

Université de Montréal

**Déterminants moléculaires du clivage protéolytique  
nécessaire à la fonction de la sous-unité  $Ca_v\alpha2\delta1$   
du canal calcique  $Ca_v1.2$**

**par SEGURA Emilie**

Département de Physiologie moléculaire et intégrative,  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention  
du grade de Maîtrise ès sciences en  
Physiologie moléculaire, cellulaire et intégrative  
option Biophysique

Dépôt en Août 2016

© SEGURA Emilie, 2016

Université de Montréal, Faculté de médecine

Ce mémoire est intitulé :

Déterminants moléculaires du clivage protéolytique  
nécessaire à la fonction de la sous-unité  $Ca_v\alpha2\delta1$   
du canal calcique  $Ca_v1.2$

Présenté par :

Emilie Segura

Évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Éric THORIN, président rapporteur

Dr Jonathan LEDOUX, membre du jury

Dr Lucie PARENT, membre du jury et directrice de recherche

## Résumé

Mots clés : canaux calciques, densité membranaire, ancrage membranaire, expression recombinante, électrophysiologie, cytométrie en flux, imagerie confocale, isolation de membranes.

Le canal calcique de type-L  $Ca_v1.2$  participe au couplage excitation-contraction des cardiomyocytes.  $Ca_v1.2$  est composé d'une sous-unité principale  $Ca_v\alpha1$ , associée aux sous-unités auxiliaires  $Ca_v\beta$  et  $Ca_v\alpha2\delta1$ . Lorsque présente à la membrane, c'est  $Ca_v\alpha2\delta1$  qui est responsable de moduler la densité du courant calcique. Elle ne possède qu'un seul segment transmembranaire présent du côté C-terminal, au niveau de la protéine  $\delta$ , ce qui en fait une protéine transmembranaire de type I. Certaines protéines qui appartiennent à cette famille doivent être clivées au niveau du site dit « omega », une modification post-traductionnelle nécessaire à leur fonction. Une fois clivées, ces protéines sont retenues à la membrane plasmique par une ancre glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI). Nos études en microscopie confocale montrent que la protéine sauvage est sensible à l'action de la phospholipase C qui clive de manière spécifique les groupements phosphoinositol, ce qui est compatible avec la présence d'une ancre GPI fonctionnelle. De plus, la mutation des résidus formant le site « omega » en isoleucine au niveau des sites G1060 et G1061 prévient l'adressage membranaire de  $Ca_v\alpha2\delta1$  estimé par cytométrie en flux et imagerie confocale, et réduit la modulation des courants calciques mesurés par la méthode du « patch-clamp ». Les mutants G1060I et G1061I sont aussi associés à un changement dans le patron de migration de la partie C-terminale, suggérant un processus protéolytique défectueux. Les mutations simples des glycines en alanines préservent les propriétés de la protéine mais le double mutant G1060A/G1061A réduit significativement l'expression de  $Ca_v\alpha2\delta1$  à la surface de la cellule et sa modulation sur le canal  $Ca_v1.2$ . Ces données suggèrent fortement que le clivage requiert spécifiquement un résidu Glycine en position 1060 ou 1061 pour produire le clivage protéolytique dominant chez  $Ca_v\alpha2\delta1$ , et que cet ancrage GPI est essentiel à la fonction du canal.

## Abstract

Key words: calcium channels, cell surface density, GPI membrane anchor, recombinant expression, electrophysiology, flow cytometry, confocal imaging, membrane isolation.

Voltage-gated calcium channels  $Ca_v1.2$  play an essential role in the regulation of cardiac excitability. Functional channels are formed by the  $Ca_v\alpha1$  subunit and the intracellular  $Ca_v\beta$  and the extracellular  $Ca_v\alpha2\delta1$  subunits.  $Ca_v\alpha2\delta1$  are type I transmembrane proteins that undergo a posttranslational modification producing their association at the plasma membrane through a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor. The molecular determinants required for the proteolytic cleavage of the recombinant  $Ca_v\alpha2\delta1$  protein were studied using biochemical, immunocytochemical, fluorescence, and electrophysiological methods. Enzymatic treatment with a phospholipase C specific for the cleavage of phosphatidyl inositol lipids abolished the colocalisation of  $Ca_v\alpha2\delta1$  with a plasma membrane marker as shown using live-cell confocal imaging. Single point mutations G1060I or G1061I in the predicted transmembrane  $Ca_v\delta$  domain was shown to significantly reduce the cell surface fluorescence of  $Ca_v\alpha2\delta1$  as characterized by two-color flow cytometry assays and confocal imaging, and to prevent the  $Ca_v\alpha2\delta1$ -mediated increase in the peak current density and voltage-dependent gating of  $Ca_v1.2$  currents. The isoleucine mutations were also associated with a change in the migration pattern of the C-terminal fragments suggesting that proteolytic processing was altered. Single glycine to alanine mutations preserved the protein properties but the double mutant G1060A/G1061A significantly impaired cell surface expression of  $Ca_v\alpha2\delta1$  and its functional regulation of  $Ca_v1.2$ . Altogether our data support a model where one Glycine residue at position 1060 or 1061 is required to produce the dominant proteolytic cleavage of  $Ca_v\alpha2\delta1$  and further suggest that the GPI-anchored form of  $Ca_v\alpha2\delta1$  is essential for channel function.

# Sommaire

<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>III</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>IV</b>
<b>SOMMAIRE.....</b>	<b>V</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>XI</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>XIII</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
1) GÉNÉRALITÉS SUR LE TRANSPORT DES IONS .....	1
1.A) <i>Les ions et leurs propriétés à travers les membranes.....</i>	1
1.B) <i>Les différents transports de la cellule .....</i>	2
1.B.a) Le transport des anions .....	3
1.B.b) Le transport des cations .....	4
B.b.i) Le potassium.....	4
B.b.ii) Le sodium .....	4
B.b.iii) Le calcium .....	5
1.B.c) Les canaux cationiques dépendants du potentiel.....	6
1.C) <i>Rôles généraux du calcium dans le corps .....</i>	7
2) CANAUX CALCIQUES DÉPENDANTS DU POTENTIEL .....	8
2.A) <i>Classification des canaux calciques voltage-dépendants .....</i>	8
2.B) <i>Rôles des canaux calciques de type-L <math>Ca_v1.2</math>.....</i>	9
2.B.a) Sécrétion endocrine d'insuline.....	9
2.B.b) Potentiel d'action dans le cœur.....	10
2.B.c) Couplage excitation-contraction dans le cœur .....	13
2.B.d) Signalisation calcique.....	14
2.B.e) Pathologies associées à $Ca_v1.2$ .....	16
2.C) <i>Structure du complexe macromoléculaire <math>Ca_v1.2</math>.....</i>	17
2.C.a) La sous-unité principale $\alpha1C$ .....	17
2.C.b) La sous-unité $Ca_v\beta$ .....	20
2.C.c) La sous-unité $Ca_v\alpha2\delta$ .....	21
2.C.d) La calmoduline .....	22
2.C.e) La sous-unité $Ca_v\gamma$ .....	23
2.C.f) Fonctionnement du complexe $Ca_v1.2$ .....	23
3) ADRESSAGE DES PROTÉINES MEMBRANAIRES.....	25
3.A) <i>Signal d'adressage.....</i>	25
3.B) <i>Modifications post-traductionnelles importantes pour l'adressage des protéines.....</i>	27
3.B.a) La Phosphorylation .....	27
3.B.b) La Glycosylation.....	28
B.b.i) Les différents types de glycolysation .....	28

B.b.ii) Fonctions de la glycolysation.....	30
3.B.c) L'ancrage GPI.....	31
B.c.i) Biosynthèse de l'ancre GPI .....	31
B.c.ii) Ancrage des protéines .....	32
B.c.iii) Fonctions des protéines GPI ancrées.....	34
B.c.iv) L'ancrage GPI chez $Ca_v\alpha 2\delta 1$ .....	35
<b>OBJECTIF DE L'ÉTUDE .....</b>	<b>38</b>
<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES.....</b>	<b>39</b>
1) BIOLOGIE MOLÉCULAIRE .....	39
1.A) <i>ADN utilisés</i> .....	39
1.B) <i>Mutants de <math>Ca_v\alpha 2\delta 1</math></i> .....	40
1.B.a) Mutagenèse dirigée .....	40
1.B.b) Amplification de l'ADN .....	41
1.B.c) Constructions utilisées dans cette étude .....	42
2) BIOLOGIE CELLULAIRE.....	42
2.A) <i>Culture cellulaire</i> .....	42
2.B) <i>Transfection d'ADN</i> .....	43
2.C) <i>Essais de Cycloheximide</i> .....	44
3) IMMUNOFLUORESCENCE.....	44
3.A) <i>Ultracentrifugation</i> .....	44
3.A.a) Protocole d'extraction des protéines .....	44
3.A.b) Western Blot.....	45
3.B) <i>Microscopie confocale</i> .....	46
3.B.a) Transfections pour l'imagerie .....	46
3.B.b) Préparation des cellules vivantes.....	47
3.B.c) Analyse des images .....	47
3.C) <i>Cytométrie en flux</i> .....	48
3.C.a) Préparation des cellules.....	48
3.C.b) Enregistrement des données de fluorescence.....	49
3.C.c) Analyse et quantification de la densité membranaire relative .....	50
4) ÉLECTROPHYSIOLOGIE .....	52
4.A) <i>Préparation des cellules</i> .....	52
4.B) <i>Enregistrement des courants</i> .....	52
4.C) <i>Analyse des données</i> .....	53
<b>RÉSULTATS (PAR ARTICLE).....</b>	<b>55</b>
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>101</b>
1) ANCRAGE MEMBRANAIRE DE $Ca_v\alpha 2\delta 1$ .....	101
2) CLIVAGES PROTÉOLYTIQUES POST-TRADUCTIONNEL DE $Ca_v\alpha 2\delta 1$ .....	103
3) IMPLICATIONS PHYSIO-PATHOLOGIQUES DU CLIVAGE PROTÉOLYTIQUE DE $Ca_v\alpha 2\delta 1$ .....	105
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>107</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>LI</b>
1) HOMOLOGIE DES SÉQUENCES DE $Ca_v\alpha 2\delta 1$ POUR LE LAPIN, L'HOMME, LE RAT ET LA SOURIS .....	LI

2)	ALIGNEMENT DES SÉQUENCES DE $Ca_vA2\Delta 1$ POUR LE LAPIN, L'HOMME, LE RAT ET LA SOURIS.....	LII
3)	TESTS DE LA PI-PLC SUR LES MUTANTS EN ALANINE DE LA RÉGION DE CLIVAGE $\Omega$ .....	LV
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>		<b>LVI</b>

## Liste des tableaux

Tableau I: Composition générale des ions à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule ainsi que leur potentiel d'équilibre selon l'équation de Nernst. ....	2
Tableau II: Classification des canaux calciques voltages dépendants selon leurs propriétés physiques, leurs localisations et leurs fonctions physiologiques.....	9
Tableau III: Tableau des différents algorithmes utilisés pour prédire un ancrage dans la sous-unité $\alpha 2\delta 1$ de rat. ....	35

## Liste des figures

Figure 1: Représentation schématique des pores des différents canaux cationiques dépendants du potentiel. Image de Hille 2001. ....	7
Figure 2: Représentation graphique du potentiel d'action ventriculaire et les ions impliqués dans les différentes phases au cours du temps.....	11
Figure 3: Représentation schématique de la correspondance entre les événements électriques et l'électro-cardiogramme. Adapté de Silverthorn, 2007. ....	12
Figure 4: Correspondance entre le potentiel d'action ventriculaire et l'ECG au cours du temps. ....	13
Figure 5: Représentation schématique du couplage excitation-contraction dans le coeur. ....	14
Figure 6: Exemple de signalisation(s) résultante(s) non exhaustive d'une élévation de $Ca^{++}$ dans la cellule. ....	15
Figure 7: Électrocardiogramme de patients atteints du syndrome du QT long de type 3. A : ECG d'un patient atteint du syndrome du QT long en comparaison avec un patient sain. B : ECG d'arythmies ventriculaires. Images de Heydley et al., 2009.....	16
Figure 8: Schéma de la structure secondaire prédite du canal $Ca_v1.2$ avec les séquences importantes pour sa fonction ou son interaction avec d'autres protéines. ....	18



Figure 9: Schéma de la structure tertiaire prédite du canal $Ca_v1.2$ au sein de la membrane plasmique. ....	18
Figure 10: Représentation schématique du mouvement des hélices dans les différents états du canal $Ca_v1.2$ selon la dépolarisation de la membrane plasmique. ....	19
Figure 11: Schéma de la structure secondaire prédite de la sous-unité $Ca_v\alpha2\delta$ . ....	21
Figure 12: Représentation schématique de l'action de la CAM dans l'inactivation du canal $Ca_v1.2$ . ....	23
Figure 13: Moyennes des Intensités de fluorescence obtenues par cytométrie en flux, pour les différentes conditions utilisées dans l'étude de l'impact des sous-unités annexes dans l'adressage de la sous-unité principale. Figure de Bourdin et al., 2015.....	24
Figure 14: Données électrophysiologiques des courants macroscopiques des cellules recombinantes transfectées avec une ou plusieurs sous-unités du canal $Ca_v1.2$ . Image de gauche : Tracés de courant représentatifs pour chaque condition. Image de droite : Courbes moyennes courant/voltage (IV) des tracés correspondants. (Données personnelles).....	24
Figure 15: Représentation de la translocation des protéines dans le RE selon leur orientation dans la membrane. A: Protéines transmembranaires avec la partie N-terminale dans la lumière du RE. B: Protéines transmembranaires avec la partie N-terminale dans le cytosol. Images tirées de Pearson Education, 2012.....	26
Figure 16: Représentation de la mise en forme des segments transmembranaires de la sous-unité principale $\alpha1$ . Image tirée de Pearson Education, 2012.....	27
Figure 17: Représentation de la N-glycosylation dès l'entrée des protéines dans le RE lors de la reconnaissance de la séquence consensus. Image tirée de Carlano publishing, 1998. ....	29
Figure 18: Action de la PI-PLC sur les ancrés GPI. Adapté de Mayor et al., 1990. ....	32
Figure 19: Représentation schématique des régions reconnues par la GPI-transamidase chez une protéine, au niveau du réticulum endoplasmique. Adapté de Eisenhaber et al., 1998. ....	33
Figure 20: Représentation des différentes régions nécessaires à la reconnaissance et à l'ancrage de $Ca_v\alpha2\delta1$ par la GPI-transamidase dans le RE.....	36
Figure 21: Détails des plasmides utilisés pour sous-cloner les ADN utilisés dans cette étude.....	39

Figure 22: Représentation schématique de la méthode d'amplification de l'ADN par PCR. ....	40
Figure 23: Exemple d'un chromatogramme après séquençage par la plateforme Génomique de l'IRIC, Université de Montréal.....	41
Figure 24: Représentation de la méthode d'analyse des données de cytométrie en flux. Adapté de Bourdin et al, 2016. ....	50
Figure 25: Représentation schématique de la détection des différentes fluorescences en cytométrie en flux selon la perméabilisation des cellules. A : cellules non perméabilisées. B : cellules perméabilisées. ....	51
Figure 26: Schéma récapitulatif représentant la balance entre les différents clivages protéolytiques de la sous-unité $Ca_v\alpha 2\delta 1$ dans les membranes totales (réticulum endoplasmique – Golgi) et à la membrane plasmique.....	109
Figure 27: Annexe, Clivage des protéines $Ca_v\alpha 2\delta 1$ -HA G1060A et G1061A par la PI-PLC dans le système recombinant HEK293 stable, en présence de la sous-unité principale $Ca_v1.2$ . <b>A.</b> Les cellules ont été incubées 16h avec le véhicule de l'enzyme (tampon 20 mM Tris HCl, cf Matériel et Méthodes). <b>B.</b> Les cellules ont été incubées 16h avec la Phospholipase C Phosphatidylinositol spécifique (PI-PLC) à 3 U/mL. Le marquage des cellules et l'analyse des images sont tels qu'indiqué dans le Matériel et Méthodes. L'échelle est de 10 $\mu$ m.....	lv

## Liste des abréviations

$\Delta$ MedFI : Intensité de fluorescence médiane relative

A : Ala ou Alanine

ADN : Acide désoxyribonucléique

AID : "Alpha interaction domain" Domaine d'interaction présent sur la sous-unité  $\alpha$ 1

AMPc : Adénosine mono-phosphate cyclique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ATP : Adénosine tri-phosphate

BID : "Beta interaction domain" Domaine d'interaction présent sur la sous-unité  $\beta$

Ca<sup>++</sup> : Ion calcium

CaCl<sub>2</sub> : Chlorure de calcium

CAM : Calmoduline

CDI : "Ca<sup>++</sup>-dependant inactivation" Inactivation Calcium dépendante

CFTR : "Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator" Nom du gene codant pour la protéine responsable de la fibrose kistique

CICR : "Calcium Induced Calcium Release" Processus de relargage calcique par induction du calcium

Cl<sup>-</sup> : Ion chlore

CO<sub>2</sub> : Dioxyde de carbone

CsCl : Chlorure de césium

D : Asp ou acide aspartique

Da : Unité de mesure de poids moléculaire, le Dalton

DHPR : Récepteurs sensibles à la dihydropyridine

DMEM-HG : "Dulbecco's high-glucose minimum essential medium" Milieu minimum de culture contenant une forte quantité de glucose

E : Glu ou acide glutamique

EGTA : "Ethylene glycol-tetraacetic acid"

ERAD : "Endoplasmic reticulum associated degradation" Processus de dégradation associée au reticulum endoplasmique

FBS : Sérum bovin fœtal

FITC : Fluorescein Isothiocyanate conjugué

FSC: "Forward scatter" Dispersion de la lumière frontale

G : Gly ou Glycine

g : Unité de mesure de gravitation, peut s'exprimer en N.m<sup>2</sup>.kg<sup>-2</sup>

GABA : Acide gamma-aminobutyrique

GAPDH : "Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase"

GFP : "Green fluorescent protein" Protéine Fluorescent dans le vert

GK: Guanylate kinase

Glc : Glucose

GlcNAc : N-acétyl-glucosamine

GlcNH<sub>2</sub> : Glucosamine

GPI : Glucosyl phosphatidyl inositol

HA : Hémagglutinine

HCl : Hydroxy chlorure

HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> : Bicarbonate

HEK293 : "Human Embryonic Kidney 293 cells" Cellules humaines embryoniques de rein

HEPES : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HVA : "High voltage activated" Activé à haut potentiel

IgG : Immunoglobuline G

K<sup>+</sup> : Ion potassium

LDLR : "Low density lipoprotein receptor"  
Récepteur au lipoprotéines de faible densité

LQT : Long QT

LVA : "Low voltage activated" Activé à faible potentiel

Man : Mannose

MAPK : "Mitogen-activated protein kinase"

MgATP : Magnésium adénosine tri-phosphate

MgCl<sub>2</sub> : Chlorure de magnésium

MIDAS : "Metal Ion-Dependent Adhesion Site"  
Site d'adhésion des ions métalliques dépendant

N : Asn ou Asparagine

Na<sup>+</sup> : Ion sodium

NaCl : Chlorure de sodium

NaGTP : Sodium guanosine tri-phosphate

NaOH : Hydroxyde de sodium

NCX : "Sodium calcium exchanger" Echangeur sodium calcium

NMDA : Canaux activés par l'agoniste N-méthyl-D-aspartate (physiologie : glutamate)

NO : Oxyde nitrique

PA : Potentiel d'action

PBS : Tampon phosphate salin

PCR : "Polymerase chain reaction"

PI-PLC : Phospholipase C phosphatidylinositol spécifique

PMCA : "Plasma Membrane Ca<sup>++</sup> ATPase"

RCPG : Récepteur couplé aux protéines G

RE : Réticulum endoplasmique

RIPA : "Radio Immunoprecipitation Assay"

ROS : "Reactive oxygen species" Espèce réactive dérivée de l'oxygène

rpm : Rotor par minute

RyR : Récepteurs sensibles à la ryanodine

S : Ser ou Sérine

SA : "Signal anchor" Signal d'ancrage

SDS-PAGE : "Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis"  
Électrophorèse avec un gel de polyacrylamide et un agent réducteur sodium dodecyl sulfate

SERCA : "Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca<sup>++</sup> ATPase"

SH3 : Src homology 3

SNC : Système nerveux central

SR : Réticulum sarcoplasmique

SSC : "Side scatter" Dispersion de la lumière déviée

ST : "Stop transfer" Signal d'arrêt de transfert

T : Thr ou Thréonine

TEACl : Chlorure de tétra-éthyl ammonium

TRP : "Transient receptor potential"

V : Val ou Valine

VNTR : "Variable Number Tandem Repeat"

VWA : "Von Willebrand factor type A"

WGA : "Wheat Germ Agglutinin"

## Remerciements

Je tiens à remercier les personnes qui m'ont aidée dans mon projet de deux années ainsi que les Drs Éric Thorin et Jonathan Ledoux qui ont gracieusement acceptés d'évaluer mon mémoire de maîtrise.

Mes remerciements vont évidemment au Dr Lucie Parent, ma directrice de recherche, qui m'a accueillie dans son laboratoire, a fait preuve de patience et de confiance à mon égard, je n'aurais pas pu avoir ma maîtrise sans sa supervision. Je remercie aussi le Dr Gaétan Mayer pour ses nombreux conseils et sa grande disponibilité.

Je tiens particulièrement à souligner l'importance du Dr Benoîte Bourdin dans mon apprentissage des techniques utilisées dans ce mémoire. Je la remercie donc pour son enseignement et son sens critique dans mon projet ainsi que tout le soutien qu'elle m'a apporté tant d'un point de vue professionnel que personnel, dans les moments de réussite comme en cas de doute et de stress.

Merci à l'ensemble de l'équipe du Dr Parent, Marie-Philippe Tétreault et Julie Briot pour avoir partagé bon nombre de mes journées au laboratoire entre filles. Je me souviendrai de ces anecdotes absurdes, mais néanmoins mémorables, sur les stagiaires d'été ou de fin de baccalauréat.

Je remercie aussi Louis Villeneuve pour les images de microscopie confocale, Serge Sénéchal et Armelle Le Campion pour leur expertise au cytomètre de flux de l'Université de Montréal.

Je remercie mes parents, Serge et Nathalie, pour leur soutien de tous les instants et leur capacité à me défaire de mon stress au profit du leur. Merci d'avoir pu faire en sorte que ces deux années d'expatriation se soient passées (presque) sans encombre. Enfin, merci à Alban d'être venu me voir au Québec dès que l'occasion le permettait pour m'exprimer son amour malgré cette épreuve. Je n'aurais rien pu faire sans vous, je vous aime.

*“- Va-t'en ! Les humains ne sont pas mes amis, je les hais !*

*- C'est vrai, je suis un humain. Mais San, toi aussi...*

*- Tais-toi ! Je suis une louve comme ma mère.”*

Hayao Miyazaki, Joe Hisaishi.

*“Tu ne sais jamais à quel point tu es fort  
jusqu'au jour où être fort reste la seule option.”*

Bob Marley.

*“C'est seulement à l'instant de les quitter que l'on mesure  
son attachement à un lieu, une maison, ou à sa famille.”*

Eric Cantona.

*“Une des plus belles qualités d'une véritable amitié  
est de comprendre et d'être compris.”*

Sénèque.

*“La distance n'est rien quand on s'aime aussi fort.”*

Amélie Nothomb.

# Introduction

Les protéines sont des macromolécules responsables de la charpente des tissus du corps humain. Elles sont codées par nos gènes et participent à bon nombre de processus biologiques. Par exemple, le transport de molécules comme l'oxygène, leur action dans les réponses immunitaires ou les transmissions de signaux entre les cellules du corps.

Certaines doivent être ancrées dans la membrane plasmique des cellules pour effectuer leur fonction. C'est le cas des canaux ioniques qui transportent les ions de part et d'autre d'une membrane.

## 1) Généralités sur le transport des ions

Un ion est un atome ou un groupe d'atome électriquement chargé. Certains sont chargés négativement, ce sont les anions, d'autres sont positifs, ce sont les cations. Ils sont nécessaires à la vie cellulaire et permettent la transmission des signaux dans le corps, aussi bien au niveau du rythme cardiaque, au niveau du mouvement des muscles squelettiques ou bien dans les connexions nerveuses.

### 1.A) Les ions et leurs propriétés à travers les membranes

La bicouche lipidique étant très peu perméable aux éléments électriquement chargés, des protéines sont nécessaires au passage des ions contre ou dans le sens de leur gradient électrochimique. Les ions ne sont donc pas répartis de façon uniforme de part et d'autre de la membrane plasmique. De ce fait, cette membrane se comporte comme une résistance électrique et il est possible de calculer le potentiel d'équilibre de chaque ion selon l'équation de Nernst pour une cellule humaine (Tableau I) (Nonner and Eisenberg, 1998).

Des protéines transmembranaires plus ou moins sélectives pour ces ions vont régir leur passage. Il est alors possible de calculer un potentiel de repos d'une cellule cardiaque, qui selon l'équation de Goldman-Hodgkin et Katz est d'environ -90 mV (Goldman, 1943).

Nature de l'ion	Concentration extracellulaire	Concentration intracellulaire	Flux passif a - 90 mV	Potentiel d'équilibre
Sodium (Na <sup>+</sup> )	140 mM	20 mM	Vers l'int	+ 50 mV
Potassium (K <sup>+</sup> )	20 mM	140 mM	Vers l'ext	- 97 mV
Chlore (Cl <sup>-</sup> )	100 mM	20 mM	Vers l'int	- 40 mV
Calcium (Ca <sup>++</sup> )	2 mM	0.1 μM	Vers l'int	+ 120 mV

*Tableau I: Composition générale des ions à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule ainsi que leur potentiel d'équilibre selon l'équation de Nernst.*

Le potentiel de repos des cellules de mammifères est donné par la forte perméabilité aux ions K<sup>+</sup>. D'une part, par la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> qui est constitutivement très active. C'est un transport actif, nécessitant de l'énergie sous forme d'ATP (Adénosine Triphosphate), qui maintient les concentrations ioniques de K<sup>+</sup> forte à l'intérieur et le Na<sup>+</sup> à l'extérieur de la cellule. Elle participe au potentiel intracellulaire négatif et maintient les gradients de concentration de ces deux ions. D'autre part, les canaux de fuite potassiques, alors actifs à l'état basal, vont contrebalancer cette entrée de K<sup>+</sup> et ainsi participer au potentiel de repos stable.

Le potentiel chimique de l'ion K<sup>+</sup> est favorable à une sortie d'ions, mais ce déplacement vers l'extérieur crée une force électrique qui endigue la sortie de plus d'ions de la cellule. Le potentiel de repos de la cellule est stable au niveau macroscopique de par les différents canaux potassiques surtout le canal K<sub>ir</sub>, activé proche du potentiel de repos du K<sup>+</sup>.

Le potentiel de repos peut varier d'une cellule à une autre selon les protéines présentes à la membrane. Les cardiomyocytes ventriculaires sont effectivement de -90 mV mais il existe aussi les cardiomyocytes auriculaires pacemaker qui sont à -40 mV par exemple.

### 1.B) Les différents transports de la cellule

Dans la cellule, il existe plusieurs types de transports d'ions, passifs et actifs. Le transport actif nécessite de l'énergie et s'effectue contre le gradient électrochimique de l'ion. Des échangeurs peuvent aussi permettre à un ion de se déplacer contre son gradient avec l'aide



du passage d'un autre ion qui lui, est dans une configuration favorable à son passage de façon passive, sans nécessiter d'énergie. Les canaux ioniques sont quant à eux des protéines qui permettent le passage toujours de façon passive dans le sens du gradient de concentration de l'ion, après une stimulation et l'activation du canal (Sadava et al., 2011).

### 1.B.a) Le transport des anions

Dans le corps, les deux principaux anions sont le chlorure et le bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ).

Les échanges de bicarbonate s'effectuent à l'aide de transporteurs pour réguler le pH dans les cellules animales. C'est un élément important des déplacements acido-basiques dans les organes digestifs, les reins et le système nerveux. Ce sont des échangeurs de bicarbonate avec d'autres ions tels que le chlorure, le  $\text{Na}^+$  ou le  $\text{K}^+$  (Schultz, 1996).

Il existe pour les ions chlorure des canaux activés par des ligands, comme les récepteurs à neurotransmetteurs  $\text{GABA}_A$  (acide gamma-aminobutyrique – canaux anioniques) et Glycine présents dans le système nerveux central et périphérique. Une autre famille de ces canaux activés par l'AMPc (Adénosine Mono Phosphate cyclique), ce sont les canaux CFTR dont la perte de fonction est associée à la fibrose kystique ou mucoviscidose (Kartner et al., 1992). La famille des canaux  $\text{I}_{\text{Cl}^{\text{swell}}}$  répond à un stimulus mécanique, les changements de tension de la membrane plasmique, les changements de volume. Certains sont aussi activés par le  $\text{Ca}^{++}$  intracellulaire.

Pour ce qui est des canaux activés par le voltage, ils sont ubiquitaires et c'est la famille des canaux ClC. Ces canaux sont présents chez certains procaryotes mais surtout chez les organismes eucaryotes, allant du plus primitif (*Saccharomyces cerevisiae*) jusqu'à l'homme (Pusch et al., 1999). Ce sont des homo- ou hétéromultimères (de 2 à 4 sous-unités) de 10 à 12 domaines transmembranaires pour chaque sous-unité. Le canal ClC-1 est présent dans les cellules musculaires squelettiques et permet la stabilisation de leur potentiel de repos. Des mutations dans le gène qui code pour ce canal sont impliquées dans la myotonie congénitale (OMIM database) (Koch et al., 1992).

## 1.B.b) Le transport des cations

### B.b.i) Le potassium

Autre que la pompe Na/K ATPase, il existe d'autres protéines qui permettent le transport du  $K^+$  à travers la membrane comme l'échangeur  $H^+/K^+$  qui est impliqué dans l'acidification de l'estomac. Au niveau cellulaire, cet échangeur est responsable de l'acidification des endosomes vers les lysosomes pour la dégradation des vésicules d'endocytose.

Les canaux potassiques sont séparés en quatre classes majeures :

- Les canaux activés par le  $Ca^{++}$  intracellulaire avec les canaux  $K_{Ca}$ , qui permettent d'inhiber la dépolarisation dûe à l'augmentation de  $Ca^{++}$  intracellulaire.
- Les canaux à rectification entrante, les  $K_{ir}$  qui peuvent être régulés par les RCPG (récepteurs couplés aux protéines G) ou par l'ATP, comme ceux impliqués dans la sécrétion de l'insuline et le maintien du potentiel de repos cellulaire.
- Les canaux activés par le voltage, hERG ou  $K_vLQT1$ , qui initient et participent à la repolarisation précoce et tardive dans le potentiel d'action.

### B.b.ii) Le sodium

Le  $Na^+$  est très impliqué dans la réabsorption de l'eau au niveau des reins. Beaucoup de protéines participent à ce phénomène comme la pompe  $Na^+/H^+$  dans le tubule proximal, le co-transporteur NKCC2 ou les canaux ENaC dans le tubule distal, sensible aux variations de pH. Toutes ces protéines fonctionnent grâce à la pompe  $Na^+/K^+$  qui maintient les gradients chimiques de ces deux ions.

Des canaux cationiques laissant passer le  $Na^+$  participent aux plaques motrices dans les jonctions neuromusculaires. Ce sont alors des canaux activés par l'acétylcholine, ils sont dits nicotiniques.

Pour ce qui est des autres cellules du corps, le  $Na^+$  initie le potentiel d'action, qu'ils soient musculaires ou nerveux. Ce sont alors les canaux ioniques dépendants du potentiel qui entrent en action, les  $Na_v$  dont il existe neuf membres. Des mutations dans les gènes codant pour ces canaux sont responsables de canalopathies associées à une perte de sensibilité à la

douleur (Bagal et al., 2015) et de certaines arythmies telles que le syndrome de Brugada (Rook et al., 1999) ou le syndrome du QT long (Wang et al., 2016).

#### B.b.iii) Le calcium

La concentration de  $\text{Ca}^{++}$  intracellulaire libre est très faible par rapport aux autres ions présents dans la cellule. Cela est dû à son implication cruciale dans une signalisation finement régulée, la signalisation calcique. Cette concentration intracellulaire faible est assurée par l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  à la membrane plasmique (NCX). Une pompe  $\text{Ca}^{++}$  ATPase permet aussi l'extrusion du  $\text{Ca}^{++}$  hors de la cellule, la PMCA (plasma membrane  $\text{Ca}^{++}$  ATPase).

Une grande concentration de  $\text{Ca}^{++}$  est cependant présente dans le réticulum endoplasmique (RE) et sarcoplasmique (RS) dans les myocytes pour assurer la contraction musculaire en temps voulu. Cette accumulation est possible grâce aux pompes SERCA à la surface du RS (sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{++}$  ATPase).

Certains canaux calciques présents dans les organelles intracellulaires sont activés par des ligands comme les récepteurs à l' $\text{IP}_3$  ou les récepteurs à la ryanodine (RyR) qui sont parfois activés directement par les canaux dépendants du potentiel (RyR1). D'autres canaux calciques sont sensibles aux variations de  $\text{Ca}^{++}$  dans les organelles de la cellule, c'est le complexe STIM/Orai.

Au niveau des neurones, il existe les récepteurs ionotropes NMDA (activés par l'agoniste N-méthyl-D-aspartate), activés physiologiquement par le glutamate ou la glycine, qui sont des canaux laissant passer spécifiquement du  $\text{Ca}^{++}$  (Landry and Gies, 2009).

Les canaux TRP (transient receptor potential) ont eux aussi une grande perméabilité pour les cations, la plupart pour le  $\text{Ca}^{++}$ . Ils sont responsables du goût, de la sensibilité à la douleur et à la chaleur. Ils sont classés selon leur mode d'activation, par des ligands, sous la chaleur, à pH faible, par le potentiel ou bien par des lipides (Rosenbaum and Simon, 2007). Des mutations dans les gènes des TRP sont liées à des troubles de neuro-dégénérescence (Levine and Alessandri-Haber, 2007), et peuvent être impliqués dans le développement de tumeurs cancéreuses (Prevarskaya et al., 2007).

Les canaux calciques activés par le potentiel sont aussi très importants dans la physiologie des muscles, en particulier dans le cas du cœur et sa contraction, développé par la suite.

### 1.B.c) Les canaux cationiques dépendants du potentiel

Il est possible de mesurer les courants ioniques générés par l'activité de tous les canaux ioniques d'une cellule excitable, grâce à la technique de patch-clamp qui a fait l'objet d'un prix Nobel en 1991 en médecine (Neher and Sakmann, 1976).

Les canaux cationiques ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ) dépendants du potentiel partagent entre eux une structure secondaire homologue et une structure tertiaire similaire (très différente de la séquence primaire des canaux anioniques). Ils appartiennent à la même super-famille de canaux à 6 segments transmembranaires. Ils forment un pore unique et possèdent une symétrie tétramérique, soit grâce à un tétramère ( $\text{K}_v$ ) ou grâce à une seule protéine ( $\text{Na}_v$  et  $\text{Ca}_v$ ). Il existe une forte relation entre la structure du canal et sa fonction (Doyle et al., 1998).

Les canaux sodiques et calciques possèdent la même structure secondaire au niveau de leur sous-unité principale. Ces canaux sont composés de 24 segments transmembranaires organisés en 4 domaines similaires de 6 segments en hélice  $\alpha$  (24 segments d'une même protéine) (Payandeh et al., 2011; Tang et al., 2014).

La plupart des canaux potassiques possèdent eux aussi 24 segments transmembranaires dans leur sous-unité principale mais grâce à un assemblage de 4 sous-unités de 6 segments chacun (homotétramères ou hétérotétramères) (Long et al., 2005).

Les structures étant similaires entre les canaux cationiques, la différence de spécificité des ions traversant se retrouve principalement dans le filtre de sélectivité de chaque type de canal (Hille, 2001).

Les canaux potassiques possèdent une région strictement conservée, indépendamment de la famille de canaux potassiques. Le filtre est constitué d'une séquence GYGVT sur les quatre domaines (Gly-Tyr-Gly-Val-Thr), qui forment un cylindre propice au passage des ions  $\text{K}^+$  deshydratés en amont (Figure 1) (Heginbotham et al., 1994).

Le filtre de sélectivité des canaux sodiques possède deux régions pour la sélection du Na<sup>+</sup>. Une région externe constituée des résidus EEDD (Glu-Glu-Asp-Asp polaire chargé négativement) et une région interne constitué du motif DEKA (Asp-Glu-Lys-Ala polaire) (Figure 1) (Shi et al., 2006).

Le Ca<sup>++</sup> possède une structure du filtre de sélectivité avec une séquence EEEE (Glu-Glu-Glu-Glu) (Figure 1), (Heinemann et al., 1992, 1994).

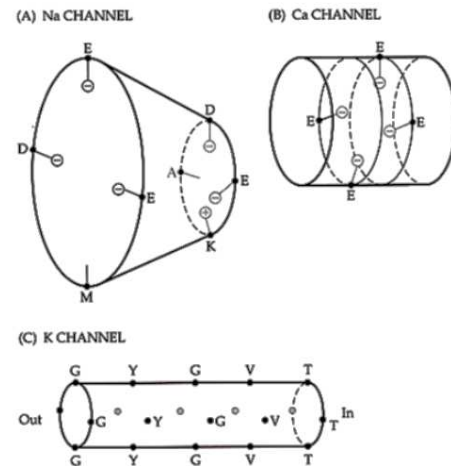


Figure 1: Représentation schématique des pores des différents canaux cationiques dépendants du potentiel. Image de Hille 2001.

### 1.C) Rôles généraux du calcium dans le corps

L'ion Ca<sup>++</sup> est un ion impliqué dans la production des hormones thyroïdiennes et de la fabrication de l'acide chlorhydrique dans l'estomac. Ses formes dérivées sont des constituants des dents et des os, essentiels à la structure de notre squelette et à notre bonne alimentation. Le Ca<sup>++</sup> est aussi impliqué dans les tissus blancs comme le cerveau, les yeux et les cordes vocales ainsi que dans la réponse au stress.

Il est également un second messager et un facteur de transcription dans les cellules musculaires ou non. De ce fait, le Ca<sup>++</sup> est primordial dans l'embryogénèse et la croissance de l'enfant ainsi que la survie de l'organisme chaque jour.

## 2) Canaux calciques dépendants du potentiel

Ils ont été mis en évidence en 1950, par l'observation de potentiels d'action (PA) sur des fibres nerveuses de grenouille (Katz, 1950). Ensuite, grâce au tétrabutyl ammonium qui bloque les canaux  $N_{av}$  et au tétraéthyl ammonium qui bloque les canaux  $K_v$ , le rôle du  $Ca^{++}$  a été mis en évidence plus tard dans la neurosécrétion (Fatt and Ginsborg, 1958; Fatt and Katz, 1953).

### 2.A) Classification des canaux calciques voltage-dépendants

Les canaux calciques dépendants du potentiel sont classés selon leur seuil d'activation (Tableau II). Les canaux HVA (High Voltage Activation) sont activés vers -30 mV et sont séparés en plusieurs types, L, P/Q, N et R selon leurs propriétés. En effet, les courants de type P/Q et N se retrouvent exclusivement dans le système nerveux central (SNC) pour la transmission d'information, tandis que le type L est plus largement répandu dans le corps.

Certains canaux sont activés à un potentiel plus faible, vers -70 mV, ce sont les LVA (Low Voltage Activation) appelés aussi le type-T. Au niveau du cœur, les canaux de type-T participent au PA des cellules du tissu nodal avec  $Ca_v1.3$  et ont donc un rôle important dans le pacemaker cardiaque.

Les membres de la famille des canaux  $Ca_v$  sont différenciés par leur sous-unité  $\alpha_1$  et c'est cette sous-unité principale qui détermine les propriétés biophysiques et pharmacologiques du canal (Hofmann et al., 2014).

Les canaux de type-L  $Ca_v1.2$ , qui possèdent la sous unité  $\alpha_{1C}$ , sont les seuls canaux calciques qui participent à la contraction des ventricules cardiaques, composante majeure de la circulation du sang à travers le cœur et la circulation.

CLASSIFICATION				LOCALISATIONS	FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES
Activation	Type de courant	Membres	Sous-unité		
HVA	L	Ca <sub>v</sub> 1.1	α <sub>1S</sub>	Muscle squelettique	Couplage excitation-contraction du muscle squelettique, régulation de la transcription
		Ca <sub>v</sub> 1.2	α <sub>1C</sub>	Système nerveux central, cardiomyocytes ventriculaires, cellules musculaires lisses, cellules endocrines	Couplage excitation-contraction du muscle lisse et cardiaque, sécrétion endocrine, transit calcique neuronal, signalisation calcique
		Ca <sub>v</sub> 1.3	α <sub>1D</sub>	Cellules endocrines, système nerveux central, cellules du tissu nodal et cardiomyocytes auriculaires, cellules ciliées de la cochlée	Sécrétion endocrine, pacemaker cardiaque, transit calcique neuronal, transduction auditive
		Ca <sub>v</sub> 1.4	α <sub>1F</sub>	Cellules de la rétine, moelle épinière, glande surrénale	Transduction optique
	P/Q	Ca <sub>v</sub> 2.1	α <sub>1A</sub>	Système nerveux central, cellules neuroendocrines	Libération de neurotransmetteurs, transit calcique dendritique
	N	Ca <sub>v</sub> 2.2	α <sub>1B</sub>		
	R	Ca <sub>v</sub> 2.3	α <sub>1E</sub>	Système nerveux central, cellules endocrines	Libération de neurotransmetteurs, transit calcique dendritique, sécrétion endocrine (insuline)
LVA	T	Ca <sub>v</sub> 3.1 Ca <sub>v</sub> 3.2 Ca <sub>v</sub> 3.3	α <sub>1G</sub> α <sub>1H</sub> α <sub>1I</sub>	Système nerveux central, cellules du tissu nodal et cardiomyocytes auriculaires, cellules musculaires lisses	Pacemaker cardiaque

Tableau II: Classification des canaux calciques voltages dépendants selon leurs propriétés physiques, leur localisation et leur fonctions physiologiques. Adapté de Hofmann et al., 2014.

