $\text{Ca}_v2.2/\beta_3$  channel regulation by G proteins. (A) Representative current traces elicited at 10 mV for control ( $I_{\text{Control}}$ ) and DAMGO ( $I_{\text{DAMGO}}$ ) conditions. (B) Lost current ( $I_{\text{Lost}}$ , red trace) under G proteins activation obtained by subtracting  $I_{\text{DAMGO}}$  from  $I_{\text{Control}}$ . The dashed line represents the zero current level and the arrow the start of the depolarization. (C)  $I_{\text{Control}}$  and  $I_{\text{Lost}}$  were extrapolated to  $t=0$  ms (start of the depolarization) by fitting traces (red dashed lines) with a single and double exponential respectively in order to determine the maximal extent of G protein inhibition ( $\text{GI}_{t0}$ ). (D) Estimate of the fraction of control currents that is present in  $I_{\text{DAMGO}}$  ( $I_{\text{DAMGO}}$  without unbinding, red trace) and that is due to a population of control channels. It is obtained by the following equation:  $I_{\text{Control}} \times (1 - \text{GI}_{t0})$ . (E) The fraction of  $I_{\text{DAMGO}}$  current that recovers from G protein inhibition (G protein inhibited channel population) is shown in red ( $I_{\text{G-protein unbinding with inactivation}}$ ) obtained by subtracting  $I_{\text{DAMGO}}$  without unbinding from  $I_{\text{DAMGO}}$ . (F) The kinetics of G protein dissociation ( $I_{\text{G-protein unbinding}}$ , red trace) from G protein inhibited channels is obtained by dividing  $I_{\text{G-protein unbinding with inactivation}}$  by the normalized control inactivation component (dashed line obtain by fitting  $I_{\text{Control}}$  with a single exponential). (G) Fit of  $I_{\text{G-protein unbinding}}$ , dashed red line) by a single exponential decrease provides the time constant  $\tau$  of G protein dissociation from the channel. (H) Measure of the percentage of recovery from G protein inhibition (RI) at the end of 500 ms pulse at 10 mV by  $\text{RI} = (I_{\text{DAMGO}} - I_{\text{DAMGO without unbinding}}) / (I_{\text{Control}} - I_{\text{DAMGO without unbinding}}) \times 100$ .

### 3.4. Application of the method to a larger interval of potentials

We first described  $\text{GI}_{t0}$  as a function of test potential (Fig. 5). Representative control and DAMGO-inhibited currents were shown for several test potentials (−10, 10 and 30 mV) (Fig. 5A(a)).  $I_{\text{Control}}$  and corresponding  $I_{\text{Lost}}$  are shown in Fig. 5Ab along with the fits extrapolated to  $t=0$  ms (in red). The inhibition by G proteins was then represented as a function of test potential by either measuring peak current inhibition  $\text{GI}_{\text{Peak}}$  (Fig. 5B) or representing  $\text{GI}_{t0}$  (Fig. 5C).  $\text{GI}_{t0}$  remained statistically constant at all voltages since it reflects the G protein inhibition obtained at −90 mV, the holding potential, before any dissociation can take place. On average, for  $\text{Ca}_v2.2/\beta_3$  channels,  $\text{GI}_{t0}$  ranges between  $63.2 \pm 6.6\%$  ( $n=10$ , at 0 mV) to  $58.8 \pm 6.0\%$  ( $n=10$ , at 20 mV), a variation that is not statistically significant ( $p=0.254$ ), contrary to  $\text{GI}_{\text{Peak}}$  that varies from  $57.1 \pm 7.2\%$  ( $n=10$ , at 0 mV) to  $22.5 \pm 6.4\%$  ( $n=10$ , at 40 mV), which is statistically different ( $p \leq 0.001$ ). Thus, when G protein inhibition is measured at the peak of the current ( $\text{GI}_{\text{Peak}}$ ), the real inhibition can be largely underestimated. This was particularly the case at high voltages because of faster G protein dissociation (Fig. 6). Therefore,  $\text{GI}_{t0}$  better reflects the real extent of G protein inhibition. Nevertheless, even  $\text{GI}_{t0}$  may not be com-

pletely accurate since it relies on an extrapolation to time zero based on a fitting procedure that misses the first 5–10 ms of the trace.

Next, we quantified the G protein dissociation parameters,  $\tau$  and RI, as a function of test potential (Fig. 6). Control and DAMGO-inhibited traces are shown in Fig. 6A(a) at different test potentials (−10, 10 and 30 mV). The corresponding  $I_{\text{G-protein unbinding}}$  traces (Fig. 6A(b)) and traces for RI measurements (Fig. 6A(c)) are shown according to the method detailed in Fig. 4. The time constants of G protein dissociation were plotted as a function of test potential (Fig. 6B, circle symbols). Fitting the values by a sigmoid curve indicates that the slowest time constant of dissociation is  $73.3 \pm 12.0$  ms for the lowest potentials, whereas the fastest time constant is  $9.4 \pm 2.1$  ms for the highest potentials with a half-maximal decrease in time constant of  $8.6 \pm 1.8$  mV ( $n=10$ ). For comparison, we also plotted what the time constants of G protein dissociation would be using the prepulse method as described in Fig. 1 (Fig. 6B, triangle symbols). Differences were striking at the lowest voltages, whereas a slight convergence was observed at the highest potential values. For instance, at 0 and 10 mV, a difference of 4.0-fold was observed in the time constants of G protein dissociation between the two methods. At 40 mV, a 3.3-fold difference was still obvious suggesting that the prepulse method may underestimate the

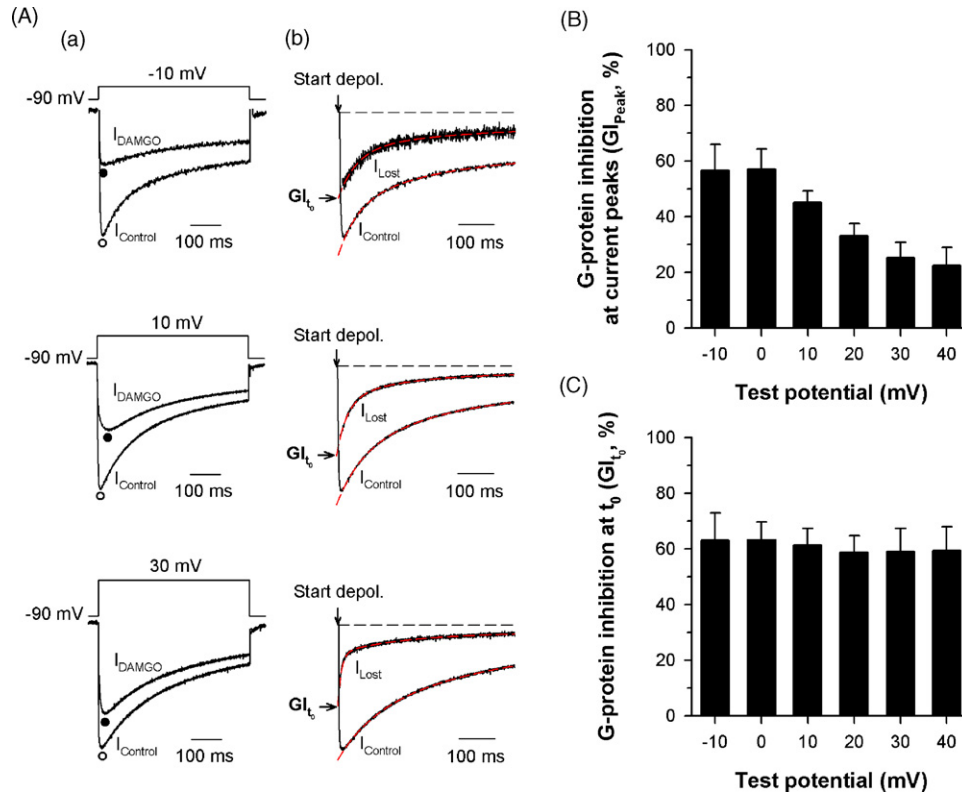


Fig. 5. Evolution of the extent of G protein inhibition as a function of test potential. (A): (a) Representative  $Ca_v2.2/\beta_3$  current traces for control and DAMGO conditions elicited at  $-10$ ,  $10$  and  $30$  mV. Symbols under traces represent the peak of the currents. (b) Corresponding  $I_{Lost}$  traces fitted with a double exponential (dashed red trace) allowing  $GI_{t_0}$  measurements. Black dashed line represents the zero current level and the arrow points to the start of the depolarization ( $t=0$  ms). (B) Evolution of G protein inhibition extent as a function of test potential when measured at the peak of the currents ( $GI_{Peak}$ ) ( $n=10$ ). (C) Evolution of G protein inhibition extent at the start of the depolarisation ( $GI_{t_0}$ ) as a function of test potential ( $n=10$ ).

speediness of G protein dissociation. Finally, RI values were represented as a function of test potential (Fig. 6C). Fitting these values with a single exponential rise to maximum provides a maximal extent of dissociation of G proteins of  $61.6 \pm 3.4\%$  ( $n=10$ ).

#### 4. Discussion

Classically, the study of direct G protein regulation is performed using prepulse applications. The technique, though widely recognized and easy to apply, makes the postulate that control and G protein inhibited channels inactivate with the same rate. However, there are no data in the literature that tend to prove or disprove this assumption. This lack of information on the rate of inactivation of G protein inhibited channels is due to technical difficulties. Here, we provide evidence that a conditioning pulse at  $-30$  mV slows down the kinetics of G protein modulated currents. The first straightforward explanation would be that G proteins slow-down inactivation kinetics of G protein-bound channels. However, two alternative explanations can be put forward: (1) the conditioning pulse at  $-30$  mV may favour a state of the channel that increases its affinity for activated G proteins, thereby increasing the proportion of G protein-regulated channels. However, this explanation would be contradictory with reports mentioning that pre-activated states of the channel favour

G protein dissociation. (2) G proteins may favour a deeper closed state of the channel at  $-30$  mV, rendering activation and inactivation slower, although there is no experimental evidence for such a mechanism. Assuming that G protein-bound channels indeed inactivate slower than control channels at  $-30$  mV, it would be interesting to study how these G protein-bound channels behave at higher membrane potentials where the interesting information lie with regard to G protein regulation. This is unfortunately difficult to test experimentally since G proteins dissociate upon channel opening. A slowing of channel inactivation by G proteins enters into a scientific logic that has already been observed on other occasions. The membrane-anchored calcium channel palmytoylated  $\beta_{2a}$  subunit is known to slow-down inactivation kinetics by the intermediate of the I-II loop (Restituito et al., 2000) which is a sensitive locus for the control of channel inactivation (Stotz et al., 2004). G proteins are known to bind to the cytoplasmic I-II loop of calcium channels as well (De Waard et al., 1997; Herlitze et al., 1997; Zamponi et al., 1997) and, depending of the  $G\gamma$  subunit isoform, many G proteins are also membrane linked by farnesyl or geranylgeranyl lipid moieties (Jones et al., 2004). The contribution of the I-II loop in G protein-induced current inhibition has been contested (De Waard et al., 2005; Zhang et al., 1996). However, it should be observed here that, if the I-II loop contributes in fact to a G protein mediated slowing of inactivation kinetics for G protein-

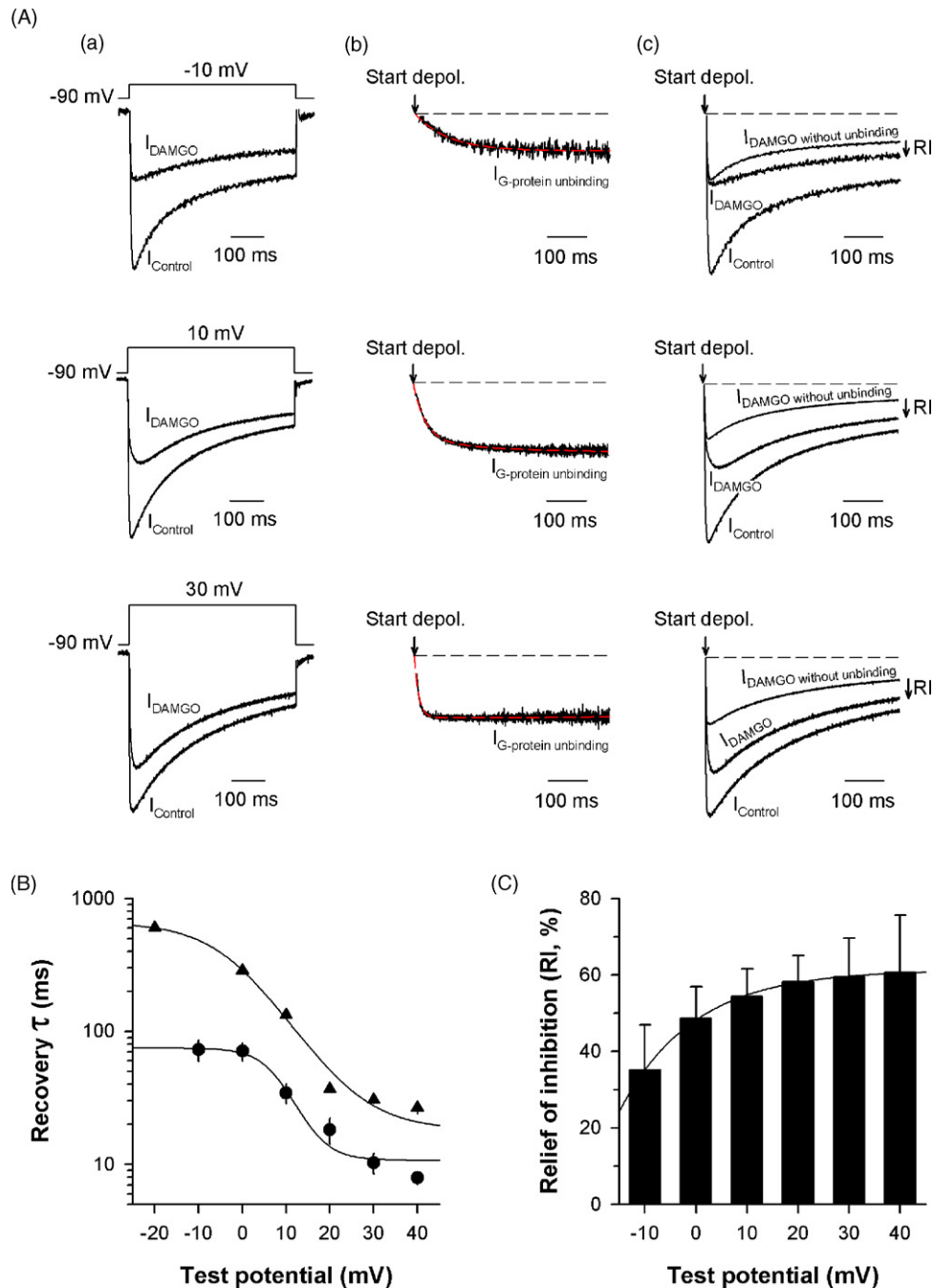


Fig. 6. Evolution of G protein dissociation parameters as a function of test potential. (A): (a) Representative  $Ca_v2.2/\beta_3$  current traces for control and DAMGO conditions elicited at  $-10$ ,  $10$  and  $30$  mV. (b) Corresponding  $I_{G\text{-protein unbinding}}$  traces fitted by a single exponential decrease (red dashed line). (c) Corresponding current traces required to measure RI value as described in Fig. 4H. Black dashed line represents the zero current level and the arrow points to the start of the depolarization ( $t=0$  ms). (B) Logarithmic representation of time constants  $\tau$  of G protein dissociation as a function of test potential obtained by the classical prepulse method (triangle symbol) or by fitting  $I_{G\text{-protein unbinding}}$  (Ab) with a single exponential decrease (circle symbol). Values were fitted by a sigmoid curve yielding a half-maximal increase in the time constant at  $-2.4 \pm 1.0$  mV ( $n=22$ ) for the prepulse method and  $8.6 \pm 1.8$  mV ( $n=10$ ) mV for this novel method. (C) Extent of G protein dissociation (RI) as a function of test potential. Values were fitted by a single exponential rise providing the maximum extent of recovery of  $61.6 \pm 3.4\%$  ( $n=10$ ).

bound channels, then this effect would have remained largely unnoticed.

In this context of uncertainties regarding the contribution of G protein to inactivation kinetics, we have developed an alternative descriptive method for the analysis of regulation of voltage-dependent calcium channel by G proteins. This method

does not require that G protein-inhibited channels inactivate with the same rate than control channels. However, like any other method, it is not model-independent and does not necessarily provide accurate parameters for all conceivable mechanisms of coupling between activation and inactivation. The method described herein is not based on the use of prepulse potentials

that are often applied along with an interpulse potential, thereby providing an incentive for G protein rebinding onto the channel. It simply requires current traces before and after G proteins activation, simplifying the electrophysiological protocol. A limitation of the method however is that it is limited to a range of potentials where currents can be measured flowing through the channel. The method gives access to three major parameters of G protein regulation:  $GI_{t0}$ , the initial extent of G protein inhibition that reflects the “ON” effect of regulation, and,  $\tau$ , the time constant of G protein dissociation from the channel, and RI, the percentage of recovery from inhibition, that both characterize the “OFF” effects of the regulation. Several predictions were met when applying this method. First,  $GI_{t0}$  remains constant with increasing test potentials, an observation not made when measuring peak currents. Second, the rate of G protein dissociation speeds up with increasing depolarization values within an interval of potentials known to increase the opening probability. Third, the extent of dissociation increases with test potential values. The observation we made with this novel method are of course qualitatively similar to what can be observed with the prepulse method. However, we note some quantitative differences that may have important consequences. One such consequence is that when a pulse is applied at 10 mV, a significant fraction of the G proteins have already dissociated from the channels at the peak of the current. Indeed, with a time constant of about 30 ms at 10 mV, two thirds of the G proteins that have the capability to dissociate have already done so by that time. DAMGO-inhibited currents had a peak well beyond these first 30 ms at 10 mV (Fig. 2), indicating the extent of the under-evaluation of G protein parameters. In these conditions, a prepulse application would not provide the desired results and the extent of facilitation could well be under-evaluated or even remain unnoticed. This is obvious from the data presented in Fig. 5B and C where G protein inhibition values are largely under-estimated when measuring at the peak ( $GI_{Peak}$ ) of the G protein-inhibited currents.

In summary, we present a novel method for analysing G protein regulation of voltage-dependent calcium channels. This method provides similar qualitative information compared to the prepulse method. It may therefore be used as an interesting alternative for an estimate of quantitative parameters of G protein regulation. The method has been developed here on expressed channels in *Xenopus* oocytes, and further investigations will be required to confirm its validity on native channels from mammalian cells.

## Acknowledgements

We acknowledge financial support from Inserm and the French Ministry of Research and Technology. The clone coding for rat  $\mu$ -opioid receptor was kindly provided by Dr. Pierre Charnet (CNRS, Montpellier, France).

## References

- Bean BP. Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage dependence. *Nature* 1989;340:153–6.
- Boland LM, Bean BP. Modulation of N-type calcium channels in bullfrog sympathetic neurons by luteinizing hormone-releasing hormone: kinetics and voltage dependence. *J Neurosci* 1993;13:516–33.
- Bourinet E, Soong TW, Stea A, Snutch TP. Determinants of the G protein-dependent opioid modulation of neuronal calcium channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:1486–91.
- Carabelli V, Lovallo M, Magnelli V, Zucker H, Carbone E. Voltage-dependent modulation of single N-Type  $Ca^{2+}$  channel kinetics by receptor agonists in IMR32 cells. *Biophys J* 1996;70:2144–54.
- Colecraft HM, Patil PG, Yue DT. Differential occurrence of reluctant openings in G-protein-inhibited N- and P/Q-type calcium channels. *J Gen Physiol* 2000;115:175–92.
- De Waard M, Hering J, Weiss N, Feltz A. How do G proteins directly control neuronal  $Ca^{2+}$  channel function? *Trends Pharmacol Sci* 2005;26:427–36.
- De Waard M, Liu H, Walker D, Scott VE, Gurnett CA, Campbell KP. Direct binding of G-protein betagamma complex to voltage-dependent calcium channels. *Nature* 1997;385:446–50.
- Dunlap K, Fischbach GD. Neurotransmitters decrease the calcium conductance activated by depolarization of embryonic chick sensory neurones. *J Physiol* 1981;317:519–35.
- Elmslie KS, Jones SW. Concentration dependence of neurotransmitter effects on calcium current kinetics in frog sympathetic neurones. *J Physiol* 1994;481(Pt 1):35–46.
- Eppig JJ, Dumont JN. Defined nutrient medium for the in vitro maintenance of *Xenopus laevis* oocytes. *In Vitro* 1976;12:418–27.
- Herlitze S, Hockerman GH, Scheuer T, Catterall WA. Molecular determinants of inactivation and G protein modulation in the intracellular loop connecting domains I and II of the calcium channel  $\alpha 1A$  subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:1512–6.
- Ikeda SR. Double-pulse calcium channel current facilitation in adult rat sympathetic neurones. *J Physiol* 1991;439:181–214.
- Jones MB, Siderovski DP, Hooks SB. The  $G\beta\gamma$  dimer as a novel source of selectivity in G-protein signaling: GGL-ing at convention. *Mol Interv* 2004;4:200–14.
- Jones SW, Elmslie KS. Transmitter modulation of neuronal calcium channels. *J Membr Biol* 1997;155:1–10.
- Lee HK, Elmslie KS. Reluctant gating of single N-type calcium channels during neurotransmitter-induced inhibition in bullfrog sympathetic neurons. *J Neurosci* 2000;20:3115–28.
- Lipscombe D, Kongsamut S, Tsien RW. Alpha-adrenergic inhibition of sympathetic neurotransmitter release mediated by modulation of N-type calcium-channel gating. *Nature* 1989;340:639–42.
- Marchetti C, Carbone E, Lux HD. Effects of dopamine and noradrenaline on Ca channels of cultured sensory and sympathetic neurons of chick. *Pflügers Arch* 1986;406:104–11.
- Patil PG, de Leon M, Reed RR, Dubel S, Snutch TP, Yue DT. Elementary events underlying voltage-dependent G-protein inhibition of N-type calcium channels. *Biophys J* 1996;71:2509–21.
- Qu Z, Hartzell HC. Functional geometry of the permeation pathway of  $Ca^{2+}$ -activated  $Cl^{-}$  channels inferred from analysis of voltage-dependent block. *J Biol Chem* 2001;276:18423–9.
- Restituto S, Cens T, Barrere C, Geib S, Galas S, De Waard M, et al. The beta2a subunit is a molecular grom for the  $Ca^{2+}$  channel inactivation gate. *J Neurosci* 2000;20:9046–52.
- Roche JP, Anantharam V, Treistman SN. Abolition of G protein inhibition of alpha 1A and alpha 1B calcium channels by co-expression of the beta 3 subunit. *FEBS Lett* 1995;371:43–6.
- Roche JP, Treistman SN. The  $Ca^{2+}$  channel beta3 subunit differentially modulates G-protein sensitivity of alpha1A and alpha1B  $Ca^{2+}$  channels. *J Neurosci* 1998;18:878–86.
- Scott RH, Dolphin AC. Voltage-dependent modulation of rat sensory neurone calcium channel currents by G protein activation: effect of a dihydropyridine antagonist. *Br J Pharmacol* 1990;99:629–30.
- Stephens GJ, Brice NL, Berrow NS, Dolphin AC. Facilitation of rabbit alpha1B calcium channels: involvement of endogenous Gbetagamma subunits. *J Physiol* 1998;509(Pt 1):15–27.
- Stotz SC, Jarvis SE, Zamponi GW. Functional roles of cytoplasmic loops and pore lining transmembrane helices in the voltage-dependent

- inactivation of HVA calcium channels. *J Physiol* 2004;554:263–73.
- Weiss N, Arnoult C, Feltz A, De Waard M. Contribution of the kinetics of G protein dissociation to the characteristic modifications of N-type channel activity. *Neurosci Res* 2006; in press.
- Wu LG, Saggau P. Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. *Trends Neurosci* 1997;20:204–12.
- Zamponi GW, Bourinet E, Nelson D, Nargeot J, Snutch TP. Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel alpha1 subunit. *Nature* 1997;385:442–6.
- Zhang JF, Ellinor PT, Aldrich RW, Tsien RW. Multiple structural elements in voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels support their inhibition by G proteins. *Neuron* 1996;17:991–1003.

## C. Discussion

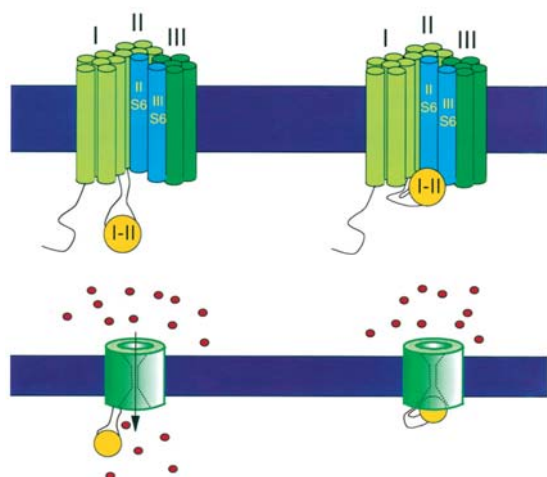
L'étude de la régulation directe des VGCCs par les protéines G hétérotrimériques est généralement réalisée par l'application de prépulses dépolarisants. Outre les différentes imprécisions que ce protocole peut générer, cette méthode d'analyse se base sur le postulat que la fixation du dimère  $G_{\beta\gamma}$  sur la sous-unité  $Ca_v2.2$  n'affecte pas les caractéristiques d'inactivation du canal. Or, pour l'heure, aucune évidence expérimentale ne permet de valider ce postulat. Au contraire, cette étude suggère que la fixation du dimère  $G_{\beta\gamma}$  sur la sous-unité  $Ca_v2.2$  serait à l'origine d'un ralentissement de la cinétique d'inactivation du canal. Cette caractéristique, mise en évidence de manière indirecte en raison du fait qu'un canal lié au dimère  $G_{\beta\gamma}$  est non conducteur, se présente comme un caractère nouveau de la régulation "ON". Aussi, nous avons développé une nouvelle méthode d'analyse de cette régulation, ne nécessitant pas l'utilisation de prépulse dépolarisant, et indépendante de la cinétique d'inactivation des canaux. Cette méthode est basée exclusivement sur l'analyse des courants ioniques enregistrés en condition contrôle et sous régulation G, et consiste à extraire la fraction de courant issu de la relaxation des canaux, au cours de la dépolarisation membranaire.

### 1. Rôle du dimère $G_{\beta\gamma}$ dans l'inactivation du canal

L'implication des protéines G hétérotrimériques dans l'inactivation du canal reste difficile à caractériser en raison du fait qu'un canal lié au dimère  $G_{\beta\gamma}$  est non conducteur. Aussi, nous avons utilisé une stratégie indirecte basée sur l'utilisation d'un prépulse inactivant appliqué à -30 mV. Ce potentiel n'induisant pas d'ouverture ionique, il est attendu que l'inactivation des canaux durant ce prépulse inactivant se produise en présence du dimère  $G_{\beta\gamma}$  sur la sous-unité  $Ca_v2.2$ . Ainsi, il apparaît que la fixation du dimère  $G_{\beta\gamma}$  sur la sous-unité  $Ca_v2.2$  induit un ralentissement drastique de la cinétique d'inactivation du canal à -30 mV. A noter toutefois que si le prépulse inactivant réalisé à -30 mV ne conduit pas à l'ouverture ionique du canal, il est cependant suffisant à générer les courants de *gating* (Patil *et al.*, 1996). Ainsi, il n'est pas à exclure que le mouvement du "*voltage-sensor paddle*" ne soit pas à l'origine d'une déstabilisation du dimère  $G_{\beta\gamma}$  de la sous-unité  $Ca_v$  durant ce prépulse inactivant. Cela contribuerait alors à diminuer l'effet du dimère  $G_{\beta\gamma}$  sur la cinétique d'inactivation du canal. Aussi, le ralentissement de la cinétique d'inactivation des canaux

induit par le dimère  $G_{\beta\gamma}$  est très certainement encore plus prononcé que ce que nous avons pu mettre en évidence.

Si la fixation du dimère  $G_{\beta\gamma}$  sur la sous-unité  $Ca_v2.2$  induit le ralentissement de la cinétique d'inactivation des canaux de type N, le mécanisme moléculaire par lequel se produit ce phénomène demeure inconnu. Toutefois, il est peut être possible de trouver une analogie avec ce qui a déjà été observé dans le cas de la sous-unité  $\beta_{2a}$ . Cette sous-unité  $\beta$  présente la particularité de posséder deux sites de palmytoylation dans son domaine amino-terminal, conduisant à son ancrage membranaire. Aussi, la fixation de la sous-unité  $\beta_{2a}$  sur la boucle I-II de la sous-unité  $Ca_v$  conduit à un ralentissement drastique de la cinétique d'inactivation du canal (Restituto *et al.*, 2000). Il a par ailleurs été proposé que la boucle I-II de la sous-unité  $Ca_v$  serait un déterminant majeur de l'inactivation des canaux de type N, suivant un mécanisme de "couverture à charnière" (*hinged lid*) (Stotz *et al.*, 2000) (Figure 32).



**Figure 32. Modèle d'inactivation rapide des VGCCs.**

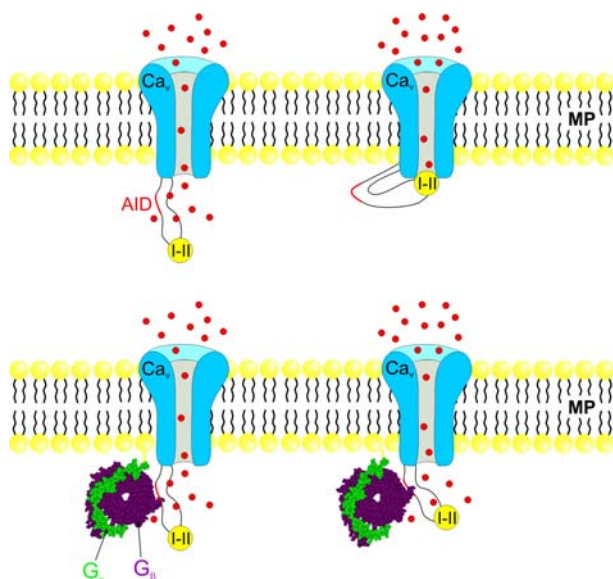
Tiré de (Stotz *et al.*, 2000).

L'inactivation rapide des canaux calciques à haut seuil d'activation pourrait se produire suivant un mécanisme de "couverture à charnière" (*hinged lid*), où la boucle I-II formerait une particule d'inactivation dont la fixation sur les segments IIS6 et IIIS6 conduirait à l'obstruction physique du pore ionique.

Aussi, la sous-unité  $\beta_{2a}$ , de part son ancrage membranaire, diminuerait la mobilité de la boucle I-II, conduisant au ralentissement de la cinétique d'inactivation du canal. De ce point de vue, le dimère  $G_{\beta\gamma}$  présente un certain nombre d'homologies avec la sous-unité  $\beta_{2a}$ . Ce dernier est en effet capable d'interagir de manière directe avec la boucle I-II (De Waard *et al.*, 1997; Herlitze *et al.*, 1997; Zamponi *et al.*, 1997). De plus, des modifications post-traductionnelles de la sous-unité  $\gamma$  de type geranylgeranyl ( $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$ ,  $\gamma_4$ ,  $\gamma_5$ ,  $\gamma_7$ ,  $\gamma_{10}$ ,  $\gamma_{12}$  et  $\gamma_{13}$ ) ou farnesyl ( $\gamma_1$ ,  $\gamma_8$  et  $\gamma_{11}$ ) (Jones *et al.*, 2004) conduisent également à l'ancrage membranaire du dimère  $G_{\beta\gamma}$ . Aussi, il est possible que le dimère  $G_{\beta\gamma}$  induise un ralentissement de la cinétique



d'inactivation des canaux, en ralentissant le mouvement de la boucle I-II impliquée dans le processus moléculaire d'inactivation rapide (Figure 33).



**Figure 33. Modèle hypothétique du mécanisme moléculaire par lequel le dimère  $G_{\beta\gamma}$  induirait un ralentissement de la cinétique d'inactivation du canal.**

En accord avec le modèle d'inactivation rapide proposé par le groupe du Dr. Zamponi (Stotz *et al.*, 2000), le dimère  $G_{\beta\gamma}$ , de part son ancrage membranaire et son interaction avec la boucle I-II, pourrait ralentir le mouvement de la particule d'inactivation, induisant un ralentissement de la cinétique d'inactivation du canal.

A noter que l'implication de la boucle I-II dans la régulation directe des VGCCs par les protéines G avait été très largement contesté (Zhang *et al.*, 1996; Page *et al.*, 1997; Canti *et al.*, 1999). Ces résultats apportent ainsi une explication fonctionnelle à la fixation du dimère  $G_{\beta\gamma}$  sur la boucle I-II de la sous-unité  $Ca_v2.x$ .

## 2. Vers une nouvelle méthode d'analyse

Puisque la fixation du dimère  $G_{\beta\gamma}$  sur la sous-unité  $Ca_v2.2$  semble induire un ralentissement de la cinétique d'inactivation du canal, l'étude de la régulation G via l'utilisation de prépulses dépolarisants apparaît conceptuellement entachée d'un biais expérimental considérable. Aussi, nous avons développé une méthode d'analyse alternative, permettant de contourner ce biais expérimental. Cette méthode consiste à extraire, simplement à partir des courants ioniques contrôle et sous régulation G, la fraction de courant issue de la relaxation de l'inhibition en réponse à l'ouverture des canaux. Elle donne accès à trois paramètres majeurs de cette régulation :  $GI_{t_0}$ , l'inhibition maximale du courant, avant que le phénomène de relaxation n'ait pris place ;  $\tau$ , la constante de temps de décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  de la sous-unité  $Ca_v2.x$  ; et RI, l'amplitude de la relaxation.  $GI_{t_0}$  caractérise ainsi la régulation "ON", alors que  $\tau$  et RI représentent les paramètres biophysiques de la régulation "OFF". Cette méthode d'analyse nous a permis de mettre en évidence que  $GI_{t_0}$  demeure

constant quel que soit le potentiel de membrane, faisant de la régulation "ON" une régulation intrinsèquement indépendante du voltage. Cette notion ne pouvait être mise en évidence par la mesure de l'inhibition aux pics des courants qui décroît de manière significative avec le potentiel, en raison du phénomène de relaxation. De plus, il apparaît que la cinétique de décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  de la sous-unité  $Ca_v2.2$  est significativement plus rapide que ce qui avait été décrit par la méthode des préimpulsions, même si elle présente qualitativement la même relation vis-à-vis du potentiel de membrane.

### **3. Conclusion**

Cette nouvelle méthode d'analyse permet de déterminer les principaux paramètres biophysiques des régulations "ON" et "OFF", de manière directe à partir de l'analyse des courants ioniques. Elle présente toutefois une limitation dans le fait qu'elle ne peut s'utiliser que pour une gamme de potentiels permettant la mesure des courants ioniques.

### III. IMPORTANCE de l'INACTIVATION RAPIDE des CANAUX N dans la REGULATION DIRECTE par les PROTEINES G

#### A. Introduction

Le décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  de la sous-unité  $Ca_v2.x$  représente une étape majeure de la régulation directe des VGCCs par les protéines G hétérotrimériques. Aussi, il est à l'origine de l'ensemble des modifications phénotypes de la régulation "OFF", tels que le ralentissement apparent de la cinétique d'activation du canal (Marchetti *et al.*, 1986), le phénomène de facilitation en réponse à un prépulse dépolarisant (Ikeda, 1991) ou un train de potentiels d'action (Brody *et al.*, 1997), et très certainement aussi à l'origine du shift dépolarisant apparent de la courbe d'activation comme nous l'avons proposé précédemment. Le mécanisme moléculaire conduisant au décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  n'est pour l'heure pas encore élucidé. Toutefois, il est très probable qu'il fasse intervenir les déterminants moléculaires impliqués dans l'ouverture du canal (Patil *et al.*, 1996), ou bien l'ouverture du canal elle-même. Aussi, si le moteur moléculaire du décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  de la sous-unité  $Ca_v2.x$  semble être lié au mécanisme d'ouverture du canal, le rôle de l'inactivation dans la régulation "OFF" n'a jamais réellement été caractérisé. Différents résultats expérimentaux suggèrent cependant que l'inactivation rapide du canal pourrait interférer avec la régulation "OFF". Une première évidence provient des travaux du groupe du Pr. Catterall, où la mutation R387E du domaine QXXER de la boucle I-II modifie la régulation directe des canaux P/Q par les protéines G, et altère de manière concomitante la cinétique d'inactivation rapide du canal (Herlitze *et al.*, 1997). Toutefois, cette mutation affectant également l'interaction du dimère  $G_{\beta\gamma}$  sur ce déterminant (De Waard *et al.*, 1997), il apparaît difficile de conclure sur une éventuelle implication de l'inactivation dans la modulation de la régulation du canal par les protéines G. Il a également été mis en évidence que les différentes sous-unités  $\beta$ , qui modulent la cinétique d'inactivation rapide des canaux de type HVA, modulent également la cinétique de décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  de la sous-unité  $Ca_v2.x$  (Canti *et al.*, 2000; Meir et Dolphin, 2002). Toutefois, aucun lien formel entre l'inactivation rapide du canal et la régulation directe par les protéines G n'a pu être établi.

Cette étude souhaite mettre en évidence la contribution de l'inactivation dans le phénotype de la régulation directe des canaux de type N par les protéines G hétérotrimériques. Dans le but de ne pas altérer les déterminants moléculaires impliqués dans l'interaction du dimère  $G_{\beta\gamma}$

avec la sous-unité  $Ca_v2.x$ , les différentes sous-unité  $\beta$  ainsi que leurs analogues structuraux ont été utilisés comme modulateurs de la cinétique d'inactivation du canal (Olcese *et al.*, 1994; Restituito *et al.*, 2000). Sur la base de la méthode d'analyse présentée précédemment, il apparaît exister une corrélation positive entre la cinétique d'inactivation rapide du canal, et la cinétique de décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  de la sous-unité  $Ca_v2.2$ . Aussi, un canal à inactivation rapide (comme en présence de la sous-unité  $\beta_3$ ) présente une cinétique de relaxation de l'inhibition accélérée, alors qu'un canal à inactivation lente (comme en présence de la sous-unité  $\beta_{2a}$ ) présente une cinétique de relaxation ralentie. Toutefois, si l'inactivation du canal est positivement corrélée à la cinétique de relaxation de l'inhibition, elle apparaît en revanche négativement corrélée à l'amplitude du phénomène. Aussi, si le processus moléculaire de l'inactivation rapide du canal apparaît promouvoir le décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  de la sous-unité  $Ca_v2.2$ , il semble également déterminer une fenêtre temporelle durant laquelle ce processus peut avoir lieu. De plus, l'inactivation rapide induite par les différentes sous-unité  $\beta$  n'affecte pas la régulation "ON" (inhibition du courant calcique), alors qu'elle apparaît au contraire influencer très largement le phénotype de la régulation "OFF" (ralentissement apparent de la cinétique d'activation et shift dépolarisant apparent de la courbe d'activation).

**B. Publication № 3**

**Importance of inactivation in N-type calcium channel regulation  
by G-proteins**

Norbert Weiss, Abir Tadmouri, Mohamad Mikati, Michel Ronjat & Michel De Waard

*Pflügers Archiv – European Journal of Physiology* (2006) **454**: 115-29

# Importance of voltage-dependent inactivation in N-type calcium channel regulation by G-proteins

Norbert Weiss · Abir Tadmouri · Mohamad Mikati · Michel Ronjat · Michel De Waard

Received: 9 October 2006 / Accepted: 29 October 2006 / Published online: 14 December 2006  
© Springer-Verlag 2006

**Abstract** Direct regulation of N-type calcium channels by G-proteins is essential to control neuronal excitability and neurotransmitter release. Binding of the  $G_{\beta\gamma}$  dimer directly onto the channel is characterized by a marked current inhibition (“ON” effect), whereas the pore opening- and time-dependent dissociation of this complex from the channel produce a characteristic set of biophysical modifications (“OFF” effects). Although G-protein dissociation is linked to channel opening, the contribution of channel inactivation to G-protein regulation has been poorly studied. Here, the role of channel inactivation was assessed by examining time-dependent G-protein de-inhibition of  $Ca_v2.2$  channels in the presence of various inactivation-altering  $\beta$  subunit constructs. G-protein activation was produced via  $\mu$ -opioid receptor activation using the DAMGO agonist. Whereas the “ON” effect of G-protein regulation is independent of the type of  $\beta$  subunit, the “OFF” effects were critically affected by channel inactivation. Channel inactivation acts as a synergistic factor to

channel activation for the speed of G-protein dissociation. However, fast inactivating channels also reduce the temporal window of opportunity for G-protein dissociation, resulting in a reduced extent of current recovery, whereas slow inactivating channels undergo a far more complete recovery from inhibition. Taken together, these results provide novel insights on the role of channel inactivation in N-type channel regulation by G-proteins and contribute to the understanding of the physiological consequence of channel inactivation in the modulation of synaptic activity by G-protein coupled receptors.

**Keywords** N-type calcium channel ·  $Ca_v2.2$  subunit · G-protein · G-protein coupled receptor ·  $\mu$ -opioid receptor · inactivation ·  $\beta$  subunit

## Abbreviations

GI	G-protein inhibition
GPCR	G-protein coupled receptor
DAMGO	(D-Ala <sup>2</sup> ,Me-Phe <sup>4</sup> ,glycinol <sup>5</sup> )-enkephalin
rMOR	rat $\mu$ -opioid receptor
PCR	polymerase chain reaction
RI	recovery from inhibition
NS	non-statistically significant

N. Weiss · A. Tadmouri · M. Ronjat · M. De Waard (✉)  
Laboratoire Canaux Calciques, Fonctions et Pathologies,  
Inserm U607, CEA,  
17 rue des Martyrs,  
38054 Grenoble Cedex 09, France  
e-mail: michel.de-waard@cea.fr

M. Mikati  
Department of Pediatrics,  
American University of Beirut Medical Center,  
Beirut, Lebanon

N. Weiss · A. Tadmouri · M. Ronjat · M. De Waard  
Commissariat à l’Energie Atomique,  
Grenoble, France

N. Weiss · A. Tadmouri · M. Ronjat · M. De Waard  
Université Joseph Fourier,  
Grenoble, France

## Introduction

Voltage-dependent N-type calcium channels play a crucial role in neurotransmitter release at the central and peripheral synapse [3, 47]. Several subtypes of N-type channels, which differ in their inactivation properties either because of differences in subunit composition [43] or because they represent splice variants [5, 28], are known to exist. N-type

channels are strongly regulated by G-protein coupled receptors (GPCR) [4, 18, 25, 29, 30]. Direct regulation by G-proteins involves the binding of the  $G_{\beta\gamma}$  dimer [22, 27] on various structural determinants of  $Ca_v2.2$ , the pore-forming subunit of N-type channels [1, 11, 15, 23, 34, 38, 44, 53]. This regulation is characterized by typical biophysical modifications of channel properties [16], including (1) a marked current inhibition [7, 51], (2) a slowing of activation kinetics [30], (3) a depolarizing shift of the voltage-dependence of activation [4], (4) a current facilitation after prepulse depolarization [26, 42], and (5) a modification of inactivation kinetics [52]. Current inhibition has been attributed to  $G_{\beta\gamma}$  binding onto the channel (“ON” effect), whereas all other channel modifications are a consequence of a variable time-dependent dissociation of  $G_{\beta\gamma}$  from the channel (“OFF” effects) [49]. Although the dissociation of  $G_{\beta\gamma}$  was previously described as voltage-dependent [17], it was then suggested that channel opening after membrane depolarization was more likely responsible for the removal of  $G_{\beta\gamma}$  [35]. More recently, we have shown that the voltage-dependence of the time constant of  $G_{\beta\gamma}$  dissociation was directly correlated to the voltage-dependence of channel activation suggesting that  $G_{\beta\gamma}$  dissociation is in fact intrinsically voltage-independent [49].

Although  $G_{\beta\gamma}$  dissociation, and the resultant characteristic biophysical changes associated with it, has been correlated with channel activation, the contribution of channel inactivation in G-protein regulation has been barely studied. Evidence that such a link may exist has emerged from a pioneering study from the group of Prof. Catterall [23] in which it was demonstrated that mutations of the  $\beta$ -subunit binding domain of  $Ca_v2.1$ , known to affect inactivation, also modifies G-protein modulation. A slower inactivating channel, in which the Arg residue of the QQIER motif of this domain was substituted by Glu, enhanced the prepulse facilitation suggesting that the extent of G-protein dissociation was enhanced. However, establishing a specific relationship between channel inactivation and G-protein regulation with mutants of such a motif is rendered difficult because this motif is also a  $G_{\beta\gamma}$ -binding determinant [15, 23, 53]. Indeed, mutations of this motif are expected to decrease the affinity of G-proteins for the channel and, hence, may facilitate G-protein dissociation. Differences in G-protein regulation of  $Ca_v2.2$  channels have also been reported if the channel is associated to  $\beta$  subunit that induces different inactivation kinetics [12, 20, 31]. However, a formal link between channel inactivation and G-protein regulation was not established in any of these studies.

In this study, we analyzed how modifying channel inactivation kinetics could affect the parameters of G-protein dissociation (time constant and extent of dissociation). We used a method of analysis that was recently

developed on N-type channels for extracting all parameters of G-protein regulation at regular potential values, independently of the use of prepulse depolarizations [48]. The objective was to perform a study in which the structural properties of the pore-forming subunit would remain unaltered to keep the known G-protein binding determinants of the channel functionally intact. Structural analogues of  $\beta$  subunits, known or expected to modify channel inactivation properties, were used [14, 32, 40]. It is concluded that fast inactivation accelerates G-protein dissociation from the channel, whereas slow inactivation slows down the process. However, channel inactivation also reduces the temporal window of opportunity in which G-protein dissociation can be observed. Far less recovery is observed for channels that undergo fast inactivation, whereas slow inactivating channels display almost complete G-protein dissociation. With regard to the landmark effects of G-protein regulation, it is concluded that the “ON” effect (extent of G-protein inhibition) is independent of the type of inactivation provided by  $\beta$  subunits, whereas all “OFF” effects (slowing of activation and inactivation kinetics, shift of the voltage-dependence of activation) are largely influenced by the kinetics of channel inactivation induced by the  $\beta$  constructs. These results better explain the major differences that can be observed in the regulation of functionally distinct N-type channels. Furthermore, they provide an insight of the potential influence of channel inactivation in modulating G-protein regulation of N-type channels at the synaptic level.

## Materials and methods

### Materials

The cDNAs used in this study were rabbit  $Ca_v2.2$  (GenBank accession number D14157), rat  $\beta_{1b}$  (X61394), rat  $\beta_{2a}$  (M80545), rat  $\beta_3$  (M88751), rat  $\beta_4$  (L02315), and rat  $\mu$ -opioid receptor (rMOR, provided by Dr. Charnet). (D-Ala<sup>2</sup>,Me-Phe<sup>4</sup>,glycinol<sup>5</sup>)-enkephalin (DAMGO) was from Bachem (Bubendorf, Germany).

### Molecular biology

The CD8- $\beta_{1b}$  chimera was generated by polymerase chain reaction (PCR) amplification of the full-length  $\beta_{1b}$  using oligonucleotide primers 5'-CGCGGATCCGTCCAGAA GAGCGGCATGTCCCGGGGCCCTTACCCA-3' (forward) and 5'-ACGTGAATTCGCGGATGTAGACGCC TTGTCCCAGCCCTCCAG-3' (reverse), and the PCR product was subcloned into the *Bam*HI and *Eco*RI sites of the pcDNA3-CD8- $\beta$ ARK-myc vector after removing the  $\beta$ ARK insert (vector generously provided by D. Lang,

Geneva University, Geneva, Switzerland). The truncated N-terminal  $\beta_{1b}$  construct ( $\beta_{1b\Delta N}$ , coding for amino acid residues 58 to 597) was performed as described above using the primers 5'-CGCGGATCCACCATGGGCTCAGCAGAGTCTACACGAGCCGGCCGTCAGAC-3' (forward) and 5'-CGGGGTACCGCGGATGTAGACGCCTTGTCCCAGCCCTCCAGCTC-3' (reverse), and the PCR product was subcloned into the *KpnI* and *BamHI* sites of the pcDNA3.1(-) vector (Invitrogen). The truncated N-terminal  $\beta_3$  construct ( $\beta_3\Delta N$ , coding for amino acid residues 16 to 484) was performed using the primers 5'-CGCGGATCCACCATGGGTTTCAGCCGACTCCTACACCAGCCGCCCTCTCTGGAC-3' (forward) and 5'-CGGGGTACCGTAGCTGTCTTTAGGCCAAGGCCGGTTACGCTGCCAGTT-3' (reverse), and the PCR product was subcloned into the *KpnI* and *BamHI* sites of the pcDNA3.1(-) vector.

#### Transient expression in *Xenopus* oocytes

Stage V and VI oocytes were surgically removed from anesthetized adult *Xenopus laevis* and treated for 2–3 h with 2 mg/ml collagenase type 1A (Sigma). Injection into the cytoplasm of cells was performed with 46 nl of various cRNA mixture in vitro transcribed using the SP6 or T7 m Message mMachine Kit (Ambion, Cambridgeshire, UK; 0.3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$   $\text{Ca}_v2.2+0.3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$   $\mu\text{-opioid receptor}+0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  of one of the different calcium channel  $\beta$  constructs). Cells were incubated at 19°C in defined nutrient oocyte medium as described [19].

#### Electrophysiological recording

After incubation for 2–4 days, macroscopic currents were recorded at room temperature (22–24°C) using a two-electrode voltage-clamp in a bathing medium containing (in millimolar):  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  40, NaOH 50, KCl 3, HEPES 10, niflumic acid 0.5, pH 7.4 with methanesulfonic acid. Electrodes filled with (in millimolar) KCl 140, EGTA 10, and HEPES 10 (pH 7.2) had resistances between 0.5 and 1 M $\Omega$ . Macroscopic currents were recorded using Digidata 1322A and GeneClamp 500B amplifier (Axon Instruments, Union City, CA). Acquisition and analyses were performed using the pClamp 8 software (Axon Instruments). Recordings were filtered at 2 kHz. Leak current subtraction was performed on-line by a P/4 procedure. DAMGO was applied at 10  $\mu\text{M}$  by superfusion of the cells at 1 ml/min. All recordings were performed within 1 min after DAMGO produced maximal current inhibition. We observed that this procedure fully minimized voltage-independent G-protein regulation that took place later, about 5–10 min after DAMGO application (data not shown). Hence, the inhibition by DAMGO was fully reversible as assessed by washout

experiments. Also, no rundown was observed during the time course of these experiments. Cells that presented signs of prepulse facilitation before  $\mu\text{-opioid}$  receptor activation (tonic inhibition) were discarded from the analyses.

#### Analyses of the parameters of G-protein regulation

The method used to extract all biophysical parameters of G-protein regulation ( $\text{GI}_{t_0}$ , the initial extent of G-protein inhibition before the start of depolarization,  $\tau$ , the time constant of G-protein unbinding from the channel, and RI, the extent of recovery from inhibition at the end of a 500-ms test pulse, unless specified in the text) were described elsewhere [48]. The key steps required to extract these parameters are briefly summarized in Fig. 1. This method is analogous to the method that relies on the use of prepulses but avoids many of the pitfalls of the latter (use of an interpulse potential that favors G-protein re-association, differences in the rate of channel inactivation between control and G-protein regulated channels, and facilitation that occurs during the control test pulse) [48].

#### Mathematical and statistical analyses

Current–voltage relationships ( $I/V$ ) were fitted with the modified Boltzmann equation  $I_{(V)} = (G_{\text{max}} \times (V - E)) / (1 + \exp(-(V - V_{1/2})/k))$  where  $I_{(V)}$  represents the maximal current amplitude in response to a depolarization at the potential  $V$ ,  $G_{\text{max}}$  is the maximal conductance,  $E$  is the inversion potential of the  $\text{Ba}^{2+}$ , and  $k$  is a slope factor. All data are given as mean  $\pm$  SEM for  $n$  number observations and statistical significance ( $p$ ) was calculated using Student's  $t$  test. Statistical significance for scatter plot analysis was performed using the Spearman rank order correlation test.

## Results

#### N-type current inhibition by G-proteins is independent of the $\beta$ subunit species

G-protein inhibition is generally studied through the measurement of the peak currents. However, this approach does not take into account the fact that, at the time to peak, a considerable proportion of G-proteins has already dissociated from the channel during depolarization. To better estimate the real extent of N-type current inhibition by G-proteins, we used the technical approach described in Fig. 1 to measure  $\text{GI}_{t_0}$ , the maximum extent of G-protein inhibition before the start of the G-protein unbinding process. Representative current inhibition and kinetic alterations are shown for  $\text{Ca}_v2.2$  channels co-expressed with the  $\beta_{1b}$ ,  $\beta_{2a}$ ,  $\beta_3$ , or  $\beta_4$  subunit (Fig. 2a, top panel) and



the corresponding  $GI_{t_0}$  values were quantified (Fig. 2a, bottom panel). The  $\beta$  subunits did not alter significantly the maximum extents of inhibition that ranged between  $59.2 \pm 1.4\%$  ( $Ca_v2.2/\beta_{2a}$  channels,  $n=25$ ) and  $62.4 \pm 1.8\%$  ( $Ca_v2.2/\beta_{1b}$  channels,  $n=25$ ; Fig. 2b). In the following part of this study, three other  $\beta$  subunit constructs have been co-expressed with  $Ca_v2.2$ ,  $\beta_{1b \Delta N}$ ,  $CD8-\beta_{1b}$ , and  $\beta_3 \Delta N$ . As for the wild-type  $\beta$  isoforms,  $GI_{t_0}$  varied not significantly ( $p > 0.05$ ) between  $58.4 \pm 1.8\%$  ( $\beta_{1b \Delta N}$ ,  $n=9$ ) and  $63.5 \pm 1.3\%$  ( $CD8-\beta_{1b}$ ,  $n=10$ ).

The two parameters that are relevant for the “OFF” effects,  $\tau$  (the time constant of G-protein unbinding from the channel), and RI (the extent of current recovery from G-protein inhibition after a 500-ms depolarization) will be used to investigate the role of N-type channel inactivation in G-protein regulation.  $GI_{t_0}$  is not a time-dependent parameter and cannot be influenced by the time course of inactivation.

