UNIVERSITE DE MONTPELLIER II

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L' UNIVERSITE DE MONTPELLIER II

Discipline : Physiologie

Ecole doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Présentée et soutenue publiquement le 29 mars 2012 par

Sylvain ACCART

Etude de l'interaction canaux calciques de type-N / récepteurs couplés aux protéines G et de son impact dans la tolérance aux effets analgésiques de la morphine.

Directeur de thèse : **Emmanuel BOURINET**

Jury :

Mr Alain ESCHALIER	*Unité Inserm 1107 Neuro-Dol*	Rapporteur
Mr Christophe ALTIER	*University of Calgary*	Rapporteur
Mr Jean-Philippe PIN	*IGF*	Examinateur
Mr Michel VIGNES	*Université Montpellier II*	Examinateur
Mr Emmanuel BOURINET	*IGF*	Invité

Résumé

Bien que la régulation des canaux calciques par les récepteurs couplés aux protéines G soit connue depuis une trentaine d'année, ce n'est que récemment qu'il a été découvert que ce phénomène pouvait passer par une interaction directe entre ces deux partenaires. Les RCPGs sont les senseurs d'un grand nombre de paramètres (des simples photons aux molécules odorantes en passant par des hormones, acides aminés et nucléotides) et ils contrôlent un grand nombre de processus cellulaires en fonction de ces différents stimuli, ce qui en fait une cible thérapeutique majeure. Une de leurs cibles est l'activité des canaux calciques voltage dépendants qui est responsable d'un grand nombre de processus tels que le contrôle du potentiel de membrane, le relargage de neurotransmetteurs, la contraction musculaire ou, bien sûr, le contrôle du taux de calcium intracellulaire qui est lui-même un second messager impliqué dans de nombreuses voies de régulations.

Il nous a donc paru intéressant de se pencher plus en avant sur ces interactions et de trouver une méthode nous permettant de cribler ces interactions potentielles avec des RCPG ciblés pouvant intervenir dans une thématique de contrôle de la douleur. Pour cela nous avons développé une stratégie de FRET en temps résolu utilisant les cryptates de terres rares à désactivation lente couplés aux ligands du tag SNAP comme donneurs de fluorescence, les canaux calciques étudiées étant fusionnés avec cet épitope et l'eGFP fusionnée aux RCPG en tant qu'accepteur. Ce test nous a permis de confirmer l'interaction entre CaV2.2 et ORL1 le récepteur de la nociceptine. Nous avons ensuite cherché à caractériser plus précisément cette interaction et nous avons déterminé quelles en étaient les séquences peptidiques responsables au sein des domaines C-terminaux de ces deux protéines grâce à des expériences de GST-pull down. Nous avons synthétisé un peptide reproduisant la séquence d'interaction d'ORL1 que nous avons couplé à la séquence TAT, le rendant ainsi capable de pénétrer les membranes cellulaires. Lorsque nous ajoutons ce peptide leurre dans les expériences de TR-FRET, l'augmentation de fluorescence observée en présence de CaV2.2-SNAP et ORL1-GFP disparait totalement alors que l'ajout d'un peptide contrôle composé des mêmes acides aminés mais présentés dans le désordre n'a aucun effet. Nous avons ensuite cherché à étudier les effets de ce peptide in vivo lors d'un protocole de tolérance à la morphine étant donné que les souris K.O. pour le gène d'ORL1 sont résistantes à l'apparition de cette tolérance. Cette stratégie de découplage CaV2.2-ORL1 abolit complètement le phénomène de tolérance aux effets analgésiques de la morphine par une action au niveau spinal. Ce travail peut conduire à l'utilisation d'une telle approche dans une perspective thérapeutique visant à améliorer l'utilisation de morphiniques lors du traitement des douleurs chroniques.

Mots-clés : Canaux calciques, RCPG, TR-FRET, $Ca_V2.2$, ORL1, tolérance à la morphine

Abstract

The regulation of the calcium channels by GPCRs has been known for almost thirty years but the direction interaction between those two proteins is a recent breakthrough. GPCRs are sensors for a great number of parameters (photons, smell molecules, hormones, amino acids, nucleotides…) and they control numerous cellular functions according to those parameters making them a major target for pharmacology. One of the GPCR's targets is the calcium channel activity which is responsible for a great number of cellular processes like control of the membrane potential, neurotransmitters or hormonal secretion, muscular contraction and, of course, control of the intracellular calcium level which is a second messenger of numerous cell-regulation pathways.

It appears to us that it would be interesting to study more closely those interactions and find a way to screen the GPCR/calcium channels interactions that may occur in pain regulation. We developed a strategy of time resolved FRET, using rare earth cryptate coupled to the ligand of the SNAP tag which is fused to the calcium channel as fluorescence donor and eGFP fused GRPRs as acceptors. That test confirmed the interaction between CaV2.2 and ORL1, the nociceptin receptor. We characterized more precisely the peptide sequence of the carboxy-terminal domain of the two proteins which is responsible for the interaction using GST-pull down experiments. We synthesized a peptide reproducing the ORL1 interaction sequence coupled to the TAT sequence allowing to go through the cell membranes. When we add this decoy peptide to ours TR-FRET experiments we lose all the increase of fluorescence that we see in presence of CaV2.2-SNAP and ORL1-GFP but the adding of a control peptide made of the same peptides but scrambled didn't affect the experiment. Then we look for the effects of this peptide in vivo, during a morphine tolerance protocol as it was reported that the ORL1 knock-out mice were insensitive to this phenomenon. This strategy of uncoupling CaV2.2 and ORL1 leads to a complete suppression of the tolerance to the analgesic effects of the morphine by an action at the spinal level. This work could lead to a therapeutic use of this approach which could enhance the use of morphinic compounds in treatment of chronic pains.

Keywords: Calcium channels, GPCR, TR-FRET, $Ca_V2.2$, ORL1, morphine tolerance.

Sommaire

Introduction..... 6

Préambule..... 7
Chapitre I : Canaux calciques..... 11
2.1) Canaux HVA..... 11
2.1.1) Les différents types de courants..... 11
2.1.2) Les différentes sous-unités..... 13
2.1.3) La modulation des canaux HVA..... 18
2.1.4 Rôles physiologiques..... 22
2.1.5) Modèles Knock-out et canalopathies..... 23
2.2) Canaux LVA..... 25
2.2.1. Les différentes isoformes de Ca_V3..... 26
2.2.2. Structure des Canaux de type T..... 27
2.2.3. Propriétés fonctionnelles..... 28
2.2.4. Expression et distribution des canaux Ca_V3..... 28
2.2.5. Régulation et modulation des courants de type T..... 29
2.2.6. Rôles physiologiques et pathologies associées..... 31
Chapitre III : Les Récepteurs Couplés au Protéines G..... 33
3.1) Structure des RCPG..... 33
3.2) Structure des protéines G..... 35
3.3) Mécanismes d'activation des RCPG..... 36
3.3.1) Activation des protéines G..... 37
3.3.2) Transduction du signal..... 39
3.3.3) Désensibilisation des RCPG..... 39
Chapitre IV : Les interactions entre Canaux calciques et RCPG..... 41
4.1) Régulation par les sous-unités βγ des protéines G..... 41
4.2) Interactions directes entre les RCPG et les canaux calciques..... 44
4.2.1) Interaction entre $Ca_V2.1$ et mGluR1..... 44
4.2.2) Interaction entre $Ca_V1.2$ et le récepteur β_2 adrénergique..... 45
4.2.3) Interaction entre $Ca_V2.2$ et ORL1..... 45
Chapitre V : Techniques de Transfert de Fluorescence..... 48
5.1) Luminescence et fluorophores..... 48
5.2) Le transfert d'énergie type Förster (FRET)..... 49
5.3) Les différentes techniques utilisant le FRET..... 52
5.3.1) Les techniques de FRET classiques..... 52
5.3.2) Utilisation de la GFP et de ses dérivés en FRET..... 54
5.3.3) Le FRET en Temps Résolu (TR-FRET)..... 55
5.3.4) Le tag SNAP..... 58
Chapitre VI : les peptides perméants..... 60
6.1) Les mécanismes de translocation membranaire..... 60
6.1.1) La pénétration directe..... 60
6.1.2) La translocation médiée par l'endocytose..... 61
6.1.3) La translocation par structures transitoires..... 61

Résultats..... 64

1) Création des constructions géniques utilisées et validation..... 65
2) Validation du modèle de TR-FRET entre molécules tagguées HA et SNAP..... 68
3) TR-FRET entre canaux calciques - SNAP et RCPG étiquetés GFP..... 70

4) Etude de l'interaction entre CaV2.2 et ORL1..... 75
4.1) Détermination des sites responsables de l'interaction Ca_V2.2 - ORL1..... 75
4.2) TR-FRET en présence de peptides TAT découplant l'interaction entre CaV2.2 et ORL1..... 78
4.3) Utilisation des peptides TAT dans un modèle de tolérance à la morphine chez la souris..... 80

Conclusions et perspectives..... 83

TR-FRET entre RCPG et canaux calciques..... 84
Interaction ORL1::CaV2.2 et conséquence pour la tolérance à la morphine..... 85
Conclusion..... 87

Annexe 1 : Matériels et méthodes..... 88
Annexe 2 : Références Bibliographiques..... 94

Introduction

Préambule

D'après l'Association Internationale de l'Etude de la Douleur, « La douleur est l'expression d'une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable, liée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle qui provoque des réactions motrices et végétatives protectrices conduisant à la modification du comportement de l'individu. »

La nociception est l'ensemble de mécanismes permettant de transmettre un stimulus nocif au système nerveux central, provoquant ainsi la douleur. Il met en jeu un ensemble de neurones, allant des phénomènes de détection des signaux par le système nerveux périphérique à la transmission au niveau spinal jusqu'à l'intégration centrale des informations par une variété de structures communément appelée matrice de la douleur ou « pain matrix » (Basbaum et al, 2009). Au niveau périphérique, le premier échelon de cette perception nociceptive se trouve dans les terminaisons nerveuses des neurones sensoriels dédiés à la détection des multiples stimuli douloureux (appelés nocicepteurs) dont les champs récepteurs sont localisés sur toute la surface cutanée du corps (on parle alors de nociception somatique) ou dans les différents organes internes (nociception viscérale). Ces stimuli nociceptifs sont de natures physico-chimiques diverses et l'Evolution a permis aux neurones sensoriels de pouvoir détecter sélectivement et avec toute une graduation dans l'intensité les températures nociceptives chaudes ou froides, les différentes pressions ou tensions mécaniques ou les irritants chimiques pour ne citer que les stimuli majeurs (Basbaum et al, 2009). Au niveau anatomique, les nocicepteurs présentent une diversité structurelle avec des terminaisons nerveuses et des fibres peu (fibres Aδ) ou pas myélinisées (fibres C) (figure 1). Le corps cellulaire des neurones sensoriels du système périphérique se trouve dans les ganglions rachidiens de la racine dorsale (Dorsal Root Ganglion ou DRG) dont chaque métamère possède une paire. Ainsi deux ganglions DRG sont présents par échelon vertébral et deux ganglions sont présents au niveau céphalique comprenant les nocicepteurs innervant les territoires de la tête (ganglions trijumeaux). Ces fibres nerveuses sont capables de transduire en signaux électriques les stimuli mécaniques, thermiques ou chimiques à travers une panoplie de récepteurs et canaux ioniques « transducteurs » de ces signaux générant un potentiel de seuil au-delà duquel un potentiel d'action est émis et véhiculé le long de l'axone de la fibre sensorielle puis transmis au système nerveux central via le premier relais

synaptique dans la moelle épinière (Figure 2). Ce signal émis et transmis peut déboucher sur une sensation de douleur chez les organismes conscients. Ces terminaisons nerveuses se situent dans la peau, dans le périoste et au niveau des joints capsule des articulations, dans les muscles, les viscères, etc. Deux grands types de fibres véhiculent les informations nociceptives. Il y a tout d'abord la transmission rapide de la douleur due aux fibres Aδ faiblement myélinisées qui synapsent dans la corne dorsale de la moelle épinière au niveau du tractus néospinothalamique ; ces fibres vont transmettre au complexe ventrobasal de l'hypothalamus, lui-même étant lié au cortex somato-sensoriel. Cette voie est responsable de la douleur aigue, ressentie environ un dixième de seconde après le stimulus, elle peut souvent être localisée précisément grâce à l'activation conjointe de récepteurs mécaniques. La transmission lente se fait par les fibres C qui synapsent dans les lamina II et III de la moelle épinière avant de remonter par la voie antérolatérale et d'innerver le thalamus (un dixième des fibres), les autres fibres innervant la matière grise périaqueducale, le tronc cérébral et le bulbe rachidien. Ces fibres sont responsables des douleurs diffuses et lancinantes.

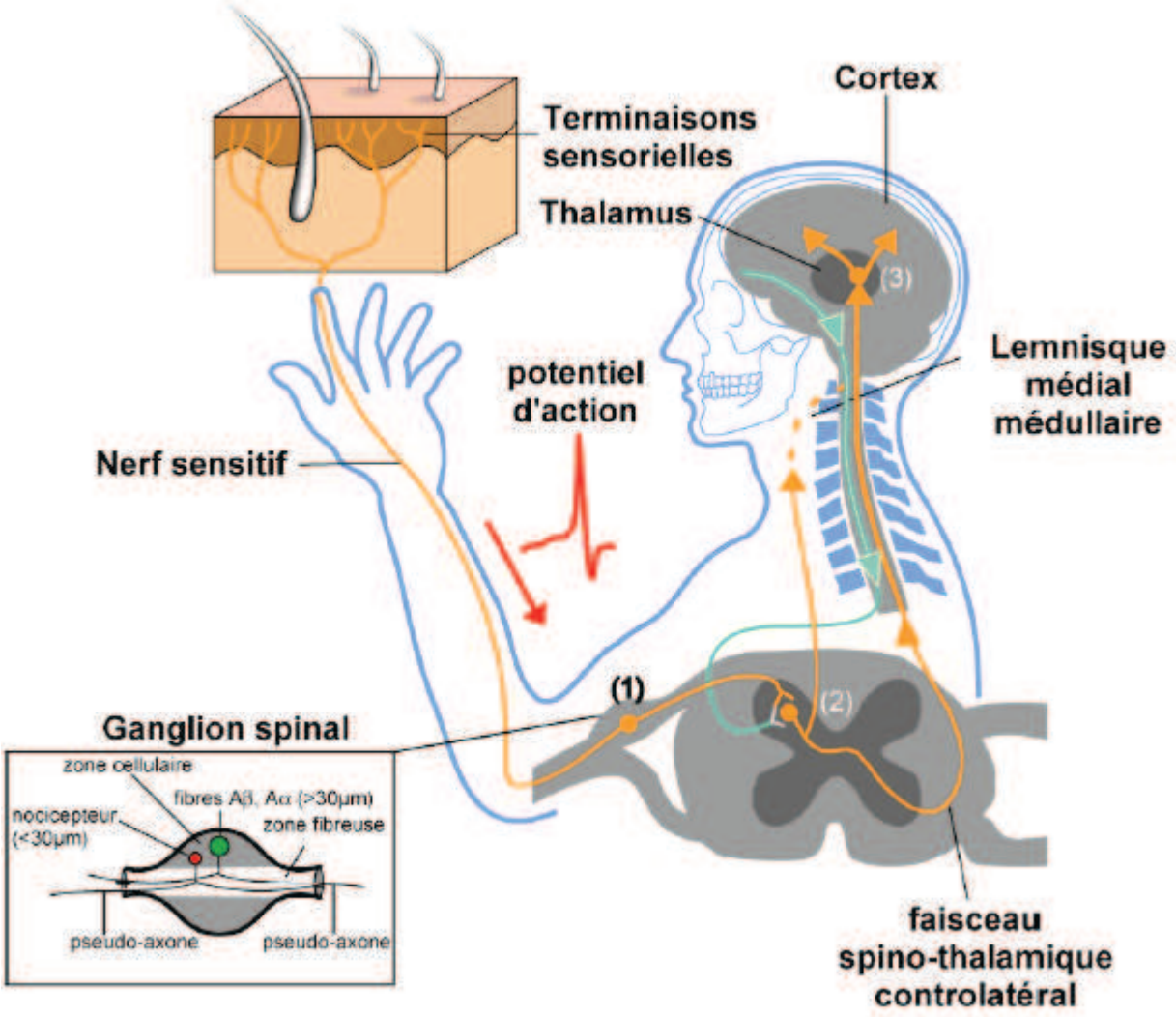


Figure 1: Voie nerveuses sensorielles. Les neurones sensoriels du système nerveux périphérique ont leurs corps cellulaires dans les ganglions spinaux de la racine dorsale (DRG, initiales de *Dorsal Root Ganglion* en anglais). Ces neurones ont un architecture en « T » avec un pseudo-axone distal vers la périphérie qui innerve les champs récepteurs (peau, muscle, viscère). Les stimuli mécaniques, thermiques, chimiques y sont captés puis transmis au ganglion spinal (1) et à la corne dorsale de la moelle épinière (2) via la partie proximale du pseudo-axone. La corne dorsale est le premier relais synaptique des neurones sensoriels véhiculant les informations nociceptives. L'information sensorielle y est traitée localement et conduite au thalamus (3) par le faisceau spino-thalamique ventral controlatéral pour les voies nociceptives, ou par le lemnisque médial de la moelle épinière pour les voies somesthésiques. L'information est alors filtrée par le thalamus et distribuée au cortex où elle est intégrée, provoquant la perception douloureuse et ses conséquences émotionnelles et comportementales.

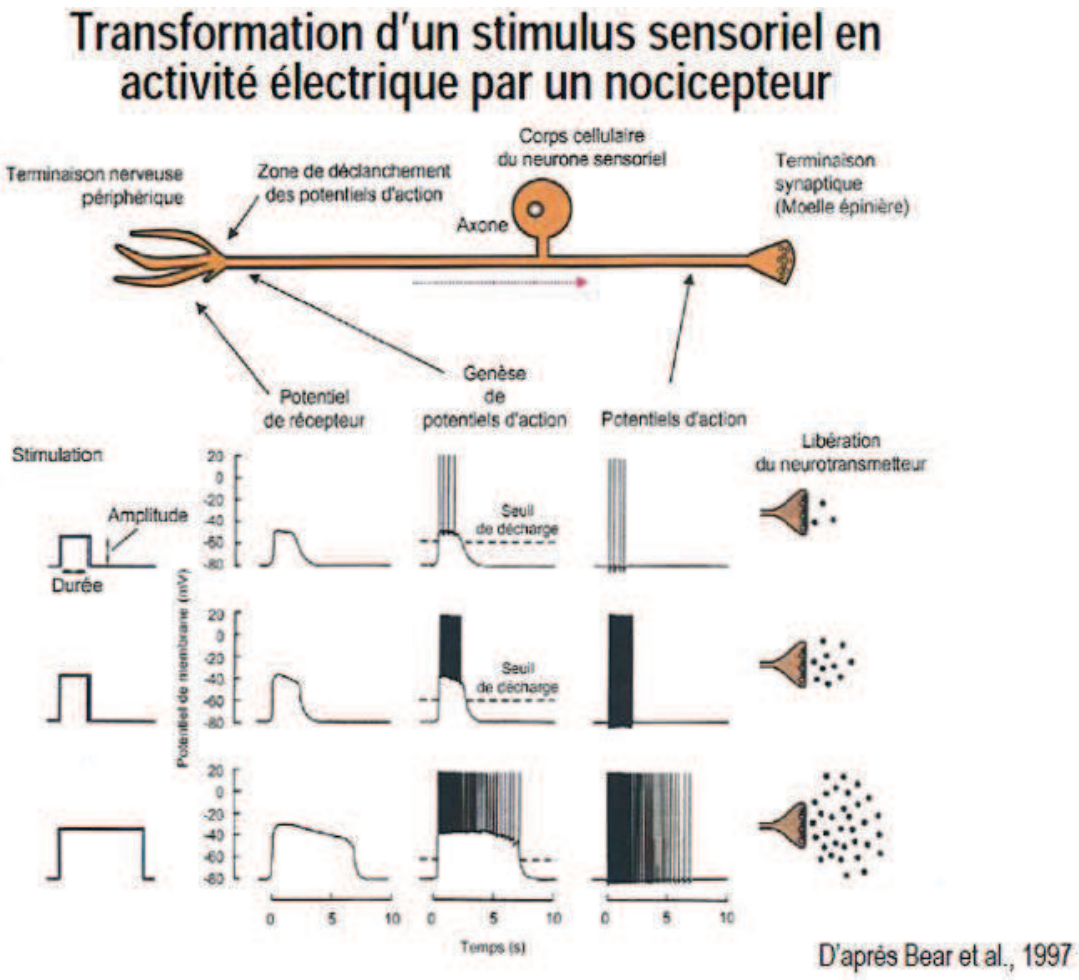


Figure 2: Activité électrique dans le neurone sensoriel. Les stimuli appliqués au champ récepteur excitent les terminaisons périphériques du neurone nocicepteur. L'intensité et la durée des stimuli sont traduites en un potentiel de récepteur plus ou moins important, qui au-delà du seuil va générer un potentiel d'action lors de la sommation des différents potentiels récepteurs arrivant des ramifications des terminaisons périphériques. Le potentiel d'action est alors propagé le long de l'axone jusqu'aux terminaisons pré synaptiques ou il y a libération du neurotransmetteur (glutamate pour les fibres sensorielles). En fonction de la fréquence d'arrivée des potentiels d'action, il y a une libération plus ou moins importante de glutamate.

Chapitre I : Canaux calciques

Les canaux calciques sont essentiels dans la régulation de nombreux processus cellulaires. Ils agissent aussi bien sur le potentiel de membrane de la cellule que sur la concentration en calcium cytoplasmique, second messager contrôlant de nombreuses voies de signalisation cellulaire.

Les canaux calciques sont divisés en deux grandes sous-familles : les canaux à haut seuil d'activation (High Voltage Activation ou HVA) et les canaux à bas seuil d'activation (Low Voltage Activation ou LVA).

Les premiers canaux calciques à avoir été purifiés sont les canaux de type L, grâce à leur grande affinité pour les DHP, par les groupes des Pr Catterall et Ladzunski dans les années 1980. Ces canaux calciques sont constitués d'une sous-unité principale α_1 formant le port et de sous-unités régulatrices β, $\alpha_2\delta$ et γ en stœchiométrie 1 :1 :1 :1 pour un poids de 400 kDa. Les sous-unités γ et δ sont cytoplasmiques, la sous-unité α_2, liée à δ par un pont disulfure est en grande partie extracellulaire et la sous unité β est cytoplasmique. Ces sous-unités modifient les caractéristiques biophysiques du canal et jouent un rôle important dans son adressage à la membrane de la cellule.

2.1) Canaux HVA.

2.1.1) Les différents types de courants

Les canaux HVA présentent une hétérogénéité quant aux différents courants que l'on peut enregistrer au sein de cette famille ; en effet différents types de courants peuvent être isolés en recourant à des inhibiteurs pharmacologiques. On dénombre ainsi sur des critères biophysiques et pharmacologiques les courants de type L, N, P, Q et R.

Historiquement les courants types L pour « Large » et « Long Lasting » étaient opposés au courants type T pour « Transient » et « Tiny », ensuite fut découvert le courant type N, « Neither L or T » puis par pharmacologie les courants P, Q et R.

Les courants de type L sont les principaux responsables de la sécrétion des cellules endocrines ainsi que la contraction des cellules musculaires. On retrouve aussi ces courants dans les cellules pacemaker cardiaques ainsi que dans certains neurones où ils s'activent à plus bas potentiel. Les courants de type L sont générés par les quatre sous-unités α_1 $Ca_V1.1$ à $Ca_V1.4$.

Ces courants sont bloqués par différentes molécules comme les dihydropyridines (DHP), les Benzothiazépines (BTZ) et les phénylalkilamines (PAA).

Les courants P/Q, N et R sont principalement neuronaux, ils initient la neurotransmission dans un grand nombre de synapses rapides et régulent l'entrée de calcium au niveau des corps cellulaires et des dendrites. Ces courants sont dus aux sous-unités α_1 de la deuxième famille, respectivement $Ca_V2.1$, $Ca_V2.2$ et $Ca_V2.3$. Leur pharmacologie diffère de celle des courants de type L car ils sont généralement insensibles aux antagonistes organiques de ceux-ci mais ils sont sensibles à des toxines polypeptidiques comme l'*ω-conotoxine GVIA* (inhibiteur spécifique des courants de type N), l'*ω-Agatoxine IVA* (inhibiteur spécifique des courants de type P et Q), l'*ω-conotoxine MVIIc* (inhibiteur des courants de type N, P et Q) et la toxine *SNX-482* (inhibiteur spécifique des courants de type R). La nomenclature actuelle repose essentiellement sur la diversité moléculaire sous-tendant ces différents courants (Catterall et al, 2003). Ainsi parmi les 10 gènes codants pour des sous-unités principales des canaux calciques activés par la dépolarisation de la membrane, on en dénombre 7 correspondants aux canaux HVA (figure 3).

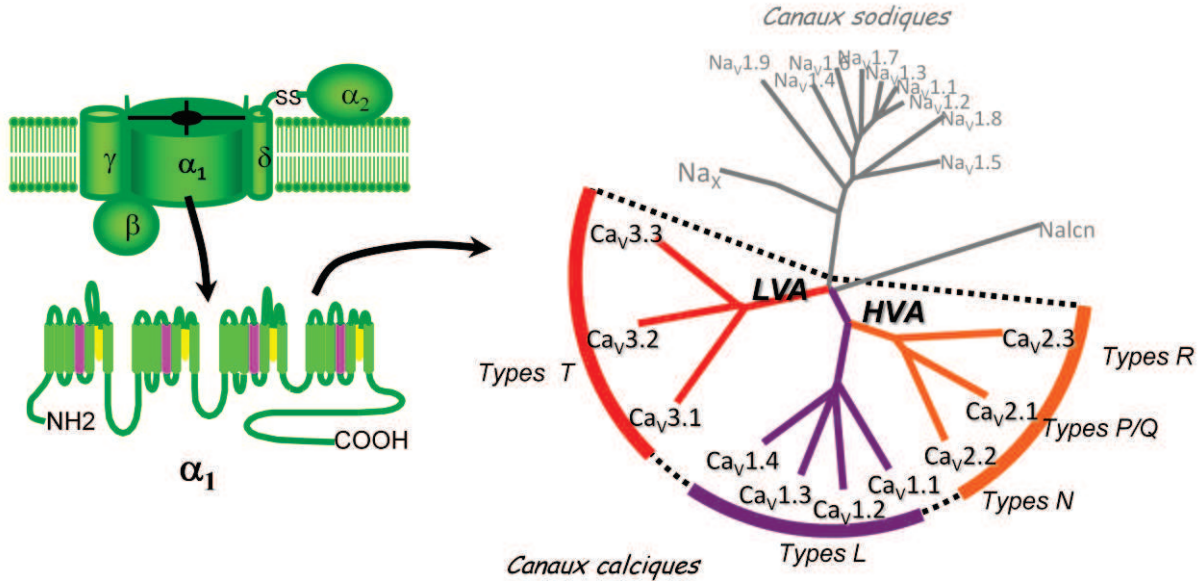


Figure 3: Diversité moléculaire des canaux calciques dépendant du potentiel. Les canaux calciques dépendent du potentiel sont des multimères de différentes sous unités. La sous unité principale qui forme le pore du canal (α1), possède une structure secondaire commune avec les canaux sodiques dépendant du potentiel. Cette structure est formée du 4 domaines transmembranaires reliés par des longs segments intracellulaires. Chaque domaine transmembranaire est formé de 6 segments avec le 4ème formant le senseur du potentiel (*voltage sensor* en anglais, noté en rose sur le schéma) et la partie reliant les 5éme et 6ème segments formant le pore du canal par lequel passent les ions. L'arbre phylogénétique sur la droite du segment permet de comparer les homologies des séquences protéiques des 10 sous unités Ca_V des mammifères. Il apparait que les canaux HVA forment une branche homogène avec deux sous branches correspondants aux canaux de type L (CaV1.X) et au canaux de type N, P/Q et R (CaV2.X). Plus distants on trouve les canaux LVA codés par les sous unité CaV3.X. Cette dernière famille est à mis chemin entre les canaux HVA et les canaux sodiques voltage dépendants en terme d'homologie de séquence.

2.1.2) Les différentes sous-unités

2.1.2.1) La sous-unité α_1

La sous-unité α_1, principale sous-unité des canaux calciques, est une protéine de 1800 à 2300 acides aminés qui présente environ 30% d'homologie avec les canaux sodiques. Cette protéine est constituée de quatre domaines homologues formant le pore du canal reliés par trois boucles intracellulaires ainsi que les domaines carboxy et amino-terminaux, intracellulaires eux aussi. Chacun des domaines est composé comme les canaux sodiques et potassiques de six segments transmembranaires S1 à S6. Le segment S4, constitué alternativement d'acides aminés chargés positivement et d'acides aminés hydrophobes, est le site de sensibilité au potentiel. L'hypothèse la plus courante quant à l'ouverture du canal est que le segment S4 se comportant comme un dipôle, une dépolarisation suffisante le déplace dans la membrane, induisant un changement de conformation des autres segments transmembranaires, ce qui conduit à l'ouverture du canal. Il faut noter qu'à ce niveau aucune donnée structurale de cristaux des canaux calciques n'est disponible. Dans cette famille de canaux seule la structure du cristal d'une isoforme de canal sodique d'Archéobactérie (NaChBac) a pu être résolue (Payandeh et al, 2011; Yarov-Yarovoy et al, 2012). Les résultats confirment les prédictions concernant le fonctionnement en dipôle du segment S4. Il est probable que les canaux sodiques et calciques de mammifères se comportent de façon proche.

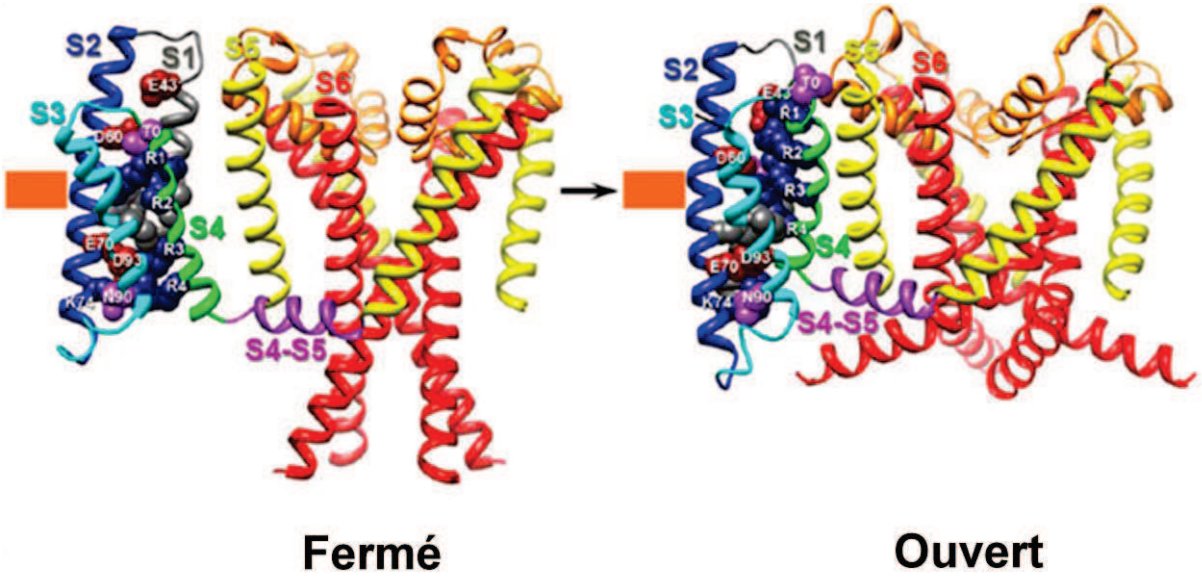


Figure 4: Conformations des états fermés et ouverts du canal NaChBac (Yarov Yarovov et al (2012) PNAS). Notez le mouvement du segment S4 (vert) associé au changement de configuration du canal.

La nomenclature des sous-unités α_1 a été standardisée de telle sorte qu'elles soient classées en fonction de l'ion auquel elles sont principalement perméables (Ca), du modulateur physiologique principal du canal (le voltage V), de la sous-famille à laquelle elles appartiennent et de l'ordre de leur découverte dans cette sous-famille, on obtient donc une nomenclature allant de $Ca_V1.1$ à $Ca_V3.3$ pour les sept sous-unités α_1 de canaux HVA identifiées et les 3 sous-unités de canaux LVA connues (Catterall et al, 2005; Catterall et al, 2003).

Ces différentes sous-unités présentent un très fort taux d'homologie au niveau des segments transmembranaires alors que ce taux est beaucoup plus faible pour les régions intracellulaires, notamment au niveau de la boucle II-III et du domaine C-terminal qui sont fortement impliqués dans la régulation des canaux. Ces domaines contiennent en effet de nombreux sites d'interactions avec d'autres partenaires protéiques qui vont réguler leurs propriétés biophysiques aussi bien que leur adressage (Catterall, 2011; Perez-Reyes, 2003; Snutch & Reiner, 1992).Ces sous-unités ont aussi de nombreux sites d'épissages alternatifs, par exemple la sous-unité $Ca_V1.1$ a 19 variants d'épissages connus. Ces sites se situant souvent dans les boucles intracellulaires et étant dans de nombreux cas tissus-spécifiques, cela permet une régulation encore plus fine du canal selon le type cellulaire où il s'exprime (Adams et al, 2009; Bourinet et al, 1999; Chemin et al, 2001a; Tan et al, 2011; Tan et al, 2012; Tang et al, 2009; Tsou et al, 2011; Wang et al, 2011). La diversité moléculaire peut également avoir pour origine un mécanisme d'édition de l'ARN comme montré récemment pour la sous-unité Cav1.3 (Huang et al, 2012) bien que cet exemple reste unique à ce jour.

Il faut noter que pour $Ca_V2.2$, canal plus particulièrement étudié dans ce travail de thèse, il existe aussi une diversité moléculaire associée à l'existence d'isoformes issues d'épissage (Altier et al, 2007; Andrade et al, 2010; Bell et al, 2004; Gray et al, 2007; Lipscombe et al, 2012; Lipscombe & Raingo, 2007; Marangoudakis et al, 2012; Raingo et al, 2007). Ces isoformes sont exprimées différentiellement dans les neurones sensoriels nocicepteurs avec des implications distinctes dans la perception des stimuli douloureux thermiques et mécaniques (Altier et al, 2007; Bell et al, 2004). Ces variants sont également modulés différemment par les protéines G (Andrade et al, 2010) ou par l'ubiquitination comme le démontre un article récent (Marangoudakis et al, 2012).

2.1.2.2) Les sous-unités auxiliaires : α_2-δ, β et γ

Les sous-unités α_2-δ, β et γ sont des protéines qui sont associées de manière stable avec les sous-unités α_1 et qui régulent leur activité de canal (cinétiques d'activation et d'inactivation, conductance…) ainsi que leur trafic intracellulaire et leur adressage à la membrane.

La sous-unité α_2-δ est codée par un seul gène puis une modification post-traductionnelle la clive en deux parties reliées par un pont disulfure. La partie δ de la protéine est transmembranaire avec une partie intracellulaire très courte, la partie α_2 de la protéine est extracellulaire et c'est elle qui interagirait avec la sous-unité α_1. Cette interaction est dépendante de l'état de glycosylation d'α_2. A l'heure actuelle, quatre gènes différents ont été trouvés codants pour la famille α_2-δ. L'intérêt thérapeutique lié à la sous-unité α_2-δ1 réside dans le fait qu'elle porte le site récepteur des Gabapentinoides, molécules « block-busters » dans le traitement de la douleur (Bauer et al, 2010a; Bauer et al, 2010b; Davies et al, 2010; Tran-Van-Minh & Dolphin, 2010).