## 2.B) Rôles des canaux calciques de type-L Ca<sub>v</sub>1.2

### 2.B.a) Sécrétion endocrine d'insuline

Suite à une hausse de glucose dans le sang, les cellules β pancréatiques vont libérer l'insuline présente dans les granules. Cette sécrétion est possible après dépolarisation de la cellule et élévation du Ca<sup>++</sup> intracellulaire.

L'inhibition des canaux de type-L Ca<sub>v</sub>1.2 par la nifédipine abolit la sécrétion d'insuline (Schulla et al., 2003). D'autres canaux calciques peuvent aussi être impliqués dans ce processus endocrine, comme Ca<sub>v</sub>1.3 (Nitert et al., 2008).

## 2.B.b) Potentiel d'action dans le cœur

Au niveau de l'oreillette droite, il existe un nœud de cellules automatiques qui se dépolarisent à intervalles réguliers. C'est le rythme sinusal, assuré par les canaux de type-T. Le courant se propage dans les cellules du cœur grâce aux jonctions de type GAP.

Dans les deux oreillettes, la dépolarisation provoque la contraction et facilite l'éjection de sang dans les ventricules pendant la phase de diastole. L'influx électrique converge au nœud auriculo-ventriculaire (entre les oreillettes et les ventricules) et progresse dans les deux ventricules de manière simultanée, par le faisceau de His et le réseau de Purkinje, jusqu'à la base du cœur. Les ventricules peuvent alors se contracter ensemble pour éjecter le sang dans la circulation pulmonaire et générale (Sherwood, 2006; Silverthorn, 2007).

Durant le potentiel d'action (PA) ventriculaire, le potentiel membranaire est modifié par le passage des ions de façon passive grâce aux canaux dépendants du potentiel. Il existe plusieurs phases (Figure 2), (Rougier and Abriel, 2015) :

- La phase 0, qui implique les canaux  $Na_v$ , voit la cellule se dépolariser par une entrée rapide d'ion  $Na^+$ .
- La phase 1 qui correspond à une repolarisation partielle grâce aux canaux  $K_v4.3$  ou courant  $I_{t0}$ . Elle est appelée la phase « *spike and dome* ».
- La phase 2 ou la phase du plateau calcique, avec les canaux de type-L  $Ca_v1.2$  par l'entrée lente d'ion  $Ca^{++}$ , et la sortie d'ion  $K^+$  par  $KCNE1/KCNQ1$  ( $K_v7.1$ ) et hERG.
- La phase 3, qui repolarise la cellule par les canaux réctifiants hERG et  $K_v7.1$  (repolarisation précoce et tardive) et l'inactivation des canaux  $Ca_v$ .
- La phase 4 correspond au repos de la cellule entre deux PA, grâce aux canaux  $K_{ir}$  actifs aux potentiels inférieurs à -40 mV.



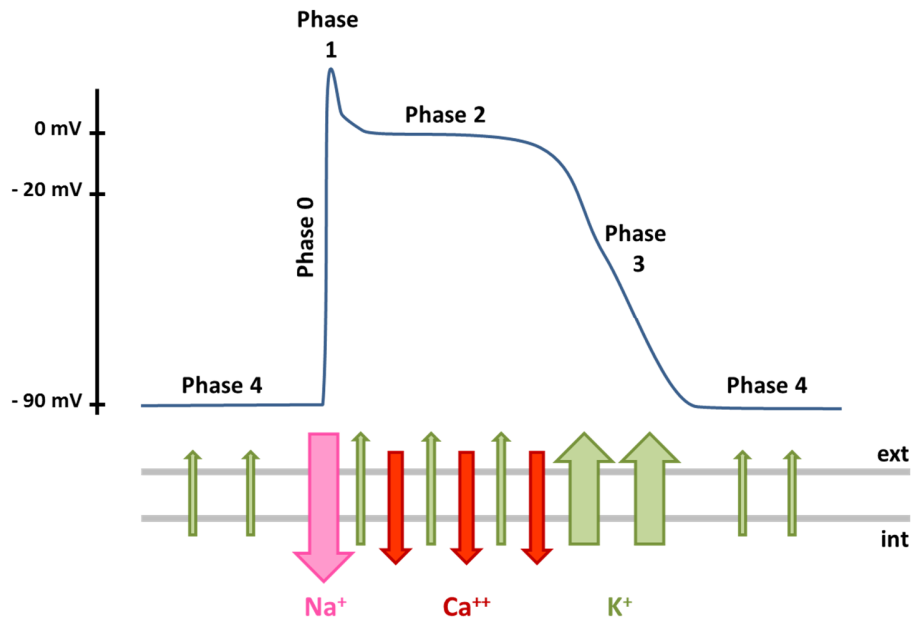


Figure 2: Représentation graphique du potentiel d'action ventriculaire et les ions impliqués dans les différentes phases au cours du temps.

Les canaux calciques présents dans les ventricules nécessitent un haut seuil d'activation (le type-L s'active vers -20 mV), c'est pour cela que l'entrée d'ion  $\text{Ca}^{++}$  ne coïncide pas avec l'entrée de  $\text{Na}^+$  lors de la phase 0, malgré la dépolarisation engendrée par l'entrée d'ion  $\text{Na}^+$  (les cinétiques calciques sont plus lentes que les cinétiques sodiques).

Durant le potentiel d'action, l'échangeur NCX ( $\text{Na}^+ \text{Ca}^{++}$  exchanger) fonctionne. Il permet la sortie de 1  $\text{Ca}^{++}$  et l'entrée de 3  $\text{Na}^+$  lorsque le potentiel de membrane est au repos. Lors de la dépolarisation, la large entrée de  $\text{Na}^+$  inverse l'échangeur (3  $\text{Na}^+$  sortent, 1  $\text{Ca}^{++}$  entre). Ce système participe à l'augmentation lente d'ion calcium dans la cellule lors de la phase plateau.

Ces courants électriques cellulaires peuvent être observés dans une vue globale grâce à l'électrocardiogramme (ECG). Il est possible d'observer les changements électriques globaux du cœur, par exemple en se positionnant à la base du cœur (Figure 3) (Silverthorn, 2007).

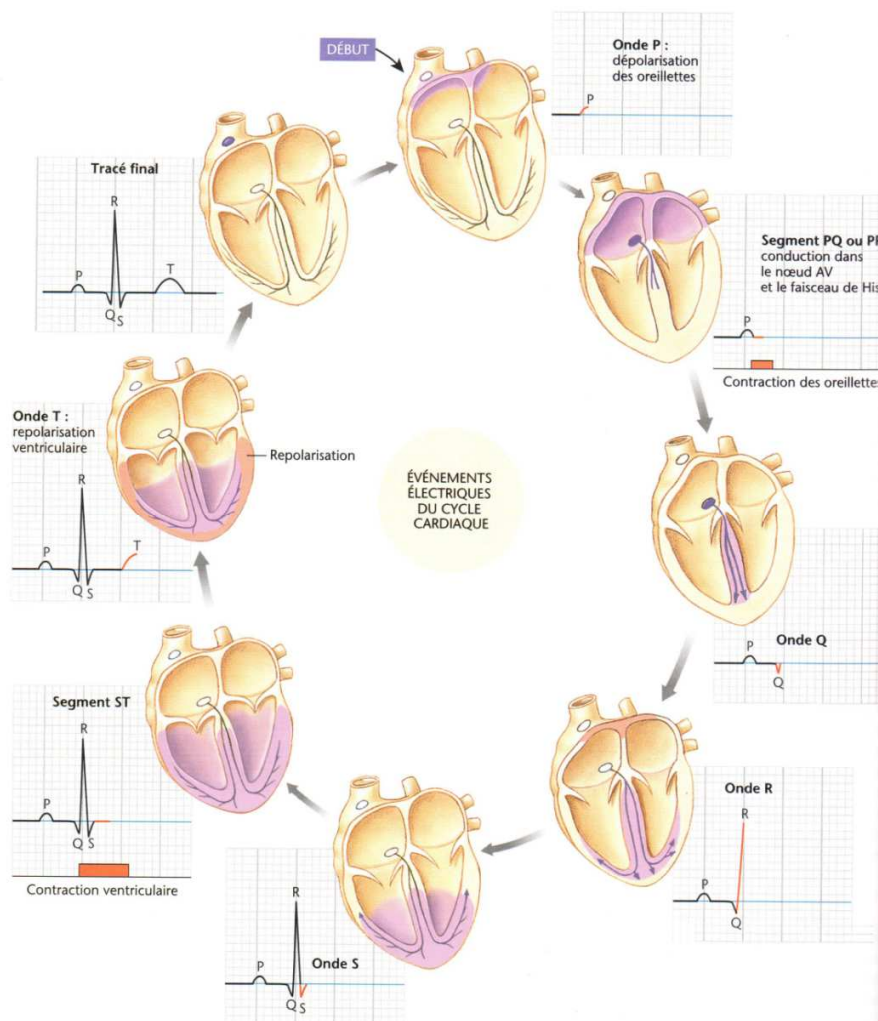
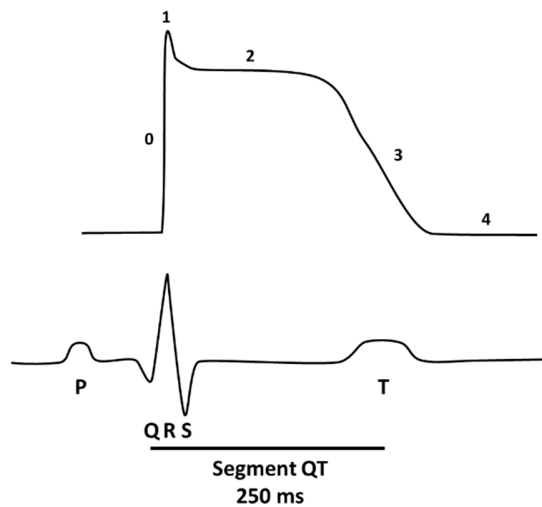


Figure 3: Représentation schématique de la correspondance entre les événements électriques et l'électro-cardiogramme. Adapté de Silverthorn, 2007.

L'onde P correspond à la dépolarisation des oreillettes.

Le complexe QRS représente la dépolarisation des ventricules. D'abord vers la base du cœur le long du sillon inter-ventriculaire, vers le point d'observation (QR) puis dans le reste du muscle ventriculaire, s'éloignant du point d'observation qui est la base du cœur (RS).

L'onde Q contient également la repolarisation des oreillettes, masquée par la dépolarisation du ventricule gauche majoritairement. L'onde T correspond à la repolarisation synchrone des cellules ventriculaires.



La durée du segment QT sert d'indicateur du fonctionnement des canaux calciques de type-L et de repolarisation du cœur car il traduit l'activité de tous les canaux calciques des ventricules. Certaines arythmies sont provoquées par une trop longue ouverture des canaux de type-L qui pourra être décelée par une prolongation de ce segment à l'ECG (Long QT syndrome) (Figure 4).

*Figure 4: Correspondance entre le potentiel d'action ventriculaire et l'ECG au cours du temps.*

L'influx d'ions  $\text{Ca}^{++}$  est essentiel pour initier la contraction du muscle cardiaque. C'est le couplage excitation-contraction.

### 2.B.c) Couplage excitation-contraction dans le cœur

La dépolarisation de la cellule va permettre l'activation des canaux calciques sensibles au potentiel dans le cœur. Ce sont les canaux de type L qui assurent cette fonction dans les ventricules, nécessitant une forte dépolarisation pour leur activation.

Le passage des ions  $\text{Ca}^{++}$  a lieu dans le sens du gradient de concentration (influx dans la cellule). Cette augmentation locale de  $\text{Ca}^{++}$  va permettre l'activation des canaux sensibles à la Ryanodine présents au niveau du réticulum sarcoplasmique (SR) (Figure 5) (Richard et al., 2006).

Ce couplage est possible car, dans le muscle strié cardiaque, les canaux de type L sont localisés dans les invaginations (tubule T) et le SR est proche de la membrane plasmique grâce aux diades (une citerne terminale avec une invagination de la membrane) (Shaw and Colecraft, 2013). Cette activité calcique est très localisée et il est possible d'observer des « sparks » calciques en microscopie (Cheng et al., 1996).

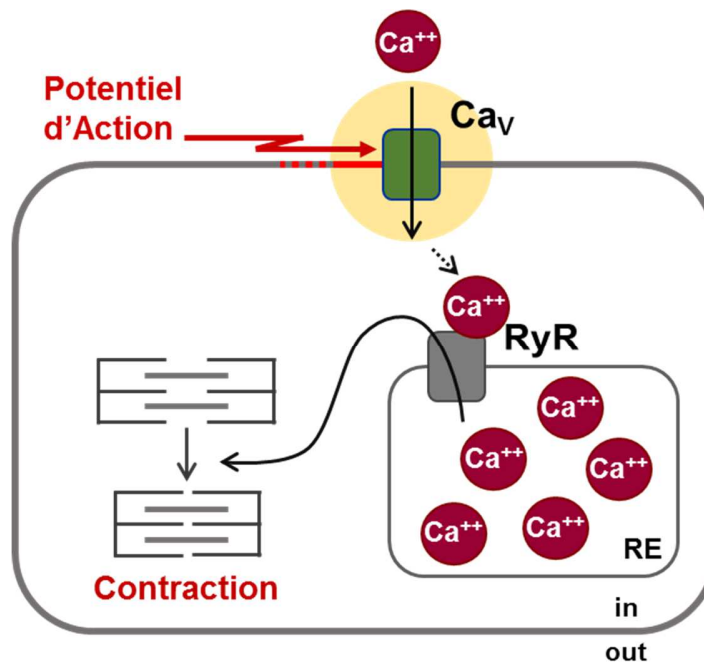


Figure 5: Représentation schématique du couplage excitation-contraction dans le cœur.

Dans le cœur, c'est un couplage chimique. Une molécule de  $Ca^{++}$  est essentielle pour initier l'ouverture du récepteur  $RyR_2$ , libérant ensuite le  $Ca^{++}$  stocké dans le SR.

Cette sortie d'ions dans la cellule, allant jusqu'à 10 fois plus d'ions  $Ca^{++}$  libre qu'en condition normale, permet sa fixation sur la troponine C au niveau des filaments d'actine. Cela permet la levée de l'inhibition par la troponine I et enclenche le glissement des myofilaments de myosine et d'actine avec l'aide de l'ATP, permettant la contraction (Bers, 2013).

Il est à noter que dans le muscle squelettique, le mécanisme de couplage repose uniquement sur l'interaction physique entre les canaux de type L et  $RyR_1$  pour la sortie de  $Ca^{++}$  du SR.

#### 2.B.d) Signalisation calcique

Les canaux de type L participent à l'augmentation de  $Ca^{++}$  intracellulaire et donc à la signalisation calcique, autre que la contraction. Ce second messenger joue plusieurs rôles dans la cellule (Figure 6).

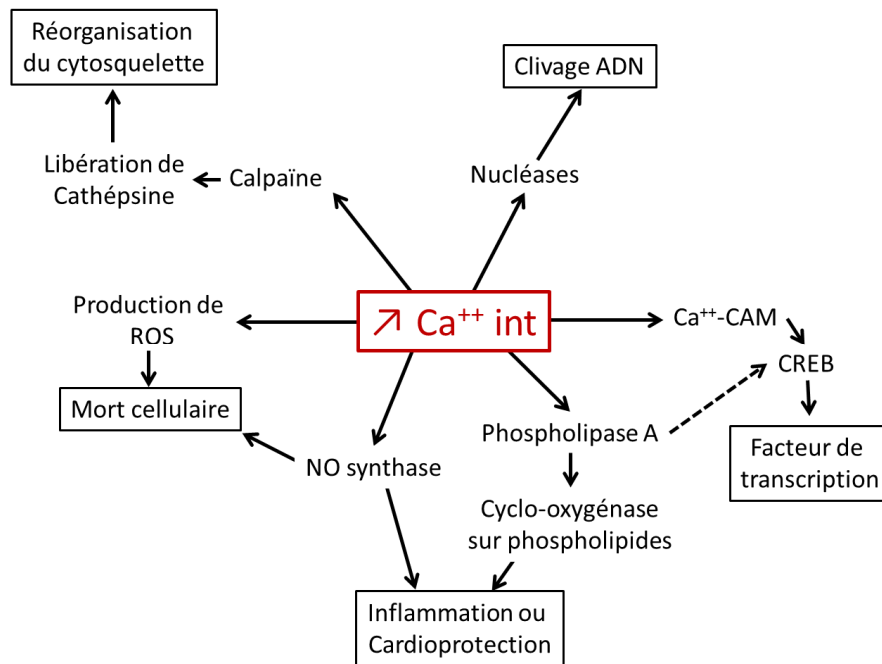


Figure 6: Exemple de signalisation(s) résultante(s) non exhaustive d'une élévation de  $Ca^{++}$  dans la cellule.

Le  $Ca^{++}$  peut activer la calpaïne qui réorganise le cytosquelette (Neuhof and Neuhof, 2014). Par la production de ROS (reactive oxygen species) ou la production de NO, il participe aussi à la mort programmée ou non de la cellule (Carraro and Bernardi).

L'oxyde nitrique permet aussi la relaxation des cellules musculaires des vaisseaux mais participe aussi à l'inflammation, comme les ROS (Taylor-Clark).

Le  $Ca^{++}$  est aussi un co-facteur de la phospholipase A, qui permet l'activation de la cyclo-oxygénase et selon le phospholipide, permet la cardioprotection ou l'inflammation (Hirabayashi and Shimizu, 2000).

En présence de la calmoduline (CAM), il permet l'activation du facteur de transcription CREB (Sun et al., 1994). Enfin, certaines nucléases peuvent aussi être activées par le  $Ca^{++}$  (Pollard et al., 2001).

Plusieurs voies de signalisation régulent l'activité du canal Cav1.2, tels que les RCPG via les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques ou les récepteurs à prostaglandine, l'adénylate cyclase ou les protéines kinases (Harvey and Hell, 2013). Le canal Cav1.2 participe aussi à la plasticité synaptique (Navedo and Santana, 2013).

### 2.B.e) Pathologies associées à Cav1.2

Le gène *CACNA1C*, à l'origine de la sous-unité principale du canal Cav1.2, peut être retrouvé muté dans certains types de pathologies. Plusieurs mutations gain ou perte de fonction de ce canal sont impliquées au niveau du SNC dans le retard mental, certaines formes d'autisme, de dépression et de schizophrénie, ainsi que dans des troubles bipolaires et des anomalies morphologiques (Gillis 2012, Bhat 2012, Uemura 2015).

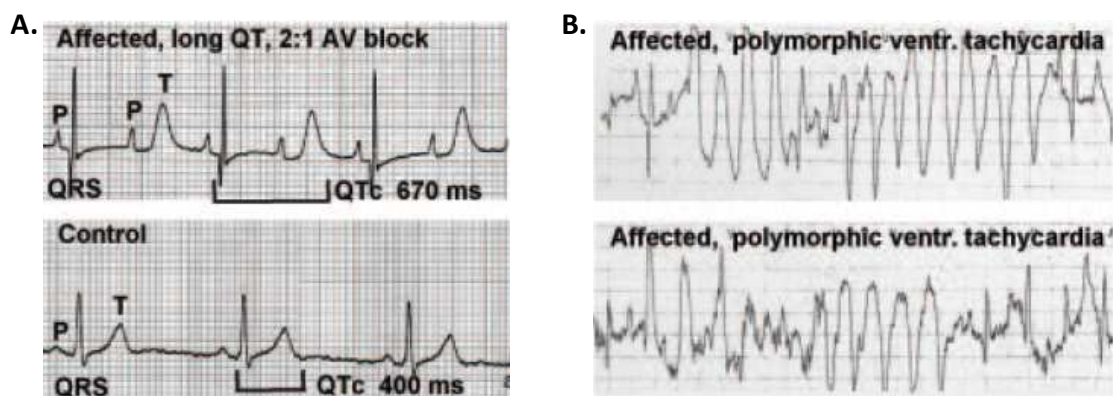


Figure 7: Électrocardiogramme de patients atteints du syndrome du QT long de type 3. A : ECG d'un patient atteint du syndrome du QT long en comparaison avec un patient sain. B : ECG d'arythmies ventriculaires. Images de Heydley et al., 2009.

Au niveau cardiaque, les mutations sont de type gain de fonction dans la boucle I-II, avec un allongement de l'intervalle QT (Long QT, LQT) à l'électrocardiogramme (Figure 7.A) (Hedley et al., 2009). Le maintien du courant calcique entrant entraîne des arythmies et une hypertrophie cardiaque dans la plupart des cas (Figure 7.B), mais aussi une diminution significative des cinétiques d'inactivation (Boczek et al., 2015; Raybaud et al., 2006). Certaines mutations appartiennent au syndrome de Timothy (Splawski et al., 2005).

Le canal  $Ca_v1.2$  est aussi impliqué dans le syndrome de Brugada, qui correspond à un décalage du segment ST à l'électrocardiogramme (Béziau et al., 2014).

Aucune mutation dans les domaines transmembranaires de  $Ca_v\alpha1C$  n'a été observée à ce jour pouvant causer ce genre d'arythmie, mais principalement des mutations en N-terminal et sur la boucle I-II..

La sous-unité  $Ca_v\alpha2\delta1$  du canal  $Ca_v1.2$  est aussi impliquée dans certains syndromes du QT court, notamment à cause d'une baisse d'adressage membranaire de la protéine en présence de mutations dans le gène *CACNA2D1* (Bourdin et al., 2015; Burashnikov et al., 2010).

Ces protéines étant les seuls canaux de type L dans les ventricules, il est important d'en comprendre le fonctionnement pour essayer de contrer les effets de l'arythmie.

Ces canaux calciques de type-L sont inhibés par la dihydropyridine et donc appartiennent à la famille des récepteurs sensibles aux dihydropyridines (DHPR) (Tang et al., 1993). C'est d'ailleurs un traitement largement utilisé dans les maladies cardiovasculaires, au même titre que les phénylalkylamines (exemple :Vérapamil®) et les benzothiazepines (Diltiazem®) (Lee et al., 2016).

## 2.C) Structure du complexe macromoléculaire $Ca_v1.2$

### 2.C.a) La sous-unité principale $\alpha1C$

La sous-unité principale de  $Ca_v1.2$  est codée par le gène *CACNA1C*. La protéine  $\alpha1C$  est composée de 24 segments transmembranaires organisés en 4 domaines de 6 segments en hélice  $\alpha$ , chacun nommé de S1 à S6 (Figure 8) (Tang et al., 2014).

Le segment S4 de chaque domaine est très conservé entre les espèces et constitue le senseur de potentiel du canal  $Ca_v1.2$ .

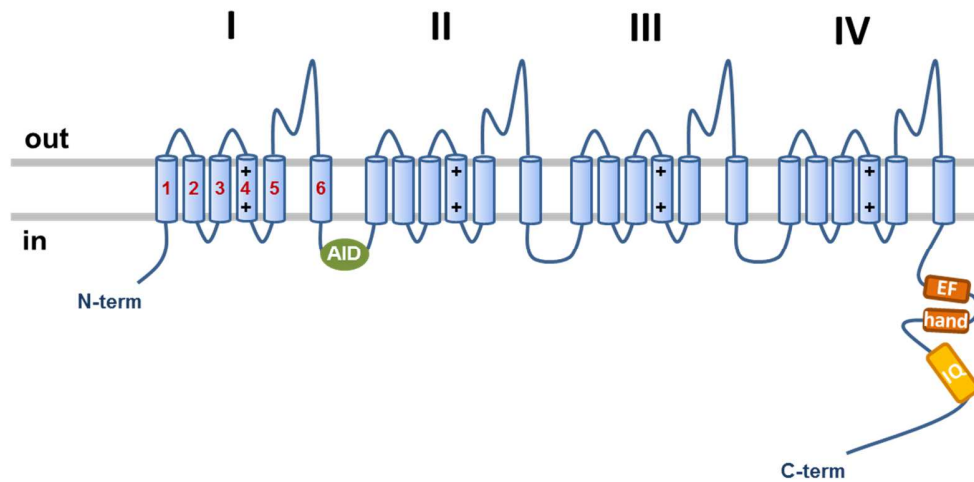


Figure 8: Schéma de la structure secondaire prédite du canal  $Ca_v1.2$  avec les séquences importantes pour sa fonction ou son interaction avec d'autres protéines.

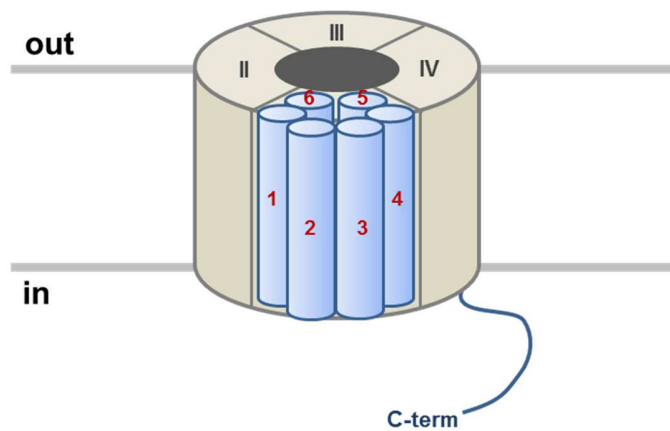


Figure 9: Schéma de la structure tertiaire prédite du canal  $Ca_v1.2$  au sein de la membrane plasmique.

Les domaines s'organisent en canal pour former un pore central unique. La région externe du pore est formée par les 4 boucles extracellulaires (P boucle) entre les segments S5 et S6 de chaque domaine. Les segments S6 forment le filtre de sélectivité du pore (Figure 9).



Ce filtre est composé de 4 glutamates (EEEE, Glu-Glu-Glu-Glu), une sur chaque boucle P, qui vont stabiliser l'ion  $\text{Ca}^{++}$  dans le pore du canal par leur groupement carboxyle polaire et privilégier les cations divalents dans le pore (Parent and Gopalakrishnan, 1995; Sather, 2005).

Les canaux calciques  $\text{Ca}_v1.2$  se retrouvent sous trois états distincts : l'état ouvert, fermé ou inactivé. Ces états sont régis par le mouvement du segment S4 chargé positivement et son impact sur le segment S6, mais aussi par l'inactivation liée à la calmoduline en présence d'ions  $\text{Ca}^{++}$ .

Le segment S4 est situé plus près de la surface interne en condition de repos, car la membrane est chargée négativement à l'intérieur (-90 mV). Les hélices S6 de chaque domaine se croisent et ferment donc le canal. C'est l'état fermé, activable par la dépolarisation de la membrane (Figure 10.A).

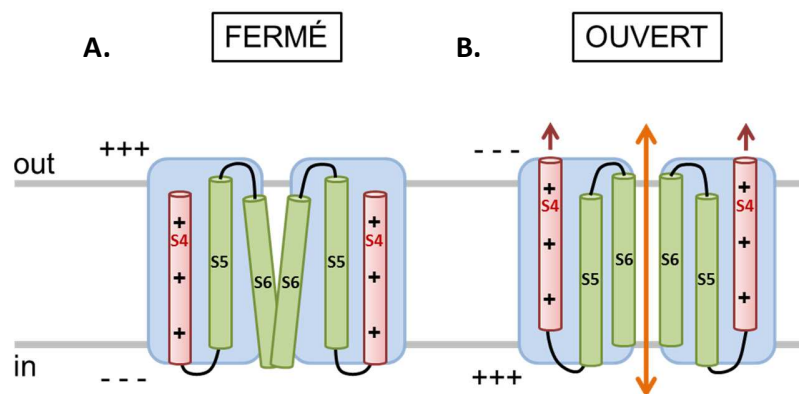


Figure 10: Représentation schématique du mouvement des hélices dans les différents états du canal  $\text{Ca}_v1.2$  selon la dépolarisation de la membrane plasmique.

Lors d'une dépolarisation, le segment S4 sera repoussé vers la surface externe en raison du changement de polarité. Cela va avoir pour effet de tirer indirectement le segment S6 et ainsi libérer l'accès du pore au passage des ions (Figure 10.B). C'est l'état ouvert du canal (Peterson et al., 1999).

L'inactivation du canal est possible grâce aux parties distales et proximales du C-terminale qui sont auto-inhibitrices (Crump et al., 2013; Satin and Schroder, 2009). Elle est aussi due

majoritairement à la calmoduline qui se fixe sur le « *motif IQ* » présent sur une autre partie du C-terminale intracellulaire (cf Figure 8). Un autre motif est présent et participe à l'inactivation liée au potentiel, le motif « *EF-hand* » qui permet le repliement de la queue C-terminale (Babitch, 1990). Pour d'autres sous-unités comme Cav $\alpha$ 1E, l'inactivation dépendante du potentiel de la sous-unité principale est régie par son motif AID, présent sur la boucle I-II (Berrou et al., 2001).

La protéine Cav $\alpha$ 1C possède une région de fixation pour la sous-unité Cav $\beta$ , appelée AID ( $\alpha$ -Interaction Domain) sur la boucle intracellulaire entre les domaines I et II, composée de 18 acides aminés (cf Figure 8) (Waard et al., 1995).

### 2.C.b) La sous-unité Cav $\beta$

La sous-unité Cav $\beta$  est entièrement cytosolique et possède un tronc conservé entre les différentes isoformes. Les régions N- et C-terminales sont quant à elles hautement variables (Harry et al., 2004).

Le corps de la protéine possède deux régions hautement conservés, SH3 (Src homology 3) et GK (Guanylate kinase) (Chen et al., 2004) qui servent à l'interaction protéine-protéine. Ces deux régions interagissent ensemble pour permettre le bon repliement de Cav $\beta$ .

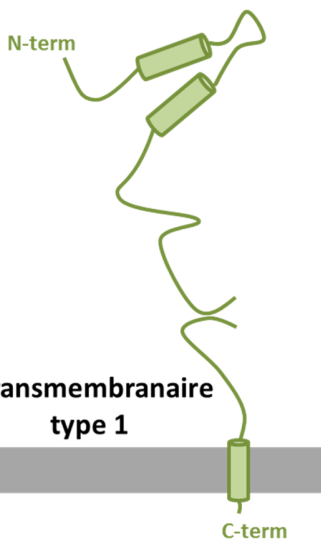
La sous-unité interagit avec Cav $\alpha$ 1, par la séquence AID, via une séquence BID ( $\beta$ -interaction domain) qui se situe sur le domaine GK, composée de 31 résidus (De Waard et al., 1994). C'est une liaison non covalente de haute affinité, de l'ordre du nanomolaire qui requiert un résidu tryptophane fortement conservé (Berrou et al., 2002, 2005; Szpyt et al., 2012).

Il existe 4 isoformes de Cav $\beta$  (Bourdin et al., 2010; Castellano and Perez-Reyes, 1994). La sous-unité Cav $\beta$  permet l'adressage à la membrane de la sous-unité principale et participe aussi à la stabilité du complexe calcique. C'est la sous-unité Cav $\beta$ 3 qui est utilisée dans notre laboratoire, qui possède les mêmes propriétés que les autres isoformes (Bourdin et al., 2010).

### 2.C.c) La sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$

La sous-unité  $\alpha 2\delta$  est produite à partir d'un même gène *CACNA2D1* (De Jongh et al., 1990). La sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha 2$  serait entièrement extracellulaire et  $\text{Ca}_v\delta$  serait transmembranaire avec un seul segment hydrophobe, aussi dite de type I. La structure tertiaire de cette sous-unité reste cependant encore à approfondir (Figure 11).

#### $\alpha 2$ extracellulaire



Les postulats scientifiques sont les suivants :

- la protéine suite à sa traduction est clivée en  $\text{Ca}_v\alpha 2$  et  $\text{Ca}_v\delta$  aux alentours du résidu 940, puis unie par des ponts disulfures (Andrade et al., 2007; Calderón-Rivera et al., 2012; Ellis et al., 1988).
- Cependant, il se pourrait que la protéine  $\text{Ca}_v\alpha 2$  soit sécrétée dans le milieu extracellulaire (Kadurin et al., 2012).

Figure 11: Schéma de la structure secondaire prédite de la sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$ .

Il existe 4 différentes isoformes de cette sous-unité auxiliaire du complexe  $\text{Ca}_v 1.2$ , celle étudiée ici est  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ . Elle est ubiquitaire dans les tissus et est présente autant dans le cœur et le muscle lisse que dans le cerveau (D'Arco et al., 2015; Dolphin, 2013). Elle est donc impliquée dans certaines arythmies et des cas d'épilepsie (Bourdin et al., 2015; Davies et al., 2007; Nieto-Rostro et al., 2014; Pippucci et al., 2013).

Cette protéine ne possède pas de domaine de liaison particulier pour la sous-unité principale, c'est une liaison de faible affinité qu'il reste encore à élucider.

La sous-unité en elle-même est très importante pour le fonctionnement du canal  $\text{Ca}_v 1.2$ . En effet, il a été montré au sein de notre laboratoire, qu'elle augmentait les densités de courant de  $\text{Ca}_v 1.2$ . Elle favorise aussi l'activation du canal  $\text{Ca}_v 1.2$  à des potentiels moins dépolarisants (Bourdin et al., 2015).

La structure cryo-microscopique du complexe  $\text{Ca}_v1.1$  du muscle squelettique de lapin a révélé que la sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha2$  surplombe  $\alpha1$  au niveau de la boucle I-II, avec son motif VWA (domaine Von Willebrand factor type A) avec le motif MIDAS (metal ion-dependent adhesion site) et Cache1 (Wu et al., 2015). C'est probablement là que se fait l'interaction et la modulation de l'activité, mais cela reste encore à explorer.

Il est important de constater une absence de densité électrique pour le domaine transmembranaire de  $\text{Ca}_v\delta$ . La sous-unité pourrait être clivée avant son adressage à la membrane. En effet, la sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha2$  seule ne semble pas assurer la fonction de la sous-unité. Probablement, la sous-unité  $\delta$  serait nécessaire à la structure tridimensionnelle de la protéine pour l'activation de  $\text{Ca}_v\alpha1$  par des domaines présents sur  $\text{Ca}_v\alpha2$  (Gurnett et al., 1997).

#### 2.C.d) La calmoduline

L'inactivation du canal  $\text{Ca}_v1.2$  est importante pour garantir l'excitabilité électrique des cellules cardiaques et nerveuses et contrôler les fonctions cellulaires assurées par le  $\text{Ca}^{++}$  en tant que second messenger.

La calmoduline (CAM) se fixe préférentiellement aux canaux  $\text{Ca}_v1.2$  au niveau du « *motif IQ* » dans le C-terminal de la sous-unité principale (Ohrtman et al., 2008; Peterson et al., 1999). De ce fait, des mutations dans cette région empêche la modulation de  $\text{Ca}_v1.2$  par la CAM (Zühlke and Reuter, 1998) et a été observée dans la mort prématurée de souris (Blaich et al., 2012).

Cette inactivation est initiée par l'influx de  $\text{Ca}^{++}$  par le pore du canal ( $\text{Ca}^{++}$ -dependent inactivation : CDI). En effet, même en présence d'autres divalents comme le barium, la calmoduline n'exerce pas autant son effet inhibiteur sur le canal (Brehm and Eckert, 1978).

La calmoduline est constitutivement liée à  $\text{Ca}_v\alpha1C$  et possède 4 sites de liaison au  $\text{Ca}^{++}$ , deux sur le lobe N et deux sur le lobe C de la calmoduline (Liang et al., 2003). Lorsque les quatre sites sont liés au  $\text{Ca}^{++}$ , la CAM va se replier sous le pore de  $\text{Ca}_v\alpha1C$  grâce au motif EF-hand qui sert de transducteur du signal (Figure 12), (Kim et al., 2004; Soldatov, 2003).

Dans les canaux de type P/Q, il a été montré que l'association  $\text{Ca}^{++}$ -CAM pouvait également faciliter l'ouverture du canal (Lee et al., 2000).

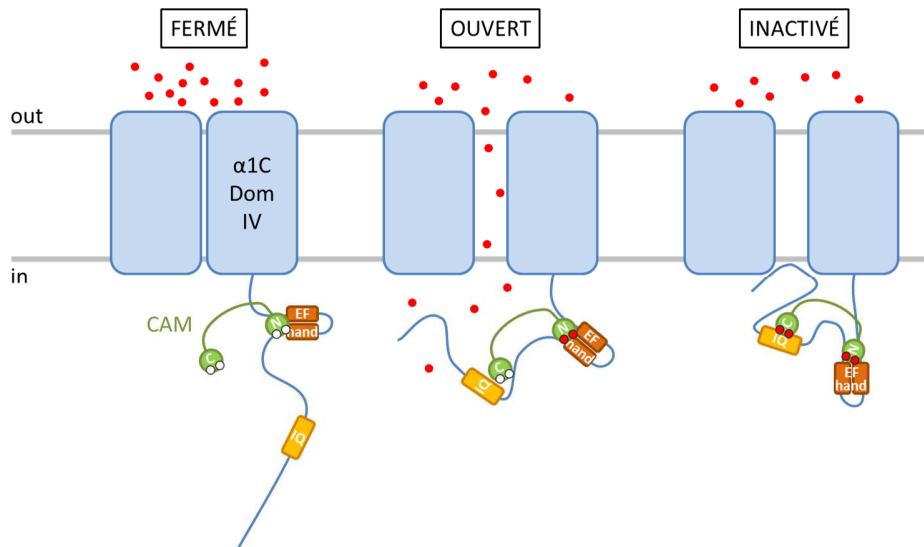


Figure 12: Représentation schématique de l'action de la CAM dans l'inactivation du canal  $Ca_v1.2$ .

À l'état de repos, la calmoduline est fixée à la région EF grâce à son lobe N. Suite à l'ouverture du canal  $Ca_v1.2$ , les ions  $Ca^{2+}$  transitent par le pore, ce qui les amène en contact avec le lobe N qui va fixer du  $Ca^{2+}$  sur ses deux sites (Petegem et al., 2005). Le motif EF va alors bouger et rapprocher le lobe C du motif IQ jusqu'à ce qu'ils se lient. Il s'ensuit un changement conformationnel qui permet aux deux lobes de s'enrouler. Le repliement favorise le rapprochement sous la face cytoplasmique, inactivant le canal (Figure 12) (Budde et al., 2002).

### 2.C.e) La sous-unité $Ca_v\gamma$

Cette sous-unité  $Ca_v\gamma$  possède 8 membres et est souvent associée aux canaux calciques dépendants du potentiel et à d'autres canaux neuronaux. Dans le complexe macromoléculaire  $Ca_v1.2$ , il n'a pas été démontré l'importance d'une sous-unité  $\gamma$  dans la modulation des courants ou dans l'inactivation (seulement dans le cas de  $Ca_v1.1$ ) (Arikath et al., 2003; Chen et al., 2007; Wei et al., 1991).

### 2.C.f) Fonctionnement du complexe $Ca_v1.2$

Un minimum de trois sous-unités sont nécessaires pour reconstituer les propriétés physiologiques du canal  $Ca_v1.2$  in vitro (Bourdin et al., 2010, 2015). La sous-unité  $Ca_v\alpha1C$ , responsable du pore, n'est pas fonctionnelle seule au niveau électrophysiologique.

La sous-unité  $\text{Ca}_v\beta 3$  dans le système recombinant HEKT est essentielle pour l'acheminement de  $\text{Ca}_v\alpha 1\text{C}$  à la membrane plasmique (ellipse rouge). Lors de l'ajout de la troisième sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  dans le système  $\text{Ca}_v\alpha 1\text{-Ca}_v\beta 3$ , l'adressage membranaire de  $\text{Ca}_v 1.2$  n'est pas augmenté (ellipse grise, Figure 13).

En effet, la moyenne d'intensité de fluorescence ( $\Delta\text{MFI}$ ) à la surface pour  $\text{Ca}_v 1.2$  est significativement plus forte pour la condition avec la sous-unité  $\text{Ca}_v\beta 3$  mais pas lorsque  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$  est ajoutée au système (ellipses rouge et grise) (Bourdin et al., 2015).

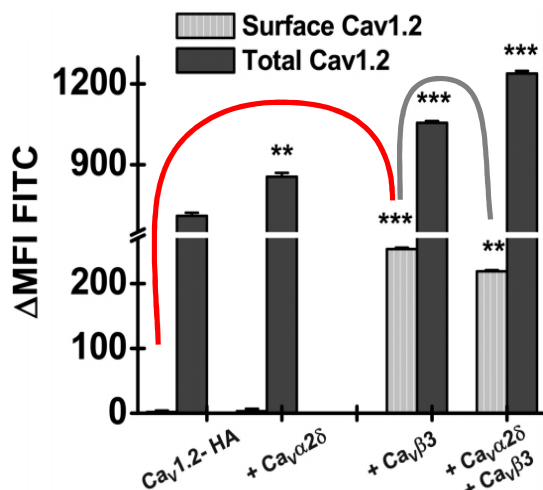


Figure 13: Moyennes des Intensités de fluorescence obtenues par cytométrie en flux, pour les différentes conditions utilisées dans l'étude de l'impact des sous-unités annexes dans l'adressage de la sous-unité principale. Figure de Bourdin et al., 2015.

Par ailleurs, c'est la sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  qui module significativement les courants de  $\text{Ca}_v 1.2$  (Figure 14). En effet, elle augmente la densité de courant lorsque co-exprimée avec  $\text{Ca}_v 1.2$  et  $\text{Ca}_v\beta 3$ , elle active le canal  $\text{Ca}_v 1.2$  à des potentiels moins dépolarisants et stabiliserait l'état ouvert.