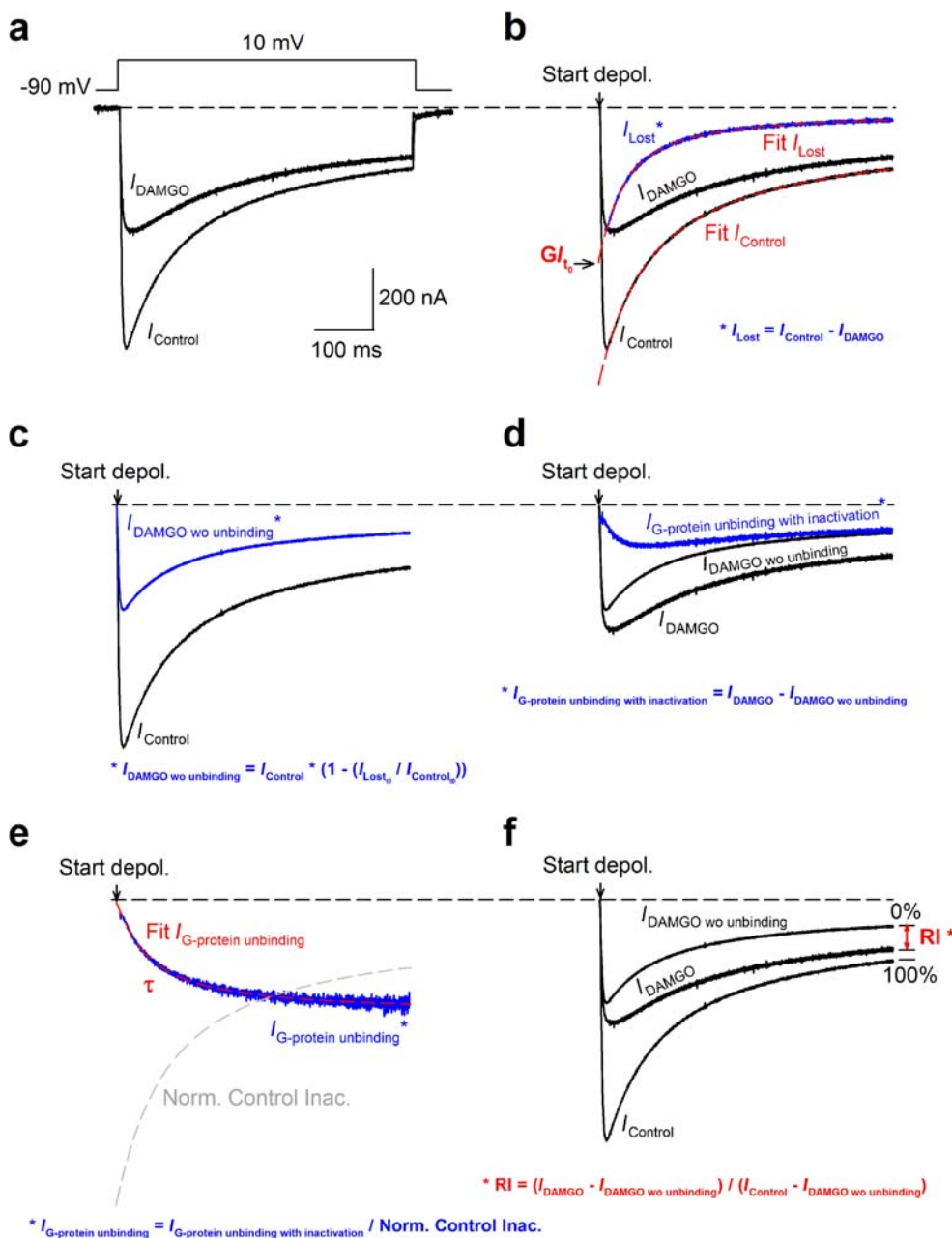
Current recovery from G-protein inhibition is altered when the inactivation kinetics of  $Ca_v2.2$  channels are modulated by  $\beta$  subunits

Auxiliary  $\beta$  subunits are known to influence the inactivation kinetics of  $Ca_v2.2$  channels with a rank order of potency, from the fastest to the slowest, of  $\beta_3 \geq \beta_4 > \beta_{1b} \gg \beta_{2a}$  [45]. Representative control current traces at 10 mV for  $Ca_v2.2$  channels co-expressed with each type of  $\beta$  subunit are shown in Fig. 3a (left panel). As expected from former reports, the  $\beta_3$  subunit produces the fastest inactivation, whereas  $\beta_{2a}$  induced the slowest inactivation. The  $\beta_{1b}$  and  $\beta_4$  subunits induce intermediate inactivation kinetics. In agreement with previous reports [12, 20],  $\beta$  subunits markedly affect G-protein regulation. Here, we investigated how channel inactivation affects the kinetics of G-protein departure from the channel and the extent RI. The time constants  $\tau$  of G-protein dissociation were extracted from the  $I_{G\text{-proteins unbinding}}$  traces for each combination of channels (Fig. 3a, middle panel), whereas RI was calculated as the extent of dissociation by comparing the current levels of  $I_{DAMGO}$ ,  $I_{DAMGO \text{ wo unbinding}}$ , and  $I_{Control}$  after 500 ms of depolarization (Fig. 3a, right panel). The data show that both  $\tau$  and RI values are differentially affected by the kinetics of channel inactivation. Average parameters are reported in Fig. 3b (for  $\tau$ ) and Fig. 3c (for RI). The time constant  $\tau$  of recovery from G-protein inhibition is 2.9-fold faster for the fastest inactivating channel ( $Ca_v2.2/\beta_3$ ,  $37.5 \pm 3.3$  ms,  $n=13$ ) than the slowest inactivating channel ( $Ca_v2.2/\beta_{2a}$ ,  $107.8 \pm 2.7$  ms,  $n=22$ ). Interestingly, the rank order for the speed of recovery from G-protein inhibition ( $\beta_3 \geq \beta_4 > \beta_{1b} \gg \beta_{2a}$ ) is similar to that observed for inactivation kinetics. Indeed, Student's *t* tests demonstrate that differences between  $\beta$  subunits are all

highly statistically significant ( $p \leq 0.001$ ) except between  $\beta_3$  and  $\beta_4$  where the difference is less pronounced ( $p \leq 0.05$ ; Fig. 3b). Thus, it is concluded that the speed of channel inactivation imposed by each type of  $\beta$  subunit impacts the time constant of recovery from G-protein inhibition. Channel inactivation appears as a “synergistic factor” to channel activation [49] for the speed of G-protein dissociation. Next, the effects of  $\beta$  subunits were investigated on RI values (Fig. 3c). Two of the  $\beta$  subunits ( $\beta_3$  and  $\beta_4$ ) have closely related RI values ( $56.9 \pm 1.8\%$  ( $n=21$ ) vs  $56.8 \pm 1.2\%$  ( $n=34$ )). In contrast,  $\beta_{1b}$  and  $\beta_{2a}$  statistically decrease ( $45.0 \pm 1.3\%$ ,  $n=24$ ) and increase ( $96.1 \pm 1.4\%$ ,  $n=29$ ) RI values, respectively. From these data, it is clear that faster recovery from inhibition is not necessarily associated with an elevated RI value. Although channel inactivation accelerates the kinetics of G-protein dissociation from the channel, it also reduces the time window in which the process can be completed. In these data, a relationship seems to exist between channel inactivation conferred by  $\beta$  subunits and G-protein dissociation. However, it is unclear whether this link is only due to the kinetics of inactivation conferred by  $\beta$  subunits or also to differences in molecular identities. In order to precisely assess this first observation, we examined how structural modifications of individual  $\beta$  subunits, known to alter channel inactivation, affect the recovery parameters from G-protein inhibition.

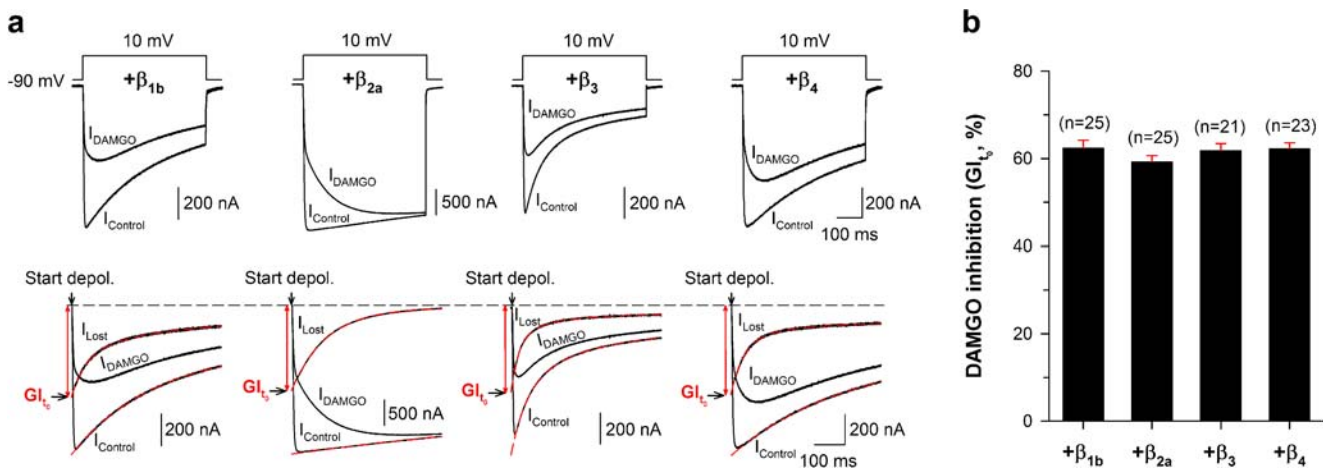
Deletion of a  $\beta$  subunit determinant important for fast inactivation alters recovery from G-protein inhibition

Important determinants for the control of inactivation rate have been identified in the past on  $\beta$  subunits [32, 37]. Deletion of the amino terminus of  $\beta$  subunits is known to slow down channel inactivation [14]. According to the data of Fig. 3, slowing of inactivation should increase both the time constant  $\tau$  of recovery from G-protein inhibition and the extent of RI. Figure 4a,b illustrates the extent of slowing in inactivation kinetics of  $Ca_v2.2/\beta_{1b}$  channels when the first 57 amino acids of  $\beta_{1b}$  subunit at the N-terminus are deleted ( $\beta_{1b \Delta N}$ ). The amount of inactivation at the end of a 500-ms depolarization at 10 mV shows a 2.2-fold decrease from  $58.4 \pm 1.6\%$  ( $n=22$ ) to  $26.2 \pm 2.3\%$  ( $n=10$ ; Fig. 4b). Representative traces of DAMGO regulation of  $Ca_v2.2/\beta_{1b}$  and  $Ca_v2.2/\beta_{1b \Delta N}$  currents demonstrate that the deletion of the N terminus of  $\beta_{1b}$  produces a significant modification in G-protein regulation (Fig. 4c, left panel). Notably, DAMGO-inhibited  $Ca_v2.2/\beta_{1b \Delta N}$  currents display much slower activation kinetics (quantified in Fig. 8c). The analysis of the time course of  $I_{G\text{-proteins unbinding}}$  traces in the presence of truncated  $\beta_{1b}$  reveals a slower time course (Fig. 4c, middle panel). Also, the deletion of the N terminus of  $\beta_{1b}$  leads to an increased recovery from G-protein inhibition (Fig. 4c, right panel). Statistical analyses



**Fig. 1** Illustration of steps leading to the determination of the biophysical parameters of N-type currents regulation by G-proteins according to [48]. **a** Representative  $\text{Ca}_v2.2/\beta_3$  current traces elicited at 10 mV for control ( $I_{\text{Control}}$ ) and DAMGO ( $I_{\text{DAMGO}}$ ) conditions. **b** Subtracting  $I_{\text{DAMGO}}$  from  $I_{\text{Control}}$  results in  $I_{\text{Lost}}$  (blue trace), the evolution of the lost current under G-protein activation.  $I_{\text{Control}}$  and  $I_{\text{Lost}}$  are then extrapolated to  $t=0$  ms (the start of the depolarization) by fitting traces (red dashed lines) with a single and double exponential, respectively, to determine  $GI_{t_0}$ , the maximal extent of G-protein inhibition. **c**  $I_{\text{DAMGO}}$  without unbinding ( $I_{\text{DAMGO wo unbinding}}$ , blue trace) represents an estimate of the amount of control current that is present in  $I_{\text{DAMGO}}$  and is obtained by the following equation:  $I_{\text{DAMGO wo unbinding}} = I_{\text{Control}} \times \left(1 - \left(I_{\text{Lost}_0} / I_{\text{Control}_0}\right)\right)$ . **d** Subtracting

$I_{\text{DAMGO wo unbinding}}$  from  $I_{\text{DAMGO}}$  results in  $I_{\text{G-protein unbinding with inactivation}}$  (blue trace), the evolution of inhibited current that recovers from G-protein inhibition after depolarization. **e**  $I_{\text{G-protein unbinding with inactivation}}$  is divided by the fit trace (normalized to 1) describing inactivation kinetics of the control current (gray dashed line) to reveal the net kinetics of G-protein dissociation ( $I_{\text{G-protein unbinding}}$ , blue trace) from the channels. A fit of  $I_{\text{G-protein unbinding}}$  by a mono-exponential decrease provides the time constant  $\tau$  of G-protein dissociation from the channel. **f** The percentage of recovery from G-protein inhibition (RI, in red) at the end of 500 ms pulse is measured as  $RI = (I_{\text{DAMGO}} - I_{\text{DAMGO wo unbinding}}) / (I_{\text{Control}} - I_{\text{DAMGO wo unbinding}}) \times 100$ . Arrows indicate the start of the depolarization



**Fig. 2** Maximal G-protein inhibition of N-type currents is independent of the type of  $\beta$  subunits. **a** Representative current traces elicited at 10 mV before ( $I_{\text{Control}}$ ) and under 10  $\mu\text{M}$  DAMGO application ( $I_{\text{DAMGO}}$ ) for  $\text{Ca}_v2.2$  channels co-expressed with the  $\beta_{1b}$ ,  $\beta_{2a}$ ,  $\beta_3$ , or  $\beta_4$  subunit (top panel). Corresponding traces allowing the measurement of the maximal DAMGO inhibition at the start of the depolarization ( $\text{GI}_t$ ) are also shown for each experimental condition (bottom panel).  $I_{\text{Control}}$  and  $I_{\text{Lost}}$  (obtained by subtracting  $I_{\text{DAMGO}}$  from  $I_{\text{Control}}$ ) were

fitted by a mono- and a double exponential, respectively (red dashed lines), to better estimate the maximal extent of DAMGO-inhibited current before the start of the depolarization ( $\text{GI}_t$ ). The red double arrow indicates the extent the DAMGO-inhibited current at  $t=0$  ms. Traces were normalized at the maximal value of  $I_{\text{Control}}$  at  $t=0$  ms to easily compare the extent of current inhibition. **b** Block diagram representation of  $\text{GI}_t$  for each experimental condition. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (in red) for  $n$  studied cells

show a significant increase in the time constant  $\tau$  of recovery (2.0-fold) from  $60.0 \pm 2.0$  ms ( $n=24$ ) to  $118.6 \pm 2.5$  ms ( $n=10$ ; Fig. 4d) and an increase in the RI values (1.8-fold) from  $45.0 \pm 1.3\%$  ( $n=24$ ) to  $79.6 \pm 2.5\%$  ( $n=9$ ) by the deletion of the N terminus of  $\beta_{1b}$  (Fig. 4e).

To confirm that these effects are independent of the nature of the  $\beta$  subunit involved, similar experiments were conducted with a 15-amino acid N-terminal truncated  $\beta_3$  subunit  $\beta_{3\Delta\text{N}}$ . As for  $\beta_{1b\Delta\text{N}}$ ,  $\beta_{3\Delta\text{N}}$  produces a slowing of channel inactivation kinetics. After 500 ms at 10 mV,  $\text{Ca}_v2.2/\beta_3$  channels inactivate by  $68.9 \pm 1.7\%$  ( $n=21$ ) compared to  $41.1 \pm 1.1\%$  ( $n=10$ ) for  $\text{Ca}_v2.2/\beta_{3\Delta\text{N}}$  channels (Fig. 5a,b). As expected, DAMGO inhibition of  $\text{Ca}_v2.2/\beta_{3\Delta\text{N}}$  channels produces currents with slower activation and inactivation kinetics than  $\text{Ca}_v2.2/\beta_3$  channels (shift of the time to peak of the current from  $20.7 \pm 2.5$  ms with  $\beta_3$  ( $n=21$ ) to  $77.0 \pm 7.6$  ms with  $\beta_{3\Delta\text{N}}$  ( $n=10$ ); Fig. 5c, left panel). Moreover, the time course of  $I_{\text{G-proteins}}$  unbinding was slowed down with the N-terminal truncation of  $\beta_3$  (Fig. 5c, middle panel), and the recovery from inhibition was enhanced (Fig. 5c, right panel). Quantification of these effects reveals a statistically significant slowing (1.8-fold) of the time constant of recovery  $\tau$  from G-protein inhibition from  $37.5 \pm 3.3$  ms ( $n=13$ ) to  $67.4 \pm 4.5$  ms ( $n=10$ ; see Fig. 5d) and an increase of RI values (1.2-fold) from  $56.9 \pm 1.8\%$  ( $n=21$ ) to  $66.9 \pm 2.1\%$  ( $n=10$ ; see Fig. 5e). However, the time constant of recovery in the presence of  $\beta_{3\Delta\text{N}}$  remains fast compared to the inactivation kinetics, which

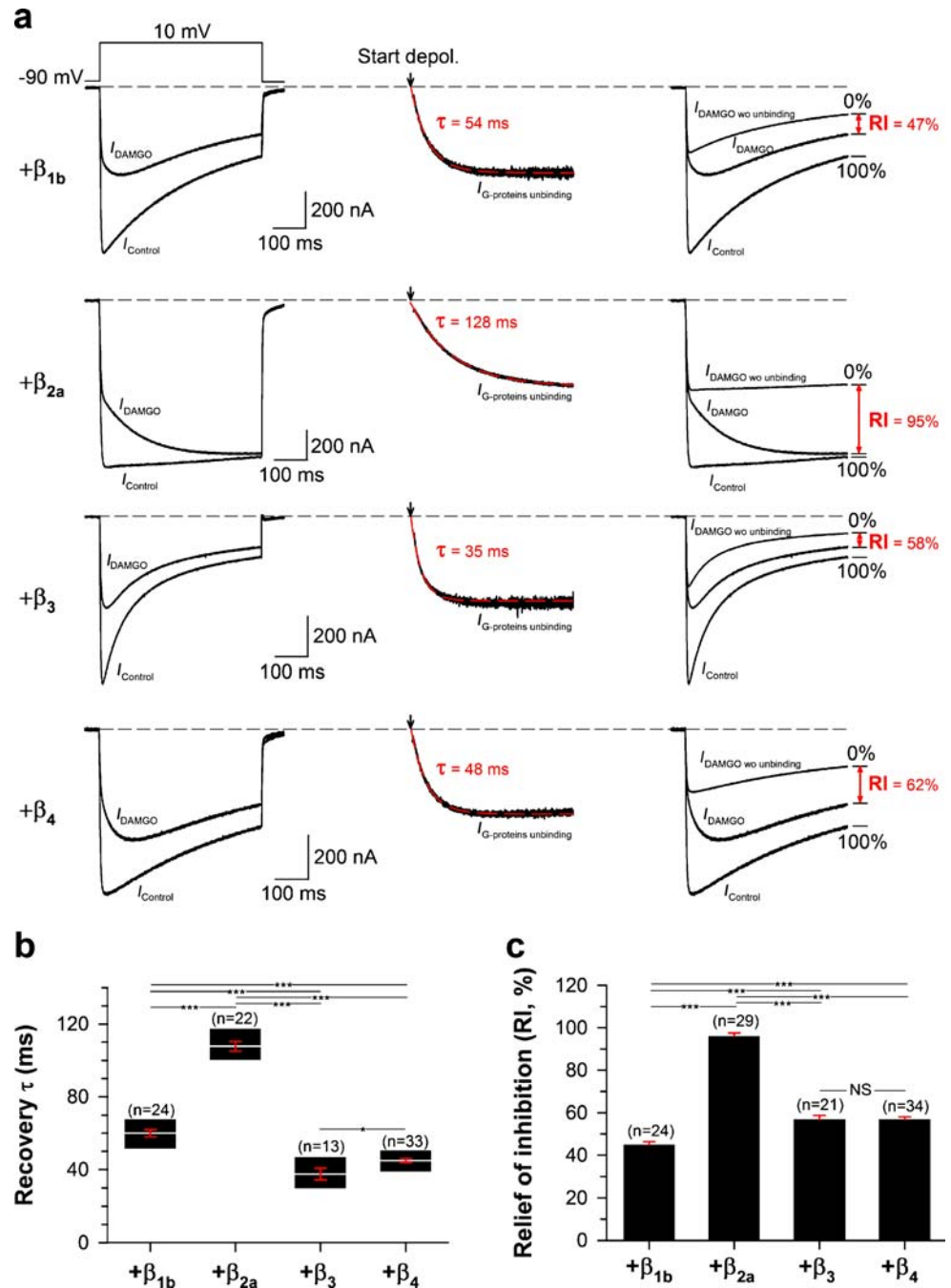
may explain the lower increase in RI values compared to what has been measured with  $\beta_{1b\Delta\text{N}}$ . Also, the starting value of RI is high for  $\beta_3$  (56.9%) compared to  $\beta_{1b}$  (45.0%), which limits the possibility of increase.

Slowing of channel inactivation by membrane anchoring of  $\beta$  subunit also alters the properties of recovery from G-protein inhibition

Another approach to modulate channel inactivation is to modify the docking of the  $\beta$  subunits to the plasma membrane [13, 40]. For that purpose, we expressed a membrane-inserted CD8 linked to the  $\beta_{1b}$  subunit (CD8- $\beta_{1b}$ ) along with  $\text{Ca}_v2.2$ . As shown in earlier studies using the same strategy but with a different  $\beta$  subunit [2, 40], membrane anchoring of the  $\beta_{1b}$  subunit significantly slows down the inactivation kinetics (Fig. 6a). Indeed, inactivation was reduced by 1.5-fold from  $58.4 \pm 1.6\%$  ( $n=22$ ) to  $38.1 \pm 1.8\%$  ( $n=10$ ; see Fig. 6b). Membrane anchoring of  $\beta_{1b}$  via CD8 slowed down the DAMGO-inhibited current activation kinetics (Fig. 6c, left panel). Under DAMGO inhibition, a greater shift of the time to peak of the current was observed for CD8- $\beta_{1b}$  than for  $\beta_{1b}$  (from  $57.0 \pm 4.1$  ms with  $\beta_{1b}$  ( $n=12$ ) to  $168.8 \pm 7.0$  ms with CD8- $\beta_{1b}$  ( $n=10$ )). Also, recovery from inhibition was slowed 1.9-fold from  $60.0 \pm 2.0$  ms ( $n=24$ ) to  $112.3 \pm 5.4$  ms ( $n=8$ ; Fig. 6d), whereas RI increased 1.3-fold from  $45.0 \pm 1.3\%$  ( $n=24$ ) to  $58.0 \pm 1.9\%$  ( $n=9$ ; see Fig. 6e).

**Fig. 3** Influence of  $\beta$  subunits on the recovery of N-type channel inhibition by G-proteins.

**a** Representative current traces before ( $I_{Control}$ ) and during application of 10  $\mu$ M DAMGO ( $I_{DAMGO}$ ) are shown at 10 mV for  $Ca_v2.2$  channels expressed with  $\beta_{1a}$ ,  $\beta_{2a}$ ,  $\beta_3$ , or  $\beta_4$  subunit (left panel). Corresponding  $I_{G-protein\ unbinding}$  traces are shown for each condition (middle panel) and were fitted by a mono-exponential decrease (red dashed line) to determine the time constant  $\tau$  of G-protein unbinding from the channel. The arrow indicates the start of the depolarization. Traces were normalized to better compare kinetics. Traces that allowed the measurement of RI values (in red) are also shown for each condition (right panel). **b** Box plot representation of the time constant  $\tau$  of G-protein unbinding as a function of the type of  $\beta$  subunit co-expressed with  $Ca_v2.2$  channels. The number of cells studied is indicated in parentheses. **c** Block diagram representation of RI values measured after 500 ms depolarization as a function of the type of the  $\beta$  subunit expressed with  $Ca_v2.2$  channels. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (in red) for  $n$  studied cells. Statistical  $t$  test: NS not statistically significant, single asterisk  $p \leq 0.05$ , two asterisks  $p \leq 0.01$ , three asterisks  $p \leq 0.001$

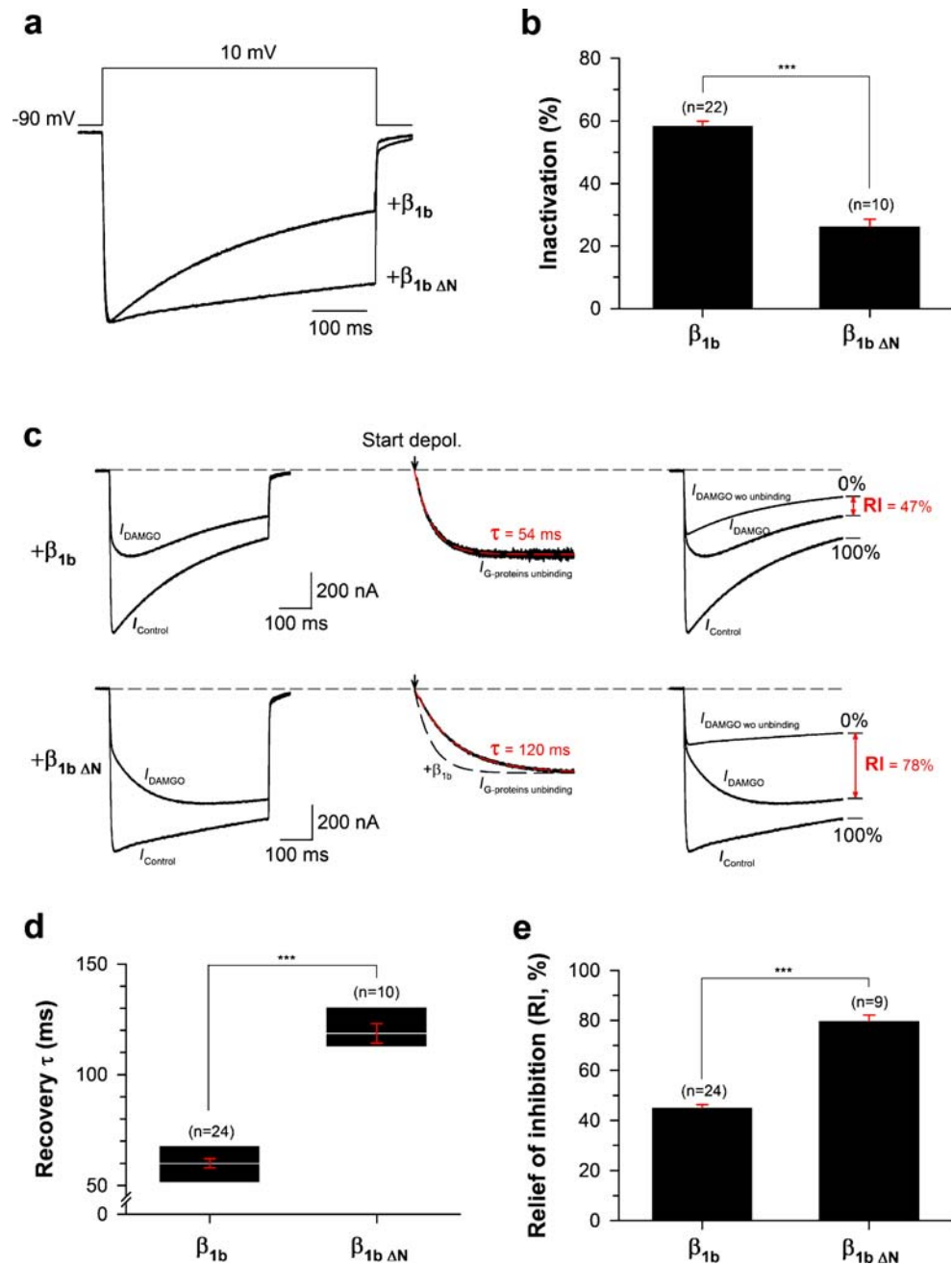


### Inactivation limits the maximum observable recovery from G-protein inhibition

As demonstrated above, inactivation influences both the time constant of recovery and the maximal observable recovery from inhibition. To study the effect of channel inactivation on the maximum recovery from inhibition independently of the time constant of recovery, we compared RI values and inactivation at a fixed time constant of recovery. The time constant of recovery from inhibition shows a voltage

dependence similar to that of channel opening [49]. An example of this voltage dependence is illustrated in Fig. 7a (left panel) for  $Ca_v2.2/\beta_{1b}$  channels. A plot of the time constant of recovery as a function of membrane depolarization indicates a great extent of variation in  $\tau$  values (Fig. 7a, middle panel). This voltage dependency of  $\tau$  values was observed for all channel combinations (data not shown). We then chose to impose the  $\tau$  value to  $50 \pm 5$  ms for all expressed channel combinations by selecting the appropriate recordings from the set of traces obtained at various test

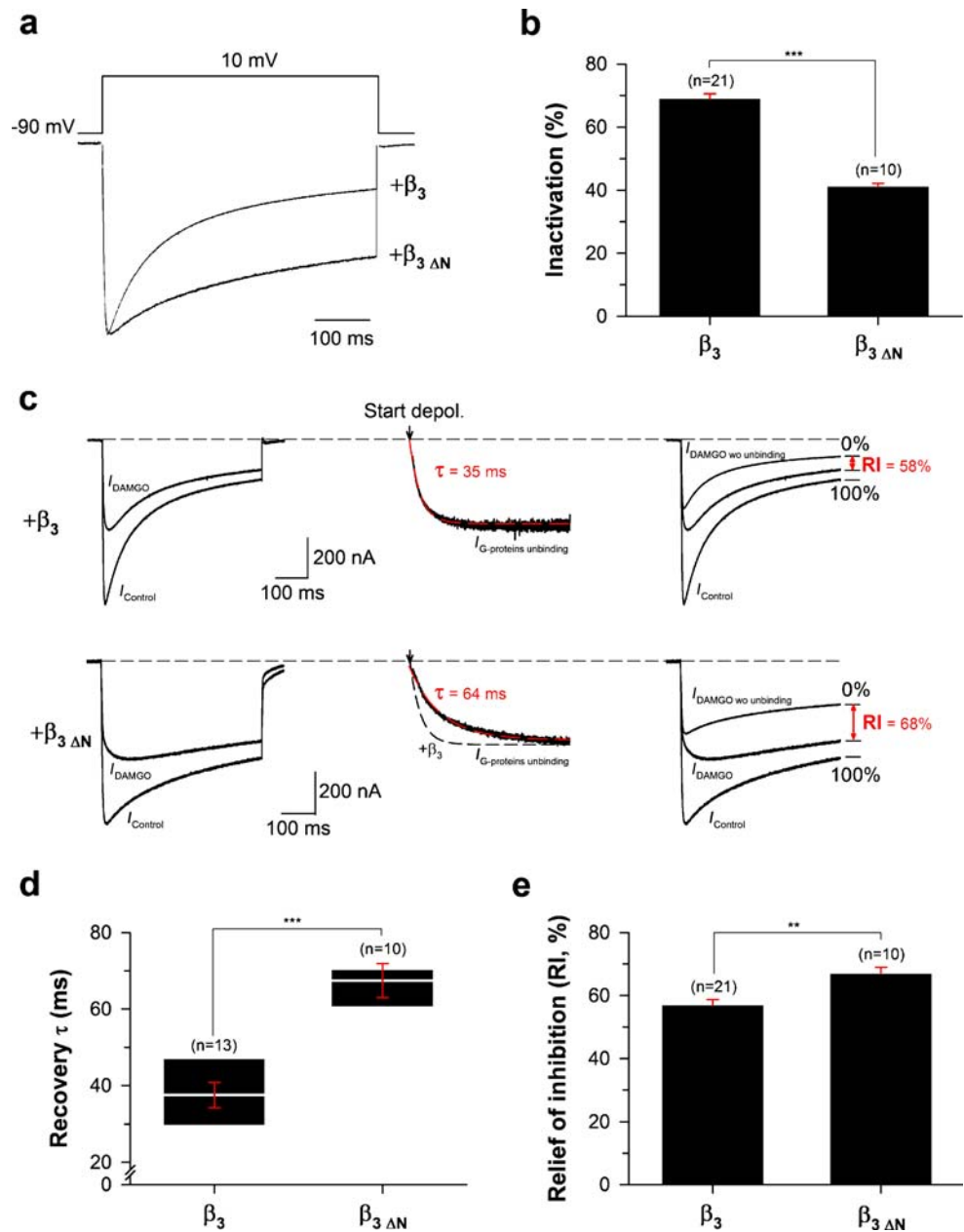
**Fig. 4** Slowing of inactivation kinetics by N-terminal truncated  $\beta_{1b}$  subunit modifies the recovery of N-type current inhibition by G-proteins. **a** Representative current elicited by a step depolarization at 10 mV for  $\text{Ca}_v2.2$  channels co-expressed with the wild-type  $\beta_{1b}$  subunit or with the N-terminal truncated subunit. Current traces were normalized to facilitate comparison of the kinetics and extent of inactivation. **b** Block diagram representation of the extent of inactivated current after 500 ms depolarization. **c** Representative current traces before ( $I_{\text{Control}}$ ) and during application of 10  $\mu\text{M}$  DAMGO ( $I_{\text{DAMGO}}$ ) are shown at 10 mV for  $\text{Ca}_v2.2$  channels co-expressed with the wild-type  $\beta_{1b}$  subunit or with the truncated subunit (left panel). Corresponding normalized  $I_{\text{G-protein unbinding}}$  traces fitted by a mono-exponential decrease (red dashed line) are shown for each condition (middle panel). The arrow indicates the start of the depolarization. The black dotted line represents the  $\text{Ca}_v2.2/\beta_{1b}$  channel condition shown for comparison. Corresponding traces, which allowed the measure of RI values (in red), are also shown for each experimental condition (right panel). **d** Box plot representation of time constants  $\tau$  of recovery from G-protein inhibition at 10 mV for each experimental condition. **e** Block diagram representation of RI values after 500 ms depolarization at 10 mV for each experimental condition. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (in red) for  $n$  studied cells. Statistical  $t$  test: three asterisks denote  $p \leq 0.001$



potentials (Fig. 7a, right panel). This  $\tau$  value was chosen because it allows the incorporation of a large number of recordings in the analysis. Also, with a  $\tau$  of 50 ms, the RI value at 500 ms after depolarization has reached saturation (95% of recovery after 150 ms of depolarization). For traces that underwent a recovery from inhibition with a  $\tau$  value of  $50 \pm 5$  ms, we measured the extent of RI and of inactivation, both at 500 ms. Representative examples for different channel combinations ( $\text{Ca}_v2.2$  along with either  $\beta_{2a}$ ,  $\beta_4$ , or  $\beta_{1b}$  from the slowest to the fastest inactivation) are shown in Fig. 7b (left panel) where the RI values and the extent of inactivation (right panel) are measured in each experi-

mental condition. Figure 7c shows the negative correlation existing between the extent of maximum recovery from inhibition and the extent of inactivation (statistically significant at  $p < 0.001$ ,  $n=62$ ). These results demonstrate that the only restriction to observe a complete current recovery from G-protein inhibition is the inactivation process. Indeed, channels that have almost no inactivation ( $\text{Ca}_v2.2/\beta_{2a}$ ) show a complete recovery from inhibition. The curve predicts that, for completely non-inactivating channels, 100% of the current would recover from inhibition. These results confirm that the experimental protocol used herein to minimize voltage-independent

**Fig. 5** Slower inactivation kinetics induced by N-terminal truncated  $\beta_3$  subunit also modifies recovery of N-type current inhibition by G-proteins. Legends as in Fig. 4 but for cells expressing  $\text{Ca}_v2.2$  channels in combination with the wild-type  $\beta_3$  subunit or with the N-terminal truncated subunit. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (in red) for  $n$  studied cells. Statistical  $t$  test: two asterisks denote  $p \leq 0.01$ , while three asterisks denote  $p \leq 0.001$



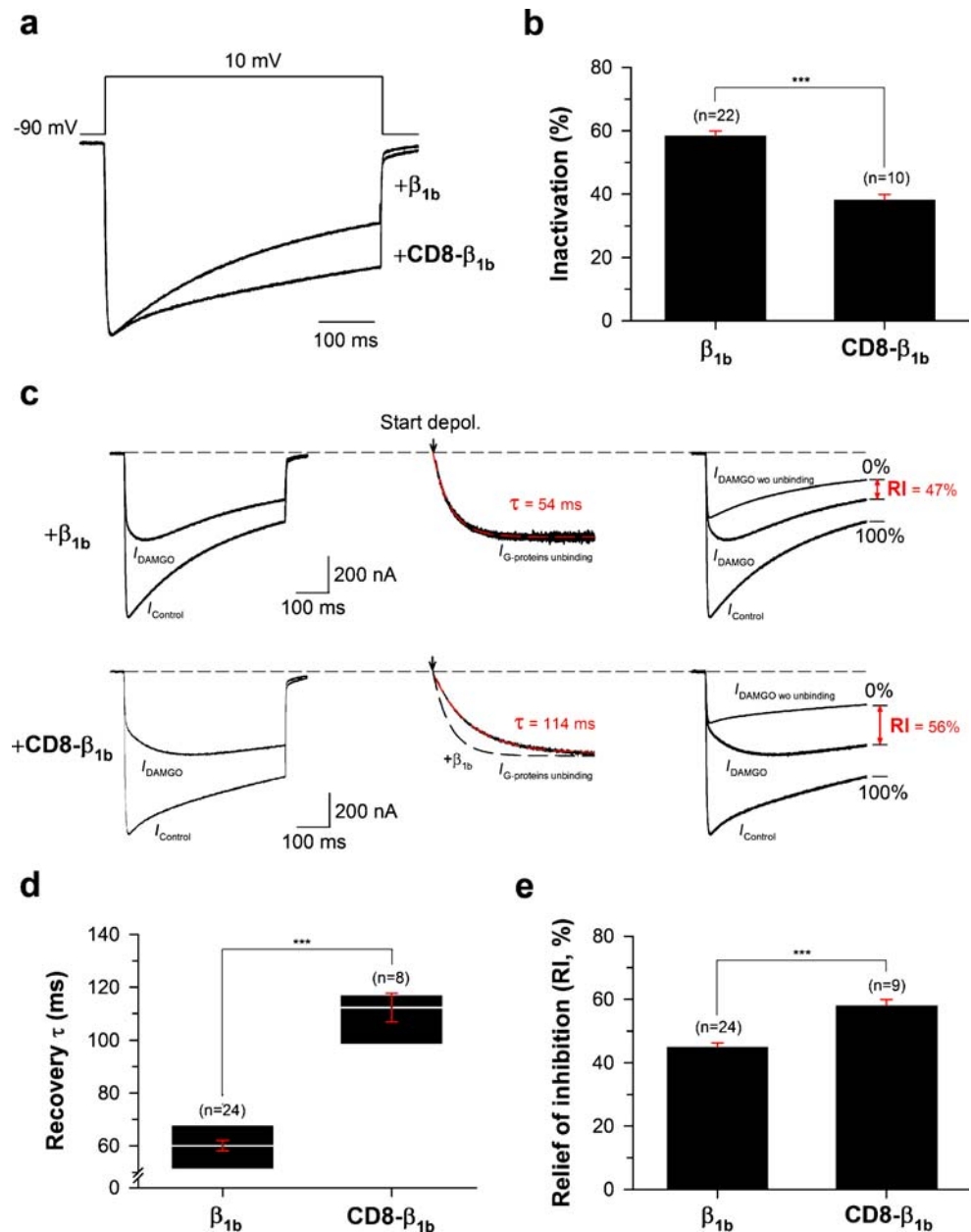
inhibition was fully functional. Conversely, channels that present the most inactivation present the smallest amount of recovery from inhibition.

Differences in calcium channel inactivation generate drastic differences in the biophysical characteristics of G-protein regulation

Since recovery from G-protein inhibition induces an apparent slowing of activation and inactivation kinetics, and shifts the voltage dependence of activation towards depolarized values [49], differences in channel inactivation that affect the recovery process should also affect the

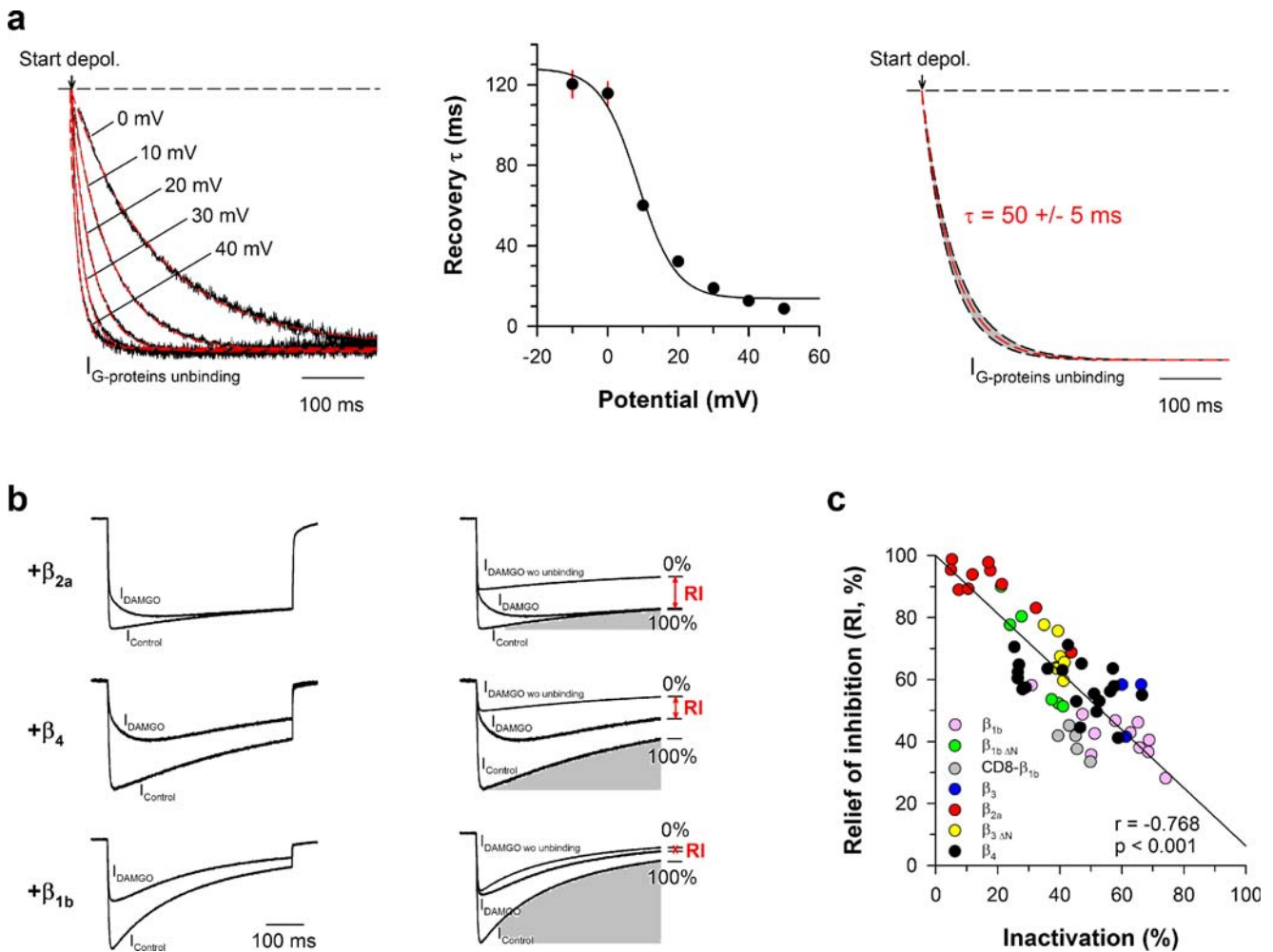
biophysical effects of G-proteins on N-type channels. Calcium currents are generally measured at peak amplitudes. The consequences of this protocol are shown for  $\text{Ca}_v2.2/\beta_{1b}$  and  $\text{Ca}_v2.2/\beta_{1b\Delta N}$  channels that present different inactivation kinetics (Fig. 8a,b). Several observations can be raised. First, it is observed that the slowing of the  $\text{Ca}_v2.2$  inactivation induced by truncating the N terminus of  $\beta_{1b}$  is responsible for a drastic slowing of activation kinetics under DAMGO application. This effect is most pronounced at low potential values and is significantly reduced at high potential values. These effects are quantified in Fig. 8c. For instance, at 0 mV, the average shift of the time to peak for  $\text{Ca}_v2.2/\beta_{1b\Delta N}$  channels ( $307.7 \pm$

**Fig. 6** Slowing of inactivation kinetics by membrane anchoring of  $\beta_{1b}$  subunit modifies recovery of N-type current inhibition by G-proteins. Legends as in Fig. 4 but for cells expressing  $\text{Ca}_v2.2$  channels in combination with the wild-type  $\beta_{1b}$  subunit or with the membrane-linked CD8- $\beta_{1b}$  subunit. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (in red) for  $n$  studied cells. Statistical  $t$  test: three asterisks denote  $p \leq 0.001$



$9.0$  ms,  $n=10$ ) is, on average, 9.2-fold greater than that observed for  $\text{Ca}_v2.2/\beta_{1b}$  channels ( $33.4 \pm 5.2$  ms,  $n=19$ ; Fig. 8c). Differences in slowing of activation kinetics, triggered by the two  $\beta$  subunits, remain statistically significant for potential values up to  $30$  mV. Above  $30$  mV, the convergence of both curves can be explained by the fact that recovery from G-protein inhibition becomes too rapid to be influenced by changes in inactivation kinetics. Second, at the time points of the peak of the current, slowing of inactivation by the N-terminal truncation of  $\beta_{1b}$  induces (1) a hyperpolarizing shift of the voltage dependence of  $\text{RI}_{\text{peak}}$  values, and (2) an increase in  $\text{RI}_{\text{peak}}$  values for potentials equal or below  $30$  mV (Fig. 8d). Since

$\text{RI}_{\text{peak}}$  values represent a voltage-dependent gain of current that is added to the unblocked fraction of control currents under G-protein regulation, they apparently modify the voltage dependence of channel activation ( $I/V$  curves) and reduce the level of DAMGO inhibition [49]. For the  $\text{Ca}_v2.2/\beta_{1b}$  channels, the average half-activation potential values were significantly shifted by  $6.4 \pm 0.9$  mV ( $n=13$ ) under DAMGO inhibition, whereas for the  $\text{Ca}_v2.2/\beta_{1b} \Delta N$  channels, a nonsignificant shift by  $1.9 \pm 0.5$  mV ( $n=10$ ) was determined (Fig. 8e,f). This difference in behavior can readily be explained by the voltage dependence of  $\text{RI}_{\text{peak}}$  values. In the case of  $\text{Ca}_v2.2/\beta_{1b}$ , the maximal  $\text{RI}_{\text{peak}}$  occurs at  $30$  mV (Fig. 8d), a depolarizing shift of  $20$  mV



**Fig. 7** The extent of N-type channel inactivation correlates with the extent of current recovery from G-protein inhibition. **a** An example of the influence of membrane potential values on the time constant  $\tau$  of current recovery from G-protein inhibition is shown for  $Ca_v2.2/\beta_{1b}$  channels. Normalized  $I_{G\text{-protein unbinding}}$  traces fitted by a mono-exponential decrease (red dashed line) are shown for a range of potentials from 0 to +40 mV (left panel). The arrow indicates the start of the depolarization. Traces were superimposed to facilitate kinetic comparisons. Corresponding voltage-dependence of the time constant  $\tau$  of current recovery from G-protein inhibition ( $n=13$ ) is shown (middle panel). Data are expressed as mean $\pm$ SEM (in red) and were fitted with a sigmoid function. Scheme illustrating normalized  $I_{G\text{-protein unbinding}}$  trace for a defined time constant  $\tau$  of  $50\pm 5$  ms (red and black lines, respectively; right panel). The gray area represents the accepted variation in  $\tau$  values ( $\pm 10\%$ ) for the incorporation of current traces in our subsequent analyses. The arrow

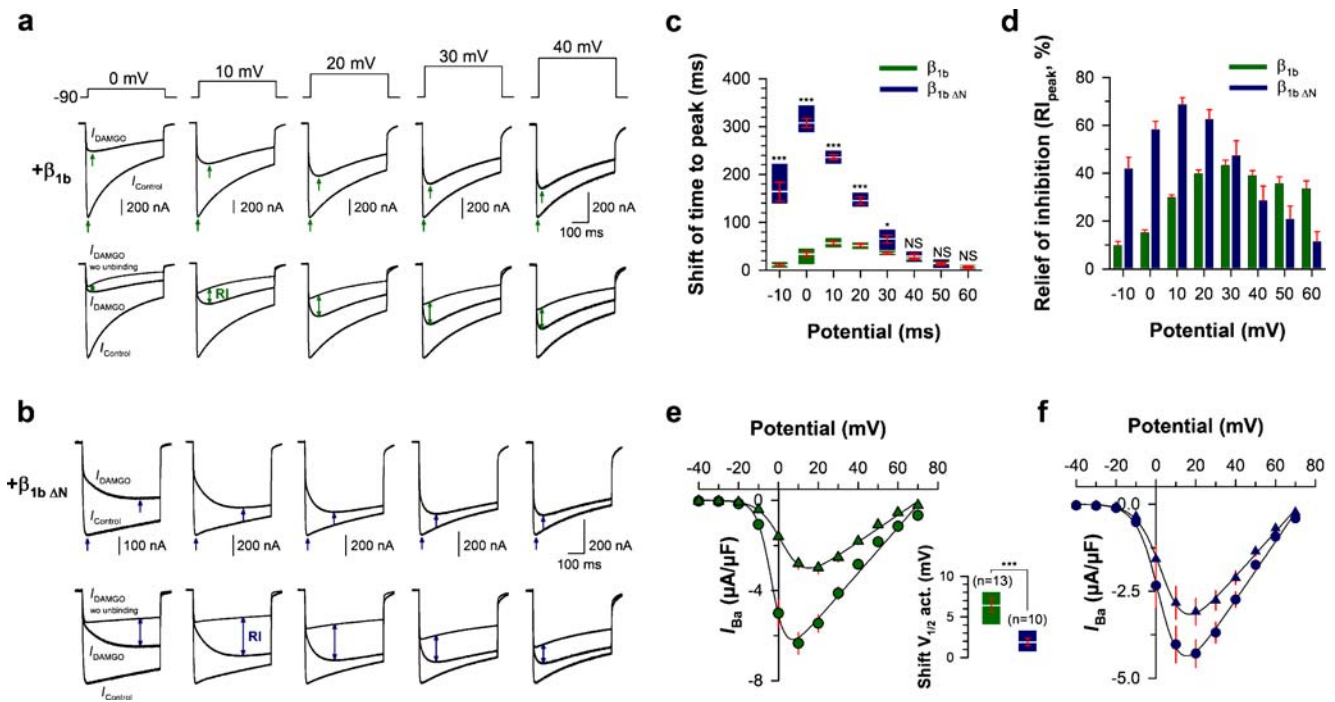
compared to control  $Ca_v2.2/\beta_{1b}$  currents, which is responsible for the depolarizing shift of the  $I/V$  curve under DAMGO inhibition (Fig. 8e). Conversely, for  $Ca_v2.2/\beta_{1b \Delta N}$ , the maximal  $RI_{peak}$  value is observed at 10 mV (Fig. 8d), which is  $-5$  mV hyperpolarized to the control  $Ca_v2.2/\beta_{1b \Delta N}$  peak currents and, therefore, influences far less the  $I/V$  curve under DAMGO inhibition (Fig. 8f). Finally, it should be noted that with a slowing of inactivation kinetics, the resultant increase in  $RI_{peak}$  values

indicates the virtual start of the depolarization. **b** Representative normalized current traces before ( $I_{Control}$ ) and under  $10 \mu M$  DAMGO application ( $I_{DAMGO}$ ) for  $Ca_v2.2$  expressed in combination with  $\beta_{2a}$ ,  $\beta_4$ , or  $\beta_{1b}$  subunit at +20, +10, and +10 mV, respectively (left panel). Traces were selected on the basis of the measured recovery G-protein inhibition time constant  $\tau$  (between 45 and 55 ms). Corresponding traces allowing the measurement of RI values (in red) after a 500-ms depolarization (right panel). The gray area represents the extent of current inactivation during a 500-ms depolarization. **c** Scattered plot representation of RI values after a 500-ms depolarization as a function of the extent of inactivation. Values are shown for various  $Ca_v2.2/\beta$  combinations ( $n=62$ ) showing a time constant  $\tau$  of recovery from G-protein inhibition of  $50\pm 5$  ms independently of the test potential. Fitting these values by a linear curve provided a linear regression coefficient of  $-0.768$ , which is statistically significant at  $p < 0.001$  (Spearman rank order correlation test)

(Fig. 8d, for potentials below 40 mV) produces an apparent reduction in DAMGO inhibition that is clearly evident when one compares the effect of DAMGO on  $I/V$  curves of  $Ca_v2.2/\beta_{1b}$  and  $Ca_v2.2/\beta_{1b \Delta N}$  (Fig. 8e,f).

In conclusion, these data indicate that slowing of channel inactivation kinetics increases the slowing of the time to peak by DAMGO, whereas it reduces both the peak current inhibition and the depolarizing shift of the voltage dependence of activation.





**Fig. 8** Effect of channel inactivation on characteristic biophysical changes induced by G-protein activation. Representative current traces before ( $I_{Control}$ ) and under 10  $\mu$ M DAMGO application ( $I_{DAMGO}$ ) and corresponding traces allowing the measurement of RI values are shown for  $Ca_v2.2/\beta_{1b}$  (a) and  $Ca_v2.2/\beta_{1b\Delta N}$  (b) at various membrane potentials illustrating DAMGO effects on channel activation kinetics and current recovery from G-protein inhibition in two conditions of channel inactivation. Arrows indicate the time to peak of the currents for control and DAMGO conditions (top panels). The time to peak of DAMGO-inhibited currents ( $I_{DAMGO}$ ) was also indicated on RI traces (arrows in lower panels). Double arrows indicate the extent of current recovery from G-protein inhibition at these time points ( $RI_{peak}$ ). **c** Box plot representation of the shift of the current time to peak induced by DAMGO application for  $Ca_v2.2/\beta_{1b}$  channels (green boxes,  $n=14$ ) and  $Ca_v2.2/\beta_{1b\Delta N}$  channels (blue boxes,  $n=10$ ) as a function of membrane potential. **d** Histogram

representation of  $RI_{peak}$  values at the peak of DAMGO currents ( $I_{DAMGO}$ ) for  $Ca_v2.2/\beta_{1b}$  channels (green bars,  $n=14$ ) and  $Ca_v2.2/\beta_{1b\Delta N}$  channels (blue bars,  $n=10$ ) as a function of membrane potential. Current–voltage relationship ( $I/V$ ) were performed for  $Ca_v2.2/\beta_{1b}$  channels (green plots,  $n=13$ ; e) and  $Ca_v2.2/\beta_{1b\Delta N}$  channels (blue plots,  $n=10$ ; f) for control (circle symbol) and DAMGO-inhibited (triangle symbols) currents measured at their peak. Data were fitted with a modified Boltzmann equation as described in the “Materials and methods” section. The insert represents the shift of the half-maximum current activation potential ( $V_{1/2}$ ) induced by DAMGO application for  $Ca_v2.2/\beta_{1b}$  (green box,  $n=13$ ) and  $Ca_v2.2/\beta_{1b\Delta N}$  channels (blue box,  $n=10$ ). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (in red) for  $n$  studied cells. Statistical  $t$  test: NS not statistically significant, single asterisk  $p \leq 0.05$ , two asterisks  $p \leq 0.01$ , three asterisks  $p \leq 0.001$

## Discussion

Relevant parameters to study the influence of inactivation on N-type channel regulation by G-proteins

N-type channel regulation by G-proteins can be described accurately by three parameters: the G-protein inhibition level at the onset of depolarization ( $GI_0$ ), the time constant of recovery from inhibition ( $\tau$ ), and the maximal extent of recovery from inhibition (RI).  $GI_0$  is indicative of the “ON” effect, whereas  $\tau$  and RI are the quantitative parameters leading to all “OFF” effects of the G-protein regulation [49]. Since  $GI_0$  is a quantitative index of the extent of G-protein inhibition at the start of the depolarization, i.e., at a time point where no inactivation has yet occurred, inactivation cannot influence this parameter. On the other hand, G-

protein dissociation is a time-dependent process at any given membrane potential and can thus be affected by channel inactivation since both processes occur within a similar timescale. In this study, we aimed at investigating this issue and came up with two novel conclusions. First, channel inactivation kinetics influences the speed of G-protein dissociation, and second, removal of G-proteins occurs within a time window that is closely controlled by inactivation. Hence, the speed of G-protein dissociation and the time window during which this process may occur control the extent of current recovery from G-protein inhibition at any given time. These conclusions were derived from the use of a recent biophysical method of analysis of N-type calcium channel regulation by G-proteins, which is independent of potential changes in channel inactivation behavior while G-proteins are bound onto the channels [48].

G-protein inhibition is completely reversible during depolarization provided that the channel has slow inactivation

There are two physiological ways to terminate direct G-protein regulation on N-type calcium channels: (1) the end of GPCR stimulation by recapture or degradation of the agonist (experimentally mimicked by washout of the bath medium), and (2) membrane depolarization by trains of action potentials (experimentally simulated by a prepulse application). Whereas the first one always leads to a complete recovery from G-protein inhibition, the second one produces a transient and variable recovery. Interestingly, a very slowly inactivating channel, such as the one produced by the combination of  $Ca_v2.2$  and  $\beta_{2a}$  subunits, can lead to a complete recovery from G-protein inhibition after membrane depolarization, whereas a fast inactivating channel, such as the one produced by the co-expression of the  $\beta_{1b}$  subunit, leads only to a partial recovery. For slow inactivating channels, the time window for G-protein dissociation is large since channel inactivation does not interfere with the process. Conversely, for fast inactivating channels, the time window for G-proteins to unbind from the channel is considerably reduced since inactivation prevents the observation of a complete recovery from inhibition. For these channels, the extent of recovery from inhibition is controlled by both the speed of G-protein dissociation and the time window of opportunity. Hence, the speed of current recovery from G-protein inhibition is controlled by channel inactivation and by channel opening as previously shown [49], whereas the time window opportunity of this process is only controlled by channel inactivation. It is likely that both parameters (the time constant of recovery  $\tau$  and the time window of opportunity) are under the control of additional molecular players or channel-modifying agents such as phosphorylation that may act on one or the other parameters in an independent manner, and could contribute to a fine control of the direct G-protein regulation.