La famille des sous-unités β est, elle aussi, composée de quatre isoformes distinctes, sujettes à de nombreuses variations d'épissage. On retrouve cependant une grande homologie de séquence dans la partie de deux domaines centraux de la protéine sur les cinq qu'elle comporte, les domaines carboxy et amino terminaux étant sujets à une plus grande variabilité. Bien que β soit la seule sous-unité complètement cytoplasmique, certaines isoformes (β_{1b}, β_{2a}) peuvent se lier seules à la membrane plasmique grâce à des résidus palmitoylés dans leur partie N-terminale.

La sous-unité β appartient à la famille des protéines MAGUK (Membrane Associated Guanylate Kinase) et comporte plusieurs domaines d'interaction : un domaine PDZ-like, des domaines SH3 (Shc Homology 3) et GK (Guanylate kinase) ainsi que le BID (Béta Interaction Domain) qui se lie au AID (Alpha Interaction Domain) de la sous-unité α_1 du canal. L'obtention du cristal par plusieurs groupes, pour revue voir (Richards et al, 2004) a permis de démontrer qu'en plus de l'interaction à forte affinité AID/BID, d'autres interactions avaient lieu entre les sous-unités β et α_1 ce qui explique l'hétérogénéité observée dans les complexes canalaires.

La famille des sous-unités γ comprend huit gènes ; elle est caractérisée par une topologie commune aux différentes isoformes : quatre domaines transmembranaires, des extrémités amino et carboxy terminales intracellulaires et des motifs extracellulaires dont un motif de glycosylation suspecté de servir à stabiliser l'interaction avec les complexes de canaux calciques. Mis à part cette topologie, cette famille possède une grande hétérogénéité fonctionnelle notamment au niveau des motifs de liaisons que l'on retrouve sur la protéine ; elle a été divisée en trois catégories en fonction de caractéristiques physiologiques. Le groupe 1 (γ_1, γ_6) est lié au complexe du canal calcique du muscle squelettique, le groupe 2 (γ_2, γ_3, γ_4, γ_8) est présent dans les neurones, lié aux canaux calciques mais aussi à d'autres canaux ioniques comme le récepteur AMPA. Le groupe 3 (γ_5, γ_7) est neuronal lui aussi quoique ses fonctions restent obscures. Les sous-unités γ neuronales présentent un domaine PDZ qui serait fondamental pour l'adressage des canaux à la membrane. Les sous-unités γ ont un profil d'association avec les sous-unités α_1 plus restreint que celui de la famille β, ce qui réduit le nombre de complexes hétérogènes possibles.

Initialement, les sous-unités auxiliaires que nous venons de voir ont été décrites comme uniquement liées à la régulation des canaux calciques. Plus récemment il a été montré qu'elles peuvent s'associer à un grand nombre d'autres protéines et ainsi réguler d'autres processus intracellulaires indépendamment des canaux calciques. La perte ou la mutation de ces sous-unités conduisent à de graves maladies voire la mort comme l'ont montré certains modèles murins ainsi que certaines pathologies humaines comme l'ataxie, la migraine et l'épilepsie. (Arikkath & Campbell, 2003; Chen et al, 2007; Hidalgo & Neely, 2007; Obermair et al, 2008).

Sous-unité	Chromosome Humain	Effets fonctionnels	Distribution
α2δ-1	7q21-q22	Trafic membranaire de α1 Augmentation de l'amplitude du courant (cinétiques d'activation/inactivation) Dépendance du voltage de l'activation	Cerveau, cœur, muscle squelettique
α2δ-2	3p21.3	Augmentation de l'amplitude du courant	Poumon, testicules, cerveau, cœur, pancréas, prostate, muscle squelettique, moelle épinière
α2δ-3	3p21.1	Augmentation de densité de courant Dépendance du voltage de l'activation Inactivation à l'état stable	Cerveau, cœur, muscle squelettique
α2δ-4	12p13.3	Augmentation de l'amplitude du courant	Cœur, muscle squelettique, intestin, foie fœtal, érythroblastes, glandes surrénale et pituitaire
β1	17q21-q22	Couplage excitation-sécrétion (m. squelet.) Trafic membranaire de α1 Adressage de CaV1.1 à la triade Augmentation de l'amplitude du courant (cinétiques d'activation/inactivation)	Muscle squelettique (β1a), cerveau (autres isoformes)
β2	10p12	Augmentation de l'amplitude du courant (cinétiques d'activation/inactivation) Trafic membranaire de α1 Adressage de CaV1.4 dans la rétine	Cœur, poumon, trachée, aorte, cerveau
β3	12q13	Augmentation de l'amplitude du courant (cinétiques d'activation/inactivation)	Trafic membranaire de α1 Muscle lisse, trachée, aorte, poumon, cerveau
β4	2q22-q23	Augmentation de l'amplitude du courant (cinétiques d'activation/inactivation) Trafic membranaire de α1	Cerveau
γ1	17q24	Effet inhibitoire (cinétiques d'activation/inactivation)	Muscle squelettique
γ2	22	Effet inhibitoire (cinétiques d'activation/inactivation)	Cerveau
γ3	16p13.1-p12 n	Cinétiques d'activation/inactivation	Cerveau
γ4	17q24	Cinétiques d'inactivation	Cœur, poumon, cerveau, prostate, moelle épinière
γ5	17q24	?	Cerveau
γ6	19q13.4	Réduction de l'amplitude du courant (canaux LVA)	Cœur, muscle squelettique, cerveau
γ7	19q13.4	Réduction de l'amplitude du courant	Cerveau, cœur, poumon, testicules
γ8	19q13.4	?	Cerveau, testicules, moelle épinière

TABLEAU 1. Caractéristiques des sous-unités auxiliaires des canaux calciques à haut seuil d'activation (d'après (Arikkath & Campbell, 2003)).

2.1.3) La modulation des canaux HVA.

Outre la régulation intrinsèque des canaux calciques par leur composition en sous-unités, un grand nombre d'autres facteurs physiologiques ou pharmacologiques peuvent entrer en ligne de compte.

2.1.3.1) Régulation de l'activité

Activité.

Les courants de type L, notamment ceux générés par le canal $Ca_V1.2$, sont facilités par leur précédente activité. En effet une même stimulation produira un courant plus important si elle a été précédée d'une dépolarisation. Ce mécanisme peut être imputé soit à des phosphorylations, soit aux variations de taux de calcium intracellulaire (voir paragraphes suivants).

Calcium/calmoduline.

Le calcium intracellulaire a un effet « feed-back » sur les canaux Type L et cet effet peut être potentiateur ou inhibiteur. La facilitation a été observée dans le muscle et le cœur, elle est médiée par la CaMK II (McCarron et al, 1992); (Yuan W & Bers D. M, 1994); (Zuhlke et al, 1999) (Zuhlke et al, 2000). Les courants de type L sont aussi sujets à une inactivation liée au calcium (Calcium Dependant Inhibition, CDI) médiée quant à elle par la calmoduline et son site de liaison IQ ainsi que le site EF de liaison du calcium du canal $Ca_V1.2$. Ces deux sites étant situés dans la partie C-terminale de la protéine, il est intéressant de noter qu'il existe un variant d'épissage ne les comportant pas qui est insensible à l'inactivation par le calcium (Soldatov et al, 1997); (Soldatov et al, 1998). Le canal $Ca_V1.4$ ne présente pas de CDI car il possède un motif d'interaction de son domaine C-terminal qui interagit avec le site IQ, empêchant ainsi l'interaction avec la calmoduline (Singh & Hamedinger, 2006). Les canaux P/Q comportant eux aussi un motif IQ sont sujets à une CDI, mais de manière moins marquée cependant (Lee & Wong, 1999). Les canaux de type N présentent une faible CDI (Cox & Dunlap, 1994).

Kinases.

Le canal $Ca_V1.2$ peut être phosphorylé par la PKA, la PKC, la CaMKII et la PKG, il possède notamment deux sites d'interaction avec la PKA sur sa queue carboxy-terminale. Les phosphorylations par la PKA augmentent la probabilité d'ouverture du canal, augmentant ainsi la taille des courants enregistrés sur une cellule. Les effets de la PKC sont plus controversés ; dans certains cas une potentiation est observée alors que dans d'autres aucun effet voir même une inhibition est rapportée, il est probable que ces différences proviennent de l'isoforme utilisée pour réaliser les expériences pour revue voir (Kamp & Hell, 2000). Les canaux de type L sont aussi la cible des tyrosine-kinases comme l'IGF qui induit une facilitation des courants parfois nécessaire à la survie des cellules comme dans les neurones granulaires du cervelet (Blair et al, 1999). Les canaux $Ca_V2.3$ quant à eux sont les substrats de la PKA, la PKC, la PKG et la CaMKII (Yokoyama et al, 1995).

2.1.3.2) Régulation de l'adressage et du trafic intracellulaire.

Rôle des sous-unités auxiliaires

La présence de sous-unités auxiliaires joue sur l'adressage des canaux à la membrane ; ainsi la sous-unité α_2-δ, bien qu'elle semble ne pas avoir d'effets sur les canaux de type L, entraine une expression plus importante des canaux P/Q et N à la membrane lorsque cette sous-unité est présente. Il a été montré que la demi-vie des canaux de type N était augmentée en présence de la sous-unité α_2-δ, ce qui peux expliquer l'augmentation du nombre de canaux à la membrane (Yasuda et al, 2004).
La sous-unité β quant à elle permet au canal d'être adressé à la membrane en masquant des motifs de rétention dans le réticulum endoplasmique. Certaines expériences montrent aussi que la présence de la sous-unité β_4 entraine le complexe α_1-β_4 vers la partie présynaptique de la cellule, pour revue voire (Jarvis & Zamponi, 2007).

Rôle de la calmoduline.

En plus de réguler la partie biophysique des canaux calciques, la calmoduline influe aussi sur leur adressage ; en effet, une étude a montré que l'isoforme neuronale de $Ca_V1.2$ est

associée de façon constitutive à la calmoduline et qu'un domaine d'adressage membranaire se trouve au niveau du site d'interaction. Les auteurs de cette étude ont remarqué, en utilisant des canaux fusionnés à la GFP, que la liaison du complexe Ca^{2+}/CaM sur ce domaine accélère le trafic de $Ca_V1.2$ vers des régions distales de l'arbre dendritique dans des neurones d'hippocampe en culture. Cette accélération est dépendante de l'activité et constitue la preuve que le calcium (via la CaM) régule non seulement l'activité des canaux matures présents à la membrane plasmique mais aussi les étapes plus précoces de leur biosynthèse (Wang et al, 2007).

Rôle des protéines synaptiques.

Les canaux de type N et P/Q possèdent un site synprint d'interaction avec les protéines synaptiques (syntaxine, SNAP-25, synaptotagmine…) dans leur boucle intracellulaire II-III. Ce site permet un couplage fonctionnel des canaux calciques avec les protéines d'assemblage des vésicules synaptiques et donc d'avoir à proximité l'entrée de calcium nécessaire à leur fusion. Si le site synprint est nécessaire à un adressage correct de $Ca_V2.2$ auprès des vésicules synaptiques, il possède aussi un domaine PDZ lui permettant d'interagir avec Mint-1 et CASK, ce qui entraine une localisation axonale du canal même dépourvu du motif synprint (Maximov et al, 1999) (Maximov & Bezprozvanny, 2002). Cependant, l'isoforme $Ca_V2.2b$ du canal qui est dépourvu du site PDZ est retenue dans le compartiment somato-dendritique. Inversement, la localisation du canal $Ca_V2.1$ est dépendante du site synprint et non PDZ (Jarvis & Zamponi, 2007).

Autres.

Le canal $Ca_V1.2$ peut être internalisé suite à une activité électrique du neurone par l'intermédiaire de la voie eIF3e (eukarioyic Initiation Factor 3 subunit e) (Green et al, 2007). Par l'intermédiaire de la protéine d'échafaudage AKAP79 l'expression à la membrane des canaux de type L peut également être régulée (Altier et al, 2012; Altier et al, 2002). De plus les canaux calciques sont régulés par les RCPG mais cette partie de leur régulation fera l'objet de plus amples détails au chapitre IV.

2.1.3.3) Modulation pharmacologique.

Depuis de nombreuses années on connait des bloqueurs pharmacologiques des canaux calciques, ils sont utilisés pour étudier les propriétés de ces canaux mais également comme agents thérapeutiques étant donné la grande importance physiologique qu'ont les canaux calciques. Les agents pharmacologiques agissant sur les canaux, généralement non perméants, ont des sites d'interactions extracellulaires. Les antagonistes des canaux calciques peuvent être séparés en trois groupes : les petits ions inorganiques, les grands bloqueurs peptidiques et les petites molécules organiques (Doering & Zamponi, 2003).

Historiquement le Nickel (Ni^{2+}) et le Cadmium (Cd^{2+}) ont été très utilisé dans les études nécessitant d'inhiber les canaux calciques. Le Nickel a longtemps servi comme bloqueur sélectif des canaux LVA. D'autres ions sont de puissants bloqueurs des canaux calciques : certains divalents (zinc, cuivre, aluminium) et d'autres trivalents (lanthane, yttrium, holmium). Malgré leur puissant effet inhibiteur, les ions ne sont pas utilisés en thérapeutique en raison de leur faible sélectivité et de leur toxicité.

Les canaux HVA possèdent des inhibiteurs plus spécifiques comme certaines toxines naturelles peptidiques que l'on trouve chez certains coquillages, (conotoxines), les araignées (agatoxines), les serpents (calcicludine) et les scorpions (kurtoxine). Ces toxines ont d'abord été d'un grand secours pour caractériser les différents courants des canaux calciques et certaines sont à l'heure actuelle considérées comme des agents thérapeutiques potentiels pour traiter diverses pathologies. Dans le cas des canaux calciques de type N codés par la sous unité $Ca_V2.2$, une application thérapeutique découle de l'utilisation d'une des toxines sélectives inhibant ce canal. Il s'agit de la conotoxine SNX111 (ou ZICONOTIDE) dérivée du venin de Conus Magnus. Depuis 2004, cette toxine est approuvée par la FDA pour le traitement de la douleur en injection péridurale sous le nom commercial de "Prialt". Le canal $Ca_V2.2$ est donc une cible validée pour le traitement de la douleur.

Il existe de nombreux autres groupes de molécules organiques ayant des effets inhibiteurs ou activateurs sur les canaux calciques, parmi celles-ci, certaines sont bien connues et caractérisées : les Dihydropyridines (DHP), les phénylalkylamines (PAA) et les benzothiazepines (BZP). Une partie de ces molécules est déjà utilisée en thérapeutique pour traiter des troubles cardiaques, l'hypertension artérielle et certaines formes de psychoses. Les

DHP sont de loin les antagonistes calciques les plus utilisés pour le traitement de l'hypertension.

2.1.4 Rôles physiologiques.

Les canaux HVA ont de nombreux rôles physiologiques et peuvent donc être impliqués dans différentes pathologies. Ils sont en effet cruciaux dans la contraction musculaire, la neurotransmission ou la sécrétion hormonale.

Dans le muscle, le couplage excitation – contraction est réalisé par une augmentation du taux de calcium intracellulaire qui est induite par l'ouverture des canaux de type L. En effet $Ca_V1.1$ fonctionne comme senseur de voltage et s'ouvre lors de la stimulation du muscle, induisant ainsi une entrée de calcium qui va activer le récepteur à la ryanodine RyR1, ce qui va entrainer un relargage du calcium sarcoplasmique dans le cytoplasme et ainsi provoquer la contraction musculaire.

Au niveau cardiaque, c'est l'isoforme $Ca_V1.2$ qui est responsable de l'entrée de calcium dans la cellule mais c'est le RyR2 qui va provoquer ce qu'on appelle la CICR (Calcium Induced Calcium release) et ainsi augmenter suffisamment le taux de calcium intracellulaire pour provoquer la contraction cardiaque. Le courant calcique ainsi provoqué par l'ouverture du canal participe aussi à la prolongation du potentiel d'action cardiaque.

Au niveau neuronal, des canaux de type L pourraient aussi être acteurs d'un couplage activité électrique – CICR. En effet des travaux ont montré suite à des trains de PA (Cohen et al, 1997), l'apparition d'oscillations du taux de calcium intracellulaires caractéristiques de ce phénomène. De plus ces oscillations sont bloquées par l'utilisation de DHP, bloqueur des canaux de type L (Wang & Gruenstein, 1997); (Przewlocki et al, 1999).
Les canaux de type L sont aussi spécifiquement impliqués au niveau neuronal dans le couplage excitation – transcription, phénomène crucial de la plasticité synaptique (LTP, LTD) ; en effet le calcium est capable d'activer certains gènes précoces de la plasticité synaptique comme c-fos. Cette activation est médiée par le facteur de transcription CREB qui est lui-même associé aux canaux au sein de complexes de signalisation comprenant la calmoduline, pour revue voir (Dolmetsch, 2003). Il existe un mécanisme de signalisation directe entre le canal et le noyau. En effet, le groupe de Doltmetsch a montré qu'un fragment

du C-terminus de Cav1.2 est capable de se transloquer dans le noyau et réguler la transcription d'une grande variété de gènes importants pour l'excitabilité et la signalisation neuronale (Gomez-Ospina et al, 2006). Dans cette étude les auteurs ont montré que ce fragment, qu'ils ont appelé « Calcium Channel Associated Trancription regulator » (CCAT), est capable de s'associer à un promoteur endogène. Sa localisation dans le noyau est régulée pendant le développement et par les influx calciques. De manière intéressante, des fragments similaires ont été retrouvés dans différents types de neurones pour d'autres canaux comme Cav1.3 (Hell et al, 1993), Cav2.1 (localisé aussi dans le noyau, (Kordasiewicz et al, 2006), et Cav2.2 (Westenbroek et al, 1992), suggérant qu'il s'agit peut-être d'un mécanisme commun à tous les Cav. De plus le canal $Ca_V2.1$ peut réguler la syntaxin1A, une des protéines reliant le canal à la machinerie de sécrétion synaptique (Sutton et al, 1999).

Les canaux calciques sont impliqués dans d'autres processus de sécrétion. Par exemple, dans les cellules β du pancréas et les cellules chromaffines, l'exocytose des granules de sécrétion est déclenchée par un influx de Ca^{2+} *via* les canaux de type L. Cette sécrétion est lente et persiste après l'arrêt de l'influx, impliquant que les vésicules sont éloignées des zones de sécrétion.

2.1.5) Modèles Knock-out et canalopathies.

Pour aller plus loin que les modèles in-vitro ou ex-vivo classiquement utilisés pour l'étude des canaux calciques, des modèles murins génétiquement modifiés ont été créés, généralement avec certaines sous-unités des canaux calciques spécifiquement inactivées. Ces modèles ont ensuite été étudiés en parallèle avec les pathologies génétiques connues des canaux calciques, pathologies aboutissant à une perte de fonction par mutation du canal ou à un gain de fonction par mutation d'une de ses voies de régulation ; pour plus de précisions quant aux canalopathies calciques, voir la revue de (McKeown et al, 2006).

Les mutations de $Ca_V1.1$ sont létales chez la souris, même si le développement embryonnaire est normal, les souris meurent d'arrêt respiratoire à la naissance. Il existe des mutations non-sens du gène CACNA1S chez l'Homme et elles induisent une perte de fonction qui cause des paralysies périodiques hypokalemiques (HypoPP) et de l'hyperthermie maligne (MHS) (Brem & Brening, 1993; Dias da Silva et al, 2002; Lapie et al, 1996; Matthews & Hanna, 2010; Morrill & Cannon, 1999).

Les souris où l'expression de $Ca_V1.2$ a été invalidée meurent pendant le développement embryonnaire précoce d'une insuffisance cardiovasculaire (Seisenberger et al, 2000). Ceci confirme le rôle fondamental de ces canaux dans la contraction cardiaque. Aucune mutation génétique avec perte de fonction n'a été repérée chez l'Homme probablement car elles y sont aussi létales. Il existe cependant quelques mutations avec gain de fonction qui éliminent l'inactivation voltage dépendante du canal induisant ainsi un syndrome de Timothy. Cette maladie est caractérisée par un dysfonctionnement multi-systémique comportant entre autres des symptômes d'autisme et d'insuffisance cardiaque (Splawski et al, 2005; Splawski et al, 2004).

Les souris K.O. pour la sous-unité $Ca_V1.3$ sont viables mais présentent surdité et insuffisance cardiaque majeure (brachycardie et arythmie), (Platzer et al, 2000). La surdité s'explique par une perte totale de l'influx calcique dans les cellules ciliées de la cochlée, entrainant ainsi une perte de la transmission synaptique et une modification morphologique de la cochlée. Au niveau cardiaque, $Ca_V1.3$ joue un rôle important dans le rythme grâce à son bas seuil d'activation (Mangoni et al, 2003).

La mutation du gène *CACNA1F* codant pour le canal $Ca_V1.4$ entraine une interruption de la signalisation calcique et de la transmission synaptique au niveau des terminaisons des photorécepteurs de la rétine et perturbe son organisation chez la souris (Mansergh et al, 2005). Ces observations confirment les effets des mutations répertoriées chez l'homme qui sont la cause de la rétinite pigmentaire de type 2 (CSNB2).

Les souris KO pour la sous-unité $Ca_V2.1$ présentent un phénotype sévère d'ataxie et de dystonie, elles meurent 3 à 4 semaines après la naissance (Jun et al, 1999). Les courants de type P/Q disparaissent de l'hippocampe et des cellules de Purkinje. Bien que ces courants soient nécessaires pour la transmission synaptique rapide, celle-ci est toujours présente. Dans l'hippocampe, les canaux de type N et R prennent le relai pour assurer cette transmission synaptique. Trois maladies génétiques impliquent le canal $Ca_V2.1$ chez l'Homme : la migraine familiale hémiplégique (MFH), l'ataxie épisodique de type 2 (AE2) et l'ataxie spino-cérébelleuse de type 6 (ASC6) (Guida et al, 2001; Hans et al, 1999; Mezghrani et al, 2008; Pietrobon, 2002). La MFH est provoquée par un gain de fonction qui augmente la sécrétion de neurotransmetteurs. L'AE2 est caractérisée par la synthèse de sous-unités $Ca_V2.1$ tronquées,

ces protéines tronquées sont retenues dans le réticulum endoplasmique et dégradées par le protéasome. Elles sont aussi capables d'interagir avec les canaux sauvages en cours de biosynthèse et d'induire leur dégradation, ce qui pourrait expliquer le caractère dominant de la maladie. L'ASC6 est aussi une maladie dominante qui est causée par une expansion de triplets CAG au niveau de la queue C-terminale qui code pour une séquence étendue de polyglutamines, cette mutation induit une perte de fonction.

Les souris KO pour la sous-unité Cav2.2 sont viables et ne présentent pas de phénotype sévère (Ino et al, 2001). En revanche, ces souris présentent une baisse d'activité des neurones sympathiques sans aucun effet sur les neurones parasympathiques. De ce fait elles ont une pression artérielle et un rythme cardiaque plus élevés. De plus, il a été montré des altérations des réponses nociceptives sur ces sujets ; on peut observer une baisse des réponses nociceptives au test de formaline (douleur persistante), une hyposensibilité aux stimuli nociceptifs thermiques et mécaniques (Hatakeyama et al, 2001; Kim et al, 2001a; Saegusa et al, 2001). En outre, la douleur pathologique est diminuée aussi bien en condition inflammatoire que neuropathique. . Les réponses aux stimuli nociceptifs mécaniques ne sont pas altérées. Ainsi ces différentes études obtenues avec trois KO différents valident largement $Ca_V2.2$ comme cible d'intérêt thérapeutique pour la recherche d'analgésiques.

Les souris invalidées pour la sous-unité $Ca_V2.3$ n'ont pas un phénotype aussi clair que les autres mais on peut noter qu'elles ont une activité locomotrice spontanée moindre ainsi qu'un comportement plus timide. Ces souris ont aussi une réponse réduite aux douleurs inflammatoires alors que leur sensibilité aux douleurs aigues est normale (Saegusa et al, 2000). L'expression de $Ca_V2.3$ dans les voies descendantes de contrôle de la douleur a néanmoins une implication intéressante dans les phénomènes de tolérance à la morphine. En effet les souris KO pour $Ca_V2.3$ ne développent pas de tolérance au effet analgésiques de la morphine et de surcroit les effets analgésiques sont accrus. Par ailleurs, l'injection intra cérébroventriculaire d'une toxine sélective pour $Ca_V2.3$, le SNX482, potentialise les effets analgésiques de la morphine (Yokoyama et al, 2004).

2.2) Canaux LVA.

Les courants calciques à bas seuil d'activation (LVA) ont été observés pour la première fois dans les années 1980. Dans les années suivantes, ce type de courant a été

observé dans différents types cellulaires et les propriétés biophysiques de ces canaux calciques ont été caractérisées. La faible conductance et la rapide inactivation de ces canaux leur a valu l'appellation de canaux de type T (pour Tiny, voir chapitre 2.1.1). L'absence d'une pharmacologie spécifique a rendu leur étude plus difficile que celle des canaux HVA, notamment en ce qui concerne leurs fonctions physiologiques. Il a fallu attendre la fin du XX^{ème} siècle et le développement de la biologie moléculaire pour que l'identité moléculaire de ces canaux calciques à bas seuil d'activation soit découverte. Les gènes codant les sous-unités CaV3.1, CaV3.2 et CaV3.3 ont été alors clonés. Malgré leur ressemblance structurale, leur homologie avec les canaux HVA est inférieure à 30% (figure 3), ce qui explique leurs différences au niveau des propriétés biophysiques et de leur régulation. L'analyse électrophysiologique de ces trois sous-unités dans divers systèmes d'expression a mis également en évidence des différences entre elles (Cribbs et al, 1998; Monteil et al, 2000a; Monteil et al, 2000b; Perez-Reyes, 1998; Perez-Reyes, 2003; Perez-Reyes et al, 1998). Finalement, le développement de nouveaux outils issus de la biologie moléculaire (antisens, modèles knock-out) ont permis de compenser l'absence d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques et d'explorer le rôle physiologique de ces protéines. Il a été montré que les canaux de type T modulent des fonctions cellulaires aussi importantes que l'excitabilité, la sécrétion, la contraction, la croissance, la différentiation, la prolifération et l'interaction entre gamètes. De nombreuses études ont révélé qu'ils sont aussi des cibles thérapeutiques intéressantes car ils sont impliqués dans les mécanismes contrôlant le pacemaker cardiaque (Mangoni et al, 2006), le sommeil et l'épilepsie (Kim et al, 2001b; Powell et al, 2009; Talley et al, 2000; Tsakiridou et al, 1995; Zhang et al, 2002), l'hypertrophie cardiaque, le tonus vasculaire (Chen et al, 2003), la nociception (Bourinet et al, 2005; Choi et al, 2007; Jevtovic-Todorovic & Todorovic, 2006; Marger et al, 2011; Messinger et al, 2009) et la fertilité (Stamboulian et al, 2004).

2.2.1. Les différentes isoformes de Ca_V3

Depuis les années 1980 avec la découverte des courants à bas seuil d'activation, toujours présents en absence de sodium mais stoppés par l'absence de calcium, on s'est aperçu que ces courants pouvaient différer d'un type cellulaire à l'autre (Perez-Reyes, 2003). Il a donc été suggéré que ces types de courants provenaient d'isoformes différentes. Comme aucunes des isoformes connues de canaux calciques voltage dépendants ne correspondaient au courant observé, il a été cherché des séquences candidates dans des banques génomiques

issues de grands programmes de séquençage. Ce criblage *in silico* a permis de découvrir trois sous unités de canal calcique : $Ca_V3.1$ – 3.3. Par la suite l'utilisation d'antisens contre ces sous-unités a permis de confirmer qu'elles étaient bien responsables des courants de type T.
Ces sous-unités ont ensuite été clonées dans différentes espèces (souris, rat, vache, chien et humain), il est intéressant de constater qu'ils sont fortement conservés, notamment 90-95% pour $Ca_V3.1$, 85-90% pour $Ca_V3.3$ et 70-80% pour $Ca_V3.2$.

2.2.2. Structure des Canaux de type T

A l'instar des canaux HVA et bien que n'ayant que 30 % d'homologie avec eux, les canaux LVA sont composés de quatre domaines comprenant six segments transmembranaires. Une différence notable cependant est située au niveau du pore du canal, pour les canaux HVA la séquence contrôlant la sélectivité au calcium est composée de quatre glutamates alors que pour les canaux de la famille Ca_V3 elle est composée de deux glutamates et deux aspartates. Cette variation peut expliquer une partie des différences de perméabilité ionique entre les deux familles de canaux.

La majeure partie du canal est intracellulaire (figure 3). Les boucles intracellulaires ont des tailles similaires à celles des HVA avec une extrémité N-terminale courte (>100a.a.), des boucles longues reliant les domaines I-II et II-III (207-305a.a.), une boucle courte reliant les domaines III-IV (55-66a.a.) et une longue queue C-terminale (433-493a.a.). En outre les séquences sont particulièrement divergentes. Les sites de liaisons connus des HVA pour les sous-unités β (AID), les protéines G ou la PKC (voir chapitres 2.2.2 et 2.2.3) sont absents chez les canaux de type T. De même, ni les sites de liaisons au Ca^{2+} et à la calmoduline, ni les sites de liaison synaptique (synprint…) ne sont présents. Cependant, les boucles intracellulaires contiennent des sites régulateurs très importants dans les canaux T.

La comparaison de la séquence complète des trois canaux de type T montre un faible degré d'homologie au sein de la famille Ca_V3 (~40%), les canaux CaV3.1 et CaV3.2 étant plus similaires entre eux que CaV3.3. Leurs segments transmembranaires sont identiques à 80-90%, mais les différences fondamentales se trouvent encore une fois dans les boucles intracellulaires pour revue voir (Perez-Reyes, 2003).

2.2.3. Propriétés fonctionnelles

Les canaux de type T ont une sélectivité pour le Ca^{2+} mais laissent aussi passer le Ba^{2+}. De plus leur sélectivité est moindre que celle des canaux HVA. En conditions physiologiques, les canaux LVA ont un potentiel d'activation situé entre -75 et -60 mV et un potentiel d'inactivation de -80 mV dans les tissus nerveux et -60 mV dans les tissus cardiaques. Il existe donc un croisement des courbes d'activation et d'inactivation, ce qui permet l'existence de courants de fenêtre lorsque le potentiel de membrane est dans certaines plages de potentiel. Ce courant induit une entrée de calcium constante dans la cellule et par exemple dans des HEK293 exprimant $Ca_V3.1$ dont le potentiel de membrane est de -40 mV, on note une augmentation de calcium intracellulaire de 50% (Chemin et al, 2000). Ce courant de fenêtre est impliqué notamment dans le développement et le contrôle de l'excitabilité neuronale (Dreyfus et al, 2009). La réactivation des canaux de type T est de 2 à 30 fois plus lente que celle des canaux HVA et elle a lieu après que les canaux soient passés de l'état fermé à inactivé.

2.2.4. Expression et distribution des canaux Ca_V3

Nous verrons par la suite que l'expression des canaux Cav3 est finement régulée tant spatialement que temporellement au cours du développement. Chez l'homme, la distribution de Cav3.1 et Cav3.2 est assez large, ces deux canaux sont présents dans les systèmes nerveux et cardiovasculaire, les appareils digestif et reproducteur et les organes endocriniens. Cav3.1 est exprimé surtout dans le cerveau mais aussi dans les ovaires, le placenta, le cœur, le rein et le poumon (Monteil et al, 2000a). L'expression de Cav3.2 est plus forte dans les reins et le foie mais il est aussi exprimé dans le cerveau, le cœur, le pancréas, le placenta, le poumon, le muscle squelettique et la glande surrénale (Cribbs et al, 1998; Williams et al, 1999). Contrairement aux deux autres canaux de type T, Cav3.3 montre une distribution plus restreinte car il est exprimé presque exclusivement dans le cerveau même si des ARNm codants pour ce canal ont été aussi détectés dans les glandes tyroïde et surrénale (Lee et al, 1999; McRory et al, 2001; Monteil et al, 2000b).

2.2.5. Régulation et modulation des courants de type T

Pour étudier les modulations des courants de type T, les mêmes expériences que celles qui ont été conduites pour comprendre les modulations des HVA ont été reprises. Cependant il apparait que les modulations des LVA soient différentes de HVA et même si certaines voies de signalisation affectent les deux familles, cela se fait par des interactions différentes.
Comme les canaux de type T n'ont pas encore été purifiés, leur composition en sous-unités n'est pas encore connue, cependant un certain nombre d'expériences montrent qu'ils n'interagissent pas avec les sous-unités β, notamment ils ne possèdent pas la séquence AID et l'inhibition ou la surexpression de ces sous-unités ne changent pas les courants de type T. Il existe cependant une modulation par certaines sous-unités α2δ et γ bien qu'on pense qu'il s'agisse principalement de régulation de l'adressage à la membrane des canaux (Dubel et al, 2004). La boucle I-II serait elle aussi impliquée dans le contrôle de l'adressage des canaux à la membrane (Vitko et al, 2007).

Les RCPG jouent eux aussi un rôle dans la régulation de l'activité des courants de type T (Chemin et al, 2006). Pour les canaux $Ca_V3.2$ et 3.3, la régulation peut passer par l'intermédiaire de la protéine $G_{\beta\gamma}$ qui va se fixer à la boucle II-III du canal (Wolfe et al, 2002). Les RCPG associés à $G\alpha_{q/11}$ peuvent aussi diminuer les courants de $Ca_V3.3$ (Hildebrand et al, 2007; Hildebrand et al, 2009; Isope et al, 2012; Tao et al, 2008). De plus les RCPG peuvent influer sur le comportement des canaux LVA par l'intermédiaire de seconds messagers comme les kinases (PKA, PKC, PKG, TK). La PKA et la PKC entrainent une augmentation des courants par une augmentation de l'expression à la membrane des canaux LVA. Il semblerait que la PKG ait le même mécanisme d'action, ces effets ne sont cependant pas notables lors d'expériences d'électrophysiologie à température ambiante et peuvent varier suivant le modèle expérimental utilisé. L'inhibition de la TK quant à elle, conduit à une augmentation des courants de type T.

La CaMKII est impliquée dans l'augmentation du courant de fenêtre dû au canal $Ca_V3.2$ par l'intermédiaire d'un site d'interaction RXXS se trouvant dans la boucle II-III du canal (Welsby et al, 2003).

Les canaux de type T peuvent aussi être régulés par des agents oxydo-réducteurs. Des agents réducteurs comme le DTT ou la L-cystéine augmentent l'amplitude des courants de type T dûs au canal $Ca_V3.2$, cet effet n'est cependant pas direct mais dû à la chélation d'ions métalliques (Nelson et al, 2007). Les agents oxydants, y compris non-perméants, ont un effet inhibiteur sur les courants de type T.

Une acidification du milieu de 7,2 à 6 comme cela peut arriver en cas d'ischémie entraine une baisse de la conductance des canaux de type T par l'augmentation de leurs seuils d'activation.

Des lipides peuvent aussi inhiber les canaux LVA ; ainsi l'anandamide, un endocannabinoïde, inhibe les trois canaux alors que l'acide arachidonique inhibe $Ca_V3.1$ et 3.2. A partir de ces premières découvertes, il a été déduit que les principaux acides gras naturels, apportés par l'alimentation, pouvaient inhiber les canaux de type T en fonction de leur longueur et de leur insaturation (Chemin et al, 2001b; Chemin et al, 2007).