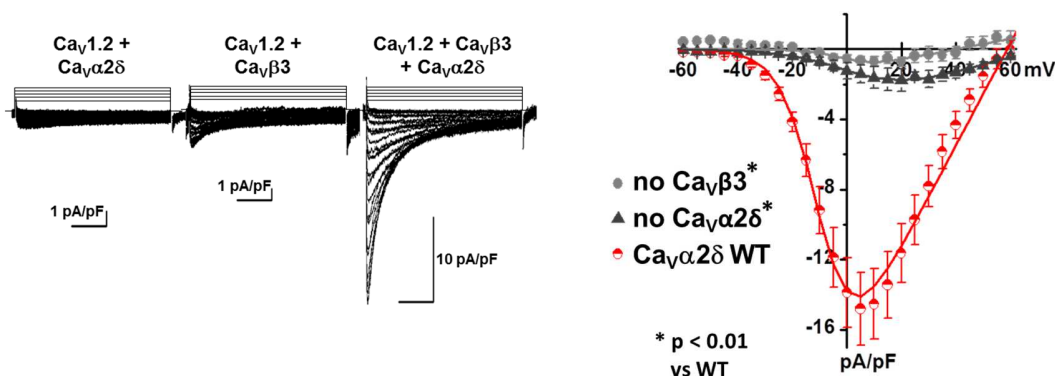


Figure 14: Données électrophysiologiques des courants macroscopiques des cellules recombinantes transfectées avec une ou plusieurs sous-unités du canal  $\text{Ca}_v 1.2$ . Image de gauche : Tracés de courant représentatifs pour chaque condition. Image de droite : Courbes moyennes courant/voltage (IV) des tracés correspondants. (Données personnelles)

La calmoduline étant présente de façon native dans le système d'expression (HEKT), l'inactivation CDI est donc présente de façon typique.

Les trois sous-unités doivent donc être présentes à la membrane plasmique de la cellule pour reconstituer les propriétés biophysiques du canal Cav1.2 (Figures 13 et 14).

### 3) Adressage des protéines membranaires

Un gène codant pour une protéine va d'abord être transcrit en ARNm (Acide ribonucléique messenger). Cet ARNm va ensuite être traduit par les ribosomes pour former un enchainement d'acides aminés spécifiques. Avant d'aller à la membrane plasmique pour exercer sa fonction, la protéine néo-synthétisée doit être maturée dans le RE (et Golgi).

#### 3.A) Signal d'adressage

L'adressage de la protéine est médié par la présence d'une séquence signal appelée SA (signal anchor). Selon l'emplacement de cette séquence dans la protéine, celle-ci pourra être orientée de différentes façons dans la membrane (Blobel, 1980).

Lorsque la séquence est retrouvée en tout début de protéine (en N-terminal), elle est composée de 16 à 30 acides aminés et possède trois régions distinctes. Lorsque présente en N-terminal, c'est une séquence hydrophile chargée positivement, la partie centrale est hydrophobe et la région C-terminal possède un signal de clivage pour les peptidases (Von Heijne, 1985).

La séquence SA sera reconnue par le translocon présent dans la membrane du RE, qui forme un pore aqueux permettant la translocation des protéines néo-synthétisées (Simon and Blobel, 1991).

Certaines protéines à la membrane plasmique possèdent un seul segment transmembranaire. Leur insertion est possible grâce à un segment hydrophobe, appelé stop transfer (ST). Lorsque ce segment est reconnu par le translocon, il stoppe la progression du polypeptide dans la lumière du RE. Le peptide SA sera alors clivé par des peptidases présentes dans le RE (Paetzel et al., 2002).

Grâce à cette séquence SA tout au début, la protéine aura son extrémité N-terminal dans le lumen du RE et sa partie C-terminal dans le cytosol (Figure 15.A). C'est le cas de la sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$  qui possède un SA en N-terminal et un segment hydrophobe en fin de  $\text{Ca}_v\delta$ .

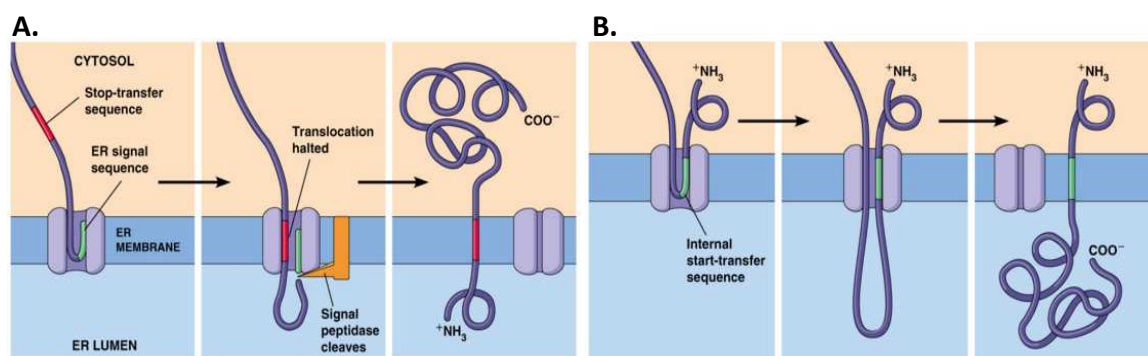


Figure 15: Représentation de la translocation des protéines dans le RE selon leur orientation dans la membrane. A: Protéines transmembranaires avec la partie N-terminale dans la lumière du RE. B: Protéines transmembranaires avec la partie N-terminale dans le cytosol. Images tirées de Pearson Education, 2012.

Lorsque la protéine possède une région SA éloignée du N-terminal dans la séquence primaire, elle est gardée au niveau du cytosol et forme un segment transmembranaire au niveau du SA. La translocation du polypeptide dans la lumière est possible grâce à une boucle (Goder and Spiess, 2001). La partie N-terminale se retrouve au niveau du cytosol et la partie C-terminale au niveau du lumen du RE (Figure 15.B).

Cette configuration correspond à celle de la sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha 1$ , les différents segments transmembranaires du canal étant en réalité déterminés par l'alternance de SA et ST (Lodish et al., 2000). Un couple SA/ST sera reconnu par le translocon pour être inséré dans la



membrane du RE. Les 24 segments transmembranaires de  $Ca_v1.2$  seront ainsi intégrés à la membrane du RE (Figure 16).

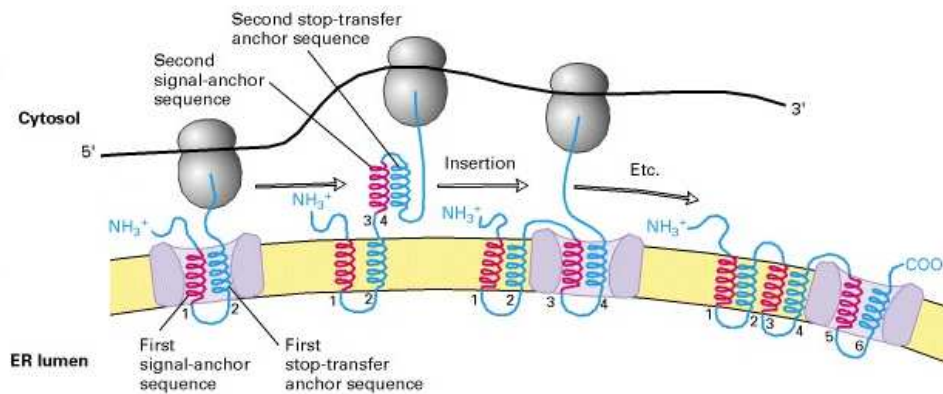


Figure 16: Représentation de la mise en forme des segments transmembranaires de la sous-unité principale  $\alpha1$ . Image tirée de Pearson Education, 2012.

L'insertion depuis le translocon des segments transmembranaires est possible grâce son ouverture directement dans la bicouche lipidique (Martoglio et al., 1995). L'intégration d'une protéine en particulier dans la membrane du RE est régulée par les différents signaux topogéniques données par ses résidus à la sortie du ribosome (Bibi, 1998).

Ces protéines devront être modifiées avant leur exposition à la membrane plasmique.

### 3.B) Modifications post-traductionnelles importantes pour l'adressage des protéines

Les modifications co- ou post-traductionnelles de certains résidus sont nécessaires à la maturation d'une protéine. C'est généralement l'ajout d'un groupement sur le radical d'un acide aminé grâce à des enzymes spécifiques du RE (Ellgaard and Helenius, 2003).

#### 3.B.a) La Phosphorylation

La phosphorylation est la plus connue des modifications post-traductionnelles des protéines. Cependant ce processus n'adresse pas les protéines à la membrane plasmique mais vers le noyau. Ce phénomène reconnaît les domaines C-terminaux riches en répétitions d'Arginine et Sérine pour y ajouter un groupement phosphate (Ghosh and Adams, 2011).

C'est aussi un système de régulation de la fonction des protéines déjà présentes à la membrane, par l'action des kinases qui ajoutent des groupements phosphate, ou des phosphatases qui enlèvent ce groupement. C'est le cas dans beaucoup de cascades cellulaires comme les récepteurs tyrosine kinase ou la voie des MAP kinases (Mitogen-Activated Protein). Cette modification post-traductionnelle peut aussi permettre la translocation de facteurs de transcription dans le noyau, comme NF- $\kappa$ B impliqué dans l'inflammation (Lawrence, 2009).

Le canal  $Ca_v1.2$  nécessite sa phosphorylation par la kinase A pour passer d'un état fermé inactivable à un état fermé activable.

### 3.B.b) La Glycosylation

La glycosylation est la plus importante des modifications co-traductionnelles dans le RE (Helenius, 1994). C'est elle qui permet le bon repliement des protéines.

La glycosylation consiste en l'ajout de sucres sur un résidu suite à la reconnaissance par une oligosaccharyl transférase d'une séquence consensus (Ruiz-Canada et al., 2009).

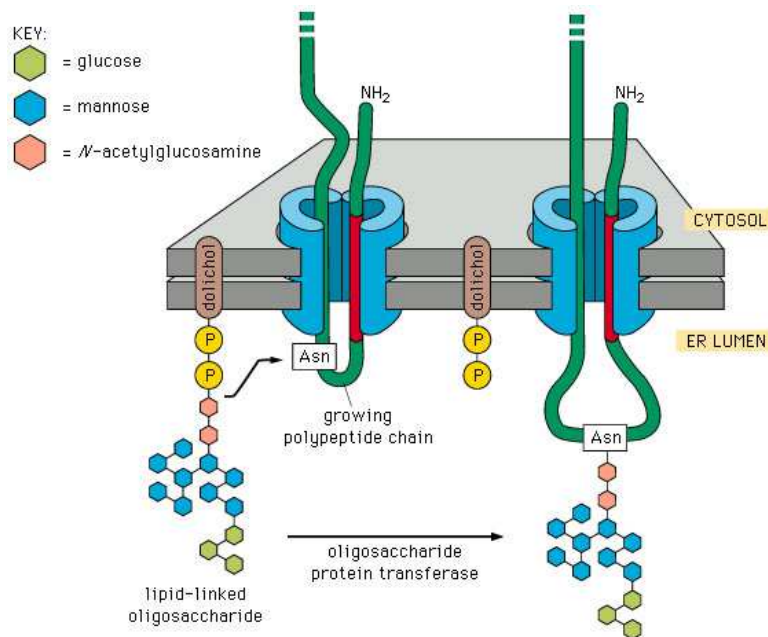
#### B.b.i) Les différents types de glycolysation

- Le type N

Dans le cas de la glycosylation de type-N, l'addition du groupement se fait sur une asparagine (N) grâce à la séquence N-X-T/S (Thréonine ou Sérine) (Marshall, 1974; Welply et al., 1983).

Le site N-X-T est souvent préféré au séquen N-X-S pour la glycosylation (Gavel and Von Heijne, 1990). Cependant, la présence d'une Proline (à l'emplacement X) dans le séquen abolit la glycosylation (Schwarz et al., 2011).

La plupart du temps, ces séquences sont retrouvées dans les boucles exposées à la lumière lors de leur sortie du translocon (entrée dans le RE, Figure 17) (Landolt-Marticorena and Reithmeier, 1994). Il existe cependant certains cas où des segments hydrophobes sont concernés par cette modification (Skvirsky et al., 1995).



La séquence de sucre ajoutée à la protéine est très conservée. Elle est constituée de deux N-acétylglucosamines (GlcNAc), neuf mannoses organisés en ramification et trois glucoses (Glc) en bout de chaîne (Aebi et al., 2010; Shibatani et al., 2005).

Figure 17: Représentation de la N-glycosylation dès l'entrée des protéines dans le RE lors de la reconnaissance de la séquence consensus. Image tirée de Carlano publishing, 1998.

Le complexe  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  est présent proche de la membrane grâce à un lipide, le dolichol (Burda and Aebi, 1999). Cet ajout est co-traductionnel et fixé sur l'arginine de la protéine dès son entrée dans le RE (Aebi, 2013).

Le transfert de ce complexe  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  est catalysé en une seule étape enzymatique par une oligosaccharide transférase (Mohorko et al., 2011).

L'ajout de sucres in vitro peut être étudié grâce à des glycosidases comme l'Endo H (Ota et al., 1998) ou la N-glycosidase F (Olivares et al., 1997).

Récemment dans notre laboratoire, il a été prouvé que la sous-unité  $\alpha 2\delta 1$  était glycosylée de façon native dans les cardiomyocytes de souris (Tétreault et al., 2016).

Un site potentiel de N-glycosylation sur l'isoforme 1 de rat a d'ailleurs été mis en évidence pour supporter le bon adressage de la protéine et sa fonction sur  $\text{Ca}_v1.2$ . La présence des 16

sites consensus de N-glycosylation est primordiale mais ce seraient le site N663 le plus important.

- Le type O/C

La glycosylation de type-O correspond à l'addition de glycans sur un groupement hydroxyl des acides aminés sérine ou thréonine (S/T) grâce à la reconnaissance d'une séquence répétée VNTR (Variable Number Tandem Repeat) dans le Golgi.

Les O-glycosylations sont de types mucines ou non mucines. Les glycoprotéines mucines sont les plus communes et contribuent à la sécrétion des muqueuses. Les glycans associés à la protéine sont un GlcNAc et éventuellement un N-acétyl neuraminique, ce sont généralement des chaînes d'oses plus courtes que celles présentes lors de la N-glycosylation. Il existe d'autres O-glycosylation non mucines avec des glycans comme le fucose, le xylose, le mannose, le galactose ou le glucose (Brockhausen et al., 2009).

La plus connue des protéines O-glycosylée est l'antigène T qui possède le groupement Gal $\beta$ 1-3GalNAc (Ju et al., 2011).

Ce type de glycosylation a aussi un effet important dans l'intégrité vasculaire, en séparant les vaisseaux vasculaires et lymphatiques (Herzog et al., 2014).

#### B.b.ii) Fonctions de la glycosylation

La N-glycosylation a un effet important dans le repliement des protéines et ainsi évite leur dégradation par le complexe Ubiquitine/Protéasome via le système ERAD (Endoplasmic reticulum associated degradation).

Dans le RE, les N-glycans sont reconnus par le complexe de chaperones calnexine/calréticuline (Hebert and Molinari, 2012). Ces chaperones facilitent le repliement en prévenant l'agrégation et le transport des protéines. Les deux glucoses externes dans la N-glycosylation seront enlevés par les glycosidases I et II et ainsi relâchent la protéine du complexe (Grinna and Robbins, 1979).

L'enzyme « UDP-glycoprotein glycosyl transférase » reconnaît le repliement, et si celui-ci n'est pas satisfaisant, re-glycolyse la protéine pour la réengager dans le complexe calnexine/calréticuline (Soldà et al., 2007).

Il existe une autre de ces chaperones ayant la même fonction qui est la protéine BiP (Hendershot, 2004).

Les protéines correctement glycosylées et repliées seront relâchées de ce cycle pour être transportées vers leur destination (Lederkremer, 2009).

### 3.B.c) L'ancrage GPI

Une autre modification importante pour le repliement et l'adressage de certaines protéines permet l'ancrage à la membrane phospholipidique par un autre mécanisme qu'une séquence hydrophobe. L'ancre GPI (Glucosylphosphatidyl inositol) est une modification nécessaire pour certaines protéines qui possèdent une région hydrophobe unique au niveau C-terminal et qui seront ancrées à la membrane par des glycolipides.

#### B.c.i) Biosynthèse de l'ancre GPI

L'ancrage GPI est une modification post-traductionnelle qui a pour but d'ancrer certaines protéines à la membrane externe de la cellule de manière stable (Englund, 1993; Stevens, 1995). L'ancre GPI est formée d'une série de sucres et de lipides qui est formée dans le RE.

À la surface cytoplasmique de la membrane du RE, un GlcNAc (N-acétylglucosamine) est ajouté à un phosphatidylinositol (PI). Ce GlcNAc-PI est ensuite dé-N-acétylé, ce qui permet sa palmitoylation sur l'inositol en position 2-O.

Un mouvement de type tête-bêche permet la présentation du complexe au niveau de la lumière du RE. Trois mannoses sont ajoutés séquentiellement sur le GlcNH<sub>2</sub>. Un phosphoéthanolamine est finalement ajouté au complexe (chez les eucaryotes au niveau du deuxième ou troisième mannose), servant de lien avec la future protéine qui y sera rattachée (Tiede et al., 1999).

Le noyau de sucre ( $\text{GlcNH}_2+3*\text{Man}$ ) est très conservé entre les protéines GPI-ancrées, malgré de légers changements au niveau des chaînes ramifiées (Low, 1989). Les lipides permettant l'ancrage dans la membrane varient en longueurs, de 14 à 28 carbones, saturés ou insaturés (McConville et al., 1994).

Le phosphatidylinositol servant d'ancrage à la membrane plasmique est sensible au clivage d'enzymes bactériennes spécifiques telles que la PI-PLC (Phospholipase C phosphatidylinositol spécifique) (Figure 18). Cet effet est notable sauf lorsque un acide palmitique est présent sur le cycle de l'inositol (Mayor et al., 1990; McConville et al., 1994).

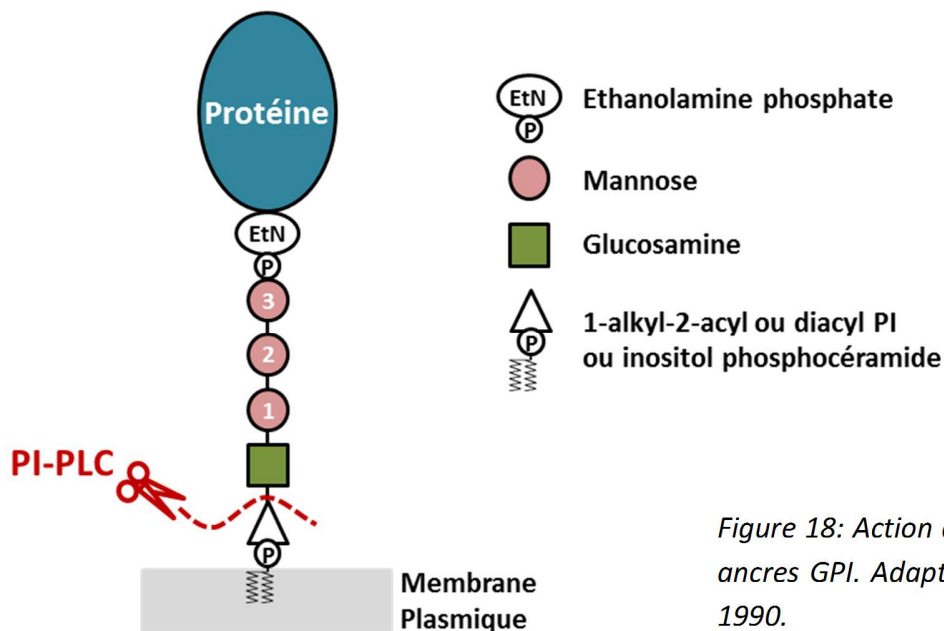


Figure 18: Action de la PI-PLC sur les ancrés GPI. Adapté de Mayor et al., 1990.

#### B.c.ii) Ancrage des protéines

Cet ancrage fut découvert en 1976 après traitement par la PI-PLC de *Bacillus cereus* (Nosjean et al., 1997). En effet, cette enzyme clive les structures lipidiques contenant du phospho-inositol sans altérer les membranes cellulaires (Griffith and Ryan, 1999). Beaucoup de protéines ont ainsi été retrouvées dans le milieu après traitement sur des tissus, comme l'alcaline phosphatase, la 5'-nucléotidase ou l'érythrocyte acétylcholinestérase. Ces protéines possèdent donc toutes des ancrés GPI.

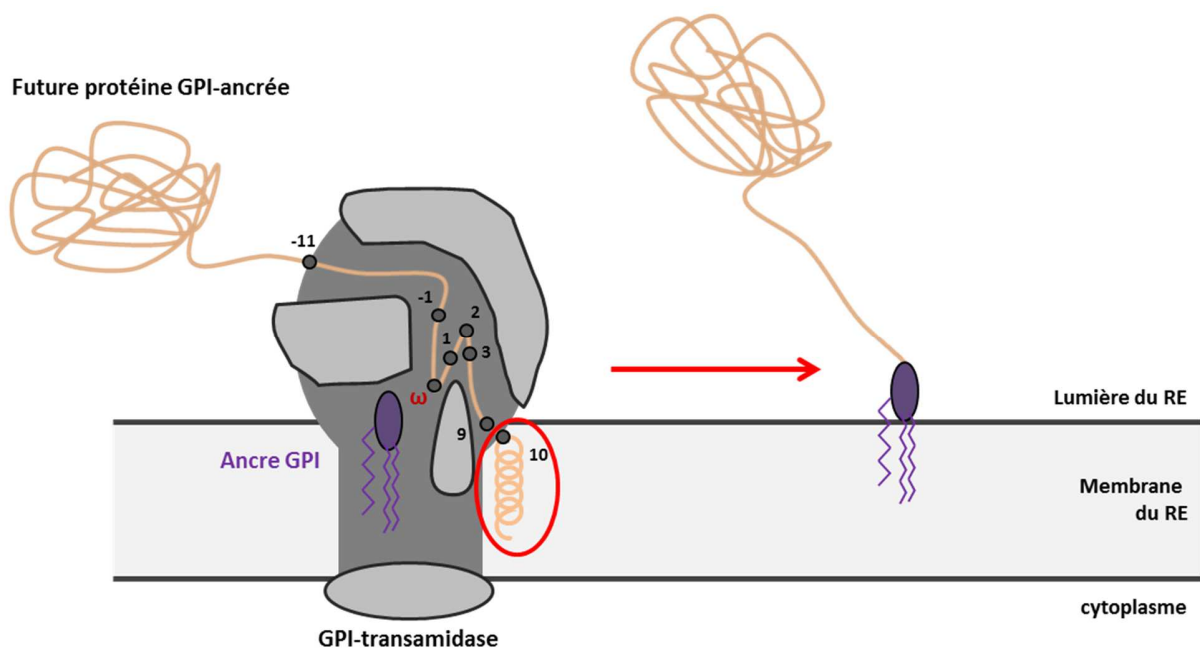


Figure 19: Représentation schématique des régions reconnues par la GPI-transamidase chez une protéine, au niveau du réticulum endoplasmique. Adapté de Eisenhaber et al., 1998.

L'ancre ainsi construite peut-être fixée à une protéine par la GPI-transamidase, la GPI-T (Ikezawa, 2002; Kinoshita et al., 2013; Sharma et al., 1999), dont la sous-unité catalytique est la GPI-8 appelée aussi PIG-G (Meyer et al., 2000; Shishioh et al., 2005; Yu et al., 2013). Cette protéine est primordiale pour la reconnaissance des protéines et la transamidation de l'ancre. Elle est par ailleurs très conservée entre les espèces (Nagamune et al., 2003).

Les structures reconnues chez la protéine responsables de cet ancrage se trouvent en C-terminal de la protéine, principalement une région hydrophobe servant de signal, mis en évidence sur la figure par le numéro 10 et l'hélice entourés en rouge (Figure 19) (Amthauer et al., 1993; Ferguson et al., 1985). Cette région hydrophobe est souvent initiée par une lysine en amont symbolisée par le numéro 9 sur l'image (Eisenhaber et al., 2001).

D'autres régions spécifiques sont aussi retrouvées telle qu'une région de liaison, 11 acides aminés avant un site oméga ( $\omega$ ) de clivage (-11) avec une faible prédiction pour une structure secondaire.

L'environnement du site  $\omega$  (de -1 à 2) doit contenir de petits acides aminés tels que des cystéines, aspartates, asparagines, sérines, alanines ou glycines (Cys ou C, Asp ou D, Ser ou S, Ala ou A, Gly ou G). Le site  $\omega$  en lui-même est inclus parmi les petits résidus, la plupart du temps une glycine, une alanine ou une sérine qui précède une région d'espace avant la région hydrophobe, des numéros 3 à 9 (Eisenhaber et al., 1998).

Ces protéines possèdent aussi un signal d'adressage à la membrane en N-terminal, non modifié dans le processus d'ancrage GPI (Amthauer et al., 1993).

Après transamidation de l'ancre sur la protéine reconnue, le groupe palmitoyl présent sur l'inositol est habituellement soustrait en vue d'un contrôle qualité (Fujita et al., 2006).

#### B.c.iii) Fonctions des protéines GPI ancrées

Il existe à ce jour environ 250 protéines connues qui possèdent des ancres GPI, allant de l'antigène CD52 qui possède 12 acides aminés à la protéine CDw109 retrouvée chez les lymphocytes T qui fait 250 kDa (Ferguson, 1999; Tiede et al., 1999). Elles sont essentielles pour l'embryogénèse et la survie des eucaryotes, aussi bien chez les levures que chez les mammifères (Kawagoe et al., 1996).

La présence d'ancres GPI sont aussi impliquées dans des pathologies comme le pathogène du Prion, sans que l'on en connaisse sa fonction (Aguzzi, 2005; Chesebro et al., 2005).

Ces protéines ont des rôles variés plus ou moins liés aux ancres elles-mêmes. L'alcaline phosphatase est une enzyme importante dans la physiologie rénale, la « Neuronal Cell Adhesion Molecule » permet l'adhésion cellule-cellule dans le cerveau. Il existe aussi des protéines GPI ancrées responsables de la cascade du complément nécessaire à la protection contre les pathogènes (Moon et al., 1999; Mukasa et al., 1995).

L'ancre GPI est résistante à la plupart des lipases et protéases extracellulaires (Low, 1989). Elle pourrait aussi affecter la structure de la protéine qui y est associée, grâce à une interaction directe ou bien en faisant interagir la protéine avec sa membrane. Elle peut également servir



de signal de transduction en s'associant avec des intégrines, tyrosine kinases ou des protéines G hétéro-trimériques (Robinson, 1997).

L'ancre GPI peut également faciliter la communication cellulaire et servir de signal apical pour la cellule.

Les protéines GPI-ancrées sont plus ou moins associées aux radeaux lipidiques, membranes fortement ordonnées avec beaucoup de sphingolipides et de cholestérol, résistantes aux détergents (Rajendran and Simons, 2005). Ces domaines constitueraient des plateformes pour toute une variété de fonctions cellulaires.

Il existe encore des divergences quant à la relation entre les ancres GPI et leur appartenance aux radeaux lipidiques (Glebov and Nichols, 2004; Varma and Mayor, 1998). Selon certains, une petite quantité de protéines GPI seraient organisées en petits domaines de l'ordre du nanomètre n'étant pas forcément des radeaux (environ 20 à 40%) (Sharma et al., 2004).

Ce type de modification post-traductionnelle n'exclut pas d'autres modifications telles que la N-Glycosylation et l'oligomérisation de certaines protéines (Benting et al., 1999; Paladino et al., 2004).

#### B.c.iv) L'ancrage GPI chez $Ca_v\alpha 2\delta 1$

La sous-unité  $Ca_v\alpha 2\delta 1$  est une protéine qui possède un segment hydrophobe et est donc susceptible d'être GPI-ancrée. Suite à une analyse informatique, il a été possible d'identifier une région potentielle de clivage pour l'ancrage GPI chez l'isoforme 1 de  $Ca_v\alpha 2\delta 1$  de rat (Tableau III).

$Ca_v\alpha 2\delta 1$ NM- 012919.3	Big-PI	PredGPI	GPI-SOM
Ancre GPI prédit	Non	Oui	Oui
Site "omega" probable	<b>G1061</b>	<b>V1062</b>	Non précisé

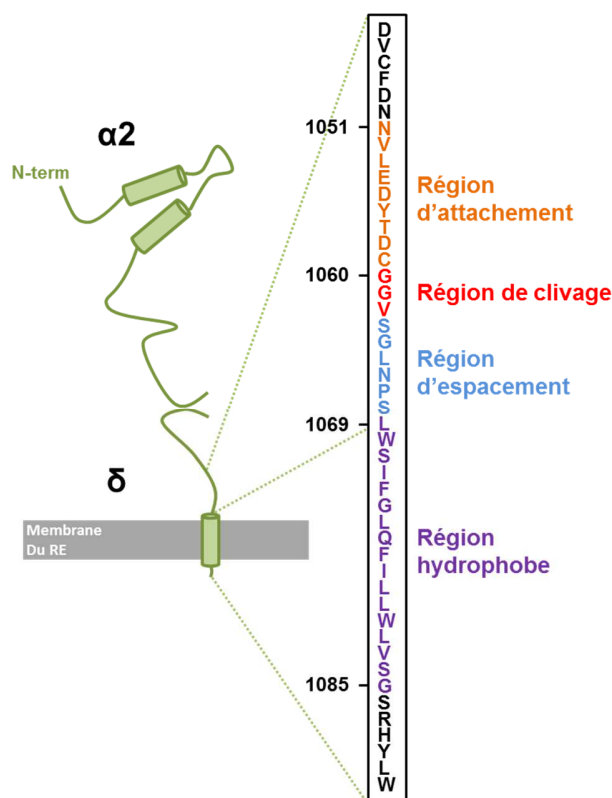
Tableau III: Tableau des différents algorithmes utilisés pour prédire un ancrage dans la sous-unité  $\alpha 2\delta 1$  de rat.

$Cav\alpha2\delta1$  a été analysée en utilisant trois algorithmes indépendants, Big-PI ([http://mendel.imp.ac.at/gpi/cgi-bin/gpi\\_pred.cgi](http://mendel.imp.ac.at/gpi/cgi-bin/gpi_pred.cgi)) (Eisenhaber et al., 1998), PredGPI (<http://gpcr.biocomp.unibo.it/predgpi/index.htm>) (Pierleoni et al., 2008) et GPI-SOM (<http://gpi.unibe.ch/>) (Fankhauser and Mäser, 2005).

D'après les analyses informatiques, deux programmes sur trois prédisent un ancrage, le site de clivage « oméga,  $\omega$  » pouvant être des acides aminés différents selon le logiciel.

En effet, Big-PI prévoit l'ancrage sur la glycine 1061, PredGPI préfère la valine 1062 et la littérature donne aussi la glycine 1060 comme site de clivage (Davies et al., 2010).

Le segment hydrophobe en C-terminal de la protéine est ainsi reconnu dans le RE pour être clivé et recevoir l'ancrage glyco-lipidique. Les différentes structures sont également présentes (Figure 20).



La région d'attachement est présente de l'acide aminé 1051 à 1059.

Le site oméga de clivage est potentiellement soit la Glycine 1060, soit la Glycine 1061 ou la Valine 1062.

L'environnement du site de clivage avec des petits acides résidus est aussi présent (Asp 1058, Cys 1059, Ser 1063, Gly 1064)

La région d'espacement est entre les résidus 1063 à 1068 et la région dite trans-membranaire ou hydrophobe initiée par une lysine se situe entre 1069 et 1085.

Figure 20: Représentation des différentes régions nécessaires à la reconnaissance et à l'ancrage de  $Cav\alpha2\delta1$  par la GPI-transamidase dans le RE.

Dans la littérature, la sous-unité  $Ca_v\alpha 2\delta 1$  a été retrouvée dans les radeaux lipidiques résistants aux détergents au niveau du cerveau de façon native. Lorsque traité avec la PI-PLC, la protéine est dans la fraction soluble, preuve qu'elle y est sensible (Davies et al., 2007).

Les résultats de microscopie après traitement à la PI-PLC dans des cellules COS-7 qui expriment de façon recombinante  $Ca_v\alpha 2\delta 1$  ne sont pas cependant pas concluants (Robinson et al., 2011).

Récemment, le complexe macromoléculaire  $Ca_v 1.1$  du muscle squelettique de lapin a été observé en cryo-microscopie (Wu et al., 2015, 2016). La sous-unité  $Ca_v\alpha 2\delta 1$  est visible au niveau extracellulaire, mais le segment transmembranaire de delta n'est pas visible (chez le lapin entre les résidus 1065-1106 et chez le rat entre 1049-1090, cf Annexe 2).

Cette observation serait compatible avec le clivage et l'ancrage GPI.

## Objectif de l'étude

La sous-unité  $Ca_v\alpha 2\delta 1$  est responsable de la modulation des courants calciques de type-L lorsqu'elle est présente à la surface des cellules au sein du complexe  $Ca_v1.2-Ca_v\beta$  (Bourdin et al., 2015). De ce fait, tous les processus de modifications post-traductionnelles sont cruciaux pour son repliement et son adressage à la membrane.

L'importance de la N-glycosylation a été récemment mise en évidence chez  $Ca_v\alpha 2\delta 1$  dans la stabilité et la fonction de la protéine (Tétreault et al., 2016). D'autres modifications post-traductionnelles pourrait avoir un impact sur la protéine. Le segment transmembranaire unique de  $Ca_v\delta$  a été indiqué comme un marqueur d'une autre forme de modification, permettant un ancrage à la membrane par un lipide : l'ancrage GPI.

Ce mécanisme nécessite des régions spécifiques au niveau de la séquence primaire de la protéine, notamment une région  $\omega$  de clivage, qui semble exister chez  $Ca_v\alpha 2\delta 1$  après analyse informatique en position G1060, G1061 ou V1062. Le rôle de cette étude est de mettre en évidence la présence ou non d'un ancrage membranaire de type GPI et de comprendre les déterminants moléculaires qui aboutiraient à ce type d'ancrage.

# Matériels et Méthodes

## 1) Biologie moléculaire

### 1.A) ADN utilisés

Les différents ADN (Acide désoxyriboonucléique) utilisés lors de toutes les expériences proviennent d'isoformes déjà séquencés, référencés dans GenBank. La sous-unité principale  $Ca_v1.2$  provient du lapin, sous le numéro X15539 (Williams et al., 1992). Les sous-unités  $Ca_v\beta3$  et  $Ca_v\alpha2\delta1$  proviennent d'isoformes présente dans le cerveau du rat sous l'appellation M88751 et NM\_012919 (Castellano et al., 1993).

Les sous-unités ont été préalablement insérées dans des plasmides commerciaux (Figure 21). Le plasmide pCMV-tag5A pour les sous-unités  $Ca_v\alpha1C$  et  $Ca_v\beta3$ . Le plasmide pmCherry-N1 pour la sous-unité  $Ca_v\alpha2\delta1$  (mCherry en C-terminal) (Bourdin et al., 2015; Shakeri et al., 2012).

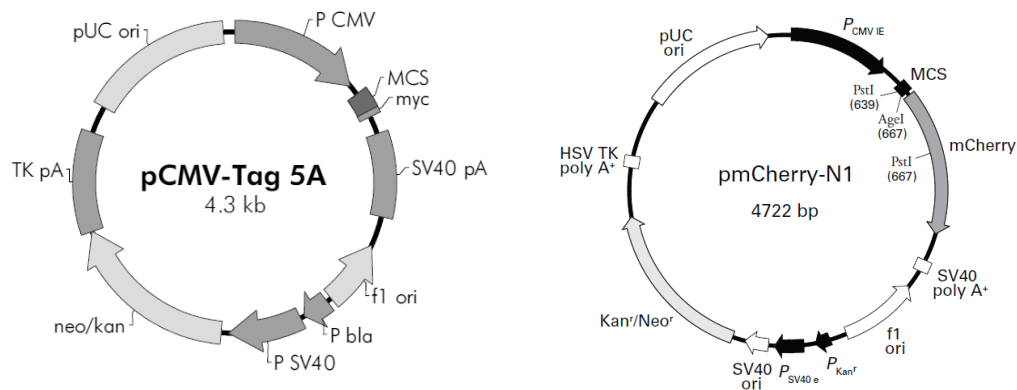


Figure 21: Détails des plasmides utilisés pour sous-cloner les ADN utilisés dans cette étude.

La séquence primaire de  $Ca_v\alpha2\delta1$  chez le rat est constituée de 1091 résidus et possède 96% d'homologie avec la séquence prédite chez l'humain, le clone NM\_000722 (Annexe 2). L'épitope Hémagglutinine a été inséré dans le domaine extracellulaire  $Ca_v\alpha2$  entre les acides aminés D676 et R677 (Bourdin et al., 2015).

## 1.B) Mutants de Ca<sub>v</sub>α2δ1

### 1.B.a) Mutagénèse dirigée

Les mutants présents dans cette étude ont été produits avec le kit « Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit » (*New England Biolab*) Les amorces ont été élaborées grâce au site internet de *New England Biolabs Inc*, *NEBaseChanger*. L'amorce « forward » ou celle « reverse » contient la mutation voulue à introduire dans Ca<sub>v</sub>α2δ1. Le plasmide contenant la sous-unité de type sauvage est utilisé comme ADN parental auquel viendront se fixer les amorces avec la mutation.

L'insertion de la mutation se fait par PCR (poly-chain reaction) grâce à plusieurs étapes répétées.

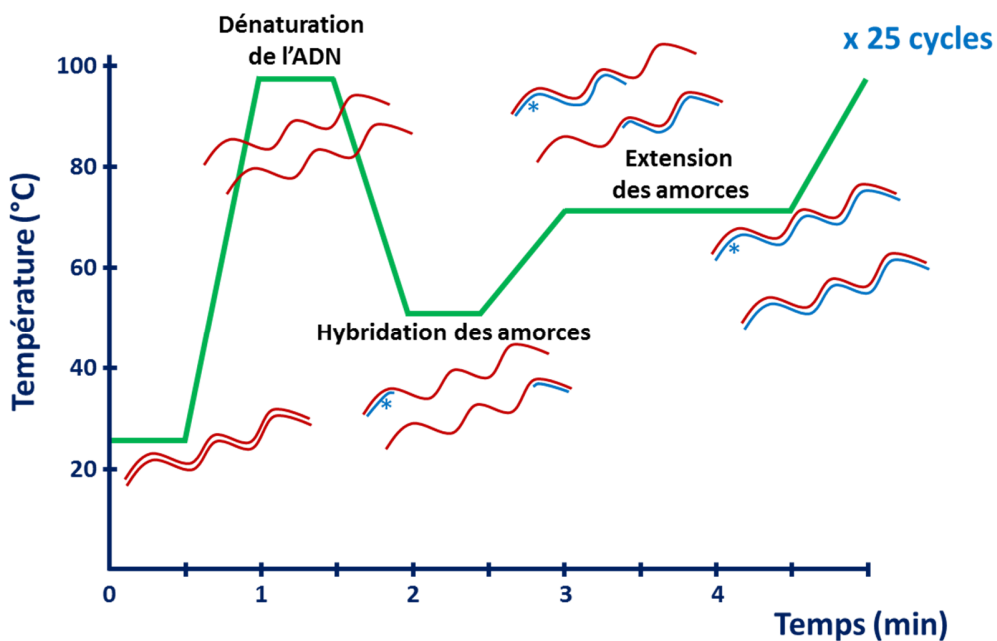


Figure 22: Représentation schématique de la méthode d'amplification de l'ADN par PCR.

La PCR est une technique qui permet d'amplifier de l'ADN en y introduisant une mutation ponctuelle, une délétion ou une substitution d'un ou plusieurs acides aminés selon les amorces (Figure 22).

25 cycles sont nécessaires pour obtenir une quantité d'ADN satisfaisante. Ces cycles contiennent différentes températures :

- 98°C pour la séparation des deux brins d'ADN.
- La température adéquate pour l'hybridation des amorces, ici de 55°C à 57°C selon les amorces.
- 75°C pour l'extension des amorces sur le brin d'ADN.

### 1.B.b) Amplification de l'ADN

L'ADN de la PCR peut être vérifié avec un gel d'agarose à 1% et un intercalant de l'ADN, l'HydraGreen. L'ADN parental est détruit du produit PCR grâce à l'enzyme Dpn1 qui reconnaît la méthylation de l'ADN, pour ne laisser que l'ADN formé.

Le produit de PCR est ensuite transformé dans des bactéries compétentes *E.Coli* DH5- $\alpha$  avec du milieu SOC puis étalé sur une gélose contenant l'antibiotique de résistance, ici la kanamycine pour tous les plasmides utilisés.

L'ADN présent dans une colonie unique est extrait par MiniPrep (*Quiagen*) et séquencé pour vérifier la présence de la mutation (Plateforme Génomique, IRIC, Université de Montréal).

Les résultats sont donnés en tant que séquence nucléotidique et sous forme de chromatogramme (Figure 23).

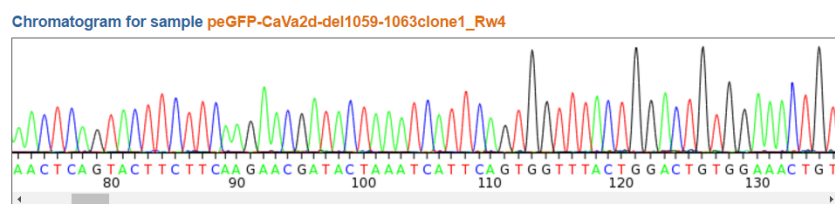


Figure 23: Exemple d'un chromatogramme après séquençage par la plateforme Génomique de l'IRIC, Université de Montréal.

Ils sont analysés par homologies de séquence avec une base de données grâce à un Blastn (*National Center for Biotechnology Information* : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Les clones possédant la mutation voulue, avec le reste de la séquence sans anomalie, seront à nouveau transformés dans les bactéries compétentes *E.Coli* DH5- $\alpha$ . Ils seront ensuite cultivés dans du milieu de culture LB Broth pour amplifier l'ADN en vue de l'extraire par une MidiPrep (*Quiagen*). Les constructions sont enfin vérifiées par Western Blot.

### 1.B.c) Constructions utilisées dans cette étude

Les différentes constructions utilisées sont de plusieurs types. Tout d'abord, les vecteurs vides comme pmCherry et peGFP (Green Fluorescent Protein) utilisés pour la détection des cellules transfectées selon les conditions. Ensuite les vecteurs contenant les différentes sous unités du complexe  $Ca_v1.2$  sans mutation comme pCMV-tag5A- $Ca_v1.2$  (sous-unité principale  $\alpha1C$ ), pCMV-tag5A- $\beta3$  et pmCherry- $Ca_v\alpha2\delta1$ -HA WT (Hémagglutinine).