There is an unexpected relationship between the channel inactivation kinetics and the kinetics of current recovery from G-protein inhibition

One surprising observation from this study is that fast inactivation accelerates the speed of current recovery from G-protein inhibition, whereas slower inactivation slows down G-protein dissociation from the channel. This was first demonstrated through the use of different  $\beta$  subunit isoforms (see also [12, 20]), and then confirmed with  $\beta$  subunit constructs known to modify channel inactivation kinetics. Besides this functional correlation, there might be a structural basis that underlies a mechanistic link between

channel inactivation and G-protein dissociation. Indeed, Herlitz et al. [23] illustrated that an R to A mutation of the QXXER motif (one of the  $G_{\beta\gamma}$ -binding determinant within the I–II linker of  $Ca_v2.x$  channels [15]) slows both the inactivation kinetics and the recovery from G-protein inhibition. The I–II loop of  $Ca_v2.2$  appears as a particularly interesting structural determinant for supporting G-protein dissociation. First, it contains several  $G_{\beta\gamma}$ -binding determinants whose functional role remain unclear [11, 15, 23, 33, 53, 54]. Second, this loop is known to contribute to fast inactivation [21, 23, 46]) possibly through a hinged lid mechanism that would impede the ion pore [46]. Third, some of the residues of the QXXER motif have been found to contribute to inactivation in a voltage-sensitive manner [41]. A possible working hypothesis for the contribution of the I–II loop to G-protein regulation can be proposed: (1) the channel openings provide an initial destabilizing event favoring G-protein dissociation, and (2) the hinged lid movement of the I–II loop triggered by the inactivation process further accelerates G-protein dissociation through an additional decrease in affinity between  $G_{\beta\gamma}$  and the channel.

However, there is an alternative possibility based on the expected relationship between channel opening probability and rate of G-protein dissociation [49]. At the potential at which we performed this study (10 mV), all channel combinations are at their maximal activation (data not shown) and should produce maximal opening probabilities. Nevertheless, we cannot rule out that the various  $\beta$  subunits and structural analogues introduce differences in the maximal opening probabilities of the channel thereby explaining differences in the rate of G protein dissociation, e.g.,  $\beta_{2a}$  with a lower opening probability and, thus, slower recovery from inhibition. However, this would imply that anything that leads to a slowing of inactivation kinetics, through a modification of  $\beta$  subunit structure, produces a reduced opening probability. The likelihood of this hypothesis is probably low, but cannot be dismissed.

Inactivation differentially affects each characteristic biophysical channel modification induced during G-protein regulation

Since time-dependent G-protein dissociation is responsible for the characteristic biophysical modifications of the channel [49], inactivation, by altering the parameters of the recovery from inhibition, plays a crucial role in the phenotype of G-protein regulation. Two extreme case scenarios were observed. G-protein regulation of slowly inactivating channels, such as  $Ca_v2.2/\beta_{1b \Delta N}$ , induces an important slowing of the activation kinetics, but no or little depolarizing shift of the voltage dependence of activation and less peak current inhibition. Conversely, faster inacti-

vating channels, such as  $\text{Ca}_v2.2/\beta_{1b}$ , present reduced slowing of activation kinetics, but a greater peak current inhibition and a marked depolarizing shift of the voltage dependence of activation. These data point to the fact that characteristic biophysical changes of the channel under G-protein regulation should not be correlated with each other. Indeed, an important shift of the time to peak is not necessarily associated with an important depolarizing shift of the voltage dependence of activation or a greater peak current reduction. Thus, it seems important to be cautious on the absence of a particular phenotype of G-protein regulation that does not necessarily reflect the lack of direct G-protein inhibition.

#### Physiological implications of channel inactivation in G-protein regulation

N-type channels are rather heterogeneous by their inactivation properties because of differences in subunit composition [43] or in alternative splicing [5, 28]. Very little information is available on the targeting determinants that lead to N-type channel insertion at the synapse. However, a contribution of the  $\beta$  subunits and of specific C-terminal sequences of  $\text{Ca}_v2.2$  is thought to be involved in the sorting of mature channels [24]. An epileptic lethargic phenotype in mouse is known to arise from the loss of expression of the  $\beta_4$  subunit, which is accompanied by a  $\beta$ -subunit reshuffling in the N-type channels [9]. These animals present an altered excitatory synaptic transmission suggesting the occurrence of a modification in channel composition and/or regulation at the synapse [10]. Synaptic terminals that arise from single axons present a surprising heterogeneity in calcium channel composition and in processing capabilities [39]. One of the synaptic properties most influenced by calcium channel subtypes is presynaptic inhibition by G-proteins. Evidence has been provided that the extent of N-type current facilitation (hence, current recovery from G-protein inhibition) is dependent on both the duration [8] and the frequency of action potentials (AP) [36, 50]. Low frequencies of AP produce no or little recovery, whereas high-frequency action potentials more dramatically enhance recovery. Hence, slowly inactivating channels should allow much better recovery from G-protein inhibition than fastly inactivating channels, thereby further enhancing the processing abilities of synaptic terminals. In that sense, a model of synaptic integration has been proposed by the group of Dr. Zamponi [6] that would be implicated in short-term synaptic facilitation or depression. It should be noted that the inactivation of calcium channels does not only rely on a voltage-dependent component and that other modulatory signals (calcium-dependent inactivation, phosphorylation) need to find a place in the integration pathway.

#### Conclusion

These data permit a better understanding of the role of inactivation in N-type calcium channel regulation by G-proteins and will call attention to the contribution of the different  $\beta$  subunits in physiological responses at the synapse.

**Acknowledgements** We thank Dr. Pierre Charnet and Dr. Yasuo Mori for providing the cDNAs encoding the rat  $\mu$ -opioid receptor and the rabbit  $\text{Ca}_v2.2$  channel, respectively. We are indebted to Dr. Anne Feltz, Dr. Lubica Lacinova, Dr. Michel Vivaudou, and Dr. Eric Hosity for critical evaluation of this work. We thank Sandrine Geib for her contribution to the  $\text{CD8-}\beta_{1b}$  construct.

#### References

1. Agler HL, Evans J, Tay LH, Anderson MJ, Colecraft HM, Yue DT (2005) G protein-gated inhibitory module of N-type ( $\text{Ca}_v2.2$ )  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Neuron* 46:891–904
2. Ahern CA, Sheridan DC, Cheng W, Mortenson L, Nataraj P, Allen P, De Waard M, Coronado R (2003)  $\text{Ca}^{2+}$  current and charge movements in skeletal myotubes promoted by the  $\beta$ -subunit of the dihydropyridine receptor in the absence of ryanodine receptor type 1. *Biophys J* 84:942–959
3. Artalejo CR, Adams ME, Fox AP (1994) Three types of  $\text{Ca}^{2+}$  channel trigger secretion with different efficacies in chromaffin cells. *Nature* 367:72–76
4. Bean BP (1989) Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage dependence. *Nature* 340:153–156
5. Bell TJ, Thaler C, Castiglioni AJ, Helton TD, Lipscombe D (2004) Cell-specific alternative splicing increases calcium channel current density in the pain pathway. *Neuron* 41:127–138
6. Bertram R, Swanson J, Yousef M, Feng ZP, Zamponi GW (2003) A minimal model for G protein-mediated synaptic facilitation and depression. *J Neurophysiol* 90:1643–1653
7. Boland LM, Bean BP (1993) Modulation of N-type calcium channels in bullfrog sympathetic neurons by luteinizing hormone-releasing hormone: kinetics and voltage dependence. *J Neurosci* 13:516–533
8. Brody DL, Patil PG, Mulle JG, Snutch TP, Yue DT (1997) Bursts of action potential waveforms relieve G-protein inhibition of recombinant P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in HEK 293 cells. *J Physiol* 499(Pt 3):637–644
9. Burgess DL, Jones JM, Meisler MH, Noebels JL (1997) Mutation of the  $\text{Ca}^{2+}$  channel  $\beta$  subunit gene *Cchb4* is associated with ataxia and seizures in the lethargic (lh) mouse. *Cell* 88:385–392
10. Caddick SJ, Wang C, Fletcher CF, Jenkins NA, Copeland NG, Hosford DA (1999) Excitatory but not inhibitory synaptic transmission is reduced in lethargic (*Cacnb4(lh)*) and tottering (*Caena1atg*) mouse thalami. *J Neurophysiol* 81:2066–2074
11. Canti C, Page KM, Stephens GJ, Dolphin AC (1999) Identification of residues in the N terminus of  $\alpha_{1B}$  critical for inhibition of the voltage-dependent calcium channel by  $G_{\beta\gamma}$ . *J Neurosci* 19:6855–6864
12. Canti C, Bogdanov Y, Dolphin AC (2000) Interaction between G proteins and accessory subunits in the regulation of  $\alpha_{1B}$  calcium channels in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 527(Pt 3):419–432
13. Chien AJ, Carr KM, Shirokov RE, Rios E, Hosey MM (1996) Identification of palmitoylation sites within the L-type calcium

- channel  $\beta_{2a}$  subunit and effects on channel function. *J Biol Chem* 271:26465–26468
14. De Waard M, Pragnell M, Campbell KP (1994)  $\text{Ca}^{2+}$  channel regulation by a conserved  $\beta$  subunit domain. *Neuron* 13:495–503
  15. De Waard M, Liu H, Walker D, Scott VE, Gurnett CA, Campbell KP (1997) Direct binding of G-protein  $\beta\gamma$  complex to voltage-dependent calcium channels. *Nature* 385:446–450
  16. De Waard M, Hering J, Weiss N, Feltz A (2005) How do G proteins directly control neuronal  $\text{Ca}^{2+}$  channel function? *Trends Pharmacol Sci* 26:427–436
  17. Doupnik CA, Pun RY (1994) G-protein activation mediates prepulse facilitation of  $\text{Ca}^{2+}$  channel currents in bovine chromaffin cells. *J Membr Biol* 140:47–56
  18. Dunlap K, Fischbach GD (1981) Neurotransmitters decrease the calcium conductance activated by depolarization of embryonic chick sensory neurones. *J Physiol* 317:519–535
  19. Eppig JJ, Dumont JN (1976) Defined nutrient medium for the in vitro maintenance of *Xenopus laevis* oocytes. *In Vitro* 12:418–427
  20. Feng ZP, Amot MI, Doering CJ, Zamponi GW (2001) Calcium channel  $\beta$  subunits differentially regulate the inhibition of N-type channels by individual  $G_{\beta}$  isoforms. *J Biol Chem* 276:45051–45058
  21. Geib S, Sandoz G, Cornet V, Mabrouk K, Fund-Saunier O, Bichet D, Villaz M, Hoshi T, Sabatier JM, De Waard M (2002) The interaction between the I–II loop and the III–IV loop of  $\text{Ca}_v2.1$  contributes to voltage-dependent inactivation in a  $\beta$ -dependent manner. *J Biol Chem* 277:10003–10013
  22. Herlitze S, Garcia DE, Mackie K, Hille B, Scheuer T, Catterall WA (1996) Modulation of  $\text{Ca}^{2+}$  channels by G-protein  $\beta\gamma$  subunits. *Nature* 380:258–262
  23. Herlitze S, Hockerman GH, Scheuer T, Catterall WA (1997) Molecular determinants of inactivation and G protein modulation in the intracellular loop connecting domains I and II of the calcium channel  $\alpha_{1A}$  subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:1512–1516
  24. Herlitze S, Xie M, Han J, Hummer A, Melnik-Martinez KV, Moreno RL, Mark MD (2003) Targeting mechanisms of high voltage-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *J Bioenerg Biomembr* 35:621–637
  25. Hille B (1994) Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci* 17:531–536
  26. Ikeda SR (1991) Double-pulse calcium channel current facilitation in adult rat sympathetic neurones. *J Physiol* 439:181–214
  27. Ikeda SR (1996) Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein  $\beta\gamma$  subunits. *Nature* 380:255–258
  28. Lin Z, Haus S, Edgerton J, Lipscombe D (1997) Identification of functionally distinct isoforms of the N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel in rat sympathetic ganglia and brain. *Neuron* 18:153–166
  29. Lipscombe D, Kongsamut S, Tsien RW (1989)  $\alpha$ -adrenergic inhibition of sympathetic neurotransmitter release mediated by modulation of N-type calcium-channel gating. *Nature* 340:639–642
  30. Marchetti C, Carbone E, Lux HD (1986) Effects of dopamine and noradrenaline on  $\text{Ca}^{2+}$  channels of cultured sensory and sympathetic neurons of chick. *Pflugers Arch* 406:104–111
  31. Meir A, Dolphin AC (2002) Kinetics and  $G_{\beta\gamma}$  modulation of  $\text{Ca}_v2.2$  channels with different auxiliary  $\beta$  subunits. *Pflugers Arch* 444:263–275
  32. Olcese R, Qin N, Schneider T, Neely A, Wei X, Stefani E, Birnbaumer L (1994) The amino terminus of a calcium channel  $\beta$  subunit sets rates of channel inactivation independently of the subunit's effect on activation. *Neuron* 13:1433–1438
  33. Page KM, Stephens GJ, Berrow NS, Dolphin AC (1997) The intracellular loop between domains I and II of the B-type calcium channel confers aspects of G-protein sensitivity to the E-type calcium channel. *J Neurosci* 17:1330–1338
  34. Page KM, Canti C, Stephens GJ, Berrow NS, Dolphin AC (1998) Identification of the amino terminus of neuronal  $\text{Ca}^{2+}$  channel  $\alpha_1$  subunits  $\alpha_{1B}$  and  $\alpha_{1E}$  as an essential determinant of G-protein modulation. *J Neurosci* 18:4815–4824
  35. Patil PG, de Leon M, Reed RR, Dubel S, Snutch TP, Yue DT (1996) Elementary events underlying voltage-dependent G-protein inhibition of N-type calcium channels. *Biophys J* 71:2509–2521
  36. Penington NJ, Kelly JS, Fox AP (1991) A study of the mechanism of  $\text{Ca}^{2+}$  current inhibition produced by serotonin in rat dorsal raphe neurons. *J Neurosci* 11:3594–3609
  37. Qin N, Olcese R, Zhou J, Cabello OA, Birnbaumer L, Stefani E (1996) Identification of a second region of the  $\beta$ -subunit involved in regulation of calcium channel inactivation. *Am J Physiol* 271: C1539–C1545
  38. Qin N, Platano D, Olcese R, Stefani E, Birnbaumer L (1997) Direct interaction of  $G_{\beta\gamma}$  with a C-terminal  $G_{\beta\gamma}$ -binding domain of the  $\text{Ca}^{2+}$  channel  $\alpha_1$  subunit is responsible for channel inhibition by G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:8866–8871
  39. Reid CA, Bekkers JM, Clements JD (2003) Presynaptic  $\text{Ca}^{2+}$  channels: a functional patchwork. *Trends Neurosci* 26:683–687
  40. Restituito S, Cens T, Barrere C, Geib S, Galas S, De Waard M, Charnet P (2000) The  $\beta_{2a}$  subunit is a molecular groom for the  $\text{Ca}^{2+}$  channel inactivation gate. *J Neurosci* 20:9046–9052
  41. Sandoz G, Lopez-Gonzalez I, Stambouliau S, Weiss N, Amoult C, De Waard M (2004) Repositioning of charged I–II loop amino acid residues within the electric field by  $\beta$  subunit as a novel working hypothesis for the control of fast P/Q calcium channel inactivation. *Eur J Neurosci* 19:1759–1772
  42. Scott RH, Dolphin AC (1990) Voltage-dependent modulation of rat sensory neurone calcium channel currents by G protein activation: effect of a dihydropyridine antagonist. *Br J Pharmacol* 99:629–630
  43. Scott VE, De Waard M, Liu H, Gurnett CA, Venzke DP, Lennon VA, Campbell KP (1996)  $\beta$  subunit heterogeneity in N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *J Biol Chem* 271:3207–3212
  44. Simen AA, Lee CC, Simen BB, Bindokas VP, Miller RJ (2001) The C terminus of the  $\text{Ca}^{2+}$  channel  $\alpha_{1B}$  subunit mediates selective inhibition by G-protein-coupled receptors. *J Neurosci* 21:7587–7597
  45. Stephens GJ, Page KM, Bogdanov Y, Dolphin AC (2000) The  $\alpha_{1B}$   $\text{Ca}^{2+}$  channel amino terminus contributes determinants for  $\beta$  subunit-mediated voltage-dependent inactivation properties. *J Physiol* 525(Pt 2):377–390
  46. Stotz SC, Hamid J, Spaetgens RL, Jarvis SE, Zamponi GW (2000) Fast inactivation of voltage-dependent calcium channels. A hinged-lid mechanism? *J Biol Chem* 275:24575–24582
  47. Takahashi T, Momiyama A (1993) Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature* 366:156–158
  48. Weiss N, De Waard M (2006) Introducing an alternative biophysical method to analyze direct G protein regulation of voltage-dependent calcium channels. *J Neurosci Methods*. DOI 10.1016/j.jneumeth.2006.08.010
  49. Weiss N, Amoult C, Feltz A, De Waard M (2006) Contribution of the kinetics of G protein dissociation to the characteristic modifications of N-type calcium channel activity. *Neurosci Res* 56:332–343
  50. Williams S, Serafin M, Muhlethaler M, Bernheim L (1997) Facilitation of N-type calcium current is dependent on the frequency of action potential-like depolarizations in dissociated cholinergic basal forebrain neurons of the guinea pig. *J Neurosci* 17:1625–1632
  51. Wu LG, Saggau P (1997) Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. *Trends Neurosci* 20:204–212
  52. Zamponi GW (2001) Determinants of G protein inhibition of presynaptic calcium channels. *Cell Biochem Biophys* 34:79–94
  53. Zamponi GW, Bourinet E, Nelson D, Nargeot J, Snutch TP (1997) Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel  $\alpha_1$  subunit. *Nature* 385:442–446
  54. Zhang JF, Ellinor PT, Aldrich RW, Tsien RW (1996) Multiple structural elements in voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels support their inhibition by G proteins. *Neuron* 17:991–1003

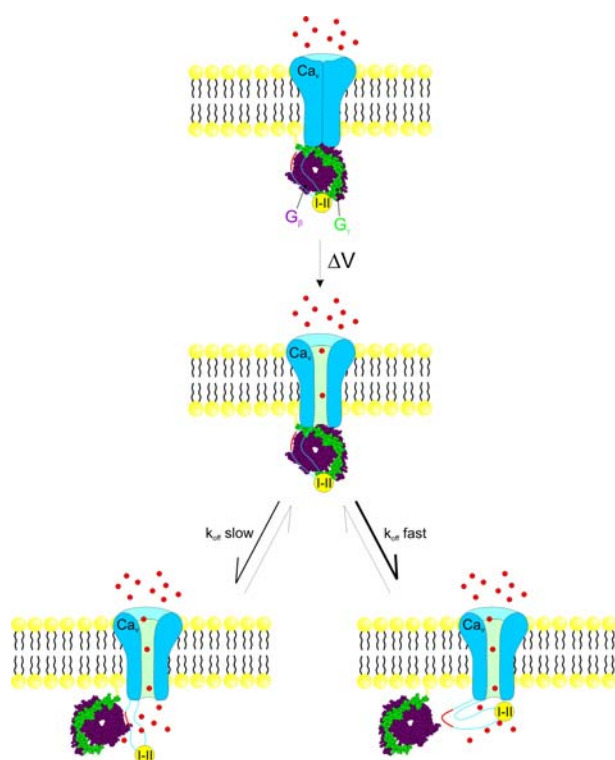
## C. Discussion

Comme nous l'avons déjà énoncé dans les deux chapitres précédents, trois paramètres biophysiques permettent de décrire la régulation directe des canaux de type N par les protéines G hétérotrimériques : (1) l'inhibition maximale du courant  $GI_{t_0}$  (pour *G-protein Inhibition at  $t = 0$  ms*), (2) la constante de temps de décrochage  $\tau$  du dimère  $G_{\beta\gamma}$  de la sous-unité  $Ca_v2.2$ , et (3) l'amplitude maximale de la relation RI (pour *Relief from Inhibition*).  $GI_{t_0}$  représente ainsi le paramètre quantitatif de la régulation "ON", alors que  $\tau$  et RI représentent les paramètres de la régulation "OFF".  $GI_{t_0}$  étant l'amplitude de l'inhibition avant que le processus de relaxation ne prenne place, c'est-à-dire juste avant la dépolarisation membranaire, ce paramètre n'est donc pas affecté ni par le voltage, ni par le temps, et par conséquent ne peut être affecté par l'inactivation rapide du canal. Aussi, l'inhibition induite par le dimère  $G_{\beta\gamma}$  reste constante quelque soit la sous-unité  $\beta$  co-exprimée avec la sous-unité  $Ca_v2.2$ . Nous avons mis en évidence précédemment que la sous-unité  $\beta_3$  n'était ni un agoniste, ni un antagonisme de la régulation "ON". Nous pouvons maintenant étendre cette notion à l'ensemble des sous-unités  $\beta$ . En revanche,  $\tau$  et RI reflètent des processus temporels, susceptibles d'être affectés par le processus d'inactivation. Aussi, il apparaît d'une part que l'inactivation rapide du canal accélère la cinétique de décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  de la sous-unité  $Ca_v2.2$ , et d'autre part qu'elle conditionne une fenêtre temporelle durant laquelle le processus de relaxation peut avoir lieu.

### 1. L'inactivation rapide : un cofacteur de la relaxation

Cette étude met en évidence une corrélation positive entre la cinétique d'inactivation rapide du canal, et la cinétique de décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  de la sous-unité  $Ca_v2.2$ . Ainsi, les canaux à inactivation rapide présentent une cinétique de décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  accélérée, alors que les canaux à inactivation lente présentent une relaxation de l'inhibition ralentie. Cette observation est en accord avec les résultats du groupe du Pr. Dolphin (Canti *et al.*, 2000), et est renforcée par l'utilisation des analogues structuraux des sous-unités  $\beta$  qui conduisent aux mêmes résultats. De manière intéressante, la mutation R387E du domaine QXXER de la boucle I-II induisait un ralentissement de la cinétique d'inactivation rapide des canaux P/Q associé à un ralentissement de la cinétique de relaxation de l'inhibition directe induite par les protéines G hétérotrimériques (Herlitze *et al.*, 1997). Au-delà de cette observation fonctionnelle, doit résider un mécanisme moléculaire reliant l'inactivation rapide

et le décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  de la sous-unité  $Ca_v2.x$ . Aussi, la boucle I-II de la sous-unité  $Ca_v$  se présente comme un élément potentiel. En effet, elle contient différents sites d'interaction du dimère  $G_{\beta\gamma}$  (De Waard *et al.*, 1997; Herlitzte *et al.*, 1997; Zamponi *et al.*, 1997), et a été proposé comme étant l'un des déterminants moléculaires de l'inactivation rapide des canaux HVA, comme nous l'avons énoncé précédemment (Stotz *et al.*, 2000; Stotz et Zamponi, 2001b; Stotz et Zamponi, 2001a; Stotz *et al.*, 2004b; Stotz *et al.*, 2004a). Le domaine QXXER étant par ailleurs impliqué dans l'inactivation rapide des canaux P/Q de manière dépendante du potentiel de membrane (Sandoz *et al.*, 2004a). Aussi, il est possible que le mouvement de la boucle I-II au cours du processus moléculaire d'inactivation suivant le mécanisme d'*hinged lid* (Stotz *et al.*, 2000) conduise à déstabiliser l'interaction du dimère  $G_{\beta\gamma}$  de la sous-unité  $Ca_v$ . Le mécanisme moléculaire d'inactivation rapide agirait ainsi en cofacteur du mécanisme moléculaire d'ouverture du canal, pour le décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  de la sous-unité  $Ca_v2.x$  (Figure 34).



**Figure 34. Modèle hypothétique du mécanisme moléculaire par lequel l'inactivation rapide contribuerait au décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$ .**

En accord avec le modèle d'inactivation rapide proposé par Stotz et collaborateurs (Stotz *et al.*, 2000), le mouvement de la boucle I-II conduit à l'inactivation du canal. En l'absence d'inactivation, le dimère  $G_{\beta\gamma}$  dissocie de la sous-unité  $Ca_v2.x$  en réponse à l'ouverture du canal, suivant une constante de temps lente. Au contraire, le mouvement de la boucle I-II au cours du processus d'inactivation, favorise le décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$ , par déstructuration de ses sites d'interaction sur le canal.

## 2. Notion de "fenêtre temporelle" de relaxation

D'un point de vue physiologique, l'arrêt de la régulation directe des protéines G hétérotrimériques peut se produire de deux façons : (1) l'arrêt de la stimulation du RCPG suite à la dégradation ou la recapture des neuromédiateurs (mimé expérimentalement par le lavage du milieu extracellulaire d'enregistrement), et (2) la dépolarisation membranaire par un train de potentiels d'action (mimé expérimentalement par l'application d'un prépulse dépolarisant). Alors que l'arrêt de la stimulation du RCPG conduit généralement à une récupération totale de l'activité des canaux, la dépolarisation membranaire ne permet qu'une relaxation partielle et transitoire de l'inhibition. De manière intéressante, si l'inactivation du canal produit une accélération de la cinétique de relaxation de l'inhibition induite, elle semble en revanche stopper prématurément le processus de récupération. En effet, les canaux à inactivation rapide (tels que les canaux  $Ca_v2.2/\beta_3$ ) ne présentent qu'une récupération partielle de l'inhibition, alors que les canaux à inactivation lente (tels que les canaux  $Ca_v2.2/\beta_{2a}$ ) présentent une récupération quasi-totale de l'inhibition. Aussi, il apparaît que l'inactivation rapide du canal détermine une fenêtre temporelle durant laquelle le processus de récupération peut se produire, et ce avant que le canal ait inactivé. Les canaux à inactivation lente possèdent une fenêtre temporelle de récupération importante puisque l'inactivation ne vient pas interférer avec le processus. Inversement, les canaux à inactivation rapide ne présentent qu'une faible opportunité de récupération, le processus d'inactivation venant "éteindre" le canal avant que celui-ci ait eu le temps de récupérer de l'inhibition et retrouver une activité ionique. Aussi, nous avons mis en évidence une corrélation négative entre l'amplitude de la récupération de l'inhibition induite par les protéines G hétérotrimériques et la cinétique d'inactivation des canaux, indépendamment de la sous-unité  $\beta$  considérée. Il apparaît ainsi que les sous-unités  $\beta$  affectent différemment la régulation directe des canaux N par les protéines G uniquement de part le fait qu'elles affectent différemment la cinétique d'inactivation du canal.

Enfin, la cinétique de relaxation de l'inhibition apparaît ainsi être contrôlée à la fois par l'ouverture du canal, mais également par son inactivation, alors que la fenêtre temporelle durant laquelle le processus peut se produire semble être conditionnée uniquement par l'inactivation du canal. Aussi, il est probable que l'ouverture et l'inactivation du canal puissent eux aussi être modulés, indépendamment l'un de l'autre, via d'autres acteurs moléculaires ou suite à des modifications biochimiques du canal telles que des

phosphorylations, permettant un contrôle plus fin de la régulation directe des VGCCs par les RCPGs.

### 3. Implication dans le phénotype de la régulation G

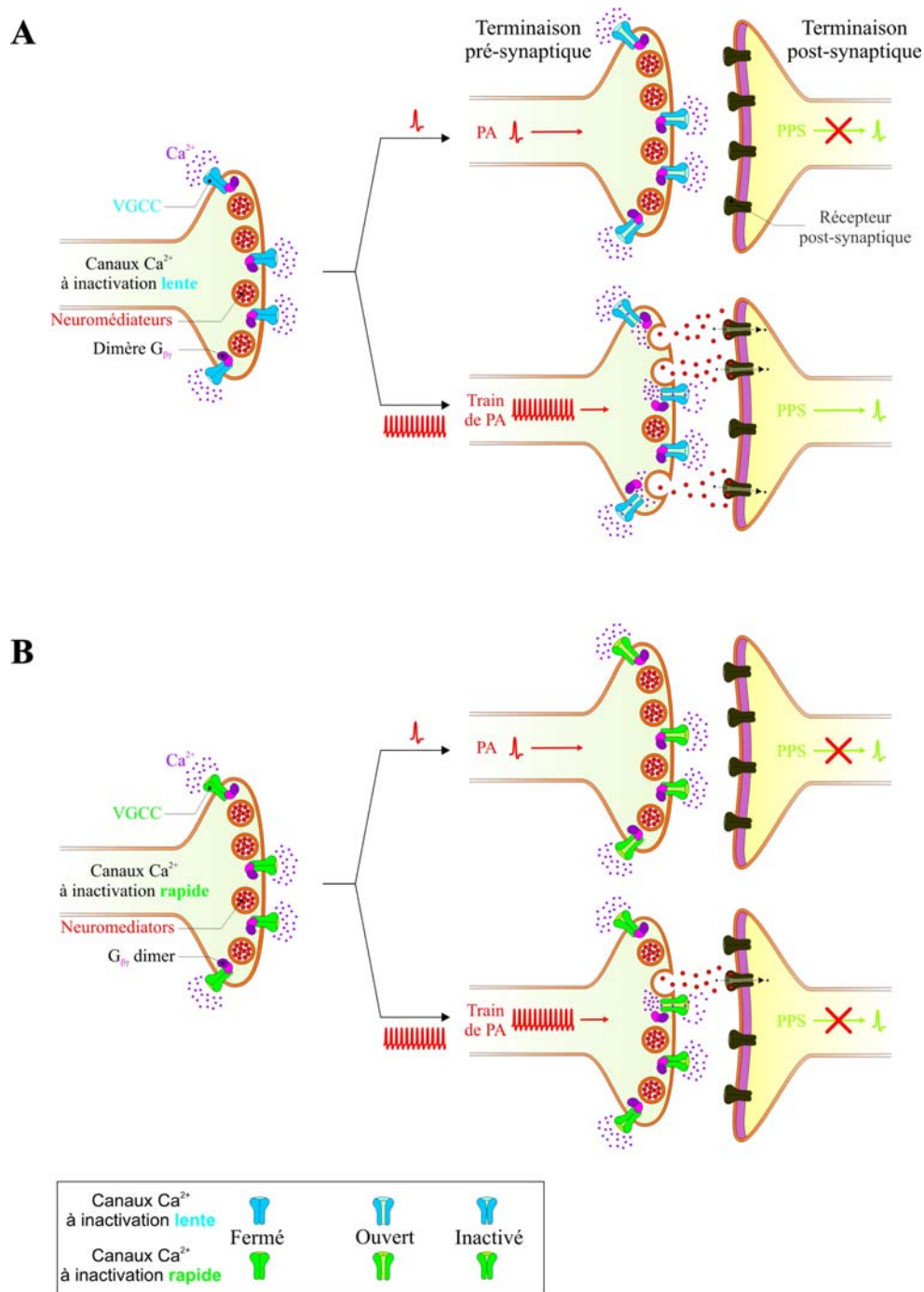
Comme nous l'avons déjà mentionné à plusieurs reprises, le décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  de la sous-unité  $Ca_v2.x$  est à l'origine de l'ensemble des modifications phénotypiques de la régulation "OFF". Aussi, l'inactivation rapide du canal, en affectant le processus de récupération de l'inhibition, joue un rôle crucial dans le phénotype de la régulation des canaux N par les protéines G. Sur la base de deux conditions extrêmes d'inactivation, nous avons ainsi pu mettre en évidence que les canaux  $Ca_v2.2/\beta_{1b \Delta N}$  (inactivation lente) présentent un ralentissement important de la cinétique d'inactivation, alors que le shift dépolarisant de la courbe d'activation du canal est absent, et que l'inhibition aux pics des courants est faible. Inversement, les canaux  $Ca_v2.2/\beta_{1b}$  (inactivation rapide) ne présentent qu'un faible ralentissement de leur cinétique d'activation, mais une forte inhibition ainsi qu'un shift dépolarisant de la courbe d'activation marqué. Il apparaît ainsi que les différentes modifications phénotypiques induites par la régulation directe des protéines G hétérotrimériques ne sont pas nécessairement corrélées les unes aux autres. Un important ralentissement de la cinétique d'activation du courant n'étant pas nécessairement gage d'un important shift dépolarisant de la courbe d'action du canal. Aussi, l'absence d'un phénotype particulier n'est pas obligatoirement le reflet d'une absence d'inhibition directe par les protéines G hétérotrimériques.

### 4. Importance physiologique

En raison des modifications post-transcriptionnelles (épissage alternatif) que subit l'ARNm codant pour la sous-unité  $Ca_v2.2$  (Lin *et al.*, 1997; Bell *et al.*, 2004), les canaux calciques de type N présentent une certaine hétérogénéité fonctionnelle, amplifiée encore par leurs différences de composition moléculaire en sous-unités régulatrices (Scott *et al.*, 1996). Si cette hétérogénéité dans la composition moléculaire des canaux N se retrouve à travers différentes cellules neuronales, elle est également présente au sein d'une même cellule (Reid *et al.*, 2003). Peu de choses sont connues au niveau de l'importance fonctionnelle de cette hétérogénéité. Pour l'heure, et contrairement au canal P/Q, aucune mutation dans le gène *CACNA1B* codant pour la sous-unité  $Ca_v2.2$  n'a été relevée. Aussi, il est difficile de savoir quelles pourraient être les conséquences physiopathologiques d'une altération des propriétés



biophysiques des canaux N. Toutefois, certaines données sont disponibles au sujet de leurs sous-unités régulatrices. Ainsi, chez l'homme, la mutation R482X présente dans le gène *CACNB4* codant pour la sous-unité  $\beta_4$ , introduit un codon stop prématurément, conduisant à la délétion des 38 derniers acides aminés de la protéine (Escayg *et al.*, 2000). Cette mutation de la sous-unité  $\beta_4$ , associée à un phénotype épileptique myoclonique juvénile (JME), pourrait être à l'origine d'une altération de l'activité des canaux N, même si elle ne semble pas affecter de manière drastique les canaux P/Q (Escayg *et al.*, 2000). Chez la souris, un phénotype léthargique a été mis en évidence dans une lignée spontanée, chez laquelle l'insertion de quatre nucléotides dans le gène *Cacnb4* conduit à l'absence totale de sous-unité  $\beta_4$  fonctionnelle (Burgess *et al.*, 1997). Ces animaux présentent un remaniement dans la composition moléculaire des canaux N (Burgess *et al.*, 1997), associé à une diminution de la transmission synaptique (Caddick *et al.*, 1999), suggérant une altération de l'activité de ces canaux, ou de leur régulation. Une des régulations synaptiques largement influencée par la composition moléculaire des canaux calciques concerne l'inhibition directe par les RCPGs. Comme nous l'avons déjà mentionné, la relaxation de l'inhibition des canaux N est largement dépendante de la durée (Brody *et al.*, 1997) et de la fréquence (Penington *et al.*, 1991; Williams *et al.*, 1997) des potentiels d'action. Ainsi, il est probable que l'inhibition / récupération de l'activité synaptique par les GPCRs dépende également de la composition moléculaire des canaux calciques présents au niveau des terminaisons présynaptiques (Figure 35). Cette inhibition / récupération différentielle se présente dès lors comme un possible mécanisme moléculaire de codage de l'information synaptique. Aussi, il a été proposé par le groupe du Dr. Zamponi un modèle d'intégration synaptique potentiellement impliqué dans la potentialisation / dépression à court terme (Bertram *et al.*, 2003).



**Figure 35. Implication hypothétique de l'inactivation rapide dans l'activité synaptique au cours de la régulation G.**

Sous inhibition protéine G, l'arrivée d'un potentiel d'action (PA) unique au niveau de la terminaison présynaptique n'est pas suffisante à lever l'inhibition des canaux calciques. En revanche, un train de potentiel d'action est capable d'induire la relaxation des canaux à inactivation lente (A), et permettre alors de restaurer la transmission synaptique. Dans le cas d'une terminaison présynaptique contenant des canaux à inactivation rapide (B), le train de potentiel d'action conduit rapidement à l'inactivation des canaux calciques, stoppant prématurément le processus de relaxation, l'activité synaptique n'étant alors pas restaurée.

## CONCLUSION GENERALE et PERSPECTIVES

Les canaux calciques activés par le potentiel électrique de membrane (VGCCs) se présentent sous la forme de complexes multiprotéiques, formés d'une sous-unité principale  $Ca_v$ , centrée autour de différentes sous-unités auxiliaires  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\alpha_2\delta$  (pour revue voir (Walker et De Waard, 1998)). Ils représentent une des voies majeures d'entrée du calcium dans la cellule nerveuse en réponse à une dépolarisation membranaire. Au niveau des terminaisons présynaptiques, ces structures participent activement aux processus moléculaires de la transmission synaptique en contrôlant finement l'entrée de calcium dans la cellule (Meir *et al.*, 1999). Via une boucle de rétrocontrôle négatif, ou par l'activité de neurones afférents, ces canaux, en permettant la libération des neuromédiateurs, se voient à leur tour être modulés par les neuromédiateurs eux mêmes. Ce phénomène, décrit pour la première fois en 1978 par Dunlap et Fischbach (Dunlap et Fischbach, 1978), met en jeu l'activation des récepteurs à sept domaines transmembranaires, couplés aux protéines G hétérotrimériques (RCPGs). Cette régulation nécessite la fixation du dimère  $G_{\beta\gamma}$  sur différents déterminants structuraux de la sous-unité  $Ca_v2.x$ , et conduit à une inhibition drastique du courant calcique (Bean, 1989). Cette inhibition étant en partie reversée par l'application d'un prépulse dépolarisant (Ikeda, 1991) ou d'un train de potentiels d'action (Brody *et al.*, 1997). Aussi, la fixation du dimère  $G_{\beta\gamma}$  sur la sous-unité  $Ca_v2.x$  est à l'origine de la régulation "ON" des VGCCs par les RCPGs, alors que son décrochage caractérise la régulation "OFF". Les régulation "ON" et "OFF" sont ainsi décrites par un ensemble de modifications phénotypiques de l'activité du canal. La régulation "ON" s'illustre par une inhibition du courant calcique (Boland et Bean, 1993), associée à un shift dépolarisant de la courbe d'activation du canal (Bean, 1989), caractéristique du mode "*reluctant*", alors que le développement de la régulation "OFF" se traduit par un ralentissement apparent de la cinétique d'activation du canal (Boland et Bean, 1993), et une relaxation de l'inhibition (facilitation) en réponse au prépulse dépolarisant (Ikeda, 1991) ou au train de potentiels d'action (Brody *et al.*, 1997). Voici résumé, d'un point de vue bibliographique, le tableau phénotypique de la régulation directe des VGCCs par les RCPGs au niveau de la cellule entière.

Ce travail de thèse se voulait d'essayer d'approfondir les bases moléculaires de cette régulation. Aussi, nous avons (1) proposé une mécanistique de la notion de "*reluctance*" fondamentalement différente de celles proposées à ce jour dans la bibliographie, (2) ajouté un

caractère nouveau à la régulation "ON", (3) élucidé l'implication agoniste / antagonisme de la sous-unité  $\beta$  dans cette régulation, et enfin (4) nous avons mis en évidence le rôle majeur de l'inactivation rapide du canal dans la régulation "OFF". Ces quatre notions vont être brièvement résumées et discutées, afin de proposer une mise à jour du tableau phénotypique de la régulation directe des VGCCs par les protéines G hétérotrimériques.

### I. La reluctance : un caractère de la régulation "OFF"

La notion de "*reluctance*" qualifierait la transition du canal d'un mode "*willing*" de haute sensibilité au voltage, vers un mode "*reluctant*" de plus faible sensibilité (Bean, 1989), suite à la fixation du dimère  $G_{\beta\gamma}$  sur la sous-unité  $Ca_v2.x$ . Aussi, le shift dépolarisant de la courbe d'activation du canal représenterait la signature phénotypique de cette transition de mode (Bean, 1989). Deux théories ont été proposées comme bases moléculaires à cette transition : (1) l'altération d'un déterminant moléculaire de la sous-unité  $Ca_v2.x$  impliqué dans la détection du potentiel électrique de membrane (senseur de voltage) (Bean, 1989), et (2) le déplacement stérique de la sous-unité  $\beta$  du canal suite à la fixation du dimère  $G_{\beta\gamma}$  sur la sous-unité  $Ca_v2.x$  (Sandoz *et al.*, 2004b). Si le premier modèle reste fragile en raison du fait que le senseur de voltage n'a jamais été identifié, le second modèle, de part son mécanisme moléculaire basé sur la présence de sous-unités  $\beta$ , restreint la régulation directe des VGCCs par les protéines G hétérotrimériques aux canaux associés à une sous-unité  $\beta$ . Aussi, nous avons mis en évidence, par une méthode de simulation des courants sous régulation G, que la fraction variable de courant récupéré suite au décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  de la sous-unité  $Ca_v2.2$  en réponse à une dépolarisation membranaire, pouvait largement induire le shift dépolarisant de la courbe d'activation du canal, faisant finalement de la notion de "*reluctance*" non pas un mécanisme de la régulation "ON", mais une conséquence de la régulation "OFF". Le shift dépolarisant de la courbe d'activation du canal ne semble donc pas avoir de fondements moléculaires, et reflète simplement le décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  de la sous-unité  $Ca_v2.2$ , au même titre que le ralentissement apparent de la cinétique d'activation ou le phénomène de facilitation. Aussi, le shift dépolarisant de la courbe d'activation des courants de *gating* (Patil *et al.*, 1996) peut lui aussi être expliqué par le décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  de la sous-unité  $Ca_v2.2$  durant le processus moléculaire d'ouverture du canal. Bien que nous ne puissions pas exclure totalement l'existence d'une altération moléculaire de la

sensibilité du canal au voltage, il est cependant fortement probable que sa contribution dans le shift dépolarisant de la courbe d'activation du canal resterait limitée.

## II. Le dimère $G_{\beta\gamma}$ : un modulateur de l'inactivation

La fixation du dimère  $G_{\beta\gamma}$  sur la boucle I-II de la sous-unité  $Ca_v2.x$  demeure largement discutée quant à son implication dans l'inhibition directe du courant calcique (Zhang *et al.*, 1996; Page *et al.*, 1997; Canti *et al.*, 1999). Aussi, il a été suggéré que la boucle I-II ne serait pas directement impliquée dans la régulation "ON" des VGCCs par les GPCRs, mais occuperait plutôt un rôle dans la régulation "OFF", c'est-à-dire dans le processus moléculaire de décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  de la sous-unité  $Ca_v2.x$  (Page *et al.*, 1997). La caractérisation de la régulation "ON" vis-à-vis de l'activité du canal calcique reste difficile à mettre en œuvre en raison du fait que l'interaction du dimère  $G_{\beta\gamma}$  sur le canal empêche tout flux ionique, rendant alors difficile la caractérisation de ses propriétés biophysiques. Aussi, à travers une méthode indirecte d'enregistrement de l'activité d'un canal calcique lié aux protéines G, nous avons mis en évidence que la fixation du dimère  $G_{\beta\gamma}$  sur la sous-unité  $Ca_v2.2$  induit un ralentissement de la cinétique d'inactivation des canaux N. Pour l'heure, nous ne disposons pas d'évidences expérimentales sur les bases moléculaires de ce ralentissement. Toutefois, nous savons que le dimère  $G_{\beta\gamma}$  est capable d'interagir d'une part avec la boucle I-II de la sous-unité  $Ca_v2.x$ , et d'autre part avec la membrane plasmique via la sous-unité  $\gamma$  et ses groupements guanylguanyle ou farnesyle. De plus, en accord avec le modèle d'inactivation rapide des canaux HVA proposé par le groupe du Dr. Zamponi, la boucle I-II formerait une particule d'inactivation venant obstruer physiquement le pore ionique suivant un mouvement d' "hinged lid" (Stotz *et al.*, 2000). Aussi, nous proposons que le dimère  $G_{\beta\gamma}$  puisse moduler l'inactivation du canal calcique en ralentissant le mouvement de la boucle I-II via son ancrage membranaire. De ce point de vue, il pourrait exister des analogies avec le mécanisme moléculaire par lequel la sous-unité  $\beta_{2a}$  produit un ralentissement de l'inactivation des VGCCs (Restituito *et al.*, 2000).

Ainsi, le ralentissement de la cinétique d'inactivation du canal se présente comme nouveau caractère de la régulation "ON", et vient compléter le tableau moléculaire de la régulation directe des VGCCs par les protéines G hétérotrimériques.

### III. La sous-unité $\beta$ : ni agoniste, ni antagoniste de la régulation "ON"

Le rôle de la sous-unité  $\beta$  dans la régulation directe des VGCCs par les RCPGs a été controversé. Si une étude suggère qu'elle serait agoniste de cette régulation (Meir *et al.*, 2000), la majorité des travaux s'accordent à dire que la sous-unité  $\beta$  serait un antagoniste de l'inhibition directe du courant calciques par les protéines G hétérotrimériques (Roche *et al.*, 1995; Bourinet *et al.*, 1996a; Roche et Treistman, 1998b), suivant un mécanisme de compétition entre la sous-unité  $\beta$  et le dimère  $G_{\beta\gamma}$ . Toutefois, l'accélération de la cinétique de décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  induit par la sous-unité  $\beta$  (Roche et Treistman, 1998a), contribue largement à sous estimer l'amplitude de l'inhibition, mesurée généralement aux pics des courants. Aussi, sur la base d'une nouvelle méthode d'analyse de cette régulation, que nous avons développé comme alternative aux prépulses dépolarisants, nous mettons en évidence que l'inhibition maximale du courant calcique, avant que le processus de relaxation n'ait pris place, est indépendante de la présence ou non de la sous-unité  $\beta$ , suggérant qu'il n'existe pas d'antagonisme  $\beta$  vis-à-vis de l'inhibition du courant calcique. En revanche, le fait que la sous-unité  $\beta$  accélère la cinétique de décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  lorsque le canal est activé suggère qu'elle pourrait malgré tout induire une perte d'affinité du dimère  $G_{\beta\gamma}$  pour la sous-unité  $Ca_v2.2$ , peut être via la perte d'éléments structuraux du GPBP.

### IV. L'inactivation rapide : déterminant de la régulation "OFF"

Si les différentes étapes du processus moléculaire conduisant à l'ouverture du canal (ou l'ouverture du canal elle-même) sont à l'origine du décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  de la sous-unité  $Ca_v2.x$ , un certain nombre d'évidences expérimentales suggéraient que l'inactivation rapide du canal puisse être impliquée dans la régulation directe des canaux calciques par les protéines G hétérotrimériques. Nous avons ainsi mis en évidence la participation de l'inactivation dans la régulation "OFF". Aussi, l'inactivation rapide du canal se présente comme un cofacteur de la cinétique de décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  de la sous-unité  $Ca_v2.x$ , probablement via le mouvement de la boucle I-II au cours du processus moléculaire d'inactivation. Toutefois, si elle potentialise la relaxation de l'inhibition, elle détermine également une fenêtre temporelle durant laquelle le processus de relaxation peut avoir lieu. Ainsi, en contrôlant d'une part la cinétique de relaxation, et d'autre part la durée du

phénomène, l'inactivation semble contrôler la probabilité d'un canal à récupérer de l'inhibition directe par les protéines G en réponse à une dépolarisation membranaire.

Enfin, en participant activement au décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  de la sous-unité  $Ca_v2.2$ , l'inactivation rapide influence de manière drastique le phénotype de la régulation "OFF", apportant une base moléculaire aux différences généralement observées.

## V. Deux questions essentielles

La première description de la régulation des VGCCs par les RCPGs remonte à la fin des années 70 avec les travaux pionniers de Dunlap et Fischback (Dunlap et Fischbach, 1978). De nombreux travaux se sont par la suite attachés à comprendre les mécanismes moléculaires à la base de cette régulation. Ces différents travaux permettent aujourd'hui de proposer que la fixation du dimère  $G_{\beta\gamma}$  induit l'inhibition des courants calciques (régulation "ON"), alors que son décrochage produit un ensemble de modifications phénotypiques de l'activité apparente du canal (régulation "OFF"). Ceci ouvre deux questions essentielles : (1) comment le dimère  $G_{\beta\gamma}$  induit-il l'inhibition du courant calcique ?, et (2) quels sont les mécanismes moléculaires permettant le décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  de la sous-unité  $Ca_v2.x$  ?

En dépit des multiples travaux réalisés, force est de constater qu'à ce jour, ces deux questions demeurent sans réponse. Aussi, nous ne connaissons en définitive pas grand-chose des bases moléculaires de la régulation directe des VGCCs par les protéines G hétérotrimériques. Nous avons déjà discuté d'un possible mécanisme d'inhibition du courant calcique par le dimère  $G_{\beta\gamma}$  dans la seconde partie de l'introduction. Bien que peu d'évidences expérimentales existent, le ralentissement du mouvement du "*voltage-sensor paddle*" par le dimère  $G_{\beta\gamma}$  suivant un mécanisme de "*voltage-sensor trapping*" (Zhong *et al.*, 2001) se présente comme un mécanisme moléculaire d'inhibition séduisant. Aussi, afin d'aller plus loin dans la caractérisation de ce potentiel mécanisme d'inhibition, il semble important de tester en premier lieu l'interaction entre les différents segments S4 de la sous-unité  $Ca_v2.x$  et la sous-unité  $G_{\beta}$ . Si cette interaction existe, nous aurions là une première base du mécanisme moléculaire d'inhibition du courant calcique par le dimère  $G_{\beta\gamma}$ . De plus, si l'inhibition du courant calcique se produit suivant ce mécanisme moléculaire, il est probable que le décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  mette en jeu les mêmes déterminants structuraux de la sous-unité  $Ca_v2.x$ , le mouvement du "*voltage sensor paddle*" au cours du processus d'ouverture du canal conduisant au décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  des segments S4.

## VI. Implications physiopathologiques

La régulation "OFF" des VGCCs par les RCPGs étant très largement dépendante de la dépendance d'activation du canal, sa cinétique d'inactivation rapide, et probablement de sa probabilité d'ouverture comme nous l'avons suggéré. Aussi, toutes altérations de l'une ou l'autre de ces caractéristiques pourraient être susceptibles de conduire à une altération de la régulation directe des canaux calciques par les protéines G hétérotrimériques. Pour l'heure, aucune mutation pathologique n'a été relevée dans la sous-unité  $Ca_v2.2$ . En revanche, comme nous l'avons vu en introduction, chez l'homme, de nombreuses mutations (17 mutations faux sens relevées à ce jour) ont été décrites dans le gène *CACNA1A* codant pour la sous-unité  $Ca_v2.1$ . Elles sont impliquées dans la physiopathologie de la migraine hémiplésique familiale de type I (MHF-I) (Ophoff *et al.*, 1996), et sont dans certains cas associées à des signes d'ataxie cérébelleuse (voir [Annexe 2](#)). Ces mutations sont généralement de type "gain de fonction" et induisent un shift hyperpolarisant de la courbe d'activation des canaux P/Q. Aussi, il est attendu que l'inhibition directe des courants P/Q par les RCPGs soit également affectée de manière indirecte, à travers les altérations des propriétés biophysiques de la sous-unité  $Ca_v2.1$  induites par ces mutations. Il a ainsi été mis en évidence que la mutation R192Q (Kraus *et al.*, 1998; Hans *et al.*, 1999), localisée dans la région proximale du premier segment S4 de la sous-unité  $Ca_v2.1$ , induit une diminution de l'inhibition des courants P/Q suite à l'activation par le quinpirole du récepteur dopaminergique D2 (Melliti *et al.*, 2003). Cette mutation étant à l'origine d'une augmentation de la probabilité d'ouverture du canal, il est probable que cette diminution de l'inhibition du courant calcique soit liée à une accélération de la cinétique de décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  de la sous-unité  $Ca_v2.1$ . Aussi, la majorité des mutations MHF-I modifiant les propriétés biophysiques des canaux P/Q, leur caractérisation systématique dans le contexte de la régulation directe par les protéines G hétérotrimériques, pourrait apporter de précieuses informations quant à leurs implications dans les mécanismes moléculaires de la MHF-I.



**The calcium channel  $\beta_{4a}$  subunit: a scaffolding protein between voltage-gated calcium channel and presynaptic vesicle-release machinery?**

Norbert Weiss

*The Journal of Neuroscience* (2006) **26**: 6117-6118

**Editor's Note:** These short reviews of a recent paper in the *Journal*, written exclusively by graduate students or postdoctoral fellows, are intended to mimic the journal clubs that exist in your own departments or institutions. For more information on the format and purpose of the Journal Club, please see [http://www.jneurosci.org/misc/ifa\\_features.shtml](http://www.jneurosci.org/misc/ifa_features.shtml).

## The Calcium Channel $\beta_{4a}$ Subunit: A Scaffolding Protein Between Voltage-Gated Calcium Channel and Presynaptic Vesicle-Release Machinery?

Norbert Weiss<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U607, Laboratoire Canaux Calciques, Fonctions et Pathologies, 38054 Grenoble Cedex 09, France,

<sup>2</sup>Commissariat à l'Energie Atomique, Grenoble, France, and <sup>3</sup>Université Joseph Fourier, Grenoble, France

Review of Vendel et al. (<http://www.jneurosci.org/cgi/content/full/26/10/2535>)

Neuronal voltage-gated calcium channels represent a major pathway for calcium entry into nerve termini, where they control neurotransmitter release. The channels are composed of a pore-forming subunit ( $\text{Ca}_v2.x$ ) and auxiliary subunits ( $\text{Ca}_v\beta_{1-4}$ ,  $\alpha_2\Delta_{1-4}$  and  $\gamma_{1-8}$ ). The cytoplasmic  $\text{Ca}_v\beta$  subunits belong to the membrane-associated guanylate kinase (GK) family of proteins and regulate trafficking to the plasma membrane and gating properties of  $\text{Ca}_v2.x$  channels. Their five domains (A–E), include hypervariable A, C, and E domains linked to the highly conserved Src homology 3 (SH3) (B) and GK (D) domains. The crystal structure of the core domains (B–D) of several  $\beta$  subunits was recently elucidated (Chen et al., 2004; Opatowsky et al., 2004; Van Petegem et al., 2004), but less is known about the structure of the A and E domains. A recent report published in *The Journal of Neuroscience* provides new information on the  $\text{Ca}_v\beta_{4a}$  subunit hypervariable A domain ( $\text{Ca}_v\beta_{4a}\text{-A}$ ) (Vendel et al., 2006a). The authors previously showed that alternative splicing of the  $\text{Ca}_v\beta_4\text{-A}$  domain generates

two distinct proteins,  $\text{Ca}_v\beta_{4a}$  and  $\text{Ca}_v\beta_{4b}$  (Helton and Horne, 2002), and they recently provided the solution structure of the  $\text{Ca}_v\beta_{4a}\text{-A}$  domain (Vendel et al., 2006b). Vendel et al. now address the expression pattern of the  $\text{Ca}_v\beta_{4a}$  splice variant and the functional importance of the  $\text{Ca}_v\beta_{4a}\text{-A}$  domain.