Les ions sont aussi des modulateurs des canaux LVA, contrairement aux canaux HVA, le Ca^{2+} ne semble pas moduler directement l'activité des canaux LVA. Néanmoins, il a été montré que l'inactivation lente de la sous-unité Cav3.1 est affectée par la concentration extracellulaire de calcium (Hering et al, 2004). Les canaux de type T sont bloqués par d'autres ions divalents et trivalents dont principalement le nickel, le zinc, le cuivre, le cadmium et le lanthane. Les ions cadmium et lanthane sont des bloqueurs non spécifiques et leur mécanisme d'action semble passer par une simple occlusion du pore. Dans le cas des ions divalents (Ni^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}) un deuxième mécanisme qui explique les différentes sensibilités observées entre les membres de la famille Cav3, est impliqué. Le Ni^{2+} aurait une poche de liaison entre les segments S3 et S4 et induirait un découplage du senseur de voltage (S4) avec le pore.

La pharmacologie classique ne possède pas à l'heure actuelle d'inhibiteurs spécifiques des canaux de type T, cependant certaines molécules sont des bloqueurs de ces canaux notamment le mibéfradil qui est le seul à être efficace à des concentrations de l'ordre du micromolaire et, dans une moindre mesure, les dihydropyridines, les phenylalkylamines et les benzodiazépines. Les canaux de type T sont insensibles aux toxines peptidiques qui ciblent les canaux HVA, sauf la kurtoxine. Malheureusement elle bloque aussi les canaux HVA. Il est possible qu'au moins une partie des effets des antiépileptiques, antipsychotiques et anesthésiques soit due à une inhibition des canaux de type T. En effet les trois canaux Cav3 sont inhibés modérément par le methyl-alpha-phenylsuccinimide (MPS), un métabolite du méthosuximide. Un autre antiépileptique, l'éthosuximide, est aussi capable d'inhiber les canaux T. Parmi les antipsychotiques il faut noter que de très faibles doses de pimozide et penfluoridol bloquent les trois canaux de type T (IC50<1iM, (Santi et al, 2002)).

L'amiloride est un diurétique initialement décrit comme un ligand spécifique des canaux de type T. Il bloque sélectivement Cav3.2 par rapport à Cav3.1. Cependant, il bloque aussi les canaux Cav1. Il n'est cependant pas sélectif car il a une activité antagoniste vis-à-vis

d'autres canaux ioniques comme les canaux ASIC activés par les protons pour revue voir (Doering & Zamponi, 2005)).

2.2.6. Rôles physiologiques et pathologies associées.

Les canaux de type T sont impliqués dans un grand nombre de processus physiologiques, notamment grâce à leurs fonctions de contrôle de l'excitabilité d'un grand nombre de cellules. Malgré le manque d'outils pharmacologiques spécifiques, le clonage des différentes sous-unités Ca_V3 a permis de développer des modèles knock-out murins et de se rendre compte de l'importance de ces canaux dans la régulation du sommeil, de la douleur et de leur implication dans des troubles comme l'épilepsie.

Le faible potentiel d'activation des canaux de type T fait d'eux des acteurs privilégiés pour le contrôle de l'excitabilité neuronale, notamment par leur activité en bouffée qui va faire remonter le potentiel de membrane des neurones après une hyperpolarisation (Kim et al, 2001b). Au potentiel de repos des neurones, les canaux de type T produisent un courant de fenêtre qui compense le courant de fuite maintenant ainsi un équilibre bi-stable qui évoluera de manière à amplifier les PPSE ou les PPSI. De par ce contrôle de l'activité neuronale dans le thalamus, les canaux LVA jouent un rôle central dans le contrôle du sommeil et la génération des rythmes de celui-ci (Dreyfus et al, 2009).

Les canaux de type T jouent donc un rôle important dans le contrôle de la nociception, leur inhibition dans les champs récepteurs induit une analgésie de même qu'une injection d'ARN antisens pour CaV3.2 dans les ganglions rachidiens dorsaux, les antisens de CaV3.1 et 3.3 n'ayant eux pas d'effet remarquable sur la douleur (Bourinet et al, 2005; Choi et al, 2007; Marger et al, 2011; Messinger et al, 2009). Le traitement per os avec un antagoniste relativement sélectif des canaux T et ayant une affinité supérieure pour $Ca_V3.2$ comparativement à $Ca_V3.1$ et $Ca_V3.3$ induit également une analgésie (Francois et al, 2012).
La désactivation lente des canaux de type T leur permet de changer la forme des PA sodiques et même d'être encore activés si un deuxième PA survient suffisamment tôt, de plus l'élévation du taux de calcium qu'ils provoquent leur permet de jouer un rôle important dans la plasticité synaptique.

Les canaux LVA ont été à de nombreuses reprises associés à l'épilepsie de type "absence" car leur activité de contrôle du rythme dans les neurones du réseau thalamo-cortical est associée à ce type de trouble. Sans la sous-unité $Ca_V3.1$ il est impossible d'induire des modèles d'épilepsie chez les animaux, alors que dans d'autres modèles on note une

augmentation de la quantité d'ARNm de Ca_V 3.2 et 3.3 (Kim et al, 2001b; Peloquin et al, 2006; Powell et al, 2009; Talley et al, 2000; Tsakiridou et al, 1995; Zamponi et al; Zhang et al, 2002).

Les canaux de type T sont aussi présents au niveau cardiaque et jouent un rôle dans le contrôle du rythme ; ils sont notamment impliqués dans la dépolarisation diastolique et en contrôlent son amplitude (Mangoni et al, 2006).

Il a été montré que les canaux à bas seuil sont impliqués dans de nombreux phénomènes de sécrétion d'hormones ou de neurotransmetteurs ; par exemple dans l'hypophyse, si la libération rapide de neurohormone est sous le contrôle de PA sodiques et de courants HVA, la libération tonique et lente de ces neurohormones est due à l'activité des canaux de type T. La découverte d'une interaction entre des protéines synaptiques et les canaux $Ca_V3.x$ conforte l'idée de leur implication dans la sécrétion induite par des faibles dépolarisations (Weiss et al, 2012a; Weiss & Zamponi, 2012; Weiss et al, 2012b).

Bien qu'ils ne soient pas impliqués dans la contraction des muscles squelettiques et cardiaques, il semblerait que les canaux LVA soient impliqués dans la contraction des muscles vasculaires et contrôlent la tension artérielle d'après l'analyse du KO $Ca_V3.2$ (Chen et al, 2003).

Les canaux de type T apparaissent très précocement au cours du développement dans beaucoup de tissus mais ils disparaissent souvent dans les étapes plus tardives. Ceci suggère qu'ils peuvent jouer un rôle important dans des processus clés du développement comme la prolifération et la différentiation. De nombreuses études ont confirmé que ces canaux T sont impliqués dans ces processus notamment au niveau du muscle lisse et des neurones pour revue voir (Lory et al, 2006). Dans ces types cellulaires les variations de l'expression des canaux T sont souvent corrélées avec les phases du cycle cellulaire. L'amplitude des courants de type T est maximale pendant la phase S, ce qui confirme leur implication dans la prolifération. Les canaux de type T semblent être également impliqués dans les processus de mort cellulaire. Ceci montre que dans des environnements différents, ces canaux peuvent avoir des rôles complètement opposés.

Chapitre III : Les Récepteurs Couplés au Protéines G

L'organisme, sollicité en permanence par son environnement, est amené à analyser simultanément des milliers d'informations de natures diverses allant de simples photons à des molécules odorantes en passant par des hormones, acides aminés et nucléotides. La réception de ces informations et leur décodage par les cellules nécessitent la présence de récepteurs spécifiques présents à l'interface entre le milieu extra et intracellulaire. Parmi ces récepteurs, les RCPG constituent la plus grande famille de récepteurs membranaires de mammifères puisqu'elle représente 3,4 % du génome (Bockaert & Pin, 1999; Gershengorn & Osman, 2001). Ces récepteurs ont été mis sous les feux de l'actualité récemment avec l'attribution du prix Nobel 2012 de chimie aux Américains Brian Kobilka et Robert Lefkowitz. Ces récepteurs doivent leur appellation à leur capacité de couplage, une fois activés à des protéines hétérotrimériques liant le GTP, aussi appelées protéines G. Ces protéines transmettent le signal provenant du récepteur à différents effecteurs intracellulaires permettant la génération d'une réponse cellulaire appropriée. L'isolement puis le clonage des RCPG a permis d'identifier chez l'Homme autour de 900 gènes dont environ 500 correspondent aux récepteurs olfactifs et gustatifs et 400 à des récepteurs capables de lier des ligands endogènes (Fredriksson & Schioth, 2005; Takeda et al, 2002; Vassilatis et al, 2003). Ainsi, l'hétérogénéité de ces récepteurs assure une reconnaissance très large de signaux tant externes (odeurs, lumière, molécules du goût) qu'internes (hormones, neurotransmetteurs, ions).

Les RCPG sont des acteurs essentiels de nombreux processus physiologiques et par conséquent, des cibles de choix pour des médicaments dans le cas de pathologies (épilepsie, diabète, allergies, SIDA…). En effet, ils représentent la cible d'environ 50% des médicaments actuellement sur le marché pharmaceutique (Takeda et al, 2002) (Wise, 2002).

3.1) Structure des RCPG

Les RCPG sont des protéines membranaires dont la masse moléculaire varie pour la plupart de 40 à 85 kDa. Il existe cependant des récepteurs beaucoup plus gros avec des masses moléculaires pouvant atteindre jusqu'à 620 kDa. Basés sur le modèle de la rhodopsine dont la structure tridimensionnelle a été résolue il y a une dizaine d'années (Palczewski et al, 2000), les RCPG se caractérisent par une structure commune de sept hélices hydrophobes transmembranaires (TM), connectées par trois boucles extracellulaires et trois boucles

intracellulaires. Le domaine N-terminal orienté du côté extracellulaire est opposé au domaine C-terminal intracytoplasmique (Bockaert & Pin, 1999) (Pierce KL et al, 2002); (Schertler, 1998). Selon des homologies de séquences, les RCPG sont référencés en trois classes majeures (Bockaert & Pin, 1999).

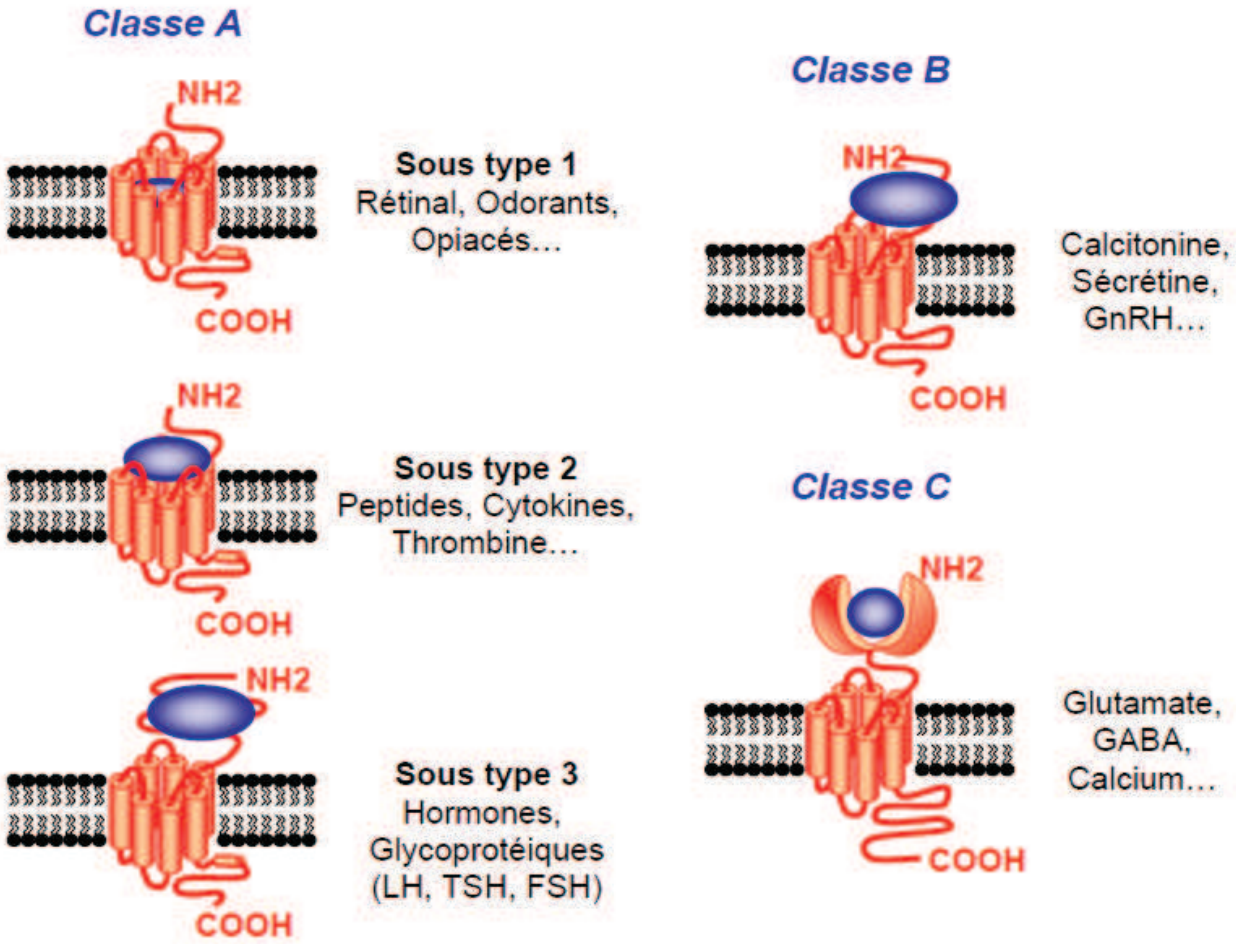


Figure 5 Les différentes classes de RCPG. Le site de liaison du ligand représenté en bleu diffère selon la classe du RCPG.

La classe A, qui a comme archétype la rhodopsine, est la plus représentée. Elle est composée entre autres des récepteurs aux catécholamines, chimiokines et glycoprotéines. La signature de cette classe est un ensemble d'une vingtaine d'acides aminés très conservés dont on soupçonne l'importance capitale dans le maintien de la structure de ces RCPG. Parmi ces

acides aminés nous retiendrons l'aspartate du TM_{II} et quatre résidus hydrophobes des TM_{VI} et TM_{VII} (proline, phénylalanine, asparagine) qui seraient déterminants pour l'activation des récepteurs ainsi que l'arginine du motif Asp-Arg-Tyr (DRY) entre le passage du TM_{III} et la boucle i_2. A noter ici la présence de deux cystéines sur les boucles extracellulaires e_1/e_2 engagées dans un pont disulfure et un site possible de palmitoylation après la courte hélice VIII située directement à la sortie du TM_{VII}. Ce site de modification post-traductionnelle représente un point d'ancrage labile à la membrane plasmique pouvant former une quatrième boucle intracellulaire. Le site de liaison des ligands implique principalement les domaines transmembranaires ainsi que les boucles extracellulaires (Hibert et al, 1991); (Kristiansen, 2004)

La classe B se caractérise par un large domaine amino-terminal extracellulaire (de 100 à 500 acides aminés) contenant des cystéines caractéristiques de cette classe, engagées dans des ponts disulfures. Ces récepteurs sont capables de lier un grand nombre de peptides (calcitonine, sécrétine etc.) au niveau de leur domaine extracellulaire (Trumpp-Kallmeyer S et al, 1992).

La classe C comprend les récepteurs du glutamate, de l'acide γ-amino butyrique (GABAB), les récepteurs du calcium, trois récepteurs du goût, le récepteur GPRC6A dont le ligand a récemment été découvert ainsi que quelques récepteurs orphelins. Ces récepteurs sont caractérisés par un très grand domaine extracellulaire (~ 600 acides aminés) ressemblant aux protéines périplasmiques bactériennes, impliquées dans le transport d'acides aminés de sucres et d'ions (Felder CB et al, 1999) (O'Hara PJ et al, 1993) (Pin & Bockaert, 1995).

3.2) Structure des protéines G.

Les protéines G sont des protéines intracellulaires hétérotrimériques appelées « G » en fonction de leur activité GTPase. Localisées de préférence près de la membrane plasmique, elles forment un complexe entre une sous-unité Gα et un ensemble Gβγ indissociables en conditions non-dénaturantes. A l'heure actuelle, seize gènes codants pour les sous-unités Gα ont été identifiés et les vingt-trois protéines dérivant de ces gènes ont été classées en quatre familles selon des homologies de séquence : Gαs/olf, Gαi/o, Gαq/11, Gα12/13 (Gilman, 1987). Concernant le complexe βγ, cinq gènes codants pour la sous-unité Gβ ainsi que douze gènes codants pour la sous-unité Gγ ont été identifiés (Bockaert & Pin, 1998) (Gilman, 1987) (Neer, 1995). Il existe cependant une spécificité d'association qui fait que les 960

combinaisons possibles ne sont pas utilisées. La sous-unité Gα est une protéine de 39 – 52 kDa composée de deux domaines bien distincts : un domaine GTPase impliqué dans l'échange GDP/GTP et dans l'hydrolyse du GTP ainsi qu'un domaine riche en hélices α susceptible d'interagir avec les RCPG et la sous-unité Gβ. Même si les domaines N- et C-terminaux de Gα, tous deux proches de la membrane plasmique, n'ont pas été résolus, il a été suggéré qu'ils pourraient jouer un rôle clé dans les processus d'activation et dans la spécificité des interactions protéine – protéine (récepteurs, effecteurs…).

Concernant le complexe βγ, la masse moléculaire des sous-unités Gβ et Gγ est respectivement de 36 kDa et 6 – 9 kDa. Il apparaît que les sous-unités Gβ présentent une très haute affinité pour les sous-unités Gγ. De plus, l'interaction entre ces deux protéines est stabilisée par une interaction entre leurs domaines N-terminaux de type superhélicoïdale (Garritsen A et al, 1993). Enfin, le complexe βγ subit des modifications post-traductionnelles par ajout de lipides qui permettent l'ancrage du complexe à la membrane plasmique.

3.3) Mécanismes d'activation des RCPG

Le modèle le plus classiquement retenu pour l'activation des RCPG est le modèle ternaire où le récepteur qui passe d'un état inactif (R) à un état actif (R*) par le biais d'un changement de conformation (De Lean A et al, 1980) (Gether & Kobilka, 1998) (Kenakin, 2002). Le changement de conformation, bien qu'il puisse être spontané ou dû à une mutation, se fait généralement par fixation d'un ligand.

Sur la base de cet équilibre, l'agoniste plein présente une forte affinité pour la forme active du récepteur (R*) et une faible affinité pour sa forme inactive (R). Sa fixation sur le récepteur favorise le déplacement de l'équilibre vers R* ce qui permet d'augmenter le nombre des protéines G activées. L'agoniste partiel a une préférence dans une moindre mesure pour la forme active du récepteur plutôt que pour sa forme inactive. Ainsi, la forme R* est moins représentée d'où un effet de plus faible intensité que l'agoniste plein. Les agonistes inverses, présentent une haute affinité pour la forme inactive du récepteur et une faible affinité pour sa forme active. Ils suppriment l'activité basale intrinsèque du récepteur (Barker et al, 1994) (Chidiac et al, 1994). Enfin, l'antagoniste sans activité propre, lie les formes actives et inactives du récepteur avec la même affinité. L'antagoniste compétitif bloque l'activité de l'agoniste en s'opposant à sa liaison sur le récepteur. Il se distingue de l'antagoniste non compétitif qui se fixe sur des sites différents de celui de l'agoniste (sites allostériques) mais

empêche les changements conformationnels nécessaires à l'induction d'une réponse biologique.

Il semblerait cependant qu'il n'existe pas un seul état actif par récepteur mais qu'en fonction du ligand, la conformation initiale change plus ou moins induisant ainsi des réponses différentes (Yao X et al, 2006).

3.3.1) Activation des protéines G.

Les protéines G sont les principaux effecteurs des RCPG et leur activation suit toujours le même mécanisme. A l'état inactif, la protéine G est composée de ses trois sous-unités α, β et γ et la sous-unité Gα est liée à du GDP dans son domaine GTPase. Dans le cas de figure classique où le RCPG se lie à son agoniste, le changement de conformation induit provoque une augmentation de l'affinité de la protéine G pour son récepteur au détriment du GDP qui est expulsé. Dans la conformation ainsi obtenue, la protéine G à une grande affinité pour son récepteur mais aussi pour le GTP qu'elle va lier, entrainant ainsi une dissociation du complexe héterotrimèrique et une libération des sous-unités Gα-GTP et Gβγ qui vont aller activer leurs effecteurs spécifiques (Adenylate Cyclase (AC), Phospholipase C (PLC)…). Pour terminer le cycle, la déphosphorylation du GTP en GDP par l'action d'une protéine RGS (Regulator of G-protein signaling) met fin au signal d'activation. Le complexe Gαβγ se recompose, stabilisant la liaison du GDP au niveau de la sous-unité Gα.(De Vries L et al, 1995)

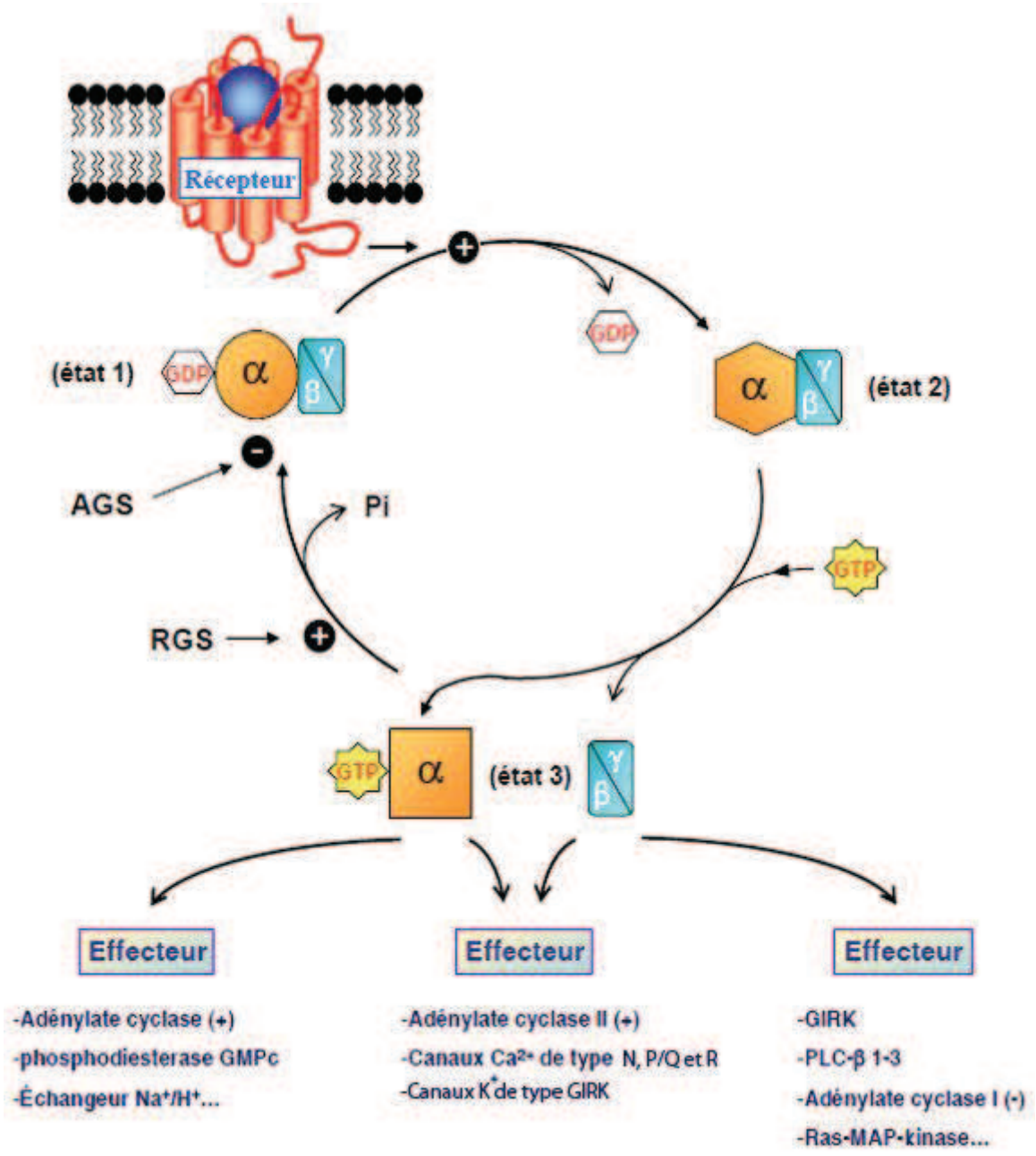


Figure 6: Cycle d'activation des protéines G. Dans son état actif, un RCPG peut activer une protéine G en la faisant passer d'un état trimèrique lié au GDP (état 1) à un état vide de nucléotide de haute affinité pour le récepteur. Selon le modèle classique, la liaison du GTP présent à haute concentration dans la cellule, entraîne d'une part la dissociation du complexe récepteur - protéine G (état 2) et d'autre part la dissociation de la protéine G en ses deux sous-unités Gα et Gβγ (état 3).

3.3.2) Transduction du signal

La liaison d'un ligand sur son récepteur et l'activation successive de la protéine G représentent les deux premières étapes indispensables à la transmission d'un signal à l'intérieur de la cellule. La protéine Gα activée peut interagir avec différentes classes d'effecteurs dont l'AC et la PLC (Figure 6) (Cabrera-Vera et al, 2003)). L'AMPc, considéré comme second messager, est produit à partir d'ATP par l'AC membranaire. La régulation de la concentration intracellulaire en AMPc est contrôlée par l'équilibre entre sa synthèse à partir d'ATP et sa dégradation rapide en 5'-AMP par une phosphodiestérase (PDE) (Simonds, 1999). Certains récepteurs peuvent contrôler la production d'AMPc en agissant via l'activation de protéines G spécifiques, capables de stimuler (Gs) ou inhiber (Gi) sa production.

D'autres protéines G sont associées à des voies de signalisation distinctes de celles déclenchées par les protéines $G\alpha_s$ ou $G\alpha_i$. C'est le cas par exemple des protéines $G\alpha_q$ activant la PLCβ. Cette enzyme membranaire, une fois activée par la sous-unité $G\alpha_q$, clive le phosphatidyl-inositol-4,5-diphosphate (PIP) en inositol-triphosphate (IP3) et en diacylglycérol (DAG). Ces deux seconds messagers agissent à leur tour comme des effecteurs : l'IP3 en se liant sur des canaux calciques du réticulum endoplasmique (RE) permet d'augmenter la concentration cytoplasmique en calcium et le DAG en agissant sur la PKC favorise, entre autres, l'ouverture de canaux calciques membranaires.

Gβγ peut également moduler l'activité d'effecteurs au moins aussi nombreux que ceux contrôlés par les Gα. On retrouve des canaux potassiques à rectification entrante ("GIRK: G protein-coupled inwardly rectifying K+"), des canaux calciques voltages dépendants, des enzymes (phospholipases A2 et C…) (Katz et al, 1992) (Kim D et al, 1989), l'AC (Federman et al, 1992) ainsi qu'un nombre important de kinases (MAP kinases, tyrosines kinases…).

3.3.3) Désensibilisation des RCPG

Pour éviter les effets néfastes d'une trop longue activation d'un récepteur, il existe des mécanismes de rétrocontrôle qui vont limiter son activité. Pour cela il faut un découplage

entre le récepteur et la protéine G, ce qui est fait par l'intermédiaire de phosphorylations sur des résidus sérine et thréonine dans le domaine C-terminal du récepteur (Bouvier et al, 1988) (Hausdorff et al, 1989) (Lohse et al, 1990). Il existe trois classes de protéines kinases capables de réaliser cette phosphorylation : les PKA et PKC, qui phosphorylent le récepteur indépendamment de son activité et les GRK (G protein Receptor Kinase) qui sont plus spécifiques des RCPG et phosphorylent les récepteurs uniquement dans la conformation active (Ferguson et al, 1996) (Lohse et al, 1989). Cette phosphorylation entraine le recrutement de la β-arrestine qui est suspectée de prendre la place de la protéine G, entrainant ainsi l'arrêt de la signalisation par ce récepteur. La β-arrestine deviendra ensuite un élément clé de l'endocytose du récepteur car elle est indispensable à la formation du puits recouvert de clathrines. Son implication pourrait aussi passer par une association avec les protéines adaptatrices AP-2. Le récepteur peut ensuite soit être dirigé vers les endosomes de recyclage, soit être dirigé vers le compartiment lysosomial (Dery et al, 1999) (Zhang et al, 1996). Dans les endosomes de recyclage, le pH acide peut entrainer une séparation du complexe ligand-récepteur et donc un retour à la conformation de repos. Ensuite, après que le récepteur ait été déphosphorylé par des phosphatases, il peut être renvoyé à la membrane plasmique, on parle alors de resensibilisation (Oakley et al, 2000). Ce mécanisme permet d'éviter une désensibilisation trop longue de la cellule aux stimuli associés à ces récepteurs. A l'inverse, certains récepteurs qui sont principalement dégradés dans le compartiment lysosomial ont une signalisation plus transitoire.

Chapitre IV : Les interactions entre Canaux calciques et RCPG

Nous avons vu l'importance capitale des canaux calciques dépendants du voltage dans de très nombreux mécanismes cellulaires et homéostatiques, il est donc aisé de comprendre l'importance d'une régulation fine de ceux-ci. Les RCPG étant des senseurs d'un grand nombre de signaux extracellulaires, qu'ils soient physiques, chimiques ou hormonaux, il est logique qu'ils doivent jouer un rôle prépondérant dans la régulation des canaux calciques. Une partie de ce contrôle est exercé par les sous-unités βγ de la protéine G mais il peut aussi y avoir des interactions directes entre le canal et le récepteur ce qui entraine une co-régulation de leurs traffickings.

4.1) Régulation par les sous-unités βγ des protéines G

Depuis la découverte en 1981 de la réduction de la durée des PA et l'amplitude des courants calciques dans les neurones sensoriels de poulet par la noradrénaline (Dunlap & Fischbach, 1981), il est apparu que le contrôle des canaux calciques est un mécanisme répandu et important, entre autres, pour la régulation de la libération de neurotransmetteurs et d'hormones (Bean, 1989). Le mécanisme d'inhibition par les RCPG le plus étudié est l'inhibition dépendante du voltage par les sous-unités βγ de la protéine G.

L'inhibition directe dépendante du voltage cible principalement les canaux $Ca_V2.1$ et $Ca_V2.2$ bien que $Ca_V2.3$ soit lui aussi sensible à ces mécanismes. Il y a plusieurs mécanismes qui sont responsables de l'appellation « inhibition voltage dépendante » en effet, cette inhibition joue sur les caractéristiques des courants calciques enregistrés ; ils sont diminués en amplitude et leur cinétique d'activation est réduite. Les canaux inhibés sont dans un état appelé « réticent » alors que les canaux non inhibés sont appelés « consentants ». Ces termes traduisent le fait que les canaux inhibés par les protéines G ont leur sensibilité au potentiel perturbée. Ainsi il faut plus de dépolarisation pour entrainer l'ouverture des canaux réticents. Traduit en relation stimulus/réponse, la relation est déplacée vers des stimuli plus importants. La conséquence est que, plus la cellule est dépolarisée, moins les effets de cette inhibition par les protéines G sont importants. Par ailleurs, l'inhibition peut être levée par l'application d'un prépulse hyperpolarisant très important (classiquement à + 100 mV) entrainant une « facilitation » dite « proteine G dependante ». Ce type de stimulation peut être rencontré physiologiquement dans les neurones lors de trains de PA à haute fréquence et ce phénomène

pourrait même être impliqué dans la plasticité synaptique à court terme de certaines synapses. L'hypothèse du décrochage des sous-unités Gβγ lors du prépulse est soutenue par le fait qu'en présence de quantités croissantes de ces sous-unités on n'obtient pas une meilleure inhibition du canal mais un retour à l'état inhibé plus rapide après celui-ci. Ce concept a largement été proposé par le travail précurseur de Bruce Bean (Bean, 1989). L'utilisation des canaux recombinants a démontré que le dimère Gβγ est l'acteur principal de cet effet (Bourinet et al, 1996; De Waard et al, 1997; Herlitze et al, 1997; Zamponi et al, 1997)

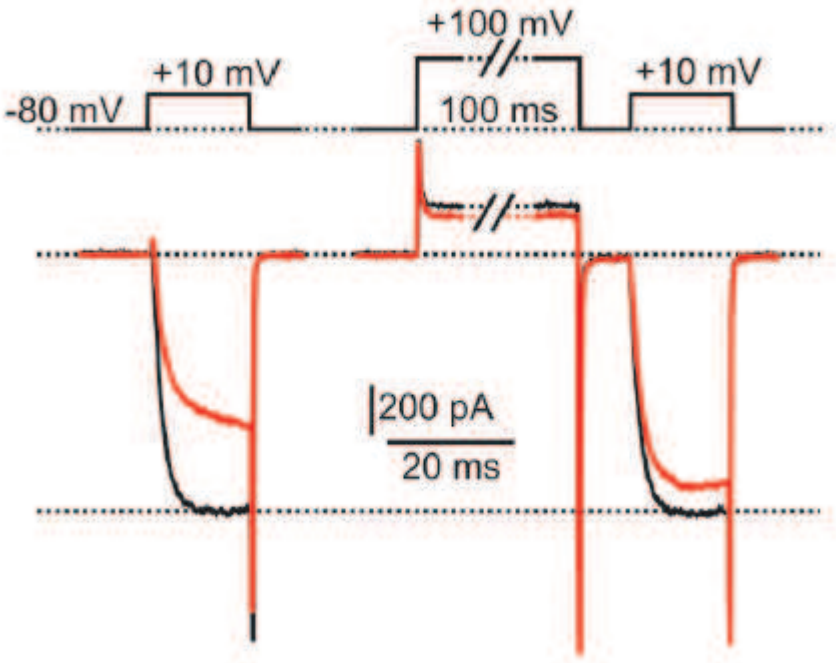


Figure 7 : Courants calciques enregistrés en électrophysiologie sur une cellule chromaffine en présence ou en absence d'ATP dans le milieu extracellulaire. Ces cellules possédant des récepteurs P2Y à l'ATP, la présence de celui-ci dans le milieu active les récepteurs et permet l'inhibition par $G_{\beta\gamma}$ des canaux calciques (tracé rouge).

La différence de cinétique entre les canaux réticents et consentants s'explique par la nécessité pour les canaux réticents de décrocher le dimère Gβγ et de changer de conformation avant de pouvoir générer le courant calcique. Inversement si les RCPG sont stimulés pendant que le canal est ouvert, on observe seulement une faible inhibition car le changement de conformation nécessaire à l'ouverture du canal doit perturber la liaison de la sous-unité Gβγ. Certaines études suggèrent que la liaison de Gβγ sur le canal entrave les mouvements du domaine senseur du potentiel, entrainant ainsi le décalage de l'ouverture du canal vers des potentiels plus élevés.

Il a été montré (De Waard et al, 2005) qu'une seule sous-unité Gβγ se lie au canal alors que trois sous-domaines de celui-ci sont impliqués : Les domaines Carboxy et amino terminaux ainsi que la boucle qui fait le lien entre les domaines I et II du canal. A partir de ces constatations, il a été conclu que ces trois domaines concouraient à créer une poche de liaison pour le dimère Gβγ. De plus ces domaines contiennent des séquences de liaison à d'autres protéines-signal comme la calmoduline, la CaMKII ou la PKC. La PKC a d'ailleurs la particularité de pouvoir phosphoryler la thr^{422} de la boucle I-II, provoquant ainsi l'impossibilité pour les dimères comportant la sous-unité $G\beta_1$ de se lier mais pas pour les autres Gβγ (Cooper et al, 2000).

Il a été montré que deux sites sont responsables de la liaison de Gβγ sur la boucle I-II du canal, le premier site est un motif QXXER qui est une séquence consensus de liaison du dimère Gβγ sur ses effecteurs, pour la famille Ca_V2 il s'agit de QQIER. Ce site masque partiellement le domaine AID de liaison de la sous-unité β du canal, diminuant ainsi l'affinité de celui-ci pour sa sous-unité. Le deuxième site se situe après la séquence AID et est appelé GID (G protein Interaction Domain).