Enfin, les mutants de la région de clivage de  $Ca_v\alpha2\delta1$  sont construits comme expliqué précédemment : pmCherry- $Ca_v\alpha2\delta1$ -HA G1060A, pmCherry- $Ca_v\alpha2\delta1$ -HA G1060I, pmCherry- $Ca_v\alpha2\delta1$ -HA G1061A, pmCherry- $Ca_v\alpha2\delta1$ -HA G1061I, pmCherry- $Ca_v\alpha2\delta1$ -HA G1060A/G1061A, pmCherry- $Ca_v\alpha2\delta1$ -HA V1062A et pmCherry- $Ca_v\alpha2\delta1$ -HA V1062I.

Les constructions phCMV<sub>3</sub>GFP-GPI et pCMV-hLDLR-GFP (Low density lipoprotein receptor) ont été gracieusement données par le Dr Gaétan Mayer (Institut de Cardiologie de Montréal) pour les images de microscopie et ont été décrites dans certains de ces articles (Mayer et al., 2008; Poirier et al., 2015).

## 2) Biologie cellulaire

### 2.A) Culture cellulaire

La lignée cellulaire utilisée au sein du laboratoire est la lignée HEK293T (HEKT) appelée aussi tsA-210. Les cellules sont cultivées dans des pétris de 100 mm avec du « Dulbecco's high-glucose minimum essential medium » ou DMEM-HG (*Life Technologies*) accompagné de 10% de sérum bovin fœtal (FBS) et 1% de pénicilline-streptomycine dans un incubateur à 37°C



avec 5% de CO<sub>2</sub> (Bourdin et al., 2010, 2015). Les passages de ces cellules sont au nombre de deux par semaines.

Plusieurs spécimens de cette lignée sont conservés en azote liquide en attendant leur décongélation pour les expériences. Pas plus de 40 passages pour une lignée ne sont tolérés à cause de la fragilité des cellules dans les expériences.

Une lignée stable de HEKT contenant la sous-unité Cavβ3 est aussi entretenue dans le même incubateur. Le milieu est similaire mis à part l'ajout d'un antibiotique pour la sélection des cellules uniquement détentrices de l'ADN de Cavβ3 dans leur génome, la geneticine.

## 2.B) Transfection d'ADN

Les cellules HEKT ou β3 stables sont transfectées à 80% de confluence (1 million de cellules par 10<sup>6</sup> cm<sup>2</sup>) dans des pétris de 35 mm, sauf pour l'ultracentrifugation qui se fait dans des pétris de 100 mm. Les sous-unités sont transfectées selon un ratio de 1 : 1 ou 4 µg : 4 µg pour pCMV-tag5A Cav1.2 et pmCherry-N1-Cavα2δ1, pour un volume de 10 µL de lipofectamine 2000® (*Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent, Invitrogen*) et 500 µL d'OptiMem (*Opti-MEM® I Reduced-Serum Medium (1X), Invitrogen*). Le ratio ADN : lipide est donc de 1 :2.5.

Pour les tests de la phospholipase C phosphatidyl inositol spécifique (PI-PLC) en microscopie confocale, phCMV<sub>3</sub>-GFP-GPI ou pCMV-hLDLR-GFP ont été transfectés avec le vecteur vide pmCherry avec un ratio ADN de 4 µg:0.2 µg. Le ratio ADN : lipide est toujours de 1:2.5.

La construction pmCherry-Cavα2δ1-HA est exprimée soit de façon sauvage sans mutation, appelé WT ou bien avec les mutations. Pour toutes les expériences, un total de 8 µg d'ADN a été transfecté, sauf pour l'ultracentrifugation qui compte 24 µg d'ADN.

## 2.C) Essais de Cycloheximide

Les cellules sont incubées avec 100 µg/mL de cycloheximide 24h à 36h après transfection (*Sigma-Aldric, Canada*) afin de bloquer la synthèse de nouvelles protéines. Aux temps donnés (0h ou sans cycloheximide, 1h, 2h, 4h ou 6h), les lysats totaux subissent une migration sur un gel SDS-PAGE à 8% (Sodium dodecyl sulfate- Polyacrylamide gel electrophoresis), suivit d'un immuno marquage pour visualiser Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 (*Alomone, 1:1000*), mCherry (*Biovision, 1:20000*) et GAPDH (*Sigma, 1:25000*). La densité totale de protéine Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 est exprimée de façon relative grâce au GAPDH (Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) et est ensuite normalisée par rapport à la densité relative du temps 0 de chaque condition afin d'obtenir un temps de dégradation.

La densité des protéines a été mesurée par Image Lab 5.2™ (*Biorad*). Les temps de dégradations ont été mesurés à partir de 3 expériences indépendantes.

## 3) Immunofluorescence

### 3.A) Ultracentrifugation

#### 3.A.a) Protocole d'extraction des protéines

Cette technique permet l'isolation de la membrane plasmique du reste de la cellule. Le protocole est une adaptation d'une précédente publication (Lizotte et al., 2005).

Cette technique permet de séparer 3 différents compartiments de la cellule, le cytoplasme, les membranes totales et la membrane plasmique. Le lysat total est aussi obtenu grâce à cette technique.

Succinctement, les cellules transfectées ont été solubilisées dans du tampon homogénéisant Tris-HCl 20 mM à pH 7.2 agrémenté d'inhibiteurs de protéases (*Sigma-Aldrich, 0.001%*) puis une isolation mécanique est effectuée. Le lysat échantillonné (3 tubes) est traité différemment selon la fraction à récupérer.

Fraction 1 : Après 2 h d'incubation à 4°C dans 1% de triton X100, le premier tube est centrifugé à 10 000 g 10 min pour obtenir le lysat total.

Fraction 2 : Le second tube est centrifugé à 200 000 g à 4°C pendant 20 min. Le surnageant correspond à la fraction cytosolique. Le culot est resuspendu dans du tampon homogénéisant contenant 1% de Triton X-100. Après 30 min à 4°C, une seconde centrifugation à 200 000 g a lieu. Le surnageant obtenu constitue la fraction des membranes totales de la cellule.

Fraction 3 : Après une centrifugation à 10 000 g pendant 10 min, le surnageant est centrifugé à 200 000 g pendant 20 min à 4°C. Le culot est resuspendu dans le tampon homogénéisant contenant 0.6 M de KCl pour dissocier les protéines et une autre centrifugation à haute vitesse est effectuée. Le culot est lavé par deux centrifugations avec du tampon homogénéisant. Le culot final est resuspendu dans le Tris-HCl + inhibiteurs et est considéré comme la fraction de la membrane plasmique.

### 3.A.b) Western Blot

Dans le cas de protéines ne provenant pas de la technique d'ultracentrifugation, les protéines totales sont lysées à partir d'un tampon RIPA (Radio immunoprecipitation assay) (*Sigma-Aldrich*) avec 0,001% de cocktail d'inhibiteur de protéase (*Sigma-Aldrich*), puis mises à agitation à 4°C pendant 30 minutes avant une centrifugation à 13 000 rpm pendant 30 min. Le surnageant est alors prélevé pour constituer le lysat total.

Pour toutes les protéines, il est nécessaire d'effectuer un dosage grâce à l'albumine du sérum bovin (BCA Protein Assay Kit, *Thermo Fisher Scientific*) pour mettre la même quantité de protéine dans chaque puits. Les protéines sont ajoutées à un tampon de Laemmli 4X qui contient 0.4 mM de 2-β-mercaptoethanol. Le gel dénaturant à 8% de polyacrylamide subit une électrophorèse afin de séparer les protéines selon leur taille. Un marqueur de taille migre dans le même gel pour pouvoir calculer la masse moléculaire des protéines (*Precision Plus Protein™, Bio-Rad*).

Les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (*Biorad*) qui est ensuite bloquée avec 5% de lait en poudre dans du PBS 1X (tampon phosphate salin).

Les anticorps pour révéler les protéines sont : anti-Ca<sub>v</sub>α<sub>2</sub> (*Alomone*, 1:1000) et anti-Cherry (*Biovision*, 1 :10 000). Les témoins de charge sont soit l'anti-GAPDH (*Sigma*, 1 :25 000) pour marquer les protéines cytoplasmiques, soit l'anti-pan-cadhérine (*Cell Tech*, 1:5000). La pan-cadhérine est une protéine présente dans la membrane plasmique, donc qui atteste de l'isolation de la fraction membranaire.

Le signal est détecté grâce à l'« ECL Chemiluminescent Substrate » (*Biorad*). Les images sont capturées par le ChemiDoc Touch™ (*BioRad*) et analysées par le logiciel Image Lab (*BioRad*) pour mesurer la masse des protéines et recadrer les images.

Le poids calculé pour la construction pmCherry-Ca<sub>v</sub>α<sub>2</sub>δ<sub>1</sub>-HA est de 153 kDa, sans prendre en compte les modifications post-traductionnelles.

La construction donne donc deux bandes en révélant avec l'anti-α<sub>2</sub>, une à 200 kDa et une à 175 kDa selon les modifications post-traductionnelles de la protéine. Le GAPDH migre à 37 kDa et la pan-cadhérine est un monomère de 140 kDa.

### 3.B) Microscopie confocale

#### 3.B.a) Transfections pour l'imagerie

***Imagerie pour voir l'adressage à la membrane des mutants.*** Les cellules HEKT Ca<sub>v</sub>β<sub>3</sub> stables ont été transfectées avec pCMV-tag5A-Ca<sub>v</sub>1.2 et pmCherry-Ca<sub>v</sub>α<sub>2</sub>δ<sub>1</sub>-HA WT ou mutant.

***Imagerie pour voir la sensibilité de Ca<sub>v</sub>α<sub>2</sub>δ<sub>1</sub> à la PI-PLC.*** La PI-PLC est une enzyme qui clive spécifiquement les ancras GPI présentes à la membrane plasmique. Les différentes transfections seront traitées ou non avec cette enzyme pendant 16h après leur division dans du DMEM HG + 1% de FBS et ainsi éviter les possibles interactions du FBS avec l'enzyme (3 U/mL). Le véhicule sera mis en présence des cellules dans la condition sans PI-PLC (20 mM Tris HCl ph 7.5, 1 mM EDTA, 0.01% sodium azide, 50% glycérol).

Les cellules HEKT Ca<sub>v</sub>β<sub>3</sub> stables ont été transfectées avec pCMV-tag5A-Ca<sub>v</sub>1.2 et pmCherry-Ca<sub>v</sub>α<sub>2</sub>δ<sub>1</sub>-HA WT. Le contrôle négatif pour l'enzyme est constitué des cellules HEKT Ca<sub>v</sub>β<sub>3</sub>

stables transfectées avec pCMV-hLDLR-GFP qui est un récepteur ancré dans la membrane plasmique par un segment transmembranaire et ne possède donc pas d'ancre GPI. La protéine GFP est fusionnée en C terminal du LDL récepteur (Low-Density Lipoprotein).

Le contrôle positif pour l'enzyme est constitué des cellules HEK293 stables transfectées avec pCMV<sub>3</sub>GFP-GPI. La protéine GFP-GPI est construite pour être ancrée à la membrane plasmique grâce à une ancre GPI. Le vecteur vide pmCherry est co-transfecté avec les deux contrôles pour servir de contrôle de transfection.

Pour ces deux conditions, un pétri non transfecté est utilisé comme contrôle négatif pour la fluorescence à chaque expérience.

### 3.B.b) Préparation des cellules vivantes

Les cellules sont divisées 6 h après transfection avec de la trypsine-EDTA 0,05% (*Invitrogen*) et isolées dans des pétris avec un revêtement de poly-D-Lysine munis d'une lamelle. Exactement 24 h après transfection, les cellules sont incubées avec un marqueur membranaire, le WGA (Wheat Germ Agglutinin) (1:200) (*Invitrogen*), dans du PBS 1X à température ambiante pendant 20 min. Un anticorps anti-HA couplé au fluorochrome FITC (Fluorescein Isothiocyanate conjugué, anticorps monoclonal de souris) est utilisé pour détecter la présence de Ca<sub>v</sub>α2δ1 à la membrane plasmique (1:100) (*Clone HA-7, Sigma*) (45 min à 4°C). Du DAPI est incubé dans du PBS 1X jusqu'à la prise des images (1:1000) (*Life Technologies*) pour marquer les noyaux.

Du DMEM sans phénol sera utilisé pour le lavage des cellules et la dilution des anticorps dans le cas de l'étude sur la sensibilité de la protéine à la PI-PLC.

Les images sont capturées grâce au microscope Zeiss LSM 710 par Louis Villeneuve à l'Institut de Cardiologie de Montréal avec un objectif à immersion x63/1.4 ou avec l'objectif x20 pour les plans larges.

### 3.B.c) Analyse des images

Les images sont analysées par le logiciel ImageJ (*Fiji*) pour enlever le bruit de fond et produire les pixels de colocalisation. Les images sont prises au niveau du noyau des cellules et acquises en deux dimensions avec une qualité de 1024x512 pour une image en x63/2.0.

Le canal mCherry excité par le laser de 543 nm et détecté par le filtre entre 597 nm et 629 nm, il est utilisé pour détecter les cellules transfectées. Il est alors possible de comparer la fluorescence FITC dans ces cellules (excité avec le laser 488 nm et détecté avec le filtre entre 493 nm et 548 nm). Le canal WGA (excité par le laser 633nm, détecté avec le filtre 648 nm et 727 nm, visualisé en rouge) et le canal FITC (en vert) sont utilisés pour produire les pixels de colocalisation (en blanc) grâce à l'extension « Colocalisation Finder » et ainsi regarder la localisation membranaire plus ou moins importante dans les mutants ou en présence de PI-PLC.

### 3.C) Cytométrie en flux

Notre technique de cytométrie en flux a fait l'objet d'un article sur invitation dans le journal Jove (accepté : Bourdin et al., 2016). Il est possible de déterminer l'expression d'une protéine à la surface des cellules dans la condition non perméabilisée grâce à la présence de l'étiquette hémagglutinine sur Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1.

#### 3.C.a) Préparation des cellules

Les cellules sont récupérées 24 h après transfection, lavées avec du PBS 1X et marquées avec 5  $\mu$ g/mL de l'anticorps anti-HA couplé au FITC à 4°C pour 30 min. Afin de déterminer la quantité totale de protéines, les cellules sont aussi fixées et perméabilisées avec le kit BD Cytotfix / Cytoperm™ Fixation / Permeabilization (*BD Biosciences*) à chaque expérience.

Les taux de fluorescence détectés avec l'isotype IgG-FITC de souris (Immunoglobuline G à 5  $\mu$ g/mL) ou l'anti-HA FITC conjugué (5  $\mu$ g/mL) dans les cellules non transfectées ne sont pas différents de la fluorescence mesurée en absence de fluorophore, garantissant la spécificité de l'anticorps anti-HA FITC conjugué pour notre protéine.

Les conditions contrôles sont faites en triplicat pour chaque expérience :

- Cellules HEKT Cav $\beta$ 3 stables non transfectées sans anticorps.
- Cellules HEKT Cav $\beta$ 3 stables non transfectées avec l'anti-HA FITC pour mesurer le bruit de fond de l'anticorps.

- Cellules HEKT Cav $\beta$ 3 stables transfectées avec pCMV-Cav1.2 et pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT.

Ce contrôle positif produit une augmentation significative de 3-log de niveau de fluorescence pour les deux fluorescences, FITC (abscisse) et mCherry (ordonnée) sur le diagramme en deux dimensions.

Chaque mutant est effectué en triplicat à chaque jour de trois transfections indépendantes, en condition non perméabilisée et perméabilisée avec les contrôles appropriés.

### 3.C.b) Enregistrement des données de fluorescence

Le cytomètre en flux FACSAria III<sup>®</sup> SORP (*Becton Dickinson*) de la plateforme de cytométrie du Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie de l'Université de Montréal a été utilisé.

Les techniciens Serge Sénéchal et Armelle Le Campion sont responsables de la lecture des tubes préalablement préparés.

Brièvement, pour détecter le FITC conjugué à l'anti-HA et le mCherry présent de manière constitutive dans Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1, les lasers utilisés sont 488 nm et 561 nm respectivement. Les différentes fluorescences sont détectées par les photomultiplicateurs 530/30 pour FITC et 610/20 pour mCherry. Ces deux fluorophores ont été sélectionnés pour éviter le recouvrement des spectres d'absorption et d'émission, permettant de distinguer les deux fluorescences de façon indépendante.

Les cellules passent une à une à travers un flux liquide pour être excitées par les différents lasers. Différentes caractéristiques autres que l'intensité de fluorescence sont acquises par l'ordinateur comme la taille, donnée par le « forward scatter » (FSC ou Dispersion de la lumière frontale) ou la granulosité, donnée par le « side scatter » (SSS). Les cellules vivantes sont sélectionnées et 10 000 d'entre elles sont enregistrées pour analyse sous le format .fcs.

### 3.C.c) Analyse et quantification de la densité membranaire relative

Le logiciel utilisé pour l'analyse des données de cytométrie en flux est FlowJo 10. Deux différents groupes sont constitués entre la condition non perméabilisée et perméabilisée pour une analyse indépendante au sein d'un même fichier.

Le fichier .fcs présente les cellules enregistrées sous la forme d'un graphique montrant la taille en abscisse (FSC) et la granulosité en ordonné (SSC ou Dispersion de la lumière déviée). Les cellules vivantes sont sélectionnées sous la forme d'une ellipse pour exclure les débris et les cellules mortes.

Le graphique en 2-dimension des cellules vivantes montre la fluorescence mCherry versus la fluorescence FITC pour chaque cellule. Deux cadrans sont déterminés comme les cellules positives (P2) et les cellules négatives (P3). La notion de cellule positive ou non est déterminé par l'expression de la protéine dans la cellule, donnée par la fluorescence constitutive mCherry.

L'intensité des fluorophores peut être visualisée grâce à un histogramme dont l'intensité est fonction du nombre relatif de cellule, pour les cellules positives ou non (Figure 24). Les valeurs médianes ou moyennes des intensités de fluorescence peuvent être extraites de ces données.

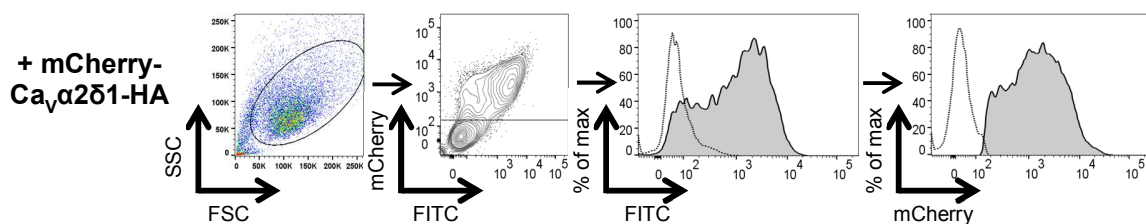


Figure 24: Représentation de la méthode d'analyse des données de cytométrie en flux. Adapté de Bourdin et al, 2016.

Ces données chiffrées d'intensité permettent de comparer les mutants à la condition WT du même jour et d'obtenir des moyennes ou des médianes par mutant (dût aux triplicats).



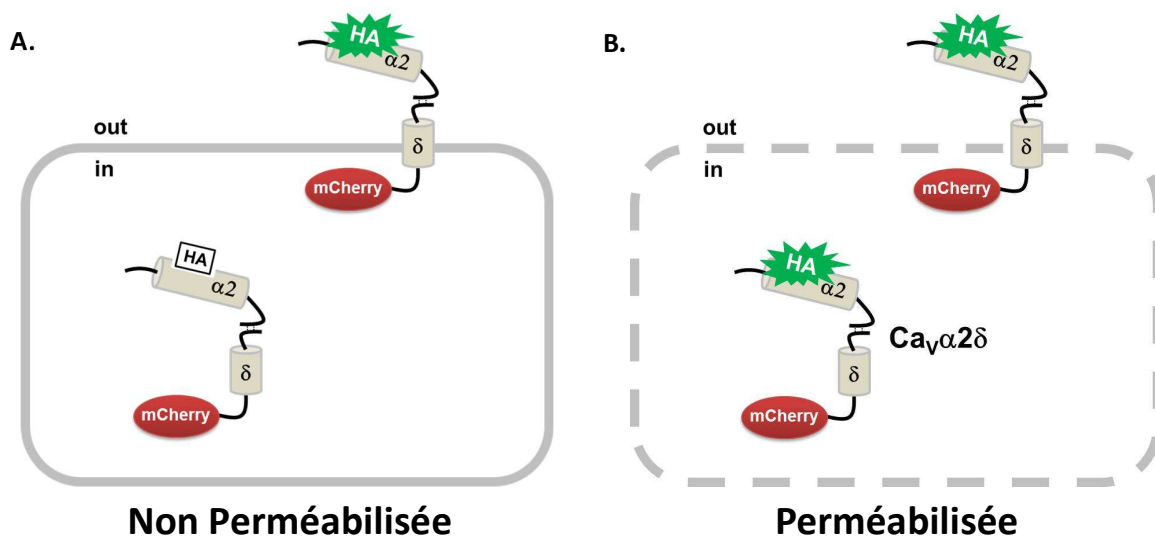


Figure 25: Représentation schématique de la détection des différentes fluorescences en cytométrie en flux selon la perméabilisation des cellules. A : cellules non perméabilisées. B : cellules perméabilisées.

La fluorescence FITC pour les cellules non perméabilisées correspond aux seules protéines présentes à la membrane donc est un indicatif de l'expression de Ca<sub>v</sub>α2δ1 à la surface de la cellule (Figure 25.A).

La condition perméabilisée pour FITC permet de confirmer l'accessibilité de l'épitope HA dans la cellule et permet donc de quantifier la quantité totale de protéine (Figure 25.B).

La densité membranaire relative est calculée comme l'intensité médiane de fluorescence en FITC ( $\Delta\text{MedFI}$ ) du mutant en condition non perméabilisée sur l'intensité médiane de fluorescence ( $\Delta\text{MedFI}$ ) en FITC du mutant en condition perméabilisée, rapportée ensuite à la valeur du WT la plus grande du même jour.

Les médianes sont utilisées en raison de la distribution non Gaussienne de certains mutants au niveau de leur distribution d'intensité de fluorescence. Cependant, il est important de noter que la valeur médiane est à chaque fois relativement proche de la valeur moyenne.

## 4) Électrophysiologie

### 4.A) Préparation des cellules

La construction peGFP (0.2 µg) est cotransfectée avec pCMV-β3, pCMV-Cav1.2 et pmCherry-Cavα2δ1-HA WT ou mutants (4-4-4 µg) comme contrôle de la transfection dans les cellules.

Exactement 36h après la transfection, les cellules sont divisées pour être isolées et permettre le patch-clamp en configuration cellule entière.

Pour les expériences, les cellules baignent dans une solution saline dérivée de la solution « Earle » extracellulaire (en mM) : 140 CsCl; 135 NaCl; 20 TEACl (Chlorure de tétra-éthyl ammonium); 2 CaCl<sub>2</sub>; 1 MgCl<sub>2</sub>; 10 HEPES (Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique), titrée au pH 7.3 avec du KOH. L'électrode présente dans la pipette de verre est remplie d'une solution intracellulaire (en mM) : 140 CsCl; 0.6 NaGTP; 3 MgATP; 10 EGTA (Ethylene glycol-tetraacetic acid); 10 HEPES; titrée au pH 7.3 avec du NaOH. Un pont d'agar relie l'électrode de référence au bain.

### 4.B) Enregistrement des courants

Les expériences d'électrophysiologie ont été effectuées à 20-22°C, avec 2 mM de Ca<sup>++</sup> grâce à un amplificateur Axopatch 200-B (*Molecular Devices*), le système d'acquisition Digidata 1440A (*Molecular Devices*) et le logiciel pClamp Clampex 10.5 (Bourdin et al., 2015).

La construction pmCherry-Cavα2δ1-HA WT a été montrée comme seule responsable de la modulation des courants Cav1.2 (Bourdin et al., 2015). Cette construction est enregistrée à chaque journée comme contrôle positif et un minimum de 8 cellules par condition et par jour est enregistré (un total de 109 WT est alors compilé).

Les cellules sont sélectionnées selon l'intensité de fluorescence GFP et la taille/forme de la cellule.

Un protocole est utilisé pour mesurer la capacitance de la cellule (résistance membranaire) : deux pulses de -10/+10 mV de 450 ms sont appliqués à partir de -90 mV. La taille des cellules

est comprise généralement entre 10 et 20 pF, ce qui correspond à la taille moyenne des cellules HEK isolées.

Un protocole de rampe permet de visualiser la présence de canaux ou non à la surface de la cellule susceptibles d'être sensible aux changements de potentiel (de -100 mV à 100 mV de façon progressive sur 2 s).

Le protocole d'activation des canaux  $Ca_v1.2$  permet d'obtenir des informations sur le courant maximal de la cellule, le potentiel de demi-activation et l'inactivation des canaux entre autres. La résistance en série (de la pipette en verre) est compensée à 85% après l'élimination de la résistance membranaire par l'amplificateur.

Une série de pulse est appliquée à la cellule à partir de -100 mV, depuis -60 mV jusqu'à +70 mV à 5 mV d'intervalle.

Les données de toutes les expériences de patch-clamp ont été faites dans les mêmes conditions sur une période de 8 mois pour être compilées.

#### 4.C) Analyse des données

Les courants enregistrés en configuration cellule entière ont été enregistrés à une fréquence de 5 Hz et filtrés à 1 Hz pour l'analyse. Le logiciel pClamp Clampfit 10.5 a été utilisé pour l'analyse des données.

La moyenne du potentiel de demi-activation est estimée à partir de la courbe IV des courants de chaque cellule d'une condition grâce au logiciel Origin 7.0 (*OriginLab Corporation*) (Bourdin et al., 2015; Yifrach and MacKinnon, 2002).

L'énergie libre d'activation est calculée en utilisant ce potentiel de demi-activation :

$\Delta G_{act} = z.F.E_{0.5,act}$ , où  $z$  est la charge de déplacement durant l'activation et  $F$ , la constante de Faraday (Richard et al., 2006; Yifrach and MacKinnon, 2002).

La cinétique d'inactivation des canaux est approchée par la valeur  $r_{100}$ , défini par le ratio du courant au pic et le courant résiduel après 100 ms ( $I_{100ms} / I_{Peak}$ ).

Les tests statistiques sur les différentes valeurs obtenues de l'analyse sont effectués en utilisant un test ANOVA à une voie avec un test Tukey en utilisant le logiciel Origin.  
Les données sont considérées comme statistiquement significatives dès  $p < 0.05$ .

## Résultats (par article)

La section des résultats est présentée dans le manuscrit intitulé «*Molecular determinants responsible for the proteolytic processing of the  $Ca_v\alpha2\delta1$  subunit: Identification of the Glycine residues essential for the function of the L-type  $Ca_v1.2$  channel* ». Ce dernier va être soumis dans la revue scientifique *American Physiological Journal* prochainement.

Emilie Segura et Benoîte Bourdin ont produits les mutations simples et doubles du site  $\omega$ , ont effectué et analysé les expériences de cytométrie en flux, et ont conduit l'immunobuvardage des fractions de membrane plasmique des cellules HEK293. Emilie Segura a effectué les essais de cycloheximide, les expériences de patch clamp et l'immunomarquage des cellules HEK293 pour la microscopie confocale sur des cellules vivantes. Gaétan Mayer a supervisé les expériences de phospholipase-C. Lucie Parent a élaboré et coordonné l'étude, interprété les données et écrit le manuscrit.

De plus, tous les auteurs ont participé aux révisions des résultats et approuvé la version finale du manuscrit. Lors de la première soumission officielle, l'article n'avait pas encore été soumis à aucun journal. À cette date, l'article a été soumis dans *American Journal of Physiology* et a été rejeté.

Molecular determinants responsible for the proteolytic processing of the Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 subunit:

Identification of the Glycine residues essential for the function of the L-type Cav1.2 channel\*

**Emilie Segura<sup>§&#</sup>, Benoîte Bourdin<sup>§&#</sup>, Gaétan Mayer<sup>%&</sup>, and Lucie Parent<sup>§&1</sup>**

§ Département de Physiologie Moléculaire et Intégrative, Faculté de Médecine, % Faculté de Pharmacie, & Centre de recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal, Université de Montréal, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada.

#These authors have contributed equally to the manuscript

\*Running head: *GPI-anchoring of the cardiac Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 subunit*

1. To whom correspondence should be addressed: Lucie Parent, Département de Physiologie Moléculaire et Intégrative, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Downtown Station, Montréal, QC, H3C 3J7, Canada; Tel: 514-343-6673; E-mail: [lucie.parent@umontreal.ca](mailto:lucie.parent@umontreal.ca)

#### **Footnotes**

2. The Abbreviations used are : SR : Sarcoplasmic reticulum;  $\Delta G_{act}$  : Free energy of activation; FITC : Fluorescein Isothiocyanate; HA : Hemagglutinin; HEKT : Human Embryonic Kidney 293 cells stably expressing an SV40 temperature-sensitive T antigen; HVA : High-Voltage Activated;  $\Delta MedFI$  : Relative Median Fluorescent Intensity; WT : Wild-Type.

**Keywords:** Calcium channels, cell surface density, gating, recombinant expression, Post-translational modification, electrophysiology, flow cytometry, confocal imaging, protein anchoring.

---

## ABSTRACT

Voltage-gated calcium channels  $Ca_v1.2$  play an essential role in the regulation of cardiac excitability. Functional channels are formed by the  $Ca_v\alpha1$  subunit and the auxiliary intracellular  $Ca_v\beta$  and the  $Ca_v\alpha2\delta1$  subunits.  $Ca_v\alpha2\delta1$  are type I transmembrane proteins that undergo a posttranslational modification that produces their association at the plasma membrane through a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor. The molecular determinants required for the proteolytic cleavage of the recombinant  $Ca_v\alpha2\delta1$  protein were studied using biochemical, immunocytochemical, fluorescence, and electrophysiological methods. Enzymatic treatment with a phospholipase C specific for the cleavage of phosphatidyl inositol lipids abolished the colocalisation of  $Ca_v\alpha2\delta1$  with a plasma membrane marker as shown using live-cell confocal imaging. Single point mutations G1060I or G1061I before the predicted transmembrane  $Ca_v\delta$  domain was shown to significantly reduce the cell surface fluorescence of  $Ca_v\alpha2\delta1$  as characterized by two-color flow cytometry assays and confocal imaging, and to prevent the  $Ca_v\alpha2\delta1$ -mediated increase in the peak current density and voltage-dependent gating of  $Ca_v1.2$  currents. The isoleucine mutations were also associated with a change in the migration pattern of the C-

terminal fragments suggesting that proteolytic processing was altered. Single glycine to alanine mutations preserved the protein properties but the double mutant G1060A/G1061A significantly impaired cell surface expression of  $Ca_v\alpha2\delta1$  and its functional regulation of  $Ca_v1.2$ . Altogether our data support a model where one Glycine residue at position 1060 or 1061 is required to produce the dominant proteolytic cleavage of  $Ca_v\alpha2\delta1$  and further suggest that the GPI-anchored form of  $Ca_v\alpha2\delta1$  is essential for channel function.

## INTRODUCTION

In cardiac cells,  $Ca^{2+}$  signals control the force necessary for the myocardium to meet the physiological needs of the body (1). During the diastole, the intracellular free ionized  $Ca^{2+}$  is maintained in the nanomolar range by the concerted action of mechanisms that prevent  $Ca^{2+}$  entry, promote its extrusion (mostly via the  $Na^+/Ca^{2+}$  exchanger), and ensure its storage in the sarcoplasmic reticulum (SR)<sup>2</sup> (2). Upon depolarization,  $Ca^{2+}$  enters the cell through the cardiac L-type  $Ca_v1.2$  channel and initiates the myocardium contraction via  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release from the SR. Regulation of the L-type  $Ca^{2+}$  current has profound physiological significance. Alterations in density or the activation/inactivation gating of L-type  $Ca_v1.2$  channels have been implicated in a variety of

cardiovascular diseases such as hypertension (3), atrial fibrillation (4-7), heart failure (8; 9), and congenital arrhythmias (10-12).

The L-type  $\text{Ca}_v1.2$  channel is a high-voltage activated (HVA) channel composed of the main pore-forming  $\text{Ca}_v\alpha1$  subunit non-covalently bound to the cytoplasmic  $\text{Ca}_v\beta$  auxiliary subunit, the EF-hand protein calmodulin (constitutively bound to the C-terminus of  $\text{Ca}_v\alpha1$ ), and the  $\text{Ca}_v\alpha2\delta$  subunit (13-18). The full complement of auxiliary subunits is required to produce HVA  $\text{Ca}_v1.2$  channels with the properties of the native channels. Hence changes in channel density at the plasma membrane could result from variations in the protein biogenesis, stability, post-translational modification, and/or trafficking in any of the regulatory subunits forming cardiac L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel complexes.  $\text{Ca}_v\beta$  promotes the cell surface density of  $\text{Ca}_v1.2$  channels through a high-affinity interaction (19) in part by preventing its degradation by the ubiquitin/proteasome system (20).

The  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  subunit, encoded by *CACNA2D1*, is expressed in skeletal (21-23) and in cardiac muscle (24) where it is the main isoform associated with  $\text{Ca}_v1.2$  (24; 25). Co-expression of  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  subunit with  $\text{Ca}_v\beta$ -bound  $\text{Ca}_v\alpha1$  increases peak current density and promotes  $\text{Ca}_v1.2$  channel activation at more negative voltages (26-31) with little changes in the cell surface expression of the pore-forming  $\text{Ca}_v\alpha1$

subunit (19; 20; 29). There is a positive correlation between the cell surface expression of  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  and the net  $\text{Ca}^{2+}$  influx through L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels (29; 31). This may be achieved by virtue of  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  stabilizing the channel voltage sensor. Arrhythmogenic genetic mutations within the coding sequence of  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  were shown to impair the  $\text{Ca}_v1.2$  channel function by decreasing the surface levels of  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  (29). The cell surface level of  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  thus indirectly controls the function of the cardiac  $\text{Ca}_v1.2$  channel.

The  $\text{Ca}_v\alpha2\delta$  proteins undergo complex co- and post-translational modifications.  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  is heavily glycosylated (15) with N-glycans found in 16 Asn sites accounting for up to 50 kDa in the apparent molecular weight (31; 32). Although all sites are required to account for the protein stability, the mutation of a single site at Asn663 (N663Q) completely prevented the detection of the protein at the cell surface by immunofluorescence and the modulation of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  currents, suggesting that N-glycans at this position play a critical role in the protein synthesis, stability, folding, and ultimately cell surface expression (31). Endogenous  $\text{Ca}_v\alpha2$  and  $\text{Ca}_v\delta$  are also referred to as being produced as a single protein that is proteolytically cleaved around A935 (exact residue numbering varies according to the animal species) (33) and then linked through strong disulfide bridges (33; 34). The formation of bridges between the cysteine



residues of the two subunits was investigated and the double mutation C404S/C1047S was shown to prevent modulation of  $Ca_v2.2$  currents (35). Although  $Ca_v\delta$  has been traditionally described as a classic type I transmembrane protein, it has been recently proposed that  $Ca_v\alpha2\delta$  proteins associate with the plasma membrane through a glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI) anchor attached to  $Ca_v\delta$  (36) although the functional relevance of this process has been debated (37).

GPI-anchoring is a post-translational modification that occurs in the luminal side of endoplasmic reticulum (ER) and permits a stable anchoring for type I membrane proteins (38-40). The anchor involves specific glycans and lipids: an ethanolamine phosphate (EtNP), three mannoses, one glucosamine and a lipid that will be the plasmic anchor (41). This lipid is usually diacyl phosphatidyl inositol (PI) but some of them are 1-alkyl-2-acyl-PI or inositol phosphoceramide (42). The transfer of the GPI anchor is possible thanks to the catalytic subunit of the GPI-transamidase, GPI-8 (43; 44). After recognition by the enzyme, the protein will be cleaved at the “ $\omega$ ” site, and then the transamidation of the EtNP-Man<sub>3</sub>GlcNAc-PI complex can occur. Three different residues in  $Ca_v\alpha2\delta1$  are considered for the cleavage site and addition of the GPI for the membrane anchoring, the glycine residues at positions 1060 and 1061 as well as the valine residue at position 1062 (36).

Over the years, we have devised a series of fluorescently-labeled proteins that provide strong metrics for protein expression that exquisitely complement the functional data obtained with electrophysiological recordings (19; 29; 31; 45). Herein, we aim to exploit these molecular devices to unravel the molecular determinants supporting the GPI-anchoring of  $Ca_v\alpha2\delta1$ . The mCherry- $Ca_v\alpha2\delta1$ -HA construct was labeled at the C-terminus with the mCherry protein allowing for the robust detection of the C-terminal fragments. An extracellular 9-residue hemagglutinin (HA) tag from the human influenza virus was inserted in the  $Ca_v\alpha2$  protein permitting the quantification of the protein at the cell surface under non-denaturing conditions (29; 31). Using this construct, we confirm the GPI-anchoring of recombinant  $Ca_v\alpha2\delta1$ . Incubation with PI-PLC, a phospholipase C specific for the cleavage of phosphatidyl inositol lipids (42; 46) abolished the colocalisation of  $Ca_v\alpha2\delta1$  with a plasma membrane marker. A mutational analysis was carried out with the residues potentially forming the “ $\omega$ ” cleavage site to investigate the role of steric hindrance in the formation of the anchor. The impact of these modifications on the surface expression has been assessed using confocal imaging, flow cytometry assays, and fractionation of total and plasma membranes by preparative ultra-centrifugation. Protein function was measured in patch-clamp

recordings of recombinant Cav1.2 proteins expressed in HEKT cells. Single point mutations of the putative  $\omega$  cleavage sites G1060 or G1061 to isoleucine (and to a smaller extent V1062I) was shown to significantly eliminate the steady-state cell surface fluorescence of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 as characterized by two-color flow cytometry assays and confocal imaging and prevent the Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-mediated increase in the peak current density and voltage-dependent gating of Cav1.2. In contrast, single point mutations of Gly1060 and G1061 to the smaller alanine residue preserved the protein cell surface expression and the modulation of Cav1.2 currents. Altogether our data support a model where the dominant proteolytic cleavage of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 occurs at the level of GPI-anchor and further suggest that the GPI-anchored form of the Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 protein is essential to upregulate Cav1.2 currents.

## MATERIAL AND METHODS

*Recombinant DNA techniques.* The rabbit Cav1.2 (GenBank X15539) and the rat Cav $\beta$ 3 (Genbank M88751) (47) were subcloned in commercial vectors under the control of the CMV promoter as described elsewhere (29; 45). The primary sequence (1091 residues) of the rat brain Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 clone (Genbank NM\_012919) (48) was subcloned in two vectors. Unless stated otherwise, the pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA construct was used

throughout. Briefly the hemagglutinin (HA) epitope (YPYDVPDYA) was inserted in the extracellular domain of Cav $\alpha$ 2 between D676 and R677 in the Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 clone, subcloned in the pmCherry-N1 vector (Cederlane, Burlington, ON, Canada) (Fig 1A) (29).

*Site-directed mutagenesis.* Single and double GPI mutants at position Gly1060, Gly1061, and Val1062 were produced with the Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs Inc., Whitby, Ontario, Canada) in the pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA construct according to the manufacturer's instructions as described elsewhere (29; 31). Constructs were verified by automated double stranded sequence analysis (Genomics Platform, IRIC, Université de Montréal, QC, Canada). Protein expression of these constructs was confirmed by western blotting in total cell lysates as described below (19; 29; 31).

*Cell culture and transfections.* HEK293T (HEKT, human embryonic kidney 293 cells stably expressing an SV40 temperature sensitive T antigen) and HEKT cells stably transfected with Cav $\beta$ 3 were grown in Dulbecco's high-glucose minimum essential medium (DMEM-HG) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum, 1% penicillin-streptomycin at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> atmosphere as described elsewhere (19; 29). Stable cells were transfected at 80-90% confluence (1 million cells per 35-mm culture

dish) with similar amounts of DNA (1:1 ratio or 4  $\mu\text{g}$  : 4  $\mu\text{g}$ ) for pCMV-Cav1.2 WT and pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA construct (either pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT or GPI mutants) in 10  $\mu\text{L}$  Lipofectamine 2000 (*Life Technologies, Burlington, ON, Canada*) using a DNA:lipid ratio of 1:2.5 (19; 29; 31). Mock transfection was achieved with the empty vector referred to as pmCherry-no insert. A total of 8  $\mu\text{g}$  of DNA was thus transfected per  $10^6$  HEKT stable Cav $\beta$ 3 cells in all experiments.

*Immunoblotting of total cell lysates from HEKT cells.* Twenty-four (24) hours after transfection, cells were washed twice with ice cold PBS (phosphate buffered saline) and lysed with a RIPA buffer (150 mM NaCl, 1% IGEPAL, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris, pH 8.0) containing a protease inhibitor including 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride, aprotinin, bestatin, E-64, leupeptin, and 1 mM EDTA (*Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON, Canada*) for 30 min at 4°C. The cell lysates were sonicated and centrifuged at 13,000 x rpm for 30 minutes at 4°C. Supernatant was collected and proteins were quantified with the Pierce BCA Protein Assay Kit (*Fisher Scientific Company, Ottawa, ON, Canada*). Immunoblotting was carried out with fresh lysates. Proteins were mixed with the Laemmli sample buffer in the presence of 0.4 mM 2-mercaptoethanol and electrophoresed on a 8% SDS-polyacrylamide

gel alongside the Precision Plus Protein™ Dual Color Standard (*Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada*). After electroblotting and blocking with 5% (w/v) skim milk for 30 min, the supported nitrocellulose membranes (*Bio-Rad*) were incubated with the anti-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 (1:1000, *Alomone, Jerusalem, Israel*) or the anti-mCherry (1:20000, *Biovision*). Membranes were stripped and incubated with an anti-GAPDH as a loading control (1:25000, *Sigma-Aldrich*) unless stated otherwise. Signal was detected with the Biorad ECL Chemiluminescent Substrate. Blots were visualized with the ChemiDoc Touch documentation system (*Bio-Rad*). Molecular weights were estimated using Image Lab™ 5.2 Software by linear regression of standard molecular weight markers. The molecular mass of the Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 protein in cardiomyocytes before N-glycosylation was calculated at 123 kDa. The calculated molecular mass of the mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA construct under the same conditions is 153 kDa. GAPDH migrated as a monomer close to 37 kDa in accordance with its calculated mass.