Using immunohistochemistry, the authors show that the  $\text{Ca}_v\beta_{4a}$  splice variant was expressed as punctuate structures throughout the molecular layer of the cerebellum [Vendel et al. (2006a), their Fig. 3D, E (<http://www.jneurosci.org/cgi/content/full/26/10/2635/F3>)]. In contrast,  $\text{Ca}_v\beta_{4b}$  was expressed in basket cells surrounding Purkinje cell bodies as well as in the Bergmann glia [Vendel et al. (2006a), their Fig. 3F (<http://www.jneurosci.org/cgi/content/full/26/10/2635/F3>)]. To determine the functional importance of the  $\text{Ca}_v\beta_{4a}\text{-A}$  domain, the authors performed two electrode voltage-clamp recording in *Xenopus laevis* oocytes expressing  $\text{Ca}_v2.1$  channels (P/Q type currents) in combination with  $\alpha_2\Delta$  and  $\text{Ca}_v\beta_{4a}$  subunits with (ABCDE) or without (BCDE) the N-terminal A domain. The  $\text{Ca}_v\beta_{4a}\text{-A}$  domain was not essential for the expression of the  $\text{Ca}_v2.1$  channel at the plasma membrane and did not influence gating properties. Indeed, no difference was observed in current amplitude [Vendel et al. (2006a), their Fig. 2A (<http://www.jneurosci.org/cgi/content/full/26/10/2635/F2>)], nor in the

voltage dependence of activation or inactivation [Vendel et al. (2006a), their Fig. 2C, D (<http://www.jneurosci.org/cgi/content/full/26/10/2635/F2>)]. These results are, however, in agreement with published studies (Bichet et al., 2000; Van Petegem et al., 2004) because (1) enhanced  $\text{Ca}_v2.x$  subunit trafficking to the plasma membrane occurs after binding of the  $\text{Ca}_v\beta$  subunit to the channel (Bichet et al., 2000) via the  $\alpha$  interaction domain (AID)-binding pocket within the GK domain (Van Petegem et al., 2004), and (2) the molecular determinants by which the  $\text{Ca}_v\beta$  subunit modulates channel gating remain unclear but are probably carried by the conserved core domains because all  $\text{Ca}_v\beta$  subtypes are able to modulate the biophysical properties of the channel. However, it is more surprising that channel inactivation kinetics was not influenced by deletion of the  $\text{Ca}_v\beta_{4a}\text{-A}$  domain [Vendel et al. (2006a), their Fig. 2B (<http://www.jneurosci.org/cgi/content/full/26/10/2635/F2>)]. Indeed, it is known that a deletion of the N-terminal of  $\text{Ca}_v\beta$  subunits results in a drastic slowing of channel inactivation kinetics (Olcese et al., 1994). It seems not to be the case for the  $\text{Ca}_v\beta_{4a}$  splice variant. Thus, further investigations will provide interesting structural information on how the N-terminal of  $\text{Ca}_v\beta$  subunits controls channel inactivation.

Because the  $\text{Ca}_v\beta_{4a}\text{-A}$  domain was not

Received April 20, 2006; revised April 27, 2006; accepted April 27, 2006.

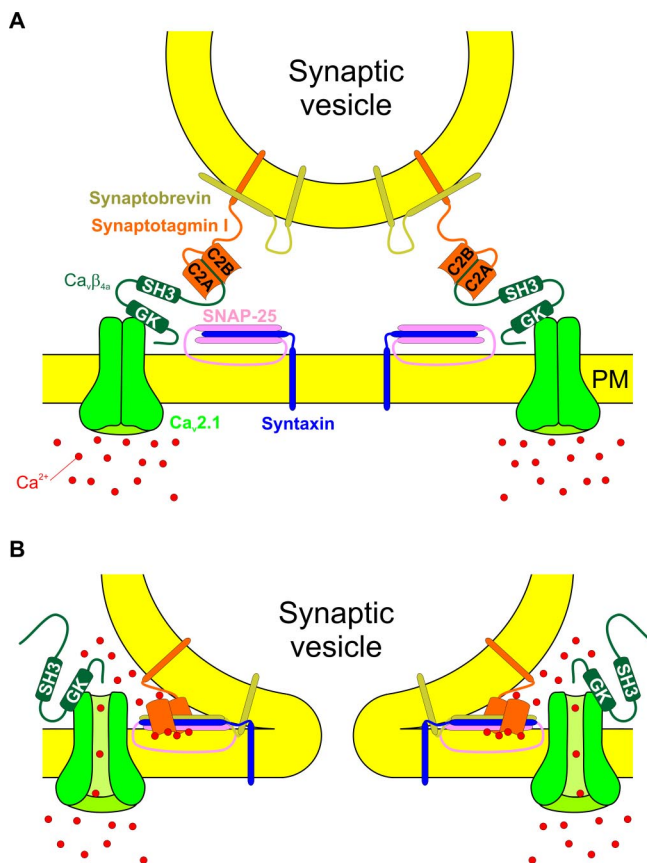
Correspondence should be addressed to Norbert Weiss, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U607, Laboratoire Canaux Calciques, Fonctions et Pathologies, Commissariat à l'Energie Atomique/DRDC/Bâtiment C3, 17 Rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 09, France. E-mail: norbert.weiss@cea.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.1699-06.2006

Copyright © 2006 Society for Neuroscience 0270-6474/06/266117-02\$15.00/0

a key determinant in the regulation of  $Ca_v2.1$  channel gating, Vendel et al. looked for a role of this domain in protein–protein interactions. Using the yeast two-hybrid system, the authors screened a human cerebellum cDNA library with the  $Ca_v\beta_{4a}$ -A domain (amino acids 1–58). Synaptotagmin I (Syt I) (amino acids 95–337 including the entire C2A domain and a half of the C2B domain) as well as the microtubule-associated protein 1A (MAP1A) (amino acids 2508–2775 corresponding to the complete LC2 domain) interacted specifically with the N-terminal A domain of the  $Ca_v\beta_{4a}$  splice variant but not with the  $Ca_v\beta_{4b}$ -A domain [Vendel et al. (2006a), their Fig. 4B (<http://www.jneurosci.org/cgi/content/full/26/10/2635/F4>)]. The authors then focused their study on Syt I and confirmed its interaction with the  $Ca_v\beta_{4a}$ -A domain by *in vitro* pull-down experiments. The interaction did not occur in the presence of 10 mM  $Ca^{2+}$  and could also be disrupted by adding  $Ca^{2+}$  to the medium [Vendel et al. (2006a), their Fig. 5C (<http://www.jneurosci.org/cgi/content/full/26/10/2635/F5>)]. These data certainly represent the most important findings of this study.

In conclusion, Vendel et al. (2006a) provide evidence that alternative splicing of the N-terminal A domain of the  $Ca_v\beta_4$  auxiliary subunit confers functions other than modulations of channel gating and trafficking. Because  $Ca_v\beta_{4a}$  splicing variant can bind synaptotagmin I, an important protein for presynaptic vesicle release, the  $\beta$  subunit, could conceivably act as a scaffolding element to facilitate coupling of calcium signaling with neurotransmitter release (Fig. 1). However, the authors do not provide evidence that  $Ca_v\beta_{4a}$  can bind  $Ca_v2.1$  channel and Syt I simultaneously. Pull-down experiments performed by preincubating the full-length  $Ca_v\beta_{4a}$  with the AID peptide (the molecular determinant of the  $Ca_v\beta$  subunit) before adding Syt I could partially answer this question. Finally, the fact that  $Ca_v\beta_{4a}$ –Syt I interaction is disrupted by  $Ca^{2+}$  is interesting. In this context, we speculate that at basal  $Ca^{2+}$  levels,  $Ca_v\beta_{4a}$  interacts both with  $Ca_v2.1$  and Syt I to organize the vesicle-release machinery and that calcium entry into cells via voltage-gated calcium channels breaks this inter-



**Figure 1.** A putative model of coupling between voltage-gated calcium channels, calcium signaling, and presynaptic vesicle-release machinery. **A**, In basal condition with a low  $Ca^{2+}$  level,  $Ca_v\beta_{4a}$  interacts both with  $Ca_v2.1$  channel and Syt I to position the synaptic vesicle in front of the channel to better couple calcium signaling and neurotransmitter release. **B**, Calcium entry into the cell via voltage-gated calcium channels and after membrane depolarization disrupts  $Ca_v\beta_{4a}$ –Syt I interaction. The content of the synaptic vesicle is thus released by the fusion of the vesicle with the plasma membrane after soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein (SNAP) receptors v-SNAREs (synaptobrevin and synaptotagmin I) and t-SNAREs (syntaxin and SNAP 25) interactions. PM, Plasma membrane.

action, thus releasing the vesicle to allow fusion with the plasma membrane. FRET experiments using tagged Syt I and  $Ca_v\beta_{4a}$  in the presence of  $Ca_v2.1$  channels before and during membrane depolarization might address such a possible mechanism.

## References

- Bichet D, Cornet V, Geib S, Carlier E, Volsen S, Hoshi T, Mori Y, De Waard M (2000) The I-II loop of the  $Ca^{2+}$  Channel  $\alpha_1$  subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron* 25:177–190.
- Chen YH, Li MH, Zhang Y, He LL, Yamada Y, Fitzmaurice A, Shen Y, Zhang H, Tong L, Yang J (2004) Structural basis of the  $\alpha_1$ - $\beta$  subunit interaction of voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels. *Nature* 429:675–680.
- Helton TD, Horne WA (2002) Alternative splicing of the  $\beta_4$  subunit has  $\alpha_1$  subtype-specific effects on  $Ca^{2+}$  channel gating. *J Neurosci* 22:1573–1582.
- Olcese R, Qin N, Schneider T, Neely A, Wei X, Stefani E, Birnbaumer L (1994) The amino terminus of a calcium channel  $\beta$  subunit sets rates of channel inactivation independently of the subunit's effect on activation. *Neuron* 13:1433–1438.
- Opatowsky Y, Chen CC, Campbell KP, Hirsch JA (2004) Structural analysis of the voltage-dependent calcium channel beta subunit functional core and its complex with the  $\alpha_1$  interaction domain. *Neuron* 42:387–399.
- Van Petegem F, Clark KA, Chatelain FC, Minor DL (2004) Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel b-subunit and an alpha-subunit domain. *Nature* 429:671–675.
- Vendel AC, Terry MD, Striegel AR, Iverson NM, Leuranguer V, Rithner CD, Lyons BA, Pickard GE, Tobet SA, Horne WA (2006a) Alternative splicing of the voltage-gated  $Ca^{2+}$  channel  $\beta_4$  subunit creates a uniquely folded N-terminal protein binding domain with cell-specific expression in the cerebellar cortex. *J Neurosci* 26:2635–2644.
- Vendel AC, Rithner CD, Lyons BA, Horne WA (2006b) Solution structure of the N-terminal A domain of the human voltage-gated  $Ca^{2+}$  channel  $\beta_{4a}$  subunit. *Protein Sci* 15:378–383.

**Rôle du canal calcique P/Q dans la migraine hémiplégique familiale**

Norbert Weiss, Elisabeth Tournier-Lasserre & Michel De Waard

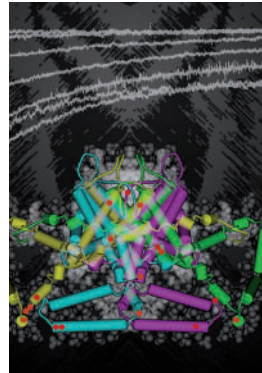
*Medicine Sciences (Paris)* (2007) **23**: 53-63

► Les canaux calciques dépendants du voltage participent à de nombreuses fonctions cellulaires, où ils jouent un rôle essentiel au niveau du système nerveux central en contrôlant l'excitabilité neuronale et la transmission synaptique. Ces canaux, de par leurs fonctions essentielles, sont à l'origine de nombreuses canalopathies résultant de mutations dans les gènes codant pour leurs différentes sous-unités. Des études génétiques ont ainsi démontré l'implication du gène *CACNA1A* dans la migraine hémiplegique familiale de type 1. Ce gène code pour la sous-unité  $Ca_v2.1$  des canaux calciques de type P/Q, et est le siège de nombreuses mutations. Mais comment différentes mutations ponctuelles conduisent-elles à un phénotype migraineux ? La caractérisation fonctionnelle de ces mutations dans différents systèmes d'expression hétérologue, ainsi que *in vivo* chez l'animal, a permis d'apporter une réponse débouchant sur un modèle moléculaire de physiopathologie de la migraine hémiplegique familiale dans lequel neurones, astrocytes et circulation sanguine agissent de concert. ◀

La migraine est une affection fréquente dont la prévalence est estimée à environ 10-15 %. Cette affection touche plus souvent les femmes que les hommes et débute généralement dans l'enfance ou l'adolescence. Les critères de l'*International Headache Society* (IHS) distinguent deux formes de migraine : (1) la migraine sans aura et (2) la migraine avec aura, l'aura étant définie par les troubles neurologiques, le plus souvent visuels, qui précèdent la céphalée migraineuse. Le déterminisme et les mécanismes physiopathologiques de cette affection sont encore mal compris et font probablement intervenir des facteurs environnementaux et génétiques [1]. La migraine avec et sans aura est considérée comme une affection polygénique multifactorielle. Il existe, cependant, une forme rare de

## Rôle du canal calcique P/Q dans la migraine hémiplegique familiale

Norbert Weiss, Elisabeth Tournier-Lasserre, Michel De Waard



N. Weiss, M. De Waard :  
Inserm U607, Laboratoire Canaux calciques, fonctions et pathologies, 17, rue des Martyrs, Bâtiment C3, 38054 Grenoble Cedex 09, France ; CEA, Grenoble, France ; Université Joseph Fourier, Grenoble, France.  
E. Tournier-Lasserre :  
Inserm U740, Faculté de Médecine Lariboisière, 10, avenue de Verdun, 75010 Paris, France.  
Laboratoire de génétique, AP-HP, Hôpital Lariboisière, 2, rue Amboise Paré, 75010 Paris, France.  
[mdewaard@cea.fr](mailto:mdewaard@cea.fr)

migraine avec aura, la migraine hémiplegique familiale (MHF) dont le mode de transmission est monogénique, autosomique dominant.

Une approche de génétique inverse a permis l'identification des gènes impliqués dans cette forme de migraine. Ainsi, les canaux calciques dépendants du voltage (CCDV) de type P/Q sont apparus être les protagonistes de la MHF de type 1 (MHF-1). Si la recherche et la caractérisation de mutations affectant ce canal ont rapidement fait l'objet de nombreux travaux, ce n'est que récemment que leur implication moléculaire dans un schéma intégré de physiopathologie a réellement émergé. Cet article présente l'implication des canaux P/Q dans cette affection, depuis l'étude clinique et génétique de familles atteintes de MHF et la mise en évidence du gène codant pour la sous-unité  $Ca_v2.1$  à la caractérisation fonctionnelle de mutations affectant ce canal, débouchant sur un modèle moléculaire à la base de la physiopathologie de cette forme de migraine.

Article reçu le 17 février 2006, accepté le 20 mars 2006.

## Caractéristiques cliniques de la MHF

La MHF est définie selon les critères de l'IHS comme une forme de migraine avec aura dans laquelle l'aura comporte un certain degré

de déficit moteur, cela chez au moins deux apparentés du premier degré. Le mode de transmission est, dans la plupart des familles, compatible avec un mode autosomique dominant, sans toutefois que ce critère fasse

Mutation Nucléotides	Localisation sur		Propriété de l'acide aminé		Réf.
	CACNA1A	Ca <sub>v</sub> 2.1	Sauvage	Muté	
<b>R192Q</b> CGA→CAA	Exon 4	I S4	Basique	Polaire	[3]
<b>R195K</b> AGG→AAG	Exon 4	I S4	Basique	Basique	[7]
<b>S218L</b> TCG→TTG	Exon 5	I boucle S4-S5	Polaire	Apolaire (hydrophobe)	[39]
<b>R583Q</b> CGA→CAA	Exon 13	II S4	Basique	Polaire	[40]
<b>T666M</b> ACG→ATG	Exon 16	II boucle P	Polaire	Apolaire (hydrophobe)	[3, 7]
<b>V714A</b> GTG→GCG	Exon 17	II S6	Apolaire (hydrophobe)	Apolaire (hydrophobe)	[3]
<b>D715E</b> GAC→GAG	Exon 17	II S6	Acide	Acide	[7]
<b>K1336E</b> AAA→GAA	Exon 25	III boucle S3-S4	Basique	Acide	[7]
<b>R1347Q</b> CGA→CAA	Exon 25	III S4	Basique	Polaire	[41]
<b>Y1385C</b> TAC→TGC	Exon 26	III S5	Polaire	Polaire	[42]
<b>V1457L</b> GTG→TTG	Exon 27	III boucle P	Apolaire (hydrophobe)	Apolaire (hydrophobe)	[43]
<b>R1668W</b> CGG→TGG	Exon 32	IV S4	Basique	Apolaire (hydrophobe)	[7]
<b>L1683P</b> CTN→CCN	Exon 32	IV boucle S4-S5	Apolaire (hydrophobe)	Apolaire (hydrophobe)	
<b>W1684R</b> TGG→CGG	Exon 32	IV boucle S4-S5	Apolaire (hydrophobe)	Basique	[7]
<b>V1696I</b> GTC→ATC	Exon 33	IV S5	Apolaire (hydrophobe)	Apolaire (hydrophobe)	[7]
<b>I1710T</b> ATT→ACC	Exon 33	IV S5	Apolaire (hydrophobe)	Apolaire (hydrophobe)	[44]
<b>I1811L</b> ATC→CTC	Exon 36	IV S6	Apolaire (hydrophobe)	Apolaire (hydrophobe)	[3]

Tableau I. Localisation et propriétés biochimiques des mutations MHF-1.

partie des critères de définition de l'IHS (Figure 1). Cette affection débute en général dans l'enfance et affecte autant les filles que les garçons. La fréquence des crises varie beaucoup d'un patient à l'autre et au cours de la vie chez un même patient. La symptomatologie peut varier d'une crise à l'autre. Les crises sont caractérisées par la présence d'un déficit moteur isolé ou associé à d'autres symptômes de l'aura : hémianopsie, paresthésies et/ou dysphasie. Ces symptômes durent en général de 30 à 60 minutes et sont suivis d'une céphalée de type migraineux qui dure généralement plusieurs heures. Le déficit moteur est toujours réversible en totalité. Parfois, certaines crises plus sévères peuvent s'accompagner de fièvre, d'une confusion voire même d'un coma. L'imagerie cérébrale à distance de la crise reste, quant à elle, normale.

Dans certaines familles atteintes de MHF, les patients souffrant de crises de migraine hémiplégique peuvent présenter d'autres troubles cliniques. Dans 20 % d'entre elles, les sujets atteints présentent un nystagmus et/ou une ataxie permanente de type cérébelleux. D'autres troubles, paroxystiques ou permanents, ont également été observés tels que crises d'épilepsie, retard mental ou rétinite pigmentaire.

### Génétique moléculaire de la MHF

La migraine hémiplégique familiale est une affection autosomique dominante hétérogène génétiquement. Le caractère mendélien (monogénique) de la MHF a permis, grâce à l'utilisation des méthodes de la génétique inverse, de localiser puis d'identifier trois des gènes impliqués dans cette affection, *CACNA1A*, *ATP1A2* et *SCN1A* [2-5].

Le premier de ces gènes, *CACNA1A*, localisé sur le chromosome 19, code pour la sous-unité  $Ca_v2.1$  des CCDV de type P/Q. La moitié environ des familles atteintes de MHF à

cas multiples sont liées à ce locus ainsi que la totalité des familles dans lesquelles certains patients présentent, en sus de leur phénotype MH, un nystagmus et/ou une ataxie cérébelleuse [6]. À ce jour, 17 mutations dans le gène *CACNA1A* ont été rapportées dont certaines sont récurrentes dans les familles de migraines hémiplégiques (MH) avec ataxie cérébelleuse [1] (Tableau I, Figure 2). Jusqu'à présent, toutes les mutations détectées sont des mutations faux sens, changeant un des acides aminés de la protéine. Aucun autre type de mutation du gène *CACNA1A* n'a été rapporté dans les familles atteintes de MHF.

L'analyse clinique détaillée de plus d'une centaine de sujets porteurs d'une mutation dans le gène *CACNA1A* appartenant à 21 familles non apparentées a permis de mettre en évidence certaines corrélations entre phénotype et nature de la mutation au sein du gène [7]. Les mutations observées dans les familles avec MH isolée sont différentes de celles observées dans les familles de MH associée à une ataxie cérébelleuse. À titre d'exemple, la mutation T666M est associée à une pénétrance plus élevée du phénotype MH et une plus grande fréquence de crises sévères.

### *CACNA1A*, migraine sans et avec aura et autres affections neurologiques

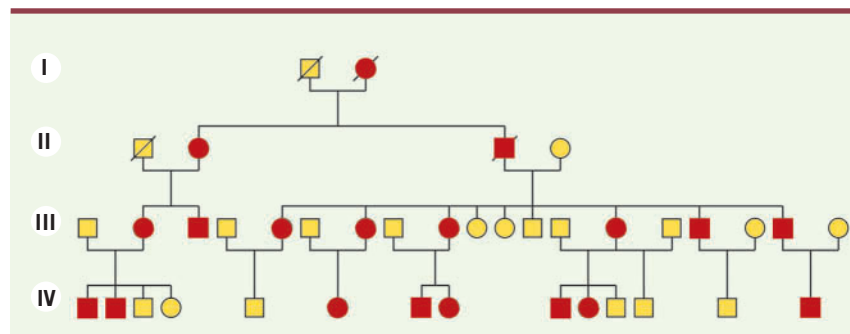
Plusieurs études ont été conduites visant à déterminer si le locus ou le gène *CACNA1A* était impliqué dans les formes fréquentes de migraine avec ou sans aura. Les résultats de ces études ne sont pas en faveur d'une implication de ce gène. Un criblage de tous les exons codants du gène *CACNA1A*, réalisé récemment chez 25 patients atteints de migraine sans aura et 18 patients atteints de migraine avec aura, n'a détecté aucune mutation de ce gène [8]. Il existe donc peu ou pas d'arguments, à ce jour, en faveur d'une implication du gène *CACNA1A* dans les autres formes de migraine.

En revanche, des mutations de la sous-unité  $Ca_v2.1$ , d'une nature différente de celles observées dans la MHF, ont été détectées dans deux autres affections neurologiques différentes sur le plan clinique, soulevant d'intéressantes questions de physiopathologie [9]. L'ataxie épisodique de type 2 (EA2) est en effet liée essentiellement à des mutations tronquantes

de la sous-unité  $Ca_v2.1$  et l'ataxie spino-cérébelleuse SCA6 à une amplification du triplet CAG situé dans la partie 3' du gène *CACNA1A* [3, 10].

### Le canal calcique de type P/Q : de sa fonction à sa structure

Le canal calcique de type P/Q ( $Ca_v2.1$ ) constitue un membre de la grande famille des CCDV, représentée également par les canaux de type L ( $Ca_v1.1$  à  $Ca_v1.4$ ), N ( $Ca_v2.2$ ), R ( $Ca_v2.3$ ) et T ( $Ca_v3.1$  à  $Ca_v3.3$ ), et dont l'activation fait suite à une modification du potentiel de membrane de la cellule [11]. Bien que très largement pré-



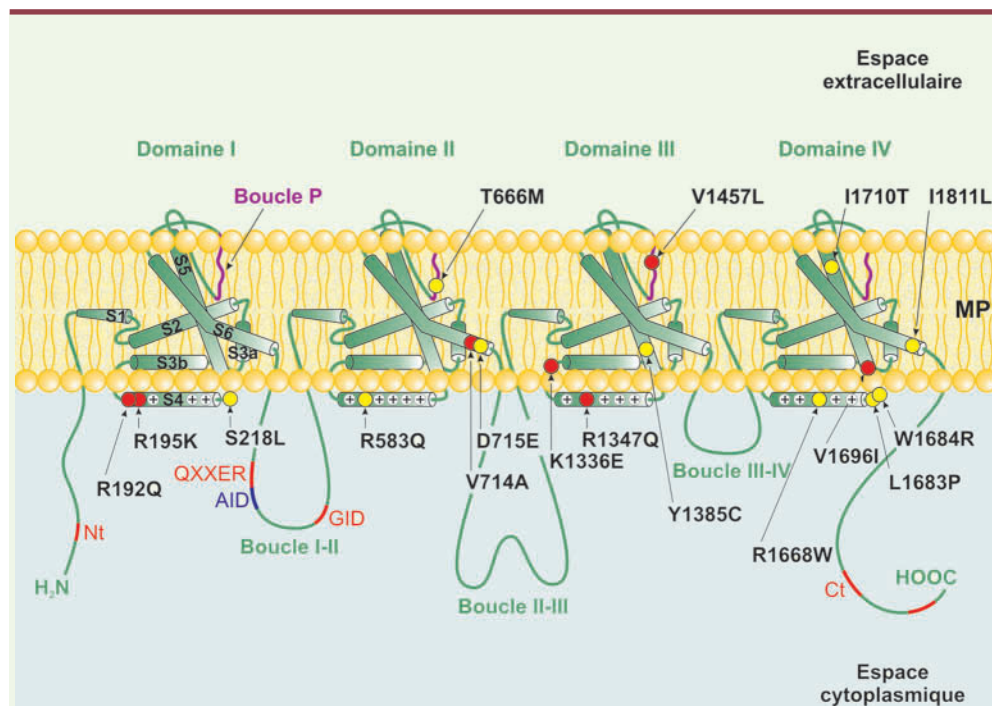
**Figure 1.** Arbre généalogique d'une famille atteinte de migraine hémiplégique familiale. Les hommes sont représentés par des carrés, les femmes par des cercles. Les sujets malades sont indiqués par des symboles rouges, les sujets sains par des symboles jaunes. Le mode de transmission observé est typiquement autosomique dominant.

sents au niveau du cervelet [12, 13], l'expression des canaux P/Q s'étend également au reste des structures cérébrales incluant celles impliquées dans la physiopathologie de la migraine, à savoir le cortex cérébral, le ganglion trijumeau et le tronc cérébral. De par leur localisation subcellulaire au niveau des terminaisons présynaptiques, les canaux P/Q, en régulant finement l'entrée de calcium dans la cellule nerveuse, jouent un rôle essentiel dans le contrôle de la libération des neuromédiateurs [14]. Ils représentent une étape clef dans la conversion du message électrique en message chimique, se présentant ainsi comme des acteurs essentiels dans les processus de transmissions synaptiques. Ces canaux sont également

présents au niveau somatodendritique où ils participent à de nombreuses autres fonctions cellulaires telles que l'excitabilité neuronale, l'expression génique ou encore la synaptogenèse. Enfin, ces canaux jouent également un rôle important au niveau des jonctions neuromusculaires en contrôlant la libération d'acétylcholine [15]. Leur implication a été confirmée chez des patients atteints du syndrome de Lambert-Eaton, une maladie auto-immune où la présence élevée d'anticorps dirigés contre les canaux P/Q altère la libération d'acétylcholine, conduisant progres-

sivement à une myopathie [16].

D'un point de vue structural, le canal P/Q se présente sous la forme d'un hétérocomplexe, composé d'une sous-unité principale  $Ca_v2.1$  comportant le pore ionique, centrée autour de sous-unités auxiliaires  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\alpha_2\text{-}\delta$  [17]. Dans le but de mieux appréhender les effets fonctionnels des mutations MHF-1 affectant les canaux P/Q que nous décrivons par la suite, il est important de bien comprendre la structure de la sous-unité  $Ca_v2.1$  ainsi que les déterminants moléculaires majeurs gouvernant ses propriétés biophysiques. Il s'agit d'une protéine membranaire d'environ 2 400 acides aminés, pour un poids moléculaire compris entre 250 et 275 kDa (variable suivant les variants d'épissage). En l'absence de donnée cristallographique relative à cette protéine, la topologie membranaire de la sous-unité  $Ca_v2.1$  repose sur les données structurales disponibles pour les canaux potassiques dépendants du voltage [18] dont les comparaisons de séquences suggèrent une grande



**Figure 2. Topologie membranaire présumée de la sous-unité  $Ca_v2.1$  des canaux P/Q et ses mutations MHF-1 associées.**

Sur la base des données cristallographiques relatives à la structure des canaux potassiques dépendants du voltage [18], la sous-unité  $Ca_v2.1$  des canaux P/Q pourrait se présenter sous la forme de quatre domaines membranaires chacun constitués de six segments transmembranaires ou sous membranaires (S1 à S6). Ces quatre domaines sont reliés entre eux par des boucles cytoplasmiques I-II, II-III et III-IV reliant respectivement les domaines I et II, II et III, et III et IV. Les boucles cytoplasmiques extracellulaires et transmembranaires reliant les segments S5 et S6 (boucles P, en violet) s'organisent pour former le pore ionique tout en étant responsables de la sélectivité pour le calcium. Les segments S4, de par leur composition riche en acides aminés basiques arginine et lysine, forment le capteur de voltage conférant au canal ses propriétés de voltage dépendance. Le domaine AID (*alpha interaction domain*), localisé sur la boucle cytoplasmique I-II (bleu), constitue un des sites majeurs d'interaction avec la sous-unité  $\beta$  régulatrice. Sont également représentés les différents sites d'interaction du dimère  $G_{\beta\gamma}$  (en rouge). Ces sites sont au nombre de cinq et sont localisés dans la partie aminoterminal (Nt), au sein de la boucle I-II (QXXER et GID) ainsi que dans la partie carboxyterminale du canal (Ct). Enfin sont localisées les différentes mutations humaines (*GenBank* N° X99897) associées à la MHF-1. Les cercles rouges représentent les mutations donnant lieu à un phénotype purement MH alors que les cercles jaunes représentent les mutations donnant lieu à un phénotype MH associé à des signes d'ataxie cérébelleuse. AID : *alpha interaction domain* ; GID : *G-protein interaction domain* ; MP : membrane plasmique ; NH<sub>2</sub> : extrémité aminoterminal ; COOH : extrémité carboxyterminale ; A : alanine ; C : cystéine ; D : acide aspartique ; E : acide glutamique ; I : isoleucine ; K : lysine ; L : leucine ; M : méthionine ; P : proline ; Q : glutamine ; R : arginine ; S : sérine ; T : thréonine ; V : valine ; W : tryptophane ; Y : tyrosine.

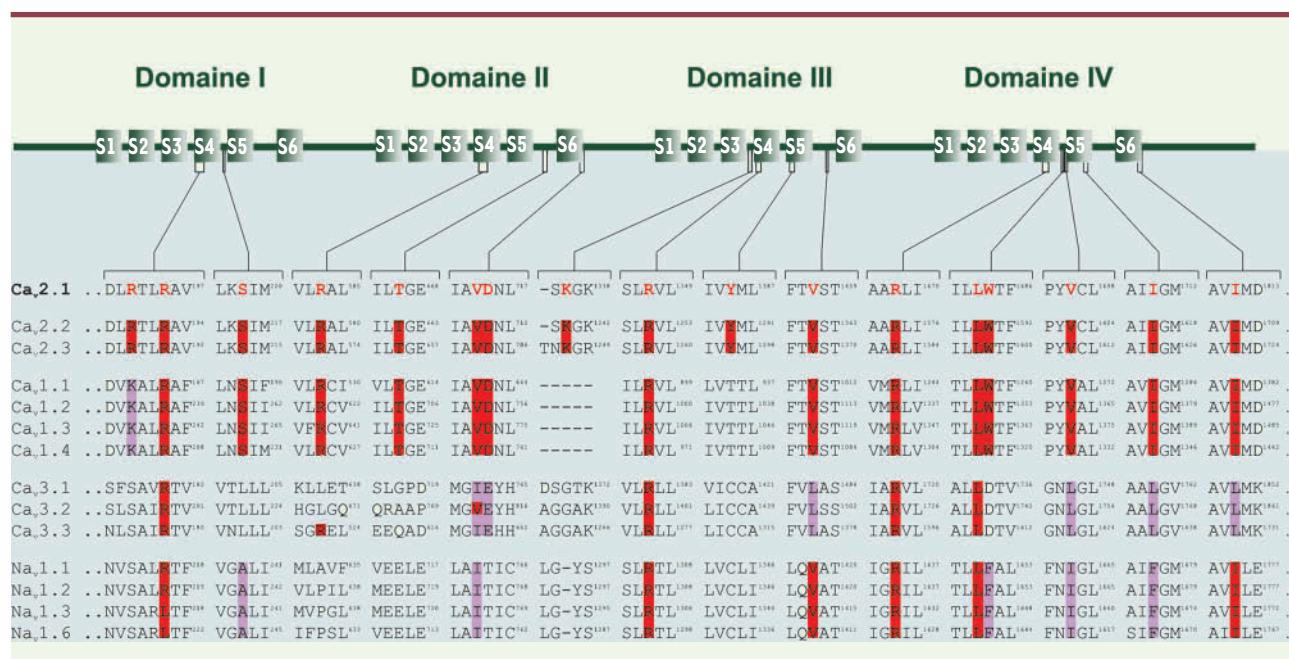


homologie avec les CCDV. La sous-unité  $Ca_v2.1$  pourrait ainsi s'organiser sous la forme de quatre domaines membranaires, chacun constitués de six segments transmembranaires ou sous-membranaires (S1 à S6). Ces quatre domaines sont liés entre eux par des boucles cytoplasmiques (Figure 2). Les segments S4 sous-membranaires, de par leur composition riche en résidus basiques (positivement chargés) arginines et lysines, constituent le senseur de voltage et seraient à l'origine de la détection des modifications du potentiel électrique de membrane de la cellule à l'origine de l'ouverture du canal. Les boucles extracellulaires et transmembranaires reliant les segments S5 et S6 (boucles P) s'organisent pour former le pore ionique à proprement parler et déterminent également la sélectivité ionique [19]. Enfin, les boucles cytoplasmiques I-II et III-IV, reliant respectivement les domaines I et II et les domaines III et IV, constituent quelques uns des éléments importants dans les processus d'inactivation du canal [20, 21]. Ces structures étant impliquées dans le contrôle des propriétés biophysiques du canal, des mutations au sein de l'ensemble de ces déterminants structuraux seraient

susceptibles de conduire à une altération de son activité. Ainsi, la recherche et la caractérisation de mutations dans le gène *CACNA1A* représentent une étape clé dans la compréhension des mécanismes moléculaires conduisant au développement de la MHF-1.

### À la recherche de mutations...

Depuis l'identification en 1996 du gène *CACNA1A* comme premier gène responsable de la MHF [3], 17 mutations portées par ce gène ont été identifiées (Tableau 1). Ces mutations se répartissent sur l'ensemble des quatre domaines membranaires de la sous-unité  $Ca_v2.1$ , certaines affectant des structures importantes comme le senseur de voltage ou le pore ionique (Figure 2). Il s'agit exclusivement de mutations ponctuelles faux sens conduisant à la substitution d'un acide aminé par un autre. La comparaison des séquences protéiques des sous-unités  $Ca_v$  des différents CCDV et des sous-unités  $Na_v$  des canaux sodiques neuronaux dépendants du voltage ( $Na_v1.1$ ,  $Na_v1.2$ ,  $Na_v1.3$ ,  $Na_v1.6$ ) [22] révèle que ces mutations affectent des acides aminés hautement conservés au niveau de leur identité ou de leur homologie, suggérant que ces acides aminés représentent des éléments déterminants nécessaires au bon fonctionnement des canaux ioniques (Figure 3). Dans l'espoir de mieux comprendre les conséquences fonctionnelles de ces

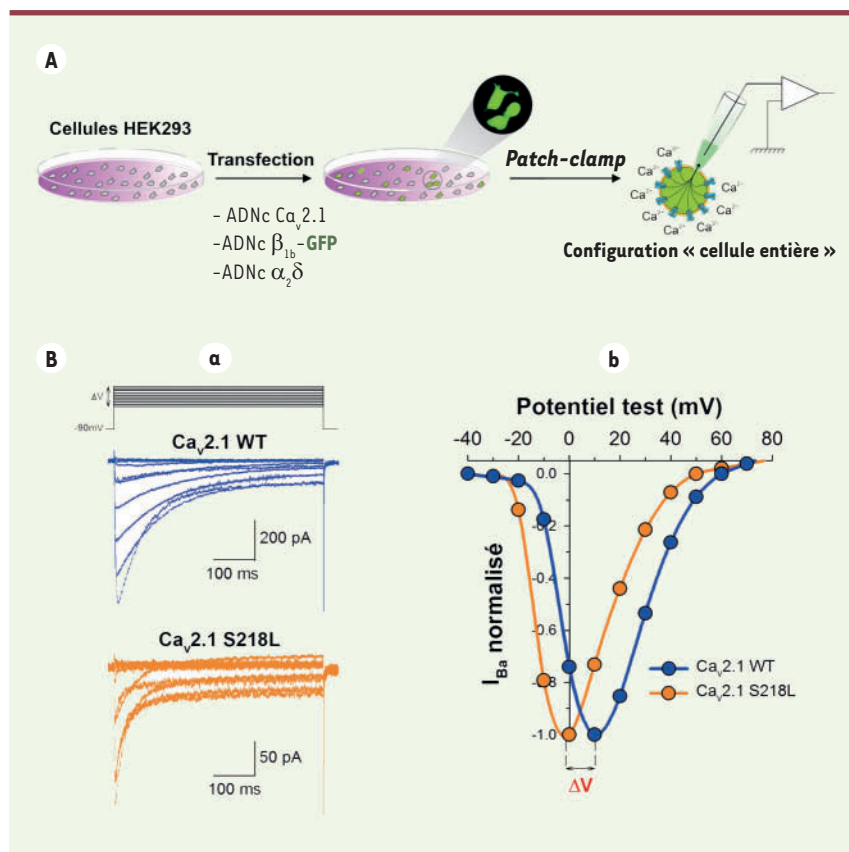


**Figure 3. Analyse comparative des séquences protéiques des canaux calciques et sodiques des régions affectées par les mutations MHF-1.** Comparaison de la séquence protéique humaine de la sous-unité  $Ca_v2.1$  (canaux P/Q) des régions porteuses des mutations MHF-1 avec les séquences protéiques humaines des autres canaux calciques dépendants du voltage à haut seuil d'activation (HVA)  $Ca_v2.2$  (canaux N),  $Ca_v2.3$  (canaux R) et  $Ca_v1.1$  à  $Ca_v1.4$  (canaux L) et à bas seuil d'activation (LVA)  $Ca_v3.1$  à  $Ca_v3.3$  (canaux T), ainsi qu'avec les séquences protéiques humaines des canaux sodiques neuronaux voltages dépendants  $Na_v1.1$ ,  $Na_v1.2$ ,  $Na_v1.3$  et  $Na_v1.6$ . Les acides aminés mutés dans la MHF-1 sont indiqués en rouge sur la séquence de la sous-unité  $Ca_v2.1$ . Le surlignage rouge sur les séquences comparatives indique une conservation d'identité de l'acide aminé, le surlignage violet indiquant une conservation d'homologie. Séquences *GenBank relatives* :  $Ca_v2.2$  (M94172),  $Ca_v2.3$  (NM000721),  $Ca_v1.1$  (NM000069),  $Ca_v1.2$  (NM000719),  $Ca_v1.3$  (NM000720),  $Ca_v1.4$  (AF201304),  $Ca_v3.1$  (AF134986),  $Ca_v3.2$  (AF051946),  $Ca_v3.3$  (AF129133),  $Na_v1.1$  (AF225985),  $Na_v1.2$  (NM021007),  $Na_v1.3$  (NM006922),  $Na_v1.6$  (AF225988).

mutations, onze d'entre elles ont été caractérisées au niveau fonctionnel par réexpression des sous-unités  $Ca_v2.1$  porteuses des mutations MHF-1 dans différents systèmes d'expression hétérologue tels que l'ovocyte de xénope, la lignée cellulaire de mammifère HEK293 (Figure 4) ou encore dans des neurones granulaires du cervelet ou d'hippocampe de souris  $Ca_v2.1^{-/-}$  [23-29]. Un certain nombre de caractéristiques biophysiques du canal ont ainsi été étudiées aussi bien au niveau de la cellule entière (voltage dépendance d'activation/inactivation, cinétiques d'activation/inactivation...) que

du canal unitaire (probabilité d'ouverture et conductance unitaire) (Tableau II). D'une manière générale, la presque totalité de ces mutations (dix des onze caractérisées) confère au canal un déplacement de sa voltage dépendance d'activation vers des potentiels moins dépolarisants, c'est-à-dire une diminution de son seuil d'activation conduisant à une ouverture facilitée du canal au niveau unitaire et une augmentation de l'entrée calcique à des potentiels pour lesquels les canaux P/Q sauvages ne sont normalement pas activés. À titre d'exemple, la sous-unité  $Ca_v2.1$ , porteuse de la mutation S218L dans la boucle reliant les segments S4 et S5 du premier domaine membranaire, présente un seuil d'activation aux alentours de  $-50$  mV/ $-60$  mV dans les neurones granulaires du cervelet de souris  $Ca_v2.1^{-/-}$ , seuil proche du potentiel de repos de la cellule nerveuse [27].

Cependant, l'explication moléculaire du déplacement de la voltage dépendance d'activation du canal reste difficile à établir. Il est, en effet, classiquement admis que la sensibilité au voltage des CCDV est conférée par les segments S4. Or, parmi les dix mutations MHF-1 affectant la voltage dépendance d'activation du canal, six d'entre elles ne se situent pas dans les segments S4 ou proche des segments S4 (boucles S3-S4 et boucles S4-S5) (Tableau I, Figure 2). De plus, parmi les quatre mutations localisées dans l'environnement des segments S4 et conduisant à un déplacement de la voltage dépendance d'activation du canal, la mutation R583Q conduit à une perte de charge positive, la mutation K1336E conduit au gain d'une charge négative et la mutation S218L n'entraîne pas de modification de charge. Ainsi, l'effet fonctionnel de ces mutations se révèle être à l'opposé de ce que l'on pourrait attendre d'un point de vue purement théorique. Inversement, la mutation R192Q, portée par le segment S4 du premier domaine membranaire, conduit à une perte de charge positive sans pour autant altérer la voltage dépendance d'activation du canal étudiée dans l'ovocyte de xénope (Tableau II). Ces données suggèrent que les effets fonctionnels de certaines mutations MHF-1 ne passent pas directement par une altération de la sous-unité  $Ca_v2.1$  elle-même, mais peut être par une altération de sa régulation par d'autres partenaires moléculaires. En revanche, les mutations T666M et V1457L, portées par les boucles P des second et



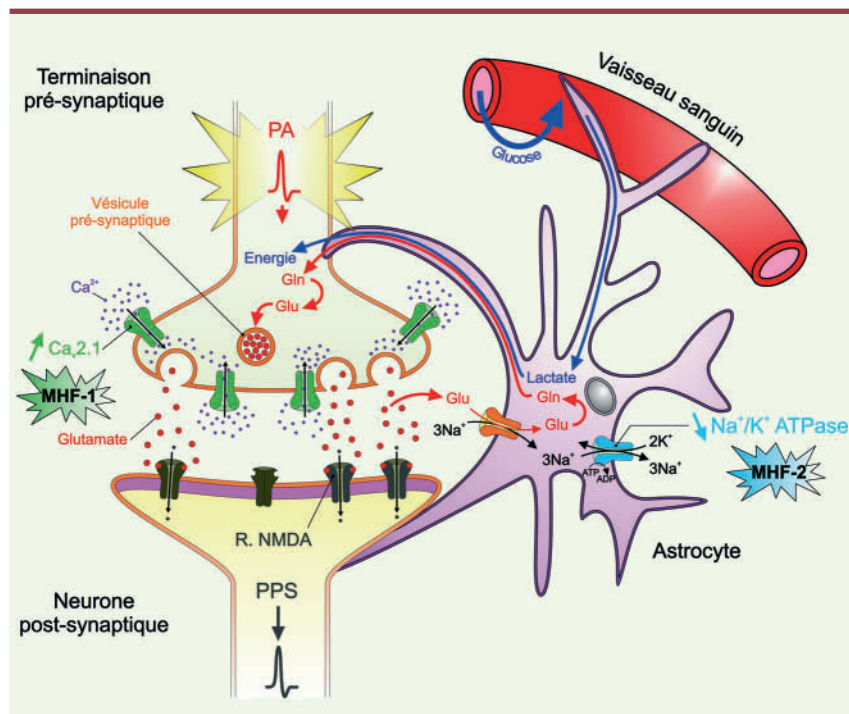
**Figure 4. Exemple des altérations biophysiques de la sous-unité  $Ca_v2.1$  engendrées par la mutation S218L.** **A.** Représentation schématique du protocole expérimental permettant la caractérisation fonctionnelle des mutations MHF-1. L'ADN complémentaire (ADNc) codant pour la sous-unité  $Ca_v2.1$  et portant la mutation à étudier est co-transfecté dans des cellules de mammifères HEK293 (ne présentant pas de CCDV endogène) en présence des ADNc codants pour les sous-unités régulatrices  $\beta$  et  $\alpha_2\delta$ , la protéine fluorescente verte GFP (*green fluorescent protein*) servant de marqueur de transfection. Les courants calciques sont ensuite enregistrés trois jours après la transfection par la technique du patch clamp en configuration « cellule entière » permettant d'enregistrer l'activité de l'ensemble des canaux calciques présents à la surface de la cellule. **B. (a)** Exemple de traces de courants obtenues par dépolarisation de la membrane de  $-50$  mV à  $+70$  mV à partir d'un potentiel de repos de  $-90$  mV. A noter l'altération des cinétiques d'inactivation due à la présence de la mutation S218L. **(b)** Représentation graphique normalisée du courant maximum obtenu en fonction de la dépolarisation appliquée (courbe I-V), témoignant du déplacement de la voltage dépendance d'activation engendrée par la mutation S218L.

Mutation MHF	Type cellulaire	Densité de courant max. (% ctr)	Shift $V_{1/2}$ activ. (mV)	$\tau$ activ. (% ctr)	Shift $E$ (mV)	Shift $V_{1/2}$ inac (mV)	$\tau$ inac. (rapide/lent)	Inac. à 1Hz	$\tau$ dé-inac. (rapide/lent)	Conductance (pS)	Proba. ouverture (% ctr)	Réf.
R192Q	Xénope HEK293	193 %	=	=	=	=	= / =	=	= / =	=	134 %	[23, 25]
S218L	HEK293 Neurones	60 %	- 10.7	ND	=	=	↓ / ↑	↓	↓	=	=	[27]
R583Q	Xénope	ND	- 9.6	ND	=	- 7.4	= / =	↑	↑	ND	ND	[24]
T666M	Xénope HEK293	21 %	- 5.6	=	- 15	=	↓ / =	↑	↑ / =	↓	=	[23, 25, 26]
V714A	Xénope HEK293	25 %	- 9.5	=	=	=	↓ / =	↓	↓ / =	↓	251 %	[23, 25]
D715E	Xénope	ND	- 16.7	ND	=	- 10.2	↓ / ↓	↑	=	ND	ND	[24]
K1336E	Xénope	ND	- 7.5	ND	=	=	=	↑	= / =	ND	ND	[28]
V1457L	Xénope HEK293	32 %	- 12.6	ND	- 15	=	= / ↑	=	↑	↓	ND	[24, 26]
W1684R	Xénope	ND	- 8.6	ND	=	- 7.4	=	↑	= / =	ND	ND	[28]
V1696I	Xénope	ND	- 4.0	ND	=	=	↑	↑	↑ / ↑	ND	ND	[28]
I1811L	Xénope HEK293	29 %	- 5.6	=	=	=	= / =	↓	↓ / =	=	149 %	[23, 25]

Tableau II. Propriétés biophysiques des canaux P/Q porteurs des mutations MHF-1.

troisième domaines membranaires, confèrent au canal un déplacement du potentiel d'inversion du calcium témoignant d'une altération de la sélectivité ionique dont elles sont responsables (Tableau II).

Bien que l'ensemble des mutations fonctionnellement caractérisées altèrent au moins une des caractéristiques biophysiques du canal, force est de constater



**Figure 5. Modèle intégré de l'implication des mutations MHF-1 et MHF-2 à l'origine du phénomène de CSD.** La sous-unité  $Ca_v2.1$  (en vert) des canaux calciques de type P/Q (MHF-1) ainsi que la pompe  $Na^+/K^+$ -ATPase (MHF-2) (en bleu) sont exprimés respectivement par les terminaisons présynaptiques des synapses excitatrices glutamatergiques du système nerveux central et par les cellules astrocytaires. L'ouverture des canaux P/Q en réponse à la dépolarisation membranaire engendrée par l'arrivée d'un potentiel d'action permet l'entrée de calcium dans la terminaison présynaptique conduisant à la fusion des vésicules synaptiques et la libération de glutamate dans l'espace synaptique. Le glutamate permet alors la transmission de l'influx nerveux au neurone post-synaptique via l'activation des récepteurs NMDA (en gris) présents à sa surface. La terminaison du signal s'opère en partie par la recapture du glutamate présent dans l'espace synaptique par la cellule astrocytaire via un transporteur de glutamate (en orange) mettant en jeu le gradient de sodium. Ce gradient est maintenu par la pompe  $Na^+/K^+$ -ATPase (en bleu) qui extrude trois ions sodium du milieu cytoplasmique en échange de deux ions potassium. Le glutamate ainsi recapté est ensuite métabolisé et recyclé vers le neurone présynaptique où il servira à réapprovisionner les vésicules de neurotransmetteurs. Par ailleurs, la cellule astrocytaire représente un intermédiaire entre la circulation sanguine cérébrale et la cellule nerveuse, permettant ainsi son approvisionnement énergétique. Les mutations « gain de fonction », affectant la sous-unité  $Ca_v2.1$  en diminuant le seuil d'activation des canaux P/Q, conduisent à une hyperexcitabilité neuronale à l'origine d'une augmentation de la sécrétion de glutamate et d'une hyperactivité synaptique. De plus, les mutations « perte de fonction » affectant la pompe  $Na^+/K^+$ -ATPase conduisent à une diminution de l'activité de cette pompe et du gradient électrochimique de sodium, à l'origine d'une diminution de la recapture du glutamate par les cellules astrocytaires et de son recyclage. Dans ces conditions, après une période d'hyperactivité synaptique où les besoins énergétiques du neurone sont accrus, suit une période d'inactivité (dépression) par épuisement des vésicules présynaptiques en glutamate à l'origine du phénomène de dépression corticale (CSD). Adapté de [38]. PA : potentiel d'action ; Glu : glutamate ; Gln : glutamine ; NMDA : N-méthyl-D-aspartate ; PPS : potentiel post-synaptique.

que ces altérations dépendent de la mutation considérée, du type cellulaire dans lequel la caractérisation est réalisée, mais également des différentes sous-unités régulatrices du canal présentes. Ainsi, l'expression fonctionnelle de certaines mutations semble dépendre très largement de l'isoforme de la sous-unité  $\beta$ . A titre d'exemple, l'altération de la cinétique d'inactivation du canal engendrée par la mutation V1696I (Tableau II), portée par le segment S5 du quatrième domaine membranaire, se manifeste uniquement en présence des sous-unités  $\beta_1$  ou  $\beta_3$ , mais pas en présence de la sous-unité  $\beta_4$  [28]. Sachant que la sous-unité  $\beta_4$  est la sous-unité  $\beta$  préférentiellement associée aux canaux P/Q, du moins *in vivo* dans le cervelet [30], il est important de considérer avec prudence le phénotype engendré par ces mutations caractérisées *in vitro* en système d'expression hétérologue. Une alternative consiste à réintroduire *in vivo* chez l'animal le gène *CACNA1A* porteur de mutations MHF-1 (*knock-in*). Cette technique, bien que nécessitant un travail considérable, présente l'avantage indéniable de replacer la sous-unité  $Ca_v2.1$  mutée dans un environnement intact, en présence de l'ensemble de ses partenaires moléculaires. Ce travail a été réalisé très récemment chez la souris avec le *knock-in* de la mutation R192Q portée par le segment S4 du premier domaine membranaire [31]. Ces animaux présentent un gain de fonction, caractérisé par (1) une augmentation de la densité de courant portée par les canaux P/Q dans les cellules granulaires du cervelet, (2) une augmentation de la neurotransmission au niveau des jonctions neuromusculaires, (3) un déplacement de la voltage dépendance d'activation des canaux P/Q vers des potentiels moins dépolarisants à l'origine d'une diminution du seuil d'excitabilité des neurones corti-

caux. À noter que cette mutation, initialement caractérisée *in vitro* en système d'expression hétérologue en présence des sous-unités régulatrices  $\beta_{1b}$  et  $\alpha_2\delta$ , n'altérerait pas la voltage dépendance d'activation du canal, confirmant l'idée que l'expression fonctionnelle des mutations MHF-1 passe très probablement par une altération des régulations de la sous-unité  $Ca_v2.1$  plus que par une altération intrinsèque du canal calcique lui-même.

Une des régulations majeures des canaux P/Q au niveau présynaptique met en jeu l'activation de récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques [32]. Cette régulation mobilise le dimère  $G_{\beta\gamma}$  dont la fixation directe sur la sous-unité  $Ca_v2.1$  est à l'origine d'une inhibition du courant calcique porté par ces canaux, permettant ainsi de diminuer l'activité synaptique. Ainsi, la mutation R192Q semble s'opposer à l'inhibition des canaux P/Q par les protéines G [33]. L'inhibition des CCDV par les protéines G étant levée par le décrochage du dimère  $G_{\beta\gamma}$  en réponse à l'ouverture du canal, l'augmentation de la probabilité d'ouverture du canal engendrée la mutation R192Q (Tableau 1) est très certainement à l'origine de l'altération de cette régulation. La majorité des mutations MHF-1 modifiant la voltage dépendance de l'activation des canaux P/Q, leur caractérisation systématique dans le contexte de leur régulation par les protéines G hétérotrimériques devrait apporter des informations importantes dans la compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine de la MHF.

### Des mutations à la compréhension de la physiopathologie de la MHF

Bien que la recherche systématique de mutations et leur caractérisation fonctionnelle constituent des informations importantes pour la compréhension des mécanismes moléculaires conduisant aux symptômes migraineux, force est de constater que pour l'heure, l'origine de la maladie reste mal comprise. S'il est maintenant admis que la crise migraineuse résulte d'un dysfonctionnement d'une région du cerveau conduisant à l'activation des voies nociceptives trigéminales (pour une revue relative à la douleur trigéminal, voir [34]), l'une des questions majeures en suspens est de comprendre la nature des mécanismes moléculaires à la base de l'activation du système trigéminal. La théorie de la dépression corticale (CSD, *cortical spreading depression*) est pour l'heure l'explication la plus rationnelle. Il s'agit d'un phénomène électrophysiologique observé pour la première fois dans le cortex cérébral de lapin par Leao dans les années quarante. Il se caractérise par une phase

d'hyperactivité neuronale se propageant lentement à la surface du cortex cérébral (2 à 6 mm/min), suivie d'une longue phase de silence électrique (dépression) des neurones impliqués, ces deux événements étant associés respectivement à une augmentation puis une diminution locale du flux sanguin cérébral [35]. Sur la base de perturbations similaires du flux sanguin cérébral observées chez des patients souffrant de migraine avec aura, la théorie de la dépression corticale a été proposée comme étant à l'origine des migraines avec aura. De plus, des perturbations de l'activité électrique neuronale observées chez l'homme et compatibles avec la théorie CSD [36], ainsi que l'étude de modèles animaux, ont définitivement confirmé l'idée que la dépression corticale était capable d'activer le système trigéminal, pouvant ainsi être à l'origine du déclenchement des symptômes migraineux [37]. Dans ce contexte, les altérations biophysiques des canaux P/Q engendrées par les mutations MHF-1 prennent toute leur importance. En effet, ces mutations, en diminuant le seuil d'activation des canaux P/Q, conduisent à une diminution du seuil d'excitabilité cellulaire pouvant être à l'origine de l'initiation du phénomène CSD et de la phase d'hyperactivité neuronale (Figure 5).

De plus, bien que les canaux P/Q représentent les canaux caractéristiques de la MHF-1, ils ne sont pas les seuls canaux ioniques associés aux MHF. Des mutations ont également été identifiées dans le gène *ATP1A2* codant pour la sous-unité  $\alpha_2$  de la pompe  $Na^+/K^+$ -ATPase et sont caractéristiques de la MHF de type 2. À l'âge adulte, cette pompe est exprimée de manière constitutive par les cellules astrocytaires où elle est à l'origine du gradient électrochimique  $Na^+/K^+$  par hydrolyse de l'ATP. Les mutations relevées dans le gène *ATP1A2* sont également des mutations faux sens (très rarement des mutations non sens), mais contrairement aux mutations relevées dans le gène *CACNA1A*, ces mutations conduisent à une perte de fonction de la pompe  $Na^+/K^+$ -ATPase. L'implication moléculaire de cette protéine dans la CSD a également été proposée sur la base d'un modèle de coopérativité entre cellule neuronale, cellule astrocytaire et circulation sanguine [38]. Le glutamate (neuromédiateur excitateur) libéré par les neurones présynaptiques des synapses excitatrices du système nerveux central est recapté par la cellule astrocytaire environnante, contribuant d'une part à la terminaison du signal et, d'autre part, au recyclage du glutamate qui sera redistribué au neurone présynaptique afin de recharger les vésicules en neuromédiateurs ; la recapture du glutamate par la cellule astrocytaire étant tributaire du gradient électrochimique de  $Na^+$ . Ainsi, toute perturbation de ce gradient conduit inévitablement à une altération de la recapture du neuromédiateur. Les mutations MHF-2, à l'origine d'une perte d'activité de la pompe  $Na^+/K^+$ -ATPase, altèrent le gradient électrochimique de  $Na^+$  et aboutissent par voie de conséquence à une diminution de la recapture du glutamate. Les terminaisons présynaptiques se trouvent alors déplétées en glutamate, conduisant à une phase d'inactivité neuronale observée dans le phénomène de CSD (Figure 5).