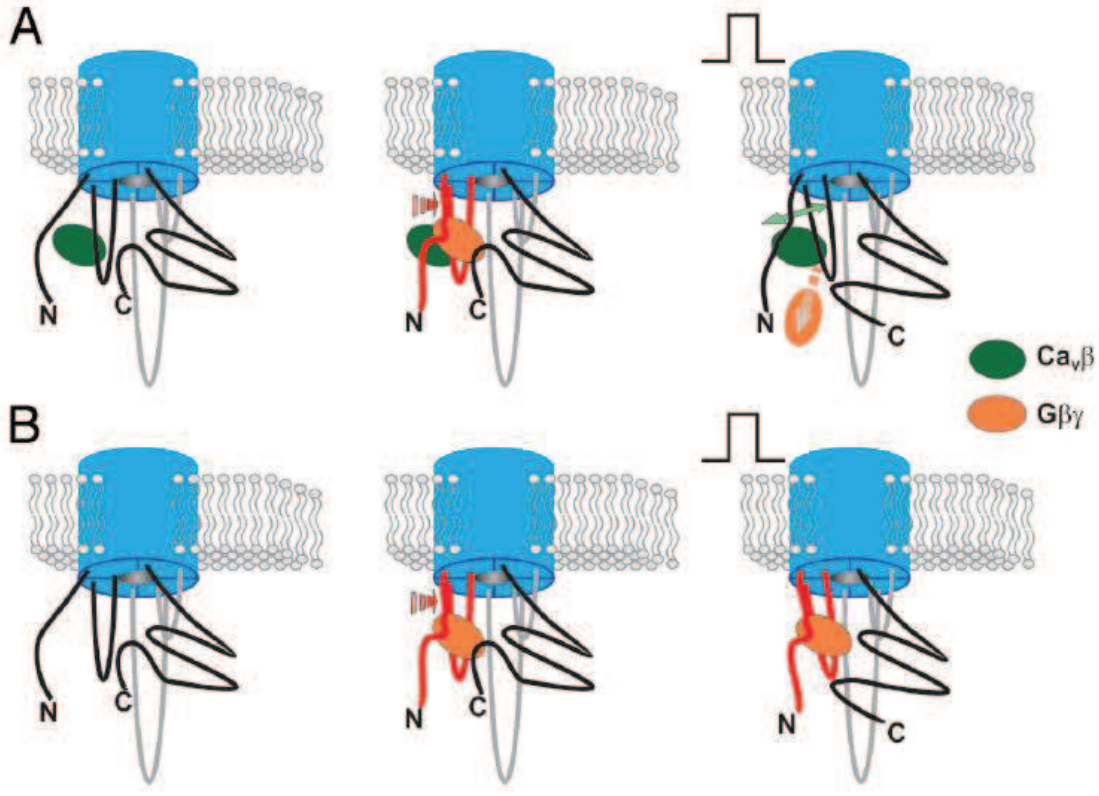


Figure 8 : Représentation schématique d'un canal Ca_V2 (en bleu) et de ses interactions avec les dimères Gβγ en présence de sa sous-unité β (A) ou sans (B). La protéine Gβγ interagit avec la boucle I-II du canal et ses extrémités N et C terminales. En cas de forte dépolarisation de la membrane le dimère Gβγ se décroche et l'inhibition qu'il provoquait disparait.

Les groupes de Dolphin et de Yang ont récemment montré que les sous-unités $Ca_V\beta$ jouaient un rôle primordial dans la dépendance au voltage de l'inhibition par les dimères $G\beta\gamma$ des canaux $Ca_V2.2$ et $Ca_V2.1$ (Zhang et al, 2008) (Dresviannikov et al, 2009). Cette perte de la dépendance au voltage est due à un changement de conformation du canal en présence de $Ca_V\beta$ qui est nécessaire pour coupler le domaine senseur du voltage avec la poche de liaison de $G\beta\gamma$. En effet en présence de $Ca_V\beta$, le domaine AID passe d'une conformation en hélice aléatoire à une conformation en hélice α plus rigide.

4.2) Interactions directes entre les RCPG et les canaux calciques.

En plus de réguler les canaux calciques par la voie des sous unités $G\beta\gamma$, les récepteurs couplés aux protéines G peuvent aussi interagir directement avec eux, renforçant ainsi leur régulation et permettant aussi de passer par d'autres mécanismes.

4.2.1) Interaction entre $Ca_V2.1$ et mGluR1

Il a été montré que le glutamate pouvait augmenter la concentration en calcium des neurones à travers son action sur les récepteurs ionotropiques AMPA et NMDA mais aussi par l'activation des récepteurs métabotropiques mGluR qui peuvent jouer sur le taux de calcium par les seconds messages (IP3 et DAG) de même qu'en régulant les canaux calciques voltage dépendants.

Kitano et ses collaborateurs ont montré qu'il pouvait y avoir une interaction directe entre les récepteurs mGluR1 et les canaux $Ca_V2.1$. Dans leur étude (Kitano et al, 2003) ont d'abord montré en microscopie que mGluR1 et $Ca_V2.1$ colocalisaient dans les neurones de Purkinje, puis ils ont conduits des co-immunoprécipitations avec les protéines entières ou en exprimant les domaines suspectés d'être responsables de l'interaction entre ces deux protéines. Ils ont ainsi découvert qu'il était possible de co-immunoprécipiter le canal et le récepteur et que cette co-immunoprécipitation était toujours possible en ne conservant qu'une partie des domaines carboxy-terminaux des deux protéines (acides aminés 841 – 932, proche du segment transmembranaires pour mGluR1). La transfection de mGlur1 dans des cellules HEK293 exprimant de manière stable $Ca_V2.1$ et ses sous-unités $\alpha_2\delta$ et β induit une baisse des courant calciques provoqués à l'aide d'une dépolarisation par le KCl et ce même en l'absence d'agoniste ou en présence d'antagonistes de mGlur1. En dehors de l'inhibition tonique du canal $Ca_V2.1$ par mGlur1, une activation de celui-ci avant que la membrane soit dépolarisée

entraine une augmentation de l'inhibition. Inversement si mGlur1 est activé au même moment que la stimulation de $Ca_V2.1$, on note un courant calcique plus grand que lorsque le récepteur au glutamate n'est pas activé.

4.2.2) Interaction entre $Ca_V1.2$ et le récepteur β_2 adrénergique

La voie de signalisation β-adrénergique augmente l'activité des canaux de type L dans le cœur et le cerveau par l'intermédiaire de la PKA et de l'adénylate cyclase. Pour que la signalisation par la PKA soit optimale, il faut qu'elle soit maintenue à proximité du canal et le recrutement des PKA auprès des canaux calciques voltage dépendants se fait grâce à leur site d'interaction avec la protéine d'échafaudage AKAP (A Kinase Anchoring Protein). L'hypothèse que cette protéine pouvait former un complexe plus large comportant d'autres effecteurs en amont de cette voie de signalisation comme des RCPG a ensuite été émise puis testée (Davare et al, 2001). Le groupe de Davare a regardé par immunohistochimie la localisation du canal $Ca_V1.2$ et du récepteur β_2 adrénergique dans des neurones de l'aire CA1 de l'hippocampe et ils ont observé une colocalisation régulière de ces deux protéines dans la partie dendritique. Ils ont aussi réalisé une série d'immunoprécipitations à partir de lysat de cerveau de rat en précipitant à l'aide d'anticorps anti $Ca_V1.2$ et en révélant avec un anti récepteur β_2 adrénergique ou en réalisant l'expérience inverse ; à chaque fois on note une co-immunoprécipitation des deux protéines.

Ces expérimentations ont permis de démontrer que le canal $Ca_V1.2$ et le récepteur β_2 adrénergiques se trouvent bien au sein du même complexe protéique, ce qui atteste d'une association fonctionnelle entre le canal calcique et un récepteur le régulant à la post-synapse.

4.2.3) Interaction entre $Ca_V2.2$ et ORL1

La régulation des canaux de type N par le récepteur à la nociceptine (ORL1, alias NOP pour Nociceptine Opioid Receptor qui représente le quatrième membre le plus divergeant des récepteurs opiacés en compagnie des récepteurs mu delta et kapa opioïdes) est un processus important dans les voies de contrôle de la douleur. Le groupe du Pr Zamponi a montré que le récepteur et le canal sont en interaction directe (Beedle et al, 2004). Pour ce faire ils ont d'abord étudié les effets de la présence de ORL1 sur les courants calciques par électrophysiologie. Il s'est avéré que les courants de type N étaient inhibés par le récepteur de

manière dépendante du voltage et ce de manière proportionnelle au taux d'expression du récepteur, le tout en absence de l'agoniste du récepteur. Ils ont ensuite réalisé une série de co-immunoprécipitations qui a permis de démontrer que $Ca_V2.2$ interagit avec le récepteur ORL1 par leurs domaines carboxy terminaux respectifs. Cette interaction s'est révélée être indépendante de la liaison ou non de la nociceptine sur son récepteur ; bien que la liaison conduise à une augmentation de l'inhibition du canal, celle-ci est dépendante du voltage, ce qui amène à penser qu'il s'agit d'une inhibition par les sous-unités Gβγ du récepteur ORL1.
L'hypothèse que cette interaction entre le canal et le récepteur ORL1 pouvait jouer sur leur trafficking a ensuite été émise et testée, tout d'abord par immunohistochimie (Altier et al, 2006). Pour ce faire un canal $Ca_V2.2$ étiqueté avec la GFP et un récepteur ORL1 avec une étiquette 6 his/Xpress ont été utilisés. Cela a permis de voir qu'en absence de stimulation, la fluorescence associée à ces deux protéines se trouvait bien localisée à la membrane cellulaire, cependant une stimulation longue du récepteur par la nociceptine entraine une internalisation tant du récepteur ORL1 que du canal $Ca_V2.2$. En rajoutant un marqueur des lysosomes, il est ainsi apparu que l'internalisation du complexe canal – récepteur se faisait au sein de ceux-ci. Pour vérifier que le domaine carboxy terminal de $Ca_V2.2$ était bien nécessaire et suffisant pour se lier au récepteur. L'équipe a réalisé une construction comprenant le C-terminus de $Ca_V2.2$ couplé à la YFP. Exprimée seule, cette construction reste principalement cytoplasmique mais dès lors que ORL1 est coexprimé, on la retrouve colocalisée avec le récepteur à la membrane et l'application longue de nociceptine induit le même phénomène d'internalisation dans les lysosomes. Par électrophysiologie et imagerie calcique, il a été vérifié que dans les populations neuronales des ganglions rachidiens dorsaux exprimant ORL1, on observait une forte diminution de la densité de courant de type N après 30 minutes de stimulation à la nociceptine. Il s'agit donc d'un mécanisme permettant de diminuer sur un plus long terme l'activité d'une synapse par la dégradation des canaux calciques responsables de son activité. Le dernier développement de ces effets concerne l'association entre récepteurs ORL1 et Mu opioïde (MOP) d'une part, et l'association de ce dimère de RCPG aux canaux $Ca_V2.2$ d'autre part (Evans et al, 2010). La conséquence fonctionnelle est que la stimulation du récepteur MOP par son agoniste entraine l'internalisation du canal $Ca_V2.2$ via l'interaction tripartite MOP-ORL1-CaV2.2.

Ces résultats du laboratoire, confrontés à la littérature, sont intéressants dans le contexte de l'analgésie morphinique. En effet, il a été montré que le KO du récepteur ORL1 est résistant au développement de la tolérance à la morphine vis-à-vis de l'analgésie tout comme des animaux traités au niveau spinal (injection intrathécale) avec un antagoniste

ORL1 (Ueda et al, 2000). Inversement il a été montré que des animaux rendus tolérants à la morphine ont une augmentation d'expression du récepteur ORL1 à la synapse entre le neurone afférent primaire et la corne dorsale de la moelle épinière (Ray et al, 2005). Enfin, dans un modèle de neuropathie traumatique connue pour sa résistance à la morphine, une augmentation d'expression d'ORL1 au niveau spinal a été identifiée (Briscini et al, 2002). Ainsi l'hypothèse que nous formulons dans ce travail de thèse est que l'interaction MOR-ORL1-$Ca_V2.2$ limite les effets antalgiques de la morphine. Ainsi la perturbation de la formation du complexe ORL1-CaV2.2 devrait entrainer une meilleure efficacité de la morphine et/ou une tolérance diminuée.

L'exemple de l'interaction ORL1-CaV2.2 n'est pas unique pour ces canaux. Des interactions directes avec les récepteurs dopaminergiques D1 et D2 ont été décrites laissant penser que ce type d'interaction doit être une voie de régulation plus large que l'on ne pense (Kisilevsky et al, 2008; Kisilevsky & Zamponi, 2008).

Chapitre V : Techniques de Transfert de Fluorescence

L'étude de la dynamique d'interactions entre protéines a été grandement aidée par l'utilisation de techniques de transfert d'énergie, notamment le transfert de fluorescence de type Förster. L'utilisation de molécules ayant des propriétés de fluorescence particulières, notamment des protéines telles que la GFP, a permis de suivre l'évolution de l'emplacement de protéines auxquelles elles sont fusionnées et de leurs interactions si elles sont impliquées dans un transfert d'énergie.

5.1) Luminescence et fluorophores

La luminescence peut être définie par l'émission de photons due au retour d'un électron d'un état excité vers un état de moindre énergie au sein de la même molécule. On peut distinguer la photoluminescence (fluorescence, phosphorescence) qui est un phénomène radiatif consécutif à une excitation lumineuse et la chimioluminescence dont la production de lumière est consécutive à une réaction chimique ou enzymatique (bioluminescence).
Une molécule capable d'émettre un signal de fluorescence est qualifiée de fluorophore et peut être définie par plusieurs caractéristiques photophysiques :

- Les spectres d'excitation et d'émission. Ils représentent respectivement quelles longueurs d'onde peuvent exciter les électrons et quelles seront les longueurs d'ondes des photons émis par la molécule. La différence de longueur d'onde entre le pic d'absorption et d'émission s'appelle le déplacement de Stokes.
- Le coefficient d'extinction molaire ε qui correspond à la capacité du fluorophore à absorber l'énergie apportée par les photons à une longueur d'onde donnée.
- Le rendement quantique Φ qui est la capacité du fluorophore à réémettre sous forme de lumière l'énergie absorbée. Il est calculé en faisant le rapport entre le nombre de photon absorbés et le nombre de photons émis.
- La durée de vie de la fluorescence τ qui est la durée moyenne durant laquelle le fluorophore reste dans l'état excité. Pour un fluorophore classique cette durée est de l'ordre de la nanoseconde mais nous verrons que dans certains cas elle peut être bien plus longue.

5.2) Le transfert d'énergie type Förster (FRET)

Le FRET a été observé par Perrin au début du XXème siècle puis décris par Förster en 1946 mais il a fallu attendre la fin du XX^{éme} siècle pour que soit généralisée son utilisation en tant que méthode de détection en biologie (Selvin, 2000). Le FRET est décrit dans la théorie de Förster comme étant un transfert d'énergie non radiatif entre dipôles. Ce phénomène nécessite une compatibilité énergétique, ce qui veut dire que le spectre d'émission d'une des molécules doit recouvrir au moins en partie le spectre d'absorption de l'autre (figure 9 A).

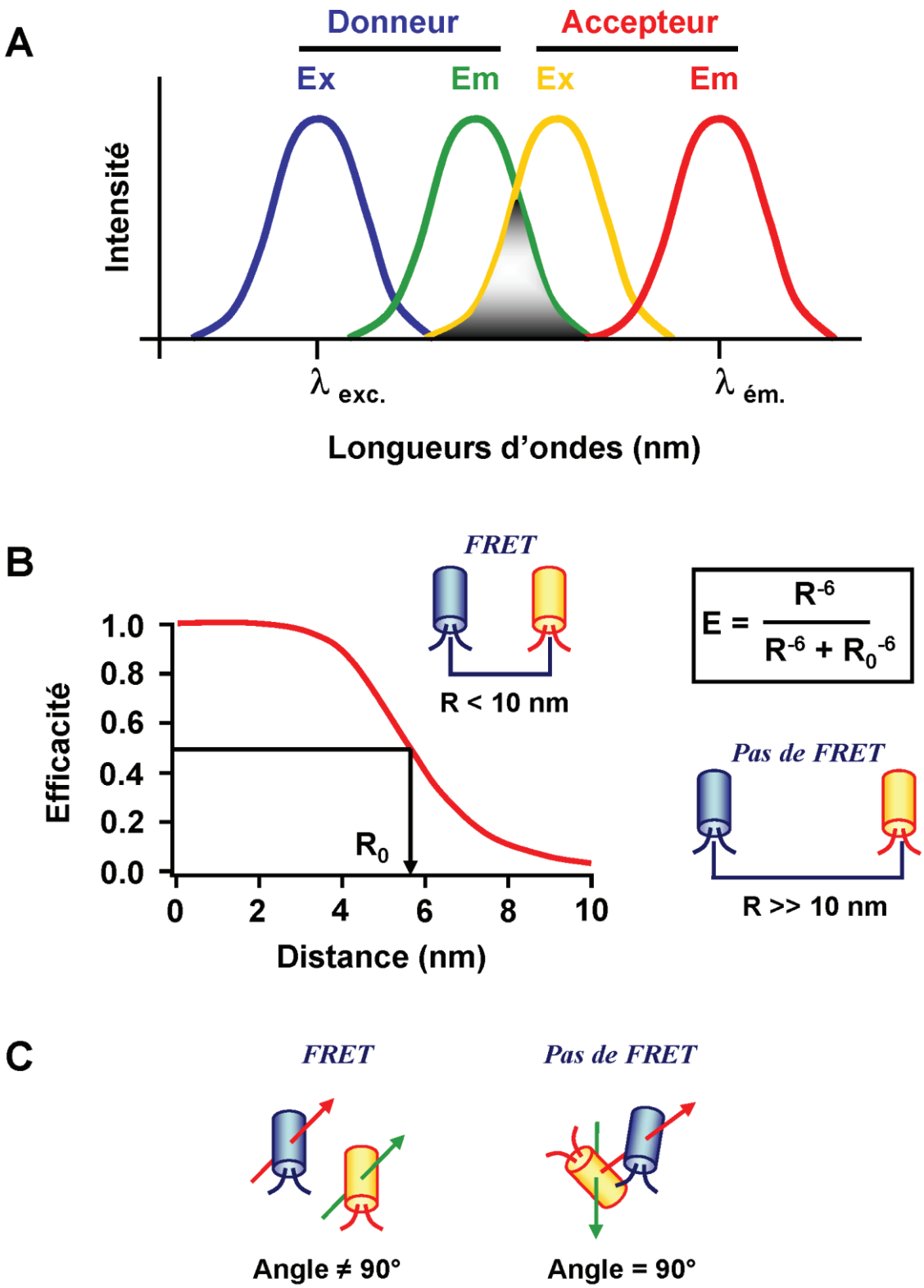


Figure 9, les conditions nécessaires pour le FRET : A : Le FRET n'est possible que si le spectre d'émission du donneur recouvre au moins en partie le spectre d'absorption de l'accepteur. B : le FRET n'est observable que si la distance entre les fluorophores est inférieure à 1,8 x le rayon de Förster R_0 qui est la distance à laquelle l'efficacité de transfert est de 50%. C : l'orientation des dipôles est elle aussi cruciale pour que l'interaction soit possible.

L'efficacité de transfert en fonction du recouvrement des spectres peut être calculée en calculant l'intégrale de recouvrement J :

$$J = \frac{\int F_D(\lambda)\varepsilon_A(\lambda)\lambda^4 d\lambda}{\int F_D(\lambda)d(\lambda)}$$

où $F_D(\lambda)$ est l'intensité de la fluorescence émise par le donneur à une longueur d'onde donnée et $\varepsilon_A(\lambda)$ le coefficient d'extinction molaire de l'accepteur. Le facteur J reflète donc la capacité d'une paire de fluorophores à émettre et absorber de l'énergie à la même longueur d'onde.

De plus pour que le FRET soit effectif, il faut que les fluorophores soient suffisamment proches ; en effet s'ils sont éloignés de plus de 1,8 fois le rayon de Förster R_0, le FRET sera imperceptible (figure 9 B). L'efficacité réelle du FRET peut être calculée grâce à la formule suivante :

$$E = \frac{R^{-6}}{R^{-6} + R_0^{-6}}$$

où R est la distance effective qui sépare les deux molécules et R_0 le rayon de Förster pour ce couple. Celui-ci peut varier en fonction des molécules employées mais il est généralement compris entre 1 et 10 nm. Sa valeur peut être calculée grâce à la formule suivante :

$$R_0 = \left(J \times 10^{-3} \times k^2 \times n^{-4} \times Q_D\right)^{1/6} \times 9730$$

où J est l'intégrale de recouvrement, n l'indice de réfraction du milieu (n^{-4} est généralement compris entre 1/3 et 1/5), Q_D le rendement quantique du donneur en absence d'accepteur et k^2 le facteur d'orientation qui est fonction de l'orientation relative des dipôles du donneur et de l'accepteur (Figure 9 C). Même si la valeur de k^2 est théoriquement comprise entre 0 et 4, 2/3 est la valeur habituellement utilisée pour déterminer le R_0. En effet, k^2 est assimilé à 2/3 lorsque le donneur et l'accepteur présentent un degré de liberté suffisant pour être aléatoirement orientés dans l'espace (Stryer, 1978). Cette condition est généralement satisfaite

pour les fluorophores attachés à des biomolécules car ils peuvent avoir une certaine liberté de rotation (Dale et al, 1979).

La durée de vie de la fluorescence du fluorophore donneur va être impactée par la présence ou non d'une association de FRET avec une autre molécule ; en effet vient s'ajouter aux constantes de désactivation radiative k_r et non radiative k_{nr}, la constante de transfert d'énergie k_t. La durée de vie lors d'une implication dans un FRET τ_{DA} peut donc être calculée ainsi :

$$\tau_{DA} = \frac{1}{k_r + k_{nr} + k_t}$$

5.3) Les différentes techniques utilisant le FRET

5.3.1) Les techniques de FRET classiques

Pour mesurer le FRET, on peut soit utiliser la microscopie soit des fluorimètres qui sont bien souvent des lecteurs de microplaques. Les lecteurs de microplaques mesurent la quantité de fluorescence à différentes longueurs d'onde, provenant de cultures cellulaires disposées au fond de puits dont la taille varie selon le type de microplaque utilisé. Cette méthode produit des résultats chiffrés permettant une analyse statistique du phénomène étudié. La microscopie quant à elle permet de voir la localisation du FRET au niveau subcellulaire. Quel que soit le type de détection choisit, la mesure d'un FRET entre deux fluorophores peut se faire de différentes manières.

La première consiste à quantifier les variations de l'intensité de fluorescence en mesurant la diminution de la fluorescence du donneur (Sokol et al, 1998), l'augmentation de celle de l'accepteur (Chan et al, 1979) ou en calculant un rapport que nous appellerons ratio (fluorescence d'émission de l'accepteur/fluorescence d'émission du donneur) (Miyawaki et al, 1997). Cette analyse est réalisable aussi bien en microplaque qu'en microscopie. La principale difficulté d'analyse de ces signaux vient du recouvrement pouvant exister entre les

spectres d'excitation et d'émission des fluorophores utilisés. Ce manque de sélectivité spectrale est à l'origine d'un important bruit de fond avec comme conséquence une réduction de la sensibilité du test. Des couples de fluorophores tels que la fluorescéine/rhodamine ou les protéines CFP/YFP présentent ce type de limitation (Zheng J et al, 2002). Cependant, le rapport signal sur bruit du FRET peut être amélioré en s'affranchissant d'une partie des signaux parasites grâce à une lecture en temps résolu. Ceci est possible en TR-FRET (Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer) grâce à l'utilisation de fluorophores à durée de vie longue tels que les chélates ou cryptates de terre rare (voire partie 5.3.3).

D'autres méthodes permettent de déterminer indirectement l'existence d'un FRET par photoblanchiment (pbFRET). Le photoblanchiment est une méthode qui consiste à éteindre un fluorophore par une exposition prolongée à une source lumineuse. La mise en œuvre de cette approche est préférable en microscopie confocale car il est ainsi possible d'obtenir une bonne résolution spatiale pour éteindre directement les fluorophores dans leur environnement cellulaire. Dans le cas du FRET par photoblanchiment (pbFRET), le photoblanchiment du fluorophore donneur entraîne une diminution de son intensité de fluorescence qui est mesurée en présence ou non d'accepteur. Lorsque l'accepteur est en étroite proximité avec le donneur, un FRET apparaît et entre en compétition avec le processus de photoblanchiment. Cette compétition se traduit par une augmentation de la résistance du donneur au photoblanchiment dont les constantes de temps mesurées (en présence ou non d'accepteur) permettent de mettre en évidence un transfert d'énergie (Rocheville et al, 2000). Une autre alternative au pbFRET du donneur est le pbFRET de l'accepteur. Les émissions de fluorescence du donneur et de l'accepteur sont mesurées avant et après photoblanchiment de l'accepteur. L'augmentation de la fluorescence du donneur après destruction de l'accepteur prouve l'existence d'un FRET entre les deux molécules (Gregan et al, 2004) (He et al, 2003). Un des désavantages du pbFRET est qu'une mesure répétée du même échantillon n'est pas envisageable en raison de la destruction des fluorophores par l'excitation continue.

L'utilisation de la durée de vie de fluorescence du donneur est aussi une approche adaptée à la mesure des évènements de FRET. Cette méthode consiste à mesurer le déclin de fluorescence du donneur au cours du temps. Cela peut être réalisé aussi bien sur des populations de cellules au format microplaque que par des techniques microscopiques. La base physique de cette approche repose sur le fait que la durée de vie d'une molécule fluorescente dépend notamment de l'efficacité du processus de FRET. Par conséquent, plus le

transfert d'énergie entre les deux molécules est efficace plus le déclin de fluorescence du donneur est rapide. Le FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) est un exemple de technologie basée sur l'analyse de durée de vie (Bastiaens & Squire, 1999). Il est préférable avec ce type d'approche d'utiliser des molécules fluorescentes dont le déclin de fluorescence est monoexponentiel. La CFP par exemple est utilisée en FLIM en dépit de certains désavantages dus à son faible rendement quantique, son faible coefficient d'extinction molaire et surtout à son déclin de fluorescence qui présente deux exponentielles (Tramier et al, 2002). Ainsi, afin de faciliter l'analyse des durées de vie en FLIM des mutations de cette protéine ont permis de générer un variant nommé Cerulean plus lumineux que la CFP et présentant une décroissance monoexponentielle (Rizzo et al, 2004).

5.3.2) Utilisation de la GFP et de ses dérivés en FRET

Une innovation clé dans le domaine des fluorophores fût la découverte de la GFP, une protéine pouvant être directement encodée dans les cellules vivantes et fusionnée avec d'autres protéines de celles-ci. De plus une fois cette découverte réalisée, des variants de la GFP ont été réalisés, permettant ainsi d'obtenir un large spectre de protéines fluorescentes.

Initialement identifié chez la méduse Aequorea Victoria, le gène codant pour la GFP a été cloné en 1992 (Prasher et al, 1992). Décrite pour la première fois en 1974, il faudra attendre 1996 pour obtenir la structure tridimensionnelle de la GFP par diffraction de rayons X (Ormo et al, 1996). Cette protéine de 27 kDa se présente sous forme d'un cylindre de 30 Å de diamètre et 40 Å de hauteur composé de onze feuillets β (9 à 13 résidus par feuillet) qui entourent une hélice α contenant le chromophore (Figure 10). Le chromophore résulte d'une réaction spontanée de cyclisation des chaînes latérales de trois acides aminés (Sérine 65– Tyrosine 66 – Glycine 67) à l'intérieur du tonneau. L'organisation des feuillets β, en formant une véritable cage, confère au chromophore son propre environnement (Ward, 2006).

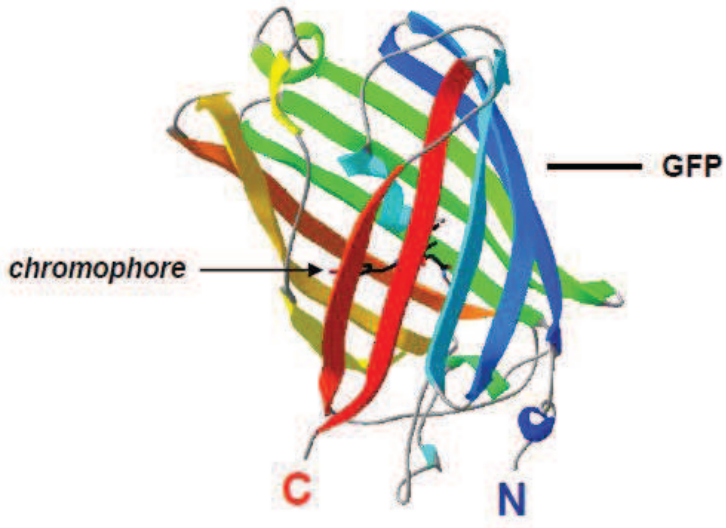


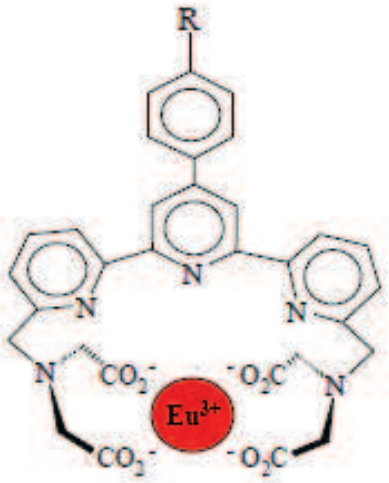
Figure 10: Structure de la GFP

La photoactivation de cette protéine connait un pic d'absorption à 395 nm et d'émission à 508 nm. A partir de cette protéine, un grand nombre de variants ont été obtenus notamment en changeant les acides aminés composant le fluorophore ; ainsi tout un spectre de protéines bien caractérisées a vu le jour (CFP, YFP, BFP, DsRed…). La forte intensité de fluorescence de ces protéines et le fait qu'elles puissent être génétiquement fusionnées à un gène d'intérêt, ont permis d'étudier la localisation cellulaire d'un grand nombre de protéines et leurs interactions à l'aide de FRET in situ et observable en microscopie.

5.3.3) Le FRET en Temps Résolu (TR-FRET)

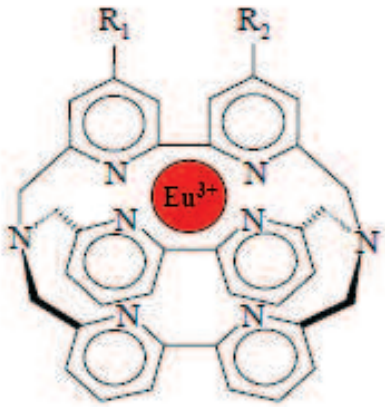
Le FRET classique connait des limitations dues à son important bruit de fond et au manque de sélectivité spectrale des fluorophores classiques. Cependant l'apparition de nouvelles molécules fluorescentes permet de réduire fortement ces problèmes. En effet des fluorophores utilisant des cryptates ou chélates d'un lanthanide faisant partie du groupe des terres rares (Europium, Terbium…) a permis la mise au point de tests plus sensibles.

Les chélates de terre rare



Terre rare en interaction avec le chélatant

Les cryptates de terre rare



Terre rare incluse dans une structure tridimensionnelle (cryptand)

La principale caractéristique de la fluorescence de lanthanides est leur désactivation lente, de l'ordre de la milliseconde, alors que la plupart des fluorophores biologiques, de même que les signaux parasites comme l'autofluorescence, ont une durée de vie de fluorescence de l'ordre de la nanoseconde. Utilisant cette longue durée de fluorescence, les tests de TR-FRET mesurent la fluorescence de l'accepteur en introduisant un délai entre l'excitation de l'échantillon et la mesure de la fluorescence de l'accepteur, ce qui permet l'extinction des fluorescences parasites (figure 10). Le cryptate, en plus de maintenir l'ion lanthanide en place, possède des groupements réactifs qui permettront son couplage à d'autres molécules (anticorps, marqueurs…) et surtout il peut collecter l'énergie excitatrice (effet d'antenne) et la transférer au cation lanthanide qui est difficilement excitable directement. Le transfert d'énergie intramoléculaire durant ce processus est responsable du grand déplacement de Stokes (de l'ordre de 200 -250 nm) qui permet de s'affranchir des interférences dues à la source d'excitation. Ainsi les cryptates et chélates absorbent principalement dans l'UV et le bleu alors que les terres rares émettent dans le vert – rouge. Dans les milieux biologiques, les cryptates sont plus employés que les chélates car la compétition du cation lanthanide avec d'autres ions divalent présents (Ca^{2+}, Mg^{2+}…) rend la molécule instable alors que l'inclusion dans une structure tridimensionnelle des cryptates permet de s'affranchir de ce problème.

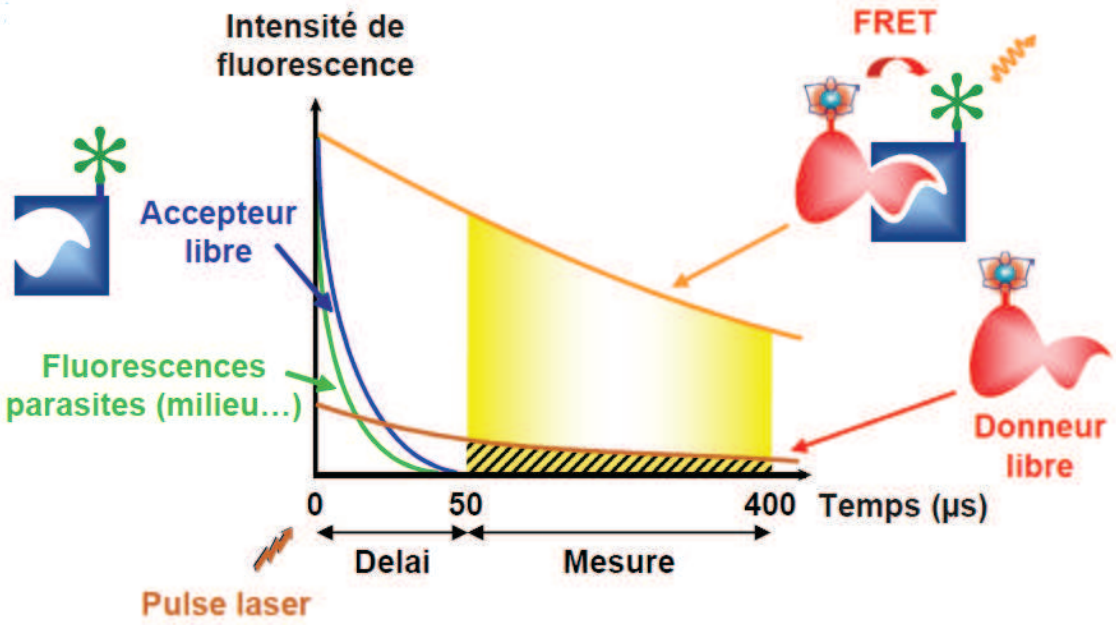


Figure 11 : La lecture du FRET après un délai permet de s'affranchir d'une part significative du bruit de fond.

Lors d'un transfert d'énergie entre un donneur ayant une durée de vie longue et un accepteur ayant une faible durée de vie, la fluorescence apparente de la molécule acceptrice sera celle de la molécule donneuse. L'utilisation de terres rares permet d'intégrer le signal de fluorescence entre 50 et 350 µs et donc de dégager le signal de fluorescence de l'accepteur engagé dans un FRET du signal de fluorescence de l'accepteur seul ou des fluorescences parasites qui ont des durées de vie de l'ordre de la nanoseconde (3,2 ns pour la GFP).