*Cycloheximide chase assays.* HEKT cells were transiently transfected simultaneously with pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA constructs (either WT or mutants). Cells were incubated with 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  cycloheximide (*Sigma-Aldrich*) to block *de novo* protein synthesis 24 h after transfection. At the indicated time points (0 h or no cycloheximide, 1 h, 2 h, 4 h, and 6 h),

cell lysates were fractionated on a 8% SDS-PAGE followed by immunoblotting to visualize Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 (*Alomone*, 1:1000), mCherry (Biovision, 1:20000) and GAPDH (*Sigma*, 1:25000) as explained in the paragraph above. Protein density Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 in total lysates was estimated with Image Lab™ 5.2 (*Biorad*) and expressed relative to GAPDH. It was then normalized to the relative protein density of the same protein at time  $t=0$ . The time course of degradation was measured in 3 experiments.

*Isolation of the plasma membrane fraction from recombinant HEKT cells.* Four different protein fractions (total cell lysates, cytosolic, total membrane, and plasma membrane fraction) were prepared as explained before (31; 49). Briefly, transfected HEKT cells cultured in 100 mm dishes were homogenized at 4°C in a Tris-based solution containing a mix of protease inhibitors (*Sigma-Aldrich*) and 1 mM EDTA at pH 7.4. The cell homogenate was aliquoted into three tubes. After a 2-h incubation period at 4°C with 1% (v/v) Triton X-100, the first tube was centrifuged at 10000g for 10 min to remove cell debris, nuclei, and mitochondria. The supernatant was kept as the total protein fraction (whole cell lysates). The second tube was centrifuged at 200000g and 4°C for 20 min. The supernatant is referred to as the cytosolic fraction. The pellet was resuspended in homogenizing buffer containing 1% (v/v) Triton X-100. After 30 min incubation on ice, a second centrifugation was

done at 200000g. The resulting supernatant is referred to as the total membrane protein fraction. The third tube was centrifuged at 10000g for 10 min. The supernatant obtained was centrifuged at 200000g and 4°C for 20 min. The pellet was resuspended in the homogenizing buffer containing 0.6M KCl. Subsequent centrifugations were performed at 200000g and 4°C for 20 min to wash out the KCl. The final pellet was resuspended in the homogenizing buffer and is considered to be enriched in plasma membrane proteins. Proteins were electrophoresed on a 8% SDS-polyacrylamide gel and blotted with the anti-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 (*Alomone*, 1:1000), anti-mCherry (Biovision, 1:20000), anti-GAPDH (*Sigma*, 1:25000), and anti-pan-cadherin (*Life Technologies*, 1:5000).

*Live-cell imaging of recombinant proteins with phospholipase C.* HEKT cells stably transfected with Cav $\beta$ 3 were transiently transfected with either 1) the negative pCMV-hLDLR-GFP construct; 2) the positive plasmid phCMV<sub>3</sub>-GFP-GPI; or 3) pCMV-Cav1.2 WT and pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT or mutants. In some cases, the phCMV<sub>3</sub>-GFP-GPI or pCMV-hLDLR-GFP plasmids were transfected with the pmCherry empty vector (DNA ratio 4  $\mu$ g : 0.2  $\mu$ g respectively) using a DNA:lipid ratio of 1:2.5. The LDLR-GFP is a fusion protein of the Low-Density Lipoprotein receptor (that does not form a GPI anchor but rather uses the full transmembrane domain) in tandem with a

Green Fluorescent Protein (GFP) tag in its C-terminus (50-53). The GFP-GPI construct was used as a positive control (54; 55). Cells were dissociated and seeded 6 hours after transfection in Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High Glucose + 1% Fetal bovine serum before adding the Phosphatidyl inositol specific-Phospholipase C enzyme (*Life Technologies*) at a concentration of 3 U/mL in the following solution 20 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, 0.01% sodium azide, 50% glycerol, pH 7.5 for overnight incubation (56). Half the cells were incubated overnight under control conditions with the vehicle solution. One day after transfection, cells were stained with the wheat germ agglutinin-647 (WGA-647) (1:200) (*Life Technologies*) in Phosphate-buffered saline (PBS) 1X for 20 min at room temperature to visualize cell membrane glycoproteins (29; 31). WGA is a carbohydrate-binding protein of approximately 36 kDa that selectively recognizes sialic acid and N-acetylglucosaminyl sugar residues. An anti-HA FITC (Fluorescein isothiocyanate)-conjugated antibody (1:100) (*Clone HA-7, Sigma*) was used to detect the HA-tagged Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 protein and the nuclei were stained with DAPI (1:1000) (*Life Technologies, Burlington, ON, Canada*) in PBS 1X for 45 min at 4°C. Confocal fluorescent images were captured between 1 and 3 h after staining with a Zeiss LSM 710 confocal microscope system with a

63x/1.4 oil objective. Experiments were conducted over an 8-month period. About 60 cells (LDLR-GFP + mCherry no insert or empty condition), 300 cells (GFP-GPI + mCherry empty) and 2500 cells (Cav $\alpha$ 1.2 + mCherry Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 HA condition) were analyzed for each experimental condition. The 488 nm laser was used to detect either FITC or GFP fluorescence whereas the mCherry fluorescence was measured at 594 nm. The fluorescence of the plasma membrane marker WGA-647 was measured at 633 nm. The images were analyzed using the FIJI software to delete background, subtract noise, and to produce colocalization pixel maps between the 488 nm and the 633 nm channels.

*Live-cell imaging of recombinant mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT and mutants in HEKT cells.* HEKT Cav $\beta$ 3 stable cells were transiently transfected with pCMV-Cav $\alpha$ 1.2 WT and pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT or mutants. One day after transfection, recombinant cells were stained with the wheat germ agglutinin-647 (WGA-647) (1:200) (*Life Technologies*) and the anti-HA FITC (Fluorescein isothiocyanate)-conjugated antibody (1:100) (*Clone HA-7, Sigma*). The nuclei were visualized with DAPI (1:1000) (*Life Technologies, Burlington, ON, Canada*). Confocal fluorescent images were captured between 1 and 3 h after staining with a Zeiss LSM 710 as explained above and analyzed using ImageJ.

*Flow cytometry assays.* Flow cytometry experiments were conducted as described elsewhere (29). In all related figures, stably Cav $\beta$ 3 cells were transiently transfected simultaneously with pCMV-Cav1.2 WT and pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT or mutants. In a few occasions, the HA-tagged version of the pCMV-Cav1.2 construct (29) was transfected with the non-HA tagged version of pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 to evaluate the impact of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 on the cell surface expression of the pore-forming subunit of Cav1.2 (data not shown). To determine cell surface expression level of the mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA proteins, cells were harvested 24 h after transfection, washed in a PBS 1X buffer and stained with the FITC-conjugated mouse monoclonal anti-HA epitope tag antibody at 5  $\mu$ g/mL (*Sigma-Aldrich*) at 4°C for 30 min. To determine the total quantity of both intracellular and extracellular expression of the tagged proteins, cells were fixed and permeabilized using BD Cytofix / Cytoperm™ Fixation / Permeabilization Solution Kit (*Becton Dickinson Biosciences, Mississauga, ON, Canada*) (29). Roughly 10,000 cells were counted using a FACSaria III® SORP (Special Order research Product) flow cytometer (*Becton Dickinson*) at the Flow cytometry facility hosted by the Department of Microbiologie, Infectiologie, Immunologie at the Université de Montréal. The level of fluorescence detected with the IgG1-FITC Isotype Control Murine (5  $\mu$ g/mL) or with the

anti-HA FITC conjugated antibody (5  $\mu$ g/mL) in HEKT untransfected cells was not significantly different than the fluorescence measured in the complete absence of fluorophore (29). Control conditions were carried out in triplicate with each series of experiments: a) untransfected Cav $\beta$ 3 cells without anti-HA FITC conjugated antibody; b) untransfected Cav $\beta$ 3 cells with the anti-HA FITC conjugated antibody to assess the level of background staining; c) Cav $\beta$ 3 cells transfected with pCMV-Cav1.2 and pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT. Expressing the mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT constructs in HEKT cells produced a significant 3-log increase in the FITC fluorescence (“x” axis) and mCherry fluorescence (“y” axis) on the two-dimensional plots (29).

*Quantification of steady-state cell surface expression by flow cytometry assays.* Flow cytometry data were analyzed using the FlowJo software, version 10 (*TreeStar, Ashland, OR 97520*) as described (29). Relative expression of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 was calculated based on  $\Delta$ Median Fluorescence Intensity ( $\Delta$ MedFI) for each fluorophore (mCherry or FITC) as explained elsewhere (29). Briefly, the positive cells gate (P2) and the negative cells gate (P3), were set manually. The fluorescence intensity within the region delineated by the P2 and P3 gates was displayed as cell count versus fluorescence intensity. The  $\Delta$ MedFI for FITC was calculated by subtracting the FITC fluorescence density

of the FITC negative cells (P3) from the fluorescence density of the FITC positive cells (P2). The same method was used to calculate the  $\Delta$ MedFI for mCherry. Under our experimental conditions, the fluorescence intensity follows a normal distribution hence the median was close to the mean value.  $\Delta$ MedFI for FITC measured in intact non-permeabilized cells was used as a relative index of the steady-state cell surface density of the HA-tagged Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. The  $\Delta$ MedFI values for FITC was measured in permeabilized cells to confirm the accessibility of the HA epitope. It is also a valid estimation of the total protein density since the relative  $\Delta$ MedFI values for FITC estimated in permeabilized cells are comparable to the relative  $\Delta$ MedFI values for mCherry measured under the same conditions.  $\Delta$ MedFI values were normalized to the maximum value measured the same day for mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT expressed under the same conditions to account for variations in the absolute fluorescence intensity of the anti-HA FITC conjugated antibody. The normalized  $\Delta$ MedFI values for mCherry measured for each mutant in intact and permeabilized cells were not significantly different from one another ( $p > 0.05$ ) suggesting that the cell permeabilization procedure did not distort significantly the relative fluorescence readout under most conditions.

*Patch-clamp experiments in HEKT cells.*  
Whole-cell patch-clamp experiments were

carried out on isolated cells after transfection in HEKT Cav $\beta$ 3 cells in the presence of the peGFP vector coding for the Green Fluorescence Protein (GFP) (0.2  $\mu$ g) as a control for transfection efficiency. Electrodes were filled with a solution containing (in mM): 140 CsCl; 0.6 NaGTP; 3 MgATP; 10 EGTA; 10 HEPES; titrated to pH 7.3 with NaOH with a resistance varying between 2.8 and 3.2 M $\Omega$  (megaOhms). Cells were bathed in a modified Earle's saline solution (in mM): 135 NaCl; 20 TEACl; 2 CaCl<sub>2</sub>; 1 MgCl<sub>2</sub>; 10 HEPES, titrated to pH 7.3 with KOH. GFP-positive cells were selected for patching. On-line data acquisition was achieved with the Axopatch 200-B amplifier (*Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA*) connected with the PClamp software Clampex 10.5 through the Digidata 1440A acquisition system (*Molecular Devices*) (29). A series of 450 ms-voltage pulses were applied from a holding potential of -100 mV at a frequency of 0.2 Hz, from -60 to +70 mV at 5 mV intervals. Series resistance was compensated to ~85% after online capacitive transient cancellation. Unless stated otherwise, whole-cell currents were sampled at 5 kHz and filtered at 1 kHz. PClamp software Clampfit10.5 was used for data analysis. Mid-potential of activation values ( $E_{0.5,act}$ ) were estimated from the peak I-V curves obtained for each channel composition and were reported as the mean of individual measurements  $\pm$  S.E.M (29; 57). The free

energy of activation was calculated using the mid-activation potential:

$$\Delta G_{act} = z \cdot F \cdot E_{0.5,act} \quad (1)$$

where  $z$  is the effective charge displacement during activation, and  $F$  is the Faraday constant (58). The  $r_{100}$  ratio is defined as the ratio of peak whole-cell currents remaining after a depolarizing pulse of 100 ms ( $I_{100ms} / I_{Peak}$ ) and was used as an indicator of the inactivation kinetics. The pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA construct was previously shown to carry the functional modulation of Cav1.2 currents (29). Each novel pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA mutant was tested alongside the control WT construct (*pCMV-Cav1.2 WT + pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT with Cav $\beta$ 3 cells*) to assess for internal consistency thus explaining the large sample size for the mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT construct. Experiments performed under the same conditions yielded peak current densities that could vary by as much as  $\pm 35\%$  between each series of experiments. This variation appeared to be essentially linked to minor changes in the cell density at the time of transfection. Data from all experiments performed under the same conditions over a period of 10 months were pooled and biophysical properties are reported in Table 2. Experiments were performed at room temperature (18-20°C).

*Statistics.* Results were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Tests of significance were carried out using the unpaired ANOVA with the Tukey

Test embedded in the Origin 7.0 analysis software (*OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA*). Data were considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

*Surface expression of recombinant Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 is sensitive to the action of phospholipase C.* The auxiliary Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 protein has been traditionally described as a classic type I transmembrane protein that undergoes a post-translational proteolytic cleavage at the level of the transmembrane Cav $\delta$  protein (around residue 940) (15). Nonetheless Cav $\alpha$ 2 $\delta$  proteins were also shown to associate with the plasma membrane through a glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) anchor attached to Cav $\delta$  (around residue 1060) (36). To examine whether recombinant Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 proteins might undergo this modification, we tested for the existence of a GPI anchor through its susceptibility to phosphatidylinositol specific-phospholipase C enzyme (PI-PLC cleavage) (59; 60). The surface expression of the pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA construct (Fig 1A) expressed in recombinant HEK293 cells was evaluated using live-cell confocal imaging (Fig 1B). The mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA construct expresses the mCherry protein at the intracellular C-terminus while the 9-residue hemagglutinin (HA) tag was inserted in the extracellular loop of the Cav $\alpha$ 2 protein (29; 31). The cell surface



expression of the HA-tagged construct is detected using a Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-HA. Under live-cell conditions, the cells are not fixated thus reducing protein internalization but also necessitating a very short delay between the cell staining step and the confocal image capture. For comparison we also examined the surface distribution of phCMV3-GFP-GPI, a well-defined GPI-anchored green fluorescent protein (54; 55) and the distribution of negative pCMV-hLDLR-GFP construct. The LDLR-GFP is a fusion protein of the Low-Density Lipoprotein receptor that does not form a GPI anchor in tandem with a Green Fluorescent Protein (GFP) tag (50-53). As shown in Fig. 1B, the hLDLR-GFP, GFP-GPI, and mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA proteins were all colocalized at the cell surface under control conditions as seen on the bright white images produced by merging the fluorescent markers for the protein and the cell surface using the colocalization pixel map feature. Overnight incubation with 3 U/mL Phosphatidylinositol specific Phospholipase C (PI-PLC) disrupted the surface localization of the GFP-anchored protein GFP-GPI but not the hLDLR-GFP. More quantitative comparisons were obtained by measuring the ratio of the fluorescence intensity for the extracellular FITC over the intensity of the intracellular mCherry, for more than 2000 cells captured during 6 separate experiments over an 8-month period. This

detailed analysis showed that PI-PLC caused a reduction in FITC surface labeling intensity to  $47 \pm 3 \%$  (n= 2475 cells without PI-PLC and n=2396 cells with PI-PLC). Altogether, these data show a significant decrease in the membrane localization of the pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA construct in the presence of PI-PLC indicating that the protein might be GPI-anchored.

The mechanisms by which transmembrane proteins are GPI-anchored are well known (43; 44; 59; 61; 62). GPI-8, a subunit of the GPI-transamidase, is essential for catalyzing the transfer of the GPI anchor to type I transmembrane proteins. Besides the transmembrane hydrophobic domain, the following regions are needed: a linker localized 11 residues before the cleavage site “ $\omega$ ” and a spacer region that includes 5 to 7 amino acids after the “ $\omega$ ” cleavage site (63). The “ $\omega$ ” cleavage site is usually formed by small amino acids such as Glycine, Alanine, Cysteine, Valine or Serine. Algorithm searches conducted with PredGPI (64) and Big-PI (65) suggest that Gly1060, Gly1061, or Val1062 could form the “ $\omega$ ” cleavage site which overlaps with the residues previously identified (36) (**Fig 1A**). Only Gly1060 is conserved throughout species and between isoforms Cav $\alpha$ 2 $\delta$ -1, -2, and -3. The posttranslational cleavage at the level of residues 1060-1062 in Cav $\alpha$ 2 $\delta$ -1 is expected to produce a N-terminal fragment with a calculated molecular weight of  $\approx 120$  kDa

while cotranslational N-glycosylation of the protein could decrease by up to 50 kDa the mobility of the N-fragment (31). In contrast, GPI-anchoring would produce a C-terminal fragment of  $\approx 3.7$  kDa significantly much smaller than the 20 kDa C-terminal fragment produced by the cleavage of the Cav $\delta$  protein at  $\approx$  residue 945 as previously demonstrated (33). Given that the posttranslational modification by the GPI-transamidase is postulated to require small amino acids, the residues between 1060-1062 were substituted either to the larger amino acid isoleucine ( $124\text{\AA}^3$ ) or to the alanine residue ( $67\text{\AA}^3$ ) as a negative control (66). Mutations were produced in the pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA construct that was previously shown to be expressed at the plasma membrane and upregulating recombinant Cav1.2 currents (29; 31). This doubly-tagged construct makes it possible to detect the C-terminal fragment of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 with mCherry while using either a commercially available Cav $\alpha$ 2 antibody or an anti-HA for the N-terminal fragment. Recombinant Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 proteins (WT and mutants) were expressed in HEK293T cells and whole-cell lysates were migrated on an 8% acrylamide gel. As seen on **Fig 2**, the N-terminal fragment of the pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT construct (lane 3) migrated as a doublet with a faint band at  $\approx 200$  kDa and a stronger band  $\approx 170$ -175 kDa the later corresponding to the calculated molecular weight of the pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-

HA with an additional  $\approx 50$  kDa N-glycans as previously reported (31). The four mutants G1060A, G1060I, G1061A, and G1061I also produced proteins that migrated with the expected molecular weight and a similar N-terminal profile as pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT with the only difference being the relative intensity of the two bands within the doublet. The anti-mCherry detected two bands in the C-terminal region for all proteins, a 29-kDa band and another one at  $\approx 45$  kDa. To note, the 29-kDa band was stronger than the 45-kDa band for the WT, G1060A, and G1061A constructs. In contrast, the 29-kDa band is nearly absent in the lanes for G1060I and G1061I while the intensity of the 45-kDa band significantly increased. The 29-kDa band is compatible with the production of a mCherry-transmembrane fragment (Cav $\alpha$ TM = 3.7 kDa + mCherry = 28.8 kDa). A similar sized-band is also present in HEK293T expressing the control mCherry plasmid (lane 1) but was absent from the nontransfected cells (lane 2), confirming that the mCherry protein is produced at the expected molecular weight. The 45-kDa band could be produced by a proteolytic cleavage closer to the N-terminal, in a position compatible with a cleavage at  $\approx$  position 945 (Cav $\delta$  = 18 kDa + mCherry = 28.8 kDa). This result suggests that the presence of an isoleucine residue at positions 1060 or 1061 could prevent the formation of a GPI-anchor while promoting the protein cleavage close to the reported site for Cav $\delta$  protein (33; 34)

These data also suggest that alanine substitutions did not completely prevent GPI-anchoring. Note that the dual proteolytic processing at the C-terminal is expected to alter the molecular weight of the N-terminal fragment but the difference of  $\approx 20$  kDa in the migration of the N-terminal fragment might be difficult to resolve under our experimental conditions given that N-glycans may add up to 50 kDa to the mature protein (31).

*Isoleucine mutations in the putative “ $\omega$ ” cleavage site prevent colocalization of  $Ca_v\alpha 2$  at the plasma membrane.* The role of proteolytic cleavage in the cell surface expression of  $Ca_v\alpha 2$  remains to be determined. Two sites proposed to carry the proteolytic cleavage of  $Ca_v\alpha 2\delta 1$ : one at the level of the GPI-anchor (36) and the other one at the level of the  $Ca_v\delta$  protein (33; 34). The localization of  $Ca_v\alpha 2$  at the plasma membrane was thus investigated by confocal imaging of live non fixated cells using the pmCherry- $Ca_v\alpha 2\delta 1$ -HA construct in its wild-type version as well as the G1060A, G1060I, G1061A, G1061I, V1062A, and V1062I expressed in HEKT cells (Panel A in Figs 3-5). The mCherry signal served as an index of protein expression, while the plasma membrane was visualized with a fluorescently-labeled wheat germ agglutinin antibody (WGA-647). The FITC-reactive cells identified the HA-tagged  $Ca_v\alpha 2\delta$  construct accessible at the plasma membrane of non permeabilized cells. Roughly 66% of the WGA-positive cells

were also positive for mCherry whereas the detection of the FITC-conjugated signal was detected in  $\approx 46\%$  of these cells transfected with mCherry- $Ca_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT (n =1272 cells). Each figure shows imaging data obtained the same day under the same experimental conditions. As seen, mCherry- $Ca_v\alpha 2\delta 1$ -HA G1060A (n = 215 cells), G1061A (n=445 cells), and V1062A (n=351 cells) were colocalized at the plasma membrane almost to the same extent as the mCherry- $Ca_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT protein. Altogether, 50% of the WGA-positive cells were also positive for mCherry whereas the detection of the FITC-conjugated signal was detected in only  $\approx 26\%$  of the cells transfected either with mCherry- $Ca_v\alpha 2\delta 1$ -HA G1060A, G1061A, or V1062A. In contrast, the fluorescent signal of the FITC-conjugated anti-HA was significantly weaker for the single isoleucine mutant V1062I and near-inexistent for G1060I and G1061I. In particular, 40% of the WGA-positive cells were also positive for mCherry in the plates transfected with mCherry- $Ca_v\alpha 2\delta 1$ -HA G1060I (n=360 cells), and G1061I (n=334 cells), whereas the detection of the FITC-conjugated signal dropped to less than  $\approx 15\%$ . These results were replicated by immunoblotting the C-terminal and the N-terminal fragments in plasma membrane and cytosolic fractions obtained by differential ultracentrifugation steps (31) (Panels B in **Figs 3-5**). The presence of N-Cadherin in the plasma membrane fraction and

the absence of GAPDH in the same fraction validated the fractionation protocol. N-terminal fragments were detected by the commercial anti-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 and C-terminal fragments were identified with the anti-mCherry. Although the cells were lysed under less stringent conditions, the migration pattern and the relative intensity of the N- and C-terminal bands for the mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT and Glycine mutants at positions 1060 and 1061 in total membranes (Lanes 3 in Fig 3B and 4B ) was similar to results shown in Fig 2. As seen, the WT construct is clearly detected by the anti-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 as a band of 175-180 kDa in the plasma membrane fraction (Lanes 4 in Figs 3B, 4B, and 5B). Note that the concentration of proteins extracted was lower using this technique (0.5 ug/uL as compared with 10 ug/uL using RIPA lysats). Single substitutions of Gly1060, Gly1061, and V1062 by alanine produced migration pattern similar to the one measured for the WT construct with a strong band detected in the 170-180 kDa range in the plasma membrane fraction (Lanes 4 in Figs 3B, 4B, and 5B). In contrast, the isoleucine mutants G1060I and G1061I were not found in the plasma membrane fractions although they produced  $\approx$ 180-kDa proteins that were detected in total lysates and total membranes (Lanes 1 and 3 in Fig 3B and 4B). This behavior was limited to the Glycine residues as substitutions with an isoleucine at position Val1062 produced proteins that were detected by the

anti-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 in the plasma membrane fraction (Lane 4 in Fig 5B).

The membrane localization of the C-terminal fragments was achieved through immunoblotting the proteins with the mCherry antibody. In contrast to the N-terminal fragments, both the short and the long C-terminal fragments were mostly found in fractions corresponding to total lysates and total membranes (Lanes 1-3 in Figs 3B, 4B, and 5B). In particular, the intensity of the 29-kDa C-terminal fragment was often correlated with the presence of a strong band N-terminal 170-180 kDa fragment in the plasma membrane fractions. In contrast, when total cell lysates included mostly 45-kDa C-terminal fragments as in the case of G1060I and G1061I, there was little or no N-terminal fragment detected at 170-180 kDa in the plasma membrane fractions. These results suggest altogether that the surface expression of Cav $\alpha$ 2 occurs simultaneously with the production of a proteolytical fragment that would be cleaved close to the beginning of the hydrophobic segment of Cav $\delta$  protein.

*Isoleucine mutation at position Valine 1062 does not prevent colocalization of Cav $\alpha$ 2 at the plasma membrane.* The surface expression of the mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA isoleucine mutants was further supported by two-color flow cytometry assays (29; 31). Briefly, the fluorescence of the FITC-conjugated HA

antibody reflect the fraction of proteins present at the cell surface since the HA epitope is located in the extracellular portion of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. In particular, the fluorescence intensity  $\Delta$ MedFI for FITC measured in intact cells provides a reliable index of the steady-state cell surface density of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 and is observed as a rightward shift in the fluorescence intensity on the “x” axis of the two-dimensional plots. The mCherry epitope expressed at the C-terminal of the construct, served as a marker for total protein expression (observed as a shift in the fluorescence intensity seen on the “y” axis of the two-dimensional plots). The two-color assay thus provides a quantitative readout of protein expression in 10,000 cells. Figure 6A shows the fluorescence profile for the gated cells under intact non permeabilized cells and selected for further analysis (far left panel). The fluorescence histograms for the corresponding experiment were reported to the right of the contour plots for FITC fluorescence. The averaged median fluorescence intensity values ( $\Delta$ MedFI) are provided in Table 1. Fluorescence intensities obtained under permeabilized cells confirmed that the HA epitope is present and accessible for all mutants. The isoleucine G1060I and G1061I mutants were slightly different in this regard. The two-color flow cytometry assays show a significant gap between the relative intensity of FITC measured in permeabilized cells and the relative intensity for mCherry

measured in intact and permeabilized cells in agreement with the results from the protein expression in the western blots of Figs 2-4.

*Quantification of cell surface expression by flow cytometry assays.* Results from imaging and western blot assays were confirmed using flow cytometry assays (29; 31). The fluorescence intensity  $\Delta$ MedFI for FITC in intact nonpermeabilized cells was strong for the WT but sharply decreased with G1060I and G1061I. These constructs produced proteins that were almost absent from the cell surface. The relative cell surface expression, obtained from the ratio of the normalized cell surface over total expression shows that isoleucine mutations at positions 1060 and 1061 nearly abolished cell surface expression whereas V1062I decreased cell surface expression anywhere between 38 to 23% with a median = 30% (**Fig 6C**). By comparison, the impact of the alanine mutations at these sites was respectively milder (Table 1). In fact, the cell surface expression of V1062A was not significantly different than the one measured for the wild-type construct. Altogether, these results show that: 1) Cell surface expression of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 is preserved in the presence of small hydrophobic alanine residues at positions 1060, 1061, and 1062 thus small residues at positions 1060-1062 are compatible with cell surface expression of Cav $\alpha$ 2; 2) Bulky hydrophobic isoleucine residues impair cell surface expression of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 more significantly at

positions 1060 and 1061 than at position 1062. Hence small residues at positions 1060 and 1061 are required to stabilize the  $\text{Ca}_v\alpha 2$  protein at the plasma membrane.

*Isoleucine mutations of glycine residues in the putative “ $\omega$ ” cleavage site prevent the  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$ -mediated modulation of  $\text{Ca}_v 1.2$  currents.* The impact of introducing isoleucine mutants at positions 1060 and 1061 on the L-type  $\text{Ca}_v 1.2$  channel function was explored after recombinant expression of  $\text{Ca}_v 1.2$  with mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA mutants in stable  $\text{Ca}_v\beta 3$  cells. As reported before (29; 31), co-expression of pmCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT with  $\text{Ca}_v 1.2$  WT in stable  $\text{Ca}_v\beta 3$  cells stimulated whole-cell peak current densities from  $-2 \pm 1$  pA/pF ( $n = 6$ ) (no insert in the pmCherry vector) to  $-15 \pm 1$  pA/pF ( $n = 109$ ) in the presence of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  WT (**Table 2**). The increase in peak current densities was associated with a  $\approx -20$  mV leftward shift in the activation potential of  $\text{Ca}_v 1.2$  from  $E_{0.5,\text{act}} = +11 \pm 6$  mV ( $n = 6$ ) (no  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ ) to  $E_{0.5,\text{act}} = -8.6 \pm 0.3$  mV ( $n = 109$ ) (with mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA). Coexpression with mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA G1060A or G1061A yielded voltage-activated inward  $\text{Ca}^{2+}$  currents with activation properties similar to those obtained with the wild-type mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA construct in all cells that were tested (Table 2). In contrast, only a small proportion of the cells expressing mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA G1060I or G1061I displayed voltage-activated inward

currents and whole-cell currents from these cells were similar to currents obtained with the mock vector (**Fig 6 B**). These observations confirm the strong correlation between the activity of the L-type  $\text{Ca}_v 1.2$  channel and the steady-state cell surface expression of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  (29). The electrophysiological experiments further show that a single alanine substitution either at position 1060 or 1061 in  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ , is compatible with channel function. The change in channel function was not apparently mediated by a change in the cell surface expression of  $\text{Ca}_v 1.2$ . Flow cytometry assays were performed with  $\text{Ca}_v 1.2$ -HA/ $\text{Ca}_v\beta 3$ / $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  WT proteins (29) and  $\text{Ca}_v 1.2$ -HA/ $\text{Ca}_v\beta 3$   $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  G1060I and G1061I (*N.B.*  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  was not HA-tagged in this subset of experiments). There was no difference in the cell surface fluorescence of the HA-tagged version of  $\text{Ca}_v 1.2$  when co-expressed with the  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  mutants under our experimental conditions (*results not shown*).

*The 45-kDa C-terminal fragment is stable.* Mutating the glycine residues at positions 1060 and 1061 produced robust 45-kDa C-terminal fragments and much fainter N- and C-terminal bands (Figs 2-4) suggesting that this fragment is significantly more stable than the exceed relatively stable. We tested the relative stability of the different fragments by carrying cycloheximide-chase assays with mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT and mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA G1061A (Fig 7). As seen, the N-terminal

fragment of the wild-type and the G1061A constructs probed with the antibody raised against Cav $\alpha$ 2 were relatively short-lived with half-times  $\tau \approx 1.7 \pm 0.3$  h (n = 6) and  $\tau \approx 1.5 \pm 0.4$  h (n = 3), respectively, close to values previously reported (31). The time constants of decay for the 29 kDa-band were very similar with respectively  $\tau \approx 1.8 \pm 0.5$  h (n=6) for the WT construct and  $\tau \approx 0.9 \pm 0.2$  h (n=3) for G1061A. In contrast, the 45-kDa C-terminal fragment appeared to remain relatively stable over the course of the 6-h experiment for the wild-type and the G1061A constructs. The relative stability of the 45-kDa fragment could explain why this is the fragment mostly observed with the isoleucine mutants G1060I and G1061I.

*Glycine residues are essential at either 1060 or 1061 in the putative “ $\omega$ ” cleavage site for channel function.* Single alanine substitutions at positions 1060 or 1061 in Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 are compatible with channel function but whether Alanine residues present in the cleavage site are functionally equivalent to the Glycine residues was investigated with the double mutant G1060A/G1061A (**Fig 8**). Typical confocal imaging snapshots of live non fixated cells are shown in **Fig 8A**. In the cells captured for imaging, the transfection rate was typically around 60% (58% of the WGA-positive cells were also positive for mCherry) whereas the FITC-conjugated signal was only detected in  $\approx 25$  % of cells positive for mCherry (n = 306

cells). Surface expression was thus lower than for the mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT construct ( $\approx 45$ % of the cells were FITC and mCherry positive) but comparable to the cell surface FITC signal reported for mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA G1060A, G1061A, and V1062A. These results were corroborated in the cell surface immunoblots shown in **Fig 8B**. The N-terminal fragment appears as a doublet at 170-180 kDa in the plasma membrane fraction and the C-terminal fragments was mostly found in total membranes. The double mutant produced short 29 kDa C-terminal fragments in a pattern reminiscent of mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT. Nonetheless, flow cytometry assays estimated that the relative fluorescence intensity  $\Delta$ MedFI for FITC of the double G1060A/G1061A mutant in intact nonpermeabilized cells was only  $34 \pm 7$  % (6 x 10,000 cells) of the cell surface fluorescence signal measured for mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT (**Fig 8C**). Furthermore, co-expression of mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA G1060A/G1061A with Cav $\beta$ 1.2 in stable Cav $\beta$ 3 cells failed to significantly upregulate whole-cell peak current densities (**Fig 8D** and **Table 2**). In fact, only 6 out of the 15 cells that were patched following transfection in three different dishes yielded voltage-activated Ca $^{2+}$  inward currents. These observations suggest that the presence of one glycine residue at either 1060 or 1061 is essential to promote the function of channel such that removing both at once eliminates

regulation.

## DISCUSSION

The auxiliary  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  protein has been traditionally described as a classic type I transmembrane protein that undergoes a post-translational proteolytic cleavage at the level of the transmembrane  $\text{Ca}_v\delta$  protein (around residue 940) (15). The model of a single-proteolytical cleavage is supported by a wealth of experimental observations (33; 34; 34; 35). More recently, it has been proposed that  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$  (isoforms 1, 2, and 3) proteins associate with the plasma membrane through a glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI) anchor attached to  $\text{Ca}_v\delta$  (around residue 1060) (36). The GPI-anchoring of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  at the N-terminal of the transmembrane domain of  $\text{Ca}_v\delta$  is also compatible with the published 3-D structure of the skeletal muscle  $\text{Ca}_v 1.1$  for which there was no significant electronic density associated with the transmembrane  $\text{Ca}_v\delta$  domain (between rabbit 1065-1106 equivalent to residues 1049-1090 in the rat) (32). Whether these two proteolytical processes occur concurrently on the same protein, on different populations of proteins depending upon their cellular distribution in lipid rafts (67), and vary according to the expression system remains to be elucidated. In addition, questions were raised about the physiological relevance of this process for the function of the

calcium channel complex (67).

Herein we provide experimental observations in support of a model whereby the proteolytic cleavage of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  at the level of the putative GPI-anchor is essential to upregulate the L-type  $\text{Ca}_v 1.2$  channel function. Live-cell confocal imaging shows that enzymatic treatment with a phospholipase C specific for the cleavage of phosphatidyl inositol lipids abolished the colocalisation of recombinant  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  proteins with a plasma membrane marker in HEKT cells. The primary sequence of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  protein contains the required elements to carry the GPI-anchoring and in particular the contiguous Glycine and Valine residues that could form a typical “ $\omega$ ” cleavage site as shown before (36).

The function and the cell surface expression of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  after mutating individually or in pairs the three residues forming the putative  $\omega$  cleavage site (Gly1060, Gly1061, and Val1062). Recombinant expression of G1060I or G1061I in HEKT cells (mutating the small glycine residue to the large hydrophobic isoleucine) was shown to significantly 1) eliminate the steady-state cell surface fluorescence of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  as characterized by confocal imaging, western blotting of surface membrane fractions, and two-color flow cytometry assays; as well as 2) prevent the  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -mediated increase in the peak current density and voltage-dependent gating of



Cav1.2. The impact of the both mutations was very similar with the G1060I mutation causing slightly more disruption than G1061I whereas the mutation to the isoleucine residue at position 1062 (V1062I) caused a minor decrease in the cell surface expression of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 and was shown to mediate near-typical regulation of Cav1.2 currents. Single-point mutations to the smaller alanine residue had minimal impact on cell surface expression. In particular, G1060A, G1061A, V1062A preserved the protein cell surface expression and the typical modulation of Cav1.2 currents. In contrast, the double mutant G1060A/G1061A disrupted the cell surface expression of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 and failed to promote Cav1.2 currents indicating that a glycine residue at either position 1060 or position 1061 carries an essential role in Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. It is tempting to speculate that the Glycine residue at position 1060 is an universal requirement that is responsible for anchoring most Cav $\alpha$ 2 $\delta$  proteins given that it is conserved throughout most species and isoforms (36).

*Post-translational proteolytic cleavage of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ .* Post-translational proteolytic cleavage of Cav $\alpha$ 2 $\delta$  was first demonstrated in the late 1980's when low-molecular weight bands (17-20 kDa) were revealed after a two-step electrophoresis SDS-PAGE gel of the Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 protein purified from rabbit skeletal muscle

upon strong reducing conditions (100 mM DTT) (33; 68). Peptide sequencing of the smaller C-terminal fragment showed the presence of residues overlapping with the primary sequence of Cav $\alpha$ 2 at around 935 (*the precise residue numbering varies according to the animal species*) leading to the proposition that the Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 protein was cleaved into Cav $\alpha$ 2 and Cav $\delta$  fragments (68). Close examination of the original gels and immunoblots (68) further indicates that the reduction of the disulfide bonds in the native protein did not significantly alter the mobility of the upper Cav $\alpha$ 2 fragment whereas incubation with 100 mM dithiothreitol (DTT) caused a 20 kDa-decrease in the mobility of the upper Cav $\alpha$ 2 band for various Cav $\alpha$ 2 $\delta$  isoforms expressed in COS-7 (25) and in HEK cells (34). Mutations of numerous residues around the cleavage region at position  $\approx$  945 (33) successfully prevented the DTT-induced shift in the mobility of the Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 protein (34). Furthermore, the Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 double mutant C404S/C1047S prevented functional modulation of recombinant Cav2.2 currents (35) suggesting that this bridge, identified in the cryo-electromicroscopy structure of the purified skeletal Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 (32), is essential for function. Nonetheless, it remains to be seen whether the disulfide bridge formed between C404 and C1047 links the Cav $\alpha$ 2 and the Cav $\alpha$  subunits or is an essential intramolecular bridge for the folding of Cav $\alpha$ 2. This question

is further complicated by the suggestion that the proteolytical cleavage could be limited to the native Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 protein. In this regard, it was shown, using two sets of antibodies specifically directed against the N-terminal and the C-terminal of the protein, that the vast majority of heterologously expressed Cav $\alpha$ 2 $\delta$ -2 was not cleaved into Cav $\alpha$ 2-2 and Cav $\delta$ -2 while showing full functionality and being expressed at the plasma membrane of HEKT, Cos-7, and NG108-15 cells (69).

The observation that the Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 and Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 2 proteins are GPI-anchored (70) suggests that Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 could be post-translationally cleaved at the level of the Cav $\alpha$  subunit and at the level of the GPI-anchor. The GPI-anchoring post-translational modification anchors the protein to hydrophobic phosphatidyl-inositol groups within the cell membrane (36) thus producing a C-terminal fragment with a molecular weight of 3.7 kDa. This process is also expected to produce a N-terminal fragment (Cav $\alpha$ 2) with a calculated molecular weight of 120.4 kDa. As it has been noted elsewhere, the mobility of the N-terminal fragment (Cav $\alpha$ 2) in SDS-PAGE gels will be influenced by the presence of N-glycans and the numerous intramolecular disulfide bonds. We have recently shown that the enzymatic removal of N-glycans from native or recombinant Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 proteins under reducing conditions yielded a sharp band at  $\approx$  123 kDa (31) close to the calculated molecular weight of the GPI-anchored Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 protein.

It remains to be seen whether these two proteolytic cleavage processes at  $\approx$  940 and/or  $\approx$  1060 residues after the N-terminus occur concurrently or are mutually exclusive. In the former case, one would be expected to observe two mCherry-labeled C-terminal fragments while in the latter case, there would be a single C-terminal fragment per construction. The shorter C-terminal fragment cleaved at  $\approx$ 1060 would reflect a mCherry fusion protein in tandem with the hydrophobic domain of the Cav $\delta$  protein thus producing a band at 28.8 kDa + 3.7 kDa = 32.3 kDa. The longer C-terminal fragment would be roughly 120 residue longer for a predicted molecular mass of 28.8 kDa + 15.5 kDa = 44.3 kDa.

The mobility-shift assays performed in these studies with mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT showed indeed that two C-terminal fragments were resolved by the intracellular mCherry antibody thus supporting an active role for two parallel proteolytical cleavage processes in the GPI-anchored Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 protein. However there was significant difference in the relative intensity of the two fragments, the short 29-kDa fragment being more intense than the long 45-kDa band. The same pattern was observed for the alanine-substituted residues at positions 1060, 1061, and 1062 and the V1062I mutant that all support the cell surface expression of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. The long 45-kDa fragment was however the dominant C-terminal fragment detected for the isoleucine-substituted G1060I

and G1061I mutants. Cycloheximide chase assays suggest the long 45-kDa fragment is the long-lived fragment thus accounting for its preponderance under these experimental conditions.

Altogether, our dataset support a model where there are two main proteolytic cleavage sites coexist within  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  under physiological conditions. Preventing cleavage at the GPI-anchoring site by substituting Glycine with Isoleucine residues appears to tilt the balance toward the production of a larger C-terminal fragment that is compatible with the protein being cleaved at the level corresponding to the N-terminal of the  $\text{Ca}_v\delta$  protein. This appears to disrupt the cell surface expression of  $\text{Ca}_v\alpha 2$  and consequently to impair the upregulation of the cardiac  $\text{Ca}_v 1.2$  channel by  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ .

*Physio- and patho- logical implications of the post-translational proteolytic cleavage of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ .*  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  appears to be cleaved at two major sites under our experimental conditions, namely at the N-terminal of the  $\text{Ca}_v\delta$  protein and then closer to its single transmembrane domain.  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  is in fact a potential *bona fide* target for a flurry of proteases. More than 250 putative cleavage sites for 11 different proteases were identified

in its primary sequence using the web served called Prosper (71). Although some of the proteases are expressed in non-muscle tissues, it is interesting to note that the  $\text{Ca}^{2+}$ -activated protease calpain is predicted to cleave the rat  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  protein at position 923 and/or 924, the proposed cleavage site for the production of  $\text{Ca}_v\alpha$  (35). Calpains are ubiquitous non-lysosomal  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent cysteine proteases present in myocardial cytosol and mitochondria (72). The increasing  $\text{Ca}^{2+}$ -content and  $\text{Ca}^{2+}$ -overload in myocardial cytosol and mitochondria during ischemia and reperfusion are associated with the activation of calpains which in turn injure the contractile apparatus and impair the energy production by cleaving structural and functional proteins of myocytes and mitochondria (72-74). Calpain I and calpain II have been reported to accelerate the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent run-down of whole-cell  $\text{Ca}^{2+}$  currents examined in guinea pig ventricular myocytes whereas calpastatin retarded it (75). In this context the proteolytic cleavage by calpain could reduce  $\text{Ca}^{2+}$  influx by virtue of neutralizing the function of  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ . It also suggests that proteolytic degradation of nascent  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  proteins under pathological conditions may reduce its cell surface expression and consequently operates as a negative feedback loop under conditions where myocytes experience a  $\text{Ca}^{2+}$  overload (76).