Enfin, très récemment, une mutation dans le gène *SCN1A* a été relevée dans trois familles présentant des cas de MHF [5]. Ce gène code pour

la sous-unité  $\text{Na}_v1.1$  des canaux sodiques neuronaux dépendants du voltage dont la structure membranaire est similaire à celle des CCDV. Il s'agit d'une mutation faux sens (Q1489K) dans la boucle cytoplasmique reliant les domaines membranaires III et IV. Bien que l'activité du canal sodique ne semble être que très faiblement affectée en système d'expression hétérologue, il n'est pas exclu que cette mutation puisse modifier les propriétés biophysiques du canal dans d'autres environnements moléculaires. Les canaux sodiques dépendants du voltage, en étant à l'origine de l'excitabilité membranaire et de la propagation du message nerveux, pourraient donc également participer au phénomène de CSD, leur implication directe restant à être démontrée.

## Conclusions

Pour l'heure, différentes mutations ont été identifiées dans les gènes *CACNA1A* et *ATP1A2* et associées à des formes familiales de migraine hémiplégique. La caractérisation fonctionnelle de ces mutations *in vitro* et *in vivo* chez l'animal a définitivement fait de la MHF une canalopathie d'origine synaptique. Ainsi, la diminution du seuil d'activation des canaux P/Q ainsi que l'altération de l'activité de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase engendrée par ces mutations apparaissent être les éléments moléculaires à l'origine de l'initiation du phénomène de CSD. Cela permet de proposer un schéma séduisant de physiopathologie de la migraine hémiplégique familiale. En revanche, à ce jour, aucune mutation dans le gène *CACNA1A* ni dans le gène *ATP1A2* n'a été détectée dans les formes fréquentes de migraine non hémiplégique. Les gènes impliqués dans ces formes fréquentes de migraine avec et sans aura restant pour l'instant inconnus. Bien qu'une dizaine de loci ait été rapportée dans des études pan-génome ou ciblées, aucun n'a été confirmé pour l'instant. ♦

## SUMMARY

### Role of P/Q calcium channel in familial hemiplegic migraine

Voltage-dependent calcium channels constitute one of the main pathways of calcium entry into neurons. They are the principal actors of synaptic transmission by controlling the release of neurotransmitters. They also contribute to numerous other cell functions, such as gene expression or synaptogenesis. These channels, by their essential cell functions, are at the origin of numerous channelopathies resulting from mutations of the genes encoding their different subunits. Familial Hemiplegic Migraine (FHM) represents one such example of these channelopathies. In this human disease, genetic studies have demonstrated the implication of the *CACNA1A* gene in a type 1 form of FHM. This gene encodes for the  $\text{Ca}_v2.1$  subunit of P/Q calcium channels and is the target of numerous mutations affecting the properties of channel activity. The question on how discrete mutations of this gene are able to alter the activity of the channel and contribute to the physiopathology of FHM remains an open question. The functional characterization of mutated channels in various heterologous expression systems, as well as *in vivo* in an animal model, provides a molecular scheme of the physiopathology of FHM in which neurons, astrocytes and blood circulation act in concert. ♦

## GLOSSAIRE

**Densité de courant max. (% ctr)** : la densité de courant maximale représente le courant total maximal enregistrable sur une cellule. Elle dépend de différents facteurs tels que le nombre de canaux fonctionnels présents à la membrane plasmique ou de la probabilité d'ouverture du canal et, de ce fait, ne représente qu'un indice de la quantité de calcium capable d'entrer dans la cellule en réponse à une dépolarisation membranaire. Elle est exprimée ici en pourcentage de la densité maximale de courant enregistrée pour la sous-unité  $\text{Ca}_v2.1$  sauvage.

**Shift  $V_{1/2}$  activ.** : le potentiel de demi-activation représente le potentiel de membrane pour lequel la moitié des canaux présents sont activés. Un déplacement de ce potentiel vers des valeurs plus dépolarisantes ou moins dépolarisantes témoigne respectivement d'une diminution ou d'une augmentation de la sensibilité du canal au voltage. Il est exprimé ici en mV par rapport à la valeur mesurée pour la sous-unité  $\text{Ca}_v2.1$  sauvage.

**$\tau$  activ.** : la constante de temps d'activation d'un canal ionique représente la cinétique suivant laquelle un canal va passer de son état fermé (non conducteur mais activable) à son état ouvert (conducteur).

**Shift E** : E représente le potentiel d'inversion d'un ion donné, c'est-à-dire le potentiel de membrane (en mV) pour lequel le flux ionique net est nul. Un déplacement (shift) de ce potentiel est le signe d'une altération de la sélectivité ionique du canal pour cet ion.

**$\tau$  inac.** : la constante de temps d'inactivation d'un canal ionique représente la cinétique suivant laquelle un canal va passer de son état ouvert (conducteur) à un état inactivé (non conducteur et non activable).

**Inac. à 1Hz** : l'inactivation à 1Hz représente un index de l'inactivation des canaux en réponse à un train de dépolarisation membranaire de type potentiels d'action.

**$\tau$  dé-inac.** : la constante de temps de dé-inactivation d'un canal ionique représente la cinétique suivant laquelle un canal va passer d'un état inactivé (non conducteur et non activable) à son état fermé (non conducteur mais activable).

**Conductance** : La conductance d'un canal ionique (exprimée en pico Siemens, pS) caractérise la facilité avec laquelle les ions traversent le pore aqueux de la protéine canal : c'est l'inverse de la résistance.

**Proba. ouverture** : La probabilité d'ouverture d'un canal ionique (entre 0 et 1) représente les chances de trouver le canal dans son état ouvert en réponse à une dépolarisation membranaire. Elle est exprimée ici en pourcentage de la probabilité d'ouverture de la sous-unité  $\text{Ca}_v2.1$  sauvage.



## RÉFÉRENCES

- Ducros A, Tournier-Lasserre E, Bousser MG. The genetics of migraine. *Lancet Neurol* 2002 ; 1 : 285-93.
- Joutel A, Bousser MG, Biouesse V, et al. A gene for familial hemiplegic migraine maps to chromosome 19. *Nat Genet* 1993 ; 5 : 40-5.
- Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN, et al. Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca<sup>2+</sup> channel gene CACNL1A4. *Cell* 1996 ; 87 : 543-52.
- De Fusco M, Marconi R, Silvestri L, et al. Haploinsufficiency of ATP1A2 encoding the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump alpha2 subunit associated with familial hemiplegic migraine type 2. *Nat Genet* 2003 ; 33 : 192-6.
- Dichgans M, Freilinger T, Eckstein G, et al. Mutation in the neuronal voltage-gated sodium channel SCN1A in familial hemiplegic migraine. *Lancet* 2005 ; 366 : 371-7.
- Joutel A, Ducros A, Vahedi K, et al. Genetic heterogeneity of familial hemiplegic migraine. *Am J Hum Genet* 1994 ; 55 : 1166-72.
- Ducros A, Denier C, Joutel A, et al. The clinical spectrum of familial hemiplegic migraine associated with mutations in a neuronal calcium channel. *N Engl J Med* 2001 ; 345 : 17-24.
- Jen JC, Kim GW, Dudding KA, Baloh RW. No mutations in CACNA1A and ATP1A2 in probands with common types of migraine. *Arch Neurol* 2004 ; 61 : 926-8.
- Pietrobon D. Function and dysfunction of synaptic calcium channels: insights from mouse models. *Curr Opin Neurobiol* 2005 ; 15 : 257-65.
- Zhuchenko O, Bailey J, Bonnen P, et al. Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha 1A-voltage-dependent calcium channel. *Nat Genet* 1997 ; 15 : 62-9.
- Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, et al. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 2000 ; 25 : 533-5.
- Mori Y, Friedrich T, Kim MS, et al. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel. *Nature* 1991 ; 350 : 398-402.
- Starr TV, Prystay W, Snutch TP. Primary structure of a calcium channel that is highly expressed in the rat cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 5621-5.
- Meir A, Ginsburg S, Butkevich A, et al. Ion channels in presynaptic nerve terminals and control of transmitter release. *Physiol Rev* 1999 ; 79 : 1019-88.
- Sugiura Y, Woppmann A, Miljanich GP, Ko CP. A novel omega-conopeptide for the presynaptic localization of calcium channels at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurocytol* 1995 ; 24 : 15-27.
- Lennon VA, Kryzer TJ, Griesmann GE, et al. Calcium-channel antibodies in the Lambert-Eaton syndrome and other paraneoplastic syndromes. *N Engl J Med* 1995 ; 332 : 1467-74.
- Walker D, De Waard M. Subunit interaction sites in voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels: role in channel function. *Trends Neurosci* 1998 ; 21 : 148-54.
- Jiang Y, Lee A, Chen J, et al. X-ray structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Nature* 2003 ; 423 : 33-41.
- Heinemann SH, Terlau H, Stuhmer W, et al. Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature* 1992 ; 356 : 441-3.
- Stotz SC, Zamponi GW. Structural determinants of fast inactivation of high voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channels. *Trends Neurosci* 2001 ; 24 : 176-81.
- Sandoz G, Lopez-Gonzalez I, Stamboulian S, et al. Repositioning of charged I-II loop amino acid residues within the electric field by beta subunit as a novel working hypothesis for the control of fast P/Q calcium channel inactivation. *Eur J Neurosci* 2004 ; 19 : 1759-72.
- Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, et al. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 2000 ; 28 : 365-8.
- Kraus RL, Sinnegger MJ, Glossmann H, et al. Familial hemiplegic migraine mutations change alpha1A Ca<sup>2+</sup> channel kinetics. *J Biol Chem* 1998 ; 273 : 5586-90.
- Kraus RL, Sinnegger MJ, Koschak A, et al. Three new familial hemiplegic migraine mutants affect P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channel kinetics. *J Biol Chem* 2000 ; 275 : 9239-43.
- Hans M, Luvisetto S, Williams ME, et al. Functional consequences of mutations in the human alpha1A calcium channel subunit linked to familial hemiplegic migraine. *J Neurosci* 1999 ; 19 : 1610-9.
- Tottene A, Fellin T, Pagnutti S, et al. Familial hemiplegic migraine mutations increase Ca<sup>2+</sup> influx through single human CaV2.1 channels and decrease maximal CaV2.1 current density in neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 ; 99 : 13284-9.
- Tottene A, Pivotto F, Fellin T, et al. Specific kinetic alterations of human CaV2.1 calcium channels produced by mutation S218L causing familial hemiplegic migraine and delayed cerebral edema and coma after minor head trauma. *J Biol Chem* 2005 ; 280 : 17678-86.
- Mullner C, Broos LA, van den Maagdenberg AM, Striessnig J. Familial hemiplegic migraine type 1 mutations K1336E, W1684R, and V1696I alter Cav2.1 Ca<sup>2+</sup> channel gating: evidence for beta-subunit isoform-specific effects. *J Biol Chem* 2004 ; 279 : 51844-50.
- Cao YQ, Tsien RW. Effects of familial hemiplegic migraine type 1 mutations on neuronal P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channel activity and inhibitory synaptic transmission. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 ; 102 : 2590-5.
- Ludwig A, Flockerzi V, Hofmann F. Regional expression and cellular localization of the alpha1 and beta subunit of high voltage-activated calcium channels in rat brain. *J Neurosci* 1997 ; 17 : 1339-49.
- van den Maagdenberg AM, Pietrobon D, Pizzorusso T, et al. A Ca<sub>v</sub>1a knockin migraine mouse model with increased susceptibility to cortical spreading depression. *Neuron* 2004 ; 41 : 701-10.
- De Waard M, Hering J, Weiss N, Feltz A. How do G proteins directly control neuronal Ca<sup>2+</sup> channel function? *Trends Pharmacol Sci* 2005 ; 26 : 427-36.
- Melliti K, Grabner M, Seabrook GR. The familial hemiplegic migraine mutation R192Q reduces G-protein-mediated inhibition of P/Q-type (Ca<sub>v</sub>2.1) calcium channels expressed in human embryonic kidney cells. *J Physiol* 2003 ; 546 : 337-47.
- Dalle R, Villanueva L, Woda A, Voisin D. Neurobiology of trigeminal pain. *Med Sci (Paris)* 2003 ; 19 : 567-74.
- Lauritzen M. Pathophysiology of the migraine aura. The spreading depression theory. *Brain* 1994 ; 117 : 199-210.
- Strong AJ, Fabricius M, Boutelle MG, et al. Spreading and synchronous depressions of cortical activity in acutely injured human brain. *Stroke* 2002 ; 33 : 2738-43.
- Parsons AA. Cortical spreading depression: its role in migraine pathogenesis and possible therapeutic intervention strategies. *Curr Pain Headache Rep* 2004 ; 8 : 410-6.
- Magistretti PJ, Pellerin L, Rothman DL, Shulman RG. Energy on demand. *Science* 1999 ; 283 : 496-7.
- Kors EE, Terwindt GM, Vermeulen FL, et al. Delayed cerebral edema and fatal coma after minor head trauma: role of the CACNA1A calcium channel subunit gene and relationship with familial hemiplegic migraine. *Ann Neurol* 2001 ; 49 : 753-60.
- Battistini S, Stenirri S, Piatti M, et al. A new CACNA1A gene mutation in acetazolamide-responsive familial hemiplegic migraine and ataxia. *Neurology* 1999 ; 53 : 38-43.
- Alonso I, Barros J, Tuna A, et al. A novel R1347Q mutation in the predicted voltage sensor segment of the P/Q-type calcium-channel alpha-subunit in a family with progressive cerebellar ataxia and hemiplegic migraine. *Clin Genet* 2004 ; 65 : 70-2.
- Vahedi K, Denier C, Ducros A, et al. CACNA1A gene de novo mutation causing hemiplegic migraine, coma, and cerebellar atrophy. *Neurology* 2000 ; 55 : 1040-2.
- Carrera P, Piatti M, Stenirri S, et al. Genetic heterogeneity in Italian families with familial hemiplegic migraine. *Neurology* 1999 ; 53 : 26-33.
- Kors EE, Melberg A, Vanmolkot KR, et al. Childhood epilepsy, familial hemiplegic migraine, cerebellar ataxia, and a new CACNA1A mutation. *Neurology* 2004 ; 63 : 1136-7.

### TIRÉS À PART

N. Weiss

**Les canaux calciques dépendants du voltage au cœur de la douleur**

Norbert Weiss & Michel De Waard

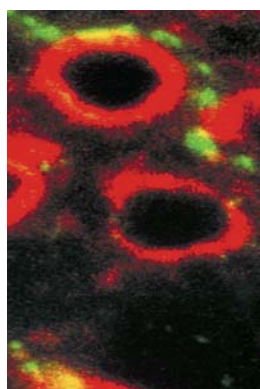
*Medicine Sciences (Paris)* (2006) **22**: 396-404



> Les canaux calciques dépendants du voltage représentent une des voies principales d'entrée du calcium dans la cellule nerveuse où ils participent activement à l'excitabilité cellulaire et aux processus moléculaires de la transmission synaptique. Ils ont, de ce fait, été depuis longtemps la cible pharmacologique d'analgésiques et ce, avant même que leur implication dans la physiologie de la nociception ait réellement été démontrée. Ces dernières années, la caractérisation moléculaire de plus en plus fine de ces canaux et de leurs sous-unités régulatrices, ainsi que la démonstration de leur implication dans les processus nociceptifs, a permis de définitivement considérer ces structures comme des cibles pharmacologiques de premier choix pour le traitement de la douleur. La recherche d'inhibiteurs spécifiques des canaux calciques dépendants du voltage laisse ainsi entrevoir le développement de nouvelles molécules analgésiques fortement prometteuses. <

## Les canaux calciques dépendants du voltage au cœur de la douleur

Norbert Weiss, Michel De Waard



Laboratoire Canaux Calciques, Fonctions et Pathologies, Inserm U607, DRDC, Bâtiment C3, 17, rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 09, France. CEA, Grenoble, Université Joseph Fourier, Grenoble, France. [mdewaard@cea.fr](mailto:mdewaard@cea.fr)

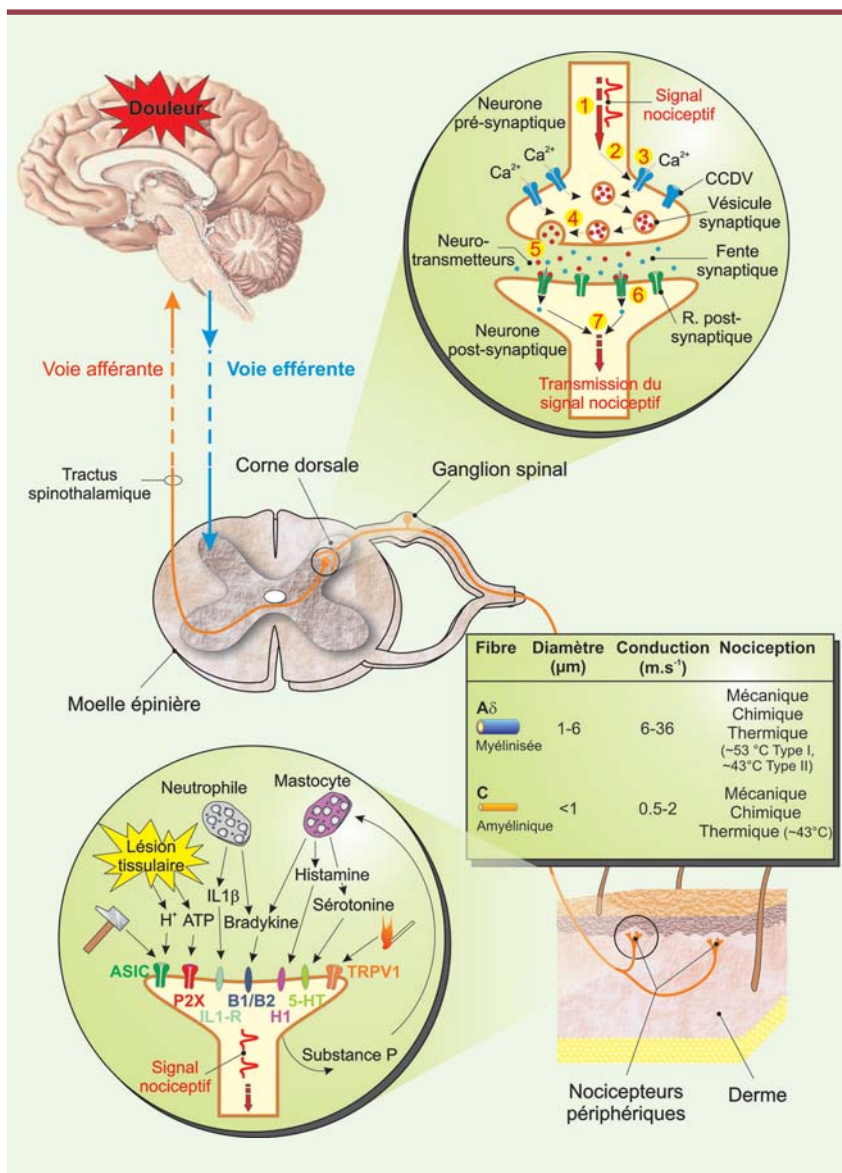
### Du stimulus à la sensation de douleur : un cheminement complexe

Classiquement, la nociception est décrite comme l'ensemble des fonctions de l'organisme permettant de détecter, de percevoir et de réagir à des stimuli potentiellement nocifs. À titre d'exemple, le contact avec un élément piquant se traduit rapidement par un réflexe de retrait. Il s'agit donc, avant tout, d'un mécanisme protecteur permettant à l'individu de maintenir son intégrité physique. En dehors de ce contexte, la douleur n'a pas lieu d'être. Les différentes thérapies visant à l'atténuer prennent dès lors toute leur importance. On distingue deux formes principales de douleurs : la douleur de type neuropathique et celle de type nociceptif. La douleur neuropathique, la plus rare, résulte le plus souvent d'une lésion du système nerveux périphérique ou central. Il s'agit d'une douleur persistante (même après disparition de la lésion) aboutissant fréquemment à une chronicité. La douleur nociceptive provient de dommages tissulaires, autres que des tissus nerveux, et disparaît en général avec la guérison de la lésion.

Bien que la nociception soit un mécanisme hautement complexe tant d'un point de vue anatomique que moléculaire, il est possible d'en établir un schéma général (Figure 1).

La définition actuelle de la douleur, établie par l'*International Association for the Study of Pain*<sup>®</sup>, se présente comme étant « l'expression d'une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable liée à une lésion tissulaire existante, potentielle ou décrite en termes d'une telle lésion ». Cette définition sous-entend des mécanismes complexes d'ordre anatomophyso-pathologiques d'une part et psychologiques d'autre part, à l'origine de la sensation douloureuse [1]. Ces dernières années, la caractérisation moléculaire de plus en plus fine des voies de la nociception a précisé l'implication d'une classe particulière de canaux ioniques : les canaux calciques dépendants du voltage (CCDV). Ces structures s'avèrent être des cibles de premier choix dans le traitement de la douleur. Les événements et les voies conduisant à la sensation de la douleur sont brièvement présentés dans cet article. Cet article fait ensuite le point de manière détaillée sur les CCDV, leurs implications dans la nociception et leurs intérêts comme cible pharmacologique dans le traitement de la douleur.

Article reçu le 28 juillet 2005, accepté le 26 octobre 2005



**Figure 1. Représentation schématique des voies afférentes nociceptives.** Sont représentés quelques éléments participants au déclenchement du signal nociceptif (zoom en bas à gauche). Ce signal peut être déclenché soit par l'activation de protéines canal en réponse à un stimulus d'origine thermique ou mécanique, soit par un ensemble de molécules libérées par le tissu lésé ou sécrétées par les cellules participant au processus inflammatoire s'il a lieu. Le signal nociceptif est ensuite conduit jusque dans la corne dorsale de la moelle épinière par des neurofibres de premier ordre Aδ et C dont les propriétés structurales et fonctionnelles sont précisées dans l'encadré. La transmission du message nociceptif vers des neurones de deuxième ordre est également détaillée et met en jeu des canaux calciques dépendants du voltage. Les différentes étapes moléculaires conduisant à la transmission synaptique sont indiquées par des numéros de ① à ⑧ (zoom en haut à droite). L'information nociceptive est ensuite transmise vers les centres supérieurs via le tractus spinothalamique (figure adaptée de [2]). ASIC : *acid sensing ionic channels* ; P2X : récepteur ionotrope P2X ; IL-1R : récepteur de l'interleukine-1 ; B1/B2 : récepteurs des bradykinines de type 1 et 2 ; H1 : récepteur de l'histamine de type 1 ; 5-HT : récepteur de la sérotonine ; TRPV1 : *transient receptor potential vanilloid 1* ; IL-1β : interleukine-1β.

Le signal nociceptif prend naissance à la suite de l'activation de nocicepteurs constitués par les terminaisons libres de fibres nerveuses. On distingue les mécanonocicepteurs activés exclusivement par des stimuli intenses de nature mécanique et les nocicepteurs polymodaux, répondant non seulement à des stimuli d'origine mécanique, mais également thermique et chimique. L'activation des nocicepteurs reste un mécanisme relativement mal connu. Bien que le nocicepteur puisse être directement stimulé par l'agent nociceptif lui-même, l'implication de substances algogènes libérées en réponse à la stimulation semble être l'explication de premier choix. Parmi ces substances, on note, de manière non exhaustive, l'histamine, la sérotonine, la bradykinine, les tachykinines (substance P et neurokynine A), les prostanoïdes (prostaglandines et leucotriènes), les interleukines, les endothélines, l'ATP, mais également des éléments plus simples tels que les protons H<sup>+</sup> ou encore certains radicaux libres comme le monoxyde d'azote [2]. Ces substances agissent sur des protéines membranaires présentes au niveau des nocicepteurs et dont l'activation est à la base même du déclenchement du signal nociceptif. L'influx nociceptif engendré est alors conduit par des fibres nerveuses de type Aδ et C en réponse à la stimulation des mécanonocicepteurs et des nocicepteurs polymodaux, respectivement. Ces neurones de premier ordre présentent tous la particularité de posséder leurs corps cellulaires dans les ganglions spinaux de la racine dorsale de la moelle épinière. Ils projettent ensuite au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière où ils font synapses avec des neurones de second ordre. Le signal nociceptif emprunte alors les voies ascendantes via le tractus spinothalamique en direction du thalamus, puis du cortex sensoriel et du système limbique, où l'information nociceptive sera confrontée à un ensemble de processus cognitifs faisant appel, par exemple, au vécu de l'individu, à son environnement ou encore à son état émotionnel [3]. Au niveau moléculaire, la transmission de l'influx nociceptif par les neurones de premier ordre dépend très largement de diverses conductances ioniques

	Sous-unité $\alpha_1$	Courant	Pharmacologie	Localisation
Haut seuil d'activation (HSA)	$\alpha_{1S}$ (Ca <sub>v</sub> 1.1)			Muscle squelettique
	$\alpha_{1C}$ (Ca <sub>v</sub> 1.2)	Type L	Dihydropyridines (par exemple, nifédipine)	Neurones, cœur, muscles lisses, cellules endocrines
	$\alpha_{1D}$ (Ca <sub>v</sub> 1.3)		Phénylalkylamines Benzothiazépines	Neurones, cœur, cellules endocrines
	$\alpha_{1F}$ (Ca <sub>v</sub> 1.4)			Rétine
	$\alpha_{1A}$ (Ca <sub>v</sub> 2.1)	Type P/Q	$\omega$ -Agatoxine IVA $\omega$ -Agatoxine IIIA $\omega$ -Conotoxine MVIIC	Neurones, cellules pancréatiques $\beta$
	$\alpha_{1B}$ (Ca <sub>v</sub> 2.2)	Type N	$\omega$ -Conotoxine GVIA $\omega$ -Conotoxine MVIIA $\omega$ -Agatoxine IIIA	Neurones
$\alpha_{1E}$ (Ca <sub>v</sub> 2.3)	Type R	Nickel, Cadmium	Neurones, cellules endocrines	
Bas seuil d'activation (BSA)	$\alpha_{1G}$ (Ca <sub>v</sub> 3.1)	Type T	Benzimidazoles (par exemple, mibéfradil)	Neurones, cœur, muscles lisses, cellules endocrines, spermatozoïdes
	$\alpha_{1H}$ (Ca <sub>v</sub> 3.2)		Amiloride Éthosuximide	Neurones, cœur, foie, muscles lisses, cellules endocrines
	$\alpha_{1I}$ (Ca <sub>v</sub> 3.3)		Kurtoxine Nickel	Neurones, spermatozoïdes

**Tableau 1. Classification moléculaire, pharmacologique et localisation tissulaire des canaux calciques dépendants du voltage.**

[4] telles que des conductances sodiques, potassiques, mais également calciques engendrées par les CCDV. En contrôlant l'excitabilité cellulaire et la transmission synaptique [5], les CCDV se révèlent être à la base de la transmission de l'influx nerveux. Ainsi, ces structures apparaissent clairement comme des cibles intéressantes lorsque l'on cherche à stopper la transmission du signal nociceptif.

### Canaux calciques dépendants du voltage : diversité, structure et fonction

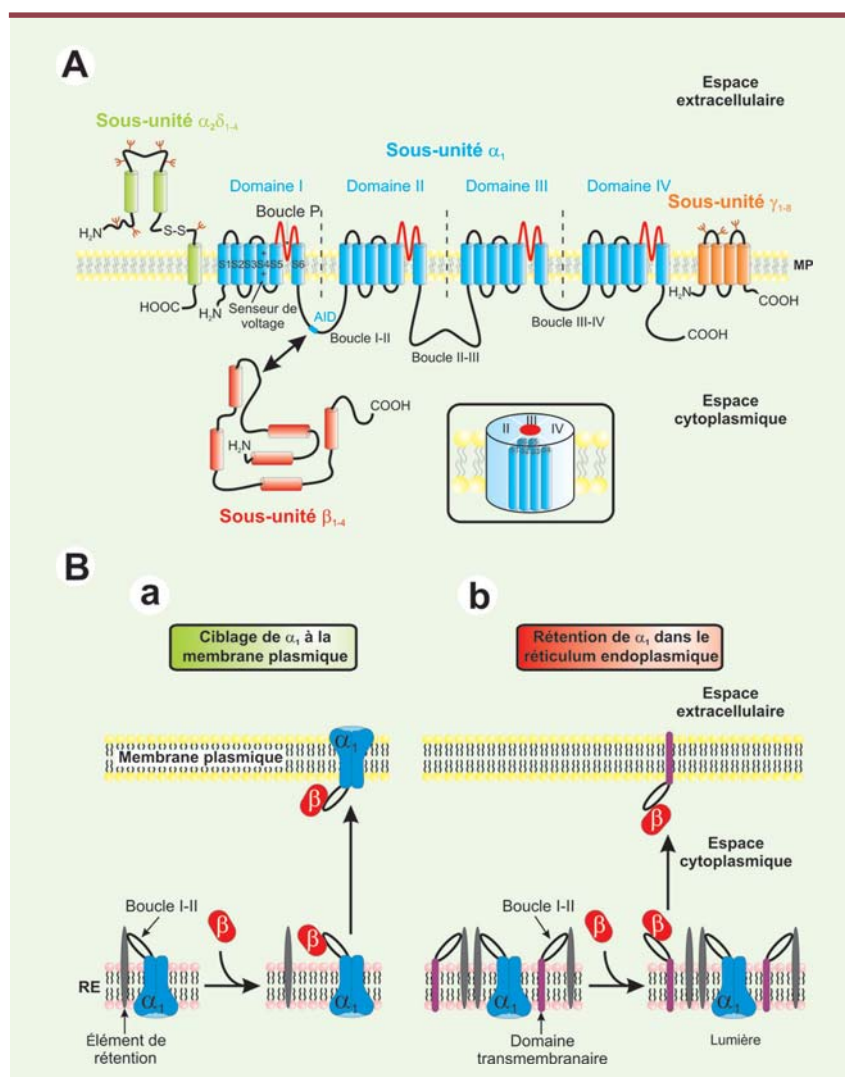
Les CCDV représentent une des voies majeures d'entrée de calcium dans la cellule nerveuse. Sur la base de propriétés électrophysiologiques, cette famille est subdivisée en deux classes (Tableau 1) : (1) les canaux à « bas seuil d'activation » (BSA) activés par de faibles dépolarisations membranaires et (2) les canaux à « haut seuil d'activation » (HSA) activés pour de plus fortes dépolarisations membranaires. La classe des canaux BSA regroupe exclusivement les canaux de type T alors que la classe des canaux HSA comprend les canaux de type L, P/Q, N, et R [6]. Chacun de ces canaux présente des propriétés biophysiques et pharmacologiques propres. Au niveau structural, les CCDV se composent d'une sous-

unité principale  $\alpha_1$ , centrée autour de sous-unités auxiliaires  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\alpha_2\delta$  (Figure 2A) dont les principales fonctions sont de moduler l'expression membranaire de la sous-unité  $\alpha_1$  (Figure 2B), son comportement biophysique ainsi que ses propriétés pharmacologiques.

Bien que les CCDV présentent la particularité commune de permettre l'entrée de calcium dans la cellule, ces canaux, de par leur spécificité tissulaire, ne présentent cependant pas la même importance dans les mécanismes de transmission de l'information nociceptive.

### Canaux calciques de type N

Les canaux de type N sont, pour l'essentiel, les canaux HSA les plus largement impliqués dans la nociception. Deux approches ont permis de mettre en évidence leur implication : (1) l'invalidation génique de la sous-unité  $\alpha_{1B}$  et (2) l'injection locale ou systémique d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques. L'invalidation génique de la sous-unité  $\alpha_{1B}$  chez l'animal témoigne de l'implication des canaux N aussi bien dans des douleurs nociceptives (thermique et inflammatoire) que neuropathiques [7, 8]. De manière intéressante, la nociception mécanique ne semble pas être affectée chez ces animaux, suggérant une certaine sélectivité dans le traitement de l'information nociceptive par ces canaux. Cette approche d'invalidation génique, bien que très informative chez l'animal, est cependant illusoire en termes de stratégie thérapeutique chez l'homme. Ainsi, l'utilisation de bloqueurs pharmacologiques spécifiques des canaux N représente sans conteste une stratégie



**Figure 2. Organisation membranaire présumée des canaux calciques dépendants du voltage et des sous-unités régulatrices.** **A.** Les CCDV (HSA et BSA) se composent d'une sous-unité principale  $\alpha_1$  (en bleu) formant le pore ionique. Elle se compose de quatre domaines (domaines I à IV) constitués chacun par six segments transmembranaires (S1 à S6). Ces quatre domaines sont reliés entre eux par des boucles cytoplasmiques reliant les domaines I à II (boucle I-II), II à III (boucle II-III) et III à IV (boucle III-IV). Les segments S4, riches en résidus basiques arginines et lysines, constituent le senseur de voltage. Les boucles extracellulaires et transmembranaires reliant les segments S5 et S6 (boucles P, en rouge) forment le pore ionique. L'insert représente l'organisation « tridimensionnelle » de cette sous-unité  $\alpha_1$ . Les sous-unités régulatrices des canaux HSA sont également représentées. Ces sous-unités auxiliaires modulent les propriétés biophysiques de la sous-unité  $\alpha_1$ . La sous-unité  $\beta$  (en rouge) est entièrement cytoplasmique et interagit avec la sous-unité  $\alpha_1$  via une séquence AID présente sur la boucle I-II. La sous-unité  $\gamma$  (en orange) est entièrement membranaire et glycosylée. La sous-unités  $\alpha_2\delta$  (en vert) est essentiellement extracellulaire et ancrée à la membrane plasmique (MP) par la partie  $\delta$  de la protéine. Les parties  $\alpha_2$  et  $\delta$  sont reliées entre elles via deux ponts disulfures. **B.** La sous-unité  $\beta$  est responsable du ciblage fonctionnel de la sous-unité  $\alpha_1$  à la membrane plasmique. **a.** Immédiatement après sa synthèse, et en absence de sous-unité  $\beta$ , la sous-unité  $\alpha_1$  (en bleu) est retenue au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) par une interaction entre la boucle cytoplasmique I-II et un élément de rétention encore non identifié (en gris). L'expression d'une sous-unité  $\beta$  (en rouge) lève cette rétention par interaction avec la boucle cytoplasmique I-II de la sous-unité  $\alpha_1$ , et cela quelle que soit l'isoforme  $\beta$ . À la suite de cette interaction, le complexe  $\alpha_1/\beta$  est adressé à la membrane plasmique. **b.** Il est possible d'interférer avec le processus de ciblage de la sous-unité  $\alpha_1$  à la membrane plasmique en surexprimant une protéine chimère (en violet) constituée d'un domaine transmembranaire et de la boucle cytoplasmique I-II de la sous-unité  $\alpha_1$ . Après sa synthèse, la protéine chimère est retenue, au même titre que la sous-unité  $\alpha_1$ , au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique via une interaction entre la boucle I-II et l'élément de rétention. La surexpression de la protéine chimère vis-à-vis de la sous-unité  $\alpha_1$  entraîne la séquestration des sous-unités  $\beta$  au niveau de la membrane plasmique. Les sous-unités  $\alpha_1$  ne sont plus ciblées correctement et restent dans la membrane du réticulum endoplasmique où elles ne sont pas fonctionnelles. AID : *alpha interaction domain* ; S-S : pont disulfure ; NH<sub>2</sub> : extrémité aminoterminal ; COOH : extrémité carboxyterminale ; MP : membrane plasmique.

plus rationnelle (Figure 3A). Les inhibiteurs les plus spécifiques sont l' $\omega$ -conotoxine GVIA (SNX-124) [9] et l' $\omega$ -conotoxine MVIIA (SNX-111) [10] (Tableau I). Isolés à partir du venin des mollusques marins *Conus geographus* et *Conus magus*, respectivement, ces inhibiteurs appartiennent à la classe des peptides neurotoxiques. L'administration de ces peptides par voie intrathécale chez l'animal témoigne de propriétés analgésiques intéressantes. Plus particulièrement, l'injection intrathécale d' $\omega$ -conotoxine MVIIA produit un effet antinociception [11] et anti-allodynie<sup>1</sup> tactile [12]. Au niveau clinique, l'injection intrathécale de ziconotide, un analogue synthétique de l' $\omega$ -conotoxine MVIIA, réalisée chez des patients cancéreux ou atteints du syndrome d'immunodéficience acquise et pour lesquels l'utilisation d'analgésiques classiques de types opiacés s'était révélé inefficace, a confirmé ses puissantes propriétés analgésiques [13] (Tableau II). Toutefois, des effets secondaires non négligeables nécessitent fréquemment l'arrêt du traitement [14]. Bien que difficile à gérer en termes de dosage, le ziconotide reste cependant une molécule intéressante. Actuellement, l' $\omega$ -conotoxine CVID (AM-336) [15], isolée à partir du venin

<sup>1</sup> L'allodynie désigne une douleur déclenchée par un stimulus habituellement indolore.

Molécule/ Nom commercial	Cibles moléculaires	Type de douleur	État clinique	Effets indésirables
Morphine	Bloqueur de canaux N via les récepteurs $\mu$ -opioïdes	Douleurs chroniques, neuropathiques et inflammatoires	Clinique	Constipation, nausées, vomissements, somnolence, développement d'une tolérance
Ziconotide ( $\omega$ -conotoxine MVIIA) /Prialt®	Bloqueur de canaux N	Douleurs neuropathiques, cancéreuses et liées au SIDA	Phase III terminée/ Clinique	Nausées, somnolence, asthénie, hypertonie, troubles de la mémoire/de la vision, troubles psychiques (anxiété, hallucinations)
Gabapentine/ Neurontin®	Sous-unités $\alpha_2\delta_1$ et $\alpha_2\delta_2$	Douleurs neuropathiques, cancéreuses, diabétiques et migraine. Neuralgies trigéminales et post-herpétiques	Clinique	Somnolence, vertiges, troubles du sommeil, troubles digestifs/ de la vision
Ethosuximide/ Zarontin®	Bloqueur de canaux T	Migraine	Clinique	Somnolence, céphalées, troubles digestifs
$\omega$ -conotoxine CVID (AM-336)	Bloqueur de canaux N	Douleur neuropathique	Phase II	Non déterminés

**Tableau II. Caractéristiques analgésiques et situation clinique de différents bloqueurs de canaux calciques dépendants du voltage.**

de *Conus catus*, semble plus adaptée à une utilisation thérapeutique (Tableau II). En effet, ce peptide présente une toxicité amoindrie par rapport à l' $\omega$ -conotoxine MVIIA tout en conservant des propriétés analgésiques similaires [16]. Une étude récente réalisée chez l'animal montre que l'utilisation d' $\omega$ -conotoxine CVID, combinée avec le dexmédétomidine (un agoniste adrénergique également utilisé pour ses propriétés analgésiques), produit une analgésie améliorée [17]. L'utilisation combinée de différents analgésiques présente l'avantage de réduire les doses thérapeutiques, diminuant ainsi les effets indésirables liés à chacune des molécules, tout en conservant un effet analgésique satisfaisant. Toutefois, l'administration de ces molécules ne peut se faire que par voie intrathécale en raison d'un risque hypotensif trop important par d'autres voies d'administration. Actuellement, l'industrie pharmaceutique développe de nouvelles molécules visant à bloquer sélectivement les canaux N. Des dérivés de L-cystéine [18] ou de 4-aminopipéridine [19], administrés par voie orale chez l'animal, semblent posséder des propriétés analgésiques intéressantes tout en restant dénués de tout effet secondaire. Leur efficacité doit à présent être évaluée chez l'homme. Enfin, la mise en évidence récente d'une isoforme des canaux N (variant d'épissage), présente exclusivement au niveau des neurones sensitifs des ganglions spinaux, indique qu'elle puisse être une cible pharmacologique particulièrement intéressante [20]. En effet,

la sélection d'inhibiteurs spécifiques de cette isoforme serait susceptible de produire, à terme, des molécules analgésiques tout aussi performantes et potentiellement administrables par voie orale en raison d'une plus grande spécificité d'action.

### Canaux N et récepteurs couplés aux protéines G

Bien que l'utilisation d'inhibiteurs agissant de manière directe sur les canaux N représente une stratégie analgésique intéressante, l'analgésique le plus ancien, encore majoritairement utilisé aujourd'hui, n'exerce pas ses effets de manière directe. Isolée en 1815, par l'Allemand Friedrich Sertürner à partir du pavot (*Papaver somniferum*), la morphine (Tableau II) qui doit son nom à Morphée, dieu du sommeil, a très tôt été utilisée pour ses propriétés analgésiques et calmantes. Même si les mécanismes par lesquels cet opiacé exerce ses propriétés sont restés longtemps méconnus, il est maintenant admis que la morphine agit comme un agoniste spécifique des récepteurs  $\mu$ -opioïdes, lesquels appartiennent à la classe des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). D'un point de vue fonctionnel, l'activation des récepteurs  $\mu$ -opioïdes au niveau présynaptique conduit à l'inhibition des courants calciques, notamment ceux des canaux N [21] (Figure 3B-C), et ceci grâce à la fixation du dimère  $G_{\beta\gamma}$  sur le canal [22, 23]. De plus, au niveau post-synaptique, l'activation des récepteurs  $\mu$ -opioïdes conduit à l'activation de conductances potassiques à l'origine d'une hyperpolarisation cellulaire rendant la cellule réfractaire à toute stimulation [24]. Ainsi, en diminuant l'excitabilité cellulaire et la libération de neuromédiateurs, la morphine agit comme un puissant inhibiteur de la transmission synaptique. La caractérisation de

nouveaux couples RCPG/ligands capables de moduler l'activité des canaux N se révèle être une stratégie intéressante dans la recherche de nouvelles molécules analgésiques. Le séquençage du génome humain a permis de caractériser un

nombre considérable de nouveaux RCPG. À l'heure actuelle, moins de 10 % des RCPG sont utilisés comme cible thérapeutique, alors que plus de 30 % des molécules pharmaceutiques présentes sur le marché ciblent des RCPG [25]. Cela témoigne du fort potentiel thérapeutique de cette famille de molécules. Ainsi, la nociceptine (initialement nommée orphanine FQ), ligand naturel des récepteurs ORL1 (*opioid receptor-like 1*) présente un intérêt particulier en raison de ses effets modulateurs sur la perception de la douleur [26]. Bien que ses effets soient encore mal caractérisés, il semblerait que l'activité des canaux N soit modulée en réponse à l'activation des récepteurs ORL1 [27].

### Implication des autres canaux calciques HSA

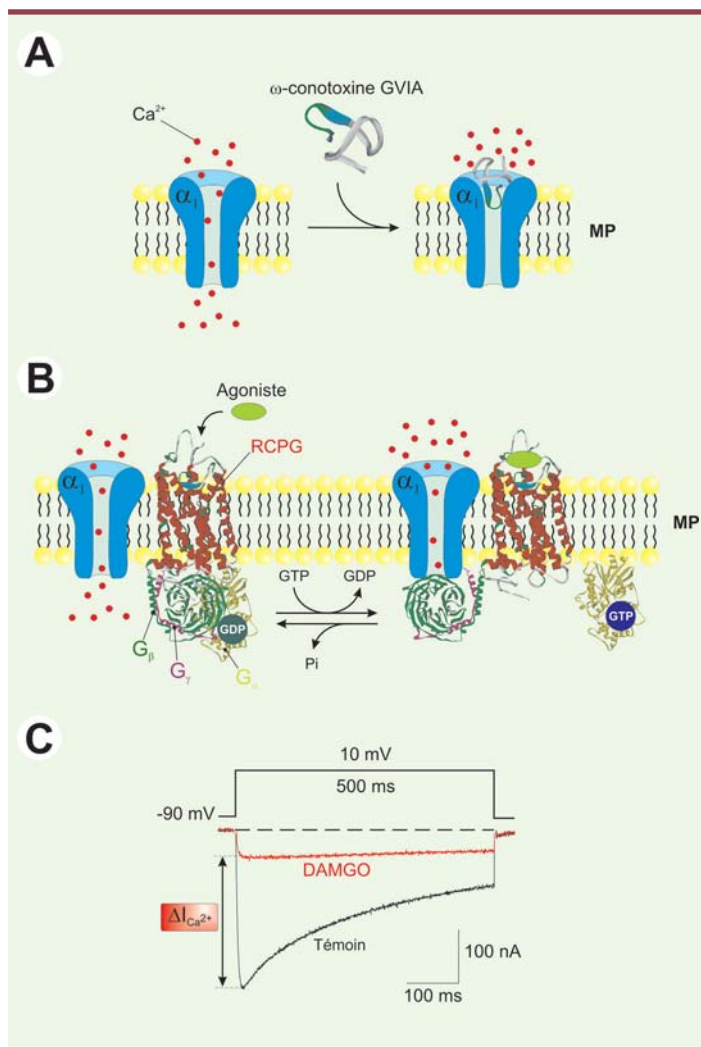
#### Canaux calciques de type P/Q

La caractérisation, en 1996, de différentes mutations dans le gène, présent sur le chromosome 19p13, codant pour la sous-unité  $\alpha_{1A}$ , a révélé l'implication des canaux P/Q dans différentes formes de migraines hémiplegiques familiales (MHF) et d'ataxie de type 2 [28]. L'étude de ces mutants a permis de mettre en évidence des modifications des propriétés biophysiques du canal conduisant à une hyperactivité neuronale des structures cérébrales impliquées dans la physiopathologie de la migraine (cortex cérébral, ganglions trijumeaux) [29]. Ainsi, les canaux P/Q représentent des cibles potentielles pour le traitement des MHF. Cependant, en raison du faible nombre de molécules disponibles pour ces canaux, ils ne sont pas les cibles de la pharmacopée actuelle. Toutefois, avec une prévalence supérieure à 20 % chez les femmes et 10 % chez les hommes, la migraine reste une affection courante, handicapante et difficilement traitable. Dans ce contexte, les canaux P/Q représentent sans aucun doute une cible pharmacologique d'intérêt à exploiter.

#### Canaux calciques de type R et L

Bien que les canaux N représentent les canaux HSA majoritairement impliqués dans la nociception, il n'est pas à exclure que d'autres conductances calciques aient également leur importance. L'invalidation génique, chez l'animal, des canaux R semble potentialiser les effets analgésiques de la morphine tout en diminuant l'instauration de la tolérance qui lui est associée [30]. De plus, ces canaux pourraient être impliqués dans les douleurs somatiques, même si leur implication à un niveau spinal ou supraspinal reste encore mal caractérisée [31]. Ainsi, les canaux R ne semblent présenter, pour l'instant, qu'un faible intérêt pharmacologique pour le traitement de la nociception.

Les canaux L ont également été évoqués comme pouvant participer aux mécanismes de nociception. L'injection



**Figure 3.** Représentation schématique des stratégies thérapeutiques visant à diminuer l'activité des canaux calciques dépendants du voltage. Actuellement, deux stratégies thérapeutiques permettent de diminuer les conductances calciques soutenues par les CCDV. **A.** Inhibition via des bloqueurs extracellulaires. C'est le cas de l'ensemble des toxines peptidiques agissant sur les CCDV. Elles agissent en bloqueur de pore ionique en empêchant le passage des ions à travers la sous-unité  $\alpha_1$ . **B.** Inhibition via l'activation des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Cette inhibition nécessite l'activation d'un RCPG via son ligand extracellulaire. L'activation du récepteur conduit à la dissociation du complexe  $G_{\beta\gamma}/G_{\alpha}$  par échange du GDP en GTP de la sous-unité  $G_{\alpha}$ . Le dimère  $G_{\beta\gamma}$  est alors capable de fixer directement la sous-unité  $\alpha_1$  conduisant à une inhibition des conductances calciques. **C.** Représentation d'un courant calcique de type N en condition témoin (trace noire) et après activation du récepteur  $\mu$ -opioïde par 10  $\mu$ M de DAMGO, un analogue synthétique de la morphine. MP : membrane plasmique ; RCPG : récepteur couplé aux protéines G ; GTP : guanosine trisphosphate ; GDP : guanosine bisphosphate ; DAMGO : (*D-Ala2, N-Me-Phe4, glycinol5*)-Enkephalin.

intrapéritonéale de vérapamil, un bloqueur de canaux L, procure un effet analgésique, principalement sur des douleurs d'origine thermique et mécanique [32]. Toutefois, les évidences de leur implication dans la nociception restent encore largement fragmentaires. Néanmoins, en raison de leur sensibilité particulière aux dihydropyridines, ces canaux pourraient représenter des cibles pharmacologiques à fort intérêt thérapeutique si des preuves plus substantielles de leur implication dans des voies de signalisation nociceptive étaient faites.

### **Sous-unités auxiliaires : des cibles potentielles pour le traitement de la douleur**

#### **Sous-unité $\beta$**

Bien que les principaux travaux se soient focalisés sur la sous-unité  $\alpha_1$ , certains résultats montrent l'implication des sous-unités régulatrices dans les mécanismes de nociception. En effet, l'invalidation génique de la sous-unité  $\beta_3$  chez l'animal semble conférer à ces animaux un seuil de sensibilité accru à la douleur inflammatoire [33]. Il est toutefois probable que cette sous-unité ne soit pas impliquée de manière directe dans les mécanismes de nociception, mais vraisemblablement *via* les canaux auxquels elle est associée. Plus particulièrement, la sous-unité  $\beta$  participe à la mise en place de la sous-unité  $\alpha_1$  dans la membrane plasmique [34] (Figure 2B). Des travaux fondés sur l'utilisation d'un dominant négatif, visant à diminuer la disponibilité des sous-unités  $\beta$ , mettent en évidence une diminution de l'expression des canaux HSA à la membrane plasmique [35]. Cette diminution d'expression est vraisemblablement à l'origine d'une diminution de l'excitabilité cellulaire, conduisant à des effets analgésiques. En l'absence d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques des sous-unités  $\beta$ , l'utilisation d'un dominant négatif, administré localement, représente sans aucun doute une stratégie thérapeutique pertinente pour l'avenir.

#### **Sous-unité $\alpha_2\delta$**

Il a également été relevé une augmentation de l'expression des sous-unités  $\alpha_2\delta_1$  au niveau des neurones des ganglions spinaux, en réponse à une lésion du système nerveux périphérique associée au développement de douleurs allodymiques [36]. Cette surexpression des sous-unités  $\alpha_2\delta_1$  n'affecte ni l'expression de la sous-unité  $\alpha_{1B}$ , ni celle des sous-unités  $\beta$  [37]. L'injection intrathécale d'oligonucléotides antisens, visant à diminuer le niveau d'expression des sous-unités  $\alpha_2\delta_1$ , confère aux animaux un effet anti-allodynie [38]. De plus, l'injection intrathécale de gabapentine (un anticonvulsif

et antiépileptique) (Tableau II), capable d'interagir *in vitro* avec les sous-unités  $\alpha_2\delta$ , diminue également les douleurs allodymiques sur ces modèles animaux. Ces données suggèrent que les sous-unités  $\alpha_2\delta$  sont impliquées dans le développement des douleurs allodymiques indépendamment de leur fonction de régulation des CCDV.

### **Canaux calciques de type T**

Ce n'est que récemment que l'injection systémique de mibéfradil, un bloqueur de canaux T (Tableau I), a permis de mettre en évidence l'implication de ces canaux dans des mécanismes de nociception [39]. Ces études réalisées chez l'animal ont mis en évidence l'implication des canaux T dans des douleurs d'origine thermique et mécanique. De même, l'injection intrapéritonéale, intrathécale ou encore locale, d'éthosuximide (un antiépileptique) (Tableau II), également bloqueur des canaux T (Tableau I), présente des propriétés analgésiques chez des modèles animaux d'hyperalgésie thermique ou mécanique [40]. Fait intéressant, l'utilisation du paclitaxel (médicament à base de taxol) classiquement utilisé dans le traitement des tumeurs pour ses propriétés antimitotiques (cette molécule bloque la réplication cellulaire en se fixant sur les microtubules qu'elle stabilise) induit chez les patients une hyperalgésie et/ou allodynie thermique et mécanique. Ces effets secondaires étant, chez le rat, complètement abolis par l'injection intrapéritonéale d'éthosuximide [41]. Ces résultats attendent d'être confirmés en clinique. Des travaux visant à développer la pharmacopée des canaux T ont permis de mettre en évidence des propriétés inhibitrices spécifiques de certains anesthésiques stéroïdiens tels que l'alphaxalone ou l'allopregnaolone [42]. De plus, l'état redox des canaux T semble également jouer un rôle dans la modulation de la nociception. L'injection dans les aires réceptrices de L-cystéine, un agent réducteur, induit une hyperalgésie thermique qui est complètement abolie par la co-injection d'un agent oxydant comme le DTNB [43]. Ces résultats suggèrent que les sites rédox des canaux T pourraient être d'importantes cibles analgésiques. Enfin, l'implication des canaux T dans les mécanismes de nociception a été précisée très récemment par l'injection intrathécale d'oligonucléotides antisens visant à diminuer l'expression de ces canaux au niveau périphérique. Cette étude a révélé le rôle majeur de la sous-unité  $\alpha_{1H}$ , témoignant de l'implication sélective de ces canaux [44]. Ainsi, les canaux T représentent une classe émergente de cibles analgésiques dont la sélection d'inhibiteurs spécifiques de la sous-unité  $\alpha_{1H}$  est certainement une piste thérapeutique de première importance à exploiter.

### **Au-delà des canaux calciques dépendants du voltage...**

Bien que les modulateurs des CCDV représentent des analgésiques de premier choix, ils s'intègrent toutefois dans une pharmacopée plus générale, ciblant d'autres protagonistes de la physiopathologie de la douleur. Ainsi, les cyclooxygénases (COX) impliquées dans la production des prostanoïdes sont la cible des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) tels que l'acide acétylsalicylique (aspirine) [45]. Les antidépresseurs tricycliques (ATC) sont également utilisés depuis longtemps

pour leurs propriétés analgésiques. En dépit du fait que leur mécanisme d'action demeure mal connu, il est certain qu'ils exercent leurs effets analgésiques indépendamment de leurs propriétés psychogènes. En effet, en agissant comme des inhibiteurs de la recapture des monoamines (noradrénaline et sérotonine), ils participent à l'activation d'une voie nociceptive efférente inhibitrice largement dépendante de ces neuromédiateurs. Ils pourraient également moduler le système opioïde endogène ou encore agir comme des inhibiteurs des canaux ioniques. Le venlafaxine est ainsi l'ATC utilisé comme analgésique de second choix dès lors que les autres thérapeutiques se révèlent inefficaces [46].

Dans la recherche de nouvelles stratégies antidouleur, l'ensemble des canaux ioniques impliqués dans la détection, la propagation ou la transmission du signal nociceptif représente également des cibles pharmacologiques potentiellement intéressantes [47]. Dans ce contexte, l'A-317491, un inhibiteur non nucléotidique des récepteurs ionotropiques purine/pyrimidine P2X<sub>3</sub> et P2X<sub>2/3</sub>, a démontré des propriétés analgésiques intéressantes sur des modèles animaux de neuropathies [48]. Les canaux sodiques ASIC (*acidic sensing ion channels*), activés par une diminution du pH extracellulaire à la suite d'un processus inflammatoire, pourraient également être des candidats intéressants si leur pharmacologie venait à se développer. En effet, seule la capsazépine, un antagoniste des canaux TRPV1, est capable de réduire l'activation des neurones sensoriels par les protons [49]. Des données plus récentes suggèrent que les AINS pourraient également moduler l'activité de ces canaux, indépendamment de leur action sur les COX [50]. Enfin, les récepteurs glutamatergiques de type NMDA (N-méthyl-D-aspartate), de par leur implication dans les phénomènes de plasticité synaptique, semblent jouer un rôle majeur dans le développement d'allodynies et d'hyperalgésies après une lésion du système nerveux périphérique [51]. Au niveau clinique, l'administration par voie intraveineuse de kétamine, un puissant antagoniste des récepteurs NMDA, a révélé des effets analgésiques très intéressants chez des patients souffrant de douleurs cancéreuses et pour lesquels la morphine s'était révélée insuffisante [52]. Toutefois, si l'implication de ces canaux ioniques dans les mécanismes moléculaires de la douleur n'est plus à démontrer, ces structures ne pourront être considérées comme de réelles cibles thérapeutiques que lorsque qu'une pharmacologie spécifique et dépourvue d'effets secondaires sera disponible.