Le TR-FRET entre le Cryptate de terbium Lumi4tb© (Cisbio) et la GFP permet de mesurer les différentes émissions de fluorescence à des longueurs d'ondes où les spectres d'émissions des deux molécules ne se recouvrent pas (Figure 11), cela permet de travailler avec un bruit de fond minimum. Dans le système de TR-FRET que j'ai le plus utilisé, le canal calcique était couplé par l'intermédiaire d'un tag SNAP (voir partie 5.3.4) au cryptate de terbium et la GFP était fusionnée à l'extrémité carboxy terminale des différents RCPG étudiés.

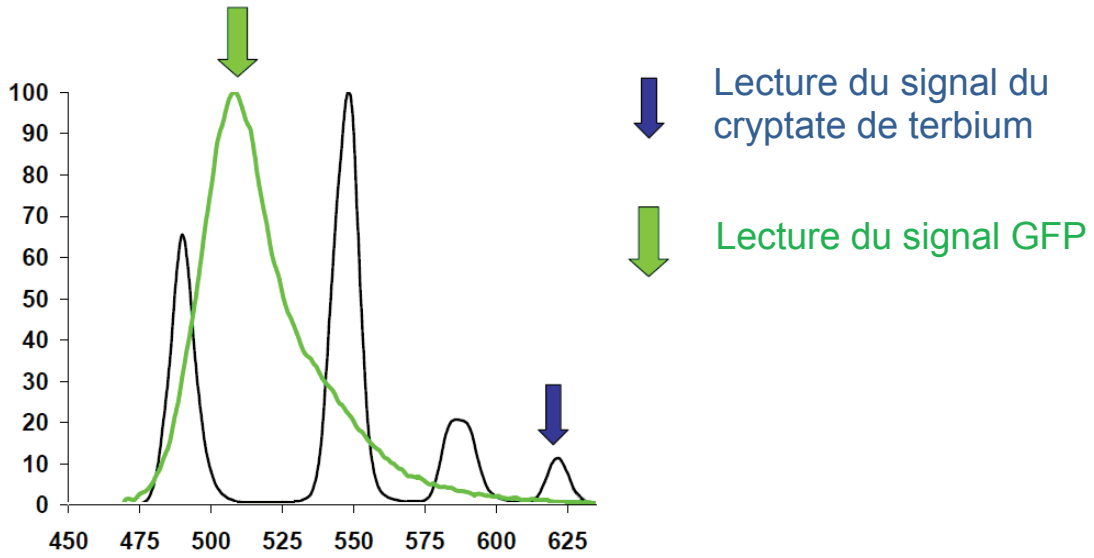


Figure 12 : Les spectres d'émission de la GFP et du cryptate de Terbium permettent d'effectuer la lecture de fluorescence à des longueurs d'ondes où les spectres ne se recouvrent pas.

5.3.4) Le tag SNAP

Le principe de cette technique repose sur la fusion de la protéine d'intérêt à une enzyme légèrement modifiée, l'O^6-alkylguanine DNA alkyltransferase (AGT, voir figure 13) (Juillerat et al, 2003) (Juillerat et al, 2005). Cette enzyme de 207 acides aminés, est une enzyme de réparation de l'ADN qui reconnaît in vivo les groupements alkyls présents sur les guanines de l'ADN. Cette étape de reconnaissance est suivie d'un transfert du groupement alkyl au niveau d'une cystéine réactive (Cys145) présente dans le site catalytique de l'enzyme. Cette réaction qualifiée de suicide est irréversible et unique. En effet, une fois le groupement alkyl fixé par liaison covalente dans le site catalytique de l'enzyme, celle-ci est dégradée dans les heures qui suivent. En chimiothérapie, les propriétés cytotoxiques de ces lésions de l'ADN (alkylation) sont utilisées pour détruire les cellules cancéreuses. Dans ce type de traitement, l'inhibition de l'AGT est essentielle. Le O^6-BG (O^6-Benzyl Guanine) est un exemple de molécule qui permet de potentialiser l'efficacité du traitement en entrant en compétition avec l'ADN pour l'enzyme (Dolan & Pegg, 1997) (Rabik et al, 2006).

La société Covalys a créé une enzyme AGT modifiée (baptisé tag SNAP) qui lie de manière covalente un substrat Benzyl-Guanine (BG) qu'il est possible de coupler à un fluorophore, notamment les cryptates de terres rares. Après avoir fusionné le tag SNAP avec la protéine cible, ici les canaux $Ca_V2.2$ et $Ca_V3.2$, il convient de les exprimer dans un modèle cellulaire et de rajouter le BG marqué dans le milieu pour avoir un marquage covalent spécifique de la protéine.

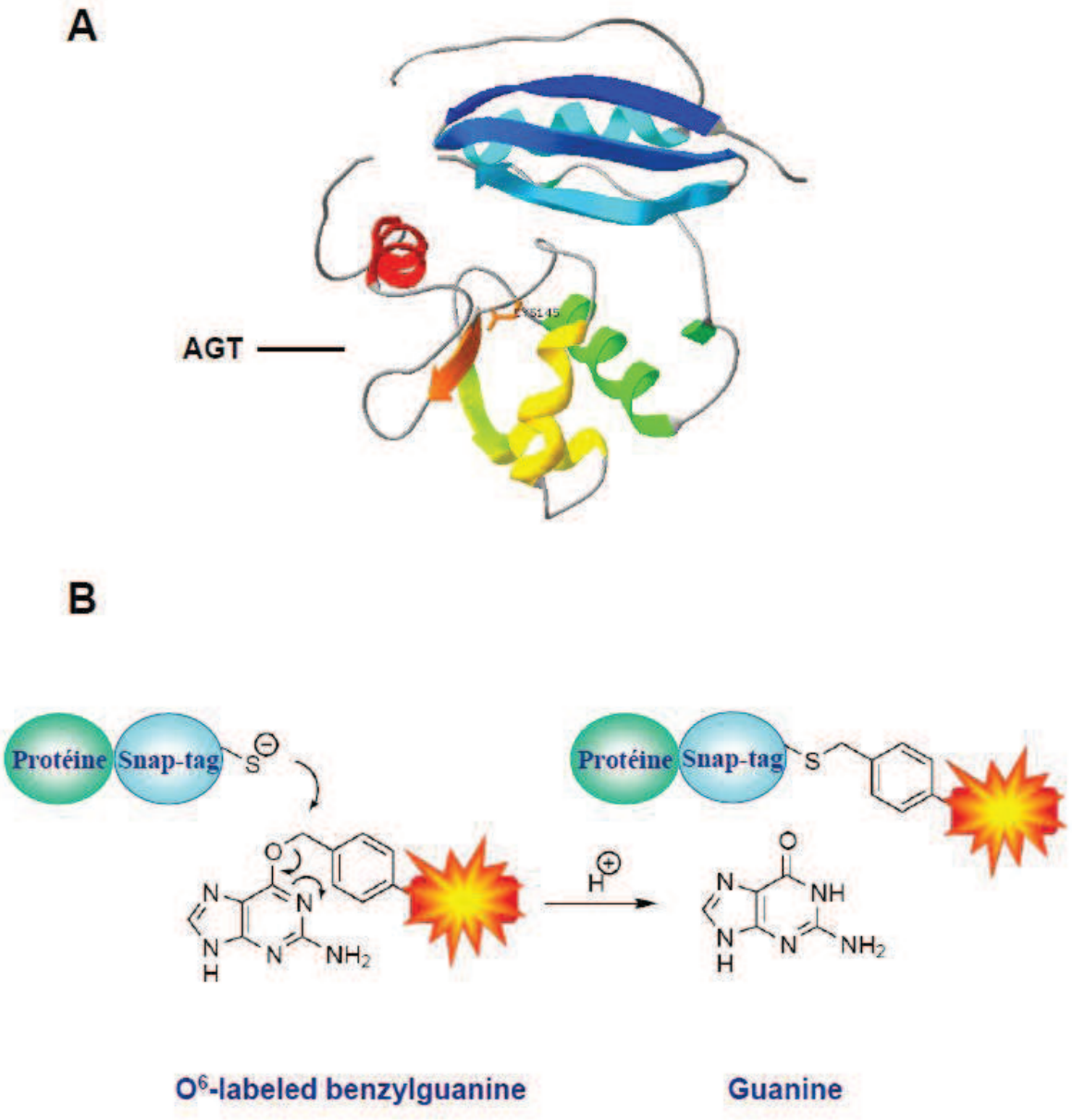


Figure 13 : A : Structure cristallographique de l'O^6-alkylguanine DNA alkyltransferase (AGT). B : Le tag SNAP est fusionné à la protéine d'intérêt et un ligand Benzyl-Guanine (BG) marqué est ajouté dans le milieu, l'enzyme va catalyser la fixation covalente du marqueur sur elle-même procurant ainsi un marquage stable de la protéine d'intérêt.

Chapitre VI : les peptides perméants.

Les peptides pénétrant les cellules (Cell penetrating peptides ou CPP) sont de courtes séquences d'acides aminés qui ont la possibilité de faire traverser la membrane cellulaire à certaines molécules auxquelles ils sont liés de manière covalente ou non. Les molécules qui peuvent être acheminées par ces CPP peuvent être des chimiques, des peptides, des séquences d'ADN, des nanoparticules… Ces propriétés en font donc des molécules de grand intérêt pour la recherche et la médecine. Les CPP ont généralement une composition riche en acides aminés chargés positivement (lysine, arginine…), ou alternant les charges positives et les résidus hydrophobes. Le premier CPP a été découvert en 1988 indépendamment par deux groupes, il s'agit du trans-activating transcriptional activator (TAT) du Virus de l'immunodéficience humaine 1 (HIV1). Ce facteur de transcription peut facilement être assimilé par les cellules à partir du milieu extracellulaire. Depuis de nombreux autres CPP ont été découverts et des analogues synthétiques ont été générés (Dietz & Bahr, 2005; Trabulo et al, 2012).

6.1) Les mécanismes de translocation membranaire.

Les CPP sont des peptides qui ont des séquences et charges différentes mais ils ont tous la capacité de pouvoir traverser les membranes cellulaires. Cependant ce mécanisme n'est pas encore bien compris et à l'heure actuelle trois théories majeures tentent d'expliquer le phénomène : la pénétration directe, la translocation médiée par l'endocytose et la translocation par la formation d'une structure transitoire.

6.1.1) La pénétration directe.

Au début le mécanisme suggéré pour la translocation des CPP comme le TAT était un processus ne requérant pas d'énergie et impliquant l'interaction des résidus chargés positivement de la molécule avec les phospholipides de la membrane. Récemment ce modèle a été ajusté (Herce & Garcia, 2007a; Herce & Garcia, 2007b) ; il est expliqué que les charges électrostatiques du CPP rentrent en interaction avec les charges des phospholipides, ce qui entraine une perturbation de la membrane cellulaire, formant ainsi un pore transitoire. Les peptides entreraient par diffusion au travers de ce pore. Ce modèle explique ainsi la nécessité

des charges positives et de la coopération entre les peptides pour leur entrée dans la cellule. Ce modèle a été conforté expérimentalement (Herce et al, 2009). Cependant il possède toujours certaines zones d'ombre notamment le fait que ce mécanisme devrait aussi bien s'appliquer à la membrane plasmique qu'aux membranes des organelles de la cellule.

6.1.2) La translocation médiée par l'endocytose.

L'endocytose parait aussi être une des voies possible d'entrée des CPP dans la cellule car c'est le processus classique par lequel la cellule absorbe des éléments du milieu extracellulaire. Ce mécanisme est une ingestion par repli de la membrane sur elle-même et peut être médiée par différentes protéines du cytosquelette. Des recherches ont montré que le peptide TAT pouvait entrer dans la cellule grâce à une macropinocytose (Frankel & Pabo, 1988). Mais si ces études ont montré que l'endocytose peut être impliquée dans l'entrée des CPP dans la cellule, cela n'empêche pas d'autres mécanismes d'être impliqués en parallèle.

6.1.3) La translocation par structures transitoires.

Le troisième mécanisme pouvant être impliqué dans l'entrée des CPP dans la cellule passe par la formation de micelles inversées. En effet des agents colloïdaux peuvent se lier par le groupement phosphate au peptide qui est chargé positivement et donc ayant les groupes lipophiles tournés vers l'extérieur de la structure. Ce processus permet au peptide de rester dans un environnement hydrophile mais cela crée une accumulation de charges qui permet la translocation par un processus similaire à l'électroporation.

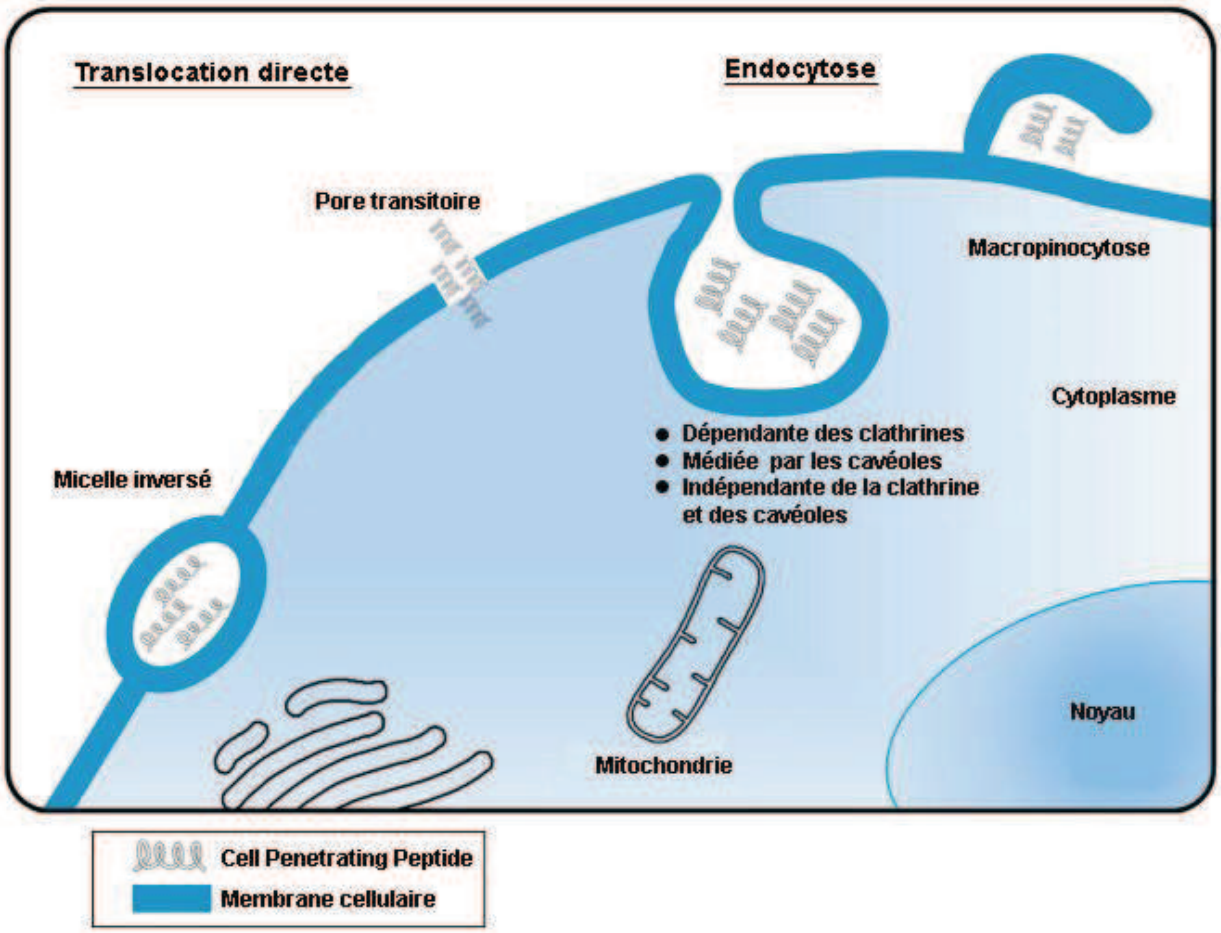


Figure 14 : Les différents mécanismes d'entrée des Cell Penetrating Peptides (CPP) d'après Koren et Torchilin 2012.

Bien que l'entrée des CPP dans les cellules soit toujours sujet à débats, il semblerait que différentes voies soient en compétition et que la nature du CPP ainsi que celle de la molécule qui y est attaché influent sur la voie qui sera privilégiée.

Cell Penetrating Peptide	Origine	Structure	Mécanisme supposé
TAT	Activateur de transcription du HIV	Hélice aléatoire / Hélice PP II	Pénétration directe, Macropinocytose
Pénétratine (pAntp)	Antenapedia *Drosophila melanogaster*	Amphipathique, hélice α / feuillets β (à concentration plus élevée)	Pénétration directe, endocytose
Polyarginine	Modèle chimérique	Hélice aléatoire, hélice α	Pénétration directe, endocytose
pVec	Cadhérine endothéliale vasculaire murine.	Amphipathique, feuillet β	Pénétration directe, translocation médiée par récepteur.
Pep-1	Modèle chimérique	Amphipathique, hélice α	Pénétration directe, formation de pore
Transportan	Galalnine – Mastoparan (chimérique)	Amphipathique, hélice α	Endocytose, pénétration directe
MAP	Model Amphipathic Peptide (chimérique)	Amphipathique, hélice α	Mécanismes Multiples

Tableau 2 : Exemples parmi les principaux CPP de leur origine, structure et mécanisme d'entrée dans la cellule.

A l'heure actuelle et même si de nombreux points de leur mécanisme de fonctionnement restent à éclaircir les CPP sont largement utilisés en recherche pour faire rentrer dans les cellules de nombreuses molécules, que ce soit des marqueurs, des ADN plasmidiques ou génomiques, des siRNA, ou divers peptides aux fonctions variées. Au cours de ma thèse j'ai eu recours aux peptides TAT pour faire rentrer dans les cellules transfectées ou chez l'animal un peptide reproduisant la séquence d'interaction d'ORL1 avec $Ca_V2.2$ de manière à pouvoir interrompre cette interaction par compétition avec le peptide.

Résultats

1) Création des constructions géniques utilisées et validation.

Pour pouvoir étudier les interactions entre les récepteurs couplés aux protéines G et les canaux calciques voltage dépendant, il nous est apparu crucial d'avoir des moyens simples de pouvoir suivre et localiser leur expression. Pour cela nous avons décidé de réaliser une fusion des canaux calciques que nous souhaitions étudier avec le tag SNAP, car sa grande versatilité se prête à de nombreux types d'expérimentations différents. Nous avons choisi de sous-cloner le tag en remplacement d'un tag GFP pour les canaux $Ca_V2.2$ et $Ca_V3.2$ car il est bien plus aisé de manipuler de courtes séquences comme celle du tag SNAP ou GFP (respectivement 546 et 720 paires de bases) qu'une séquence d'environ 6500 paires de bases telle que celles encodant les canaux calciques. Cette méthode a permis d'obtenir les canaux étiquetés SNAP et nous avons vérifié leur expression en Western Blot et migration SDS-PAGE avec marqueur du tag SNAP BG Vista green puis nous avons testé leur fonctionnalité par électrophysiologie. Nous avons aussi réalisé des constructions comprenant des sites d'interactions connus du canal $Ca_V2.2$ étiquetées SNAP pour pouvoir valider le modèle de TR-FRET que nous souhaitions utiliser en criblant ces interactions dans leur expression minimale.
Pour pouvoir suivre l'expression des différents RCPGs étudiés, nous avons réalisé dans un premier temps une fusion avec le tag HA, en créant un vecteur pHA-C1 à partir du vecteur commercial peGFP-C1, dans lequel nous avons remplacé la séquence codant pour l'eGFP par la séquence du tag HA que nous avons obtenue en liant deux oligonucléotides de synthèse codant pour sa séquence et les sites de restriction utilisés pour extraire le tag GFP.

L'expression de ces constructions a d'abord été testée en Western Blot classique pour les protéines portant les tags FLAG ou HA (Figure 15 A), puis en migration SDS-PAGE après incubation avec un ligand du tag SNAP (SNAP-Vista Green) et lecture du gel à l'aide d'un phosphoimager Typhoon Trio+ (Figure 15 B). Cette technique est plus aisée à mettre en œuvre qu'un Western Blot classique car les étapes de transfert des protéines sur membrane et d'incubation des anticorps primaires et secondaires ne sont pas nécessaires ce qui permet un gain de temps appréciable. Nous avons aussi vérifié l'expression des canaux à la membrane en les marquant à l'aide de conotoxine GVIA biotinylée et en révélant à l'aide de streptavidine Alexa 594 (Figure 15 C et D). La fonctionnalité des canaux calciques étiquetés SNAP a ensuite été testée par électrophysiologie, en transfectant transitoirement le canal et ses sous-unités auxiliaires dans des cellules TSA-201 (Figure 16). Nous n'avons pas obtenu de différences significatives entre le canal sauvage et celui portant le tag SNAP lors de ces

expériences, confirmant ainsi que la présence du tag n'influe pas sur ses propriétés biophysiques de canal ionique.

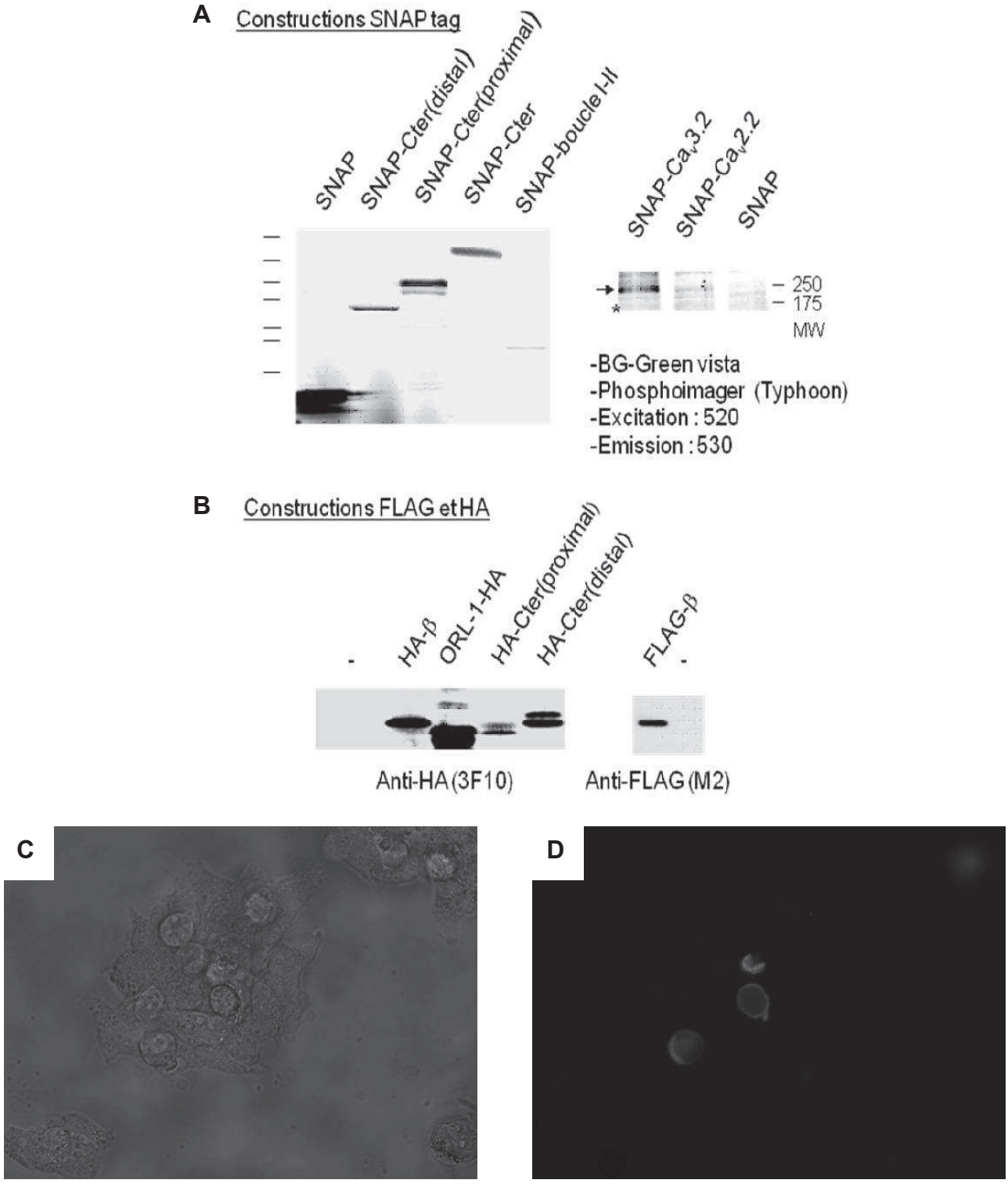


Figure 15 : A Western Blot des protéines étiquetées HA ou FLAG, révélé à l'aide d'anticorps dirigés contre ces tags. **B** Lecture au typhoon trio 3D d'une SDS-PAGE de protéines tagguées SNAP et marquées à l'aide du BG-Vista Green avant migration. **C**.et **D** Cellules transfectées avec $Ca_V2.2$-SNAP et marquées avec de la Conotoxine GVIA biotinylée et révélées à l'aide de streptavidine-Alexa 594. A gauche, observation microscopique grossissement x40 en contraste de phase et à droite, observation du marquage fluorescent Alexa 594. Il faut noter le marquage membranaire obtenu avec la toxine fluorescente montrant l'expression membranaire de la construction SNAP-CaV2.2.

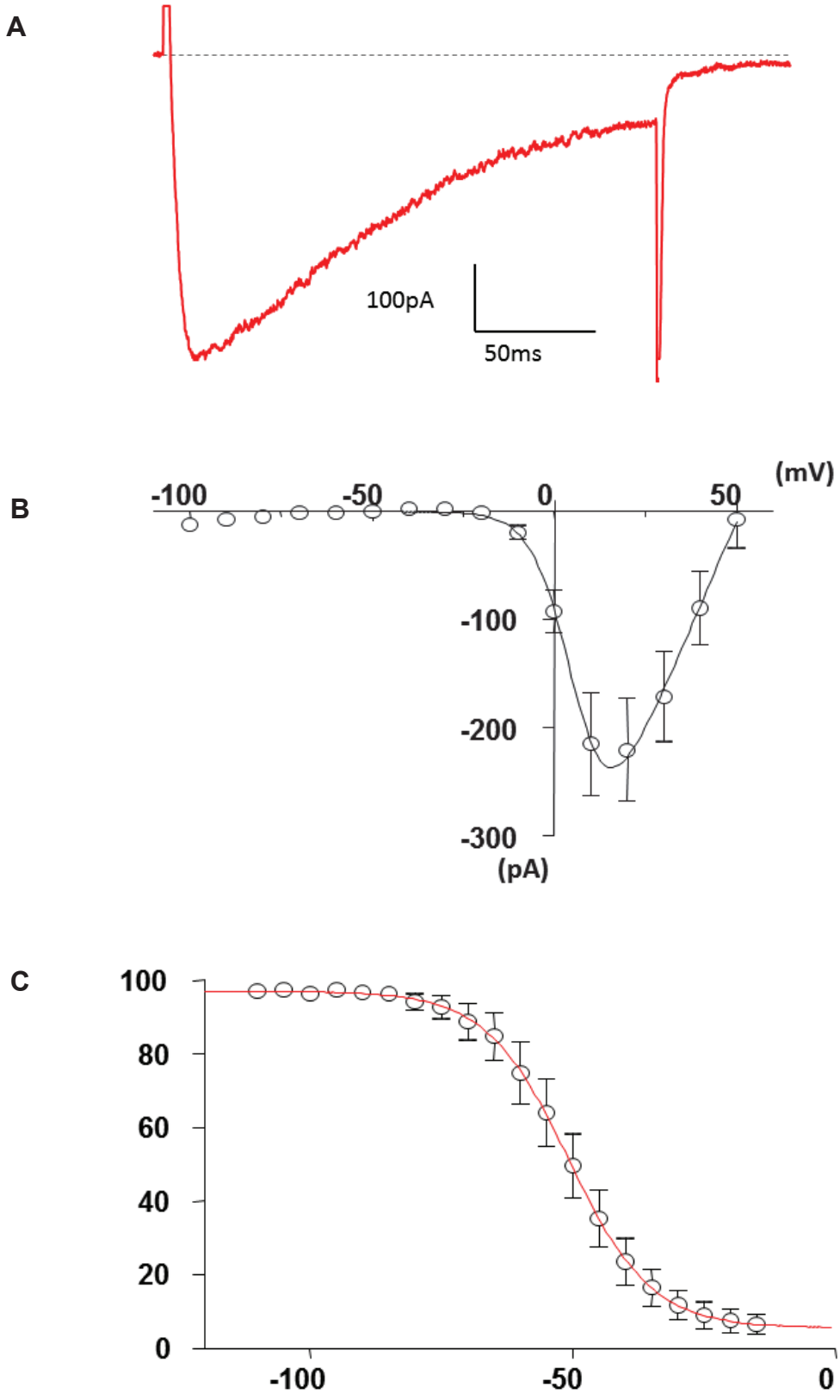


Figure 16 : Enregistrements électrophysiologiques du canal $Ca_V2.2$-SNAP transfecté transitoirement avec ses sous-unités $\alpha_2\delta$ et β_1b dans des cellules TSA-201 en milieu extracellulaire comportant 10 mM Ba^{2+}. **A** Trace représentative d'un courant observé en configuration cellule entière. **B** Relation courant / potentiel **(**courbe IV). Cette courbe trace le courant moyen observé en fonction du potentiel de la dépolarisation induisant le courant. **C** Courbe d'inactivation. Cette courbe représente le pourcentage de canaux inactivés en fonction du potentiel de repos de la cellule.

2) Validation du modèle de TR-FRET entre molécules tagguées HA et SNAP.

Le but initial de ma thèse étant de réaliser un crible des interactions entre les RCPG impliqués dans la régulation des voies de la douleur et les canaux calciques $Ca_V2.2$ et $Ca_V3.2$ connus pour participer à la transmission du message nociceptif, nous avons décidé d'utiliser pour cela une technique de FRET en temps résolu. Pour déterminer la faisabilité de cette technique nous avons commencé par étudier des interactions connues entre des canaux calciques entiers ou des chimères comportant des domaines d'interaction de canaux calciques étiquetés. Nous avons ensuite comparé les résultats obtenus avec différentes manières de marquer les protéines en interaction dans le test.

Nous avons d'abord commencé par réaliser du TR-FRET en utilisant des anticorps anti-HA couplés à un fluorophore et un ligand Benzyl-Guanine lui-même couplé à un deuxième fluorophore. Les premières expériences ont été réalisées dans le but de déterminer la faisabilité d'une expérience de FRET intracellulaire. Pour valider notre modèle nous avons commencé par étudier le transfert d'énergie intracellulaire avec comme modèle d'étude les sous-unités de protéine G dans un premier temps. Pour cela, l'équipe de Jean-Philippe Pin de l'IGF nous a donné les plasmides codant pour les protéines $G_{i\alpha}$-SNAP, $G_{\beta 1}$et G_{γ}-HA pour la mise au point de la technique. Nous n'avons pas réussi à faire fonctionner ce test en condition homogène (technique de HTRF, résultats non montrés) mais nous avons eu de bons résultats sur des cellules préalablement fixées au paraformaldéhyde puis perméabilisées à l'aide de 0,1% de saponine (figure 17 A). Nous avons aussi dans cette expérience cherché à déterminer quel était le meilleur couple anticorps / ligand BG. Pour cela nous avons utilisé un anticorps donneur : l'anti-HA-TBP et un ligand accepteur le BGXL-647 ou un anticorps accepteur : l'anti-HA-D2 et le BG-K2. Nous n'avons eu aucun FRET visible dans le cas d'un anticorps-accepteur alors que dans le cas d'un anticorps-donneur on obtient une augmentation de FRET de 100% pour des cellules perméabilisées avec du triton X-100 et de 300% sur des cellules perméabilisées avec de la saponine (Figure 17 A). Ces expériences ont déterminé le protocole utilisé par la suite dans l'étude. Une fois ces manipulations préliminaires effectuées, nous avons utilisé les meilleures conditions pour tester le FRET entre canaux calciques et quelques-uns de ses interactants connus (Figure 17 B et C). Le tag FLAG a aussi été testé pour comparer son efficacité avec le tag HA dans les expériences de TR-FRET intracellulaire en utilisant des constructions déjà présentes dans le laboratoire : la sous-unité Ca_V β-flag et la kinase IκB (IKK-FLAG) ; (Figure 17 D).

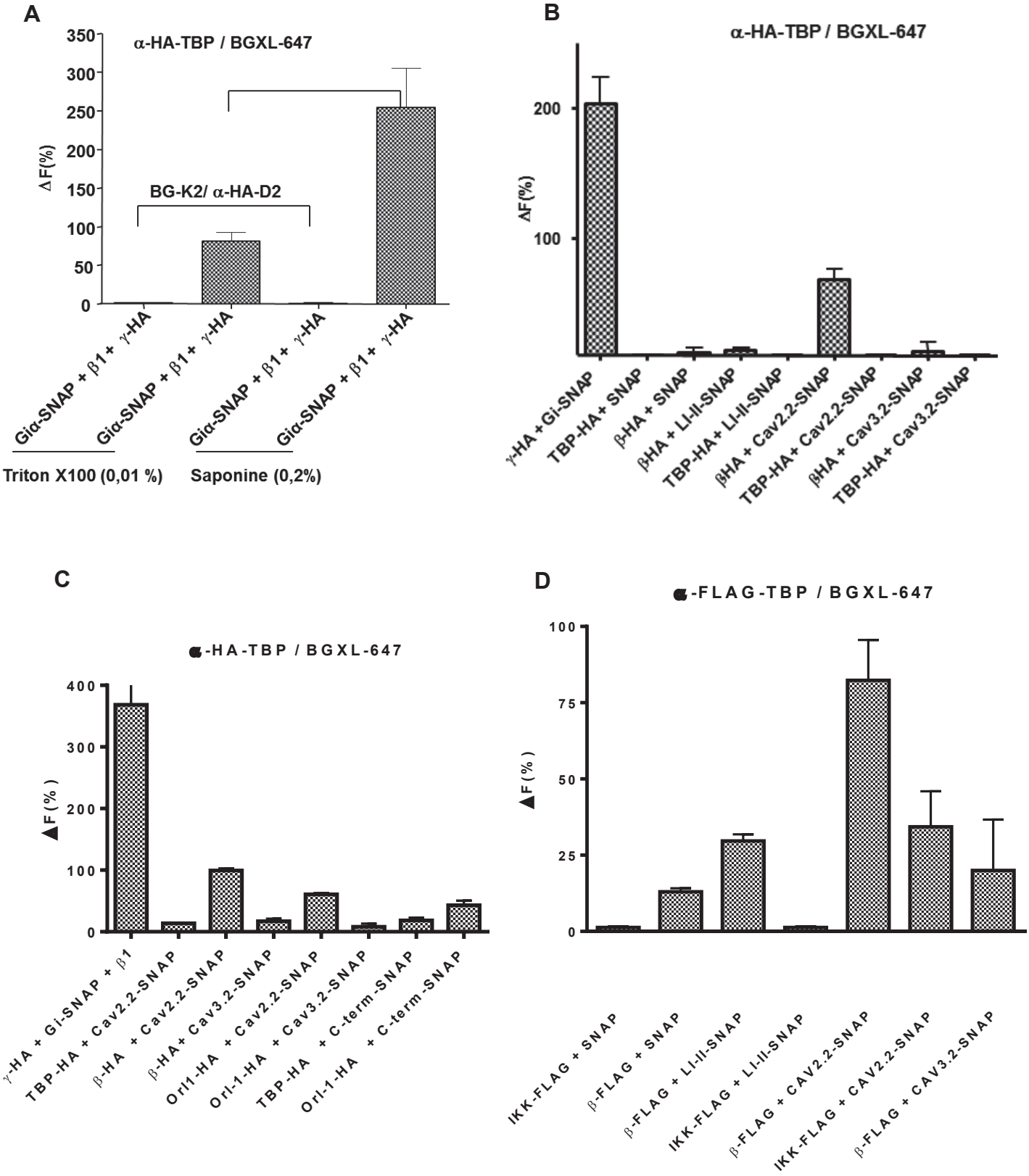


Figure 17: A TR-FRET entre sous-unités de la protéine Gi. Le FRET n'est présent que dans le cas où le donneur de fluorescence est couplé à l'anticorps anti-HA, et il est trois fois plus fort si les cellules ont été perméabilisées à la saponine et non au triton X100. **B** TR-FRET dans différentes conditions de contrôle négatif et entre le canal $Ca_V2.2$-SNAP et sa sous unité β-HA ou entre les sous-unités de la protéine Gi. Les seules augmentions significatives de la fluorescence ressortent pour ces deux dernières conditions. **C** TR-FRET entre le canal $Ca_V2.2$-SNAP ou son domaine d'interaction C-terminal et sa sous-unité β-HA ou ORL1-HA. Il y a une augmentation significative de la fluorescence entre les sous-unités de la protéine Gi, entre $Ca_V2.2$-SNAP et β-HA et ORL1-HA ou entre le C-terminus-SNAP et ORL1-HA bien que le FRET soit inférieur à celui relevé pour le canal entier.