### **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Serge Sénéchal, Armelle Le Campion, and Dr. Jacques Thibodeau for sharing their expertise and granting us access to their flow cytometry and cell sorting platform; Ms Marie-Philippe Tétreault for help with the flow-cytometry experiments; Mr. Louis Villeneuve for invaluable assistance in confocal microscopy; and Dr. Rémy Sauvé for critical reading of the manuscript.

### **GRANTS**

This work was completed with the operating grant 130256 from the Canadian Institutes of Health Research and the grant number G-15-0009329 from the Canadian Heart and Stroke Foundation to L.P.

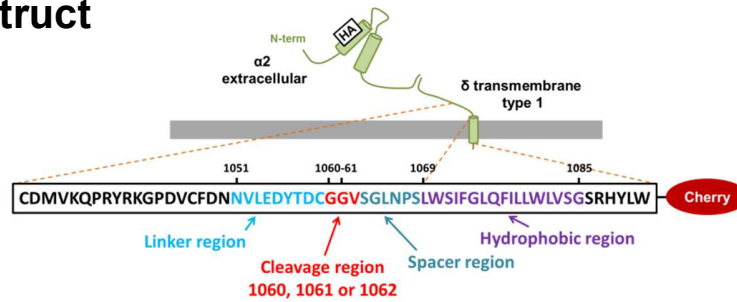
### **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare that they do not have any conflict of interest with the contents of this manuscript.

### **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

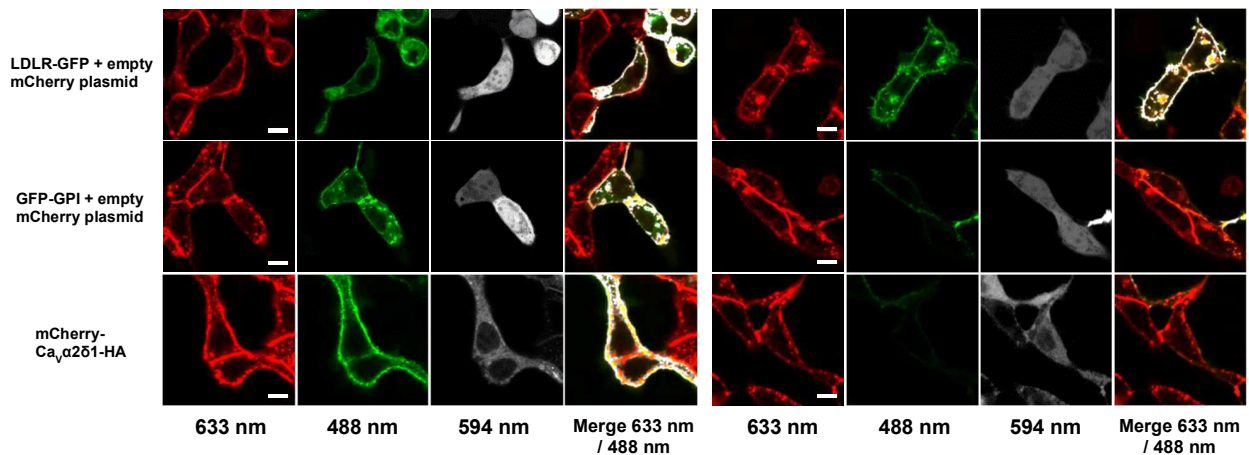
ES and BB produced the single and multiple mutants, performed and analyzed the flow-cytometry experiments, and carried out the immunoblotting of the cell fractions from recombinant HEKT. ES carried out the cycloheximide chase assays, conducted patch-clamp experiments, and performed the stained of HEKT cells for live-cell imaging. GM supervised the phospholipase-C experiments. LP designed and coordinated the study, interpreted the data, and wrote the manuscript. All authors reviewed the results and approved the final version of this manuscript.

## A. Construct



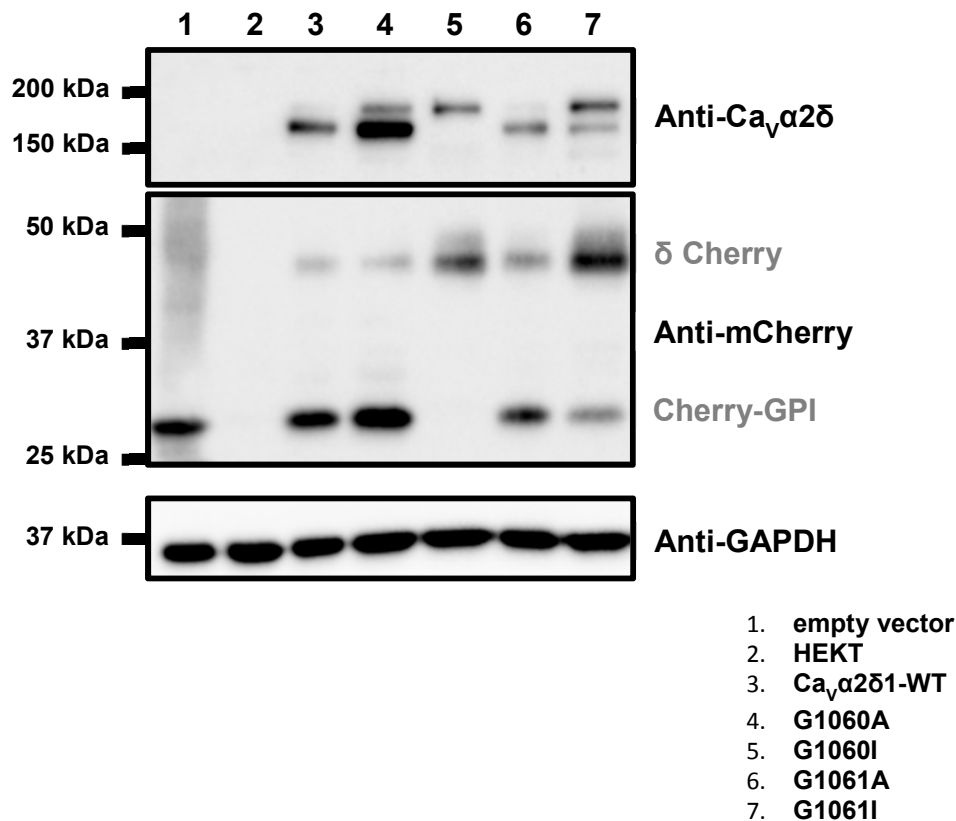
## B. Vehicle

## C. PI-PLC



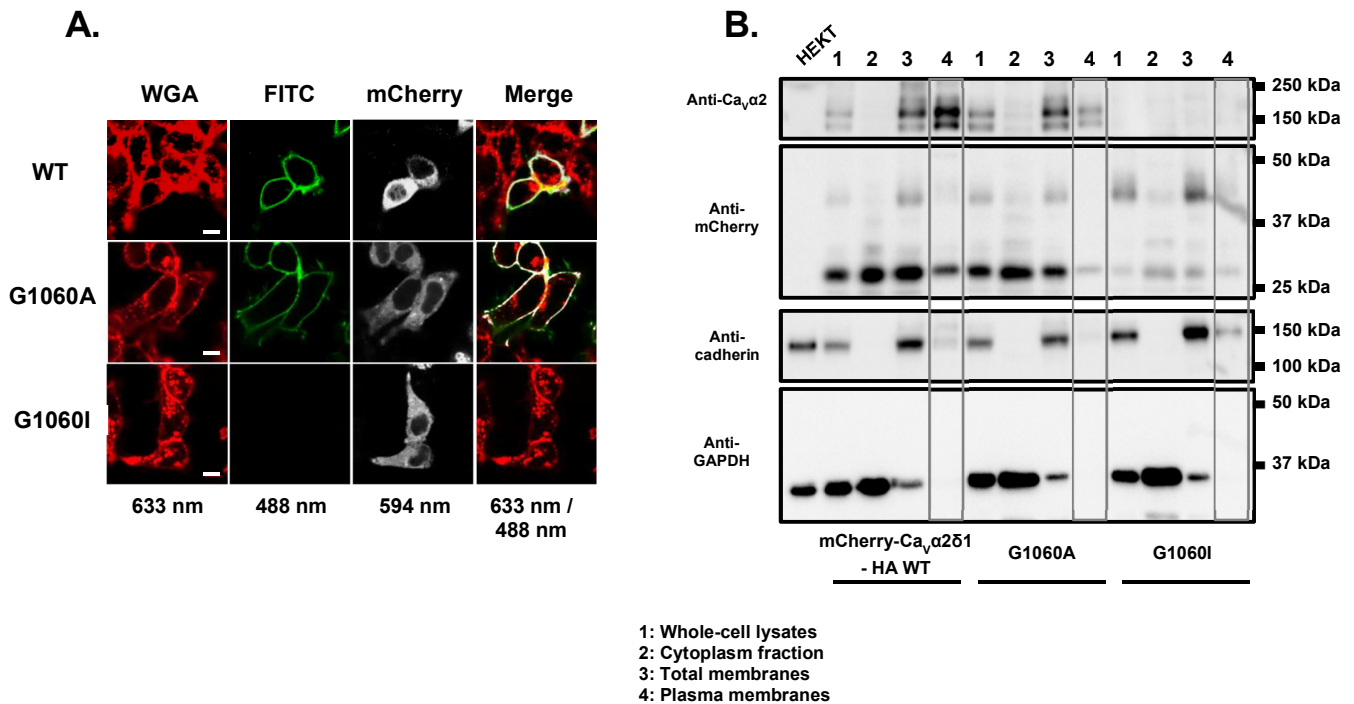
**FIGURE 1: A. Schematic representation of mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA construct.** Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 was subcloned in the pmCherry-N1 vector to express the fusion protein to the N-terminus of mCherry. The hemagglutinin (HA) epitope (YPYDVPDYA) was inserted in the extracellular domain of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 between D676 and R677. Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 was doubly tagged to express an extracellular non-fluorescent epitope HA that can be detected by an anti-HA FITC-conjugated antibody and a constitutive fluorescent intracellular mCherry fluorochrome for flow cytometry assays. The primary sequence of the transmembrane  $\delta$  protein (Genbank NM\_012919) is shown to the right with a color code identifying the putative regions required for recognition by the glycosyl-phosphatidylinositol transamidase to carry the posttranslational modification. **B. and C. Phospholipase-C mediated cleavage of recombinant Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 WT expressed in HEK293.** Confocal images of live cells transiently transfected with LDLR-GFP + mCherry empty (**top panels**); phCMV3GFP-GPI + pmCherry empty vector (**middle panels**) or pCMV-Cav1.2 + pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA (**bottom panels**) in stable Cav $\beta$ 3 cells. The mCherry vector was co-expressed to monitor cell transfection. **B.** Cells were incubated overnight with the vehicle (20 mM Tris HCl buffer, see details in Materials and Methods). **C.** Cells were incubated overnight with Phosphatidylinositol specific Phospholipase C (PI-PLC) at 3 U/mL.

One day after transfection cells were stained with wheat germ agglutinin (WGA) 647 (1:200) and FITC-labeled anti-HA epitope tag antibodies (10 µg/mL). Colocalization pixel maps of the expressed proteins and the surface marker WGA are shown in white and were produced by merging the fluorescent signals measured at 633 nm (WGA) and 488 nm (GFP and FITC) using the co-localization finder plugin from Image J. The GFP-GPI transfection was used as a positive control for PI-PLC efficiency and the strong mCherry fluorescence confirms the adequate expression of recombinant pmCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA proteins. Scale bar corresponds to 10 µm.



**FIGURE 2:** HEKT cells transiently transfected with either pmCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT, G1060A, G1060I, G1061A, or G1061I were lysed with a RIPA buffer (See Material and Methods for details). Proteins were fractionated on a SDS-PAGE (8%). Western blot analysis was carried out with the Cavα2 antibody (1:1000 Alomone) (upper panel) and mCherry antibody (1:25000 Biovision) (middle panel) as the primary antibodies. The housekeeping protein Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was probed as an index of protein loading (GAPDH antibody 1:10000 Sigma) (lower panel).

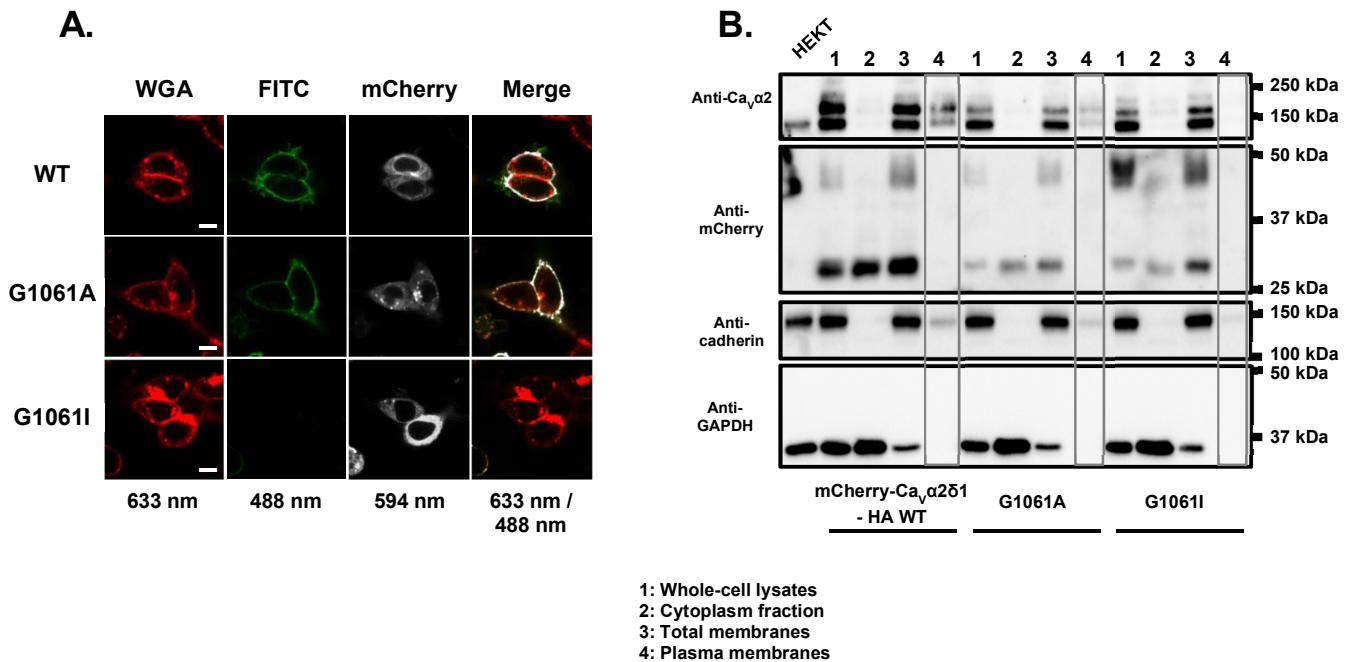
Each lane was loaded with 30 µg of proteins. Lane 1: pmCherry empty vector (expressing the mCherry protein alone); Lane 2: non-transfected HEKT cells; Lane 3: mCherry Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT; Lane 4: mCherry Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA G1060A; Lane 5: mCherry Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA G1060I; Lane 6: mCherry Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA G1061A; Lane 7: mCherry Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA G1061I. The mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA fusion protein has a calculated molecular mass of 125 kDa before N-glycosylation roughly 25 kDa larger than the calculated molecular mass of the endogenous Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 protein. The molecular masses of the different bands were estimated by linear regression and interpolation from the molecular weight markers using the Image Lab™ Software 5.2 (Biorad). Lane 1: 27 kDa; Lane 2: no band; Lane 3: 180 kDa, 160 kDa, 45 kDa and 29 kDa; Lane 4: 180 kDa, 160 kDa, 45 kDa and 29 kDa; Lane 5: 180 kDa and 45 kDa; Lane 6: 160 kDa, 45 kDa and 29 kDa; Lane 7: 180 kDa, 160 kDa, 45 kDa and 29 kDa. The 29 kDa band could correspond to the C- terminus of the Cav $\delta$  subunit cleaved around the putative “ $\omega$ ” site, attached to the mCherry fluorophore (last 25 residues). The 180 kDa band corresponds to the N-glycosylated form of the mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA protein and the 160 kDa band is compatible with the presence of the N-glycosylated form of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-GPI anchored protein absent from the isoleucine substituted mutant. The 46 kDa band could correspond to the Cav $\delta$  subunit attached to the mCherry fluorophore.



**FIGURE 3: Single mutation G1060I but not G1060A in the putative  $\omega$  cleavage site in Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 prevents cell surface expression of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1.** HEKT Cav $\beta$ 3 stable cells were transiently transfected with pCMV-Cav1.2 WT and pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT, pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA G1060A or pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA G1060I. **A.** Live-cell confocal imaging. One day after transfection, cells were stained with both wheat germ agglutinin (WGA) 647 (1:200) and FITC-conjugated anti-HA antibodies (10  $\mu$ g/mL). Colocalization pixel maps of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 and WGA are shown in white and were produced using the co-localization finder plugin in ImageJ. As seen, the HA-FITC fluorescence and the plasma membrane marker are strongly colocalized in cells expressing pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT and pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA G1060A indicating that these proteins are found at the plasma membrane. In contrast, there was very little cell surface FITC fluorescence in cells expressing the isoleucine mutant pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA G1060I although the fluorescence intensity for mCherry (marker for constitutive expression) remained strong. Scale bar corresponds to 10  $\mu$ m. **B.** Western blots were carried out with the following cellular fractions (from left to right). Lane 1: whole cell lysate; lane 2: cytoplasm; lane 3: total membranes, and lane 4: plasma membranes, obtained through preparative ultracentrifugation of transfected cells as described previously (31; 49). Lane 4 containing the plasma membrane fraction is within the grey rectangle for better visualization. Each lane was loaded with 1  $\mu$ g proteins. Proteins were electrophoresed on an 8% SDS-polyacrylamide denaturing gel, transferred to

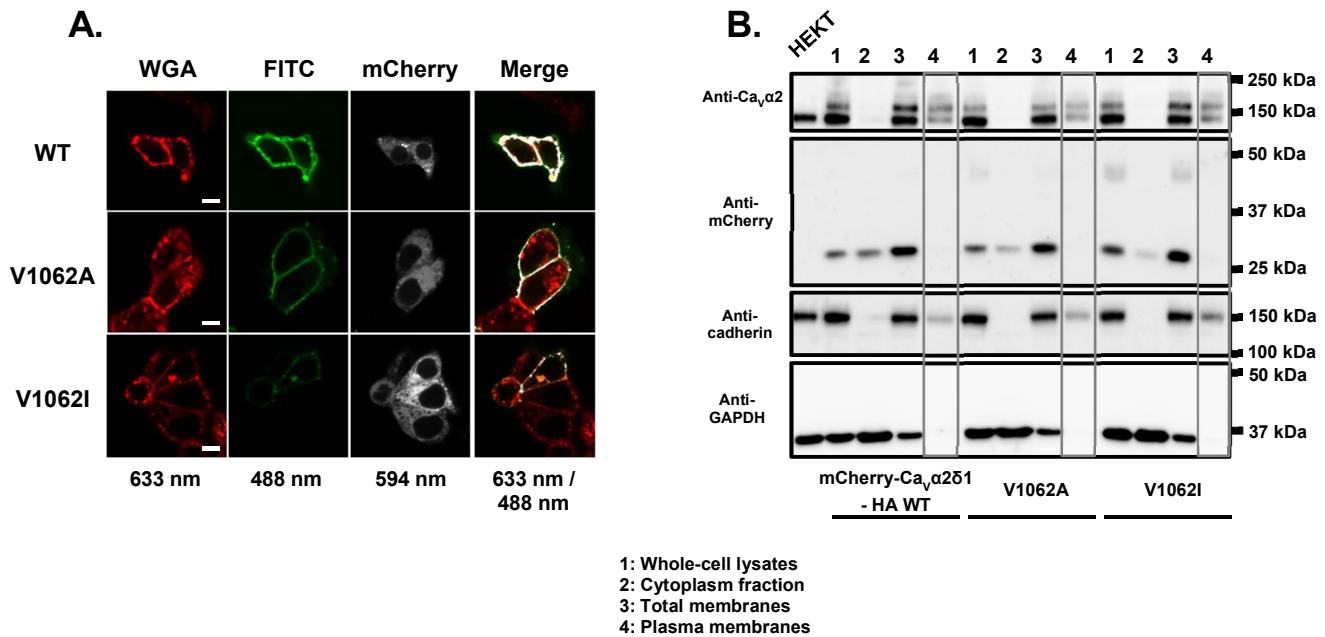


a nitrocellulose membrane, and probed with an anti- Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 (*Alomone 1:1000*), anti-mCherry (*Biovision 1:20000*), anti-pan-cadherin (*1:5000*) and anti-GAPDH (*1:25000*) as a loading control. The blot was cut in half and proteins probed with the anti- Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 are shown in the upper panel and the proteins probed with the anti-mCherry are shown in the 2<sup>nd</sup> panel from the top. Lanes 1, 3, and 4 show a wide upper band with a molecular mass of 160 kDa for pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT and pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA G1060A. Much fainter bands if any were detected by the anti- Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 for pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA G1060I. The lower bands are 46 kDa and 29 kDa for pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT, pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA G1060A, and pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA G1060I. Cadherin shows up as a single band of 140 kDa and is used as a marker of non-cytosolic fractions, thus as a positive control for membrane extraction (3<sup>rd</sup> panel from the top). GAPDH is revealed as a protein of 35 kDa throughout and is absent from the plasma membrane fraction (bottom panel). A weak GAPDH signal is perceptible in the total membrane fractions which contain all neo-synthesized proteins. The 45 kDa-band could indicate the presence of Cav $\delta$ -Cherry proteins in total membranes and its absence from the plasma membrane fraction suggests it could be rapidly degraded.



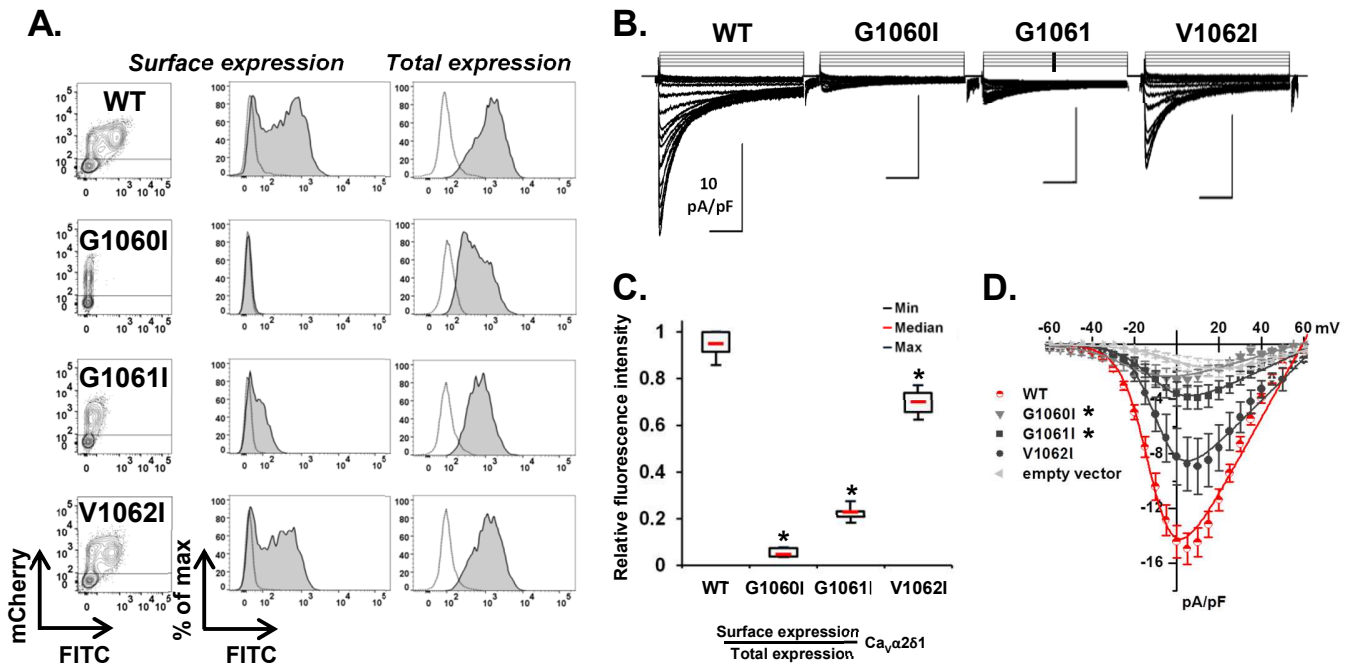
**FIGURE 4: Single mutation G1061I but not G1061A in the putative  $\omega$  cleavage site in Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 prevents cell surface expression of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1.** HEKT Cav $\beta$ 3 stable cells were transiently transfected with pCMV-Cav1.2 WT and pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT, pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA G1061A or pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA G1061I **A.** Confocal imaging with live cells stained with the wheat germ agglutinin WGA-647 and the FITC-conjugated anti-HA antibodies. Colocalization of the antibodies is shown in white when the pixels for the green (FITC) and the red (WGA) channels are merged using the co-localization finder plugin in ImageJ. As seen, the HA-FITC fluorescence and the plasma membrane marker were strongly colocalized in cells expressing pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT and pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA G1061A indicating that these proteins are found at the plasma membrane. In contrast, there was no FITC fluorescence in cells expressing the Isoleucine mutant pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA G1061I although the fluorescence signal for mCherry (constitutive expression marker) remained strong. Scale bar corresponds to 10  $\mu$ m. **B.** Western blots were carried out with the following fractions (from left to right). Lane 1: whole cell lysate; lane 2: cytoplasm; lane 3: total membranes, and lane 4: plasma membranes, obtained through preparative ultracentrifugation of transfected cells. Lane 4 containing the plasma membrane fraction is within the grey rectangle for better visualization. Each lane was loaded with 2  $\mu$ g proteins. Proteins were probed as described in Fig 3. Lanes 1, 3, and 4 show a doublet of bands with the anti-Cav $\alpha$ 2 $\delta$  with molecular masses of 180-160 kDa, and 140 kDa for pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT, pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA G1061A, and pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA G1061I

(lanes 1 and 3 only). The lower bands are 45 kDa and 29 kDa for pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT, pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA G1061A, and pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA G1061I. The 140-kDa band also appears in the lysates extracted from the nontransfected HEKT cells, suggesting this band is non-specific (see also Fig 3 and 5). Cadherin was used as a plasma membrane marker and GAPDH was mostly present in total lysates.



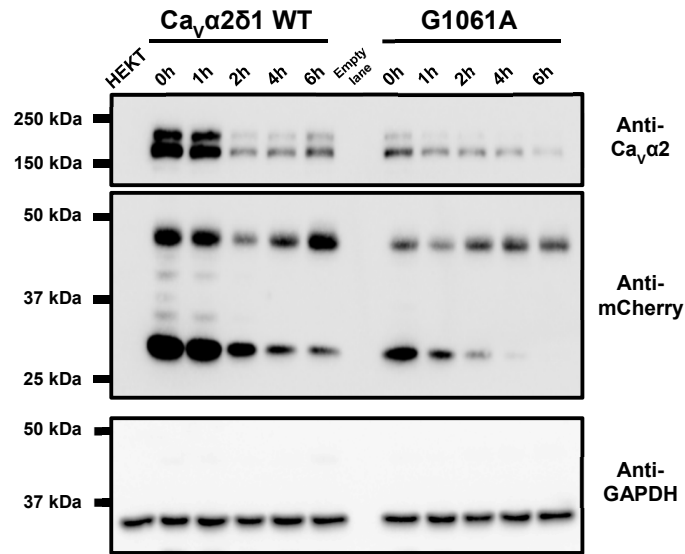
**FIGURE 5: Single mutations V1062A and V1062I in the putative  $\omega$  cleavage site in Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 do not prevent cell surface expression of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1.** HEKT Cav $\beta$ 3 stable cells were transiently transfected with pCMV-Cav1.2 WT and pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT, pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA V1062A or pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA V1062I. **A.** Confocal imaging of live cells stained with the wheat germ agglutinin (WGA) 647 and the FITC-conjugated anti-HA antibodies. Co-localization is shown in white when the pixels for the green (FITC) and the red (WGA) channels were merged. As seen, the HA-FITC fluorescence and the plasma membrane marker are strongly colocalized in cells expressing pmCherry-

Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT, pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA V1062A, and pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA V1062I indicating that these proteins are found at the plasma membrane. Scale bar corresponds to 10  $\mu$ m. **B.** Western blots were carried out with the following fractions (from left to right). Lane 1: whole cell lysate; lane 2: cytoplasm; lane 3: total membranes, and lane 3: plasma membranes, obtained through preparative ultracentrifugation of transfected cells. Lane 4 containing the plasma membrane fraction is within the grey rectangle for better visualization. Each lane was loaded with 2  $\mu$ g proteins. Proteins were probed as described in Fig 3. The blot was cut in half and proteins probed with the anti-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 are shown in the upper panel and the proteins probed with the anti-mCherry are shown in the middle panel. Lanes 1, 3, and 4 show a doublet with molecular masses of 180-160 kDa and 140 kDa for pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT, pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA V1062A, and pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA V1062I. The lower bands are 45 kDa and 29 kDa for pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT, pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA V1062A, and pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA V1062I. The 140-kDa band also appears in the lysates extracted from the nontransfected HEKT cells, suggesting this band is non-specific. Cadherin was used as a plasma membrane marker and GAPDH was mostly present in total lysates.

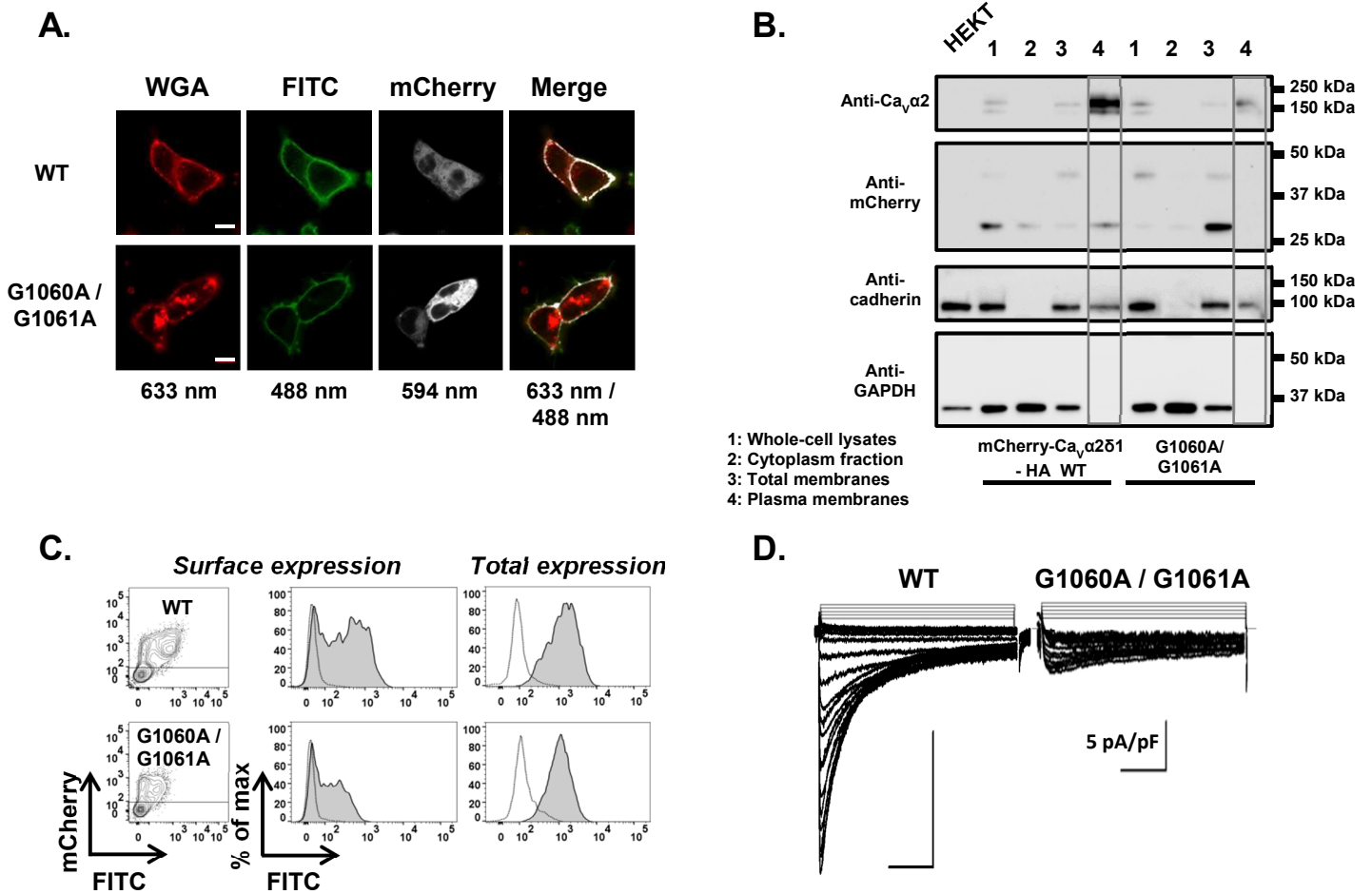


**FIGURE 6: Mutations G1060I and G1061I in the putative  $\omega$  cleavage site of  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  prevents functional modulation of  $\text{Ca}_v1.2$  currents.** Stably  $\text{Ca}_v\beta3$  cells were transiently transfected simultaneously with pCMV- $\text{Ca}_v1.2$  WT and pmCherry-  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ -HA WT or mutants. **A. Representative two-dimensional plots of mCherry versus FITC fluorescence** are shown for G1060I, G1061I or V1062I. The distribution of the fluorescence intensity measured for cells within the P2 gate (fluorescence positive cells) are shown in gray whereas the distribution of fluorescence intensity for cells present in the P3 gate (fluorescence negative cells) is displayed as an overlay. In all cases, the  $\Delta\text{MedFI}$  fluorescence (for median) measured for the FITC-conjugated anti-HA in permeabilized cells was qualitatively similar to the constitutive fluorescence measured for mCherry validating the accessibility of the HA epitope. Numerical values are shown in Table 1. **B. Representative whole-cell  $\text{Ca}^{2+}$  current traces** obtained after recombinant expression of  $\text{Ca}_v1.2$  in stable  $\text{Ca}_v\beta3$  cells with mCherry- $\text{Ca}_v\alpha2\delta$ -HA WT, mCherry- $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ -HA G1060I, G1061I, or V1062I. To note, the same mCherry- $\text{Ca}_v\alpha2\delta$ -HA constructs were used for the flow cytometry assays and the patch-clamp experiments. Currents were recorded in the presence of 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  from a holding potential of -100 mV. Time scale is 100 ms throughout. Unless specified otherwise, the current density scale is 10 pA/pF. **C. The relative cell surface expression** of the constructs shown in panel A was obtained from the ratio of the relative  $\Delta\text{MedFI}$  for the FITC-conjugated anti-HA measured in intact cells over the relative  $\Delta\text{MedFI}$  for the FITC-conjugated anti-HA measured in permeabilized cells, then

compared to the WT ratio of  $\Delta$ MedFI. Statistical analyses were performed with the “one Way Anova” test embedded in Origin 7.0. \*  $p < 0.01$  vs WT. **D. Averaged current–voltage relationships.** Peak current densities versus voltage relationships were measured for the wild-type construct and the mutants (as shown) using a series of depolarizing pulses from a  $V_m = -100$  mV. The electrophysiological properties of the mCherry- $Ca_v\alpha 2\delta 1$ -HA mutants were measured the same day and under the same transfection conditions as mCherry- $Ca_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT over the course of 5 months. Peak currents densities were averaged from the recording of mCherry- $Ca_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT ( $n = 109$  cells), mCherry- $Ca_v\alpha 2\delta 1$ -HA G1060I ( $n = 11$  cells), mCherry- $Ca_v\alpha 2\delta 1$ -HA G1061I ( $n = 11$  cells), and mCherry- $Ca_v\alpha 2\delta 1$ -HA V1062I ( $n = 10$  cells). Currents traces obtained with the empty mCherry vector (no insert) are also shown. Co-expression with  $Ca_v\alpha 2\delta 1$  left-shifted the voltage-dependence of activation of  $Ca_v 1.2$  WT /  $Ca_v\beta 3$  from  $E_{0.5,act} = +11 \pm 6$  mV ( $n = 6$ ) (empty vector pmCherry) to  $E_{0.5,act} = -8.6 \pm 0.3$  mV ( $n = 109$ ) (for  $Ca_v 1.2$  WT/  $Ca_v\beta 3$  with mCherry- $Ca_v\alpha 2\delta 1$  -HA WT), a significant  $\approx -20$  mV shift in the activation potential. The free energy of activation ( $\Delta G_{act}$ ) measured in the presence of mCherry-  $Ca_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT was well described by a Gaussian distribution (not shown). Statistical analyses were performed with a “one Way Anova” test: \*  $p < 0.01$  vs WT. See Table 2 for complete statistical significance.



**FIGURE 7: Cycloheximide chase assays.** Stably Ca<sub>v</sub>β3 cells were transiently transfected with pmCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT and pmCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA G1061A. One day after transfection, cells were incubated with 100 μg/mL cycloheximide (*Sigma-Aldrich Canada*) to block *de novo* protein synthesis. At the indicated time points (0 h or no cycloheximide, 1 h, 2 h, 4 h, and 6 h), cell lysates were fractionated on a 8% SDS-PAGE followed by immunoblotting to visualize Ca<sub>v</sub>α2δ1 (*Alomone, 1:1000*), mCherry (*Biovision, 1:20000*) and GAPDH (*Sigma, 1:25000*). Each lane was loaded with 20 μg proteins. The time course of degradation was measured in 3 experiments where the WT construct was tested alongside the mutant. A representative blot is shown for each condition. Protein band intensities were quantified by densitometry using Image Lab (BioRad) software at a single exposure selected for clear bands without saturation. The calculated molecular masses were similar for the three proteins. The anti-Ca<sub>v</sub>α2 detected proteins at 200 and 175 kDa; anti-Cherry detected proteins at 45 kDa and 29 kDa; and anti-GAPDH detected a single band at 35 kDa. The protein density of Ca<sub>v</sub>α2δ1 in total lysates was expressed relative to GAPDH and normalized to the relative protein density of test protein measured at time t = 0. Averaged data points were fitted with a mono-exponential decay function. The time constants of decay for the 175 kDa band were  $\tau \approx 1.7 \pm 0.3$  h (n=6) for the WT construct and  $\tau \approx 1.5 \pm 0.4$  h (n=3) for G1061A. The time constants of decay for the 29 kDa band were  $\tau \approx 1.8 \pm 0.5$  h (n=6) for the WT construct and  $\tau \approx 0.9 \pm 0.2$  h (n=3) for G1061A. Remarkably, the 45-kDa C-terminal fragment appeared to remain relatively stable over the course of the 6-h experiment for the WT and the G1061A constructs.