## Conclusions et perspectives

Comme nous l'avons vu en introduction, le traitement de la douleur, quel que soit son type, représente une des priorités de la thérapeutique moderne. Les canaux calciques de type N, en raison de leur implication directe dans la transmission synaptique, ont depuis longtemps été considérés comme des cibles à fort potentiel analgésique. Ils sont ainsi la cible principale de la morphine qui reste, malgré ses effets indésirables, l'analgésique le plus utilisé pour le traitement des douleurs neuropathiques. Ces dernières années, le développement de la pharmacologie des canaux N, avec la découverte de nouveaux inhibiteurs spécifiques (toxines peptidiques, petites molécules organiques), a permis d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques. Un certain nombre d'essais cliniques ont ainsi pu mettre en évidence des effets analgésiques de certaines molécules dans des situations où la morphine

s'était révélée inefficace. De plus, l'émergence très récente des canaux T dans les mécanismes moléculaires de la nociception ouvre de nouvelles pistes thérapeutiques. Même si la pharmacologie de ces canaux reste encore trop largement fragmentaire, nul doute que les canaux T représentent de réelles cibles pharmacologiques pour le traitement de la douleur. Ainsi, l'analgésie future repose peut-être sur l'utilisation combinée de différentes molécules agissant en synergie sur les canaux N et T. Enfin, nous avons vu que des conductances calciques sous-tendues par les autres membres de la famille des CCDV, ainsi que les sous-unités régulatrices, pourraient également avoir leur importance dans les mécanismes moléculaires de la nociception. Une caractérisation plus fine de leur implication moléculaire mérite d'être poursuivie. Les CCDV, en étant largement impliqués dans la physiologie de la nociception, représentent des cibles analgésiques à fort potentiel thérapeutiques. La meilleure compréhension de l'implication de ces canaux dans la physiologie de la nociception, ainsi que le développement d'une pharmacologie spécifique des différentes isoformes, représentent très certainement les bases actuelles qui mèneront au développement de nouvelles molécules analgésiques. ♦

## SUMMARY

### Voltage-dependant calcium channels at the heart of pain perception

Voltage-dependent calcium channels represent a major pathway of calcium entry into neurons, where they participate actively to cell excitability and to the molecular processes of synaptic transmission. For that reason, they have been the direct or indirect pharmacological targets of analgesics and this long before their implication in the physiology of nociception had been demonstrated. These last years, the still more refined molecular characterization of these channels and their associated regulatory subunits and the demonstration of their implication in nociceptive processes indicates that these structures are prime pharmacological targets for the management of pain. Herein, we detail the recent breakthroughs on calcium channel structure, function and pharmacology, review the implication of calcium channels in the transmission of nociception, and evaluate their importance as targets for the treatment of pain perception. The search for specific inhibitors of voltage-dependent calcium channels appears as a prelude to the development of new promising analgesic molecules. ♦

## RÉFÉRENCES

1. Craig AD. A new view of pain as a homeostatic emotion. *Trends Neurosci* 2003 ; 26 : 303-7.
2. Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 2001 ; 413 : 203-10.
3. Craig AD. Pain mechanisms : labeled lines versus convergence in central processing. *Annu Rev Neurosci* 2003 ; 26 : 1-30.



4. McCleskey EW, Gold MS. Ion channels of nociception. *Annu Rev Physiol* 1999; 61 : 835-56.
5. Meir A, Ginsburg S, Butkevich A, et al. Ion channels in presynaptic nerve terminals and control of transmitter release. *Physiol Rev* 1999; 79 : 1019-88.
6. Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, et al. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 2000; 25 : 533-5.
7. Hatakeyama S, Wakamori M, Ino M, et al. Differential nociceptive responses in mice lacking the alpha(1B) subunit of N-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuroreport* 2001; 12 : 2423-7.
8. Saegusa H, Kurihara T, Zong S, et al. Suppression of inflammatory and neuropathic pain symptoms in mice lacking the N-type Ca<sup>2+</sup> channel. *EMBO J* 2001; 20 : 2349-56.
9. Kerr LM, Yoshikami D. A venom peptide with a novel presynaptic blocking action. *Nature* 1984; 308 : 282-4.
10. Olivera BM, Cruz LJ, de Santos V, et al. Neuronal calcium channel antagonists. Discrimination between calcium channel subtypes using omega-conotoxin from *Conus magus* venom. *Biochemistry* 1987; 26 : 2086-90.
11. Malmberg AB, Yaksh TL. Effect of continuous intrathecal infusion of omega-conopeptides, N-type calcium-channel blockers, on behavior and antinociception in the formalin and hot-plate tests in rats. *Pain* 1995; 60 : 83-90.
12. Chaplan SR, Pogrel JW, Yaksh TL. Role of voltage-dependent calcium channel subtypes in experimental tactile allodynia. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 269 : 1117-23.
13. Staats PS, Yearwood T, Charapata SG, et al. Intrathecal ziconotide in the treatment of refractory pain in patients with cancer or AIDS : a randomized controlled trial. *JAMA* 2004; 291 : 63-70.
14. Penn RD, Paice JA. Adverse effects associated with the intrathecal administration of ziconotide. *Pain* 2000; 85 : 291-6.
15. Adams DJ, Smith AB, Schroeder CI, et al. Omega-conotoxin CVID inhibits a pharmacologically distinct voltage-sensitive calcium channel associated with transmitter release from preganglionic nerve terminals. *J Biol Chem* 2003; 278 : 4057-62.
16. Smith MT, Cabot PJ, Ross FB, et al. The novel N-type calcium channel blocker, AM336, produces potent dose-dependent antinociception after intrathecal dosing in rats and inhibits substance P release in rat spinal cord slices. *Pain* 2002; 96 : 119-27.
17. Blake DW, Scott DA, Angus JA, Wright CE. Synergy between intrathecal omega-conotoxin CVID and dexmedetomidine to attenuate mechanical hypersensitivity in the rat. *Eur J Pharmacol* 2005; 506 : 221-7.
18. Seko T, Kato M, Kohno H, et al. Structure-activity study of L-cysteine-based N-type calcium channel blockers : optimization of N- and C-terminal substituents. *Bioorg Med Chem Lett* 2002; 12 : 915-8.
19. Teodori E, Baldi E, Dei S, et al. Design, synthesis, and preliminary pharmacological evaluation of 4-aminopiperidine derivatives as N-type calcium channel blockers active on pain and neuropathic pain. *J Med Chem* 2004; 47 : 6070-81.
20. Bell TJ, Thaler C, Castiglioni AJ, et al. Cell-specific alternative splicing increases calcium channel current density in the pain pathway. *Neuron* 2004; 41 : 127-38.
21. Seward E, Hammond C, Henderson G. Mu-opioid-receptor-mediated inhibition of the N-type calcium-channel current. *Proc Biol Sci* 1991; 244 : 129-35.
22. De Waard M, Liu H, Walker D, et al. Direct binding of G-protein betagamma complex to voltage-dependent calcium channels. *Nature* 1997; 385 : 446-50.
23. Zamponi GW, Bourinet E, Nelson D, et al. Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel alpha1 subunit. *Nature* 1997; 385 : 442-6.
24. Marker CL, Lujan R, Loh HH, Wickman K. Spinal G-protein-gated potassium channels contribute in a dose-dependent manner to the analgesic effect of mu- and delta- but not kappa-opioids. *J Neurosci* 2005; 25 : 3551-9.
25. Wise A, Gearing K, Rees S. Target validation of G-protein coupled receptors. *Drug Discov Today* 2002; 7 : 235-46.
26. Meunier JC. Nociceptin/orphanin FQ and the opioid receptor-like ORL1 receptor. *Eur J Pharmacol* 1997; 340 : 1-15.
27. Beedle AM, McRory JE, Poirat O, et al. Agonist-independent modulation of N-type calcium channels by ORL1 receptors. *Nat Neurosci* 2004; 7 : 118-25.
28. Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN, et al. Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca<sup>2+</sup> channel gene CACNL1A4. *Cell* 1996; 87 : 543-52.
29. Pietrobon D, Striessnig J. Neurobiology of migraine. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4 : 386-98.
30. Yokoyama K, Kurihara T, Saegusa H, et al. Blocking the R-type (Cav2.3) Ca<sup>2+</sup> channel enhanced morphine analgesia and reduced morphine tolerance. *Eur J Neurosci* 2004; 20 : 3516-9.
31. Saegusa H, Kurihara T, Zong S, et al. Altered pain responses in mice lacking alpha 1E subunit of the voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97 : 6132-7.
32. Todorovic SM, Pathirathna S, Meyenburg A, Jevtovic-Todorovic V. Mechanical and thermal anti-nociception in rats after systemic administration of verapamil. *Neurosci Lett* 2004; 360 : 57-60.
33. Murakami M, Fleischmann B, De Felipe C, et al. Pain perception in mice lacking the beta3 subunit of voltage-activated calcium channels. *J Biol Chem* 2002; 277 : 40342-51.
34. Bichet D, Cornet V, Geib S, et al. 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* 2000; 25 : 177-90.
35. Cuchillo-Ibanez I, Aldea M, Brocard J, et al. Inhibition of voltage-gated calcium channels by sequestration of beta subunits. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 311 : 1000-7.
36. Newton RA, Bingham S, Case PC, et al. Dorsal root ganglion neurons show increased expression of the calcium channel alpha2delta-1 subunit following partial sciatic nerve injury. *Brain Res Mol Brain Res* 2001; 95 : 1-8.
37. Luo ZD, Chaplan SR, Higuera ES, et al. Upregulation of dorsal root ganglion (alpha)2(delta) calcium channel subunit and its correlation with allodynia in spinal nerve-injured rats. *J Neurosci* 2001; 21 : 1868-75.
38. Li CY, Song YH, Higuera ES, Luo ZD. Spinal dorsal horn calcium channel alpha2delta-1 subunit upregulation contributes to peripheral nerve injury-induced tactile allodynia. *J Neurosci* 2004; 24 : 8494-9.
39. Todorovic SM, Meyenburg A, Jevtovic-Todorovic V. Mechanical and thermal antinociception in rats following systemic administration of mibefradil, a T-type calcium channel blocker. *Brain Res* 2002; 951 : 336-40.
40. Dogrul A, Gardell LR, Ossipov MH, et al. Reversal of experimental neuropathic pain by T-type calcium channel blockers. *Pain* 2003; 105 : 159-68.
41. Flatters SJ, Bennett GJ. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. *Pain* 2004; 109 : 150-61.
42. Todorovic SM, Pathirathna S, Brimelow BC, et al. 5beta-reduced neuroactive steroids are novel voltage-dependent blockers of T-type Ca<sup>2+</sup> channels in rat sensory neurons in vitro and potent peripheral analgesics in vivo. *Mol Pharmacol* 2004; 66 : 1223-35.
43. Todorovic SM, Meyenburg A, Jevtovic-Todorovic V. Redox modulation of peripheral T-type Ca<sup>2+</sup> channels in vivo : alteration of nerve injury-induced thermal hyperalgesia. *Pain* 2004; 109 : 328-39.
44. Bourinet E, Alloui A, Monteil A, et al. Silencing of the Ca(v)3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception. *EMBO J* 2005; 24 : 315-24.
45. Burian M, Geisslinger G. COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. *Pharmacol Ther* 2005; 107 : 139-54.
46. Coluzzi F, Mattia C. Mechanism-based treatment in chronic neuropathic pain : the role of antidepressants. *Curr Pharm Des* 2005; 11 : 2945-60.
47. Eglén RM, Hunter JC, Dray A. Ions in the fire : recent ion-channel research and approaches to pain therapy. *Trends Pharmacol Sci* 1999; 20 : 337-42.
48. Jarvis MF, Burgard EC, McGaraughty S, et al. A-317491, a novel potent and selective non-nucleotide antagonist of P2X3 and P2X2/3 receptors, reduces chronic inflammatory and neuropathic pain in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99 : 17179-84.
49. Vyklicky L, Knotkova-Urbancova H, Vitaskova Z, et al. Inflammatory mediators at acidic pH activate capsaicin receptors in cultured sensory neurons from newborn rats. *J Neurophysiol* 1998; 79 : 670-6.
50. Voilley N. Acid-sensing ion channels (ASICs) : new targets for the analgesic effects of non-steroid anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2004; 3 : 71-9.
51. Wilson JA, Garry EM, Anderson HA, et al. NMDA receptor antagonist treatment at the time of nerve injury prevents injury-induced changes in spinal NR1 and NR2B subunit expression and increases the sensitivity of residual pain behaviours to subsequently administered NMDA receptor antagonists. *Pain* 2005; 117 : 421-32.
52. Lossignol DA, Obiols-Portis M, Body JJ. Successful use of ketamine for intractable cancer pain. *Support Care Cancer* 2005; 13 : 188-93.

---

**TIRÉS À PART**  
M. De Waard

**How do G proteins directly control neuronal Ca<sup>2+</sup> channel function?**

Michel De Waard, Julien Hering, Norbert Weiss & Anne Feltz

*Trends in Pharmacological Science* (2005) **26**: 427-436

# How do G proteins directly control neuronal $\text{Ca}^{2+}$ channel function?

Michel De Waard<sup>1</sup>, Julien Hering<sup>2</sup>, Norbert Weiss<sup>1</sup> and Anne Feltz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire Canaux Calciques, Fonctions et Pathologies, Inserm U607, CEA, DRDC, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 09, France

<sup>2</sup>Laboratoire de Neurobiologie, UMR 8544, Ecole Normale Supérieure, 46 rue d'Ulm, 75230 Paris Cedex 05, France

**$\text{Ca}^{2+}$  entry into neuronal cells is modulated by the activation of numerous G-protein-coupled receptors (GPCRs). Much effort has been invested in studying direct G-protein-mediated inhibition of voltage-dependent  $\text{Ca}_v2 \text{Ca}^{2+}$  channels. This inhibition occurs through a series of convergent modifications in the biophysical properties of the channels. An integrated view of the structural organization of the  $\text{G}\beta\gamma$ -dimer binding-site pocket within the channel is emerging. In this review, we discuss how variable geometry of the  $\text{G}\beta\gamma$  binding pocket can yield distinct sets of channel inhibition. In addition, we propose specific mechanisms for the regulation of the channel by G proteins that take into account the regulatory input of each  $\text{G}\beta\gamma$  binding element.**

## **$\text{G}\beta\gamma$ mediates GPCR-induced inhibition of neuronal $\text{Ca}^{2+}$ channels**

Neuronal voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels that give rise to P/Q-, N- and R-type currents ( $\text{Ca}_v2$  channels) are localized predominantly in synaptic terminals where they control neurotransmitter release and thereby synaptic communication. The involvement of  $\text{Ca}^{2+}$  channels is thus essential for the normal functioning of the peripheral and central nervous systems [1–3]; any mechanism that leads to dysfunction of these channels is responsible for severe neuronal diseases (channelopathies such as familial hemiplegic migraine, episodic ataxia type 2, spinocerebellar ataxia type 6 and absence epilepsy). Like most key contributors to cell physiology, these molecular structures are under tight regulatory control. One regulatory mechanism comprises the negative control provided by G-protein-coupled receptors (GPCRs), whereby activation of one GPCR activates a signaling mechanism that terminates  $\text{Ca}^{2+}$  influx and hence inhibits neurotransmitter release [4]. This process can be exploited for therapeutic purposes. For example, pain can be treated by the administration of a specific agonist of opioid peptide receptors (e.g. morphine) that inhibits N-type channel activity at peripheral synapses. The number of GPCRs (600 estimated from the sequencing of the human genome) together with the diversity of G proteins identified (17 genes

encoding G-protein  $\alpha$ -subunits, 5 genes encoding  $\beta$ -protein  $\beta$ -subunits and 12 genes encoding G-protein  $\gamma$ -subunits) suggests that many different forms of channel inhibition exist. Indeed, 20 known GPCRs have been shown to inhibit N-type channel activity. This inhibition can occur as a result of a feedback mechanism whereby the neurotransmitter, just released into the synaptic cleft, activates a GPCR adjacent to the channel to inhibit the process responsible for its own release. Inhibition can also result from the activity of an inhibitory neuromediator released from a nearby site.

Understanding how activation of various GPCRs can lead to inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  channels is thus essential for understanding the physiological implications of this regulation and designing new drugs. Many structure–function approaches have been undertaken to reach this goal. However, the precise mechanism by which  $\text{Ca}^{2+}$  channels are regulated by G proteins remains unclear. In this article, we review current knowledge of this important regulatory process.

Following a period (1990–1995) in which controversial reports were published, Herlitze and colleagues [5] and Ikeda [6] established that inhibition of  $\text{Ca}_v2$  channels can be mediated by  $\text{G}\beta\gamma$  dimers that are produced, with  $\text{G}\alpha$ -GTP, following GPCR activation. Expression experiments clearly demonstrated that the pore-forming subunit of  $\text{Ca}_v2$  channels is sufficient on its own to enable direct G-protein-mediated inhibition to take place [7–9]. The identification of multiple  $\text{G}\beta\gamma$  binding sites within  $\text{Ca}_v2$  channels gives rise to an unclear structural view of the direct G-protein-mediated inhibition. In this article, all  $\text{Ca}_v2$  channels are considered to contain a single  $\text{G}\beta\gamma$  protein-binding pocket (GPBP) with multiple interactive binding sites. The aim of the present review is to dissect out the functional consequences of  $\text{G}\beta\gamma$  binding to the GPBP of  $\text{Ca}_v2$  channels. The number of active  $\text{G}\beta\gamma$  binding sites within  $\text{Ca}_v2$  channels depends on the composition of the implicated  $\text{G}\beta\gamma$  dimer, the state of the channel and the protein environment of the channel. Each  $\text{Ca}_v2$  channel comprises, in addition to the pore-forming  $\text{Ca}_v2$  subunit, three auxiliary subunits:  $\text{Ca}_v\beta$ ,  $\text{Ca}_v\gamma$  and  $\text{Ca}_v\alpha2\delta$ . In this article, we focus on the  $\text{Ca}_v\beta$  channel subunit, which binds onto the pore-forming  $\text{Ca}_v2$  subunit of the channel and modulates the effects of  $\text{G}\beta\gamma$ .

Corresponding author: De Waard, M. (mdewaard@cea.fr).

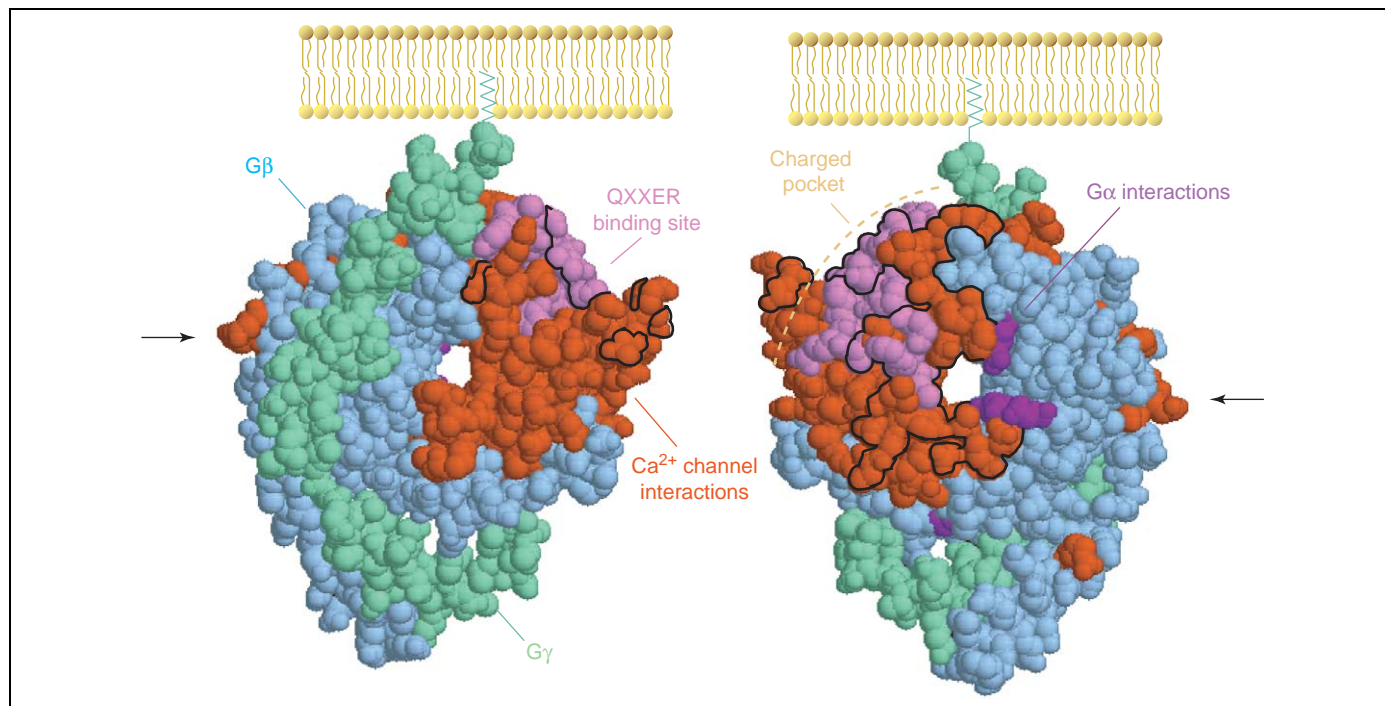
### Gβγ binding sites within Ca<sub>v</sub>2 channels and their relative contribution to direct GPCR-induced inhibition of Ca<sup>2+</sup> channels

GPCR activation produces two signaling molecules: Gα-GTP and the Gβγ dimer (Figure 1). The focus of this review is on the direct role of Gβγ in G-protein-mediated inhibition of Ca<sub>v</sub>2 channels but this does not preclude a functional role of Gα-GTP in channel regulation [10]. Only few of the possible Gβγ combinations have been tested. However, the rank order of efficacies of the various Gβ isoforms is strongly linked to the type of pore-forming Ca<sub>v</sub>2 channel subunit (i.e. Ca<sub>v</sub>2.1, Ca<sub>v</sub>2.2 or Ca<sub>v</sub>2.3) and associated Ca<sub>v</sub>β isoform [11]. Additionally, the rank order of efficacies also appears to be related to the isoform type of Gγ that pairs with Gβ [12], and most data suggest that Gγ is mandatory for observing G-protein-induced inhibition of Ca<sub>v</sub>2 channels [6,13,14].

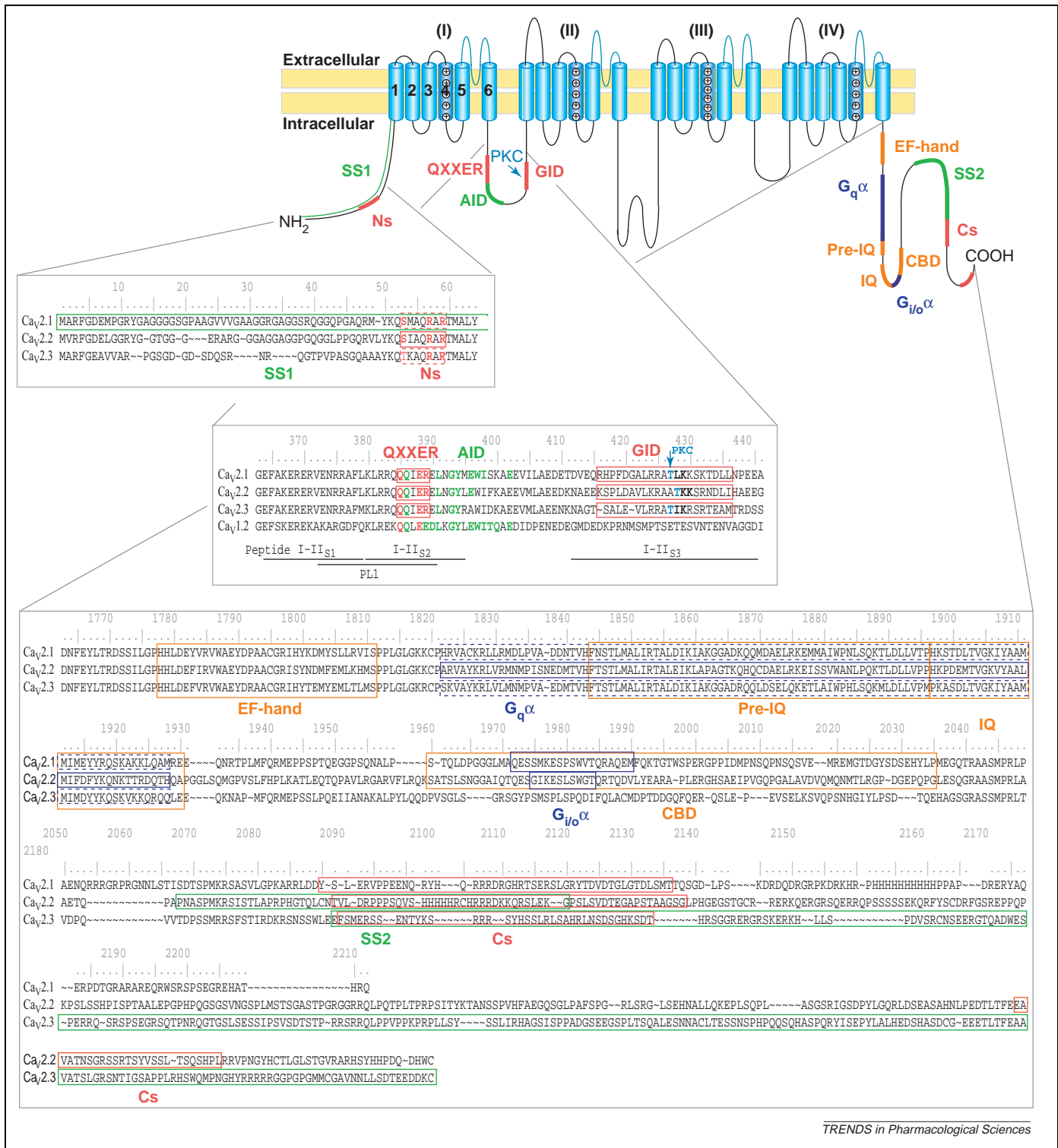
Figure 2 summarizes current knowledge of the interaction between Gβγ and Ca<sub>v</sub>2 channels. Regulation mediated by Gβγ requires several structural and functional Ca<sub>v</sub>2 channel determinants: one in the N-terminus (Ns), several in the loop between transmembrane domains I and II (I-II<sub>S1</sub>, I-II<sub>S2</sub> and I-II<sub>S3</sub>) and two in the C-terminus of the channel (Cs). I-II<sub>S2</sub> contains the QXXER Gβγ binding motif and I-II<sub>S3</sub> contains the G-protein interaction domain (GID). In the

QXXER motif, mutation of its R residue blocks G-protein-mediated slowing of the activation kinetics of Ca<sub>v</sub>2.1 channels [15], whereas this mutation together with an additional mutation at the third position (I to L) decreases G-protein-mediated modulation and enhances the rate of reversal of G-protein-mediated effects on Ca<sub>v</sub>2.1 channels [16]. The GID was identified as being important because the 21-mer GID peptide of I-II<sub>S3</sub> blocked paired-pulse facilitation of Ca<sub>v</sub>2.2 channels under tonic Gβγ-mediated inhibition [17]. The 60 and 20 nM binding affinities of the QXXER domain and the I-II<sub>S3</sub> site, respectively, for Gβγ [15] are one order of magnitude lower than the *K<sub>d</sub>* for the interaction between the Ca<sub>v</sub>2 and Ca<sub>v</sub>β channel subunits [18]. The interaction point Cs in the middle of the C-terminus of Ca<sub>v</sub>2.3 channels [19] has homologous sequences in Ca<sub>v</sub>2.1 and Ca<sub>v</sub>2.2 channels [20]. After truncation of all of the C-terminal Ca<sub>v</sub>2.3 channel subunit sequence, including Cs, current is no longer reduced by GPCR activation [19]. Interestingly, this Cs site for Gβγ binding is close to the G<sub>o</sub>α binding site in Ca<sub>v</sub>2.1 and Ca<sub>v</sub>2.2 channels [21] and to the G<sub>q</sub>α binding site in Ca<sub>v</sub>2.2 channels [20], which suggests that a large Ca<sub>v</sub>2 channel-Gαβγ-GPCR complex might exist [22,23].

Importantly, the N-terminus and the C-terminus of the Ca<sub>v</sub>2.1 channel have been shown to interact with the I-II loop [24,25]. This pattern of interaction probably brings



**Figure 1.** Structure of the G-protein βγ dimer and its essential binding determinants. The crystal structure of Gβγ suggests a complex with the dimensions 80×50×45 Å (PDB accession 1TBG [50]). A CPK (Corey–Pauling–Koltun) model of the transducin Gβγ crystal structure [50] is shown in two opposing orientations (180° rotation). Considering its membrane attachment, Gβγ should be oriented with its longest axis perpendicular to the plasma membrane, positioning the Gβγ at the periphery of the Ca<sub>v</sub>2 channel. Gβ is shown in blue, whereas Gγ is depicted in green. Gβγ is oriented such that Gγ binds the plasma membrane by its farnesyl residue at the N-terminus. A positively charged pocket is also oriented towards the plasma membrane. Various structural and functional studies have defined Gβ amino acid residues that are crucial for the regulation of Ca<sup>2+</sup> channels (shown in red) [51–58]. Amino acid residues that are common to all Gβ subunits that bind to the loop between transmembrane domains I and II of Ca<sup>2+</sup> channels, but are absent from other Gβ subunits that do not bind to this loop, include R19, S31, N35, P39, A193, R197 and A305 according to Gβ1 numbering. Some of these residues are within or near regions involved in the interaction with the Gγ subunit. The observation that Gβ isoforms differ in their ability to interact with the I–II loop of Ca<sub>v</sub>2.1 channels is confirmed by a study demonstrating that the antagonistic effect of protein kinase C (PKC)-mediated phosphorylation of the I–II loop is only observed with Gβ1 [52,53]. Additional residues required for binding peptides that possess the QXXER motif are shown in light purple [59,60]. The arrows depict the phosphorylation sensor of the G-protein interaction domain (GID) [53]. All important functional residues for Ca<sup>2+</sup> channel regulation are distributed on the two faces of the Gβγ dimer shown here. Interestingly, the Gα binding site (dark purple) is almost completely masked by the ‘interaction’ with the Ca<sup>2+</sup> channel with the exception of a few amino acid residues [54,56–59,61–64]. The masked residues are outlined by a solid black line. Note that important functional channel regulation is provided by a peptide that comprises amino acid residues 270–305 of Gβ<sub>2</sub> [65]. Figure created using RasMol v2.7.2.1 [Raswin Molecular Graphics (©H.J. Bernstein 1998–2001)].

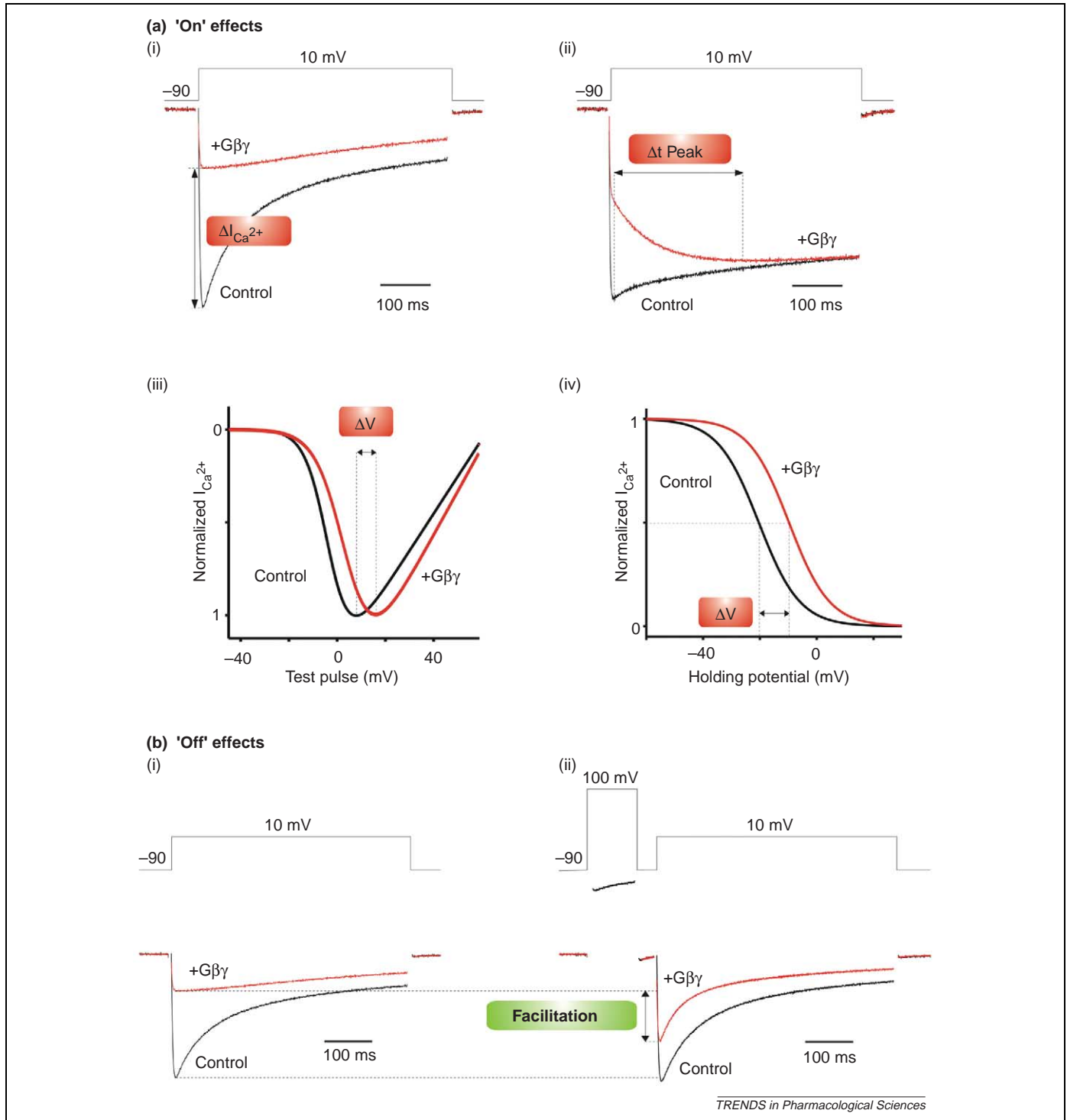


**Figure 2.** Important G-protein determinants on Ca<sub>v</sub>2 channels. The characteristic topology of the pore-forming Ca<sub>v</sub> channel is shown. Each hydrophobic domain (I–IV) is made up of six transmembrane segments (S1–S6). S4 of each domain represents the voltage-sensor and is rich in positively charged amino acid residues. Several Gβγ determinants are present on Ca<sub>v</sub> channel cytoplasmic domains, and include one within the N-terminus (Ns), several within the I–II loop [e.g. QXXER and the G-protein interaction domain (GID)] and two within the C-terminus (Cs). These are shown in red and are detailed in the lower panels. The Ns determinant has been described within Ca<sub>v</sub>2.3 channels [31] and Ca<sub>v</sub>2.2 channels [31,32] and identified on the basis of functional evidence only. An equivalent sequence is found within Ca<sub>v</sub>3.2 channels but within the I–II loop [66]. Two binding domains, QXXER and GID, have been identified in the I–II loop using either peptides [peptides I–II<sub>S1</sub>, I–II<sub>S2</sub> and I–II<sub>S3</sub> [17], and peptide PL1 [21] (underlined sequences)], mutagenesis [15] or binding experiments [19]. GID forms part of the I–II<sub>S3</sub> sequence [67], whereas PL1 is part of both I–II<sub>S1</sub> and I–II<sub>S2</sub> [21,68]. The inhibitory phosphorylation site in GID is shown in blue [17]. The primary site (the 18 amino acid residues of the α1 interaction domain (AID), responsible for Ca<sub>v</sub>β association within the I–II loop [69]) and the secondary sites (SS1 on the N-terminus [70,71] and SS2 on the C-terminus [70,72]) that interact with the Ca<sub>v</sub>β channel subunit are shown in green. The EF hand, pre-IQ domain (Ca<sup>2+</sup>-binding domain located before IQ), IQ domain (contains I and Q residues) and Ca<sup>2+</sup>-binding domain (CBD) [73,74], which constitute the C-terminal Ca<sup>2+</sup>-binding domains, are shown in orange. G<sub>q</sub>α [20] and G<sub>10</sub>α [68] binding sites are shown in dark blue. The lower panels show sequence alignments for Ca<sub>v</sub>2.1 (SwissProt accession number: P54282, rat), Ca<sub>v</sub>2.2 (Q02294, rat) and Ca<sub>v</sub>2.3 (Q15878, human) for non L-type channels, and Ca<sub>v</sub>1.2 (P22002, rat) for L-type channels. Boxes refer to sites defined by point mutations. Solid lines represent experimentally proven domains whereas dashed lines represent theoretical domains. Sequence gaps are shown by dashes.

the various  $G\beta\gamma$  interaction points in close spatial proximity to each other. Convincingly, Zamponi and Snutch [26] demonstrated that the reassociation of  $G\beta\gamma$  onto  $Ca_v2.2$  channels follows a mono-exponential time-course whose time constant depends linearly on the concentration of  $G\beta\gamma$ . It was therefore concluded that  $G\beta\gamma$  reassociation with the channel occurs as a

bimolecular reaction, which implicates the binding of a single  $G\beta\gamma$  dimer to each channel.

All the above observations suggest that there is a single GPBP within  $Ca_v2$  channels and that the activation of GPCRs produces variable sets of G-protein-mediated regulation. Figure 3 summarizes all the effects that are considered as hallmarks of direct G-protein-mediated



**Figure 3.** Hallmarks of G-protein modulation. **(a)** 'On' effects observed after GPCR activation are: (i) an inhibition of the current amplitude (ranging from 15% to 80% depending on the  $Ca_v$  channel and GPCR combination), which is far more pronounced at the start of the depolarization than at the end of the pulse; (ii) a slowing of the kinetics of current activation between 10 ms and 100 ms; (iii) a depolarizing shift of the voltage-dependence of channel activation, which can be explained by three models (Figure 4); and (iv) a shift to hyperpolarized potentials of the steady-state inactivation curve. **(b)** Experimental 'off' effects. Prepulse application at 100 mV before the test pulse at 10 mV reduces  $G\beta\gamma$ -mediated inhibition (relative facilitation). Current traces and curves were obtained from various  $Ca_v2.2$  channel and  $Ca_v\beta$  channel subunit combinations expressed in *Xenopus* oocytes [all data were obtained with the combination  $Ca_v2.2$ - $\beta_3$  except panel (a)(ii) traces, which were obtained with the combination  $Ca_v2.2$ - $\beta_{2a}$ ].

regulation. Four 'on' effects converge to achieve an efficient inhibition of  $\text{Ca}_v2$  channels, and washout of the receptor agonist leads to full recovery of the current amplitude. Recovery ('off' effect) kinetics appear to be systematically slower than the 'on' effects, lasting a few seconds [27,28]. Experimentally, 'off' effects are also observed when large prepulse depolarizations are applied (Figure 3b) [29]. However, recovery of the current amplitude is then rarely complete [30]. Prepulse application has always been assumed to reverse the direct G-protein-mediated 'on' inhibition by producing dissociation of the  $\text{G}\beta\gamma$  dimer from the channel.

The molecular determinants implicated in the various effects of G-protein-mediated channel regulation have been dissected out by mutagenesis of G-protein-sensitive channels and sequence swapping between G-protein-sensitive and G-protein-insensitive channels. Despite the variability among the data, the following conclusions can be made. First, to observe any effect, the Ns site is mandatory because G-protein-mediated inhibition of  $\text{Ca}_v2.3$  channels is observed only for a long isoform that comprises the Ns site but not for a short isoform that lacks the Ns site [31]. Furthermore, a  $\text{Ca}_v2.2$ - $\text{Ca}_v1.2$  channel chimera with the Ns of the  $\text{Ca}_v2.2$  channel is sensitive to G-protein-mediated regulation, whereas  $\text{Ca}_v1.2$  channels are not sensitive to such regulation [32]. Second, the C-terminus of all  $\text{Ca}_v2$  channels has an obligatory or facilitatory role (depending on the  $\text{Ca}_v2$  channel or GPCR isoform) when G-protein-mediated inhibition is produced following GPCR activation [19,21], whereas it does not seem to contribute when any  $\text{G}\beta\gamma$  complex is over-expressed [32]. In addition, peptides that mimic the binding site for  $\text{G}\alpha$ , present within the C-terminus of  $\text{Ca}_v2.1$  and  $\text{Ca}_v2.2$  channels, impair the GPCR-induced channel inhibition [21]. Deletion of the Cs site in  $\text{Ca}_v2.3$  channels induces a complete loss of regulation following activation of the muscarinic acetylcholine  $\text{M}_2$  receptor [19], whereas a similar deletion in  $\text{Ca}_v2.2$  channels reduces somatostatin-mediated regulation by ~50% [33]. These findings support the hypothesis that the initial binding of the heterotrimeric G protein onto the C-terminus of  $\text{Ca}_v2$  channels facilitates channel regulation [22]. Third, the binding determinants of the I-II loop of  $\text{Ca}_v2$  channels do not seem to be obligatory for observing current inhibition (one of the 'on' effects of G-protein inhibition) [19,34]. However, the presence of the I-II loop increases the extent of G-protein-mediated inhibition [32]. There is also some evidence [35] to suggest that the I-II loop of some  $\text{Ca}_v2$  channels is more efficient than that of other channels in controlling the  $\text{G}\beta\gamma$  binding affinity to the channel, which probably imposes the well-established rank order of sensitivity to G-protein-mediated inhibition:  $\text{Ca}_v2.2 > \text{Ca}_v2.1 \gg \text{Ca}_v2.3$ . At the functional level, one convincing role of I-II<sub>S2</sub> is in the rate of channel facilitation by prepulse application [16,36]. This index is interpreted as measuring  $\text{G}\beta\gamma$  dissociation from the channel complex ('off' effect); the I-II<sub>S2</sub> might act as a voltage-sensor and its movements during membrane depolarization might constitute one step in the pathway leading to channel facilitation. Indeed, the voltage-sensitivity of I-II<sub>S2</sub> has been shown recently [37].

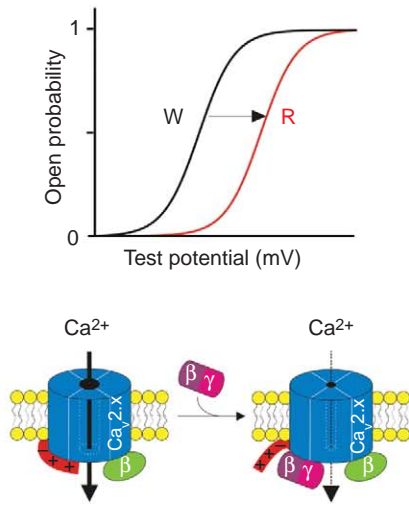
Interestingly, peptides that mimic I-II<sub>S1</sub>, I-II<sub>S2</sub> or I-II<sub>S3</sub> can all prevent G-protein-mediated channel inhibition [16,17,21]. The limited involvement of the  $\text{Ca}_v2$  channel I-II loop in the 'on' effects of G-protein-mediated regulation suggests that I-II loop determinants might rather contribute to 'off' effects. This hypothesis will require specific testing; if proven to be true, it suggests that the GPBP undergoes a real dynamic of sequential interacting events during the 'on' and 'off' course of G-protein-mediated regulation.

### Contribution of the $\beta$ -subunit to G-protein-mediated channel regulation

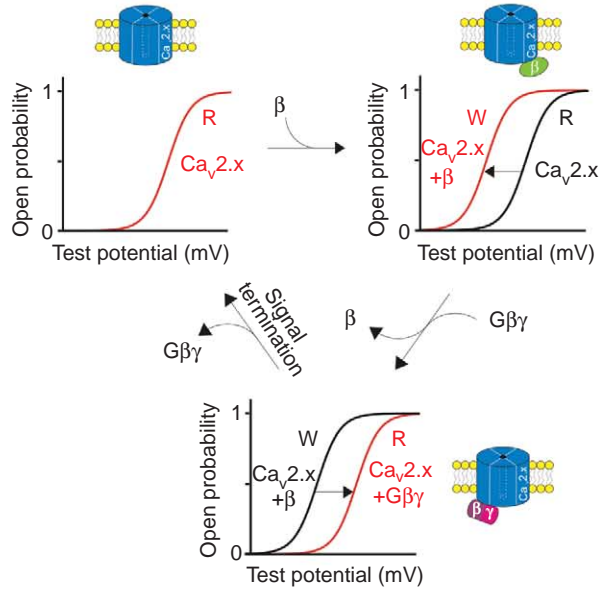
Any protein that forms part of a larger  $\text{Ca}^{2+}$  channel protein complex, such as the machinery that regulates transmitter release, is expected to interact with  $\text{G}\beta\gamma$  determinants and to alter G-protein-mediated inhibition as a consequence (e.g. syntaxin 1A [38,39]). Here, we focus on the 'constitutive'  $\text{Ca}_v\beta$  channel subunit, whose modulatory effects on the activity of the pore-forming  $\text{Ca}_v2$  channel subunit have been studied extensively. The structures of three  $\text{Ca}_v\beta$  channel subunits have been determined (for a review see [40]).

The  $\text{Ca}_v\beta$  channel subunit acts by increasing the coupling efficiency between the gating charge movements and pore opening (measured by  $\text{Ca}^{2+}$  currents) [41,42]. The voltage-dependence of gating current is however not modified. As a result, channel opening is facilitated, an effect that translates into a hyperpolarizing shift of the voltage-dependence of current activation. From this point of view, the effects of the  $\text{Ca}_v\beta$  channel subunit are seemingly opposite to those observed with  $\text{G}\beta\gamma$ . A more-subtle picture emerges however when comparing the regulatory effects of  $\text{G}\beta\gamma$  on a channel that either lacks or contains a  $\text{Ca}_v\beta$  channel subunit. On a 'nude' channel, G-protein-mediated regulation produces: (i) marked inhibition of current; (ii) mild slow-down of activation kinetics; (iii) no clear-cut shifts in the voltage-dependencies of the activation or inactivation properties; and (iv) current facilitation induced by prepulse application (although this has not been observed systematically). When the  $\text{Ca}_v\beta$  channel subunit is added, the effect of  $\text{G}\beta\gamma$  on the current amplitude is conserved, whereas the slowing of activation kinetics is enhanced. Furthermore, prepulse facilitation is clearly shown, the depolarizing shift of the voltage-dependence of activation is obvious, and changes in inactivation are demonstrated. These observations point to a synergistic or 'promoting' effect of the  $\text{Ca}_v\beta$  channel subunit on  $\text{G}\beta\gamma$ -mediated regulation. This diversity of effects might be due to distinct experimental conditions. In the physiological situation, one must keep in mind that the regulatory  $\text{Ca}_v\beta$  channel subunit is constitutive (all  $\text{Ca}_v2$  channel subunits in a  $\text{Ca}_v2$ - $\text{Ca}_v\beta$  complex form with a generally accepted 1:1 stoichiometry) whereas the concentration of  $\text{G}\beta\gamma$  varies spatio-temporally with GPCR activation. Expression of  $\text{Ca}_v\beta$  channel subunits introduces an experimental bias in the study of G-protein-mediated regulation. To be optimal, the experimental conditions should be set so that the concentration of  $\text{G}\beta\gamma$  rises sufficiently to also approach a 1:1 ratio between  $\text{Ca}_v2$  channels and  $\text{G}\beta\gamma$ . Most favorable conditions appear to be:

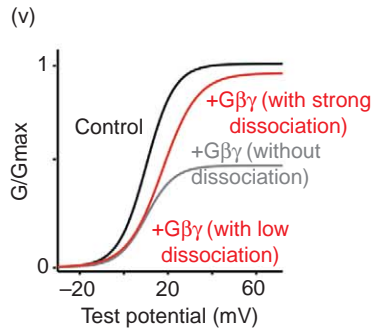
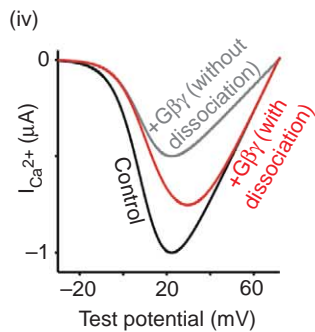
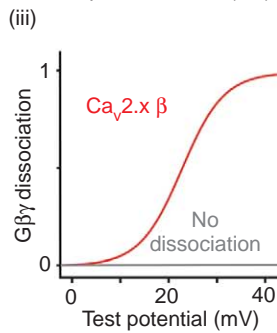
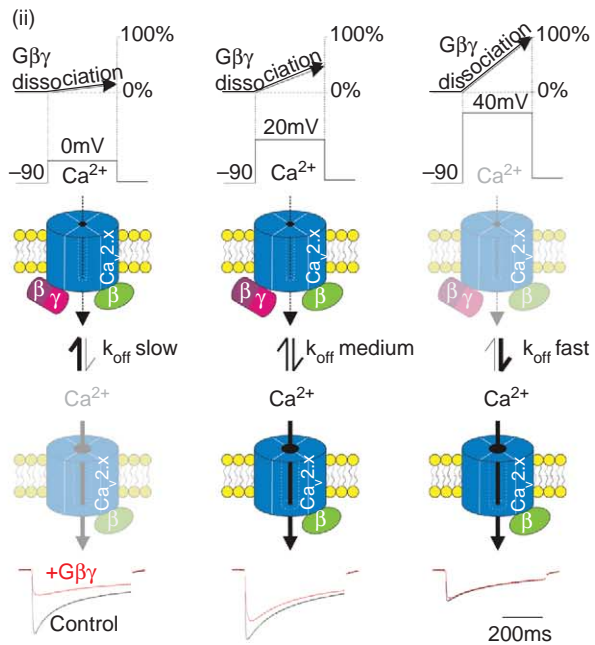
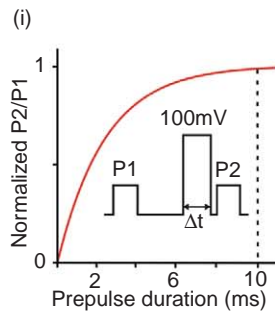
(a) State-induced model



(b)  $\beta$ -subunit dissociation model



(c)  $\beta\gamma$  dissociation model





(i) the acute injection of  $G\beta\gamma$ ; or (ii) the overexpression of a  $G\alpha\beta\gamma$  complex. Assuming that the stoichiometric requirements have been reached in most studies, the data indicate that the regulation mediated by  $G\beta\gamma$  in the presence of  $Ca_v\beta$  channel subunits can be placed into four different case scenarios.

#### Case 1: lack of $G\beta\gamma$ binding in the presence of the $Ca_v\beta$ channel subunit

There are clear-cut examples in the literature in which  $G\beta\gamma$ -mediated regulation is ineffective on  $Ca_v2.3$  channels in the presence of a particular isoform of the  $Ca_v\beta$  channel subunit [43]. For example, the coexpression of  $Ca_v\beta_{2a}$  with  $Ca_v2.3$  channels blocks  $M_2$  receptor-induced inhibition of current [19]. In this study, both  $G\beta\gamma$  and  $Ca_v\beta_{2a}$  were able to bind separately on the Cs interaction point. Furthermore, binding of  $Ca_v\beta_{2a}$  to Cs occludes the subsequent interaction of  $G\beta\gamma$  with Cs. As suggested earlier, it is tempting to propose that Cs represents an initial anchoring point for  $G\beta\gamma$  that controls the efficient positioning of  $G\beta\gamma$  for regulation.

#### Cases 2 and 3: simultaneous binding of $G\beta\gamma$ and $Ca_v\beta$

The first evidence to demonstrate that  $G\beta\gamma$  and the  $Ca_v\beta$  channel subunit can bind simultaneously onto the channel is derived from the fact that the activation kinetics of  $Ca_v2.2$  channels under  $G\beta\gamma$ -mediated inhibition are much slower when the  $Ca_v\beta_{2a}$  channel subunit is used instead of any other  $Ca_v\beta$  channel subunit [11]. The second evidence is derived from fluorescence resonance energy transfer (FRET) experiments between  $Ca_v2.1$  channels and  $Ca_v\beta_{1b}$ , that indicate that a conformational change is induced by  $G\beta$  binding onto the C-terminus interaction site (presumably Cs) of  $Ca_v2.1$  channels [44]. All these observations suggest that some isoforms of  $G\beta$  bind to the channel simultaneously with the  $Ca_v\beta$  channel subunit. The functional antagonism between the  $Ca_v\beta$  channel subunit and  $G\beta\gamma$  might thus result from steric hindrance as a result of the presence of the  $Ca_v\beta$  channel subunit on the I–II loop. Consequently, binding of  $G\beta\gamma$  to

the I–II loop would occur with a lower affinity (reduced interaction points and altered conformation). The induction of an inhibited channel mode induced by  $G\beta\gamma$  in the simultaneous presence of the  $Ca_v\beta$  channel subunit can be envisaged along two mechanisms illustrated in Figure 4: the state-induced model (Figure 4a) or the  $G\beta\gamma$  dissociation model (Figure 4b).

#### Case 4: Binding of $G\beta\gamma$ complex produces $Ca_v\beta$ dissociation

One simple explanation for some of the opposing effects of G proteins and  $Ca_v\beta$  channel subunits could be that  $G\beta\gamma$  displaces the  $Ca_v\beta$  channel subunit from its binding site on the channel, thereby reversing its regulatory properties (Figure 4b,  $\beta$  dissociation model). Association of the  $Ca_v\beta$  channel subunit to the  $\alpha 1$  interaction domain (AID) (its binding site on the  $Ca_v2$  channel subunit) has been shown to modify this site from a random coiled structure to an  $\alpha$ -helix with a concomitant increase in affinity [45,46]. This observation strongly suggests that the interaction of  $G\beta\gamma$  with I–II<sub>S2</sub> would be able to destabilize the  $\alpha$ -helical structure and shift AID from a high- to low-affinity binding site for the  $Ca_v\beta$  channel subunit (binding antagonism). Although steric information is lacking, simultaneous binding of the  $Ca_v\beta$  channel subunit and  $G\beta\gamma$  onto the I–II loop (required as the initiation step for  $Ca_v\beta$  channel subunit dissociation) is likely considering the number of high-affinity sites for  $G\beta\gamma$  that are present downstream of AID. In agreement with these structural considerations, such a  $Ca_v\beta$  channel subunit displacement by  $G\beta\gamma$  has been observed experimentally [47]. Using a I–II loop– $Ca_v\beta$  channel subunit chimera to impose the 1:1 stoichiometry of interaction, it was shown that  $G\beta\gamma$  binding on the I–II loop produces a loss of internal AID– $Ca_v\beta$  channel subunit interaction. This conclusion was also reached with a FRET approach using the full-length green fluorescent protein (GFP)-tagged  $Ca_v2.1$  channel and a chemically modified Cy3– $Ca_v\beta$  channel subunit. Dissociation of the  $Ca_v\beta$  channel subunit might require specific conditions: (i) a single anchoring point for

**Figure 4.** ‘Willing’ and ‘reluctant’ modes of  $Ca_v2$  channels. The terms willing and reluctant [75] refer to the easiness of channel activation. The willing mode corresponds to channel activation at more hyperpolarized potentials than the reluctant mode. We have identified three different possible mechanisms for the induction of the reluctant mode by  $G\beta\gamma$  (state-induced,  $\beta$  dissociation and  $G\beta\gamma$  dissociation). (a) State-induced model. This model assumes that willing (W) and reluctant (R) modes are intrinsic modes of  $Ca_v2$  channels. Alteration of voltage detection induced by  $G\beta\gamma$  binding preferentially shifts the equilibrium between willing and reluctant modes towards the reluctant mode. In favor of this model, a mutation of  $Ca_v2.2$  channels (G177E) in the third segment of transmembrane domain I can shift the channel to a reluctant mode without the contribution of  $G\beta\gamma$  [76]. The state-induced model suggests that simultaneous binding of  $G\beta\gamma$  and the  $Ca_v\beta$  channel subunit is possible. (b)  $Ca_v\beta$  dissociation model. Binding of the  $Ca_v\beta$  channel subunit to the  $Ca_v2$  channel induces a shift from a reluctant state to a willing state [77]. The binding of  $G\beta\gamma$  physically displaces the  $Ca_v\beta$  channel subunit from its binding site and simultaneously imposes the reluctant mode of the channel. In this model, the converse displacement of  $G\beta\gamma$  by the  $Ca_v\beta$  channel subunit is not likely to occur because  $G\beta\gamma$  occupies multiple binding sites on the  $Ca_v2$  channel and the concentration of the  $Ca_v\beta$  channel subunit is not thought to vary. Signal termination occurs with the departure of  $G\beta\gamma$  without modal shift. Re-association of the  $Ca_v\beta$  channel subunit and induction of the willing mode will only occur after  $G\beta\gamma$  departure. The  $Ca_v\beta$  dissociation model implicates that simultaneous binding of  $G\beta\gamma$  and the  $Ca_v\beta$  channel subunit is not possible. Evidence for this model was provided for the  $Ca_v2.1$  channel [47]. (c)  $G\beta\gamma$  dissociation model. (i) Prepulse depolarization at strong voltage is known to induce a facilitation that can be interpreted as a departure of a blocking  $G\beta\gamma$  from the channel complex ( $Ca_v2$ – $G\beta\gamma$ – $\beta$ ). This departure is dependent on prepulse duration and has been proposed to be completed in  $<100$  ms [78]. (ii) This process is therefore likely to occur during the first depolarizing pulse, resulting in a voltage-dependent variable proportion of mixed  $Ca_v2$ – $\beta$ – $G\beta\gamma$  and  $Ca_v2$ – $Ca_v\beta$  complexes. Small depolarization favors the undissociated state, whereas strong depolarization favors the dissociated state.  $G\beta\gamma$  departure induces an increased  $Ca^{2+}$  entry, probably by an increase in opening probability. The inhibitory effect of  $G\beta\gamma$  becomes voltage-dependent as illustrated by the lower current traces. (iii) Two relationships were drawn, one in which  $G\beta\gamma$  does not dissociate from the channel (grey line) and another in which increased dissociation of  $G\beta\gamma$  from the channel occurs with increased membrane depolarization (red line). (iv) Current (I) versus voltage (V) relationships before (control) and after  $G\beta\gamma$  binding under two conditions (without and with a voltage-dependent  $G\beta\gamma$  dissociation during pulse application). In the case where  $G\beta\gamma$  does not dissociate, a constant 50% inhibition of the current occurs at all potentials (grey line). With a voltage-dependent  $G\beta\gamma$  dissociation, the resulting I–V curve is close to the grey line at low potentials, whereas it becomes closer to the control black line at depolarized potentials. (v) Resulting voltage dependence of the conductance for control and liganded  $G\beta\gamma$  channels with or without dissociation is shown. The red curve illustrates the appearance of an apparent reluctant mode. As a result, the reluctant mode and the slowing of activation kinetics are not ‘on’ effects but become ‘off’ effects of G-protein regulation. Activation curves have been described by Boltzmann-derived equations. The  $G\beta\gamma$  dissociation model has not yet been demonstrated experimentally. Similar to the state-induced model, it implies that  $G\beta\gamma$  and the  $Ca_v\beta$  channel subunit can bind together on the channel. Importantly, further complexity in the mechanism of G-protein regulation can be introduced by combining the three different mechanisms that are not exclusive of each other.

the  $\text{Ca}_v\beta$  channel subunit onto the channel (AID); (ii) a peculiar  $\text{G}\beta\gamma$  combination; and (iii) a specific  $\text{G}\gamma$  subunit for an interaction with the I–II loop [48].