Lorsque nous utilisons les conditions déterminées précédemment nous obtenons une augmentation de FRET quasi nulle pour les conditions contrôle :

- anticorps anti-HA avec $Ca_V2.2$-SNAP sans interactants
- anticorps anti-HA avec parties intracellulaires $Ca_V2.2$-SNAP sans intéractants
- anticorps anti-HA avec $Ca_V3.2$-SNAP + $Ca_V\beta$-HA

Par contre lorsque le canal $Ca_V2.2$-SNAP est transfecté avec sa sous-unité $Ca_V\beta$-HA ou ORL1-HA nous obtenons une augmentation de FRET de 100% par rapport aux conditions contrôle. Les constructions comprenant uniquement les sites d'interaction du canal taggués SNAP avec leurs interactants spécifiques (boucle I-II avec la sous unité β, ou partie C-terminale avec le récepteur ORL1) donnent des résultats plus mitigés comparativement à la condition canal entier. Le but de ces constructions était de pouvoir augmenter le signal grâce à une expression qui était attendue comme plus importante car les séquences concernées étaient bien plus courtes. La nécessité de la conformation du canal entier est probablement requise pour le signal FRET. Par conséquent ces protéines correspondant aux sites d'interaction n'ont pas été utilisées par la suite. De même, l'utilisation d'un tag FLAG ne rend pas le test plus précis ; au contraire pour certaines conditions contrôle le FRET mesuré est plus important qu'en utilisant le tag HA alors que dans les conditions positives entre le canal $Ca_V2.2$-SNAP et sa sous-unité β-FLAG par exemple, l'augmentation du ratio de fluorescence est moins importante que celle relevée en utilisant la sous-unité β-HA et l'anticorps approprié.

3) TR-FRET entre canaux calciques - SNAP et RCPG étiquetés GFP.

Pour pouvoir étendre la recherche d'interactions entre les canaux calciques et les RCPG, nous avons cherché à adapter le test à une étiquette permettant de s'affranchir de l'utilisation des anticorps anti-tags, dans un but de simplification de l'essai en réduisant les étapes d'incubation et de lavage qui conduisent au décollage des cellules du fond des plaques de lecture. Etant donné d'une part, le grand nombre de récepteurs couplés aux protéines G étiquetés par la GFP en position C terminale intracellulaire existants et d'autre part la compatibilité spectrale entre le cryptate de Terbium comme donneur et la GFP comme receveur de fluorescence, nous avons cherché à savoir s'il était possible d'observer du FRET entre ces deux partenaires.

Nous avons donc transfecté le canal $Ca_V2.2$-SNAP en même temps que sa sous-unité β étiquetée par la GFP ou le récepteur à la nociceptine ORL1-GFP. Nous avons contrôlé la

spécificité du ratio de FRET observé en transfectant en parallèle le vecteur peGFP-N1 pour obtenir une expression de la GFP seule dans le cytoplasme de la cellule, ou encore la protéine CD4-GFP pour avoir une protéine membranaire tagguée GFP mais n'interagissant pas avec le canal.

Les augmentations de fluorescence significatives ne sont observées que pour les puits où se trouvent le canal $Ca_V2.2$-SNAP et ses partenaire β-GFP et ORL1-GFP, respectivement 250% et 100% d'augmentation de ratio de fluorescence. En comparaison le contrôle CD4-GFP conduit à un signal proche de zéro, même non-significativement négatif, une fois le bruit de fond général soustrait à l'ensemble des données (Figure 18).

Toutes ces approches ont permis de définir le test, des conditions de fixation/perméabilisation, aux paramètres de partenaires de FRET requis (canal pleine longueur étiqueté SNAP par son extrémité C-terminale, et le RCPG étiqueté avec la GFP par son C-terminus). Cette mise au point a été réalisée avec des partenaires aux interactions connues ; à partir de là, le but de l'approche était de pouvoir appliquer ce test à la découverte de RCPG pouvant interagir avec le canal $Ca_V2.2$ et d'en établir un catalogue. Ce type d'informations étant important pour comprendre la pertinence physiopathologique de cette voie de régulation. Nous avons du composer avec le nombre de constructions RCPG-GFP que nous avons pu collecter pour un criblage initial à petite échelle ; le choix des RCPG étant aussi dicté par leur présence dans les neurones sensoriels afférents primaires, dans une visée de modulation de perception de la douleur. Le premier élément qui est apparu essentiel était de trouver un vrai contrôle négatif, à savoir un RCPG couplé à la GFP, avec une partie C-terminale de longueur similaire à celle du récepteur ORL1, mais ne donnant pas de signal de FRET. Le récepteur activé par les protéases PAR2 étiqueté GFP s'est révélé être un bon contrôle négatif. Le signal de TR-FRET avec PAR2-GFP est comparable à celui obtenu avec la construction CD4-GFP (Figure 19 A). Le récepteur PAR2-GFP a donc été constitué le contrôle négatif dans la suite des tests.

Une fois ces expérimentations préliminaires effectuées, nous avons testé un échantillon de RCPG taggués GFP qu'il nous a été possible de trouver, tout en cherchant des récepteurs connus pour leur implication dans le contrôle des voies de la douleur. Malheureusement nous avons eu beaucoup de mal à obtenir une expression suffisamment bonne à la fois des RCPG et du canal pour pouvoir avoir un signal de FRET suffisamment robuste, clairement distinct du bruit de fond lors de chaque transfection. Un exemple de ce que peut donner une expérimentation où le comportement des RCPG et du canal CaV2.2-SNAP ne peut être clairement défini est fourni à titre d'exemple dans la figure 19 B. Bien que

de nombreux autres essais aient été tentés, ils ne seront pas montrés. On peut toutefois noter qu'un signal de FRET entre $Ca_V2.2$-SNAP et le récepteur β_2 adrénergique-GFP a été observé et mériterait de plus amples investigations.

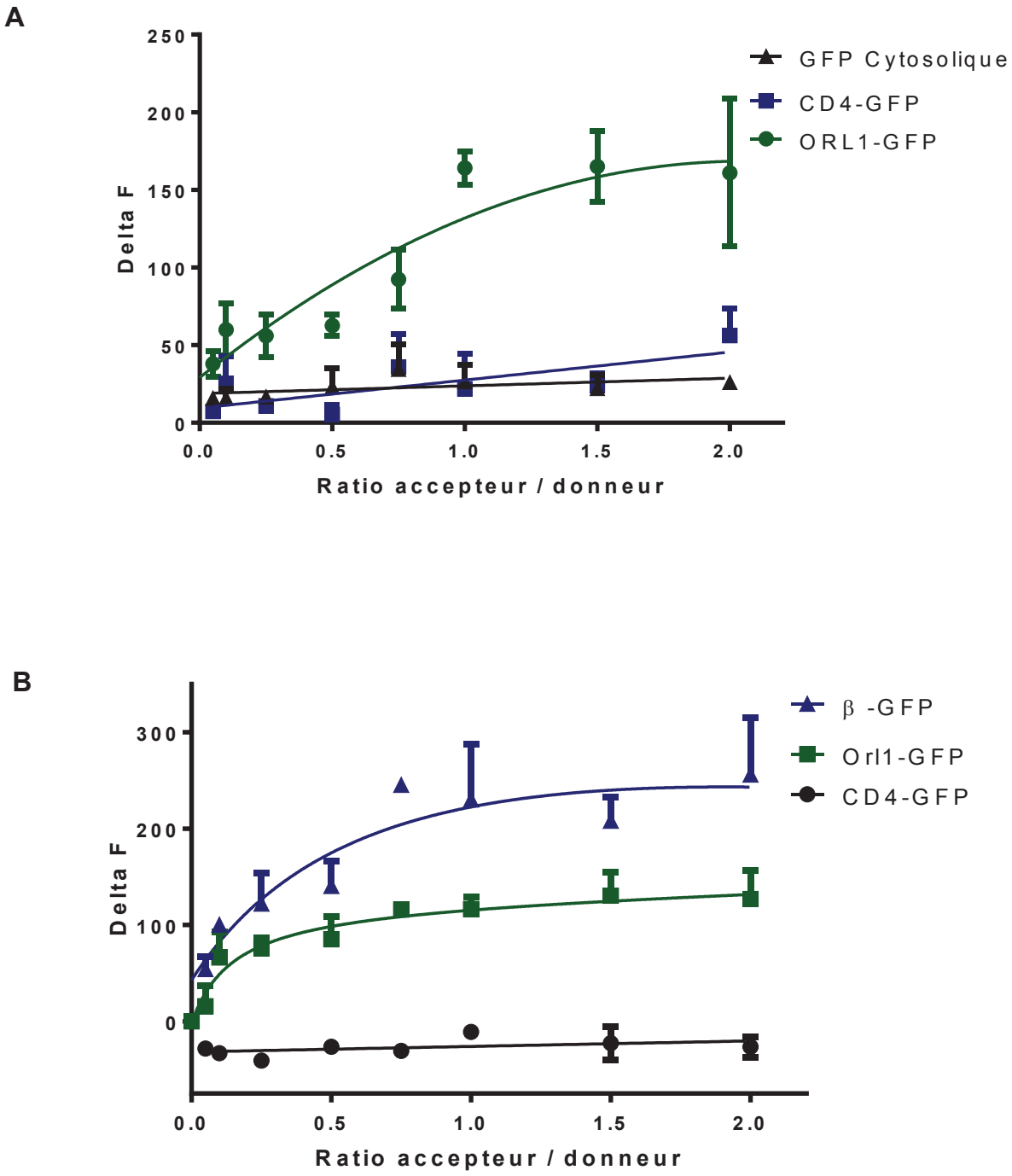


Figure 18: Validation du modèle de FRET entre canal taggué SNAP donneur d'énergie et interactants taggués GFP receveurs. **A** TR-FRET entre $Ca_V2.2$-SNAP et la GFP seule, libre dans le cytoplasme de la cellule, CD4-GFP et ORL1-GFP. **B** TR-FRET entre $Ca_V2.2$-SNAP et sa sous-unité β-GFP, ORL1-GFP ou CD4-GFP. Dans ces expériences nous avons un signal de FRET entre le canal et deux de ses interactants connus qui est significatif, aux alentours de 150% d'augmentation de fluorescence pour ORL1 et 250% pour la sous-unité β, alors que les contrôles négatifs, qu'ils soient cytosoliques (GFP seule) ou membranaires (CD4) restent proche de 0.

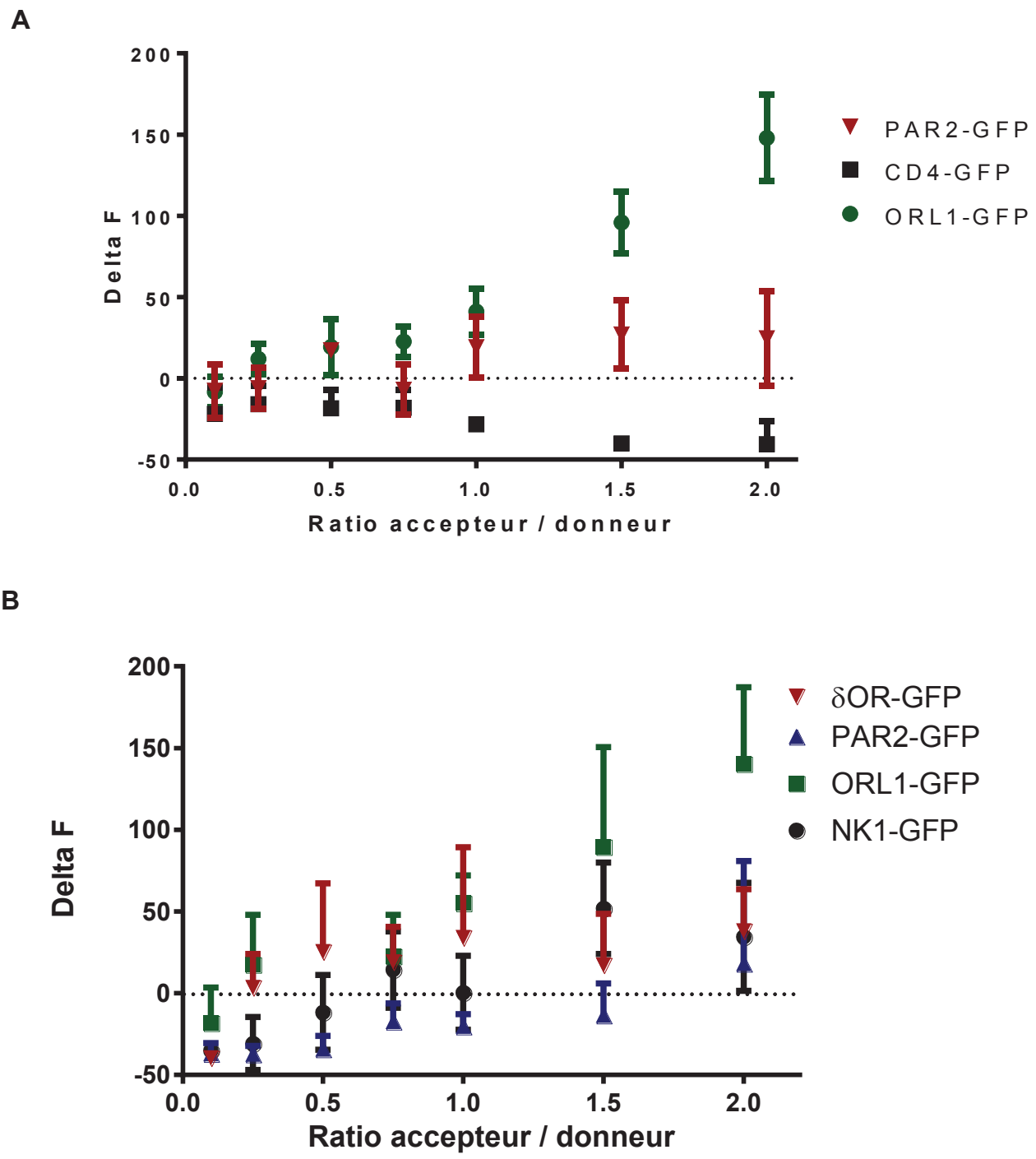


Figure 19: Recherche d'interactions entre $Ca_V2.2$-SNAP et certains RCPG taggués GFP. **A** TR-FRET entre $Ca_V2.2$-SNAP, CD4-GFP et PAR2-GFP. Comme PAR2-GFP a un signal proche du contrôle négatif nous l'utiliserons en tant que contrôle négatif dans les expériences de TR-FRET entre canaux calciques et RCPG pour avoir un contrôle structuralement proche des interactions testées. **B** TR-FRET entre $Ca_V2.2$-SNAP et δOR-GFP, NK1-GFP, ORL1-GFP et PAR2-GFP. Malheureusement dans un certain nombre de cas, les RCPG dont nous testons l'hypothétique interaction avec $Ca_V2.2$ ont un signal de FRET qui se trouve entre le contrôle positif et négatif, ne permettant pas d'en tirer quelque conclusion que ce soit. D'autres expériences ayant eu des résultats similaires ne seront pas montrées ici.

4) Etude de l'interaction entre CaV2.2 et ORL1

Des études précédemment réalisées au laboratoire en collaboration avec le groupe du Pr Zamponi à Calgary ont révélé que le récepteur à la nociceptine interagissait directement avec le canal calcique $Ca_V2.2$ (Altier et al, 2006; Beedle et al, 2004). L'étude d'un modèle KO pour le gène codant pour ORL1 chez la souris a permis de déterminer que ce récepteur était crucial dans les processus conduisant à la tolérance aux effets analgésiques de la morphine au niveau spinal (Ueda et al, 2000). Par ailleurs, les travaux du laboratoire (Evans et al, 2010) montrent que le récepteur MOR de la morphine est capable de s'hétérodimeriser avec le récepteur ORL1 et par là-même de former un complexe tripartite MOR:ORL1:$Ca_V2.2$ laissant penser que l'interaction de l'hétéromère avec le canal pourrait être impliqué dans le mécanisme de la tolérance aux effets antalgiques de la morphine en précipitant l'internalisation du complexe. Pharmacologiquement, l'utilisation d'antagonistes exogènes ou endogènes du récepteur ORL1 a montré une réduction de la tolérance à la morphine (Kamp & Hell, 2000; Pierce KL et al, 2002) et la stimulation d'ORL1 par son agoniste endogène, la nociceptine, conduit à des effets pronociceptifs définissant le couple nociceptine/ORL1 comme un système « anti-opioïde » (Wise, 2002). Enfin, lors de protocoles de tolérance à la morphine, le nombre de récepteurs ORL1 et de site de liaisons de la nociceptine sont augmentés dans la corne dorsale de la moelle épinière (Skilling et al, 2004). Des associations entre des variants du gène ORL1 et la susceptibilité à l'addiction à la morphine ont également été récemment trouvées (Fung et al, 2004). Comme la morphine est un des analgésiques les plus utilisés dans le monde et que le développement de la tolérance est l'une des complications de son utilisation clinique, notamment en Amérique du Nord ou la morphine est très utilisée (Hawkins et al, 2004), il nous est apparu crucial d'étudier plus en détail l'interaction entre $Ca_V2.2$ et ORL1, en commençant par chercher quels étaient précisément les sites responsables de cette interaction.

4.1) Détermination des sites responsables de l'interaction $Ca_V2.2$ - ORL1.

Pour l'étude biochimique de l'interaction entre $Ca_V2.2$ et ORL1, nous avons travaillé en collaboration avec le département de physiologie et de pharmacologie de l'université de Calgary, sous la direction du professeur Zamponi.

Les études précédemment conduites nous avaient appris que le site d'interaction entre ces deux protéines se trouvaient dans leur domaine carboxy-terminal ; diverses constructions

comportant des parties de ce domaine C-terminal ont été construites et fusionnées à la GST pour les constructions réalisées à partir d'ORL1, et au tag 6xHis/Xpress pour celles provenant du domaine carboxy-terminal de $Ca_V2.2$ (voir Figure 20 A). Ces constructions ont ensuite été utilisées pour réaliser des expériences de GST pull-down, où le domaine C-terminal entier de $Ca_V2.2$ était cotransfecté avec les fragments partiels du domaine C-terminal d'ORL1 pour déterminer quel était le fragment nécessaire à la réussite du pull-down (Figure 20 B). Cette expérience a ensuite été inversée pour déterminer le site d'interaction de $Ca_V2.2$ (figure 20 C, D, E).

Ces expériences ont permis d'établir que les 18 acides aminés proximaux du domaine carboxy-terminal du récepteur à la nociceptine étaient suffisants pour réaliser le pull-down de $Ca_V2.2$ et que les 35 acides aminés de 1817 à 1852 étaient suffisants pour obtenir la liaison avec ORL1 (voir figure 20).

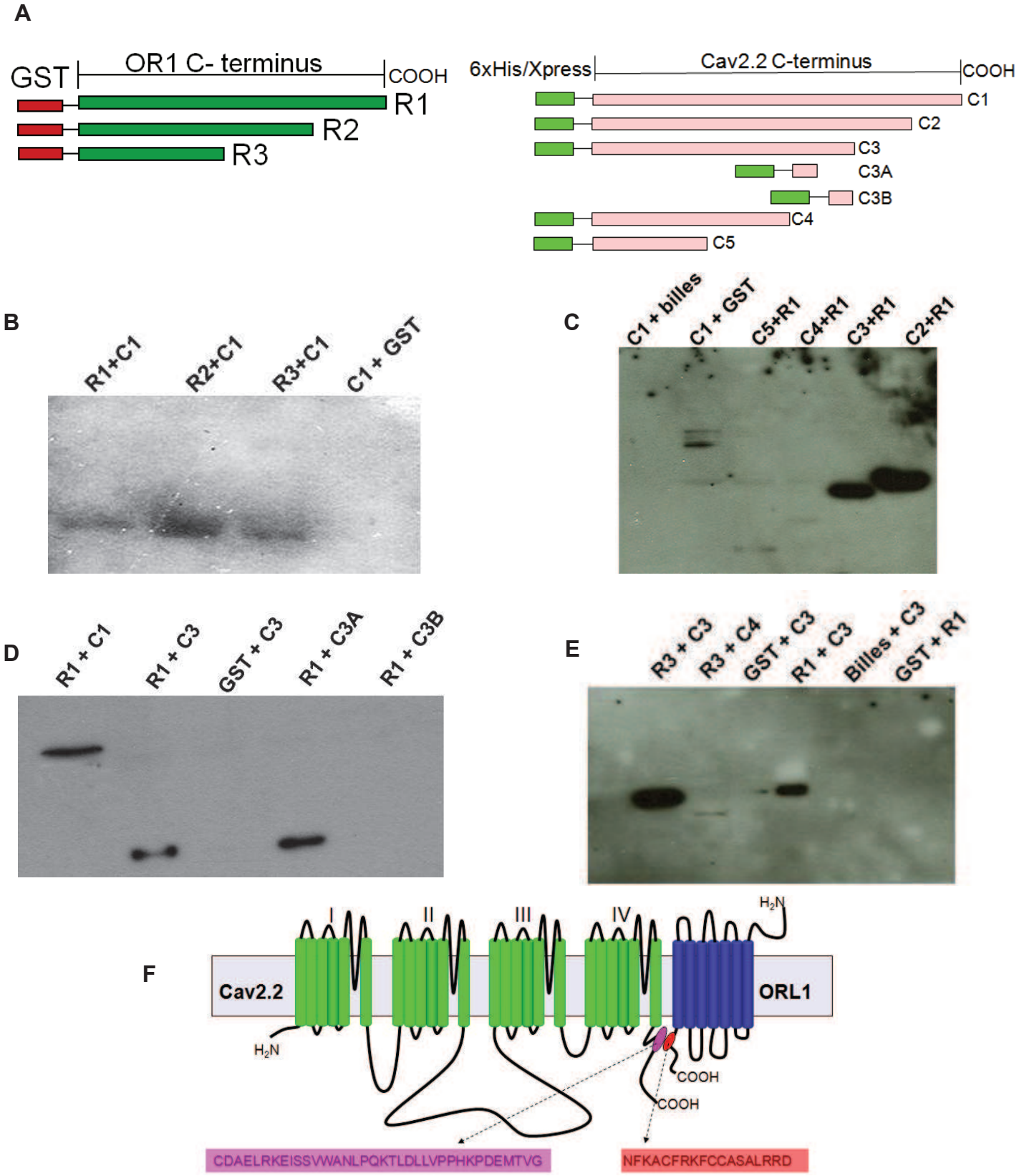


Figure 20: GST pull-down des domaines C-terminaux de $Ca_V2.2$ et ORL1 et de leurs fragments. **A** Schéma des constructions employées. **B** Pull-Down avec les différents fragments du C-ter d'ORL1 et le C-ter entier de $Ca_V2.2$, révélé avec un anti Xpress. **C** et **D** Pull-down avec les différents fragments du C-ter de $Ca_V2.2$ et le C-ter entier d'ORL1. Pull-down entre différents fragments de deux domaines C-terminaux. On notera que le pull-down est possible entre les fragments R1 et C3A et entre R3 et C3, ce qui montre que les séquences d'interaction sont comprises dans les fragments R3 et C3A. **F** Représentation schématique de $Ca_V2.2$ et d'ORL1 et de leurs sites d'interactions respectifs.

4.2) TR-FRET en présence de peptides TAT découplant l'interaction entre CaV2.2 et ORL1

Une fois que nous avons eu déterminé le site d'interaction entre $Ca_V2.2$ et ORL1, nous avons fait synthétiser le peptide correspondant au site d'interaction du domaine carboxy-terminal d'ORL1, couplée à un peptide TAT qui a la particularité de pouvoir traverser les membranes cellulaires, de manière à pouvoir concurrencer cette interaction par l'introduction de ce peptide leurre ; par la suite nous appellerons ce peptide TAT-ORL1. Nous avons aussi fait synthétiser un peptide comportant les mêmes acides aminés mais dont la séquence a été mélangée de manière à ne correspondre à aucune séquence connue. Nous avons donc obtenu un contrôle négatif le plus proche possible du peptide que nous souhaitions tester ; par la suite ce peptide sera appelé TAT-Scramble.

Nous avons ensuite réalisé la même transfection que lors des expériences de TR-FRET classiques en transfectant en trois gammes distinctes le canal $Ca_V2.2$-SNAP, ses sous-unités $\alpha_2\delta$ et β_{1b} ainsi qu'ORL1-GFP. Après trois jours d'expression des transgènes, 100 nmol de peptide TAT-ORL1 ou TAT-Scramble ou un volume équivalent de véhicule ont été ajoutées 30 minutes avant le début de l'expérience ;ces concentrations ont été maintenues dans toutes les solutions utilisées par la suite. Nous avons ainsi obtenu une augmentation de la fluorescence par le FRET d'environ 100% pour les puits ayant été traités avec le véhicule ou le peptide TAT-Scramble, comme lors des expériences précédemment réalisées avec ces conditions de TR-FRET entre $Ca_V2.2$-SNAP et ORL1-GFP. Par contre l'application du peptide TAT-ORL1 a complètement fait disparaitre le signal de FRET, ce qui confirme que ce peptide reproduisant le site d'interaction d'ORL1 avec $Ca_V2.2$ bloque cette interaction lorsqu'il est mis dans un système comportant ces deux protéines (Figure 21).

Nous nous sommes ensuite demandés si ce peptide pourrait avoir des effets in vivo, notamment sur un modèle de tolérance à la morphine.

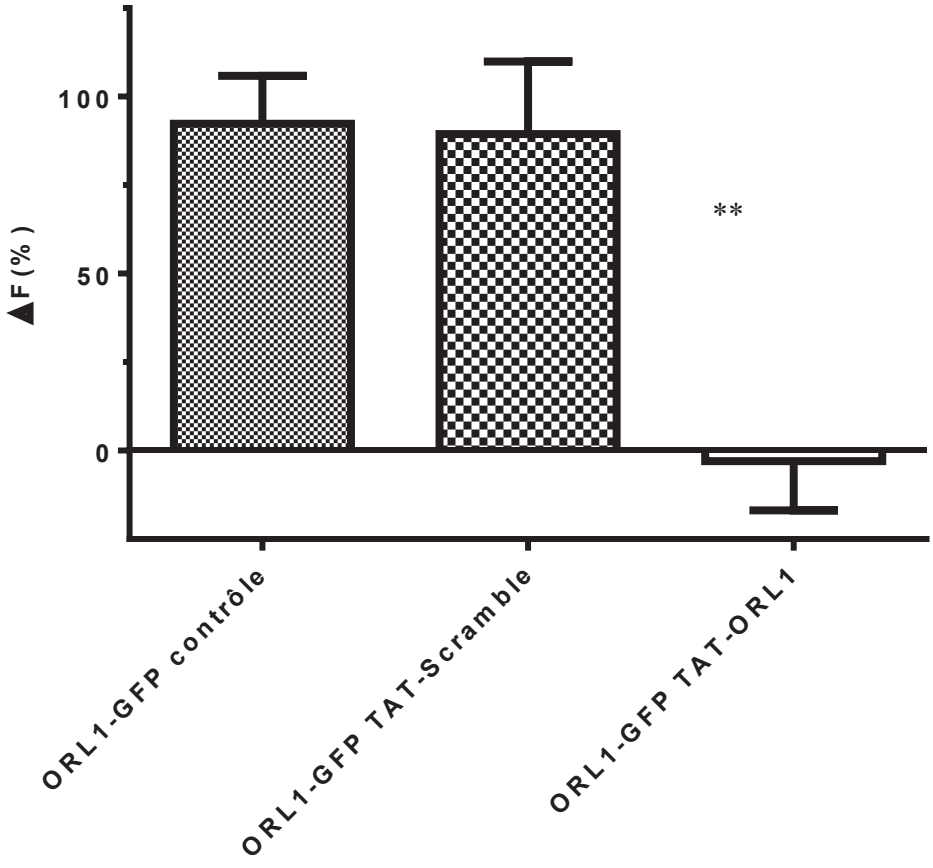


Figure 21: TR-FRET entre $Ca_V2.2$-SNAP et ORL1-GFP en présence ou non de peptides reproduisant le site d'interaction entre le canal et le RCPG visant à concurrencer l'interaction. Les résultats obtenus avec le peptide contrôle dont la séquence a été mélangée et le véhicule montrent une FRET significatif entre ORL1 et $Ca_V2.2$, alors que le peptide TAT-ORL1 fait perdre totalement le signal de FRET.

4.3) Utilisation des peptides TAT dans un modèle de tolérance à la morphine chez la souris.

Pour tester l'effet du peptide TAT-ORL1 découplant l'interaction du récepteur à la nociceptine avec les canaux de type N, nous avons mis au point en collaboration avec le laboratoire du professeur A. Eschalier à l'université de Clermont-Ferrand un protocole d'induction de tolérance à la morphine chez la souris (expériences réalisées avec le Dr. A. Alloui à Clermont Ferrand). Le laboratoire a déjà utilisé cette approche pour découpler l'interaction entre le canal $Ca_V3.2$ et la nNOS (travaux en cours de rédaction) ; cette approche a également été utilisée, toujours en collaboration entre l'IGF (Dr. P. Marin) et le laboratoire du Pr. Eschalier pour découpler les récepteurs de la sérotonine 5HT2A et leurs partenaires du motif PDZ C-terminal (Keir et al, 2004). Aussi les différents contrôles de pénétration de peptides TAT suivant une injection intrathécale étaient déjà mis au point. Pour cela nous avons pris six groupes de huit souris black6 traitées d'une double injection intrathécale de la manière suivante :

- deux groupes ont reçu des injections de sérum physiologique,
- deux groupes ont reçu des injections de peptide TAT-Scramble
- deux groupes ont reçu des injections de peptide TAT-ORL1.

Après un délai de trente minutes correspondant d'une part à la pénétration du peptide TAT au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière, dans les synapses entres les afférences sensorielles nociceptives et les neurones spinaux et d'autre part au temps d'incubation efficace pour découpler l'interaction ORL1::CaV2.2 dans le test TR-FRET, chaque groupe a reçu soit une injection de morphine, soit une injection de sérum physiologique (voir figure 22 A). Les seuils de sensibilité nociceptive vis-à-vis d'un stimulus thermique chaud ont ensuite été mesurés par le test d'immersion de la queue dans un bain marie à 46 °C deux minutes après la deuxième injection. Ce protocole étant répété dans son ensemble pendant cinq jours, les réponses basales ayant été enregistrées le jour 0. Ce protocole devait permettre d'évaluer l'effet de l'interaction récepteurs-canal sur deux aspects : d'une part l'effet analgésique de la morphine dès le premier jour de traitement, et d'autre part la tolérance à l'effet analgésique de la morphine.

Les trois premiers jours, les souris ayant reçu de la morphine, sans influence notable de la première injection, ont toutes présenté l'effet analgésique de celle-ci avec une latence de retrait de la queue quasi-systématiquement supérieure à la valeur limite de trente secondes où nous les retirions de manière à ce que la température ne puisse pas leur provoquer de lésions

(Figure 20). Les animaux ayant subi une injection de sérum physiologique en deuxième injection avaient, eux, un temps de réaction aux alentours de dix secondes, et ce quelle que fût la première injection qui leur ait été faite. Ainsi le peptide découplant de l'interaction ORL1::$Ca_V2.2$ n'a aucun effet ni sur les seuils de base, ni sur l'effet analgésique de la morphine. Sur cette partie, il est cependant difficile d'être concluant car la forte dose de morphine utilisée entraine un effet maximal ; il conviendrait d'utiliser des doses plus faibles de morphine pour vérifier ce point. Néanmoins, la tolérance étant directement liée à la dose de morphine utilisée, nous avons pris le parti d'utiliser une forte dose (10 µg) dans cette étude.

A partir du quatrième jour, les animaux des groupes traités avec le peptide contrôle ou avec le sérum physiologique en première injection et avec de la morphine ensuite ont commencé à montrer une tendance à perdre l'effet analgésique, tendance qui s'est confirmée le cinquième jour où les latences de retrait de la queue de ces deux groupes sont redescendues autour de 10 secondes, rejoignant les trois groupes recevant l'injection de sérum physiologique en deuxième injection tout le long du test. Ainsi le protocole utilisé (fréquence et dose de morphine) entraine une tolérance aux effets analgésiques de la morphine et le peptide contrôle ne modifie pas ce phénomène. A l'inverse, le groupe d'animaux ayant été traité avec le peptide TAT-ORL1 puis la morphine a gardé des valeurs proches de trente secondes traduisant la constance de l'effet analgésique de la morphine tout au long du protocole et donc la disparition du phénomène de tolérance.

Nous avons donc réussi lors de ce test à prolonger l'analgésie de la morphine chez la souris par l'injection d'un peptide imitant le site d'interaction du récepteur à la nociceptine avec le canal $Ca_V2.2$.

Concernant la stratégie de publication, ces résultats avec la mise en place du test de TR-FRET et l'identification du site d'interaction sont en cours de formatage pour un manuscrit sous forme de brevium ou brief communication respectivement pour la revue Science ou Annals of Neurology. Dans les deux cas il s'agit de manuscrits courts (1000 – 1500 mots avec 1-2 figures) avec les contrôles en données supplémentaires.