**FIGURE 8: A single glycine residue is essential in the “ $\omega$ ” cleavage site at position 1060 or 1061 to carry the functional modulation of Ca<sub>v</sub>1.2 currents.** Stably Ca<sub>v</sub>β<sub>3</sub> cells were transiently transfected simultaneously with pCMV-Ca<sub>v</sub>1.2 WT and pmCherry-Ca<sub>v</sub>α<sub>2</sub>δ1-HA WT or the G1060A/G1061A double mutant. **A.** Confocal imaging of recombinant cells stained with wheat germ agglutinin WGA-647 and the FITC-conjugated anti-HA antibodies. Cells expressing pmCherry-Ca<sub>v</sub>α<sub>2</sub>δ1-HA WT are shown in the upper panel and the G1060A/G1061A cells in the lower panel. Colocalization of the antibodies is shown in white when the pixels for the green (FITC) and the red (WGA) channels are merged. As seen, the HA-FITC and the plasma membrane marker display a robust colocalization in cells expressing pmCherry-Ca<sub>v</sub>α<sub>2</sub>δ1-HA WT and a smaller one for cells expressing pmCherry-Ca<sub>v</sub>α<sub>2</sub>δ1-HA G1060A/G1061A. Scale bar corresponds to 10 μm. **B.** Western blots were carried out with the following fractions (from left to right). Lane 1: whole cell lysate; lane 2: cytoplasm; lane 3: total membranes, and lane 4: plasma membranes, obtained through preparative



ultracentrifugation of transfected cells. Lane 4 containing the plasma membrane fraction is within the grey rectangle for better visualization. Each lane was loaded with 2  $\mu$ g proteins. Proteins were probed as described in Fig 3. The blot was cut in half and proteins probed with the anti-  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  are shown in the upper panel and the proteins probed with the anti-mCherry are shown in the middle panel. Lanes 1, 3, and 4 show single bands with molecular masses of 160 kDa for pmCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT and pmCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA G1060A/G1061A. The lower bands are 45 kDa and 29 kDa for pmCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT and G1060A/G1061A. Cadherin was used as a plasma membrane marker and GAPDH was mostly present in total lysates. **C. Representative two-dimensional plots of mCherry versus FITC fluorescence** are shown for pmCherry-  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT and the G1060A/G1061A double mutant. Analysis was carried out as explained in **Fig 6**. As seen, pmCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA G1060A/G1061A was expressed at the cell surface although its fluorescence was somewhat decreased when compared with pmCherry-  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT. Numerical values are shown in Table 1. **D. Representative whole-cell  $\text{Ca}^{2+}$  current traces** obtained after recombinant expression of  $\text{Ca}_v 1.2$  in stable  $\text{Ca}_v\beta 3$  cells with mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$ -HA WT and mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA G1060A/G1061A. The same mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$ -HA constructs were used for the flow cytometry assays and the patch-clamp experiments. Currents were recorded in the presence of 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  from a holding potential of -100 mV. Time scale is 100 ms throughout. The current density scale is 10 pA/pF (see Table 2 for statistical analysis).

mCherry- Ca <sub>v</sub> α2δ1-HA WT or mutant	ΔMedFI FITC		ΔMedFI mCherry	
	Intact cells	Permeabilized cells	Intact cells	Permeabilized cells
+ mCherry- Ca <sub>v</sub> α2δ1-HA WT	0.94 ± 0.07 (4)	0.94 ± 0.08 (4)	0.94 ± 0.07 (4)	0.95 ± 0.07 (4)
G1060A	0.8 ± 0.2 (2) *	0.9 ± 0.1 (2)	0.9 ± 0.2 (2)	0.9 ± 0.2 (2)
G1060I	0.01 ± 0.01 (3) **	0.28 ± 0.01 (3) **	0.73 ± 0.05 (3) **	0.79 ± 0.08 (3) **
G1061A	0.6 ± 0.1 (3) **	0.8 ± 0.2 (3)	0.7 ± 0.1 (3) **	0.8 ± 0.2 (3)
G1061I	0.11 ± 0.01 (3) **	0.46 ± 0.02 (3) **	0.81 ± 0.04 (3) **	0.84 ± 0.08 (3) **
G1060A/ G1061A	0.34 ± 0.07 (2) **	0.71 ± 0.07 (2) **	0.6 ± 0.1 (2) **	0.7 ± 0.1 (2)
V1062A	0.92 ± 0.09 (2)	0.93 ± 0.05 (2)	0.79 ± 0.02 (2) **	0.81 ± 0.05 (2) **
V1062I	0.53 ± 0.02 (2) **	0.71 ± 0.04 (2) **	0.98 ± 0.04 (2)	0.96 ± 0.06 (2)

**TABLE 1:** Ca<sub>v</sub>1.2 WT was co-expressed in stable Ca<sub>v</sub>β3 HEKT cells with pmCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT or pmCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA GPI mutant using a 1:1 DNA ratio (4 μg : 4 μg DNA). Flow cytometry experiments were conducted to determine cell surface expression of tagged proteins. Fluorescence intensity was estimated with the FlowJo software. Relative expression of Ca<sub>v</sub>α2δ1 was calculated based on ΔMedian Fluorescence Intensity (ΔMedFI) estimated for each fluorophore (mCherry or FITC) as compared with the value obtained for the WT construct measured the same day under the same conditions. The relative cell surface expression was expressed as the ratio of ΔMedFI for FITC in intact cells over the value of ΔMedFI for FITC in permeabilized cells. The total number of experiments is provided in parentheses, each experiment being the result of a transfection done in triplicate (three different cell dishes with more than 10000 cells each). As seen, the ΔMedFI values for mCherry measured in intact and permeabilized cells were found to be within the experimental error suggesting that cell permeabilization did not significantly alter the protein structure. Statistical analysis was carried out against the ΔMedFI for FITC measured with pmCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT. \* p < 0.05; \*\* p < 0.01.

mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA mutants with Cav1.2 WT + Cav $\beta$ 3 in HEKT cells	Electrophysiological Properties 2mM Ca <sup>2+</sup>			
	Peak current density (pA/pF)	E <sub>0.5,act</sub> (mV)	$\Delta$ Gact (kcal.mol <sup>-1</sup> )	r100 at +5 mV
Empty mCherry vector	- 1.9 $\pm$ 0.6 (6) ***	11 $\pm$ 6	0.4 $\pm$ 0.2 **	N.D.
mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT	- 15 $\pm$ 1 (109)	-8.6 $\pm$ 0.3	- 0.69 $\pm$ 0.03	0.36 $\pm$ 0.01
G1060A	- 12 $\pm$ 2 (8)	-11 $\pm$ 2	- 0.8 $\pm$ 0.1	0.25 $\pm$ 0.03 **
G1060I	- 2.6 $\pm$ 0.7 (11) **	6 $\pm$ 4	0.2 $\pm$ 0.1 **	0.3 $\pm$ 0.1
G1061A	- 8 $\pm$ 2 (10)	-5 $\pm$ 1	- 0.36 $\pm$ 0.08 **	0.42 $\pm$ 0.03
G1061I	- 4.0 $\pm$ 0.8 (11) **	-5 $\pm$ 2	- 0.4 $\pm$ 0.2 **	0.37 $\pm$ 0.03
G1060A/G1061A	- 3.6 $\pm$ 0.7 (6) **	-2 $\pm$ 4	- 0.2 $\pm$ 0.2 **	0.46 $\pm$ 0.04 *
V1062A	- 26.1 $\pm$ 0.7 (10)	-9.4 $\pm$ 0.8	- 0.8 $\pm$ 0.1	0.22 $\pm$ 0.03 **
V1062I	- 9 $\pm$ 2 (10)	-9 $\pm$ 0.9	- 0.71 $\pm$ 0.06	0.32 $\pm$ 0.03

**TABLE 2:** Cav1.2 WT was co-expressed in stable Cav $\beta$ 3 cells with pmCherry-no insert, pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT, or pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA GPI mutant using a 1:1 DNA ratio (4  $\mu$ g: 4  $\mu$ g DNA). Biophysical parameters were measured in the presence of 2 mM Ca<sup>2+</sup> as described elsewhere (29; 31). Activation properties (E<sub>0.5,act</sub> and  $\Delta$ Gact) were estimated from the mean I-V relationships and fitted to a Boltzmann equation. Only the cells with voltage-activated currents were kept for further analysis. Null cells were preponderant or outnumbered the positive cells for the following mutants: G1060I (24 null cells); G1061A (8 null cells); and G1060A/G1061A (15 null cells). The data are shown with the mean  $\pm$  S.E.M. of the individual experiments and the number of experiments appears in parentheses. N.D. not determined because of a poor signal to noise ratio. Statistical analysis was carried out against the values obtained in the presence of mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 -HA WT. \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.0001.

## Reference List

1. **Bers DM.** Calcium Fluxes Involved in Control of Cardiac Myocyte Contraction. *Circ Res* 87: 275-281, 2000.
2. **Richard S, Perrier E, Fauconnier J, Perrier R, Pereira L, Gomez AM and Benitah JP.** Calcium-induced calcium entry or how the L-type Calcium channel remodels its own signalling pathway in cardiac cells. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 90: 118-135, 2006.
3. **Bannister JP, Bulley S, Narayanan D, Thomas-Gatewood C, Luzny P, Pachuau J and Jaggari JH.** Transcriptional Upregulation of  $\alpha_2\delta_1$  Elevates Arterial Smooth Muscle Cell Voltage-Dependent  $Ca^{2+}$  Channel Surface Expression and Cerebrovascular Constriction in Genetic Hypertension. *Hypertension* 60: 1006-1015, 2012.
4. **Yue L, Feng J, Gaspo R, Li GR, Wang Z and Nattel S.** Ionic Remodeling Underlying Action Potential Changes in a Canine Model of Atrial Fibrillation. *Circ Res* 81: 512-525, 1997.
5. **Van Wagoner DR, Pond AL, Lamorgese M, Rossie SS, McCarthy PM and Nerbonne JM.** Atrial L-Type Calcium Currents and Human Atrial Fibrillation. *Circ Res* 85: 428-436, 1999.
6. **Aschar-Sobbi R, Izaddoustdar F, Korogyi AS, Wang Q, Farman GP, Yang F, Yang W, Dorian D, Simpson JA, Tuomi JM, Jones DL, Nanthakumar K, Cox B, Wehrens XHT, Dorian P and Backx PH.** Increased atrial arrhythmia susceptibility induced by intense endurance exercise in mice requires TNF $\alpha$ . *Nat Commun* 6: 6018, 2015.
7. **Lugenbiel P, Wenz F, Govorov K, Schweizer PA, Katus HA and Thomas D.** Atrial Fibrillation Complicated by Heart Failure Induces Distinct Remodeling of Calcium Cycling Proteins. *PLoS ONE* 10: e0116395, 2015.
8. **Richard S, Leclercq F, Lemaire S, Piot C and Nargeot J.** Calcium currents in compensated hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 37: 300-311, 1998.
9. **Mukherjee R and Spinale FG.** L-type Calcium Channel Abundance and Function with Cardiac Hypertrophy and Failure: A Review. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 30: 1899-1916, 1998.
10. **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 and Keating MT.** Ca(V) $_{1.2}$  calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell* 119: 19-31, 2004.
11. **Splawski I, Timothy KW, Decher N, Kumar P, Sachse FB, Beggs AH, Sanguinetti MC and Keating MT.** Severe arrhythmia disorder caused by cardiac L-type calcium channel mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 8089-8096, 2005.
12. **Napolitano C and Antzelevitch C.** Phenotypical manifestations of mutations in the genes

- encoding subunits of the cardiac voltage-dependent L-type calcium channel. *Circ Res* 108: 607-618, 2011.
13. **Catterall WA.** Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 521-555, 2000.
  14. **Peterson BZ, DeMaria CD, Adelman JP and Yue DT.** Calmodulin is the Ca<sup>2+</sup> sensor for Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron* 22: 549-558, 1999.
  15. **Dolphin AC.** Calcium channel diversity: multiple roles of calcium channel subunits. *Curr Opin Neurobiol* 19: 237-244, 2009.
  16. **Dai S, Hall DD and Hell JW.** Supramolecular assemblies and localized regulation of voltage-gated ion channels. *Physiol Rev* 89: 411-452, 2009.
  17. **Gao T, Puri TS, Gerhardstein BL, Chien AJ, Green RD and Hosey MM.** Identification and subcellular localization of the subunits of L-type calcium channels and adenylyl cyclase in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 272: 19401-19407, 1997.
  18. **Carl SL, Felix K, Caswell AH, Brandt NR, Ball WJ, Jr., Vaghy PL, Meissner G and Ferguson DG.** Immunolocalization of sarcolemmal dihydropyridine receptor and sarcoplasmic reticular triadin and ryanodine receptor in rabbit ventricle and atrium. *J Cell Biol* 129: 673-682, 1995.
  19. **Bourdin B, Marger F, Wall-Lacelle S, Schneider T, Klein H, Sauve R and Parent L.** Molecular Determinants of the Cavb-induced Plasma Membrane Targeting of the Cav1.2 Channel. *J Biol Chem* 285: 22853-22863, 2010.
  20. **Altier C, Garcia-Caballero A, Simms B, You H, Chen L, Walcher J, Tedford HW, Hermosilla T and Zamponi GW.** The Cav[beta] subunit prevents RFP2-mediated ubiquitination and proteasomal degradation of L-type channels. *Nat Neurosci* 14: 173-180, 2011.
  21. **Ellis SB, Williams ME, Ways NR, Brenner R, Sharp AH, Leung AT, Campbell KP, McKenna E, Koch WJ and Hui A.** Sequence and expression of mRNAs encoding the  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  subunits of a DHP-sensitive calcium channel. *S* 241: 1661-1664, 1988.
  22. **Leung AT, Imagawa T, Block B, Franzini-Armstrong C and Campbell KP.** Biochemical and ultrastructural characterization of the 1,4-dihydropyridine receptor from rabbit skeletal muscle. Evidence for a 52,000 Da subunit. *J Biol Chem* 263: 994-1001, 1988.
  23. **Dolphin AC.** The  $\alpha_2\delta$  subunits of voltage-gated calcium channels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1828: 1541-1549, 2013.
  24. **Chang FC and Hosey MM.** Dihydropyridine and phenylalkylamine receptors associated with cardiac and skeletal muscle calcium channels are structurally different. *J Biol Chem* 263: 18929-18937, 1988.

25. **Marais E, Klugbauer N and Hofmann F.** Calcium Channel alpha2delta Subunits: Structure and Gabapentin Binding. *Molecular Pharmacology* 59: 1243-1248, 2001.
26. **Fuller-Bicer GA, Varadi G, Koch SE, Ishii M, Bodi I, Kadeer N, Muth JN, Mikala G, Petrashevskaya NN, Jordan MA, Zhang SP, Qin N, Flores CM, Isaacsohn I, Varadi M, Mori Y, Jones WK and Schwartz A.** Targeted disruption of the voltage-dependent calcium channel  $\alpha_2/d_1$  subunit. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297: H117-H124, 2009.
27. **Singer D, Biel M, Lotan I, Flockerzi V, Hofmann F and Dascal N.** The roles of the subunits in the function of the calcium channel. *Science* 253: 1553-1557, 1991.
28. **Parent L, Schneider T, Moore CP and Talwar D.** Subunit regulation of the human brain  $\alpha_{1E}$  calcium channel. *J Membr Biol* 160: 127-140, 1997.
29. **Bourdin B, Shakeri B, Tetreault MP, Sauve R, Lesage S and Parent L.** Functional Characterization of Ca $\nu$ a2d Mutations Associated with Sudden Cardiac Death. *J Biol Chem* 290: 2854-2869, 2015.
30. **Yasuda T, Chen L, Barr W, McRory JE, Lewis RJ, Adams DJ and Zamponi GW.** Auxiliary subunit regulation of high-voltage activated calcium channels expressed in mammalian cells. *Eur J Neurosci* 20: 1-13, 2004.
31. **Tetreault MP, Bourdin B, Briot J, Segura E, Lesage S, Fiset C and Parent L.** Identification of glycosylation sites essential for surface expression of the Cav $\alpha_2\delta_1$  subunit and modulation of the cardiac Cav1.2 channel activity. *J Biol Chem* 291(9): 4826-4843, 2016.
32. **Wu J, Yan Z, Li Z, Yan C, Lu S, Dong M and Yan N.** Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 complex. *Science* 350 (6267): aad2395, 2015.
33. **Jay SD, Sharp AH, Kahl SD, Vedvick TS, Harpold MM and Campbell KP.** Structural characterization of the dihydropyridine-sensitive calcium channel  $\alpha_2$ -subunit and the associated d peptides. *J Biol Chem* 266: 3287-3293, 1991.
34. **Andrade A, Sandoval A, Oviedo N, De WM, Elias D and Felix R.** Proteolytic cleavage of the voltage-gated Ca $^{2+}$  channel  $\alpha_2d$  subunit: structural and functional features. *Eur J Neurosci* 25: 1705-1710, 2007.
35. **Calderon-Rivera A, Andrade A, Hernandez-Hernandez O, Gonzalez-Ramirez R, Sandoval A, Rivera M, Gomora JC and Felix R.** Identification of a disulfide bridge essential for structure and function of the voltage-gated Ca(2+) channel  $\alpha_2\delta_1$  auxiliary subunit. *Cell Calcium* 51: 22-30, 2012.
36. **Davies A, Kadurin I, Alvarez-Laviada A, Douglas L, Nieto-Rostro M, Bauer CS, Pratt WS and Dolphin AC.** The  $\alpha_2\delta$  subunits of voltage-gated calcium channels form GPI-anchored proteins, a posttranslational modification essential for function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 1654-1659, 2010.

37. **Robinson P, Etheridge S, Song L, Shah R, Fitzgerald EM and Jones OT.** Targeting of voltage-gated calcium channel alpha2delta-1 subunit to lipid rafts is independent from a GPI-anchoring motif. *PLoS One* 6: e19802, 2011.
38. **Nosjean O, Briolay A and Roux B.** Mammalian GPI proteins: sorting, membrane residence and functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 1331: 153-186, 1997.
39. **Stevens VL.** Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol membrane anchors. *Biochem J* 310 ( Pt 2): 361-370, 1995.
40. **Englund PT.** The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Annu Rev Biochem* 62: 121-138, 1993.
41. **Tiede A, Bastisch I, Schubert J, Orlean P and Schmidt RE.** Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositols in mammals and unicellular microbes. *Biol Chem* 380: 503-523, 1999.
42. **McConville MJ, Schneider P, Proudfoot L, Masterson C and Ferguson MA.** The developmental regulation and biosynthesis of GPI-related structures in Leishmania parasites. *Braz J Med Biol Res* 27: 139-144, 1994.
43. **Ikezawa H.** Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins. *Biol Pharm Bull* 25: 409-417, 2002.
44. **Shishioh N, Hong Y, Ohishi K, Ashida H, Maeda Y and Kinoshita T.** GPI7 is the second partner of PIG-F and involved in modification of glycosylphosphatidylinositol. *J Biol Chem* 280: 9728-9734, 2005.
45. **Shakeri B, Bourdin B, Demers-Giroux PO, Sauve R and Parent L.** A quartet of Leucine residues in the Guanylate Kinase domain of CaVbeta determines the plasma membrane density of the CaV2.3 channel. *J Biol Chem* 287: 32835-32847, 2012.
46. **Mayor S, Menon AK and Cross GA.** Glycolipid precursors for the membrane anchor of Trypanosoma brucei variant surface glycoproteins. II. Lipid structures of phosphatidylinositol-specific phospholipase C sensitive and resistant glycolipids. *J Biol Chem* 265: 6174-6181, 1990.
47. **Castellano A, Wei X, Birnbaumer L and Perez-Reyes E.** Cloning and expression of a third calcium channel b subunit. *J Biol Chem* 268: 3450-3455, 1993.
48. **Williams ME, Feldman DH, McCue AF, Brenner R, Velicelebi G, Ellis SB and Harpold MM.** Structure and functional expression of a<sub>1</sub>, a<sub>2</sub>, and b subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. *Neuron* 8: 71-84, 1992.
49. **Lizotte E, Tremblay AF, Allen BG FAU - Fiset C and Fiset C.** Isolation and characterization of subcellular protein fractions from mouse heart. *Anal Biochem* 345: 47-54, 2005.

50. **Holst HU, Dagnaes-Hansen FF, Corydon TJ FAU, Andreassen PH FAU, Jorgensen MM FAU, Kolvraa S FAU - Bolund, Bolund LF and Jensen TG.** LDL receptor-GFP fusion proteins: new tools for the characterisation of disease-causing mutations in the LDL receptor gene.
51. **Rivier AS, Castillon GA FAU - Michon L, Michon LF, Fukasawa MF, Romanova-Michaelides MF, Jaensch NF, Hanada KF and Watanabe R.** Exit of GPI-anchored proteins from the ER differs in yeast and mammalian cells.
52. **Mayer G, Poirier S and Seidah NG.** Annexin A2 Is a C-terminal PCSK9-binding Protein That Regulates Endogenous Low Density Lipoprotein Receptor Levels. *J Biol Chem* 283: 31791-31801, 2008.
53. **Poirier S, Mamarbachi M, Chen WT, Lee AS and Mayer G.** GRP94 Regulates Circulating Cholesterol Levels through Blockade of PCSK9-Induced LDLR Degradation. *Cell Rep* 13 (10): 2064-2071, 20150.
54. **Mayer G, Hamelin J, Asselin MC, Pasquato A, Marcinkiewicz E, Tang M, Tabibzadeh S and Seidah NG.** The Regulated Cell Surface Zymogen Activation of the Proprotein Convertase PC5A Directs the Processing of Its Secretory Substrates. *J Biol Chem* 283: 2373-2384, 2008.
55. **McConville MJ, Schneider PF, Proudfoot LF, Masterson CF and Ferguson MA.** The developmental regulation and biosynthesis of GPI-related structures in Leishmania parasites.
56. **Mayor S, Menon AK, Cross GA, Ferguson MA, Dwek RA and Rademacher TW.** Glycolipid precursors for the membrane anchor of Trypanosoma brucei variant surface glycoproteins. I. Can structure of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C sensitive and resistant glycolipids. *J Biol Chem* 265: 6164-6173, 1990.
57. **Wall-Lacelle S, Hossain MI, Sauve R, Blunck R and Parent L.** Double mutant cycle analysis identified a critical leucine residue in IIS4-S5 linker for the activation of the Cav2.3 calcium channel. *J Biol Chem* 286: 27197-27205, 2011.
58. **Yifrach O and MacKinnon R.** Energetics of pore opening in a voltage-gated K(+) channel. *Cell* 111: 231-239, 2002.
59. **Ferguson MA, Low MG and Cross GA.** Glycosyl-sn-1,2-dimyristylphosphatidylinositol is covalently linked to Trypanosoma brucei variant surface glycoprotein. *J Biol Chem* 260: 14547-14555, 1985.
60. **Elortza F, Nuhse TS, Foster LJ, Stensballe A, Peck SC and Jensen ON.** Proteomic analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins. *Mol Cell Proteomics* 2: 1261-1270, 2003.
61. **Amthauer R, Kodukula K, Gerber L and Udenfriend S.** Evidence that the putative COOH-terminal signal transamidase involved in glycosylphosphatidylinositol protein synthesis is



present in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 3973-3977, 1993.

62. **Chen R, Knez JJ, Merrick WC and Medof ME.** Comparative efficiencies of C-terminal signals of native glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proproteins in conferring GPI-anchoring. *J Cell Biochem* 84: 68-83, 2001.
63. **Eisenhaber B, Bork P and Eisenhaber F.** Sequence properties of GPI-anchored proteins near the omega-site: constraints for the polypeptide binding site of the putative transamidase. *Protein Eng* 11: 1155-1161, 1998.
64. **Pierleoni A, Martelli PL and Casadio R.** PredGPI: a GPI-anchor predictor. *BMC Bioinformatics* 9: 392, 2008.
65. **Eisenhaber B, Bork P and Eisenhaber F.** Sequence properties of GPI-anchored proteins near the omega-site: constraints for the polypeptide binding site of the putative transamidase. *Protein Eng* 11: 1155-1161, 1998.
66. **Creighton TE.** *Proteins, structure and molecular properties.* New-York: W.H. Freeman and Co., 1993, p. p. -507.
67. **Robinson P, Etheridge S, Song L, Shah R, Fitzgerald EM and Jones OT.** Targeting of Voltage-Gated Calcium Channel  $\alpha_2\delta_1$  Subunit to Lipid Rafts Is Independent from a GPI-Anchoring Motif. *PLoS ONE* 6: e19802, 2011.
68. **Sharp AH and Campbell KP.** Characterization of the 1,4-dihydropyridine receptor using subunit-specific polyclonal antibodies. Evidence for a 32,000-Da subunit. *J Biol Chem* 264: 2816-2825, 1989.
69. **Douglas L, Davies A, Wratten J and Dolphin AC.** Do voltage-gated calcium channel  $\alpha_2\delta$  subunits require proteolytic processing into  $\alpha_2$  and  $\delta$  to be functional? *Biochem Soc Trans* 34: 894-898, 2006.
70. **Kadurin I, Alvarez-Laviada A, Ng SFJ, Walker-Gray R, D'Arco M, Fadel MG, Pratt WS and Dolphin AC.** Calcium currents are enhanced by  $\alpha_2\delta_1$  lacking its membrane anchor. *J Biol Chem* 287: 33554-33566, 2012.
71. **Song J, Tan H, Perry AJ, Akutsu T, Webb GI, Whisstock JC and Pike RN.** PROSPER: an integrated feature-based tool for predicting protease substrate cleavage sites. *PLoS One* 7: e50300, 2012.
72. **Neuhof C and Neuhof H.** Calpain system and its involvement in myocardial ischemia and reperfusion injury. *World J Cardiol* 6: 638-652, 2014.
73. **Khalil PN, Neuhof C, Huss R, Pollhammer M, Khalil MN, Neuhof H, Fritz H and Siebeck M.** Calpain inhibition reduces infarct size and improves global hemodynamics and left ventricular contractility in a porcine myocardial ischemia/reperfusion model. *European Journal of Pharmacology* 528: 124-131, 2005.

74. **Potz BA, Sabe AA, Abid MR and Sellke FW.** Calpains and CoronaryVascular Disease. *Circ J* 80: 4-10, 2015.
75. **Belles B, Hescheler J, Trautwein W, Blomgren K and Karlsson JO.** A possible physiological role of the Ca-dependent protease calpain and its inhibitor calpastatin on the Ca current in guinea pig myocytes. *Pfl<sup>++</sup>gers Archiv* 412: 554-556, 1988.
76. **Patterson C, Portbury AL, Schisler JC and Willis MS.** Tear Me Down: Role of Calpain in the Development of Cardiac Ventricular Hypertrophy. *Circ Res* 109: 453-462, 2011.

## Discussion

### 1) Ancrage membranaire de $Ca_v\alpha 2\delta 1$

La sous-unité  $Ca_v\alpha 2\delta 1$  est une protéine transmembranaire de type I grâce à son segment hydrophobe unique prédit en C-terminal entre la Leu 1069 et la Gly 1085. De nombreuses modifications post-traductionnelles sont nécessaires à son repliement, sa stabilité, son adressage et sa fonction au sein du complexe  $Ca_v 1.2$ .

Le postulat traditionnel consiste en un clivage protéolytique post-traductionnel de la sous-unité  $Ca_v\alpha 2$  et  $Ca_v\delta$  au niveau du résidu 940 pour sa future liaison par pont disulfure (Calderón-Rivera et al., 2012; Dolphin, 2009). Cependant, sa région hydrophobe unique dans  $Ca_v\delta$  a été proposée comme étant un marqueur d'un ancrage glycosyl-phosphatidyl-inositol nécessaire à son adressage membranaire.

A la membrane plasmique, les radeaux lipidiques sont connus pour accueillir plus ou moins les protéines GPI ancrées. Ce sont des membranes hautement organisées, résistantes aux détergents, qui sont une plateforme pour toute une variété de fonctions cellulaires (Rajendran and Simons, 2005). Il a d'ailleurs été montré que l'isoforme 1 de  $Ca_v\alpha 2\delta$  est présente dans les tissus cérébraux de rat de façon native, dans ces mêmes radeaux, mais que, sous l'action de la phospholipase C phosphatidyl-inositol spécifique (PI-PLC), la protéine devenait soluble (Davies et al., 2010).

Notre étude a mis en place un modèle défectueux en ancrage GPI chez cette sous-unité qui a permis de mettre en évidence l'importance de cet ancrage pour l'adressage membranaire de  $Ca_v\alpha 2\delta 1$  et sa fonction au sein du complexe de type-L  $Ca_v 1.2$ . De plus, la reconnaissance et le clivage de cette isoforme 1 chez le rat (96% d'homologie avec l'homme, cf Annexe 1) par la PI-PLC dans notre système recombinant, permettant de confirmer la présence de cette ancre grâce au marquage immunofluorescent détecté en microscopie confocale.

Les mutations ponctuelles de la région prédite de clivage « $\omega$ » ont permis de définir pour chaque résidu, l'effet de l'encombrement stérique aux sites G1060, G1061 et V1062. Les mutants en isoleucine des acides aminés Gly1060 et Gly1061 ont un impact significatif sur l'adressage membranaire de  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ , caractérisé par cytométrie en flux, ultracentrifugation et microscopie confocale. En raison de la diminution de l'expression de cette protéine à la membrane, et donc par conséquent de sous-unité susceptible de se trouver au sein du complexe  $\text{Ca}_v 1.2$ , on observe une baisse significative de la densité de courant du canal  $\text{Ca}_v 1.2$ , mesuré par électrophysiologie.

Il est important de noter que l'adressage de  $\text{Ca}_v 1.2$  n'est pas altéré en présence des mutants de  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  G1060I et G1061I (résultats non montrés).

La fonction du canal  $\text{Ca}_v 1.2$  étant préservée en présence des mutants en Alanine, il apparaît que l'encombrement stérique est un critère déterminant pour la reconnaissance de la protéine par la GPI-transamidase dans le RE (Eisenhaber et al., 1998). En effet, la sous-unité catalytique GPI-8 reconnaît un environnement peu encombré, favorable au clivage au niveau du site « $\omega$ » 1060, 1061 ou 1062, et à l'ancrage des sucres et des lipides (Ikezawa, 2002; Meyer et al., 2000). Ces mutants présentent d'ailleurs toujours une ancre GPI à leur extrémité C-terminale, comme en témoigne leur sensibilité à la PI-PLC (Annexe Figure 27).

Cependant, il est important de noter qu'une glycine à l'une des deux positions 1060 ou 1061 est tout de même nécessaire à l'ancrage, au vu de la baisse d'adressage et de fonction du double mutant G1060A/G1061A.

Ce clivage post-traductionnel à la position 1060 ou 1061, sur l'une des deux Glycines prédites, est compatible avec la récente structure en 3 dimensions du complexe canalaire  $\text{Ca}_v 1.1$  du muscle squelettique de lapin (Wu et al., 2015, 2016). De ce fait, l'absence de densité électronique pour la partie C-terminale contenant le segment transmembranaire de  $\text{Ca}_v\delta$  (chez le lapin entre les résidus 1065-1106 et chez le rat entre 1049-1090, cf en Annexe 2) est concordant avec le clivage et l'ancrage GPI. Cette structure de cryo-microscopie électronique permet aussi de constater la proximité des Cys406 et 1062 chez le lapin correspondant aux Cys404-1047 prédites chez le rat pour supporter le pont disulfure entre  $\text{Ca}_v\alpha 2$  et  $\text{Ca}_v\delta$ .

Cependant, il a été montré que la sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha 2$  pouvait être soluble dans le milieu extracellulaire lorsque le segment hydrophobe de  $\text{Ca}_v\delta$  est tronqué, réduisant la modulation du canal  $\text{Ca}_v 2.1$  (Kadurin et al., 2012). Cette perte de modulation est toutefois compatible avec la nécessité pour  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  d'avoir un ancrage membranaire spécifique, probablement grâce à un GPI.

Il reste cependant incertain quant à la corrélation ou non des deux clivages post-traductionnels, l'un entre  $\text{Ca}_v\alpha 2$  et  $\text{Ca}_v\delta$  pour une future liaison disulfure, l'autre concernant l'ancrage GPI sur  $\text{Ca}_v\delta$  en amont de la région hydrophobe.

## 2) Clivages protéolytiques post-traductionnel de $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$

Le clivage protéolytique de la sous-unité en  $\text{Ca}_v\alpha 2$  et  $\text{Ca}_v\delta$  a été montré pour la première fois dans les années 80 par un gel SDS-PAGE de protéines  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  purifiées de muscle squelettique de lapin en condition fortement réductrice (100 mM DTT) (Jay et al., 1991; Sharp and Campbell, 1989). Le séquençage du petit fragment reconnu par l'anticorps anti- $\text{Ca}_v\delta$  de 17-20 kDa a permis de détecter la séquence primaire de  $\text{Ca}_v\alpha 2$  aux environs du résidu 940 (variable selon les espèces). Il a donc été proposé que la protéine soit clivée en deux fragments en condition dénaturante (Sharp and Campbell, 1989).

De plus, le double mutant des deux cystéines impliquées dans le pont disulfures C404-C1047 chez  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  de rat prévient la modulation du canal  $\text{Ca}_v 2.2$  (Calderón-Rivera et al., 2012). Ce pont, identifié aussi grâce à la structure 3D (Wu et al., 2015), est donc essentiel à la fonction de la protéine sur le canal étudié. Il est encore incertain quant à l'importance de ce pont entre  $\text{Ca}_v\alpha 2$  et  $\text{Ca}_v\delta$  pour les relier véritablement ou bien pour le repliement de la sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$ .

Grâce à des anticorps dirigés contre le N-terminal ou le C-terminal de  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 2$ , il a été montré que, dans un système recombinant, le clivage n'avait pas lieu, permettant une pleine modulation des courants et un bon adressage membranaire dans les HEK, Cos-7 et les cellules NG108-15 (Douglas et al., 2006). De ce fait, cette étude suggère que le clivage protéolytique

serait limité aux protéines Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 natives. La détection de la bande à 46 kDa en Western Blot de lysats des cellules HEK transfectées de façon transitoire, correspondant au fragment Cav $\delta$  lié au fluorophore mCherry, semble invalider cette théorie, de même que la détection de bandes uniques à 90 et 125 kDa dans des lysats totaux de cardiomyocytes de souris néonatales, à 180 kDa chez la souris adulte et à 175 kDa chez le rat adulte (anticorps anti- $\alpha$ 2, résultats non montrés effectués par Dre Benoîte Bourdin, (Tétreault et al., 2016)).

L'observation de l'ancrage GPI chez Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 et Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 2 suggère que la protéine subit deux différents clivages post-traductionnels au niveau de Cav $\delta$ , en N-terminal vers  $\approx$ 940 et en C-terminale vers  $\approx$ 1060 pour l'ancrage GPI. Malgré cela, il n'a pas encore été démontré si les deux clivages sont concomitants ou bien excluant l'un envers l'autre.

Le clivage GPI permet l'ancrage de la protéine à la membrane par un glycosyl-phosphatidylinositol, libérant la partie C-terminale de Cav $\delta$  (3.7 kDa). Les sucres et les lipides attachés à Cav $\alpha$ 2 $\delta$  produisent un fragment de 120.4 kDa auquel s'ajoutent les 50 kDa de N-glycosylation, susceptibles d'influencer la migration dans le gel SDS-PAGE. Récemment, la protéine Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 native ou recombinante ayant perdu ses glycanes par processus enzymatique apparaît à un poids moléculaire de 123 kDa en condition réductrice, proche de son poids calculé lorsqu'elle est ancrée par un GPI (Tétreault et al., 2016).

Les deux clivages protéolytiques sont donc supposés produire deux fragments au niveau du C-terminale liés au fluorophore mCherry de 25 kDa, Cav $\delta$  au complet à  $\approx$ 45 kDa (25 + 20) et le segment transmembranaire à  $\approx$ 30 kDa (25 + 3.7). En étudiant la migration des différents fragments et leur intensité entre mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT et les mutants Isoleucine, il est possible d'observer des différences dans les patrons de migration des fragments liés au mCherry. L'anticorps anti-mCherry montre une bande dominante pour le WT à 30 kDa, compatible avec l'ancrage GPI (avec une faible bande à 45 kDa). Au contraire, les mutants de mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA en Isoleucine perdent partiellement ou totalement ce fragment de 30 kDa et possèdent une bande à 45 kDa beaucoup plus prononcée en lysats totaux.

Toutes ces données supportent un modèle où les deux clivages protéolytiques de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 sont présents de manière concomitante mais contrebalancés en condition physiologique. La substitution des Glycines 1060 ou 1061 en Isoleucines tend à pencher la balance vers la production du fragment C-terminale de plus forte masse moléculaire, coïncidant avec le clivage de Cav $\alpha$ 2 et Cav $\delta$  aux alentours du résidu 940. Ce changement dans la structure de la protéine perturbe l'expression à la surface cellulaire de Cav $\alpha$ 2 et par conséquent, sa modulation au sein du canal cardiaque Cav1.2.

### 3) Implications physio-pathologiques du clivage protéolytique de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1

Dans cette étude, deux sites de clivages chez Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 ont été détectés dans la sous-unité Cav $\delta$ , au niveau de son extrémité N-terminale et C-terminal à  $\approx$ 1060-1061. Ces observations obtenues dans le système recombinant des HEKT, ne permet pas d'exclure d'autres formes de clivages de observés dans les systèmes natifs.

Pas loin de 250 sites de clivages potentiels pour 11 différentes protéases ont été identifiés au niveau de la séquence primaire de notre protéine d'intérêt, en utilisant le site Prosper (Song et al., 2012). Certaines de ces protéases sont exprimées dans des tissus musculaires, notamment la calpaïne qui est une protéase activée par le Ca<sup>2+</sup>. Elle a un site de clivage pour Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 de rat aux positions 923 et/ou 924, correspondant à la production du fragment Cav $\delta$ . La calpaïne est une protéase ubiquitaire non-lysosomale activée par le Ca<sup>++</sup> qui clive au niveau d'une cystéine. Elle est présente dans le cytosol et les mitochondries du myocarde (Neuhof and Neuhof, 2014). L'augmentation et la surcharge de Ca<sup>++</sup> dans le cytosol et les mitochondries des cardiomyocytes pendant l'ischémie et la reperfusion causent une activation de la calpaïne qui endommage l'appareil contractile et entrave la production d'énergie par le clivage de protéines essentielles dans ces compartiments.

Deux isoformes de cette protéase ont été reportées pour favoriser l'accélération de l'inactivation Ca<sup>2+</sup>-dépendante des courants calciques au niveau des myocytes ventriculaires

de cobaye (Belles et al., 1988). Il se pourrait que le clivage de  $Ca_v\alpha_2\delta$  par la calpaïne soit responsable de la diminution du courant calcique.

Il est cependant important de constater que ce clivage n'est que peu en rapport avec le clivage post-traductionnel postulé entre  $Ca_v\alpha_2$  et  $Ca_v\delta$  pour les relier ensuite par un/des pont(s) disulfure(s) puisque la calpaïne est active principalement dans les compartiments ne contenant pas  $Ca_v\alpha_2\delta_1$  (modifications post-traductionnelles dans le RE majoritairement). De ce fait, il reste questionnable quant à l'impact de cette protéase dans la physiopathologie de  $Ca_v\alpha_2\delta$ , sauf si l'on considère la possibilité de la sécrétion de cette protéase, qui pourrait entraîner un clivage de la protéine et un dysfonctionnement du canal  $Ca_v1.2$ .

De plus, au niveau du tissu natif de rat, dans les cardiomyocytes ventriculaires, la migration des lysats totaux a montré une bande unique à 180 kDa avec l'anticorps anti- $Ca_v\alpha_2$ . Cette bande correspond à la protéine  $Ca_v\alpha_2\delta_1$  qui a une masse moléculaire prédite de 123 kDa auxquels s'ajoutent 50 kDa de glycosylation, comme visible dans le système recombinant (Tétreault et al., 2016). Ce qui implique une absence de clivage soit entre  $Ca_v\alpha_2$  et  $Ca_v\delta$  ou par la calpaïne.

L'isoforme 1 de souris possède d'ailleurs des structures similaires avec celle du rat et de l'homme au niveau du site «  $\omega$  » avec la même séquence DCGGVSG, impliquant un potentiel ancrage GPI chez la souris (cf Annexe 2).

La présence d'une ancre GPI chez  $Ca_v\alpha_2\delta_1$  peut être une cible d'enzymes protéolytique phosphatidyl inositol spécifiques bactériennes, comme la PI-PLC. En effet, la production d'enzyme bactérienne dans le sang peut être une conséquence d'une infection pathogène et dans ce cas, la protéase aurait la capacité de cliver l'ancre GPI des protéines présentes à la membrane plasmique des cardiomyocytes ventriculaires. Le clivage de  $Ca_v\alpha_2\delta_1$  aura pour conséquence un dysfonctionnement du complexe  $Ca_v1.2$  lors de l'infection de l'hôte.



## Conclusion

Cette étude a permis de mettre en évidence la présence d'un ancrage de type GPI chez  $Ca_v\alpha 2\delta 1$  au niveau de la Glycine 1060 ou 1061. En effet, cela est visible grâce au traitement des cellules recombinantes avec la PI-PLC qui va cliver le phosphatidyl-inositol présent dans l'ancre et donc, réduire la colocalisation de  $Ca_v\alpha 2$  avec le marqueur membranaire visible en microscopie confocale. La mutagénèse dirigée a permis de comprendre les déterminants moléculaires importants pour l'ancrage de la protéine, visualisé par cytométrie en flux, microscopie confocale et ultracentrifugation. La sensibilité des mutants de  $Ca_v\alpha 2\delta 1$  G1060A et G1061A à la PI-PLC confirme la présence de l'ancre GPI.

L'hypothèse du clivage protéolytique post-traductionnel met en place une balance entre deux formes de clivage concomitantes. D'une part, le clivage GPI qui a lieu au résidu 1060-1061 et d'une autre part, le clivage  $Ca_v\alpha 2$  et  $Ca_v\delta$  au résidu 940 (Figure 26). Il est clairement visible sur les migrations des lysats totaux ou en ultracentrifugation que l'une des deux bandes est toujours plus exprimée que l'autre (45 kDa et 30 kDa avec l'anti-mCherry) selon les mutants.

En condition sauvage, la forme GPI semble dominer ce qui amène à un adressage et à une fonction optimale. Lors des mutants des Gly en Ile, la forme  $Ca_v\alpha 2$  et  $Ca_v\delta$  semble dominer ce qui amène à un adressage partiel voir absent de même qu'une baisse de fonction, sans perte de stabilité de la protéine étudié par cycloheximide. La forme GPI-ancrée présente à la membrane serait donc la forme fonctionnelle de  $Ca_v\alpha 2\delta 1$ .

La compréhension de la structure et de l'ancrage de cette protéine peut permettre d'appréhender certaines arythmies cardiaques liées aux canaux calciques ou liées à des infections de pathogène, lorsque les sous-unités de sont pas mutées ou que la mutation est dans la région de clivage de  $Ca_v\alpha 2\delta 1$  (jamais recensé à ce jour). L'absence de détection de ce genre de mutations pourrait être due à la trop grande importance de l'activation calcique pour la survie embryonnaire.

Malgré la mise en évidence de l'ancrage de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1, il reste encore à élucider le mécanisme d'activation de la protéine sur le canal Cav1.2. L'ancre GPI peut aussi jouer un rôle dans ce processus, au sein des radeaux lipidiques ou non, grâce à une plus grande flexibilité de la protéine dans les membranes ou envers d'autres protéines.