Further investigations are required to determine which combination of subunits leads to one or other type of  $\text{G}\beta\gamma$  interactions. Importantly, this variety of interactions is likely to occur also when any constituent of a  $\text{Ca}_v$  complex is substituted with a related isoform.

### Ending the channel inhibition produced by activated G proteins

Ending the GPCR-induced channel inhibition occurs physiologically on recapture of the agonist, pharmacologically by application of a specific antagonist or experimentally by application of a strong depolarization. The latter relief of inhibition is transient because as soon as the depolarizing trigger is lost, re-inhibition occurs with well-defined kinetics that are dependent on the concentration of  $\text{G}\beta\gamma$ . Although the end result is similar, at least temporary for the prepulse application, the 'off' position of  $\text{G}\beta\gamma$  might not be identical whether the 'off' signal is provided by  $\text{G}\alpha$  or prepulse application.

In a physiological context, hydrolysis of GTP bound on  $\text{G}\alpha$  converts the latter from a low- to a high-affinity ligand for  $\text{G}\beta\gamma$ . Rebinding of  $\text{G}\alpha$  to  $\text{G}\beta\gamma$  terminates the inhibitory signal and might follow two possible paths. First,  $\text{G}\alpha$  might naturally chelate free  $\text{G}\beta\gamma$  that would come on and off the channel as a result of the binding equilibrium. Second,  $\text{G}\alpha$  might bind onto  $\text{G}\beta\gamma$  while on the channel, which implies that  $\text{G}\beta\gamma$  determinants that are essential for  $\text{G}\alpha$  association remain accessible in spite of the association of  $\text{G}\beta\gamma$  to the GPBP. The consequences of this  $\text{G}\alpha$  reassociation to  $\text{G}\beta\gamma$  can leave the  $\text{G}\beta\gamma$  associated to the  $\text{Ca}_v$  channel. In this case, the trimeric G protein is permanently associated to the channel, a view that is probably incompatible with data suggesting that  $\text{G}\beta\gamma$  can come on and off the channel in a concentration-dependent manner [26]. Alternatively,  $\text{G}\alpha$  binding produces a complete dissociation of  $\text{G}\beta\gamma$  from the GPBP, which however does not preclude that the trimeric G-protein complex can remain associated to the channel through  $\text{G}\alpha$ . In all these potential mechanisms for signal termination, what matters the most is the loss of influence of a crucial  $\text{G}\beta\gamma$  element onto a structural element that controls channel opening. In this respect, termination of G-protein inhibition by prepulse application has to share this crucial step with the physiological termination.

The channel structural elements required for prepulse termination of  $\text{G}\beta\gamma$  inhibition have not yet been identified. Expectations are that these channel structural elements are voltage-sensitive and translate their conformational changes to the structural elements that bind  $\text{G}\beta\gamma$ . The molecular schemes just proposed for the physiological termination of  $\text{G}\beta\gamma$  inhibition should also apply to prepulse termination. Full  $\text{G}\beta\gamma$  dissociation is most frequently assumed but clearly lacks a molecular demonstration. A fourth case scenario should be introduced based on the proposal that a strong depolarizing prepulse introduces a temporary conformational change in the channel [49] that would be sufficient to convert the channel from a 'reluctant' to a 'willing' mode (Figure 4)

with the assumption that these states are controlled respectively by  $\text{G}\beta\gamma$  and  $\text{Ca}_v\beta$  channel subunit association.

In a model in which  $\text{Ca}_v\beta$  channel subunit dissociation would occur, an additional molecular event should take place following termination of  $\text{G}\beta\gamma$ -mediated inhibition. This step is linked to  $\text{Ca}_v\beta$  reassociation to the channel once its binding site has been freed from the competitive action of  $\text{G}\beta\gamma$ . This second step is required for shifting back the channel from a 'reluctant' to a 'willing' state. A consequence of this two-step procedure is that the kinetics of termination of G-protein inhibition is also bimodal: a rapid reversal for current amplitude and activation kinetics, and a slower one for the shift from 'reluctant' to 'willing'.

### Concluding remarks

The study of  $\text{G}\beta\gamma$  interaction on  $\text{Ca}_v2$  channels in expression systems has opened the way to vary independently the various molecular components. However, following the basic rules of physiology, the concentration of the  $\text{Ca}_v\beta$  channel subunit is not expected to vary, as opposed to the concentration of  $\text{G}\beta\gamma$ , which is strictly controlled by GPCR activation. Thus, G proteins and not  $\text{Ca}^{2+}$  channel auxiliary subunits are the key regulatory elements. In the present model of G-protein regulation, a G-protein binding pocket of variable geometry, as defined by the direct protein environment of the channel, governs the various mechanisms of G-protein inhibition. Landmark effects that all seemed to depend on different mechanisms can be regrouped in a single effect, but with the possibility of interesting variations such as  $\text{Ca}_v\beta$  channel subunit dissociation. Channel remodeling under G-protein regulation is an interesting concept in channel biology that depicts a  $\text{Ca}^{2+}$  channel with all its dynamics and suggests intriguing new roles for each of its elementary components.

### Acknowledgements

J.H. received a postdoctoral fellowship from la Fondation Pour la Recherche Médicale.

### References

- 1 Wheeler, D.B. *et al.* (1994) Roles of N-type and Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science* 264, 107–111
- 2 Takahashi, T. *et al.* (1996) Presynaptic calcium current modulation by a metabotropic glutamate receptor. *Science* 274, 594–597
- 3 Dietrich, D. *et al.* (2003) Functional specialization of presynaptic  $\text{Ca}_v2.3$   $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Neuron* 39, 483–496
- 4 Hille, B. (1994) Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci.* 17, 531–536
- 5 Herlitze, S. *et al.* (1996) Modulation of  $\text{Ca}^{2+}$  channels by G-protein  $\beta\gamma$  subunits. *Nature* 380, 258–262
- 6 Ikeda, S.R. (1996) Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein  $\beta\gamma$  subunits. *Nature* 380, 255–258
- 7 Roche, J.P. *et al.* (1995) Abolition of G protein inhibition of  $\alpha_{1A}$  and  $\alpha_{1B}$  calcium channels by co-expression of the  $\beta_3$  subunit. *FEBS Lett.* 371, 43–46
- 8 Bourinet, E. *et al.* (1996) Determinants of the G protein-dependent opioid modulation of neuronal calcium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 1486–1491
- 9 Herlitze, S. *et al.* (2001) Allosteric modulation of  $\text{Ca}^{2+}$  channels by G proteins, voltage-dependent facilitation, protein kinase C, and  $\text{Ca}_v\beta$  subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 4699–4704

- 10 Kammermeier, P.J. *et al.* (2000) A voltage-independent calcium current inhibitory pathway activated by muscarinic agonists in rat sympathetic neurons requires both  $G\alpha_q/11$  and  $G\beta\gamma$ . *J. Neurosci.* 20, 5623–5629
- 11 Feng, Z.P. *et al.* (2001) Calcium channel  $\beta$  subunits differentially regulate the inhibition of N-type channels by individual  $G\beta$  isoforms. *J. Biol. Chem.* 276, 45051–45058
- 12 Zhou, J.Y. *et al.* (2000) Selective regulation of N-type Ca channels by different combinations of G-protein beta/gamma subunits and RGS proteins. *J. Neurosci.* 20, 7143–7148
- 13 Delmas, P. *et al.* (1998) On the role of endogenous G-protein  $\beta\gamma$  subunits in N-type  $Ca^{2+}$  current inhibition by neurotransmitters in rat sympathetic neurones. *J. Physiol.* 506, 319–329
- 14 Ruiz-Velasco, V. and Ikeda, S.R. (2000) Multiple G-protein  $\beta\gamma$  combinations produce voltage-dependent inhibition of N-type calcium channels in rat superior cervical ganglion neurons. *J. Neurosci.* 20, 2183–2191
- 15 De Waard, M. *et al.* (1997) Direct binding of G-protein  $\beta\gamma$  complex to voltage-dependent calcium channels. *Nature* 385, 446–450
- 16 Herlitze, S. *et al.* (1997) Molecular determinants of inactivation and G protein modulation in the intracellular loop connecting domains I and II of the calcium channel  $\alpha_{1A}$  subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 1512–1516
- 17 Zamponi, G.W. *et al.* (1997) Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel  $\alpha_1$  subunit. *Nature* 385, 442–446
- 18 De Waard, M. and Campbell, K.P. (1995) Subunit regulation of the neuronal  $\alpha_{1A}$   $Ca^{2+}$  channel expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* 485, 619–634
- 19 Qin, N. *et al.* (1997) Direct interaction of  $G\beta\gamma$  with a C-terminal  $G\beta\gamma$ -binding domain of the  $Ca^{2+}$  channel  $\alpha_1$  subunit is responsible for channel inhibition by G protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 8866–8871
- 20 Simen, A.A. *et al.* (2001) The C terminus of the Ca channel  $\alpha_{1B}$  subunit mediates selective inhibition by G-protein-coupled receptors. *J. Neurosci.* 21, 7587–7597
- 21 Furukawa, T. *et al.* (1998) Differential interactions of the C terminus and the cytoplasmic I-II loop of neuronal  $Ca^{2+}$  channels with G-protein  $\alpha$  and  $\beta\gamma$  subunits. I. Molecular determination. *J. Biol. Chem.* 273, 17585–17594
- 22 Kitano, J. *et al.* (2003) Direct interaction and functional coupling between metabotropic glutamate receptor subtype 1 and voltage-sensitive  $Ca_v2.1$   $Ca^{2+}$  channel. *J. Biol. Chem.* 278, 25101–25108
- 23 Beedle, A.M. *et al.* (2004) Agonist-independent modulation of N-type calcium channels by ORL1 receptors. *Nat. Neurosci.* 7, 118–125
- 24 Restituito, S. *et al.* (2000) The  $\beta_{2a}$  subunit is a molecular groom for the  $Ca^{2+}$  channel inactivation gate. *J. Neurosci.* 20, 9046–9052
- 25 Geib, S. *et al.* (2002) The interaction between the I-II loop and the III-IV loop of  $Ca_v2.1$  contributes to voltage-dependent inactivation in a  $\beta$ -dependent manner. *J. Biol. Chem.* 277, 10003–10013
- 26 Zamponi, G.W. and Snutch, T.P. (1998) Decay of prepulse facilitation of N type calcium channels during G protein inhibition is consistent with binding of a single  $G\beta$  subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 4035–4039
- 27 Zhou, J. *et al.* (1997) Speed of  $Ca^{2+}$  channel modulation by neurotransmitters in rat sympathetic neurons. *J. Neurophysiol.* 77, 2040–2048
- 28 Jones, L.P. *et al.* (1997) G-protein modulation of N-type calcium channel gating current in human embryonic kidney cells (HEK 293). *J. Physiol.* 498, 601–610
- 29 Ikeda, S.R. (1991) Double-pulse calcium channel current facilitation in adult rat sympathetic neurones. *J. Physiol.* 439, 181–214
- 30 Ikeda, S.R. and Dunlap, K. (1999) Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels: role of G protein subunits. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* 33, 131–151
- 31 Page, K.M. *et al.* (1998) Identification of the amino terminus of neuronal  $Ca^{2+}$  channel  $\alpha_{1B}$  and  $\alpha_{1E}$  as an essential determinant of G-protein modulation. *J. Neurosci.* 18, 4815–4824
- 32 Canti, C. *et al.* (1999) Identification of residues in the N terminus of  $\alpha_{1B}$  critical for inhibition of the voltage-dependent calcium channel by  $G\beta\gamma$ . *J. Neurosci.* 19, 6855–6864
- 33 Hamid, J. *et al.* (1999) Identification of an integration center for cross-talk between protein kinase C and G protein modulation of N-type calcium channels. *J. Biol. Chem.* 274, 6195–6202
- 34 Zhang, J.F. *et al.* (1996) Multiple structural elements in voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels support their inhibition by G proteins. *Neuron* 17, 991–1003
- 35 Simen, A.A. and Miller, R.J. (1998) Structural features determining differential receptor regulation of neuronal Ca channels. *J. Neurosci.* 18, 3689–3698
- 36 Simen, A.A. and Miller, R.J. (2000) Involvement of regions in domain I in the opioid receptor sensitivity of  $\alpha_{1B}$   $Ca^{2+}$  channels. *Mol. Pharmacol.* 57, 1064–1074
- 37 Sandoz, G. *et al.* (2004) Repositioning of charged I-II loop amino acid residues within the electric field by  $\beta$  subunit as a novel working hypothesis for the control of fast P/Q calcium channel inactivation. *Eur. J. Neurosci.* 19, 1759–1772
- 38 Sheng, Z.H. *et al.* (1994) Identification of a syntaxin-binding site on N-type calcium channels. *Neuron* 13, 1303–1313
- 39 Jarvis, S.E. *et al.* (2000) G protein modulation of N-type calcium channels is facilitated by physical interactions between syntaxin 1A and  $G\beta\gamma$ . *J. Biol. Chem.* 275, 6388–6394
- 40 Richards, M.W. *et al.* (2004)  $Ca^{2+}$  channel beta-subunits: structural insights AID our understanding. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 626–632
- 41 Neely, A. *et al.* (1993) Potentiation by the beta subunit of the ratio of the ionic current to the charge movement in the cardiac calcium channel. *Science* 262, 575–578
- 42 Olcese, R. *et al.* (1996) Coupling between charge movement and pore opening in vertebrate neuronal  $\alpha_{1E}$  calcium channels. *J. Physiol.* 497, 675–686
- 43 Toth, P.T. *et al.* (1996) Selective G-protein regulation of neuronal calcium channels. *J. Neurosci.* 16, 4617–4624
- 44 Hummer, A. *et al.* (2003) Competitive and synergistic interactions of G protein  $\beta_2$  and  $Ca^{2+}$  channel  $\beta_{1B}$  subunits with  $Ca_v2.1$  channels, revealed by mammalian two-hybrid and fluorescence resonance energy transfer measurements. *J. Biol. Chem.* 278, 49386–49400
- 45 Opatowsky, Y. *et al.* (2004) Expression, purification and crystallization of a functional core of the voltage-dependent calcium channel  $\beta$  subunit. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 60, 1301–1303
- 46 Van Petegem, F. *et al.* (2004) Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel beta-subunit and an alpha-subunit domain. *Nature* 429, 671–675
- 47 Sandoz, G. *et al.* (2004) Cav $\beta$ -subunit displacement is a key step to induce the reluctant state of P/Q calcium channels by direct G protein regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 6267–6272
- 48 Fathallah, M. *et al.* (2002) Modelling of the III-IV loop, a domain involved in calcium channel Cav2.1 inactivation, highlights a structural homology with the gamma subunit of G proteins. *Eur. J. Neurosci.* 16, 219–228
- 49 Kasai, H. and Aosaki, T. (1989) Modulation of Ca-channel current by an adenosine analog mediated by a GTP-binding protein in chick sensory neurons. *Pflugers Arch.* 414, 145–149
- 50 Sondek, J. *et al.* (1996) Crystal structure of a G-protein beta gamma dimer at 2.1 Å resolution. *Nature* 379, 369–374
- 51 Agler, H.L. *et al.* (2003) Custom distinctions in the interaction of G-protein beta subunits with N-type (CaV2.2) versus P/Q-type (CaV2.1) calcium channels. *J. Gen. Physiol.* 121, 495–510
- 52 Cooper, C.B. *et al.* (2000) Cross-talk between G-protein and protein kinase C modulation of N-type calcium channels is dependent on the G-protein beta subunit isoform. *J. Biol. Chem.* 275, 40777–40781
- 53 Doering, C.J. *et al.* (2004) A single  $G\beta$  subunit locus controls cross-talk between protein kinase C and G protein regulation of N-type calcium channels. *J. Biol. Chem.* 279, 29709–29717
- 54 Ford, C.E. *et al.* (1998) Molecular basis for interactions of G protein betagamma subunits with effectors. *Science* 280, 1271–1274
- 55 Garcia, D.E. *et al.* (1998) Protein kinase C disrupts cannabinoid actions by phosphorylation of the CB1 cannabinoid receptor. *J. Neurosci.* 18, 2834–2841
- 56 Mirshahi, T. *et al.* (2002) Distinct sites on G protein beta gamma subunits regulate different effector functions. *J. Biol. Chem.* 277, 36345–36350
- 57 Mirshahi, T. *et al.* (2002)  $G\beta$  residues that do not interact with  $G\alpha$  underlie agonist-independent activity of  $K^+$  channels. *J. Biol. Chem.* 277, 7348–7355

- 58 Wall, M.A. *et al.* (1998) Structural basis of activity and subunit recognition in G protein heterotrimers. *Structure* 6, 1169–1183
- 59 Weng, G. *et al.* (1996) G $\beta$  subunit interacts with a peptide encoding region 956–982 of adenylyl cyclase 2. Cross-linking of the peptide to free G $\beta\gamma$  but not the heterotrimer. *J. Biol. Chem.* 271, 26445–26448
- 60 Yan, K. and Gautam, N. (1996) A domain on the G protein beta subunit interacts with both adenylyl cyclase 2 and the muscarinic atrial potassium channel. *J. Biol. Chem.* 271, 17597–17600
- 61 Albsoul-Younes, A.M. *et al.* (2001) Interaction sites of the G protein beta subunit with brain G protein-coupled inward rectifier K<sup>+</sup> channel. *J. Biol. Chem.* 276, 12712–12717
- 62 Lambright, D.G. *et al.* (1996) The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* 379, 311–319
- 63 Li, Y. *et al.* (1998) Sites for Galpha binding on the G protein beta subunit overlap with sites for regulation of phospholipase Cbeta and adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 273, 16265–16272
- 64 Zhao, Q. *et al.* (2003) Interaction of G protein beta subunit with inward rectifier K<sup>+</sup> channel Kir3. *Mol. Pharmacol.* 64, 1085–1091
- 65 Li, X. *et al.* (2005) G protein beta (sub2) subunit derived peptides for inhibition and induction of G protein pathways: examination on voltage gated Ca<sup>2+</sup> and G protein inward rectifying K<sup>+</sup> channels. *J Biol Chem*
- 66 Wolfe, J.T. *et al.* (2003) T-type calcium channel regulation by specific G-protein betagamma subunits. *Nature* 424, 209–213
- 67 Jarvis, S.E. and Zamponi, G.W. (2001) Interactions between presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels, cytoplasmic messengers and proteins of the synaptic vesicle release complex. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 519–525
- 68 Furukawa, T. *et al.* (1998) Differential interactions of the C terminus and the cytoplasmic I-II loop of neuronal Ca<sup>2+</sup> channels with G-protein alpha and beta gamma subunits. II. Evidence for direct binding. *J. Biol. Chem.* 273, 17595–17603
- 69 Pragnell, M. *et al.* (1994) Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I–II cytoplasmic linker of the alpha 1-subunit. *Nature* 368, 67–70
- 70 Walker, D. *et al.* (1999) A new beta subtype-specific interaction in  $\alpha_{1A}$  subunit controls P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channel activation. *J. Biol. Chem.* 274, 12383–12390
- 71 Stephens, G.J. *et al.* (2000) The  $\alpha_{1B}$  Ca<sup>2+</sup> channel amino terminus contributes determinants for beta subunit-mediated voltage-dependent inactivation properties. *J. Physiol.* 525, 377–390
- 72 Walker, D. *et al.* (1998) A  $\beta_4$  isoform-specific interaction site in the carboxyl-terminal region of the voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha_{1A}$  subunit. *J. Biol. Chem.* 273, 2361–2367
- 73 Kim, J. *et al.* (2004) Identification of the components controlling inactivation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuron* 41, 745–754
- 74 Liang, H. *et al.* (2003) Unified mechanisms of Ca<sup>2+</sup> regulation across the Ca<sup>2+</sup> channel family. *Neuron* 39, 951–960
- 75 Bean, B.P. (1989) Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage dependence. *Nature* 340, 153–156
- 76 Zhong, H. *et al.* (2001) Control of gating mode by a single amino acid residue in transmembrane segment IS3 of the N-type Ca<sup>2+</sup> channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 4705–4709
- 77 Walker, D. and De Waard, M. (1998) Subunit interaction sites in voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels: role in channel function. *Trends Neurosci.* 21, 148–154
- 78 Canti, C. *et al.* (2000) Interaction between G proteins and accessory subunits in the regulation of  $\alpha_{1B}$  calcium channels in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* 527, 419–432

### Five things you might not know about Elsevier

#### 1.

Elsevier is a founder member of the WHO's HINARI and AGORA initiatives, which enable the world's poorest countries to gain free access to scientific literature. More than 1000 journals, including the *Trends* and *Current Opinion* collections, will be available for free or at significantly reduced prices.

#### 2.

The online archive of Elsevier's premier Cell Press journal collection will become freely available from January 2005. Free access to the recent archive, including *Cell*, *Neuron*, *Immunity* and *Current Biology*, will be available on both ScienceDirect and the Cell Press journal sites 12 months after articles are first published.

#### 3.

Have you contributed to an Elsevier journal, book or series? Did you know that all our authors are entitled to a 30% discount on books and stand-alone CDs when ordered directly from us? For more information, call our sales offices:

+1 800 782 4927 (US) or +1 800 460 3110 (Canada, South & Central America)  
or +44 1865 474 010 (rest of the world)

#### 4.

Elsevier has a long tradition of liberal copyright policies and for many years has permitted both the posting of preprints on public servers and the posting of final papers on internal servers. Now, Elsevier has extended its author posting policy to allow authors to freely post the final text version of their papers on both their personal websites and institutional repositories or websites.

#### 5.

The Elsevier Foundation is a knowledge-centered foundation making grants and contributions throughout the world. A reflection of our culturally rich global organization, the Foundation has funded, for example, the setting up of a video library to educate for children in Philadelphia, provided storybooks to children in Cape Town, sponsored the creation of the Stanley L. Robbins Visiting Professorship at Brigham and Women's Hospital and given funding to the 3rd International Conference on Children's Health and the Environment.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## - A -

- Adams, D.J., Smith, A.B., Schroeder, C.I., Yasuda, T. et Lewis, R.J. (2003) Omega-conotoxin CVID inhibits a pharmacologically distinct voltage-sensitive calcium channel associated with transmitter release from preganglionic nerve terminals. *J Biol Chem.* **278**, 4057-4062.
- Ammala, C., Berggren, P.O., Bokvist, K. et Rorsman, P. (1992) Inhibition of L-type calcium channels by internal GTP [ $\gamma$ S] in mouse pancreatic beta cells. *Pflugers Arch.* **420**, 72-77.
- Arikkath, J. et Campbell, K.P. (2003) Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr Opin Neurobiol.* **13**, 298-307.
- Arreola, J., Calvo, J., Garcia, M.C. et Sanchez, J.A. (1987) Modulation of calcium channels of twitch skeletal muscle fibres of the frog by adrenaline and cyclic adenosine monophosphate. *J Physiol.* **393**, 307-330.

## - B -

- Babcock, D.F. et Hille, B. (1998) Mitochondrial oversight of cellular Ca<sup>2+</sup> signaling. *Curr Opin Neurobiol.* **8**, 398-404.
- Baertschi, A.J., Audigier, Y., Lledo, P.M., Israel, J.M., Bockaert, J. et Vincent, J.D. (1992) Dialysis of lactotropes with antisense oligonucleotides assigns guanine nucleotide binding protein subtypes to their channel effectors. *Mol Endocrinol.* **6**, 2257-2265.
- Baker, O.S., Larsson, H.P., Mannuzzu, L.M. et Isacoff, E.Y. (1998) Three transmembrane conformations and sequence-dependent displacement of the S4 domain in shaker K<sup>+</sup> channel gating. *Neuron.* **20**, 1283-1294.
- Bean, B.P. (1989) Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage dependence. *Nature.* **340**, 153-156.
- Bech-Hansen, N.T., Naylor, M.J., Maybaum, T.A., Pearce, W.G., Koop, B., Fishman, G.A., Mets, M., Musarella, M.A. et Boycott, K.M. (1998) Loss-of-function mutations in a calcium-channel  $\alpha 1$ -subunit gene in Xp11.23 cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat Genet.* **19**, 264-267.
- Beedle, A.M., McRory, J.E., Poirot, O., Doering, C.J., Altier, C., Barrere, C., Hamid, J., Nargeot, J., Bourinet, E. et Zamponi, G.W. (2004) Agonist-independent modulation of N-type calcium channels by ORL1 receptors. *Nat Neurosci.* **7**, 118-125.
- Bell, D.C., Butcher, A.J., Berrow, N.S., Page, K.M., Brust, P.F., Nesterova, A., Stauderman, K.A., Seabrook, G.R., Nurnberg, B. et Dolphin, A.C. (2001) Biophysical properties,

- pharmacology, and modulation of human, neuronal L-type (alpha(1D), Ca(V)1.3) voltage-dependent calcium currents. *J Neurophysiol.* **85**, 816-827.
- Bell, T.J., Thaler, C., Castiglioni, A.J., Helton, T.D. et Lipscombe, D. (2004) Cell-specific alternative splicing increases calcium channel current density in the pain pathway. *Neuron.* **41**, 127-138.
- Bernheim, L., Beech, D.J. et Hille, B. (1991) A diffusible second messenger mediates one of the pathways coupling receptors to calcium channels in rat sympathetic neurons. *Neuron.* **6**, 859-867.
- Berridge, M.J. (1998) Neuronal calcium signaling. *Neuron.* **21**, 13-26.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D. et Lipp, P. (1998) Calcium--a life and death signal. *Nature.* **395**, 645-648.
- Bertram, R., Swanson, J., Yousef, M., Feng, Z.P. et Zamponi, G.W. (2003) A minimal model for G protein-mediated synaptic facilitation and depression. *J Neurophysiol.* **90**, 1643-1653.
- Beuckmann, C.T., Sinton, C.M., Miyamoto, N., Ino, M. et Yanagisawa, M. (2003) N-type calcium channel alpha1B subunit (Cav2.2) knock-out mice display hyperactivity and vigilance state differences. *J Neurosci.* **23**, 6793-6797.
- Bezannilla, F. (2002) Voltage sensor movements. *J Gen Physiol.* **120**, 465-473.
- Bichet, D., Cornet, V., Geib, S., Carlier, E., Volsen, S., Hoshi, T., Mori, Y. et De Waard, M. (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**, 177-190.
- Birnbaumer, L., Qin, N., Olcese, R., Tareilus, E., Platano, D., Costantin, J. et Stefani, E. (1998) Structures and functions of calcium channel beta subunits. *J Bioenerg Biomembr.* **30**, 357-375.
- Birnbaumer, L., Campbell, K.P., Catterall, W.A., Harpold, M.M., Hofmann, F., Horne, W.A., Mori, Y., Schwartz, A., Snutch, T.P., Tanabe, T. et et al. (1994) The naming of voltage-gated calcium channels. *Neuron.* **13**, 505-506.
- Black, J.L., 3rd (2003) The voltage-gated calcium channel gamma subunits: a review of the literature. *J Bioenerg Biomembr.* **35**, 649-660.
- Blake, D.W., Scott, D.A., Angus, J.A. et Wright, C.E. (2005) Synergy between intrathecal omega-conotoxin CVID and dexmedetomidine to attenuate mechanical hypersensitivity in the rat. *Eur J Pharmacol.* **506**, 221-227.
- Bohn, G., Moosmang, S., Conrad, H., Ludwig, A., Hofmann, F. et Klugbauer, N. (2000) Expression of T- and L-type calcium channel mRNA in murine sinoatrial node. *FEBS Lett.* **481**, 73-76.

- Bokvist, K., Eliasson, L., Ammala, C., Renstrom, E. et Rorsman, P. (1995) Co-localization of L-type Ca<sup>2+</sup> channels and insulin-containing secretory granules and its significance for the initiation of exocytosis in mouse pancreatic B-cells. *Embo J.* **14**, 50-57.
- Boland, L.M. et Bean, B.P. (1993) Modulation of N-type calcium channels in bullfrog sympathetic neurons by luteinizing hormone-releasing hormone: kinetics and voltage dependence. *J Neurosci.* **13**, 516-533.
- Bourinet, E., Soong, T.W., Stea, A. et Snutch, T.P. (1996a) Determinants of the G protein-dependent opioid modulation of neuronal calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**, 1486-1491.
- Bourinet, E., Zamponi, G.W., Stea, A., Soong, T.W., Lewis, B.A., Jones, L.P., Yue, D.T. et Snutch, T.P. (1996b) The alpha 1E calcium channel exhibits permeation properties similar to low-voltage-activated calcium channels. *J Neurosci.* **16**, 4983-4993.
- Bourinet, E., Soong, T.W., Sutton, K., Slaymaker, S., Mathews, E., Monteil, A., Zamponi, G.W., Nargeot, J. et Snutch, T.P. (1999) Splicing of alpha 1A subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels. *Nat Neurosci.* **2**, 407-415.
- Bourinet, E., Alloui, A., Monteil, A., Barrere, C., Couette, B., Poirot, O., Pages, A., McRory, J., Snutch, T.P., Eschalier, A. et Nargeot, J. (2005) Silencing of the Ca(v)3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception. *Embo J.* **24**, 315-324.
- Bouron, A., Soldatov, N.M. et Reuter, H. (1995) The beta 1-subunit is essential for modulation by protein kinase C of an human and a non-human L-type Ca<sup>2+</sup> channel. *FEBS Lett.* **377**, 159-162.
- Brody, D.L., Patil, P.G., Mulle, J.G., Snutch, T.P. et Yue, D.T. (1997) Bursts of action potential waveforms relieve G-protein inhibition of recombinant P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels in HEK 293 cells. *J Physiol.* **499 ( Pt 3)**, 637-644.
- Brown, C.H. et Russell, J.A. (2004) Cellular mechanisms underlying neuronal excitability during morphine withdrawal in physical dependence: lessons from the magnocellular oxytocin system. *Stress.* **7**, 97-107.
- Brown, D.A., Filippov, A.K. et Barnard, E.A. (2000) Inhibition of potassium and calcium currents in neurones by molecularly-defined P2Y receptors. *J Auton Nerv Syst.* **81**, 31-36.
- Bryant, S.M. et Hart, G. (1996) Effects of neuropeptide Y on L-type calcium current in guinea-pig ventricular myocytes. *Br J Pharmacol.* **118**, 1455-1460.
- Burgess, D.L., Jones, J.M., Meisler, M.H. et Noebels, J.L. (1997) Mutation of the Ca<sup>2+</sup> channel beta subunit gene Cchb4 is associated with ataxia and seizures in the lethargic (lh) mouse. *Cell.* **88**, 385-392.

Butcher, A.J., Leroy, J., Richards, M.W., Pratt, W.S. et Dolphin, A.C. (2006) The importance of occupancy rather than affinity of CaV(beta) subunits for the calcium channel I-II linker in relation to calcium channel function. *J Physiol.* **574**, 387-398.

- C -

Caddick, S.J., Wang, C., Fletcher, C.F., Jenkins, N.A., Copeland, N.G. et Hosford, D.A. (1999) Excitatory but not inhibitory synaptic transmission is reduced in lethargic (Cacnb4(lh)) and tottering (Cacna1atg) mouse thalami. *J Neurophysiol.* **81**, 2066-2074.

Campbell, L.W., Hao, S.Y., Thibault, O., Blalock, E.M. et Landfield, P.W. (1996) Aging changes in voltage-gated calcium currents in hippocampal CA1 neurons. *J Neurosci.* **16**, 6286-6295.

Campbell, V., Berrow, N. et Dolphin, A.C. (1993) GABAB receptor modulation of Ca<sup>2+</sup> currents in rat sensory neurones by the G protein G(0): antisense oligonucleotide studies. *J Physiol.* **470**, 1-11.

Campbell, V., Berrow, N.S., Fitzgerald, E.M., Brickley, K. et Dolphin, A.C. (1995) Inhibition of the interaction of G protein G(o) with calcium channels by the calcium channel beta-subunit in rat neurones. *J Physiol.* **485 ( Pt 2)**, 365-372.

Canti, C., Bogdanov, Y. et Dolphin, A.C. (2000) Interaction between G proteins and accessory subunits in the regulation of 1B calcium channels in *Xenopus* oocytes. *J Physiol.* **527 Pt 3**, 419-432.

Canti, C., Page, K.M., Stephens, G.J. et Dolphin, A.C. (1999) Identification of residues in the N terminus of alpha1B critical for inhibition of the voltage-dependent calcium channel by Gbeta gamma. *J Neurosci.* **19**, 6855-6864.

Castellano, A. et Perez-Reyes, E. (1994) Molecular diversity of Ca<sup>2+</sup> channel beta subunits. *Biochem Soc Trans.* **22**, 483-488.

Castellano, A., Wei, X., Birnbaumer, L. et Perez-Reyes, E. (1993a) Cloning and expression of a third calcium channel beta subunit. *J Biol Chem.* **268**, 3450-3455.

Castellano, A., Wei, X., Birnbaumer, L. et Perez-Reyes, E. (1993b) Cloning and expression of a neuronal calcium channel beta subunit. *J Biol Chem.* **268**, 12359-12366.

Catterall, W.A., Perez-Reyes, E., Snutch, T.P. et Striessnig, J. (2005) International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev.* **57**, 411-425.

Chaplan, S.R., Pogrel, J.W. et Yaksh, T.L. (1994) Role of voltage-dependent calcium channel subtypes in experimental tactile allodynia. *J Pharmacol Exp Ther.* **269**, 1117-1123.



- Chavis, P., Shinozaki, H., Bockaert, J. et Fagni, L. (1994) The metabotropic glutamate receptor types 2/3 inhibit L-type calcium channels via a pertussis toxin-sensitive G-protein in cultured cerebellar granule cells. *J Neurosci.* **14**, 7067-7076.
- Chen, H., Puhl, H.L., 3rd, Niu, S.L., Mitchell, D.C. et Ikeda, S.R. (2005) Expression of Rem2, an RGK family small GTPase, reduces N-type calcium current without affecting channel surface density. *J Neurosci.* **25**, 9762-9772.
- Chen, J., DeVivo, M., Dingus, J., Harry, A., Li, J., Sui, J., Carty, D.J., Blank, J.L., Exton, J.H., Stoffel, R.H. et al. (1995) A region of adenylyl cyclase 2 critical for regulation by G protein beta gamma subunits. *Science.* **268**, 1166-1169.
- Chen, Y.H., Li, M.H., Zhang, Y., He, L.L., Yamada, Y., Fitzmaurice, A., Shen, Y., Zhang, H., Tong, L. et Yang, J. (2004) Structural basis of the alpha1-beta subunit interaction of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Nature.* **429**, 675-680.
- Chien, A.J., Carr, K.M., Shirokov, R.E., Rios, E. et Hosey, M.M. (1996) Identification of palmitoylation sites within the L-type calcium channel beta2a subunit and effects on channel function. *J Biol Chem.* **271**, 26465-26468.
- Cohen, C., Perrault, G. et Sanger, D.J. (1997) Assessment of the antidepressant-like effects of L-type voltage-dependent channel modulators. *Behav Pharmacol.* **8**, 629-638.
- Collin, T., Wang, J.J., Nargeot, J. et Schwartz, A. (1993) Molecular cloning of three isoforms of the L-type voltage-dependent calcium channel beta subunit from normal human heart. *Circ Res.* **72**, 1337-1344.
- Craig, P.J., Beattie, R.E., Folly, E.A., Banerjee, M.D., Reeves, M.B., Priestley, J.V., Carney, S.L., Sher, E., Perez-Reyes, E. et Volsen, S.G. (1999) Distribution of the voltage-dependent calcium channel alpha1G subunit mRNA and protein throughout the mature rat brain. *Eur J Neurosci.* **11**, 2949-2964.
- Cribbs, L.L., Lee, J.H., Yang, J., Satin, J., Zhang, Y., Daud, A., Barclay, J., Williamson, M.P., Fox, M., Rees, M. et Perez-Reyes, E. (1998) Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca<sup>2+</sup> channel gene family. *Circ Res.* **83**, 103-109.
- Cuchillo-Ibanez, I., Aldea, M., Brocard, J., Albillos, A., Weiss, N., Garcia, A.G. et De Waard, M. (2003) Inhibition of voltage-gated calcium channels by sequestration of beta subunits. *Biochem Biophys Res Commun.* **311**, 1000-1007.

- D -

- D'Agostino, A., Mene, P. et Stefanini, M. (1992) Voltage-gated calcium channels in rat Sertoli cells. *Biol Reprod.* **46**, 414-418.

- Davies, A., Douglas, L., Hendrich, J., Wratten, J., Tran Van Minh, A., Foucault, I., Koch, D., Pratt, W.S., Saibil, H.R. et Dolphin, A.C. (2006) The Calcium Channel  $\alpha_2\delta_2$  Subunit Partitions with CaV2.1 into Lipid Rafts in Cerebellum: Implications for Localization and Function. *J Neurosci.* **26**, 8748-8757.
- De Waard, M., Pragnell, M. et Campbell, K.P. (1994) Ca<sup>2+</sup> channel regulation by a conserved beta subunit domain. *Neuron.* **13**, 495-503.
- De Waard, M., Hering, J., Weiss, N. et Feltz, A. (2005) How do G proteins directly control neuronal Ca(2+) channel function? *Trends Pharmacol Sci.* **26**, 427-436.
- De Waard, M., Witcher, D.R., Pragnell, M., Liu, H. et Campbell, K.P. (1995) Properties of the alpha 1-beta anchoring site in voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels. *J Biol Chem.* **270**, 12056-12064.
- De Waard, M., Liu, H., Walker, D., Scott, V.E., Gurnett, C.A. et Campbell, K.P. (1997) Direct binding of G-protein betagamma complex to voltage-dependent calcium channels. *Nature.* **385**, 446-450.
- Deisz, R.A. et Lux, H.D. (1985) gamma-Aminobutyric acid-induced depression of calcium currents of chick sensory neurons. *Neurosci Lett.* **56**, 205-210.
- Delcour, A.H. et Tsien, R.W. (1993) Altered prevalence of gating modes in neurotransmitter inhibition of N-type calcium channels. *Science.* **259**, 980-984.
- Delcour, A.H., Lipscombe, D. et Tsien, R.W. (1993) Multiple modes of N-type calcium channel activity distinguished by differences in gating kinetics. *J Neurosci.* **13**, 181-194.
- Depuy, S.D., Yao, J., Hu, C., McIntire, W., Bidaud, I., Lory, P., Rastinejad, F., Gonzalez, C., Garrison, J.C. et Barrett, P.Q. (2006) The molecular basis for T-type Ca<sup>2+</sup> channel inhibition by G protein beta2 $\gamma$ 2 subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**, 14590-14595.
- Dietrich, D., Kirschstein, T., Kukley, M., Pereverzev, A., von der Brélie, C., Schneider, T. et Beck, H. (2003) Functional specialization of presynaptic Cav2.3 Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuron.* **39**, 483-496.
- Dirksen, R.T. (2002) Bi-directional coupling between dihydropyridine receptors and ryanodine receptors. *Front Biosci.* **7**, d659-670.
- Dittman, J.S. et Regehr, W.G. (1996) Contributions of calcium-dependent and calcium-independent mechanisms to presynaptic inhibition at a cerebellar synapse. *J Neurosci.* **16**, 1623-1633.
- Docherty, R.J. et McFadzean, I. (1989) Noradrenaline-Induced Inhibition of Voltage-Sensitive Calcium Currents in NG108-15 Hybrid Cells. *Eur J Neurosci.* **1**, 132-140.

- Dolmetsch, R.E., Pajvani, U., Fife, K., Spotts, J.M. et Greenberg, M.E. (2001) Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. *Science*. **294**, 333-339.
- Dolphin, A.C. (2003) Beta subunits of voltage-gated calcium channels. *J Bioenerg Biomembr*. **35**, 599-620.
- Dolphin, A.C. (2006) A short history of voltage-gated calcium channels. *Br J Pharmacol*. **147 Suppl 1**, S56-62.
- Dolphin, A.C. et Scott, R.H. (1987) Calcium channel currents and their inhibition by (-)-baclofen in rat sensory neurones: modulation by guanine nucleotides. *J Physiol*. **386**, 1-17.
- Dolphin, A.C., Wyatt, C.N., Richards, J., Beattie, R.E., Craig, P., Lee, J.H., Cribbs, L.L., Volsen, S.G. et Perez-Reyes, E. (1999) The effect of alpha2-delta and other accessory subunits on expression and properties of the calcium channel alpha1G. *J Physiol*. **519**, 35-45.
- Dooley, D.J., Lupp, A., Hertting, G. et Osswald, H. (1988) Omega-conotoxin GVIA and pharmacological modulation of hippocampal noradrenaline release. *Eur J Pharmacol*. **148**, 261-267.
- Drolet, P., Bilodeau, L., Chorvatova, A., Laflamme, L., Gallo-Payet, N. et Payet, M.D. (1997) Inhibition of the T-type Ca<sup>2+</sup> current by the dopamine D1 receptor in rat adrenal glomerulosa cells: requirement of the combined action of the G betagamma protein subunit and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *Mol Endocrinol*. **11**, 503-514.
- Dubel, S.J., Altier, C., Chaumont, S., Lory, P., Bourinet, E. et Nargeot, J. (2004) Plasma membrane expression of T-type calcium channel alpha(1) subunits is modulated by high voltage-activated auxiliary subunits. *J Biol Chem*. **279**, 29263-29269.
- Ducros, A., Tournier-Lasserre, E. et Bousser, M.G. (2002) The genetics of migraine. *Lancet Neurol*. **1**, 285-293.
- Dunlap, K. et Fischbach, G.D. (1978) Neurotransmitters decrease the calcium component of sensory neurone action potentials. *Nature*. **276**, 837-839.
- Dunlap, K. et Fischbach, G.D. (1981) Neurotransmitters decrease the calcium conductance activated by depolarization of embryonic chick sensory neurones. *J Physiol*. **317**, 519-535.
- Dunlap, K., Luebke, J.I. et Turner, T.J. (1995) Exocytotic Ca<sup>2+</sup> channels in mammalian central neurons. *Trends Neurosci*. **18**, 89-98.

- E -

- Elmslie, K.S. et Jones, S.W. (1994) Concentration dependence of neurotransmitter effects on calcium current kinetics in frog sympathetic neurones. *J Physiol*. **481**, 35-46.

- Elmslie, K.S., Zhou, W. et Jones, S.W. (1990) LHRH and GTP-gamma-S modify calcium current activation in bullfrog sympathetic neurons. *Neuron*. **5**, 75-80.
- Ertel, E.A., Campbell, K.P., Harpold, M.M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., Schwartz, A., Snutch, T.P., Tanabe, T., Birnbaumer, L., Tsien, R.W. et Catterall, W.A. (2000) Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*. **25**, 533-535.
- Escayg, A., De Waard, M., Lee, D.D., Bichet, D., Wolf, P., Mayer, T., Johnston, J., Baloh, R., Sander, T. et Meisler, M.H. (2000) Coding and noncoding variation of the human calcium-channel beta4-subunit gene CACNB4 in patients with idiopathic generalized epilepsy and episodic ataxia. *Am J Hum Genet*. **66**, 1531-1539.
- Ewald, D.A., Pang, I.H., Sternweis, P.C. et Miller, R.J. (1989) Differential G protein-mediated coupling of neurotransmitter receptors to Ca<sup>2+</sup> channels in rat dorsal root ganglion neurons in vitro. *Neuron*. **2**, 1185-1193.
- F -
- Felix, R., Gurnett, C.A., De Waard, M. et Campbell, K.P. (1997) Dissection of functional domains of the voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel alpha2delta subunit. *J Neurosci*. **17**, 6884-6891.
- Filippov, A.K., Couve, A., Pangalos, M.N., Walsh, F.S., Brown, D.A. et Moss, S.J. (2000) Heteromeric assembly of GABA(B)R1 and GABA(B)R2 receptor subunits inhibits Ca(2+) current in sympathetic neurons. *J Neurosci*. **20**, 2867-2874.
- Fletcher, C.F., Tottene, A., Lennon, V.A., Wilson, S.M., Dubel, S.J., Paylor, R., Hosford, D.A., Tessarollo, L., McEnery, M.W., Pietrobon, D., Copeland, N.G. et Jenkins, N.A. (2001) Dystonia and cerebellar atrophy in Cacna1a null mice lacking P/Q calcium channel activity. *Faseb J*. **15**, 1288-1290.
- Forscher, P., Oxford, G.S. et Schulz, D. (1986) Noradrenaline modulates calcium channels in avian dorsal root ganglion cells through tight receptor-channel coupling. *J Physiol*. **379**, 131-144.
- Fournier, F., Bourinet, E., Nargeot, J. et Charnet, P. (1993) Cyclic AMP-dependent regulation of P-type calcium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Pflugers Arch*. **423**, 173-180.
- Furukawa, T., Nukada, T., Mori, Y., Wakamori, M., Fujita, Y., Ishida, H., Fukuda, K., Kato, S. et Yoshii, M. (1998a) Differential interactions of the C terminus and the cytoplasmic I-II loop of neuronal Ca<sup>2+</sup> channels with G-protein alpha and beta gamma subunits. I. Molecular determination. *J Biol Chem*. **273**, 17585-17594.
- Furukawa, T., Miura, R., Mori, Y., Strobeck, M., Suzuki, K., Ogihara, Y., Asano, T., Morishita, R., Hashii, M., Higashida, H., Yoshii, M. et Nukada, T. (1998b) Differential interactions of the C terminus and the cytoplasmic I-II loop of neuronal

Ca<sup>2+</sup> channels with G-protein alpha and beta gamma subunits. II. Evidence for direct binding. *J Biol Chem.* **273**, 17595-17603.

- G -

- Gandhi, C.S. et Isacoff, E.Y. (2002) Molecular models of voltage sensing. *J Gen Physiol.* **120**, 455-463.
- Gao, T., Yatani, A., Dell'Acqua, M.L., Sako, H., Green, S.A., Dascal, N., Scott, J.D. et Hosey, M.M. (1997) cAMP-dependent regulation of cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channels requires membrane targeting of PKA and phosphorylation of channel subunits. *Neuron.* **19**, 185-196.
- Garcia, D.E., Brown, S., Hille, B. et Mackie, K. (1998a) Protein kinase C disrupts cannabinoid actions by phosphorylation of the CB1 cannabinoid receptor. *J Neurosci.* **18**, 2834-2841.
- Garcia, D.E., Li, B., Garcia-Ferreiro, R.E., Hernandez-Ochoa, E.O., Yan, K., Gautam, N., Catterall, W.A., Mackie, K. et Hille, B. (1998b) G-protein beta-subunit specificity in the fast membrane-delimited inhibition of Ca<sup>2+</sup> channels. *J Neurosci.* **18**, 9163-9170.
- Garcia, M.L. et Strehler, E.E. (1999) Plasma membrane calcium ATPases as critical regulators of calcium homeostasis during neuronal cell function. *Front Biosci.* **4**, D869-882.
- Gee, N.S., Brown, J.P., Dissanayake, V.U., Offord, J., Thurlow, R. et Woodruff, G.N. (1996) The novel anticonvulsant drug, gabapentin (Neurontin), binds to the alpha2delta subunit of a calcium channel. *J Biol Chem.* **271**, 5768-5776.
- Golard, A., Role, L. et Siegelbaum, S.A. (1994) Substance P potentiates calcium channel modulation by somatostatin in chick sympathetic ganglia. *J Neurophysiol.* **72**, 2683-2690.
- Gomora, J.C., Xu, L., Enyeart, J.A. et Enyeart, J.J. (2000) Effect of mibefradil on voltage-dependent gating and kinetics of T-type Ca(2+) channels in cortisol-secreting cells. *J Pharmacol Exp Ther.* **292**, 96-103.
- Gomora, J.C., Daud, A.N., Weiergraber, M. et Perez-Reyes, E. (2001) Block of cloned human T-type calcium channels by succinimide antiepileptic drugs. *Mol Pharmacol.* **60**, 1121-1132.
- Graef, I.A., Mermelstein, P.G., Stankunas, K., Neilson, J.R., Deisseroth, K., Tsien, R.W. et Crabtree, G.R. (1999) L-type calcium channels and GSK-3 regulate the activity of NF-ATc4 in hippocampal neurons. *Nature.* **401**, 703-708.
- Grassi, F. et Lux, H.D. (1989) Voltage-dependent GABA-induced modulation of calcium currents in chick sensory neurons. *Neurosci Lett.* **105**, 113-119.

## - H -

- Hamid, J., Nelson, D., Spaetgens, R., Dubel, S.J., Snutch, T.P. et Zamponi, G.W. (1999) Identification of an integration center for cross-talk between protein kinase C and G protein modulation of N-type calcium channels. *J Biol Chem.* **274**, 6195-6202.
- Hans, M., Luvisetto, S., Williams, M.E., Spagnolo, M., Urrutia, A., Tottene, A., Brust, P.F., Johnson, E.C., Harpold, M.M., Stauderman, K.A. et Pietrobon, D. (1999) Functional consequences of mutations in the human alpha1A calcium channel subunit linked to familial hemiplegic migraine. *J Neurosci.* **19**, 1610-1619.
- Hansen, P.B., Jensen, B.L., Andreasen, D. et Skott, O. (2001) Differential expression of T- and L-type voltage-dependent calcium channels in renal resistance vessels. *Circ Res.* **89**, 630-638.
- Hartzell, H.C. et Fischmeister, R. (1992) Direct regulation of cardiac Ca<sup>2+</sup> channels by G proteins: neither proven nor necessary? *Trends Pharmacol Sci.* **13**, 380-385.
- Hatakeyama, S., Wakamori, M., Ino, M., Miyamoto, N., Takahashi, E., Yoshinaga, T., Sawada, K., Imoto, K., Tanaka, I., Yoshizawa, T., Nishizawa, Y., Mori, Y., Niidome, T. et Shoji, S. (2001) Differential nociceptive responses in mice lacking the alpha(1B) subunit of N-type Ca(2+) channels. *Neuroreport.* **12**, 2423-2427.
- Haws, C.M., Slesinger, P.A. et Lansman, J.B. (1993) Dihydropyridine- and omega-conotoxin-sensitive Ca<sup>2+</sup> currents in cerebellar neurons: persistent block of L-type channels by a pertussis toxin-sensitive G-protein. *J Neurosci.* **13**, 1148-1156.
- Heinemann, S.H., Terlau, H., Stuhmer, W., Imoto, K. et Numa, S. (1992) Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature.* **356**, 441-443.
- Hell, J.W., Westenbroek, R.E., Warner, C., Ahljanian, M.K., Prystay, W., Gilbert, M.M., Snutch, T.P. et Catterall, W.A. (1993) Identification and differential subcellular localization of the neuronal class C and class D L-type calcium channel alpha 1 subunits. *J Cell Biol.* **123**, 949-962.
- Herlitze, S., Hockerman, G.H., Scheuer, T. et Catterall, W.A. (1997) Molecular determinants of inactivation and G protein modulation in the intracellular loop connecting domains I and II of the calcium channel alpha1A subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**, 1512-1516.
- Herlitze, S., Garcia, D.E., Mackie, K., Hille, B., Scheuer, T. et Catterall, W.A. (1996) Modulation of Ca<sup>2+</sup> channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature.* **380**, 258-262.
- Hibino, H., Pironkova, R., Onwumere, O., Rousset, M., Charnet, P., Hudspeth, A.J. et Lesage, F. (2003) Direct interaction with a nuclear protein and regulation of gene silencing by a variant of the Ca<sup>2+</sup>-channel beta 4 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**, 307-312.

- Hirning, L.D., Fox, A.P., McCleskey, E.W., Olivera, B.M., Thayer, S.A., Miller, R.J. et Tsien, R.W. (1988) Dominant role of N-type Ca<sup>2+</sup> channels in evoked release of norepinephrine from sympathetic neurons. *Science*. **239**, 57-61.
- Holz, G.G.t., Rane, S.G. et Dunlap, K. (1986) GTP-binding proteins mediate transmitter inhibition of voltage-dependent calcium channels. *Nature*. **319**, 670-672.
- Horn, R. (2002) Coupled movements in voltage-gated ion channels. *J Gen Physiol*. **120**, 449-453.
- Hill, R.H., Svensson, E., Dewael, Y. et Grillner, S. (2003) 5-HT inhibits N-type but not L-type Ca(2+) channels via 5-HT1A receptors in lamprey spinal neurons. *Eur J Neurosci*. **18**, 2919-2924.
- Hullin, R., Singer-Lahat, D., Freichel, M., Biel, M., Dascal, N., Hofmann, F. et Flockerzi, V. (1992) Calcium channel beta subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNA from heart, aorta and brain. *Embo J*. **11**, 885-890.
- Hummer, A., Delzeith, O., Gomez, S.R., Moreno, R.L., Mark, M.D. et Herlitze, S. (2003) Competitive and synergistic interactions of G protein beta(2) and Ca(2+) channel beta(1b) subunits with Ca(v)2.1 channels, revealed by mammalian two-hybrid and fluorescence resonance energy transfer measurements. *J Biol Chem*. **278**, 49386-49400.
- I -
- Ikeda, S.R. (1991) Double-pulse calcium channel current facilitation in adult rat sympathetic neurones. *J Physiol*. **439**, 181-214.
- Ikeda, S.R. (1996) Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature*. **380**, 255-258.
- Ikeda, S.R. et Schofield, G.G. (1989a) Somatostatin cyclic octapeptide analogs which preferentially bind to SOMa receptors block a calcium current in rat superior cervical ganglion neurons. *Neurosci Lett*. **96**, 283-288.
- Ikeda, S.R. et Schofield, G.G. (1989b) Somatostatin blocks a calcium current in rat sympathetic ganglion neurones. *J Physiol*. **409**, 221-240.
- Ino, M., Yoshinaga, T., Wakamori, M., Miyamoto, N., Takahashi, E., Sonoda, J., Kagaya, T., Oki, T., Nagasu, T., Nishizawa, Y., Tanaka, I., Imoto, K., Aizawa, S., Koch, S., Schwartz, A., Niidome, T., Sawada, K. et Mori, Y. (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**, 5323-5328.
- Ivanina, T., Blumenstein, Y., Shistik, E., Barzilai, R. et Dascal, N. (2000) Modulation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels by gbeta gamma and calmodulin via interactions with N and C termini of alpha 1C. *J Biol Chem*. **275**, 39846-39854.