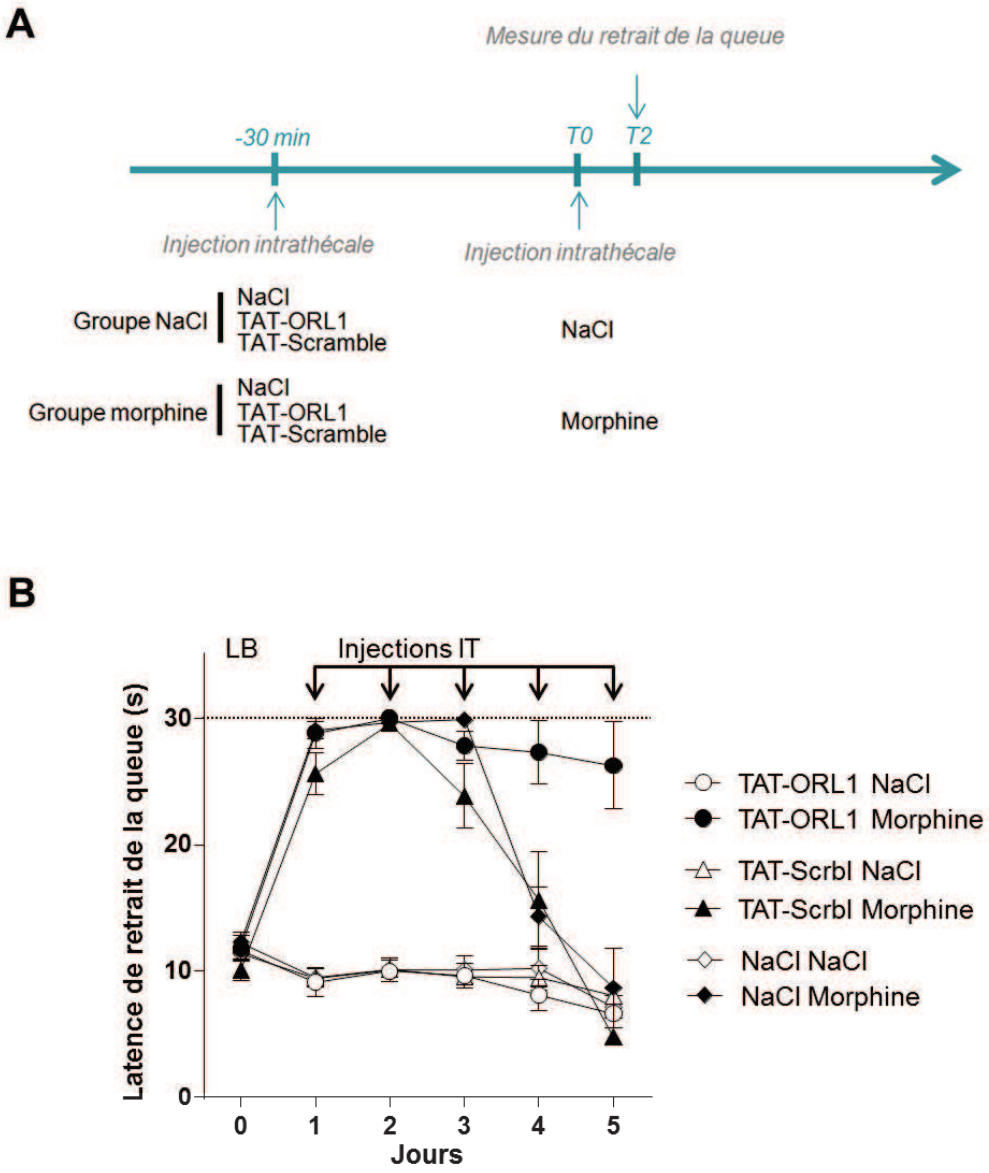


Figure 22: A Protocole utilisé pour l'expérience d'induction de tolérance à la morphine, le schéma d'injections intrathécales représenté ici étant reproduit pendant 5 jours, le jour 0 ayant servi à mesurer les valeurs naïves pour chaque groupe. **B** Temps de latence en secondes avant le retrait de la queue pour chaque groupe (n=8). On voit au 5ème jour que les souris ayant reçu le traitement morphinique précédé de l'injection du peptide TAT-ORL1 sont toujours analgésiées à l'inverse des différents groupes contrôle. (LB : ligne de base, IT : intrathécal)

Conclusions et Perspectives

TR-FRET entre RCPG et canaux calciques :

Au cours de cette étude nous avons vu qu'il était possible de réaliser des expériences de TR-FRET avec des partenaires intracellulaires, sur des cellules fixées, et que le couple cryptate de Terbium en tant que donneur et GFP en tant que receveur de fluorescence présentait de nombreux cotés pratiques aussi bien qu'une bonne capacité à produire un FRET en temps résolu. Les objectifs de départ du travail n'ont néanmoins pas été atteints concernant la réalisation d'un crible avec un panel conséquent de récepteurs. L'interaction directe RCPG - canaux calciques de type-N est certainement un mécanisme important de transduction de l'activité cellulaire. Rétrospectivement, un des aspects les plus critiques pour ce test est certainement le faible niveau d'expression des canaux qui, pour des mesures de fluorescence en format multi-puits, est une limitation. L'optimisation de la transfection nous a amenés à réduire le nombre de plasmides transfectés, notamment en créant un vecteur permettant de faire exprimer les sous unités régulatrices $Ca_V\beta_{1b}$ et $Ca_V\alpha_2\delta1$ du canal calcique à partir d'un seul plasmide. Cet aspect a amélioré la reproductibilité. Un autre handicap est aussi la nécessité de fixation des cellules pour le TR-FRET intracellulaire. La mise au point du même test mais avec une réaction de TR-FRET en extracellulaire est certainement à envisager. Ainsi, l'avantage serait de tester spécifiquement les partenaires exprimés à la membrane, et d'autre part permettrait de réaliser le test sans avoir à fixer et perméabiliser les cellules. Ceci conduirait à un gain de temps, de faisabilité, et finalement de compatibilité avec un test à grande échelle. Une large collection de RCPG avec une étiquette extracellulaire SNAP (fusion avec le N-terminus) est disponible au sein de la société Cisbio. Nous disposons de certains d'entre eux pour la poursuite de ce crible.Coté canal, nous avons construit plusieurs $Ca_V2.2$ avec des étiquette extracellulaires (HA et GFP). L'expression de ces canaux est cependant faible comparée à la séquence sauvage ; il reste donc du travail dans ce sens. Le TR-FRET intracellulaire restera néanmoins nécessaire pour des interactions entre canaux ioniques et protéines intracellulaires en complément d'autres techniques comme le BRET par exemple. Mon travail de mise au point de ce test reste donc important.

Indépendamment du TR-FRET, la réalisation de canaux calciques avec des étiquettes SNAP intracellulaires sera certainement d'utilité pour des expériences de biologie cellulaire visant à suivre le devenir des canaux par des expériences de « pulse-chase » par exemple.

Interaction ORL1::CaV2.2 et conséquence pour la tolérance à la morphine:

Nous avons aussi déterminé quels étaient les sites précis de l'interaction entre les canaux calciques $Ca_V2.2$ et le récepteur à la nociceptine ORL1 grâce à des expériences de pull-down impliquant des fragments des domaines carboxy-terminaux des deux protéines, déjà connus pour contenir ces sites d'interaction. Du coté canal, la séquence identifiée est retrouvée dans les séquences $Ca_V2.2$ de toutes les espèces, du poisson aux mammifères, avec une grande conservation (alignement ci-dessous).

```
CaV2.2 rat          CDAELRKEISSVWANLPQKTLDLLVPPHKPDEMTVG
CaV2.2 mouse        CDAELRKEISSVWANLPQKTLDLLVPPHKPDEMTVG
CaV2.2 human        CDAELRKEISVVWANLPQKTLDLLVPPHKPDEMTVG
CaV2.1 human        -DAELRKEMMAIWPNLSQKTLDLLVTPHKSTDLTVG
CaV2.3 rat          -DSELQKETLAIWPHLSQKMLDLLVPMPKASDLTVG
```

Aucun motif connu d'interaction ou de fonction cellulaire donné n'est présent dans ces 36 acides aminés importants pour l'interaction avec le récepteur ORL1. L'identification de ces acides aminés nécessiterait une approche de mutagénèse dirigée, ou l'approche de TR-FRET et la synthèse de peptides découplants avec des modifications permutant les quelques régions variables entre $Ca_V2.2$ et $Ca_V2.1$ ou $Ca_V2.3$ qui n'interagissent pas avec ORL1. Ces expériences sont une perspective à court terme de ce travail.

La séquence d'interaction du récepteur ORL1 (**NFKACFRKFCCASALRRD**) est elle plus courte. Le blast de cette séquence ne permet de trouver comme homologie que les récepteurs ORL1 de plusieurs espèces. La synthèse d'un peptide avec cette séquence couplé à un peptide pénétrant TAT a permis de réaliser un leurre découplant de l'interaction ORL1::$Ca_V2.2$.

Nous avons ensuite confirmé la capacité de ce peptide à découpler efficacement cette interaction grâce à notre système de TR-FRET où le peptide contrôle n'avait aucun effet sur le transfert d'énergie observé entre $Ca_V2.2$-SNAP et ORL1-GFP alors que le peptide TAT-ORL1 fait perdre complètement cette augmentation de la fluorescence GFP obtenue en excitant le cryptate de Terbium. Comme pour la séquence d'interaction du canal, des peptides avec des mutations (alanine scanning) devraient permettre d'identifier les acides aminés importants pour l'interaction.

Toutefois, notre objectif était de rechercher les effets de ce peptide si nous l'injections in vivo, notamment par rapport au phénomène de tolérance à la morphine, connu pour être absent chez la souris KO pour le gène du récepteur à la nociceptine. Nous avons donc réalisé un protocole de tolérance à la morphine au cours duquel les souris étaient soumises à une injection intrathécale quotidienne de morphine ou de sérum physiologique pour le groupe contrôle, précédée d'une injection de sérum physiologique, de peptide contrôle ou de peptide découplant. Au bout de cinq jours la morphine induit un phénomène de tolérance en conditions contrôle qui est complétement absent lorsque les animaux sont traités avec le peptide découplant. Cet effet des injections intrathécales montre l'importance de ce mécanisme au niveau spinal.

Néanmoins le couple ORL1::$Ca_V2.2$ est exprimé dans d'autres zones importantes des voies de la douleur pour l'action des morphiniques, en particulier au niveau supra spinal. Aussi il serait intéressant d'injecter la morphine de manière systémique pour voir si une action généralisée de la molécule permet au traitement intrathécal par le peptide de garder son efficacité. Enfin pour une perspective plus clinique, l'étude de l'effet systémique du peptide découplant permettrait d'obtenir un avantage indéniable si celui-ci s'avérait aussi efficace dans ce mode d'administration. Il a été montré qu'une telle approche est possible pour prévenir l'interaction entre $Ca_V2.2$ et la protéine CRMP-2 (Brittain et al, 2011). Ces auteurs montrent que le peptide TAT découplant qu'ils utilisent, injecté par voie intrapéritonéale, est capable de pénétrer dans les neurones sensoriels afférents primaires et d'induire un effet analgésique. Ainsi une approche d'injection IP de notre peptide découplant couplé à un effet systémique de la morphine permettrait d'accroitre la portée de ces résultats.

J'ai réalisé des injections IP du peptide à différentes concentrations pour voir sa biodisponibilité à différents temps post injection. Cette approche réalisé en dot blot suite à une extraction des protéines de DRG et de cerveaux n'a pas permis de détecter le peptide. Elle devrait néanmoins être poursuivie, en traçant le peptide avec un marqueur. Si cette démarche était fonctionnelle, cela permettrait d'étudier facilement l'implication du couplage ORL1 ::$Ca_V2.2$ sur les autres effets indésirables de la morphine, comme, par exemple, l'addiction qui est un problème lors du traitement de certains patients présentant des douleurs chroniques.

Conclusion :

Ainsi l'ensemble de ces travaux apporte certaines réponses mais surtout ouvre la voie à de nouvelles expériences qui devront compléter celles présentées ici. En ce qui concerne la partie FRET en temps résolu, il faudrait notamment arriver à s'affranchir des aléas d'expression des transgènes dans les cellules étudiées pour obtenir un système expérimental plus robuste qui permettra de rechercher de nouvelles interactions entre les canaux calciques et les éléments qui les régulent. Cela pourrait amener à une meilleure compréhension de leur régulation in vivo. Dans la thématique de contrôle de la douleur qui a été la trame de fond de mes travaux, cela peut découler sur l'obtention de thérapies plus ciblées, aux effets secondaires réduits ou ne s'atténuant pas dans le temps lors traitements conduits sur le long terme. Bien sûr, ce genre d'outils peut être appliqué à d'autres thématiques, la compréhension des interactions entre protéines étant cruciale pour comprendre un très grand nombre de processus physiologiques.

Les effets des peptides TAT mériteraient eux aussi de plus amples investigations comme je l'évoquais dans le paragraphe précédent, notamment en testant les animaux selon le même protocole mais avec des voies d'administration différentes. La douleur pathologique est bien évidement la cible des traitements morphiniques. Dans le cas présent nous avons réalisé l'étude sur des animaux naïfs ; il serait bien sur important de s'adresser au versant pathologique. Il est connu que les douleurs neuropathiques sont moins sensibles aux morphiniques (Mizoguchi et al, 2009) suggérant une dysrégulation des systèmes opioïdes/anti-opioïdes par les neuropathies. Même si des morphiniques aux propriétés pharmacocinétiques diverses sont activement recherchés pour pallier à ce phénomène, l'étude de l'interaction ORL1::$Ca_V2.2$ serait, de ce point de vue, intéressante. Ainsi l'utilisation du peptide découplant permettrait peut-être de potentialiser l'effet de la morphine dans ce contexte pathologique.

En conclusion, la mise au point du crible réalisée, bien qu'incomplète, ainsi que les résultats obtenus in vivo avec la stratégie de peptide leurre sont prometteuses. La perturbation de ce mécanisme de transduction du signal sera certainement une stratégie thérapeutique à creuser aussi bien dans le cas des récepteurs aux opiacés que pour d'autres RCPG potentiellement en interaction avec le canal.

Annexe 1 : Matériel et méthodes

Réalisation des constructions plasmidiques utilisées

Construction CaV2.2-SNAP

La stratégie utilisée pour obtenir le canal $Ca_V2.2$ avec un tag SNAP à son extrémité carboxy terminale a été d'utiliser une construction déjà employée dans notre laboratoire. Le canal $Ca_V2.2$ étant intégré dans le vecteur peGFP-C1, nous avons choisi de remplacer le tag GFP associé de ce vecteur par le tag SNAP car les séquences à cloner sont plus courtes ce qui rend plus aisé ce clonage. Pour cela le tag SNAP est extrait du vecteur pSEMxt-SNAP à l'aide des enzymes de restriction SNABI et SalI (Ozyme) et le tag GFP du vecteur peGFP-C1-$Ca_V2.2$ est enlevé par les mêmes enzymes. L'insert SNAP est purifié à l'aide d'un kit « gel extraction » (Qiagen) après migration sur gel d'agarose à 0,5% de même que le vecteur privé de son tag eGFP. Le vecteur et l'insert SNAP sont ensuite ligués à l'aide d'enzymes de ligation (New England Biolabs). Le produit de ligation est ensuite transformé dans des bactéries E.Coli compétentes (One Shot® TOP10F Chemically Competent *E. coli,* Invitrogen) par choc thermique, puis les bactéries sont incubées une nuit à 37 C° sur milieu agarose suppléé en Kanaycine et les colonies présentes le lendemain sont amplifiées à l'aide du kit miniprep (Qiagen), selon le protocole du constructeur, pour être criblées par digestion par les mêmes enzymes qui ont servi à l'intégration du tag SNAP et migration sur gel d'agarose. Une colonie ayant un produit de digestion au bon poids moléculaire est choisie puis amplifiée (kit midiprep Qiagen, selon le protocole du constructeur).

Construction $Ca_V3.2$-SNAP

La réalisation de la construction $Ca_V3.2$-SNAP a été conduite sur même schéma qu'employé pour la réalisation de $Ca_V2.2$-SNAP, la seule différence étant que l'extraction de l'insert SNAP et la suppression de l'eGFP ont été réalisée à l'aide des enzymes NheI et Xho sur les vecteurs peGFP-C1-$Ca_V3.2$ et pSEMxt-SNAP.

Construction ORL1-GFP

Pour réaliser cette construction, le gène ORL1 est amplifié par PCR à l'aide des amorces suivantes :

5'CTC CAG CAA ATG GAG CCC CTC TTC CCC GCG 3'

5' AGC TTT CAG TTG TCG TCG TCG TCG TCG TAG TCC ATT GCG GGC CGC 3'

Ces amorces, en plus de pouvoir amplifier le gène ORL1 comprennent les sites de restriction correspondant aux enzymes HindIII et Xho qui seront utilisées pour leur intégration dans le vecteur peGFP-N1. Les produits de PCR sont intégrés dans un vecteur pBlueScript digéré par l'enzyme ECORV permettant l'intégration d'ADN double brin à coupure nette sans site de restriction tel qu'obtenu par PCR. Après amplification du vecteur pbsk-ORL1 par midiprep, l'insert ORL1 est extrait à l'aide des enzymes HindIII et Xho et ligué dans le vecteur peGFP-N1 digéré par les mêmes enzymes.

Vecteur pHa-C1

Pour pouvoir réaliser aisément les différentes protéines tagguées HA en N-terminal dont j'ai eu besoin par la suite, j'ai remplacé le tag GFP d'un vecteur peGFP-N1 par le tag HA. Pour cela le tag a été extrait à l'aide des enzymes BamH1 et BsrG1, puis j'ai utilisé une paire d'oligonucléotides (MWG biotech) de séquence :

5' *GATCC* TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT *T* 3'

3' *G* ATG CGT ATG CTA CAA GGT CTA ATG CGA *ACATG* 5'

Site de restriction BamH1	Séquence du TAG HA	*Site de restriction BsRG1*

Ces oligonucleotides ont ensuite été appariés en les chauffant à 90 °C dans un tampon d'appariement (10 mM TrisHCL, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) puis chauffés à 90 °C pendant 10 minutes dans un bain marie qui a ensuite été éteint pour un refroidissement lent jusqu'à température ambiante. La courte séquence d'ADN double brin ainsi obtenue a ensuite été phosphorylée (T4 polynucléotide kinase, New England Biolabs) puis liguée dans le vecteur peGFP-C1 privé de son tag GFP pour obtenir le vecteur pHA-C1. Ce vecteur a été utilisé pour réaliser les constructions suivantes : ORL1-HA ; $Ca_V2.2$-HA ; $Ca_V2.2$ C-terminus-HA ; $Ca_V3.2$-HA.

<u>Culture cellulaire</u>

Les différentes expérimentations sur des cellules en culture ont été conduites sur des cellules TSA201 cultivées dans le milieu DMEM (Dubelco's modified Eagle Medium) avec glutamax (Gibco) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal. Les cultures ont été réalisées dans des plaques 6 puits (Falcon) pour les extractions protéiques des expériences de biochimie et dans des plaques 96 puits (Greiner) à cotés noirs et fond transparent pour les

expériences de TR-FRET, préalablement traitées pendant une heure minimum à la polyornithine (Sigma). Le fond des plaques est occulté lors de la lecture du FRET par des fonds de plaques autocollants (Perkin-Elmer backing tape). L'avantage de cette méthode par rapport aux plaques à fonds noirs est qu'il est possible de s'assurer visuellement du bon état des cellules et de leur transfection par microscopie classique à fluorescence avant l'expérience de FRET.

Vérification des constructions par Western Blot

Western Blot des RCPG taggués GFP

La transfection de chaque RCPG taggué GFP a été réalisée à partir de 2 µg de vecteur avec 5 µl de JetPeI (Polyplus transfection) dans des cultures cellulaires de TSA201. Trois jours après transfection, les cellules sont rincées avec du PBS (Gibco), et lysées pendant 20 minutes sur glace dans du tampon de lyse (150 mM NaCl ; 20 mM Tris pH = 7,5 ; 1% triton). Les puits sont ensuite grattés à l'aide de cells scrapers et le lysat est centrifugé pendant 20 minutes à 13 000 g à 4 C°.

Par la suite, le lysat est mélangé au tampon de charge protéique (New England Biolabs) puis mis à migrer dans un gel de polyacrylamide à 12%. Après migration les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose (Hybond-C; GE Healthcare), puis bloquées 30 minutes dans un tampon de saturation (PBS avec 4% de lait écrémé en poudre et 0,5% de tween 20). La membrane est incubée deux heures avec des anticorps anti-GFP (Anti-GFP chicken Invitrogen) au 1/10 000. La membrane est ensuite rincée deux fois dans le tampon de saturation puis incubée avec un anticorps secondaire anti-immunoglobulines de poulet couplé à la peroxydase de raifort au 1 / 5000 pendant deux heures. L'immunoréactivité est ensuite détectée avec un kit ECL (Pierce).

Migration SDS-PAGE des canaux taggués SNAP

Le canal $Ca_V2.2$-SNAP (2µg) a été transfecté avec ses sous-unités β1b (1µg) et α2δ (1µg). Le canal $Ca_V3.2$-SNAP (2µg) a été transfecté seul, les deux transfections ayant été réalisées avec 5µl de JetPeI. Le lysat cellulaire est préparé de la même manière que pour le Western Blot classique mais il est incubé avec 10% de BG vista green (New England Biolabs) avant d'être mélangé avec le tampon de migration et mis à migrer sur gel de polyacrylamide 10%.Le gel est ensuite lu à l'aide du typhoon trio+.

Enregistrements électrophysiologiques

Les courants macroscopiques ont été enregistrés à température ambiante suivant la technique du patch clamp en configuration cellule entière, en utilisant un amplificateur Axopatch 200B (Axon Instruments). La solution extracellulaire contenait 135mM NaCl, 20mM TEA, 2mM CaCl2, 1mM MgCl2, et 10mM HEPES (pH ajusté à 7,4 avec du KOH, ~330 mosM). Les pipettes de borosilicate possédaient une résistance typique de 1-2 MΩ et étaient remplies d'une solution interne qui contenait: 140mM CsCl, 10mM EGTA, 10mM HEPES, 3mM MgATP, 0.6mM NaGTP, et 2mM CaCl2 (pH ajusté à 7,2 avec du KOH, ~315 mosM). Les enregistrements ont été filtrés à 2 kHz. Les données ont été analysées avec les logiciels pCLAMP10 (Axon Instruments) et GraphPad Prism.

TR-FRET

TR-FRET entre $Ca_V2.2$ et protéines tagguées HA

Les cellules sont transfectées avec 0,1µg de $Ca_V2.2$-SNAP et 0,5 µg de β_{1b} et $\alpha_2\delta$ par puits ainsi que 0,1 µg de protéine interagissant avec le canal, chaque condition étant répétée dans 3 puits différents. Trois jours après transfection, les cellules sont rincées au PBS+ (Tampon PBS avec MG^{2+} et Ca^{2+}, Gibco) puis fixées 5 minutes à température ambiante avec du paraformaldéhyde 4%, puis rincées deux fois encore. Les cellules sont ensuite perméabilisées 10 minutes avec du PBS + triton 0,05 % et rincées deux fois avec du PBS + sérum de veau fœtal 10%. Le PBS + sérum est laissé 30 minutes à température ambiante pour saturer les cultures cellulaires. Les plaques sont ensuite incubées une nuit avec le ligand BG-XL647 et les anticorps TBP anti-HA couplés au cryptate de Terbium (Cisbio bioassay) à l'abri de la lumière. Les plaques sont ensuite rincées deux fois 10 minutes puis lues sur le rubystar (BMG Labtech) à 620 nm pour le donneur et 665 nm pour l'accepteur.

TR-FRET entre $Ca_V2.2$-SNAP et RCPG-GFP

Les cellules dans les plaques 96 puits sont transfectées en reproduisant chaque condition dans 6 puits différents. 0,1µg de $Ca_V2.2$-SNAP et 0,05 µg de β_{1b} et $\alpha_2\delta$ sont transfectés dans chaque puits ; les quantités de RCPG-GFP transfectées varient entre 0,05 µg et 0,2 µg. Trois jours après transfection les plaques sont rincées avec du PBS+ puis fixées avec du parafomaldéhyde 4% pendant 20 minutes. Les plaques sont ensuite rincées au PBS+ puis la fluorescence de la GFP est lue sur un Infinite F500 (Tecan) ; l'excitation est à 485 nm

et lecture de la fluorescence à 520 nm. Cette lecture permet de vérifier l'efficacité de la transfection avant l'incubation pendant deux heures à température ambiante avec 1 µM de Lumi4Tb (Cisbio bioassay) et 0,1% saponine dans du PBS+ à l'abri de la lumière. Les plaques sont ensuite rincées trois fois 10 minutes et lues sur le même appareil en mesurant la fluorescence du donneur cryptate de Terbium (excitation à 320 nm et lecture à 620 nm), la fluorescence du FRET (excitation à 320 nm, lecture après un délai de 500 µs à 520 nm) et la fluorescence de l'accepteur GFP (excitation à 485 nm et lecture à 520 nm). J'ai ensuite calculé le ratio fluorescence du FRET / fluorescence du donneur et calculé la valeur moyenne pour les 6 puits ayant été transfectés de la même manière.

Pour les expériences de TR-FRET où l'effet des peptides découplants TAT-ORL1 et contrôle TAT-Scramble ont été testés, les cellules ont étés incubées 30 minutes avant le début de l'expérimentation dans du milieu DMEM plus glutamax, 10% SVF avec 1µM de chaque peptide ou du milieu neutre puis l'expérimentation s'est déroulée comme précédemment, excepté le fait que tous les rinçages et incubations qui ont suivi ont été faits en conservant la concentration de 1µM de peptide TAT-ORL1 ou TAT-Scramble dans les différentes solutions (sauf pour la condition contrôle).

Expérimentations In Vivo

Ces expérimentations ont été conduites dans l'animalerie A2 du laboratoire de Pharmacologie fondamentale et clinique de la douleur de l'Université d'Auvergne Clermont 1 à Clermont-Ferrand, avec l'aide de Mr Abdelkarim Allaoui.

Les souris Black-6 ont été soumises à un protocole d'induction de tolérance à la morphine en réalisant 5 jours consécutifs une injection intrathécale de 10 µg de morphine. Les animaux ont été répartis en 6 groupes de 8 individus, 3 groupes recevant une injection de sérum physiologique et les 3 autres recevant l'injection de morphine. 30 minutes avant cette injection les animaux recevaient soit une injection de sérum physiologique, soit une injection de 100 nmol peptide TAT-Scramble, soit une injection de 100 nmol peptide TAT-ORL1. 5 minutes après l'injection de morphine ou l'injection contrôle, l'analgésie des animaux a été mesurée par un test d'immersion de la queue dans un bain marie à 46 °C, la latence avant que l'animal cherche se soustraire à la température élevée étant relevée puis moyennée au sein de chaque groupe. Les animaux étaient placés sur le dos dans un chiffon tenu en forme de hamac de manière à ce que leur queue dépasse vers le bas et puisse être aisément plongée dans le bain marie. En cas d'analgésie profonde des animaux, ils étaient retirés de l'eau au bout d'un temps de 30s pour éviter les lésions tissulaires.

Annexe2: Références bibliographiques

Adams PJ, Garcia E, David LS, Mulatz KJ, Spacey SD, Snutch TP (2009) Ca(V)2.1 P/Q-type calcium channel alternative splicing affects the functional impact of familial hemiplegic migraine mutations: implications for calcium channelopathies. *Channels (Austin)* **3:** 110-121

Altier C, Dale CS, Kisilevsky AE, Chapman K, Castiglioni AJ, Matthews EA, Evans RM, Dickenson AH, Lipscombe D, Vergnolle N, Zamponi GW (2007) Differential role of N-type calcium channel splice isoforms in pain. *J Neurosci* **27:** 6363-6373

Altier C, Dubel SJ, Barrere C, Jarvis SE, Stotz SC, Scott JD, Nargeot J, Zamponi GW, Bourinet E (2012) AKAP79 modulation of L-type channels involves disruption of intramolecular interactions in the CaV 1.2 subunit. *Channels (Austin)* **6**

Altier C, Dubel SJ, Barrere C, Jarvis SE, Stotz SC, Spaetgens RL, Scott JD, Cornet V, De Waard M, Zamponi GW, Nargeot J, Bourinet E (2002) Trafficking of L-type calcium channels mediated by the postsynaptic scaffolding protein AKAP79. *J Biol Chem* **277:** 33598-33603

Altier C, Khosravani H, Evans RM, Hameed S, Peloquin JB, Vartian BA, Chen L, Beedle AM, Ferguson SS, Mezghrani A, Dubel SJ, Bourinet E, McRory JE, Zamponi GW (2006) ORL1 receptor-mediated internalization of N-type calcium channels. *Nat Neurosci* **9:** 31-40

Andrade A, Denome S, Jiang YQ, Marangoudakis S, Lipscombe D (2010) Opioid inhibition of N-type Ca2+ channels and spinal analgesia couple to alternative splicing. *Nat Neurosci* **13:** 1249-1256

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

Barker EL, Westphal RS, Schmidt D, Sanders-Bush E (1994) Constitutively active 5-hydroxytryptamine2C receptors reveal novel inverse agonist activity of receptor ligands. *J Biol Chem* **269:** 11687-11690

Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D (2009) Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* **139:** 267-284

Bastiaens P, Squire A (1999) Fluorescence lifetime imaging microscopy: spatial resolution of biochemical processes in the cell. *Trens in Cell Biology* **9:** 48-52

Bauer CS, Rahman W, Tran-van-Minh A, Lujan R, Dickenson AH, Dolphin AC (2010a) The anti-allodynic alpha(2)delta ligand pregabalin inhibits the trafficking of the calcium channel alpha(2)delta-1 subunit to presynaptic terminals in vivo. *Biochem Soc Trans* **38:** 525-528

Bauer CS, Tran-Van-Minh A, Kadurin I, Dolphin AC (2010b) A new look at calcium channel alpha2delta subunits. *Curr Opin Neurobiol* **20:** 563-571

Bean BP (1989) Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage dependence. *Nature* **340:** 153-156

Beedle AM, McRory JE, Poirot O, Doering CJ, Altier C, Barrere C, Hamid J, Nargeot J, Bourinet E, Zamponi GW (2004) Agonist-independent modulation of N-type calcium channels by ORL1 receptors. *Nat Neurosci* **7:** 118-125

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

Blair LA, Bence-Hanulec KK, Mehta S, Franke T, Kaplan D, Marshall J (1999) Akt-dependent potentiation of L channels by insulin-like growth factor-1 is required for neuronal survival. *J Neurosci* **19:** 1940-1951

Bockaert J, Pin JP (1998) [Use of a G-protein-coupled receptor to communicate. An evolutionary success]. *C R Acad Sci III* **321:** 529-551

Bockaert J, Pin JP (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *Embo J* **18:** 1723-1729

Bourinet E, Alloui A, Monteil A, Barrere C, Couette B, Poirot O, Pages A, McRory J, Snutch TP, Eschalier A, Nargeot J (2005) Silencing of the Cav3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception. *Embo J* **24:** 315-324

Bourinet E, Soong TW, Stea A, Snutch TP (1996) Determinants of the G protein-dependent opioid modulation of neuronal calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93:** 1486-1491.

Bourinet E, Soong TW, Sutton K, Slaymaker S, Mathews E, Monteil A, Zamponi GW, Nargeot J, Snutch TP (1999) Splicing of alpha 1A subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels. *Nat Neurosci* **2:** 407-415.

Bouvier M, Hausdorff WP, De Blasi A, O'Dowd BF, Kobilka BK, Caron MG, Lefkowitz RJ (1988) Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature* **333:** 370-373

Brem G, Brening B (1993) [Use of molecular genetic diagnosis of malignant hyperthermic syndrome (MHS) in selection of pigs]. *Genetika* **29:** 1009-1013

Briscini L, Corradini L, Ongini E, Bertorelli R (2002) Up-regulation of ORL-1 receptors in spinal tissue of allodynic rats after sciatic nerve injury. *Eur J Pharmacol* **447:** 59-65

Brittain JM, Duarte DB, Wilson SM, Zhu W, Ballard C, Johnson PL, Liu N, Xiong W, Ripsch MS, Wang Y, Fehrenbacher JC, Fitz SD, Khanna M, Park CK, Schmutzler BS, Cheon BM, Due MR, Brustovetsky T, Ashpole NM, Hudmon A, Meroueh SO, Hingtgen CM, Brustovetsky N, Ji RR, Hurley JH, Jin X, Shekhar A, Xu XM, Oxford GS, Vasko MR, White FA, Khanna R (2011) Suppression of inflammatory and neuropathic pain by uncoupling CRMP-2 from the presynaptic Ca(2)(+) channel complex. *Nat Med* **17:** 822-829

Cabrera-Vera TM, Vanhauwe J, Thomas TO, Medkova M, Preininger A, Mazzoni MR, Hamm HE (2003) Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocrine reviews* **24:** 765-781

Catterall WA (2011) Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **3:** a003947

Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J (2005) International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* **57:** 411-425

Catterall WA, Striessnig J, Snutch TP, Perez-Reyes E (2003) International Union of Pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated ion channels: calcium channels. *Pharmacol Rev* **55:** 579-581

Chan SS, Arndt-Jovin DJ, Jovin TM (1979) Proximity of lectin receptors on the cell surface measured by fluorescence energy transfer in a flow system. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **27:** 56-64

Chemin J, Monteil A, Bourinet E, Nargeot J, Lory P (2001a) Alternatively spliced alpha(1G) (Ca(V)3.1) intracellular loops promote specific T-type Ca(2+) channel gating properties. *Biophys J* **80:** 1238-1250.

Chemin J, Monteil A, Briquaire C, Richard S, Perez-Reyes E, Nargeot J, Lory P (2000) Overexpression of T-type calcium channels in HEK-293 cells increases intracellular calcium without affecting cellular proliferation. *FEBS Lett* **478:** 166-172

Chemin J, Monteil A, Perez-Reyes E, Nargeot J, Lory P (2001b) Direct inhibition of T-type calcium channels by the endogenous cannabinoid anandamide. *EMBO J* **20:** 7033-7040

Chemin J, Nargeot J, Lory P (2007) Chemical determinants involved in anandamide-induced inhibition of T-type calcium channels. *J Biol Chem* **282:** 2314-2323

Chemin J, Traboulsie A, Lory P (2006) Molecular pathways underlying the modulation of T-type calcium channels by neurotransmitters and hormones. *Cell Calcium* **40:** 121-134

Chen CC, Lamping KG, Nuno DW, Barresi R, Prouty SJ, Lavoie JL, Cribbs LL, England SK, Sigmund CD, Weiss RM, Williamson RA, Hill JA, Campbell KP (2003) Abnormal coronary function in mice deficient in alpha1H T-type Ca2+ channels. *Science* **302:** 1416-1418

Chen RS, Deng TC, Garcia T, Sellers ZM, Best PM (2007) Calcium channel gamma subunits: a functionally diverse protein family. *Cell Biochem Biophys* **47:** 178-186

Chidiac P, Hebert TE, Valiquette M, Dennis M, Bouvier M (1994) Inverse agonist activity of beta-adrenergic antagonists. *Mol Pharmacol* **45:** 490-499

Choi S, Na HS, Kim J, Lee J, Lee S, Kim D, Park J, Chen CC, Campbell KP, Shin HS (2007) Attenuated pain responses in mice lacking Ca(V)3.2 T-type channels. *Genes Brain Behav* **6:** 425-431

Cohen C, Perrault G, Sanger DJ (1997) Assessment of the antidepressant-like effects of L-type voltage-dependent channel modulators. *Behavioural pharmacology* **8:** 629-638

Cooper CB, Arnot MI, Feng ZP, Jarvis SE, Hamid J, Zamponi GW (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

Cox DH, Dunlap K (1994) Inactivation of N-type calcium current in chick sensory neurons: calcium and voltage dependence. *J Gen Physiol* **104:** 311-336

Cribbs LL, Lee JH, Yang J, Satin J, Zhang Y, Daud A, Barclay J, Williamson MP, Fox M, Rees M, Perez-Reyes E (1998) Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca2+ channel gene family. *Circ Res* **83:** 103-109.

Dale RE, Eisinger J, Blumberg WE (1979) The orientational freedom of molecular probes. The orientation factor in intramolecular energy transfer. *Biophys J* **26:** 161-193

Davare MA, Avdonin V, Hall DD, Peden EM, Burette A, Weinberg RJ, Horne MC, Hoshi T, Hell JW (2001) A beta2 adrenergic receptor signaling complex assembled with the Ca2+ channel Cav1.2. *Science* **293:** 98-101.