## - J -

- Jarvis, S.E. et Zamponi, G.W. (2001) Interactions between presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels, cytoplasmic messengers and proteins of the synaptic vesicle release complex. *Trends Pharmacol Sci.* **22**, 519-525.
- Jay, S.D., Ellis, S.B., McCue, A.F., Williams, M.E., Vedvick, T.S., Harpold, M.M. et Campbell, K.P. (1990) Primary structure of the gamma subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science.* **248**, 490-492.
- Jiang, Y., Ruta, V., Chen, J., Lee, A. et MacKinnon, R. (2003a) The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Nature.* **423**, 42-48.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B.T. et MacKinnon, R. (2003b) X-ray structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Nature.* **423**, 33-41.
- Jing, X., Li, D.Q., Olofsson, C.S., Salehi, A., Surve, V.V., Caballero, J., Ivarsson, R., Lundquist, I., Pereverzev, A., Schneider, T., Rorsman, P. et Renstrom, E. (2005) CaV2.3 calcium channels control second-phase insulin release. *J Clin Invest.* **115**, 146-154.
- Johnson, B.D., Scheuer, T. et Catterall, W.A. (1994) Voltage-dependent potentiation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels in skeletal muscle cells requires anchored cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**, 11492-11496.
- Jones, L.P., Patil, P.G., Snutch, T.P. et Yue, D.T. (1997) G-protein modulation of N-type calcium channel gating current in human embryonic kidney cells (HEK 293). *J Physiol.* **498** ( Pt 3), 601-610.
- Jones, M.B., Siderovski, D.P. et Hooks, S.B. (2004) The G{beta}{gamma} dimer as a novel source of selectivity in G-Protein Signaling: GGL-ing at convention. *Mol Interv.* **4**, 200-214.
- Jones, S.W. (2003) Calcium channels: unanswered questions. *J Bioenerg Biomembr.* **35**, 461-475.
- Jones, S.W. et Elmslie, K.S. (1997) Transmitter modulation of neuronal calcium channels. *J Membr Biol.* **155**, 1-10.
- Jun, K., Piedras-Renteria, E.S., Smith, S.M., Wheeler, D.B., Lee, S.B., Lee, T.G., Chin, H., Adams, M.E., Scheller, R.H., Tsien, R.W. et Shin, H.S. (1999) Ablation of P/Q-type Ca(2+) channel currents, altered synaptic transmission, and progressive ataxia in mice lacking the alpha(1A)-subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**, 15245-15250.

## - K -



- Kammermeier, P.J. et Ikeda, S.R. (1999) Expression of RGS2 alters the coupling of metabotropic glutamate receptor 1a to M-type K<sup>+</sup> and N-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuron*. **22**, 819-829.
- Kang, M.G. et Campbell, K.P. (2003) Gamma subunit of voltage-activated calcium channels. *J Biol Chem*. **278**, 21315-21318.
- Kang, M.G., Chen, C.C., Felix, R., Letts, V.A., Frankel, W.N., Mori, Y. et Campbell, K.P. (2001) Biochemical and biophysical evidence for gamma 2 subunit association with neuronal voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channels. *J Biol Chem*. **276**, 32917-32924.
- Kasai, H. (1991) Tonic inhibition and rebound facilitation of a neuronal calcium channel by a GTP-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **88**, 8855-8859.
- Kasai, H. et Aosaki, T. (1989) Modulation of Ca-channel current by an adenosine analog mediated by a GTP-binding protein in chick sensory neurons. *Pflugers Arch*. **414**, 145-149.
- Kasai, H. (1992) Voltage- and time-dependent inhibition of neuronal calcium channels by a GTP-binding protein in a mammalian cell line. *J Physiol*. **448**, 189-209.
- Kerr, L.M. et Yoshikami, D. (1984) A venom peptide with a novel presynaptic blocking action. *Nature*. **308**, 282-284.
- Kim, W.T., Rioult, M.G. et Cornell-Bell, A.H. (1994) Glutamate-induced calcium signaling in astrocytes. *Glia*. **11**, 173-184.
- Kitano, J., Nishida, M., Itsukaichi, Y., Minami, I., Ogawa, M., Hirano, T., Mori, Y. et Nakanishi, S. (2003) Direct interaction and functional coupling between metabotropic glutamate receptor subtype 1 and voltage-sensitive Cav2.1 Ca<sup>2+</sup> channel. *J Biol Chem*. **278**, 25101-25108.
- Klugbauer, N., Marais, E. et Hofmann, F. (2003) Calcium channel alpha2delta subunits: differential expression, function, and drug binding. *J Bioenerg Biomembr*. **35**, 639-647.
- Klugbauer, N., Lacinova, L., Marais, E., Hobom, M. et Hofmann, F. (1999) Molecular diversity of the calcium channel alpha2delta subunit. *J Neurosci*. **19**, 684-691.
- Koschak, A., Reimer, D., Huber, I., Grabner, M., Glossmann, H., Engel, J. et Striessnig, J. (2001) alpha 1D (Cav1.3) subunits can form l-type Ca<sup>2+</sup> channels activating at negative voltages. *J Biol Chem*. **276**, 22100-22106.
- Kostyuk, P. et Verkhratsky, A. (1994) Calcium stores in neurons and glia. *Neuroscience*. **63**, 381-404.
- Kraus, R.L., Sinnegger, M.J., Glossmann, H., Hering, S. et Striessnig, J. (1998) Familial hemiplegic migraine mutations change alpha1A Ca<sup>2+</sup> channel kinetics. *J Biol Chem*. **273**, 5586-5590.

Krebs, E.G. et Beavo, J.A. (1979) Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. *Annu Rev Biochem.* **48**, 923-959.

Kuo, C.C. et Bean, B.P. (1993) G-protein modulation of ion permeation through N-type calcium channels. *Nature.* **365**, 258-262.

Kuzmin, A., Semenova, S., Ramsey, N.F., Zvartau, E.E. et Van Ree, J.M. (1996) Modulation of cocaine intravenous self-administration in drug-naive animals by dihydropyridine Ca<sup>2+</sup> channel modulators. *Eur J Pharmacol.* **295**, 19-25.

- L -

Lacerda, A.E., Rampe, D. et Brown, A.M. (1988) Effects of protein kinase C activators on cardiac Ca<sup>2+</sup> channels. *Nature.* **335**, 249-251.

Lacinova, L. (2005) Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys.* **24 Suppl 1**, 1-78.

Larsson, H.P., Baker, O.S., Dhillon, D.S. et Isacoff, E.Y. (1996) Transmembrane movement of the shaker K<sup>+</sup> channel S4. *Neuron.* **16**, 387-397.

Lee, H.K. et Elmslie, K.S. (2000) Reluctant gating of single N-type calcium channels during neurotransmitter-induced inhibition in bullfrog sympathetic neurons. *J Neurosci.* **20**, 3115-3128.

Lennon, V.A., Kryzer, T.J., Griesmann, G.E., O'Suilleabhain, P.E., Windebank, A.J., Woppmann, A., Miljanich, G.P. et Lambert, E.H. (1995) Calcium-channel antibodies in the Lambert-Eaton syndrome and other paraneoplastic syndromes. *N Engl J Med.* **332**, 1467-1474.

Li, C.Y., Song, Y.H., Higuera, E.S. et Luo, Z.D. (2004) Spinal dorsal horn calcium channel alpha<sub>2</sub>delta-1 subunit upregulation contributes to peripheral nerve injury-induced tactile allodynia. *J Neurosci.* **24**, 8494-8499.

Li, X., Hummer, A., Han, J., Xie, M., Melnik-Martinez, K., Moreno, R.L., Buck, M., Mark, M.D. et Herlitze, S. (2005) G protein beta<sub>2</sub> subunit-derived peptides for inhibition and induction of G protein pathways. Examination of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> and G protein inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels. *J Biol Chem.* **280**, 23945-23959.

Lin, Z., Haus, S., Edgerton, J. et Lipscombe, D. (1997) Identification of functionally distinct isoforms of the N-type Ca<sup>2+</sup> channel in rat sympathetic ganglia and brain. *Neuron.* **18**, 153-166.

Lipscombe, D., Kongsamut, S. et Tsien, R.W. (1989) Alpha-adrenergic inhibition of sympathetic neurotransmitter release mediated by modulation of N-type calcium-channel gating. *Nature.* **340**, 639-642.

- Llinas, R. et Yarom, Y. (1981) Electrophysiology of mammalian inferior olivary neurones in vitro. Different types of voltage-dependent ionic conductances. *J Physiol.* **315**, 549-567.
- Llinas, R.R., Sugimori, M. et Cherksey, B. (1989) Voltage-dependent calcium conductances in mammalian neurons. The P channel. *Ann N Y Acad Sci.* **560**, 103-111.
- Llinas, R.R., Ribary, U., Jeanmonod, D., Kronberg, E. et Mitra, P.P. (1999) Thalamocortical dysrhythmia: A neurological and neuropsychiatric syndrome characterized by magnetoencephalography. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**, 15222-15227.
- Lory, P. et Nargeot, J. (2004) [Genetic diversity of voltage-gated calcium channels]. *Rev Neurol (Paris).* **160**, S7-15.
- Ludwig, A., Flockerzi, V. et Hofmann, F. (1997) Regional expression and cellular localization of the alpha1 and beta subunit of high voltage-activated calcium channels in rat brain. *J Neurosci.* **17**, 1339-1349.
- Luo, Z.D., Chaplan, S.R., Higuera, E.S., Sorkin, L.S., Stauderman, K.A., Williams, M.E. et Yaksh, T.L. (2001) Upregulation of dorsal root ganglion (alpha)2(delta) calcium channel subunit and its correlation with allodynia in spinal nerve-injured rats. *J Neurosci.* **21**, 1868-1875.
- M -
- Maguire, G., Maple, B., Lukasiewicz, P. et Werblin, F. (1989) Gamma-aminobutyrate type B receptor modulation of L-type calcium channel current at bipolar cell terminals in the retina of the tiger salamander. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **86**, 10144-10147.
- Malmberg, A.B. et Yaksh, T.L. (1995) Effect of continuous intrathecal infusion of omega-conopeptides, N-type calcium-channel blockers, on behavior and antinociception in the formalin and hot-plate tests in rats. *Pain.* **60**, 83-90.
- Mangoni, M.E., Couette, B., Bourinet, E., Platzer, J., Reimer, D., Striessnig, J. et Nargeot, J. (2003) Functional role of L-type Cav1.3 Ca<sup>2+</sup> channels in cardiac pacemaker activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**, 5543-5548.
- Marchetti, C., Carbone, E. et Lux, H.D. (1986) Effects of dopamine and noradrenaline on Ca channels of cultured sensory and sympathetic neurons of chick. *Pflugers Arch.* **406**, 104-111.
- Mata, A.M. et Sepulveda, M.R. (2005) Calcium pumps in the central nervous system. *Brain Res Brain Res Rev.* **49**, 398-405.
- Matsuda, Y., Saegusa, H., Zong, S., Noda, T. et Tanabe, T. (2001) Mice lacking Ca(v)2.3 (alpha1E) calcium channel exhibit hyperglycemia. *Biochem Biophys Res Commun.* **289**, 791-795.

- McFadzean, I. et Docherty, R.J. (1989) Noradrenaline- and Enkephalin-Induced Inhibition of Voltage-Sensitive Calcium Currents in NG108-15 Hybrid Cells. *Eur J Neurosci.* **1**, 141-147.
- McFadzean, I., Mullaney, I., Brown, D.A. et Milligan, G. (1989) Antibodies to the GTP binding protein, Go, antagonize noradrenaline-induced calcium current inhibition in NG108-15 hybrid cells. *Neuron.* **3**, 177-182.
- Meir, A. et Dolphin, A.C. (2002) Kinetics and Gbetagamma modulation of Ca(v)2.2 channels with different auxiliary beta subunits. *Pflugers Arch.* **444**, 263-275.
- Meir, A., Bell, D.C., Stephens, G.J., Page, K.M. et Dolphin, A.C. (2000) Calcium channel beta subunit promotes voltage-dependent modulation of alpha 1 B by G beta gamma. *Biophys J.* **79**, 731-746.
- Meir, A., Ginsburg, S., Butkevich, A., Kachalsky, S.G., Kaiserman, I., Ahdut, R., Demirgoren, S. et Rahamimoff, R. (1999) Ion channels in presynaptic nerve terminals and control of transmitter release. *Physiol Rev.* **79**, 1019-1088.
- Melliti, K., Grabner, M. et Seabrook, G.R. (2003) The familial hemiplegic migraine mutation R192Q reduces G-protein-mediated inhibition of P/Q-type (Ca(V)2.1) calcium channels expressed in human embryonic kidney cells. *J Physiol.* **546**, 337-347.
- Menon-Johansson, A.S., Berrow, N. et Dolphin, A.C. (1993) G(o) transduces GABAB-receptor modulation of N-type calcium channels in cultured dorsal root ganglion neurons. *Pflugers Arch.* **425**, 335-343.
- Meza, U. et Adams, B. (1998) G-Protein-dependent facilitation of neuronal alpha1A, alpha1B, and alpha1E Ca channels. *J Neurosci.* **18**, 5240-5252.
- Mikala, G., Bahinski, A., Yatani, A., Tang, S. et Schwartz, A. (1993) Differential contribution by conserved glutamate residues to an ion-selectivity site in the L-type Ca<sup>2+</sup> channel pore. *FEBS Lett.* **335**, 265-269.
- Mikami, A., Imoto, K., Tanabe, T., Niidome, T., Mori, Y., Takeshima, H., Narumiya, S. et Numa, S. (1989) Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature.* **340**, 230-233.
- Mills, L.R., Niesen, C.E., So, A.P., Carlen, P.L., Spigelman, I. et Jones, O.T. (1994) N-type Ca<sup>2+</sup> channels are located on somata, dendrites, and a subpopulation of dendritic spines on live hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci.* **14**, 6815-6824.
- Missiaen, L., Robberecht, W., van den Bosch, L., Callewaert, G., Parys, J.B., Wuytack, F., Raeymaekers, L., Nilius, B., Eggermont, J. et De Smedt, H. (2000) Abnormal intracellular ca(2+)homeostasis and disease. *Cell Calcium.* **28**, 1-21.
- Monteil, A., Chemin, J., Leuranguer, V., Altier, C., Mennessier, G., Bourinet, E., Lory, P. et Nargeot, J. (2000) Specific properties of T-type calcium channels generated by the human alpha 1I subunit. *J Biol Chem.* **275**, 16530-16535.

- Morgans, C.W. (2001) Localization of the alpha(1F) calcium channel subunit in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **42**, 2414-2418.
- Morgans, C.W., Gaughwin, P. et Maleszka, R. (2001) Expression of the alpha1F calcium channel subunit by photoreceptors in the rat retina. *Mol Vis.* **7**, 202-209.
- Mori, Y., Nishida, M., Shimizu, S., Ishii, M., Yoshinaga, T., Ino, M., Sawada, K. et Niidome, T. (2002) Ca(2+) channel alpha(1B) subunit (Ca(V) 2.2) knockout mouse reveals a predominant role of N-type channels in the sympathetic regulation of the circulatory system. *Trends Cardiovasc Med.* **12**, 270-275.
- Mori, Y., Friedrich, T., Kim, M.S., Mikami, A., Nakai, J., Ruth, P., Bosse, E., Hofmann, F., Flockerzi, V., Furuichi, T. et et al. (1991) Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel. *Nature.* **350**, 398-402.
- Moss, F.J., Viard, P., Davies, A., Bertaso, F., Page, K.M., Graham, A., Canti, C., Plumpton, M., Plumpton, C., Clare, J.J. et Dolphin, A.C. (2002) The novel product of a five-exon stargazin-related gene abolishes Ca(V)2.2 calcium channel expression. *Embo J.* **21**, 1514-1523.

- N -

- Namkung, Y., Skrypnyk, N., Jeong, M.J., Lee, T., Lee, M.S., Kim, H.L., Chin, H., Suh, P.G., Kim, S.S. et Shin, H.S. (2001) Requirement for the L-type Ca(2+) channel alpha(1D) subunit in postnatal pancreatic beta cell generation. *J Clin Invest.* **108**, 1015-1022.
- Newcomb, R., Szoke, B., Palma, A., Wang, G., Chen, X., Hopkins, W., Cong, R., Miller, J., Urge, L., Tarczy-Hornoch, K., Loo, J.A., Dooley, D.J., Nadasdi, L., Tsien, R.W., Lemos, J. et Miljanich, G. (1998) Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*. *Biochemistry.* **37**, 15353-15362.
- Newton, R.A., Bingham, S., Case, P.C., Sanger, G.J. et Lawson, S.N. (2001) Dorsal root ganglion neurons show increased expression of the calcium channel alpha2delta-1 subunit following partial sciatic nerve injury. *Brain Res Mol Brain Res.* **95**, 1-8.
- Nilius, B. (2004) Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry channels: still elusive! *Sci STKE.* **2004**, pe36.
- Nilius, B., Talavera, K. et Verkhatsky, A. (2006) T-type calcium channels: the never ending story. *Cell Calcium.* **40**, 81-88.
- Nowycky, M.C., Fox, A.P. et Tsien, R.W. (1985) Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature.* **316**, 440-443.

- O -

- Olcese, R., Qin, N., Schneider, T., Neely, A., Wei, X., Stefani, E. et Birnbaumer, L. (1994) The amino terminus of a calcium channel beta subunit sets rates of channel

- inactivation independently of the subunit's effect on activation. *Neuron*. **13**, 1433-1438.
- Olivera, B.M., Cruz, L.J., de Santos, V., LeCheminant, G.W., Griffin, D., Zeikus, R., McIntosh, J.M., Galyean, R., Varga, J., Gray, W.R. et al. (1987) Neuronal calcium channel antagonists. Discrimination between calcium channel subtypes using omega-conotoxin from *Conus magus* venom. *Biochemistry*. **26**, 2086-2090.
- Opatowsky, Y., Chen, C.C., Campbell, K.P. et Hirsch, J.A. (2004) Structural analysis of the voltage-dependent calcium channel beta subunit functional core and its complex with the alpha 1 interaction domain. *Neuron*. **42**, 387-399.
- Ophoff, R.A., Terwindt, G.M., Vergouwe, M.N., van Eijk, R., Oefner, P.J., Hoffman, S.M., Lamerdin, J.E., Mohrenweiser, H.W., Bulman, D.E., Ferrari, M., Haan, J., Lindhout, D., van Ommen, G.J., Hofker, M.H., Ferrari, M.D. et Frants, R.R. (1996) Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca<sup>2+</sup> channel gene CACNL1A4. *Cell*. **87**, 543-552.
- P -
- Page, K.M., Stephens, G.J., Berrow, N.S. et Dolphin, A.C. (1997) The intracellular loop between domains I and II of the B-type calcium channel confers aspects of G-protein sensitivity to the E-type calcium channel. *J Neurosci*. **17**, 1330-1338.
- Page, K.M., Canti, C., Stephens, G.J., Berrow, N.S. et Dolphin, A.C. (1998) Identification of the amino terminus of neuronal Ca<sup>2+</sup> channel alpha1 subunits alpha1B and alpha1E as an essential determinant of G-protein modulation. *J Neurosci*. **18**, 4815-4824.
- Parekh, A.B. et Putney, J.W., Jr. (2005) Store-operated calcium channels. *Physiol Rev*. **85**, 757-810.
- Patil, P.G., de Leon, M., Reed, R.R., Dubel, S., Snutch, T.P. et Yue, D.T. (1996) Elementary events underlying voltage-dependent G-protein inhibition of N-type calcium channels. *Biophys J*. **71**, 2509-2521.
- Patterson, R.L., Boehning, D. et Snyder, S.H. (2004) Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors as signal integrators. *Annu Rev Biochem*. **73**, 437-465.
- Penington, N.J., Kelly, J.S. et Fox, A.P. (1991) A study of the mechanism of Ca<sup>2+</sup> current inhibition produced by serotonin in rat dorsal raphe neurons. *J Neurosci*. **11**, 3594-3609.
- Penn, R.D. et Paice, J.A. (2000) Adverse effects associated with the intrathecal administration of ziconotide. *Pain*. **85**, 291-296.
- Pereverzev, A., Salehi, A., Mikhna, M., Renstrom, E., Hescheler, J., Weiergraber, M., Smyth, N. et Schneider, T. (2005) The ablation of the Ca(v)2.3/E-type voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel causes a mild phenotype despite an altered glucose induced glucagon response in isolated islets of Langerhans. *Eur J Pharmacol*. **511**, 65-72.

- Perez-Reyes, E. (2003) Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev.* **83**, 117-161.
- Perez-Reyes, E., Castellano, A., Kim, H.S., Bertrand, P., Bagstrom, E., Lacerda, A.E., Wei, X.Y. et Birnbaumer, L. (1992) Cloning and expression of a cardiac/brain beta subunit of the L-type calcium channel. *J Biol Chem.* **267**, 1792-1797.
- Piedras-Renteria, E.S. et Tsien, R.W. (1998) Antisense oligonucleotides against alpha1E reduce R-type calcium currents in cerebellar granule cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**, 7760-7765.
- Pietrobon, D. (2005) Function and dysfunction of synaptic calcium channels: insights from mouse models. *Curr Opin Neurobiol.* **15**, 257-265.
- Platzer, J., Engel, J., Schrott-Fischer, A., Stephan, K., Bova, S., Chen, H., Zheng, H. et Striessnig, J. (2000) Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Cell.* **102**, 89-97.
- Plummer, M.R., Rittenhouse, A., Kanevsky, M. et Hess, P. (1991) Neurotransmitter modulation of calcium channels in rat sympathetic neurons. *J Neurosci.* **11**, 2339-2348.
- Pragnell, M., Sakamoto, J., Jay, S.D. et Campbell, K.P. (1991) Cloning and tissue-specific expression of the brain calcium channel beta-subunit. *FEBS Lett.* **291**, 253-258.
- Pragnell, M., De Waard, M., Mori, Y., Tanabe, T., Snutch, T.P. et Campbell, K.P. (1994) Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the alpha 1-subunit. *Nature.* **368**, 67-70.

- Q -

- Qin, N., Platano, D., Olcese, R., Stefani, E. et Birnbaumer, L. (1997) Direct interaction of gbetagamma with a C-terminal gbetagamma-binding domain of the Ca<sup>2+</sup> channel alpha1 subunit is responsible for channel inhibition by G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**, 8866-8871.
- Qin, N., Yagel, S., Momplaisir, M.L., Codd, E.E. et D'Andrea, M.R. (2002) Molecular cloning and characterization of the human voltage-gated calcium channel alpha(2)delta-4 subunit. *Mol Pharmacol.* **62**, 485-496.

- R -

- Raghib, A., Bertaso, F., Davies, A., Page, K.M., Meir, A., Bogdanov, Y. et Dolphin, A.C. (2001) Dominant-negative synthesis suppression of voltage-gated calcium channel Cav2.2 induced by truncated constructs. *J Neurosci.* **21**, 8495-8504.

- Randall, A. et Tsien, R.W. (1995) Pharmacological dissection of multiple types of Ca<sup>2+</sup> channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci.* **15**, 2995-3012.
- Randall, A.D. et Tsien, R.W. (1997) Contrasting biophysical and pharmacological properties of T-type and R-type calcium channels. *Neuropharmacology.* **36**, 879-893.
- Reid, C.A., Bekkers, J.M. et Clements, J.D. (2003) Presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels: a functional patchwork. *Trends Neurosci.* **26**, 683-687.
- Restituito, S., Cens, T., Barrere, C., Geib, S., Galas, S., De Waard, M. et Charnet, P. (2000) The [beta]2a subunit is a molecular groom for the Ca<sup>2+</sup> channel inactivation gate. *J Neurosci.* **20**, 9046-9052.
- Reynolds, I.J., Wagner, J.A., Snyder, S.H., Thayer, S.A., Olivera, B.M. et Miller, R.J. (1986) Brain voltage-sensitive calcium channel subtypes differentiated by omega-conotoxin fraction GVIA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **83**, 8804-8807.
- Rizzuto, R. (2001) Intracellular Ca(2+) pools in neuronal signalling. *Curr Opin Neurobiol.* **11**, 306-311.
- Roche, J.P. et Treistman, S.N. (1998a) Ca<sup>2+</sup> channel beta3 subunit enhances voltage-dependent relief of G-protein inhibition induced by muscarinic receptor activation and Gbetagamma. *J Neurosci.* **18**, 4883-4890.
- Roche, J.P. et Treistman, S.N. (1998b) The Ca<sup>2+</sup> channel beta3 subunit differentially modulates G-protein sensitivity of alpha1A and alpha1B Ca<sup>2+</sup> channels. *J Neurosci.* **18**, 878-886.
- Roche, J.P., Anantharam, V. et Treistman, S.N. (1995) Abolition of G protein inhibition of alpha 1A and alpha 1B calcium channels by co-expression of the beta 3 subunit. *FEBS Lett.* **371**, 43-46.
- Rogue, P.J. et Malviya, A.N. (1999) Calcium signals in the cell nucleus. Strasbourg, France, August 20-23, 1998. *Embo J.* **18**, 5147-5152.
- Rossier, M.F., Ertel, E.A., Vallotton, M.B. et Capponi, A.M. (1998) Inhibitory action of mibefradil on calcium signaling and aldosterone synthesis in bovine adrenal glomerulosa cells. *J Pharmacol Exp Ther.* **287**, 824-831.
- Rottbauer, W., Baker, K., Wo, Z.G., Mohideen, M.A., Cantiello, H.F. et Fishman, M.C. (2001) Growth and function of the embryonic heart depend upon the cardiac-specific L-type calcium channel alpha1 subunit. *Dev Cell.* **1**, 265-275.
- Ruth, P., Rohrkasten, A., Biel, M., Bosse, E., Regulla, S., Meyer, H.E., Flockerzi, V. et Hofmann, F. (1989) Primary structure of the beta subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science.* **245**, 1115-1118.



- Saegusa, H., Kurihara, T., Zong, S., Kazuno, A., Matsuda, Y., Nonaka, T., Han, W., Toriyama, H. et Tanabe, T. (2001) Suppression of inflammatory and neuropathic pain symptoms in mice lacking the N-type Ca<sup>2+</sup> channel. *Embo J.* **20**, 2349-2356.
- Saegusa, H., Kurihara, T., Zong, S., Minowa, O., Kazuno, A., Han, W., Matsuda, Y., Yamanaka, H., Osanai, M., Noda, T. et Tanabe, T. (2000) Altered pain responses in mice lacking alpha 1E subunit of the voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 6132-6137.
- Saisu, H., Ibaraki, K., Yamaguchi, T., Sekine, Y. et Abe, T. (1991) Monoclonal antibodies immunoprecipitating omega-conotoxin-sensitive calcium channel molecules recognize two novel proteins localized in the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun.* **181**, 59-66.
- Sandoz, G., Lopez-Gonzalez, I., Stamboulion, S., Weiss, N., Arnoult, C. et De Waard, M. (2004a) Repositioning of charged I-II loop amino acid residues within the electric field by beta subunit as a novel working hypothesis for the control of fast P/Q calcium channel inactivation. *Eur J Neurosci.* **19**, 1759-1772.
- Sandoz, G., Lopez-Gonzalez, I., Grunwald, D., Bichet, D., Altafaj, X., Weiss, N., Ronjat, M., Dupuis, A. et De Waard, M. (2004b) Cavbeta-subunit displacement is a key step to induce the reluctant state of P/Q calcium channels by direct G protein regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**, 6267-6272.
- Sarsero, D., Fujiwara, T., Molenaar, P. et Angus, J.A. (1998) Human vascular to cardiac tissue selectivity of L- and T-type calcium channel antagonists. *Br J Pharmacol.* **125**, 109-119.
- Sather, W.A., Tanabe, T., Zhang, J.F., Mori, Y., Adams, M.E. et Tsien, R.W. (1993) Distinctive biophysical and pharmacological properties of class A (BI) calcium channel alpha 1 subunits. *Neuron.* **11**, 291-303.
- Schmitt, R., Clozel, J.P., Iberg, N. et Buhler, F.R. (1995) Mibefradil prevents neointima formation after vascular injury in rats. Possible role of the blockade of the T-type voltage-operated calcium channel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **15**, 1161-1165.
- Schmitz, Y. et Witkovsky, P. (1997) Dependence of photoreceptor glutamate release on a dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Neuroscience.* **78**, 1209-1216.
- Schrier, A.D., Wang, H., Talley, E.M., Perez-Reyes, E. et Barrett, P.Q. (2001) alpha1H T-type Ca<sup>2+</sup> channel is the predominant subtype expressed in bovine and rat zona glomerulosa. *Am J Physiol Cell Physiol.* **280**, C265-272.
- Schuhmann, K. et Groschner, K. (1994) Protein kinase-C mediates dual modulation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels in human vascular smooth muscle. *FEBS Lett.* **341**, 208-212.
- Schulla, V., Renstrom, E., Feil, R., Feil, S., Franklin, I., Gjinovci, A., Jing, X.J., Laux, D., Lundquist, I., Magnuson, M.A., Obermuller, S., Olofsson, C.S., Salehi, A., Wendt, A., Klugbauer, N., Wollheim, C.B., Rorsman, P. et Hofmann, F. (2003) Impaired insulin

- secretion and glucose tolerance in beta cell-selective Ca(v)1.2 Ca<sup>2+</sup> channel null mice. *Embo J.* **22**, 3844-3854.
- Schwaller, B., Meyer, M. et Schiffmann, S. (2002) 'New' functions for 'old' proteins: the role of the calcium-binding proteins calbindin D-28k, calretinin and parvalbumin, in cerebellar physiology. Studies with knockout mice. *Cerebellum.* **1**, 241-258.
- Scott, R.H. et Dolphin, A.C. (1986) Regulation of calcium currents by a GTP analogue: potentiation of (-)-baclofen-mediated inhibition. *Neurosci Lett.* **69**, 59-64.
- Scott, R.H. et Dolphin, A.C. (1990) Voltage-dependent modulation of rat sensory neurone calcium channel currents by G protein activation: effect of a dihydropyridine antagonist. *Br J Pharmacol.* **99**, 629-630.
- Scott, R.H., Wootton, J.F. et Dolphin, A.C. (1990) Modulation of neuronal T-type calcium channel currents by photoactivation of intracellular guanosine 5'-O(3-thio) triphosphate. *Neuroscience.* **38**, 285-294.
- Scott, V.E., De Waard, M., Liu, H., Gurnett, C.A., Venzke, D.P., Lennon, V.A. et Campbell, K.P. (1996) Beta subunit heterogeneity in N-type Ca<sup>2+</sup> channels. *J Biol Chem.* **271**, 3207-3212.
- Sculptoreanu, A., Scheuer, T. et Catterall, W.A. (1993a) Voltage-dependent potentiation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels due to phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase. *Nature.* **364**, 240-243.
- Sculptoreanu, A., Rotman, E., Takahashi, M., Scheuer, T. et Catterall, W.A. (1993b) Voltage-dependent potentiation of the activity of cardiac L-type calcium channel alpha 1 subunits due to phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**, 10135-10139.
- Seisenberger, C., Specht, V., Welling, A., Platzer, J., Pfeifer, A., Kuhbandner, S., Striessnig, J., Klugbauer, N., Feil, R. et Hofmann, F. (2000) Functional embryonic cardiomyocytes after disruption of the L-type alpha1C (Cav1.2) calcium channel gene in the mouse. *J Biol Chem.* **275**, 39193-39199.
- Seko, T., Kato, M., Kohno, H., Ono, S., Hashimura, K., Takimizu, H., Nakai, K., Maegawa, H., Katsube, N. et Toda, M. (2002) Structure-activity study of L-cysteine-based N-type calcium channel blockers: optimization of N- and C-terminal substituents. *Bioorg Med Chem Lett.* **12**, 915-918.
- Shapiro, M.S. et Hille, B. (1993) Substance P and somatostatin inhibit calcium channels in rat sympathetic neurons via different G protein pathways. *Neuron.* **10**, 11-20.
- Shapiro, M.S., Loose, M.D., Hamilton, S.E., Nathanson, N.M., Gomeza, J., Wess, J. et Hille, B. (1999) Assignment of muscarinic receptor subtypes mediating G-protein modulation of Ca(2+) channels by using knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**, 10899-10904.

- Shemarova, I.V. et Nesterov, V.P. (2005a) [Evolution of mechanisms of Calcium signaling: the role of Calcium ions in signal transduction in prokaryotes.]. *Zh Evol Biokhim Fiziol.* **41**, 12-17.
- Shemarova, I.V. et Nesterov, V.P. (2005b) [Evolution of Ca(2+) signaling mechanisms. Role of calcium ions in signal transduction in lower eukaryotes]. *Zh Evol Biokhim Fiziol.* **41**, 303-313.
- Sheng, Z.H., Yokoyama, C.T. et Catterall, W.A. (1997) Interaction of the synprint site of N-type Ca<sup>2+</sup> channels with the C2B domain of synaptotagmin I. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**, 5405-5410.
- Sher, E., Pandiella, A. et Clementi, F. (1988) Omega-conotoxin binding and effects on calcium channel function in human neuroblastoma and rat pheochromocytoma cell lines. *FEBS Lett.* **235**, 178-182.
- Sher, E., Biancardi, E., Pollo, A., Carbone, E., Li, G., Wollheim, C.B. et Clementi, F. (1992) omega-Conotoxin-sensitive, voltage-operated Ca<sup>2+</sup> channels in insulin-secreting cells. *Eur J Pharmacol.* **216**, 407-414.
- Shistik, E., Ivanina, T., Puri, T., Hosey, M. et Dascal, N. (1995) Ca<sup>2+</sup> current enhancement by alpha 2/delta and beta subunits in *Xenopus* oocytes: contribution of changes in channel gating and alpha 1 protein level. *J Physiol.* **489**, 55-62.
- Simen, A.A. et Miller, R.J. (2000) Involvement of regions in domain I in the opioid receptor sensitivity of alpha1B Ca(2+) channels. *Mol Pharmacol.* **57**, 1064-1074.
- Simen, A.A., Lee, C.C., Simen, B.B., Bindokas, V.P. et Miller, R.J. (2001) The C terminus of the Ca channel alpha1B subunit mediates selective inhibition by G-protein-coupled receptors. *J Neurosci.* **21**, 7587-7597.
- Simpson, P.B. et Russell, J.T. (1998) Role of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> regulation in neuronal and glial cell signalling. *Brain Res Brain Res Rev.* **26**, 72-81.
- Singer-Lahat, D., Gershon, E., Lotan, I., Hullin, R., Biel, M., Flockerzi, V., Hofmann, F. et Dascal, N. (1992) Modulation of cardiac Ca<sup>2+</sup> channels in *Xenopus* oocytes by protein kinase C. *FEBS Lett.* **306**, 113-118.
- Sinnegger-Brauns, M.J., Hetzenauer, A., Huber, I.G., Renstrom, E., Wietzorrek, G., Berjukov, S., Cavalli, M., Walter, D., Koschak, A., Waldschutz, R., Hering, S., Bova, S., Rorsman, P., Pongs, O., Singewald, N. et Striessnig, J.J. (2004) Isoform-specific regulation of mood behavior and pancreatic beta cell and cardiovascular function by L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *J Clin Invest.* **113**, 1430-1439.
- Smith, M.T., Cabot, P.J., Ross, F.B., Robertson, A.D. et Lewis, R.J. (2002) The novel N-type calcium channel blocker, AM336, produces potent dose-dependent antinociception after intrathecal dosing in rats and inhibits substance P release in rat spinal cord slices. *Pain.* **96**, 119-127.
- Smith, S.J. et Augustine, G.J. (1988) Calcium ions, active zones and synaptic transmitter release. *Trends Neurosci.* **11**, 458-464.

- Somasundaram, B. et Tregear, R.T. (1993) Isoproterenol and GTP gamma S inhibit L-type calcium channels of differentiating rat skeletal muscle cells. *J Muscle Res Cell Motil.* **14**, 341-346.
- Soong, T.W., Stea, A., Hodson, C.D., Dubel, S.J., Vincent, S.R. et Snutch, T.P. (1993) Structure and functional expression of a member of the low voltage-activated calcium channel family. *Science.* **260**, 1133-1136.
- Soong, T.W., DeMaria, C.D., Alvania, R.S., Zweifel, L.S., Liang, M.C., Mittman, S., Agnew, W.S. et Yue, D.T. (2002) Systematic identification of splice variants in human P/Q-type channel alpha1(2.1) subunits: implications for current density and Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation. *J Neurosci.* **22**, 10142-10152.
- Splawski, I., Yoo, D.S., Stotz, S.C., Cherry, A., Clapham, D.E. et Keating, M.T. (2006) CACNA1H mutations in autism spectrum disorders. *J Biol Chem.* **281**, 22085-22091.
- Splawski, I., Timothy, K.W., Decher, N., Kumar, P., Sachse, F.B., Beggs, A.H., Sanguinetti, M.C. et Keating, M.T. (2005) Severe arrhythmia disorder caused by cardiac L-type calcium channel mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**, 8089-8096; discussion 8086-8088.
- Splawski, I., Timothy, K.W., Sharpe, L.M., Decher, N., Kumar, P., Bloise, R., Napolitano, C., Schwartz, P.J., Joseph, R.M., Condouris, K., Tager-Flusberg, H., Priori, S.G., Sanguinetti, M.C. et Keating, M.T. (2004) Ca(V)1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell.* **119**, 19-31.
- Staats, P.S., Yearwood, T., Charapata, S.G., Presley, R.W., Wallace, M.S., Byas-Smith, M., Fisher, R., Bryce, D.A., Mangieri, E.A., Luther, R.R., Mayo, M., McGuire, D. et Ellis, D. (2004) Intrathecal ziconotide in the treatment of refractory pain in patients with cancer or AIDS: a randomized controlled trial. *Jama.* **291**, 63-70.
- Stamboulian, S., Kim, D., Shin, H.S., Ronjat, M., De Waard, M. et Arnoult, C. (2004) Biophysical and pharmacological characterization of spermatogenic T-type calcium current in mice lacking the CaV3.1 (alpha1G) calcium channel: CaV3.2 (alpha1H) is the main functional calcium channel in wild-type spermatogenic cells. *J Cell Physiol.* **200**, 116-124.
- Stanley, E.F. (1991) Single calcium channels on a cholinergic presynaptic nerve terminal. *Neuron.* **7**, 585-591.
- Stanley, E.F. et Cox, C. (1991) Calcium channels in the presynaptic nerve terminal of the chick ciliary ganglion giant synapse. *Ann N Y Acad Sci.* **635**, 70-79.
- Stanley, E.F. et Goping, G. (1991) Characterization of a calcium current in a vertebrate cholinergic presynaptic nerve terminal. *J Neurosci.* **11**, 985-993.
- Starr, T.V., Prystay, W. et Snutch, T.P. (1991) Primary structure of a calcium channel that is highly expressed in the rat cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**, 5621-5625.

- Stea, A., Soong, T.W. et Snutch, T.P. (1995) Determinants of PKC-dependent modulation of a family of neuronal calcium channels. *Neuron*. **15**, 929-940.
- Stephens, G.J., Brice, N.L., Berrow, N.S. et Dolphin, A.C. (1998) Facilitation of rabbit alpha1B calcium channels: involvement of endogenous Gbetagamma subunits. *J Physiol*. **509**, 15-27.
- Stephens, G.J., Page, K.M., Bogdanov, Y. et Dolphin, A.C. (2000) The alpha1B Ca<sup>2+</sup> channel amino terminus contributes determinants for beta subunit-mediated voltage-dependent inactivation properties. *J Physiol*. **525**, 377-390.
- Stotz, S.C. et Zamponi, G.W. (2001a) Identification of inactivation determinants in the domain IIS6 region of high voltage-activated calcium channels. *J Biol Chem*. **276**, 33001-33010.
- Stotz, S.C. et Zamponi, G.W. (2001b) Structural determinants of fast inactivation of high voltage-activated Ca(2+) channels. *Trends Neurosci*. **24**, 176-181.
- Stotz, S.C., Jarvis, S.E. et Zamponi, G.W. (2004a) Functional roles of cytoplasmic loops and pore lining transmembrane helices in the voltage-dependent inactivation of HVA calcium channels. *J Physiol*. **554**, 263-273.
- Stotz, S.C., Hamid, J., Spaetgens, R.L., Jarvis, S.E. et Zamponi, G.W. (2000) Fast inactivation of voltage-dependent calcium channels. A hinged-lid mechanism? *J Biol Chem*. **275**, 24575-24582.
- Stotz, S.C., Barr, W., McRory, J.E., Chen, L., Jarvis, S.E. et Zamponi, G.W. (2004b) Several structural domains contribute to the regulation of N-type calcium channel inactivation by the beta 3 subunit. *J Biol Chem*. **279**, 3793-3800.
- Striessnig, J., Hoda, J.C., Koschak, A., Zaghetto, F., Mullner, C., Sinnegger-Brauns, M.J., Wild, C., Watschinger, K., Trockenbacher, A. et Pelster, G. (2004) L-type Ca<sup>2+</sup> channels in Ca<sup>2+</sup> channelopathies. *Biochem Biophys Res Commun*. **322**, 1341-1346.
- Strom, T.M., Nyakatura, G., Apfelstedt-Sylla, E., Hellebrand, H., Lorenz, B., Weber, B.H., Wutz, K., Gutwillinger, N., Ruther, K., Drescher, B., Sauer, C., Zrenner, E., Meitinger, T., Rosenthal, A. et Meindl, A. (1998) An L-type calcium-channel gene mutated in incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat Genet*. **19**, 260-263.
- Strong, J.A., Fox, A.P., Tsien, R.W. et Kaczmarek, L.K. (1987) Stimulation of protein kinase C recruits covert calcium channels in Aplysia bag cell neurons. *Nature*. **325**, 714-717.
- Sugiura, Y., Woppmann, A., Miljanich, G.P. et Ko, C.P. (1995) A novel omega-conopeptide for the presynaptic localization of calcium channels at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurocytol*. **24**, 15-27.
- Swartz, K.J. (1993) Modulation of Ca<sup>2+</sup> channels by protein kinase C in rat central and peripheral neurons: disruption of G protein-mediated inhibition. *Neuron*. **11**, 305-320.

Swartz, K.J. et MacKinnon, R. (1997) Mapping the receptor site for hanatoxin, a gating modifier of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels. *Neuron*. **18**, 675-682.

- T -

Takahashi, M., Seagar, M.J., Jones, J.F., Reber, B.F. et Catterall, W.A. (1987) Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **84**, 5478-5482.

Takahashi, T. et Momiyama, A. (1993) Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature*. **366**, 156-158.

Talley, E.M., Cribbs, L.L., Lee, J.H., Daud, A., Perez-Reyes, E. et Bayliss, D.A. (1999) Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels. *J Neurosci*. **19**, 1895-1911.

Tanabe, T., Adams, B.A., Numa, S. et Beam, K.G. (1991) Repeat I of the dihydropyridine receptor is critical in determining calcium channel activation kinetics. *Nature*. **352**, 800-803.

Tanabe, T., Beam, K.G., Adams, B.A., Niidome, T. et Numa, S. (1990) Regions of the skeletal muscle dihydropyridine receptor critical for excitation-contraction coupling. *Nature*. **346**, 567-569.

Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K., Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T. et Numa, S. (1987) Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature*. **328**, 313-318.

Tang, S., Mikala, G., Bahinski, A., Yatani, A., Varadi, G. et Schwartz, A. (1993) Molecular localization of ion selectivity sites within the pore of a human L-type cardiac calcium channel. *J Biol Chem*. **268**, 13026-13029.

Tareilus, E., Roux, M., Qin, N., Olcese, R., Zhou, J., Stefani, E. et Birnbaumer, L. (1997) A *Xenopus* oocyte beta subunit: evidence for a role in the assembly/expression of voltage-gated calcium channels that is separate from its role as a regulatory subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94**, 1703-1708.

Taylor, W.R. et Morgans, C. (1998) Localization and properties of voltage-gated calcium channels in cone photoreceptors of *Tupaia belangeri*. *Vis Neurosci*. **15**, 541-552.

Teodori, E., Baldi, E., Dei, S., Gualtieri, F., Romanelli, M.N., Scapecchi, S., Bellucci, C., Ghelardini, C. et Matucci, R. (2004) Design, synthesis, and preliminary pharmacological evaluation of 4-aminopiperidine derivatives as N-type calcium channel blockers active on pain and neuropathic pain. *J Med Chem*. **47**, 6070-6081.

Thibault, O. et Landfield, P.W. (1996) Increase in single L-type calcium channels in hippocampal neurons during aging. *Science*. **272**, 1017-1020.

- Todorovic, S.M., Meyenburg, A. et Jevtovic-Todorovic, V. (2002) Mechanical and thermal antinociception in rats following systemic administration of mibefradil, a T-type calcium channel blocker. *Brain Res.* **951**, 336-340.
- Toth, P.T., Bindokas, V.P., Bleakman, D., Colmers, W.F. et Miller, R.J. (1993) Mechanism of presynaptic inhibition by neuropeptide Y at sympathetic nerve terminals. *Nature.* **364**, 635-639.
- Tottene, A., Volsen, S. et Pietrobon, D. (2000) alpha(1E) subunits form the pore of three cerebellar R-type calcium channels with different pharmacological and permeation properties. *J Neurosci.* **20**, 171-178.
- Tsien, R.W., Bean, B.P., Hess, P., Lansman, J.B., Nilius, B. et Nowycky, M.C. (1986) Mechanisms of calcium channel modulation by beta-adrenergic agents and dihydropyridine calcium agonists. *J Mol Cell Cardiol.* **18**, 691-710.
- Turner, T.J., Adams, M.E. et Dunlap, K. (1992) Calcium channels coupled to glutamate release identified by omega-Aga-IVA. *Science.* **258**, 310-313.

- V -

- Van Baelen, K., Dode, L., Vanoevelen, J., Callewaert, G., De Smedt, H., Missiaen, L., Parys, J.B., Raeymaekers, L. et Wuytack, F. (2004) The Ca<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup> pumps in the Golgi apparatus. *Biochim Biophys Acta.* **1742**, 103-112.
- Van Petegem, F., Clark, K.A., Chatelain, F.C. et Minor, D.L., Jr. (2004) Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel beta-subunit and an alpha-subunit domain. *Nature.* **429**, 671-675.
- Vassilatis, D.K., Hohmann, J.G., Zeng, H., Li, F., Ranchalis, J.E., Mortrud, M.T., Brown, A., Rodriguez, S.S., Weller, J.R., Wright, A.C., Bergmann, J.E. et Gaitanaris, G.A. (2003) The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**, 4903-4908.
- Vendel, A.C., Rithner, C.D., Lyons, B.A. et Horne, W.A. (2006a) Solution structure of the N-terminal A domain of the human voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel beta4a subunit. *Protein Sci.* **15**, 378-383.
- Vendel, A.C., Terry, M.D., Striegel, A.R., Iverson, N.M., Leuranguer, V., Rithner, C.D., Lyons, B.A., Pickard, G.E., Tobet, S.A. et Horne, W.A. (2006b) Alternative splicing of the voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel beta4 subunit creates a uniquely folded N-terminal protein binding domain with cell-specific expression in the cerebellar cortex. *J Neurosci.* **26**, 2635-2644.

- W -

- Wakamori, M., Mikala, G. et Mori, Y. (1999) Auxiliary subunits operate as a molecular switch in determining gating behaviour of the unitary N-type Ca<sup>2+</sup> channel current in *Xenopus oocytes*. *J Physiol.* **517** ( Pt 3), 659-672.
- Walker, D. et De Waard, M. (1998) Subunit interaction sites in voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels: role in channel function. *Trends Neurosci.* **21**, 148-154.
- Walker, D., Bichet, D., Campbell, K.P. et De Waard, M. (1998) A beta 4 isoform-specific interaction site in the carboxyl-terminal region of the voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel alpha 1A subunit. *J Biol Chem.* **273**, 2361-2367.
- Walker, D., Bichet, D., Geib, S., Mori, E., Cornet, V., Snutch, T.P., Mori, Y. et De Waard, M. (1999) A new beta subtype-specific interaction in alpha1A subunit controls P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channel activation. *J Biol Chem.* **274**, 12383-12390.
- Watson, W.P., Misra, A., Cross, A.J., Green, A.R. et Little, H.J. (1994) The differential effects of felodipine and nitrendipine on cerebral dihydropyridine binding ex vivo and the ethanol withdrawal syndrome in mice. *Br J Pharmacol.* **112**, 1017-1024.
- Weick, J.P., Groth, R.D., Isaksen, A.L. et Mermelstein, P.G. (2003) Interactions with PDZ proteins are required for L-type calcium channels to activate cAMP response element-binding protein-dependent gene expression. *J Neurosci.* **23**, 3446-3456.
- Weiss, N. (2006) The calcium channel beta4a subunit: a scaffolding protein between voltage-gated calcium channel and presynaptic vesicle-release machinery? *J Neurosci.* **26**, 6117-6118.
- Weiss, N., Tournier-Lasserre, E., et De Waard, M. (2006) [Role of P/Q calcium channel in familial hemiplegic migraine]. *Med Sci (Paris)*. Sous presse.
- Weiss, N. et De Waard, M. (2006) [Voltage-dependent calcium channels at the heart of pain perception]. *Med Sci (Paris)*. **22**, 396-404.
- Westenbroek, R.E., Hell, J.W., Warner, C., Dubel, S.J., Snutch, T.P. et Catterall, W.A. (1992) Biochemical properties and subcellular distribution of an N-type calcium channel alpha 1 subunit. *Neuron.* **9**, 1099-1115.
- Westenbroek, R.E., Sakurai, T., Elliott, E.M., Hell, J.W., Starr, T.V., Snutch, T.P. et Catterall, W.A. (1995) Immunochemical identification and subcellular distribution of the alpha 1A subunits of brain calcium channels. *J Neurosci.* **15**, 6403-6418.
- Wheeler, D.B., Randall, A. et Tsien, R.W. (1994) Roles of N-type and Q-type Ca<sup>2+</sup> channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science.* **264**, 107-111.
- Wilkinson, M.F. et Barnes, S. (1996) The dihydropyridine-sensitive calcium channel subtype in cone photoreceptors. *J Gen Physiol.* **107**, 621-630.
- Williams, M.E., Feldman, D.H., McCue, A.F., Brenner, R., Velicelebi, G., Ellis, S.B. et Harpold, M.M. (1992a) Structure and functional expression of alpha 1, alpha 2, and beta subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. *Neuron.* **8**, 71-84.



- Williams, M.E., Brust, P.F., Feldman, D.H., Patthi, S., Simerson, S., Maroufi, A., McCue, A.F., Velicelebi, G., Ellis, S.B. et Harpold, M.M. (1992b) Structure and functional expression of an omega-conotoxin-sensitive human N-type calcium channel. *Science*. **257**, 389-395.
- Williams, M.E., Marubio, L.M., Deal, C.R., Hans, M., Brust, P.F., Philipson, L.H., Miller, R.J., Johnson, E.C., Harpold, M.M. et Ellis, S.B. (1994) Structure and functional characterization of neuronal alpha 1E calcium channel subtypes. *J Biol Chem*. **269**, 22347-22357.
- Williams, S., Serafin, M., Muhlethaler, M. et Bernheim, L. (1997) Facilitation of N-type calcium current is dependent on the frequency of action potential-like depolarizations in dissociated cholinergic basal forebrain neurons of the guinea pig. *J Neurosci*. **17**, 1625-1632.
- Wilson, S.M., Toth, P.T., Oh, S.B., Gillard, S.E., Volsen, S., Ren, D., Philipson, L.H., Lee, E.C., Fletcher, C.F., Tessarollo, L., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. et Miller, R.J. (2000) The status of voltage-dependent calcium channels in alpha 1E knock-out mice. *J Neurosci*. **20**, 8566-8571.
- Wolfe, J.T., Wang, H., Howard, J., Garrison, J.C. et Barrett, P.Q. (2003) T-type calcium channel regulation by specific G-protein betagamma subunits. *Nature*. **424**, 209-213.
- Wu, L.G. et Saggau, P. (1994) Adenosine inhibits evoked synaptic transmission primarily by reducing presynaptic calcium influx in area CA1 of hippocampus. *Neuron*. **12**, 1139-1148.
- Wu, L.G. et Saggau, P. (1995) GABAB receptor-mediated presynaptic inhibition in guinea-pig hippocampus is caused by reduction of presynaptic Ca<sup>2+</sup> influx. *J Physiol*. **485**, 649-657.
- Wu, L.G. et Saggau, P. (1997) Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. *Trends Neurosci*. **20**, 204-212.
- Y -
- Yang, J. et Tsien, R.W. (1993) Enhancement of N- and L-type calcium channel currents by protein kinase C in frog sympathetic neurons. *Neuron*. **10**, 127-136.
- Yassin, M., Zong, S. et Tanabe, T. (1996) G-protein modulation of neuronal class E (alpha 1E) calcium channel expressed in GH3 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. **220**, 453-458.
- Yawo, H. et Chuhma, N. (1993) Preferential inhibition of omega-conotoxin-sensitive presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels by adenosine autoreceptors. *Nature*. **365**, 256-258.

- Yokoyama, C.T., Sheng, Z.H. et Catterall, W.A. (1997) Phosphorylation of the synaptic protein interaction site on N-type calcium channels inhibits interactions with SNARE proteins. *J Neurosci.* **17**, 6929-6938.
- Yokoyama, K., Kurihara, T., Saegusa, H., Zong, S., Makita, K. et Tanabe, T. (2004) Blocking the R-type (Cav2.3) Ca<sup>2+</sup> channel enhanced morphine analgesia and reduced morphine tolerance. *Eur J Neurosci.* **20**, 3516-3519.
- Yoshida, A., Takahashi, M., Nishimura, S., Takeshima, H. et Kokubun, S. (1992) Cyclic AMP-dependent phosphorylation and regulation of the cardiac dihydropyridine-sensitive Ca channel. *FEBS Lett.* **309**, 343-349.
- Yusaf, S.P., Wray, D. et Sivaprasadarao, A. (1996) Measurement of the movement of the S4 segment during the activation of a voltage-gated potassium channel. *Pflugers Arch.* **433**, 91-97.
- Z -
- Zakharenko, S.S., Zablow, L. et Siegelbaum, S.A. (2001) Visualization of changes in presynaptic function during long-term synaptic plasticity. *Nat Neurosci.* **4**, 711-717.
- Zamponi, G.W. (2003) Regulation of presynaptic calcium channels by synaptic proteins. *J Pharmacol Sci.* **92**, 79-83.
- Zamponi, G.W. et Snutch, T.P. (1998) Decay of prepulse facilitation of N type calcium channels during G protein inhibition is consistent with binding of a single Gbeta subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**, 4035-4039.
- Zamponi, G.W., Bourinet, E., Nelson, D., Nargeot, J. et Snutch, T.P. (1997) Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel alpha1 subunit. *Nature.* **385**, 442-446.
- Zhang, J.F., Ellinor, P.T., Aldrich, R.W. et Tsien, R.W. (1996) Multiple structural elements in voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels support their inhibition by G proteins. *Neuron.* **17**, 991-1003.
- Zhang, J.F., Randall, A.D., Ellinor, P.T., Horne, W.A., Sather, W.A., Tanabe, T., Schwarz, T.L. et Tsien, R.W. (1993) Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca<sup>2+</sup> channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology.* **32**, 1075-1088.
- Zhong, H., Li, B., Scheuer, T. et Catterall, W.A. (2001) Control of gating mode by a single amino acid residue in transmembrane segment IS3 of the N-type Ca<sup>2+</sup> channel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**, 4705-4709.
- Zhu, Y. et Ikeda, S.R. (1994) VIP inhibits N-type Ca<sup>2+</sup> channels of sympathetic neurons via a pertussis toxin-insensitive but cholera toxin-sensitive pathway. *Neuron.* **13**, 657-669.

Zhuchenko, O., Bailey, J., Bonnen, P., Ashizawa, T., Stockton, D.W., Amos, C., Dobyns, W.B., Subramony, S.H., Zoghbi, H.Y. et Lee, C.C. (1997) Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha 1A-voltage-dependent calcium channel. *Nat Genet.* **15**, 62-69.

Zylinska, L. et Soszynski, M. (2000) Plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase in excitable and nonexcitable cells. *Acta Biochim Pol.* **47**, 529-539.