Davies A, Kadurin I, Alvarez-Laviada A, Douglas L, Nieto-Rostro M, Bauer CS, Pratt WS, Dolphin AC (2010) The alpha2delta subunits of voltage-gated calcium channels form GPI-anchored proteins, a posttranslational modification essential for function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107:** 1654-1659

De Lean A, JM S, RJ L (1980) A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *Journal of Biological Chemestry* **255:** 7108-7117

De Vries L, Mousli M, A W, MG F (1995) GAIP, a protein that specifically interacts with the trimeric G protein G alpha i3, is a member of a protein family with a highly conserved core domain. *proceedings of National Academy of Sciences USA* **92:** 11916-11920

De Waard M, Hering J, Weiss N, Feltz A (2005) How do G proteins directly control neuronal Ca2+ channel function? *Trends Pharmacol Sci* **26:** 427-436

De Waard M, Liu H, Walker D, Scott VE, Gurnett CA, Campbell KP (1997) Direct binding of G-protein betagamma complex to voltage-dependent calcium channels. *Nature* **385:** 446-450

Dery O, Thoma MS, Wong H, Grady EF, Bunnett NW (1999) Trafficking of proteinase-activated receptor-2 and beta-arrestin-1 tagged with green fluorescent protein. beta-Arrestin-dependent endocytosis of a proteinase receptor. *J Biol Chem* **274:** 18524-18535

Dias da Silva MR, Cerutti JM, Tengan CH, Furuzawa GK, Vieira TC, Gabbai AA, Maciel RM (2002) Mutations linked to familial hypokalaemic periodic paralysis in the calcium channel alpha1 subunit gene (Cav1.1) are not associated with thyrotoxic hypokalaemic periodic paralysis. *Clin Endocrinol (Oxf)* **56:** 367-375

Dietz GP, Bahr M (2005) Peptide-enhanced cellular internalization of proteins in neuroscience. *Brain Res Bull* **68:** 103-114

Doering CJ, Zamponi GW (2003) Molecular pharmacology of high voltage-activated calcium channels. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **35:** 491-505

Doering CJ, Zamponi GW (2005) Molecular pharmacology of non-L-type calcium channels. *Curr Pharm Des* **11:** 1887-1898

Dolan M, Pegg A (1997) O6-benzylguanine and its role in chemotherapy. *Clinical Cancer Research* **3:** 837-847

Dolmetsch R (2003) Excitation-transcription coupling: signaling by ion channels to the nucleus. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* **2003:** PE4

Dresviannikov AV, Page KM, Leroy J, Pratt WS, Dolphin AC (2009) Determinants of the voltage dependence of G protein modulation within calcium channel beta subunits. *Pflugers Arch* **457:** 743-756

Dreyfus FM, Tscherter A, Errington AC, Renger JJ, Shin HS, Uebele VN, Crunelli V, Lambert RC, Leresche N (2009) Selective T-type calcium channel block in thalamic neurons reveals channel redundancy and physiological impact of I(T)window. *J Neurosci* **30:** 99-109

Dubel SJ, Altier C, Chaumont S, Lory P, Bourinet E, 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

Dunlap K, Fischbach GD (1981) Neurotransmitters decrease the calcium conductance activated by depolarization of embryonic chick sensory neurones. *J Physiol* **317:** 519-535

Evans RM, You H, Hameed S, Altier C, Mezghrani A, Bourinet E, Zamponi GW (2010) Heterodimerization of ORL1 and opioid receptors and its consequences for N-type calcium channel regulation. *J Biol Chem* **285:** 1032-1040

Federman AD, Conklin BR, Schrader KA, Reed RR, Bourne HR (1992) Hormonal stimulation of adenylyl cyclase through Gi-protein beta gamma subunits. *Nature* **356:** 159-161

Felder CB, Graul RC, Lee AY, Merkle HP, W S (1999) The Venus flytrap of periplasmic binding proteins: an ancient protein module present in multiple drug receptors. *AAPS PharmSci* **1:** E2

Ferguson SS, Barak LS, Zhang J, Caron MG (1996) G-protein-coupled receptor regulation: role of G-protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Can J Physiol Pharmacol* **74:** 1095-1110

Francois A, Kerckhove N, Meleine M, Alloui A, Barrere C, Gelot A, Uebele VN, Renger JJ, Eschalier A, Ardid D, Bourinet E (2012) State dependent properties of a new T-type calcium channel blocker enhance CaV3.2 selectivity and support analgesic effects. *Pain* **In press**

Frankel AD, Pabo CO (1988) Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* **55:** 1189-1193

Fredriksson R, Schioth HB (2005) The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Mol Pharmacol* **67:** 1414-1425

Fung J, Malouin F, McFadyen BJ, Comeau F, Lamontagne A, Chapdelaine S, Beaudoin C, Laurendeau D, Hughey L, Richards CL (2004) Locomotor rehabilitation in a complex virtual environment. *Conference proceedings : Annual International Conference of the IEEE*

Engineering in Medicine and Biology Society IEEE Engineering in Medicine and Biology Society Conference **7:** 4859-4861

Garritsen A, PJ VG, WF S (1993) The N-terminal coiled-coil domain of beta is essential for gamma association: a model for Gprotein beta gamma subunit interaction. *Proceedings of National Academy of Sciences* **90:** 7706-7710

Gershengorn MC, Osman R (2001) Minireview: Insights into G protein-coupled receptor function using molecular models. *Endocrinology* **142:** 2-10

Gether U, Kobilka B (1998) G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *Journal of Biological Chemestry* **273:** 17979-17982

Gilman AG (1987) G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annual Review of Biochemestry* **56:** 615-649

Gomez-Ospina N, Tsuruta F, Barreto-Chang O, Hu L, Dolmetsch R (2006) The C terminus of the L-type voltage-gated calcium channel Ca(V)1.2 encodes a transcription factor. *Cell* **127:** 591-606

Gray AC, Raingo J, Lipscombe D (2007) Neuronal calcium channels: splicing for optimal performance. *Cell Calcium* **42:** 409-417

Green EM, Barrett CF, Bultynck G, Shamah SM, Dolmetsch RE (2007) The tumor suppressor eIF3e mediates calcium-dependent internalization of the L-type calcium channel CaV1.2. *Neuron* **55:** 615-632

Gregan B, Jurgensen J, Papsdorf G, Furkert J, Schaefer M, Beyermann M, Rosenthal W, Oksche A (2004) Ligand-dependent differences in the internalization of endothelin A and endothelin B receptor heterodimers. *J Biol Chem* **279:** 27679-27687

Guida S, Trettel F, Pagnutti S, Mantuano E, Tottene A, Veneziano L, Fellin T, Spadaro M, Stauderman K, Williams M, Volsen S, Ophoff R, Frants R, Jodice C, Frontali M, Pietrobon D (2001) Complete loss of P/Q calcium channel activity caused by a CACNA1A missense mutation carried by patients with episodic ataxia type 2. *American journal of human genetics* **68:** 759-764.

Hans M, Luvisetto S, Williams ME, Spagnolo M, Urrutia A, Tottene A, Brust PF, Johnson EC, Harpold MM, Stauderman KA, Pietrobon D (1999) Functional consequences of mutations in the human alpha1A calcium channel subunit linked to familial hemiplegic migraine. *J Neurosci* **19:** 1610-1619

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, Shoji S (2001) Differential nociceptive responses in mice lacking the alpha(1B) subunit of N-type Ca(2+) channels. *Neuroreport* **12:** 2423-2427.

Hausdorff WP, Bouvier M, O'Dowd BF, Irons GP, Caron MG, Lefkowitz RJ (1989) Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J Biol Chem* **264:** 12657-12665

Hawkins N, Richards PS, Granley HM, Stein DM (2004) The impact of exposure to the thin-ideal media image on women. *Eating disorders* **12:** 35-50

He L, Bradrick TD, Karpova TS, Wu X, Fox MH, Fischer R, McNally JG, Knutson JR, Grammer AC, Lipsky PE (2003) Flow cytometric measurement of fluorescence (Forster) resonance energy transfer from cyan fluorescent protein to yellow fluorescent protein using single-laser excitation at 458 nm. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* **53:** 39-54

Hell JW, Westenbroek RE, Warner C, Ahlijanian MK, Prystay W, Gilbert MM, Snutch TP, Catterall WA (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.

Herce HD, Garcia AE (2007a) Cell penetrating peptides: how do they do it? *Journal of biological physics* **33:** 345-356

Herce HD, Garcia AE (2007b) Molecular dynamics simulations suggest a mechanism for translocation of the HIV-1 TAT peptide across lipid membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104:** 20805-20810

Herce HD, Garcia AE, Litt J, Kane RS, Martin P, Enrique N, Rebolledo A, Milesi V (2009) Arginine-rich peptides destabilize the plasma membrane, consistent with a pore formation translocation mechanism of cell-penetrating peptides. *Biophys J* **97:** 1917-1925

Hering J, Feltz A, Lambert RC (2004) Slow inactivation of the Ca(V)3.1 isotype of T-type calcium channels. *J Physiol* **555:** 331-344

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 alpha1A subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94:** 1512-1516

Hibert MF, Trumpp-Kallmeyer S, Bruinvels A, Hoflack J (1991) Three-dimensional models of neurotransmitter G-binding protein-coupled receptors. *Mol Pharmacol* **40:** 8-15

Hidalgo P, Neely A (2007) Multiplicity of protein interactions and functions of the voltage-gated calcium channel beta-subunit. *Cell Calcium* **42:** 389-396

Hildebrand ME, David LS, Hamid J, Mulatz K, Garcia E, Zamponi GW, Snutch TP (2007) Selective inhibition of Cav3.3 T-type calcium channels by Galphaq/11-coupled muscarinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem* **282:** 21043-21055

Hildebrand ME, Isope P, Miyazaki T, Nakaya T, Garcia E, Feltz A, Schneider T, Hescheler J, Kano M, Sakimura K, Watanabe M, Dieudonne S, Snutch TP (2009) Functional coupling between mGluR1 and Cav3.1 T-type calcium channels contributes to parallel fiber-induced fast calcium signaling within Purkinje cell dendritic spines. *J Neurosci* **29:** 9668-9682

Huang H, Tan BZ, Shen Y, Tao J, Jiang F, Sung YY, Ng CK, Raida M, Kohr G, Higuchi M, Fatemi-Shariatpanahi H, Harden B, Yue DT, Soong TW (2012) RNA editing of the IQ domain in Ca(v)1.3 channels modulates their Ca(2)(+)-dependent inactivation. *Neuron* **73:** 304-316

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, 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

Isope P, Hildebrand ME, Snutch TP (2012) Contributions of T-type voltage-gated calcium channels to postsynaptic calcium signaling within Purkinje neurons. *Cerebellum* **11:** 651-665

Jarvis SE, Zamponi GW (2007) Trafficking and regulation of neuronal voltage-gated calcium channels. *Curr Opin Cell Biol* **19:** 474-482

Jevtovic-Todorovic V, Todorovic SM (2006) The role of peripheral T-type calcium channels in pain transmission. *Cell Calcium* **40:** 197-203

Juillerat A, Gronemeyer T, Keppler A, Gendreizig S, Pick H, Vogel H, Johnsson K (2003) Directed evolution of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase for efficient labeling of fusion proteins with small molecules in vivo. *Chem Biol* **10:** 313-317

Juillerat A, Heinis C, Sielaff I, Barnikow J, Jaccard H, Kunz B, Terskikh A, Johnsson K (2005) Engineering substrate specificity of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase for specific protein labeling in living cells. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **6:** 1263-1269

Jun K, Piedras-Renteria ES, Smith SM, Wheeler DB, Lee SB, Lee TG, Chin H, Adams ME, Scheller RH, Tsien RW, Shin HS (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

Kamp TJ, Hell JW (2000) Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. *Circ Res* **87:** 1095-1102

Katz A, Wu D, Simon MI (1992) Subunits beta gamma of heterotrimeric G protein activate beta 2 isoform of phospholipase C. *Nature* **360:** 686-689

Keir JA, McGregor R, Richards CJ, Windle R (2004) An unusual presentation of Crohn's disease. *Annals of the Royal College of Surgeons of England* **86:** W22-23

Kenakin T (2002) Efficacy at G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Drug Discov* **1:** 103-110

Kim C, Jun K, Lee T, Kim SS, McEnery MW, Chin H, Kim HL, Park JM, Kim DK, Jung SJ, Kim J, Shin HS (2001a) Altered nociceptive response in mice deficient in the alpha(1B) subunit of the voltage-dependent calcium channel. *Mol Cell Neurosci* **18:** 235-245

Kim D, Lewis DL, Graziadei L, Neer EJ, D B-S, DE C (1989) G-protein beta gammasubunits activate the cardiac muscarinic K+-channel via phospholipase A2. *Nature* **337:** 557-560

Kim D, Song I, Keum S, Lee T, Jeong MJ, Kim SS, McEnery MW, Shin HS (2001b) Lack of the burst firing of thalamocortical relay neurons and resistance to absence seizures in mice lacking alpha(1G) T-type Ca(2+) channels. *Neuron* **31:** 35-45

Kisilevsky AE, Mulligan SJ, Altier C, Iftinca MC, Varela D, Tai C, Chen L, Hameed S, Hamid J, Macvicar BA, Zamponi GW (2008) D1 receptors physically interact with N-type calcium channels to regulate channel distribution and dendritic calcium entry. *Neuron* **58:** 557-570

Kisilevsky AE, Zamponi GW (2008) D2 dopamine receptors interact directly with N-type calcium channels and regulate channel surface expression levels. *Channels (Austin)* **2:** 269-277

Kitano J, Nishida M, Itsukaichi Y, Minami I, Ogawa M, Hirano T, Mori Y, Nakanishi S (2003) Direct interaction and functional coupling between metabotropic glutamate receptor subtype 1 and voltage-sensitive Cav2.1 Ca2+ channel. *J Biol Chem* **278:** 25101-25108

Kordasiewicz HB, Thompson RM, Clark HB, Gomez CM (2006) C-termini of P/Q-type Ca2+ channel alpha1A subunits translocate to nuclei and promote polyglutamine-mediated toxicity. *Human molecular genetics* **15:** 1587-1599

Kristiansen (2004) Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the
superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacology and Therapeutics* **103:** 21-80

Lapie P, Goudet C, Nargeot J, Fontaine B, Lory P (1996) Electrophysiological properties of the hypokalaemic periodic paralysis mutation (R528H) of the skeletal muscle alpha 1s subunit as expressed in mouse L cells. *FEBS Lett* **382:** 244-248

Lee A, Wong ST (1999) Ca2+/calmodulin binds to and modulates P/Q-type calcium channels. *Nature* **399:** 155-159

Lee JH, Daud AN, Cribbs LL, Lacerda AE, Pereverzev A, Klockner U, Schneider T, Perez-Reyes E (1999) Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. *J Neurosci* **19:** 1912-1921.

Lipscombe D, Andrade A, Allen SE (2012) Alternative splicing: Functional diversity among voltage-gated calcium channels and behavioral consequences. *Biochim Biophys Acta*

Lipscombe D, Raingo J (2007) Alternative splicing matters: N-type calcium channels in nociceptors. *Channels (Austin)* **1:** 225-227

Lohse MJ, Benovic JL, Caron MG, Lefkowitz RJ (1990) Multiple pathways of rapid beta 2-adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors. *J Biol Chem* **265:** 3202-3211

Lohse MJ, Lefkowitz RJ, Caron MG, Benovic JL (1989) Inhibition of beta-adrenergic receptor kinase prevents rapid homologous desensitization of beta 2-adrenergic receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86:** 3011-3015

Lory P, Bidaud I, Chemin J (2006) T-type calcium channels in differentiation and proliferation. *Cell Calcium* **40:** 135-146

Mangoni ME, Couette B, Bourinet E, Platzer J, Reimer D, Striessnig J, Nargeot J (2003) Functional role of L-type Cav1.3 Ca2+ channels in cardiac pacemaker activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100:** 5543-5548

Mangoni ME, Traboulsie A, Leoni AL, Couette B, Marger L, Le Quang K, Kupfer E, Cohen-Solal A, Vilar J, Shin HS, Escande D, Charpentier F, Nargeot J, Lory P (2006) Bradycardia and slowing of the atrioventricular conduction in mice lacking CaV3.1/alpha1G T-type calcium channels. *Circ Res* **98:** 1422-1430

Mansergh F, Orton NC, Vessey JP, Lalonde MR, Stell WK, Tremblay F, Barnes S, Rancourt DE, Bech-Hansen NT (2005) Mutation of the calcium channel gene Cacna1f disrupts calcium signaling, synaptic transmission and cellular organization in mouse retina. *Human molecular genetics* **14:** 3035-3046

Marangoudakis S, Andrade A, Helton TD, Denome S, Castiglioni AJ, Lipscombe D (2012) Differential ubiquitination and proteasome regulation of Ca(V)2.2 N-type channel splice isoforms. *J Neurosci* **32:** 10365-10369

Marger F, Gelot A, Alloui A, Matricon J, Ferrer JF, Barrere C, Pizzoccaro A, Muller E, Nargeot J, Snutch TP, Eschalier A, Bourinet E, Ardid D (2011) T-type calcium channels contribute to colonic hypersensitivity in a rat model of irritable bowel syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108:** 11268-11273

Matthews E, Hanna MG (2010) Muscle channelopathies: does the predicted channel gating pore offer new treatment insights for hypokalaemic periodic paralysis? *J Physiol* **588:** 1879-1886

Maximov A, Bezprozvanny I (2002) Synaptic targeting of N-type calcium channels in hippocampal neurons. *J Neurosci* **22:** 6939-6952

Maximov A, Sudhof TC, Bezprozvanny I (1999) Association of neuronal calcium channels with modular adaptor proteins. *J Biol Chem* **274:** 24453-24456.

McCarron JG, McGeown JG, Reardon S, Ikebe M, Fay FS, Walsh JV, Jr. (1992) Calcium-dependent enhancement of calcium current in smooth muscle by calmodulin-dependent protein kinase II. *Nature* **357:** 74-77

McKeown L, Robinson P, Jones OT (2006) Molecular basis of inherited calcium channelopathies: role of mutations in pore-forming subunits. *Acta Pharmacol Sin* **27:** 799-812

McRory JE, Santi CM, Hamming KS, Mezeyova J, Sutton KG, Baillie DL, Stea A, Snutch TP (2001) Molecular and Functional Characterization of a Family of Rat Brain T- type Calcium Channels. *J Biol Chem* **276:** 3999-4011

Messinger RB, Naik AK, Jagodic MM, Nelson MT, Lee WY, Choe WJ, Orestes P, Latham JR, Todorovic SM, Jevtovic-Todorovic V (2009) In vivo silencing of the Ca(V)3.2 T-type calcium channels in sensory neurons alleviates hyperalgesia in rats with streptozocin-induced diabetic neuropathy. *Pain* **145:** 184-195

Mezghrani A, Monteil A, Watschinger K, Sinnegger-Brauns MJ, Barrere C, Bourinet E, Nargeot J, Striessnig J, Lory P (2008) A destructive interaction mechanism accounts for

dominant-negative effects of misfolded mutants of voltage-gated calcium channels. *J Neurosci* **28:** 4501-4511

Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, Tsien RY (1997) Fluorescent indicators for Ca2+ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* **388:** 882-887

Mizoguchi H, Watanabe C, Yonezawa A, Sakurada S (2009) New therapy for neuropathic pain. *International review of neurobiology* **85:** 249-260

Monteil A, Chemin J, Bourinet E, Mennessier G, Lory P, Nargeot J (2000a) Molecular and functional properties of the human alpha(1G) subunit that forms T-type calcium channels. *J Biol Chem* **275:** 6090-6100.

Monteil A, Chemin J, Leuranguer V, Altier C, Mennessier G, Bourinet E, Lory P, Nargeot J (2000b) Specific properties of T-type calcium channels generated by the human alpha 1I subunit. *J Biol Chem* **275:** 16530-16535.

Morrill JA, Cannon SC (1999) Effects of mutations causing hypokalaemic periodic paralysis on the skeletal muscle L-type Ca2+ channel expressed in Xenopus laevis oocytes. *J Physiol* **520 Pt 2:** 321-336

Neer E (1995) Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* **80:** 249-257

Nelson MT, Woo J, Kang HW, Vitko I, Barrett PQ, Perez-Reyes E, Lee JH, Shin HS, Todorovic SM (2007) Reducing agents sensitize C-type nociceptors by relieving high-affinity zinc inhibition of T-type calcium channels. *J Neurosci* **27:** 8250-8260

O'Hara PJ, Sheppard PO, Thogersen H, Venezia D, Haldeman BA, McGrane V, Houamed KM, Thomsen C, TL G, ER M (1993) The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. *Neuron* **11:** 41-52

Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Caron MG, Barak LS (2000) Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem* **275:** 17201-17210

Obermair GJ, Tuluc P, Flucher BE (2008) Auxiliary Ca(2+) channel subunits: lessons learned from muscle. *Curr Opin Pharmacol* **8:** 311-318

Ormo M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY, Remington SJ (1996) Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein. *Science* **273:** 1392-1395

Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289:** 739-745

Payandeh J, Scheuer T, Zheng N, Catterall WA (2011) The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* **475:** 353-358

Peloquin JB, Khosravani H, Barr W, Bladen C, Evans R, Mezeyova J, Parker D, Snutch TP, McRory JE, Zamponi GW (2006) Functional analysis of Ca3.2 T-type calcium channel mutations linked to childhood absence epilepsy. *Epilepsia* **47:** 655-658

Perez-Reyes E (1998) Molecular characterization of a novel family of low voltage-activated, T-type, calcium channels. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **30:** 313-318.

Perez-Reyes E (2003) Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev* **83:** 117-161

Perez-Reyes E, Cribbs LL, Daud A, Lacerda AE, Barclay J, Williamson MP, Fox M, Rees M, Lee JH (1998) Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* **391:** 896-900.

Pierce KL, Premont RT, RJ L (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*
3: 639-650

Pietrobon D (2002) Calcium channels and channelopathies of the central nervous system. *Mol Neurobiol* **25:** 31-50

Pin JP, Bockaert J (1995) Get receptive to metabotropic glutamate receptors. *Curr Opin Neurobiol* **5:** 342-349

Platzer J, Engel J, Schrott-Fischer A, Stephan K, Bova S, Chen H, Zheng H, Striessnig J (2000) Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca2+ channels. *Cell* **102:** 89-97

Powell KL, Cain SM, Ng C, Sirdesai S, David LS, Kyi M, Garcia E, Tyson JR, Reid CA, Bahlo M, Foote SJ, Snutch TP, O'Brien TJ (2009) A Cav3.2 T-type calcium channel point mutation has splice-variant-specific effects on function and segregates with seizure expression in a polygenic rat model of absence epilepsy. *J Neurosci* **29:** 371-380

Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ (1992) Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. *Gene* **111:** 229-233

Przewlocki R, Parsons KL, Sweeney DD, Trotter C, Netzeband JG, Siggins GR, Gruol DL (1999) Opioid enhancement of calcium oscillations and burst events involving NMDA receptors and L-type calcium channels in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* **19:** 9705-9715

Rabik CA, Njoku MC, Dolan ME (2006) Inactivation of O6-alkylguanine DNA alkyltransferase as a means to enhance chemotherapy. *Cancer treatment reviews* **32:** 261-276

Raingo J, Castiglioni AJ, Lipscombe D (2007) Alternative splicing controls G protein-dependent inhibition of N-type calcium channels in nociceptors. *Nat Neurosci* **10:** 285-292

Ray SB, Gupta YK, Wadhwa S (2005) Expression of opioid receptor-like 1 (ORL1) & mu opioid receptors in the spinal cord of morphine tolerant mice. *Indian J Med Res* **121:** 194-202

Richards MW, Butcher AJ, Dolphin AC (2004) Ca2+ channel beta-subunits: structural insights AID our understanding. *Trends Pharmacol Sci* **25:** 626-632

Rizzo MA, Springer GH, Granada B, Piston DW (2004) An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nat Biotechnol* **22:** 445-449

Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Patel SC, Patel RC, Patel YC (2000) Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science* **288:** 154-157

Saegusa H, Kurihara T, Zong S, Kazuno A, Matsuda Y, Nonaka T, Han W, Toriyama H, Tanabe T (2001) Suppression of inflammatory and neuropathic pain symptoms in mice lacking the N-type Ca2+ 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, Tanabe T (2000) Altered pain responses in mice lacking alpha 1E subunit of the voltage- dependent Ca2+ channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97:** 6132-6137.

Santi CM, Cayabyab FS, Sutton KG, McRory JE, Mezeyova J, Hamming KS, Parker D, Stea A, Snutch TP (2002) Differential inhibition of T-type calcium channels by neuroleptics. *J Neurosci* **22:** 396-403

Schertler GF (1998) Structure of rhodopsin. *Eye (Lond)* **12 (Pt 3b):** 504-510

Seisenberger C, Specht V, Welling A, Platzer J, Pfeifer A, Kuhbandner S, Striessnig J, Klugbauer N, Feil R, 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

Selvin PR (2000) The renaissance of fluorescence resonance energy transfer. *Nature structural biology* **7:** 730-734

Simonds WF (1999) G protein regulation of adenylate cyclase. *Trends Pharmacol Sci* **20:** 66-73

Singh A, D.,, Hamedinger D (2006) C-terminal modulator controls Ca2+-dependent gating of Ca(v)1.4 Ltype
Ca2+ channels. *Nature Neuroscience* **9:** 1108-1116

Skilling J, Denny R, Richardson K, Young P, McKenna T, Campuzano I, Ritchie M (2004) ProbSeq--a fragmentation model for interpretation of electrospray tandem mass spectrometry data. *Comparative and functional genomics* **5:** 61-68

Snutch TP, Reiner PB (1992) Ca2+ channels: diversity of form and function. *Curr Opin Neurobiol* **2:** 247-253.

Sokol DL, Zhang X, Lu P, Gewirtz AM (1998) Real time detection of DNA.RNA hybridization in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95:** 11538-11543

Soldatov NM, Oz M, O'Brien KA, Abernethy DR, Morad M (1998) Molecular determinants of L-type Ca2+ channel inactivation. Segment exchange analysis of the carboxyl-terminal

cytoplasmic motif encoded by exons 40-42 of the human alpha1C subunit gene. *J Biol Chem* **273:** 957-963.

Soldatov NM, Zuhlke RD, Bouron A, Reuter H (1997) Molecular structures involved in L-type calcium channel inactivation. Role of the carboxyl-terminal region encoded by exons 40-42 in alpha1C subunit in the kinetics and Ca2+ dependence of inactivation. *J Biol Chem* **272:** 3560-3566.

Splawski I, Timothy KW, Decher N, Kumar P, Sachse FB, Beggs AH, Sanguinetti MC, Keating MT (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 KW, Sharpe LM, Decher N, Kumar P, Bloise R, Napolitano C, Schwartz PJ, Joseph RM, Condouris K, Tager-Flusberg H, Priori SG, Sanguinetti MC, Keating MT (2004) Ca(V)1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell* **119:** 19-31

Stamboulian S, Kim D, Shin HS, Ronjat M, De Waard M, 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. *Journal of cellular physiology* **200:** 116-124

Stryer L (1978) Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annual review of biochemistry* **47:** 819-846

Sutton KG, McRory JE, Guthrie H, Murphy TH, Snutch TP (1999) P/Q-type calcium channels mediate the activity-dependent feedback of syntaxin-1A. *Nature* **401:** 800-804.

Takeda S, Kadowaki S, Haga T, Takaesu H, Mitaku S (2002) Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence. *FEBS Lett* **520:** 97-101

Talley EM, Solorzano G, Depaulis A, Perez-Reyes E, Bayliss DA (2000) Low-voltage-activated calcium channel subunit expression in a genetic model of absence epilepsy in the rat. *Brain Res Mol Brain Res* **75:** 159-165.

Tan BZ, Jiang F, Tan MY, Yu D, Huang H, Shen Y, Soong TW (2011) Functional characterization of alternative splicing in the C terminus of L-type CaV1.3 channels. *J Biol Chem* **286:** 42725-42735

Tan GM, Yu D, Wang J, Soong TW (2012) Alternative splicing at C terminus of Ca(V)1.4 calcium channel modulates calcium-dependent inactivation, activation potential, and current density. *J Biol Chem* **287:** 832-847

Tang ZZ, Zheng S, Nikolic J, Black DL (2009) Developmental control of CaV1.2 L-type calcium channel splicing by Fox proteins. *Mol Cell Biol* **29:** 4757-4765

Tao J, Hildebrand ME, Liao P, Liang MC, Tan G, Li S, Snutch TP, Soong TW (2008) Activation of corticotropin-releasing factor receptor 1 selectively inhibits CaV3.2 T-type calcium channels. *Mol Pharmacol* **73:** 1596-1609

Trabulo S, Cardoso AL, Cardoso AM, Morais CM, Jurado AS, de Lima MC (2012) Cell-penetrating peptides as nucleic acid delivery systems: from biophysics to biological applications. *Curr Pharm Des*

Tramier M, Gautier I, Piolot T, Ravalet S, Kemnitz K, Coppey J, Durieux C, Mignotte V, Coppey-Moisan M (2002) Picosecond-hetero-FRET microscopy to probe protein-protein interactions in live cells. *Biophys J* **83:** 3570-3577

Tran-Van-Minh A, Dolphin AC (2010) The alpha2delta ligand gabapentin inhibits the Rab11-dependent recycling of the calcium channel subunit alpha2delta-2. *J Neurosci* **30:** 12856-12867

Trumpp-Kallmeyer S, Hoflack J, Bruinvels A, M H (1992) Modeling of G-protein-coupled receptors: application to dopamine, adrenaline,
serotonin, acetylcholine, and mammalian opsin receptors. *Journal of Medical Chemestry* **35:** 322-333

Tsakiridou E, Bertollini L, de Curtis M, Avanzini G, Pape HC (1995) Selective increase in T-type calcium conductance of reticular thalamic neurons in a rat model of absence epilepsy. *J Neurosci* **15:** 3110-3117.

Tsou WL, Soong BW, Paulson HL, Rodriguez-Lebron E (2011) Splice isoform-specific suppression of the Cav2.1 variant underlying spinocerebellar ataxia type 6. *Neurobiology of disease* **43:** 533-542

Ueda H, Inoue M, Takeshima H, Iwasawa Y (2000) Enhanced spinal nociceptin receptor expression develops morphine tolerance and dependence. *J Neurosci* **20:** 7640-7647

Vassilatis DK, Hohmann JG, Zeng H, Li F, Ranchalis JE, Mortrud MT, Brown A, Rodriguez SS, Weller JR, Wright AC, Bergmann JE, Gaitanaris GA (2003) The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100:** 4903-4908

Vitko I, Bidaud I, Arias JM, Mezghrani A, Lory P, Perez-Reyes E (2007) The I-II loop controls plasma membrane expression and gating of Ca(v)3.2 T-type Ca2+ channels: a paradigm for childhood absence epilepsy mutations. *J Neurosci* **27:** 322-330

Wang HG, George MS, Kim J, Wang C, Pitt GS (2007) Ca2+/calmodulin regulates trafficking of Ca(V)1.2 Ca2+ channels in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* **27:** 9086-9093

Wang J, Thio SS, Yang SS, Yu D, Yu CY, Wong YP, Liao P, Li S, Soong TW (2011) Splice variant specific modulation of CaV1.2 calcium channel by galectin-1 regulates arterial constriction. *Circ Res* **109:** 1250-1258

Wang X, Gruenstein EI (1997) Mechanism of synchronized Ca2+ oscillations in cortical neurons. *Brain Res* **767:** 239-249

Ward WW (2006) Biochemical and physical properties of green fluorescent protein. *Methods of biochemical analysis* **47:** 39-65

Weiss N, Hameed S, Fernandez-Fernandez JM, Fablet K, Karmazinova M, Poillot C, Proft J, Chen L, Bidaud I, Monteil A, Huc-Brandt S, Lacinova L, Lory P, Zamponi GW, De Waard M (2012a) A Ca(v)3.2/syntaxin-1A signaling complex controls T-type channel activity and low-threshold exocytosis. *J Biol Chem* **287:** 2810-2818

Weiss N, Zamponi GW (2012) Control of low-threshold exocytosis by T-type calcium channels. *Biochim Biophys Acta*

Weiss N, Zamponi GW, De Waard M (2012b) How do T-type calcium channels control low-threshold exocytosis? *Communicative & integrative biology* **5:** 377-380

Welsby PJ, Wang H, Wolfe JT, Colbran RJ, Johnson ML, Barrett PQ (2003) A mechanism for the direct regulation of T-type calcium channels by Ca2+/calmodulin-dependent kinase II. *J Neurosci* **23:** 10116-10121

Westenbroek RE, Hell JW, Warner C, Dubel SJ, Snutch TP, Catterall WA (1992) Biochemical properties and subcellular distribution of an N-type calcium channel alpha 1 subunit. *Neuron* **9:** 1099-1115.

Williams ME, Washburn MS, Hans M, Urrutia A, Brust PF, Prodanovich P, Harpold MM, Stauderman KA (1999) Structure and functional characterization of a novel human low-voltage activated calcium channel. *J Neurochem* **72:** 791-799

Wise A (2002) Target validation of G-protein coupled receptors. *drug Discovery Today: Disease Mechanisms* **7**

Wolfe JT, Wang H, Perez-Reyes E, Barrett PQ (2002) Stimulation of recombinant Ca(v)3.2, T-type, Ca(2+) channel currents by CaMKIIgamma(C). *J Physiol* **538:** 343-355.

Yao X, Parnot C, Deupi X, Ratnala VR, Swaminath, G FD, B K (2006) Coupling ligand structure to specific conformational switches in the beta2-adrenoceptor. *Nature Chemical Biology* **2:** 417-422

Yarov-Yarovoy V, DeCaen PG, Westenbroek RE, Pan CY, Scheuer T, Baker D, Catterall WA (2012) Structural basis for gating charge movement in the voltage sensor of a sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109:** E93-102

Yasuda T, Chen L, Barr W, McRory JE, Lewis RJ, Adams DJ, Zamponi GW (2004) Auxiliary subunit regulation of high-voltage activated calcium channels expressed in mammalian cells. *Eur J Neurosci* **20:** 1-13

Yokoyama CT, Westenbroek RE, Hell JW, Soong TW, Snutch TP, Catterall WA (1995) Biochemical properties and subcellular distribution of the neuronal class E calcium channel alpha 1 subunit. *J Neurosci* **15:** 6419-6432.

Yokoyama K, Kurihara T, Saegusa H, Zong S, Makita K, Tanabe T (2004) Blocking the R-type (Cav2.3) Ca2+ channel enhanced morphine analgesia and reduced morphine tolerance. *Eur J Neurosci* **20:** 3516-3519

Yuan W, Bers D. M (1994) Ca-dependent facilitation of cardiac Ca current is due to Ca-calmodulindependent

protein kinase. *American Journal of Physiology* **267:** 982-993

Zamponi GW, Bourinet E, Nelson D, Nargeot J, Snutch TP (1997) Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel alpha1 subunit. *Nature* **385:** 442-446.

Zamponi GW, Lory P, Perez-Reyes E Role of voltage-gated calcium channels in epilepsy. *Pflugers Arch* **460:** 395-403

Zhang J, Ferguson SS, Barak LS, Menard L, Caron MG (1996) Dynamin and beta-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *J Biol Chem* **271:** 18302-18305

Zhang Y, Chen YH, Bangaru SD, He L, Abele K, Tanabe S, Kozasa T, Yang J (2008) Origin of the voltage dependence of G-protein regulation of P/Q-type Ca2+ channels. *J Neurosci* **28:** 14176-14188

Zhang Y, Mori M, Burgess DL, Noebels JL (2002) Mutations in high-voltage-activated calcium channel genes stimulate low-voltage-activated currents in mouse thalamic relay neurons. *J Neurosci* **22:** 6362-6371

Zheng J, MC T, WN Z (2002) Rod cyclic nucleotide-gated channels have a stoichiometry of three CNGA1 subunits and one CNGB1 subunit. *Neuron* **36:** 891-896

Zuhlke RD, Pitt GS, Deisseroth K, Tsien RW, Reuter H (1999) Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature* **399:** 159-162

Zuhlke RD, Pitt GS, Tsien RW, Reuter H (2000) Ca2+-sensitive inactivation and facilitation of L-type Ca2+ channels both depend on specific amino acid residues in a consensus calmodulin-binding motif in the(alpha)1C subunit. *J Biol Chem* **275:** 21121-21129