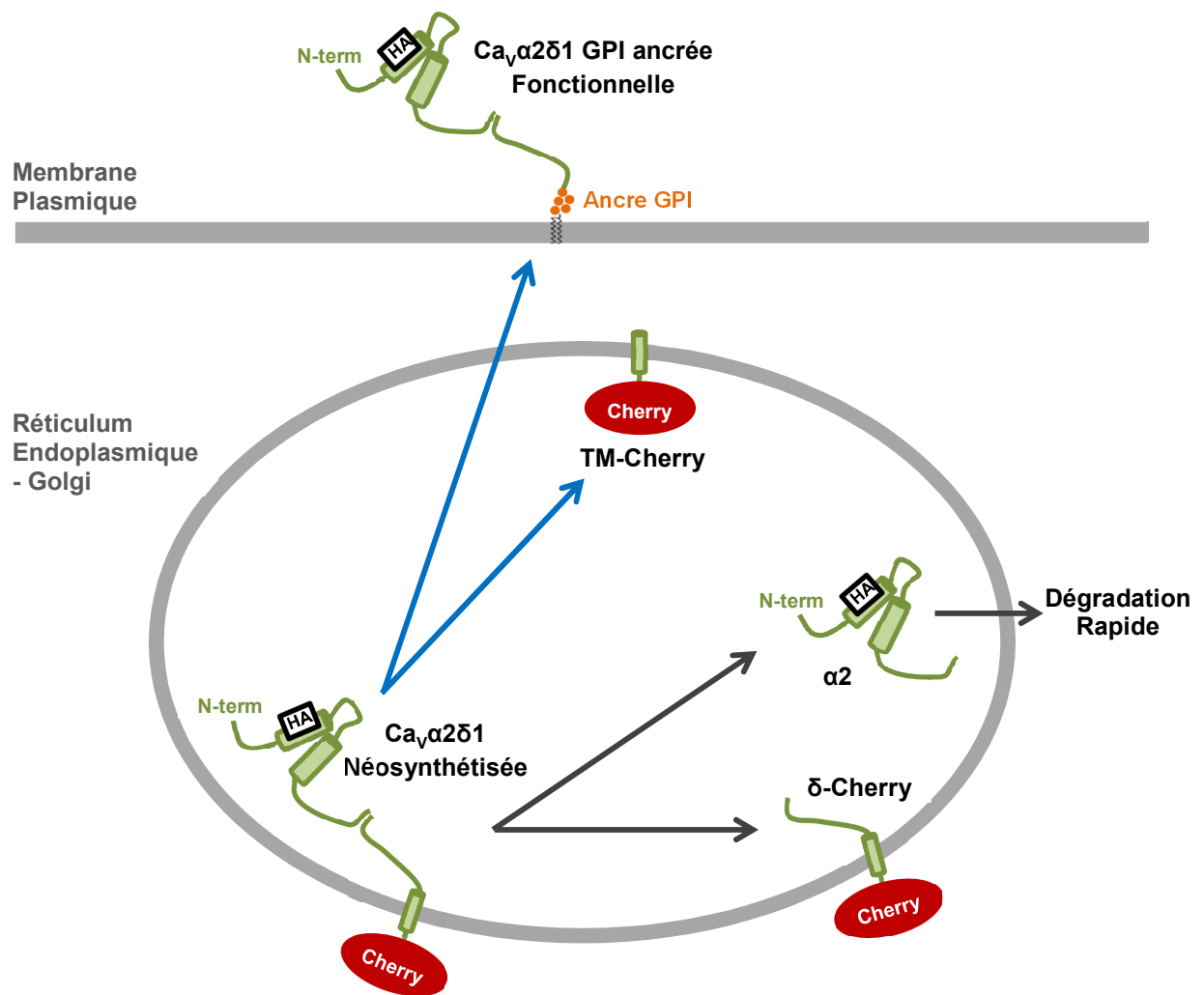


Figure 26: Schéma récapitulatif représentant la balance entre les différents clivages protéolytiques de la sous-unité  $Ca_v\alpha2\delta1$  dans les membranes totales (réticulum endoplasmique – Golgi) et à la membrane plasmique.

## Annexes

### 1) Homologie des séquences de $Ca_v\alpha 2\delta 1$ pour le lapin, l'homme, le rat et la souris

NCBI Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Homo Sapiens - Rattus Norvegicus = 96%

Homo Sapiens - Mus Musculus = 97%

Homo Sapiens - Oryctolagus cuniculus = 96 %

Rattus Norvegicus - Mus Musculus = 99 %

Rattus Norvegicus - Oryctolagus cuniculus = 95%

Mus Musculus - Oryctolagus cuniculus = 96%

## 2) Alignement des séquences de Ca<sub>v</sub>α2δ1 pour le lapin, l'homme, le rat et la souris

CLUSTAL O(1.2.2) multiple sequence alignment

```

Oryctolagus MAAGRPLAWTLTLWQAWLILIGPSSEEPFPSAVTIKSWVDKMQEDLVTLAKTASGVHQLV
Homo MAAGCLLALTLTLFQS--LLIGPSSEEPFPSAVTIKSWVDKMQEDLVTLAKTASGVNQLV
Rattus MAAGCLLALTLTLFQS--WLIGPSSEEPFSPVTIKSWVDKMQEDLVTLAKTASGVTQLA
Mus MAAGCLLALTLTLFQS--GLIGPSSEEPFSPVTIKSWVDKMQEDLVTLAKTASGVTQLA
      ****  **  ***:.*:  *****  *****  *****  *****  *****

Oryctolagus DIYEKYQDLYTVEPNNARQVLEIAARDIEKLLSNRSKALVRLALEAEKVQAAHQWREDF
Homo DIYEKYQDLYTVEPNNARQVLEIAARDIEKLLSNRSKALVRLALEAEKVQAAHQWREDF
Rattus DIYEKYQDLYTVEPNNARQVLEIAARDIEKLLSNRSKALVRLAMEAEKVQAAHQWREDF
Mus DIYEKYQDLYTVEPNNARQVLEIAARDIEKLLSNRSKALVRLAMEAEKVQAAHQWREDF
      *****:*****

Oryctolagus SNEVVYYNAKDDLDPEKNDSEPGSQRIKPVFIDDANFRQVSYQHAAVHIPTDIYEGSTI
Homo SNEVVYYNAKDDLDPEKNDSEPGSQRIKPVFIEDANFGRQISYQHAAVHIPTDIYEGSTI
Rattus SNEVVYYNAKDDLDPERNESESGSQRIKPVFIEDANFGRQISYQHAAVHIPTDIYEGSTI
Mus SNEVVYYNAKDDLDPERNESEPGSQRIKPVFIEDANFGRQISYQHAAVHIPTDIYEGSTI
      *****:.*:*** *****:**** **:******

Oryctolagus VLNELNWT SALDDVFKNREEDPSLLWQVFGSATGLARYYPASPWVDNSRTPNKIDLYDV
Homo VLNELNWT SALDEVFKKNREEDPSLLWQVFGSATGLARYYPASPWVDNSRTPNKIDLYDV
Rattus VLNELNWT SALDEVFKRNRDEDPTLLWQVFGSATGLARYYPASPWVDNSRTPNKIDLYDV
Mus VLNELNWT SALDEVFKRNRDEDPTLLWQVFGSATGLARYYPASPWVDNSRTPNKIDLYDV
      *****:***:.*:***:*****

Oryctolagus RRRPWYIQGAASPKDMLILVDVSGSVSGLTLKLIKRTSVSEMLETLSDDDFVNVASFNSNA
Homo RRRPWYIQGAASPKDMLILVDVSGSVSGLTLKLIKRTSVSEMLETLSDDDFVNVASFNSNA
Rattus RRRPWYIQGAASPKDMLILVDVSGSVSGLTLKLIKRTSVSEMLETLSDDDFVNVASFNSNA
Mus RRRPWYIQGAASPKDMLILVDVSGSVSGLTLKLIKRTSVSEMLETLSDDDFVNVASFNSNA
      *****

Oryctolagus QDVSCFQHLVQANVRNKKVLKDAVNNITAKGITDYKKGFSFAFEQLLNYNVSRANCNKII
Homo QDVSCFQHLVQANVRNKKVLKDAVNNITAKGITDYKKGFSFAFEQLLNYNVSRANCNKII
Rattus QDVSCFQHLVQANVRNKKVLKDAVNNITAKGITDYKKGFSFAFEQLLNYNVSRANCNKII
Mus QDVSCFQHLVQANVRNKKVLKDAVNNITAKGITDYKKGFSFAFEQLLNYNVSRANCNKII
      *****

Oryctolagus MLFTDGGEERAQEIFAKYNKDKKVRVFTFSVGQHNYDRGPIQWMACENKGYYYEIPSIGA
Homo MLFTDGGEERAQEIFNKYNKDKKVRVFTFSVGQHNYDRGPIQWMACENKGYYYEIPSIGA
Rattus MLFTDGGEERAQEIFAKYNKDKKVRVFTFSVGQHNYDRGPIQWMACENKGYYYEIPSIGA
Mus MLFTDGGEERAQEIFAKYNKDKKVRVFTFSVGQHNYDRGPIQWMACENKGYYYEIPSIGA
      *****

Oryctolagus IRINTQEYLDVLRPMVLGDKAKQVQWTVNYLDALELGLVITGTLPVFNITGQFENKTN
Homo IRINTQEYLDVLRPMVLGDKAKQVQWTVNYLDALELGLVITGTLPVFNITGQFENKTN
Rattus IRINTQEYLDVLRPMVLGDKAKQVQWTVNYLDALELGLVITGTLPVFNITGQFENKTN
Mus IRINTQEYLDVLRPMVLGDKAKQVQWTVNYLDALELGLVITGTLPVFNITGQFENKTN
      *****:*** *****

Oryctolagus LKNQLILGVMGVDVSLIEDIKRLTPRFTLCPNGYYFAIDPNGYVLLHPNLQPKPIGVGIPT
Homo LKNQLILGVMGVDVSLIEDIKRLTPRFTLCPNGYYFAIDPNGYVLLHPNLQPK-----
Rattus LKNQLILGVMGVDVSLIEDIKRLTPRFTLCPNGYYFAIDPNGYVLLHPNLQPK-----
Mus LKNQLILGVMGVDVSLIEDIKRLTPRFTLCPNGYYFAIDPNGYVLLHPNLQPK-----
      *****

```

Oryctolagus INLRKRPNVQNPKSQEPVTLDFLDAELENIDIKVEIRNKMIDGESGEKTFRTLKVSQDER  
Homo -----NPKSQEPVTLDFLDAELENIDIKVEIRNKMIDGESGEKTFRTLKVSQDER  
Rattus -----NPKSQEPVTLDFLDAELENIDIKVEIRNKMIDGESGEKTFRTLKVSQDER  
Mus -----NPKSQEPVTLDFLDAELENIDIKVEIRNKMIDGESGEKTFRTLKVSQDER  
\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

Oryctolagus YIDKGNRTYTWTVPVNGTDYS--LALVLPYTFYIYKAKIEETITQARY-----SETLKP  
Homo YIDKGNRTYTWTVPVNGTDYS-LALVLPYTFYIYKAKIEETITQARSKKGKMKDSETLKP  
Rattus YIDKGNRTYTWTVPVNGTDYS-LALVLPYTFYIYKAKIEETITQARSKKGKMKDSETLKP  
Mus YIDKGNRTYTWTVPVNGTDYS-LALVLPYTFYIYKAKIEETITQARY-----SETLKP  
\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

Oryctolagus DNFEESGYTFIAPRDYCSDLKPSDNNTFLLNFNEFIDRKT PNNPSCNTDLINRVLLDAG  
Homo DNFEESGYTFIAPRDYCNLDKISDNNTFLLNFNEFIDRKT PNNPSCNADLINRVLLDAG  
Rattus DNFEESGYTFIAPREYCNLDKPSDNNTFLLNFNEFIDRKT PNNPSCNTDLINRILLDAG  
Mus DNFEESGYTFIAPREYCNLDKPSDNNTFLLNFNEFIDRKT PNNPSCNTDLINRILLDAG  
\*\*\*\*\*:\*\*\*:\*.\*\*\* \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

Oryctolagus FTNELVQNYWSKQKNIKGVKARFVVTGGITRVYPKEAGENWQENPETYEDSFYKRSLDN  
Homo FTNELVQNYWSKQKNIKGVKARFVVTGGITRVYPKEAGENWQENPETYEDSFYKRSLDN  
Rattus FTNELVQNYWSKQKNIKGVKARFVVTGGITRVYPKEAGENWQENPETYEDSFYKRSLDN  
Mus FTNELVQNYWSKQKNIKGVKARFVVTGGITRVYPKEAGENWQENPETYEDSFYKRSLDN  
\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

Oryctolagus DNYVFTAPYFNKSGPGAYESGIMVSKAVEIYIQGKLLKPAVVGKIDVNSWIENFTKTSI  
Homo DNYVFTAPYFNKSGPGAYESGIMVSKAVEIYIQGKLLKPAVVGKIDVNSWIENFTKTSI  
Rattus DNYVFTAPYFNKSGPGAYESGIMVSKAVEIYIQGKLLKPAVVGKIDVNSWIENFTKTSI  
Mus DNYVFTAPYFNKSGPGAYESGIMVSKAVEIYIQGKLLKPAVVGKIDVNSWIENFTKTSI  
\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

Oryctolagus RDPGAGPVCDCKRNSDVMDCVILDDGGFLLMANHDDYTNQIGRFFGEIDPSLMRHLVNI  
Homo RDPGAGPVCDCKRNSDVMDCVILDDGGFLLMANHDDYTNQIGRFFGEIDPSLMRHLVNI  
Rattus RDPGAGPVCDCKRNSDVMDCVILDDGGFLLMANHDDYTNQIGRFFGEIDPSLMRHLVNI  
Mus RDPGAGPVCDCKRNSDVMDCVILDDGGFLLMANHDDYTNQIGRFFGEIDPSLMRHLVNI  
\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

Oryctolagus VYAFNKSVDYQSVCEPGAAPKQAGHRSAYVPSIADILQIGWWATAAAWSILQQFLLSLT  
Homo VYAFNKSVDYQSVCEPGAAPKQAGHRSAYVPSVADILQIGWWATAAAWSILQQFLLSLT  
Rattus LYAFNKSVDYQSVCDPGAAPKQAGHRSAYVPSITDILQIGWWATAAAWSILQQFLLSLT  
Mus LYAFNKSVDYQSVCDPGAAPKQAGHRSAYVPSIADILQIGWWATAAAWSILQQFLLSLT  
:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

Oryctolagus FPRLEAADMEDDDFTASMSKQSCITEQTQYFFDNDSSKSFSGVLDGNCRSRIFHVEKLMN  
Homo FPRLEAADMEDDDFTASMSKQSCITEQTQYFFDNDSSKSFSGVLDGNCRSRIFHVEKLMN  
Rattus FPRLEAADMEDDDFTASMSKQSCITEQTQYFFKNDTKSFSGVLDGNCRSRIFHVEKLMN  
Mus FPRLEAADMEDDDFTASMSKQSCITEQTQYFFKNDTKSFSGVLDGNCRSRIFHVEKLMN  
\*\*\*\*\*:\*.\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

Oryctolagus TNLIFIMVESKGTCPDTRLLIQAEQTS DGPDPDMVKQPRYRKGPDVCFDNNVLEDYTD  
Homo TNLIFIMVESKGTCPDTRLLIQAEQTS DGPDPDMVKQPRYRKGPDVCFDNNVLEDYTD  
Rattus TNLVFIMVESKGTCPDTRLLMQAEQTS DGPDPDMVKQPRYRKGPDVCFDNNVLEDYTD  
Mus TNLVFIMVESKGTCPDTRLLMQAEQTS DGPDPDMVKQPRYRKGPDVCFDNNVLEDYTD  
\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

Oryctolagus CGGVSGLNPSLWSIIGIQFVLLWLVSGSRHCLL  
Homo CGGVSGLNPSLWSIIGIQFVLLWLVSGSTRHLL  
Rattus CGGVSGLNPSLWSIFGLQFILLWLVSGSRHYLL  
Mus CGGVSGLNPSLWSIFGLQFILLWLVSGSRHYLL  
\*\*\*\*\*:\*.\*\*\*:\*\*\*\*\* \*

Le surligné en gris montre la zone supposée de clivage entre Cav $\alpha$ 2 et Cav $\delta$ .

Le surligné en jaune montre la partie C-terminale absente dans la structure 3D de lapin (Wu et al., 2015).

Le texte en orange correspond à la région de liaison de la GPI-transamidase.

Les deux Glycines surlignées en rouge correspondent au site présumé « $\omega$ » de clivage.

Le texte en bleu correspond à la région d'espacement.

Le texte en violet montre la région hydrophobe.

**Ces différentes régions sont très conservées entre les différentes espèces.**

3) Tests de la PI-PLC sur les mutants en Alanine de la région de clivage  $\omega$

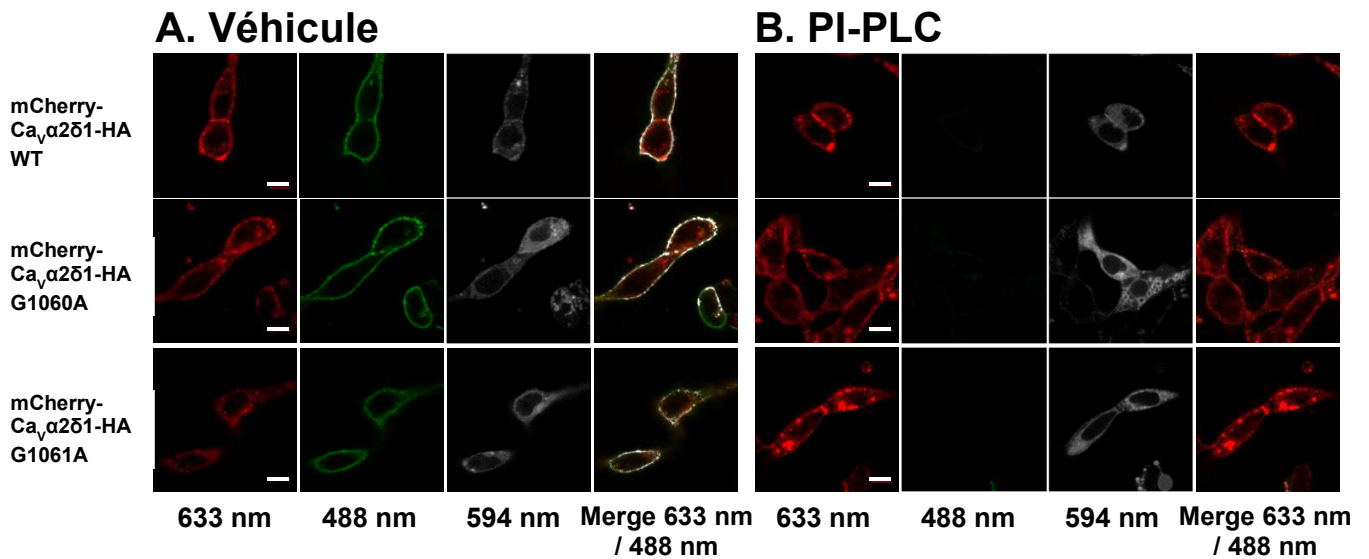


Figure 27: Annexe, Clivage des protéines Cavα2δ1-HA G1060A et G1061A par la PI-PLC dans le système recombinant HEKT 63 stable, en présence de la sous-unité principale Cav1.2. **A.** Les cellules ont été incubés 16h avec le véhicule de l'enzyme (tampon 20 mM Tris HCl, cf Matériel et Méthodes). **B.** Les cellules ont été incubées 16h avec la Phospholipase C Phosphatidylinositol spécifique (PI-PLC) à 3 U/mL. Le marquage des cellules et l'analyse des images sont tels qu'indiqué dans le Matériel et Méthodes. L'échelle est de 10  $\mu$ m.



## Bibliographie

- Aebi, M. (2013). N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 2430–2437.
- Aebi, M., Bernasconi, R., Clerc, S., and Molinari, M. (2010). N-glycan structures: recognition and processing in the ER. *Trends Biochem. Sci.* 35, 74–82.
- Aguzzi, A. (2005). Cell biology. Prion toxicity: all sail and no anchor. *Science* 308, 1420–1421.
- Amthauer, R., Kodukula, K., Gerber, L., and Udenfriend, S. (1993). Evidence that the putative COOH-terminal signal transamidase involved in glycosylphosphatidylinositol protein synthesis is present in the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 3973–3977.
- Andrade, A., Sandoval, A., Oviedo, N., De Waard, M., Elias, D., and Felix, R. (2007). Proteolytic cleavage of the voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha_2\delta$  subunit: structural and functional features. *Eur. J. Neurosci.* 25, 1705–1710.
- Arikkath, J., Chen, C.-C., Ahern, C., Allamand, V., Flanagan, J.D., Coronado, R., Gregg, R.G., and Campbell, K.P. (2003).  $\gamma_1$  Subunit Interactions within the Skeletal Muscle L-type Voltage-gated Calcium Channels. *J. Biol. Chem.* 278, 1212–1219.
- Babitch, J. (1990). Channel hands. *Nature* 346, 321–322.
- Bagal, S.K., Marron, B.E., Owen, R.M., Storer, R.I., and Swain, N.A. (2015). Voltage gated sodium channels as drug discovery targets. *Channels* 9, 360–366.
- Belles, B., Hescheler, J., Trautwein, W., Blomgren, K., and Karlsson, J.O. (1988). A possible physiological role of the Ca-dependent protease calpain and its inhibitor calpastatin on the Ca current in guinea pig myocytes. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 412, 554–556.
- Benting, J.H., Rietveld, A.G., and Simons, K. (1999). N-Glycans Mediate the Apical Sorting of a Gpi-Anchored, Raft-Associated Protein in Madin-Darby Canine Kidney Cells. *J. Cell Biol.* 146, 313–320.
- Berrou, L., Bernatchez, G., and Parent, L. (2001). Molecular determinants of inactivation within the I-II linker of  $\alpha_1E$  (CaV2.3) calcium channels. *Biophys. J.* 80, 215–228.
- Berrou, L., Klein, H., Bernatchez, G., and Parent, L. (2002). A specific tryptophan in the I-II linker is a key determinant of beta-subunit binding and modulation in Ca(V)2.3 calcium channels. *Biophys. J.* 83, 1429–1442.
- Berrou, L., Dodier, Y., Raybaud, A., Tousignant, A., Dafi, O., Pelletier, J.N., and Parent, L. (2005). The C-terminal Residues in the Alpha-interacting Domain (AID) Helix Anchor CaV $\beta$  Subunit Interaction and Modulation of CaV2.3 Channels. *J. Biol. Chem.* 280, 494–505.
- Bers, D. (2013). *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force* (Springer Science & Business Media).

- Béziau, D.M., Barc, J., O'Hara, T., Le Gloan, L., Amarouch, M.Y., Solnon, A., Pavin, D., Lecointe, S., Bouillet, P., Gourraud, J.-B., et al. (2014). Complex Brugada syndrome inheritance in a family harbouring compound SCN5A and CACNA1C mutations. *Basic Res. Cardiol.* 109.
- Bibi, E. (1998). The role of the ribosome-translocon complex in translation and assembly of polytopic membrane proteins. *Trends Biochem. Sci.* 23, 51–55.
- Blaich, A., Pahlavan, S., Tian, Q., Oberhofer, M., Poomvanicha, M., Lenhardt, P., Domes, K., Wegener, J.W., Moosmang, S., Ruppenthal, S., et al. (2012). Mutation of the Calmodulin Binding Motif IQ of the L-type Cav1.2 Ca<sup>2+</sup> Channel to EQ Induces Dilated Cardiomyopathy and Death. *J. Biol. Chem.* 287, 22616–22625.
- Blobel, G. (1980). Intracellular protein topogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 1496–1500.
- Boczek, N.J., Ye, D., Jin, F., Tester, D.J., Huseby, A., Bos, J.M., Johnson, A.J., Kanter, R., and Ackerman, M.J. (2015). Identification and Functional Characterization of a Novel CACNA1C-Mediated Cardiac Disorder Characterized by Prolonged QT Intervals With Hypertrophic Cardiomyopathy, Congenital Heart Defects, and Sudden Cardiac Death. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 8, 1122–1132.
- Bourdin, B., Marger, F., Wall-Lacelle, S., Schneider, T., Klein, H., Sauvé, R., and Parent, L. (2010). Molecular determinants of the CaV $\beta$ -induced plasma membrane targeting of the CaV1.2 channel. *J. Biol. Chem.* 285, 22853–22863.
- Bourdin, B., Shakeri, B., Tétreault, M.-P., Sauvé, R., Lesage, S., and Parent, L. (2015). Functional characterization of CaV $\alpha$ 2 $\delta$  mutations associated with sudden cardiac death. *J. Biol. Chem.* 290, 2854–2869.
- Brehm, P., and Eckert, R. (1978). Calcium entry leads to inactivation of calcium channel in *Paramecium*. *Science* 202, 1203–1206.
- Brockhausen, I., Schachter, H., and Stanley, P. (2009). O-GalNAc Glycans. In *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, and M.E. Etzler, eds. (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press), p.
- Budde, T., Meuth, S., and Pape, H.-C. (2002). Calcium-dependent inactivation of neuronal calcium channels. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 873–883.
- Burashnikov, E., Pfeiffer, R., Barajas-Martinez, H., Delpón, E., Hu, D., Desai, M., Borggrefe, M., Häissaguerre, M., Kanter, R., Pollevick, G.D., et al. (2010). Mutations in the cardiac L-type calcium channel associated with inherited J-wave syndromes and sudden cardiac death. *Heart Rhythm Off. J. Heart Rhythm Soc.* 7, 1872–1882.
- Burda, P., and Aebi, M. (1999). The dolichol pathway of N-linked glycosylation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1426, 239–257.
- Calderón-Rivera, A., Andrade, A., Hernández-Hernández, O., González-Ramírez, R., Sandoval, A., Rivera, M., Gomora, J.C., and Felix, R. (2012). Identification of a disulfide bridge essential for structure and function of the voltage-gated Ca(2+) channel  $\alpha(2)\delta$ -1 auxiliary subunit. *Cell Calcium* 51, 22–30.

Carraro, M., and Bernardi, P. Calcium and reactive oxygen species in regulation of the mitochondrial permeability transition and of programmed cell death in yeast. *Cell Calcium*.

Castellano, A., and Perez-Reyes, E. (1994). Molecular diversity of Ca<sup>2+</sup> channel  $\beta$  subunits. *Biochem. Soc. Trans.* 22, 483–488.

Castellano, A., Wei, X., Birnbaumer, L., and Perez-Reyes, E. (1993). Cloning and expression of a third calcium channel beta subunit. *J. Biol. Chem.* 268, 3450–3455.

Chen, M.M., Glover, K.J., and Imperiali, B. (2007). From peptide to protein: comparative analysis of the substrate specificity of N-linked glycosylation in *C. jejuni*. *Biochemistry (Mosc.)* 46, 5579–5585.

Chen, Y., Li, M., Zhang, Y., He, L., Yamada, Y., Fitzmaurice, A., Shen, Y., Zhang, H., Tong, L., and Yang, J. (2004). Structural basis of the  $\alpha$ 1– $\beta$  subunit interaction of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Nature* 429, 675–680.

Cheng, H., Lederer, M.R., Lederer, W.J., and Cannell, M.B. (1996). Calcium sparks and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> waves in cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.* 270, C148-159.

Chesebro, B., Trifilo, M., Race, R., Meade-White, K., Teng, C., LaCasse, R., Raymond, L., Favara, C., Baron, G., Priola, S., et al. (2005). Anchorless Prion Protein Results in Infectious Amyloid Disease Without Clinical Scrapie. *Science* 308, 1435–1439.

Crump, S.M., Andres, D.A., Sievert, G., and Satin, J. (2013). The cardiac L-type calcium channel distal carboxy terminus autoinhibition is regulated by calcium. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 304, H455-464.

D'Arco, M., Margas, W., Cassidy, J.S., and Dolphin, A.C. (2015). The upregulation of  $\alpha$ 2 $\delta$ -1 subunit modulates activity-dependent Ca<sup>2+</sup> signals in sensory neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 35, 5891–5903.

Davies, A., Hendrich, J., Van Minh, A.T., Wratten, J., Douglas, L., and Dolphin, A.C. (2007). Functional biology of the alpha(2)delta subunits of voltage-gated calcium channels. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 220–228.

Davies, A., Kadurin, I., Alvarez-Laviada, A., Douglas, L., Nieto-Rostro, M., Bauer, C.S., Pratt, W.S., and Dolphin, A.C. (2010). The  $\alpha$ 2 $\delta$  subunits of voltage-gated calcium channels form GPI-anchored proteins, a posttranslational modification essential for function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 1654–1659.

De Jongh, K.S., Warner, C., and Catterall, W.A. (1990). Subunits of purified calcium channels. Alpha 2 and delta are encoded by the same gene. *J. Biol. Chem.* 265, 14738–14741.

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

Dolphin, A.C. (2009). Calcium channel diversity: multiple roles of calcium channel subunits. *Curr. Opin. Neurobiol.* 19, 237–244.

- Dolphin, A.C. (2013). The  $\alpha\delta$  subunits of voltage-gated calcium channels. *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 1541–1549.
- Douglas, L., Davies, A., Wratten, J., and Dolphin, A.C. (2006). Do voltage-gated calcium channel  $\alpha\delta$  subunits require proteolytic processing into  $\alpha_2$  and  $\delta$  to be functional? *Biochem. Soc. Trans.* 34, 894–898.
- Doyle, D.A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., and MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* 280, 69–77.
- Eisenhaber, B., Bork, P., and Eisenhaber, F. (1998). Sequence properties of GPI-anchored proteins near the omega-site: constraints for the polypeptide binding site of the putative transamidase. *Protein Eng.* 11, 1155–1161.
- Eisenhaber, B., Bork, P., and Eisenhaber, F. (2001). Post-translational GPI lipid anchor modification of proteins in kingdoms of life: analysis of protein sequence data from complete genomes. *Protein Eng.* 14, 17–25.
- Ellgaard, L., and Helenius, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 181–191.
- Ellis, S.B., Williams, M.E., Ways, N.R., Brenner, R., Sharp, A.H., Leung, A.T., Campbell, K.P., McKenna, E., Koch, W.J., Hui, A., et al. (1988). Sequence and expression of mRNAs encoding the  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  subunits of a DHP-sensitive calcium channel. *Science* 241.
- Englund, P.T. (1993). The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 121–138.
- Fankhauser, N., and Mäser, P. (2005). Identification of GPI anchor attachment signals by a Kohonen self-organizing map. *Bioinformatics* 21, 1846–1852.
- Fatt, P., and Ginsborg, B.L. (1958). The ionic requirements for the production of action potentials in crustacean muscle fibres. *J. Physiol.* 142, 516–543.
- Fatt, P., and Katz, B. (1953). The electrical properties of crustacean muscle fibres. *J. Physiol.* 120, 171–204.
- Ferguson, M.A. (1999). The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J Cell Sci* 112, 2799–2809.
- Ferguson, M.A., Low, M.G., and Cross, G.A. (1985). Glycosyl-sn-1,2-dimyristylphosphatidylinositol is covalently linked to *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 260, 14547–14555.
- Fujita, M., Yoko-o, T., and Jigami, Y. (2006). Inositol Deacylation by Bst1p Is Required for the Quality Control of Glycosylphosphatidylinositol-anchored Proteins. *Mol. Biol. Cell* 17, 834–850.

- Gavel, Y., and von Heijne, G. (1990). Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng.* 3, 433–442.
- Ghosh, G., and Adams, J.A. (2011). Phosphorylation Mechanism and Structure of Serine-Arginine Protein Kinases. *FEBS J.* 278, 587–597.
- Glebov, O.O., and Nichols, B.J. (2004). Lipid raft proteins have a random distribution during localized activation of the T-cell receptor. *Nat. Cell Biol.* 6, 238–243.
- Goder, V., and Spiess, M. (2001). Topogenesis of membrane proteins: determinants and dynamics. *FEBS Lett.* 504, 87–93.
- Goldman, D.E. (1943). POTENTIAL, IMPEDANCE, AND RECTIFICATION IN MEMBRANES. *J. Gen. Physiol.* 27, 37–60.
- Griffith, O.H., and Ryan, M. (1999). Bacterial phosphatidylinositol-specific phospholipase C: structure, function, and interaction with lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1441, 237–254.
- Grinna, L.S., and Robbins, P.W. (1979). Glycoprotein biosynthesis. Rat liver microsomal glucosidases which process oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* 254, 8814–8818.
- Gurnett, C.A., Felix, R., and Campbell, K.P. (1997). Extracellular Interaction of the Voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> Channel  $\alpha 2\delta$  and  $\alpha 1$  Subunits. *J. Biol. Chem.* 272, 18508–18512.
- Harry, J.B., Kobrin, E., Abernethy, D.R., and Soldatov, N.M. (2004). New short splice variants of the human cardiac Cavbeta2 subunit: redefining the major functional motifs implemented in modulation of the Cav1.2 channel. *J. Biol. Chem.* 279, 46367–46372.
- Harvey, R.D., and Hell, J.W. (2013). CaV1.2 Signaling Complexes in the Heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 58, 143–152.
- Hebert, D.N., and Molinari, M. (2012). Flagging and Docking: dual roles for N-glycans in protein quality control and cellular proteostasis. *Trends Biochem. Sci.* 37, 404–410.
- Hedley, P.L., Jørgensen, P., Schlamowitz, S., Wangari, R., Moolman-Smook, J., Brink, P.A., Kanters, J.K., Corfield, V.A., and Christiansen, M. (2009). The genetic basis of long QT and short QT syndromes: A mutation update. *Hum. Mutat.* 30, 1486–1511.
- Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T., and MacKinnon, R. (1994). Mutations in the K<sup>+</sup> channel signature sequence. *Biophys. J.* 66, 1061–1067.
- von Heijne, G. (1985). Signal sequences. The limits of variation. *J. Mol. Biol.* 184, 99–105.
- Heinemann, S.H., Terlau, H., Stühmer, W., Imoto, K., and Numa, S. (1992). Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature* 356, 441–443.
- Heinemann, S.H., Schlieff, T., Mori, Y., and Imoto, K. (1994). Molecular pore structure of voltage-gated sodium and calcium channels. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Médicas E Biológicas Soc. Bras.*

Biofísica A1 27, 2781–2802.

Helenius, A. (1994). How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* 5, 253–265.

Hendershot, L.M. (2004). The ER function BiP is a master regulator of ER function. *Mt. Sinai J. Med. N. Y.* 71, 289–297.

Herzog, B.H., Fu, J., and Xia, L. (2014). Mucin-type O-glycosylation is critical for vascular integrity. *Glycobiology* 24, 1237–1241.

Hille, B. (2001). *Ion Channels of Excitable Membranes* (Mass.).

Hirabayashi, T., and Shimizu, T. (2000). Localization and regulation of cytosolic phospholipase A2. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1488, 124–138.

Hofmann, F., Flockerzi, V., Kahl, S., and Wegener, J.W. (2014). L-Type CaV1.2 Calcium Channels: From In Vitro Findings to In Vivo Function. *Physiol. Rev.* 94, 303–326.

Ikezawa, H. (2002). Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins. *Biol. Pharm. Bull.* 25, 409–417.

Jay, S.D., Sharp, A.H., Kahl, S.D., Vedvick, T.S., Harpold, M.M., and Campbell, K.P. (1991). Structural characterization of the dihydropyridine-sensitive calcium channel  $\alpha_2$ -subunit and the associated delta peptides. *J. Biol. Chem.* 266, 3287–3293.

Ju, T., Otto, V.I., and Cummings, R.D. (2011). The Tn antigen-structural simplicity and biological complexity. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 50, 1770–1791.

Kadurin, I., Alvarez-Laviada, A., Ng, S.F.J., Walker-Gray, R., D'Arco, M., Fadel, M.G., Pratt, W.S., and Dolphin, A.C. (2012). Calcium currents are enhanced by  $\alpha_2\delta$ -1 lacking its membrane anchor. *J. Biol. Chem.* 287, 33554–33566.

Kartner, N., Augustinas, O., Jensen, T.J., Naismith, A.L., and Riordan, J.R. (1992). Mislocalization of  $\Delta F508$  CFTR in cystic fibrosis sweat gland. *Nat. Genet.* 1, 321–327.

Katz, B. (1950). Action potentials from a sensory nerve ending. *J. Physiol.* 111, 248–260.

Kawagoe, K., Kitamura, D., Okabe, M., Taniuchi, I., Ikawa, M., Watanabe, T., Kinoshita, T., and Takeda, J. (1996). Glycosylphosphatidylinositol-anchor-deficient mice: implications for clonal dominance of mutant cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 87, 3600–3606.

Kim, J., Ghosh, S., Nunziato, D.A., and Pitt, G.S. (2004). Identification of the components controlling inactivation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuron* 41, 745–754.

Kinoshita, T., Maeda, Y., and Fujita, M. (2013). Transport of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins from the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1833, 2473–2478.

- Koch, M.C., Steinmeyer, K., Lorenz, C., Ricker, K., Wolf, F., Otto, M., Zoll, B., Lehmann-Horn, F., Grzeschik, K.H., and Jentsch, T.J. (1992). The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. *Science* 257, 797–800.
- Landolt-Marticorena, C., and Reithmeier, R. a. F. (1994). Asparagine-linked oligosaccharides are localized to single extracytosolic segments in multi-span membrane glycoproteins. *Biochem. J.* 302, 253–260.
- Landry, Y., and Gies, J.-P. (2009). *Pharmacologie: Des cibles vers l'indication thérapeutique* (Dunod).
- Lawrence, T. (2009). The Nuclear Factor NF- $\kappa$ B Pathway in Inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1.
- Lederkremer, G.Z. (2009). Glycoprotein folding, quality control and ER-associated degradation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 19, 515–523.
- Lee, A., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (2000). Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Facilitation and Inactivation of P/Q-Type Ca<sup>2+</sup> Channels. *J. Neurosci.* 20, 6830–6838.
- Lee, H.-A., Hyun, S.-A., Park, S.-G., Kim, K.-S., and Kim, S.J. (2016). Comparison of electrophysiological effects of calcium channel blockers on cardiac repolarization. *Korean J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Korean Physiol. Soc. Korean Soc. Pharmacol.* 20, 119–127.
- Levine, J.D., and Alessandri-Haber, N. (2007). TRP channels: Targets for the relief of pain. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1772, 989–1003.
- Liang, H., DeMaria, C.D., Erickson, M.G., Mori, M.X., Alseikhan, B.A., and Yue, D.T. (2003). Unified mechanisms of Ca<sup>2+</sup> regulation across the Ca<sup>2+</sup> channel family. *Neuron* 39, 951–960.
- Lizotte, E., Tremblay, A., Allen, B.G., and Fiset, C. (2005). Isolation and characterization of subcellular protein fractions from mouse heart. *Anal. Biochem.* 345, 47–54.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell, J. (2000). Insertion of Membrane Proteins into the ER Membrane.
- Long, S.B., Campbell, E.B., and Mackinnon, R. (2005). Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science* 309, 903–908.
- Low, M.G. (1989). Glycosyl-phosphatidylinositol: a versatile anchor for cell surface proteins. *FASEB J.* 3, 1600–1608.
- Marshall, R.D. (1974). The nature and metabolism of the carbohydrate-peptide linkages of glycoproteins. *Biochem. Soc. Symp.* 17–26.
- Martoglio, B., Hofmann, M.W., Brunner, J., and Dobberstein, B. (1995). The protein-conducting channel in the membrane of the endoplasmic reticulum is open laterally toward the lipid bilayer. *Cell* 81, 207–214.

- Mayer, G., Hamelin, J., Asselin, M.-C., Pasquato, A., Marcinkiewicz, E., Tang, M., Tabibzadeh, S., and Seidah, N.G. (2008). The regulated cell surface zymogen activation of the proprotein convertase PC5A directs the processing of its secretory substrates. *J. Biol. Chem.* *283*, 2373–2384.
- Mayor, S., Menon, A.K., and Cross, G.A. (1990). Glycolipid precursors for the membrane anchor of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoproteins. II. Lipid structures of phosphatidylinositol-specific phospholipase C sensitive and resistant glycolipids. *J. Biol. Chem.* *265*, 6174–6181.
- McConville, M.J., Schneider, P., Proudfoot, L., Masterson, C., and Ferguson, M.A. (1994). The developmental regulation and biosynthesis of GPI-related structures in *Leishmania* parasites. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Médicas E Biológicas Soc. Bras. Biofísica* *27*, 139–144.
- Meyer, U., Benghezal, M., Imhof, I., and Conzelmann, A. (2000). Active site determination of Gpi8p, a caspase-related enzyme required for glycosylphosphatidylinositol anchor addition to proteins. *Biochemistry (Mosc.)* *39*, 3461–3471.
- Mohorko, E., Glockshuber, R., and Aebi, M. (2011). Oligosaccharyltransferase: the central enzyme of N-linked protein glycosylation. *J. Inherit. Metab. Dis.* *34*, 869–878.
- Moon, Y.G., Lee, H.J., Kim, M.R., Myung, P.K., Park, S.Y., and Sok, D.E. (1999). Conversion of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored alkaline phosphatase by GPI-PLD. *Arch. Pharm. Res.* *22*, 249–254.
- Mukasa, R., Umeda, M., Endo, T., Kobata, A., and Inoue, K. (1995). Characterization of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored NCAM on mouse skeletal muscle cell line C2C12: the structure of the GPI glycan and release during myogenesis. *Arch. Biochem. Biophys.* *318*, 182–190.
- Nagamune, K., Ohishi, K., Ashida, H., Hong, Y., Hino, J., Kangawa, K., Inoue, N., Maeda, Y., and Kinoshita, T. (2003). GPI transamidase of *Trypanosoma brucei* has two previously uncharacterized (trypanosomatid transamidase 1 and 2) and three common subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 10682–10687.
- Navedo, M.F., and Santana, L.F. (2013). CaV1.2 sparklets in heart and vascular smooth muscle. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *58*, 67–76.
- Neher, E., and Sakmann, B. (1976). Noise analysis of drug induced voltage clamp currents in denervated frog muscle fibres. *J. Physiol.* *258*, 705–729.
- Neuhof, C., and Neuhof, H. (2014). Calpain system and its involvement in myocardial ischemia and reperfusion injury. *World J. Cardiol.* *6*, 638–652.
- Nieto-Rostro, M., Sandhu, G., Bauer, C.S., Jiruska, P., Jefferys, J.G.R., and Dolphin, A.C. (2014). Altered expression of the voltage-gated calcium channel subunit  $\alpha_2\delta-1$ : a comparison between two experimental models of epilepsy and a sensory nerve ligation model of neuropathic pain. *Neuroscience* *283*, 124–137.
- Nitert, M.D., Nagorny, C.L.F., Wendt, A., Eliasson, L., and Mulder, H. (2008). CaV1.2 rather than CaV1.3 is coupled to glucose-stimulated insulin secretion in INS-1 832/13 cells. *J. Mol. Endocrinol.* *41*, 1–11.



- Nonner, W., and Eisenberg, B. (1998). Ion permeation and glutamate residues linked by Poisson-Nernst-Planck theory in L-type calcium channels. *Biophys. J.* 75, 1287–1305.
- Nosjean, O., Briolay, A., and Roux, B. (1997). Mammalian GPI proteins: sorting, membrane residence and functions. *Biochim. Biophys. Acta* 1331, 153–186.
- Ohrtmann, J., Ritter, B., Polster, A., Beam, K.G., and Papadopoulos, S. (2008). Sequence differences in the IQ motifs of CaV1.1 and CaV1.2 strongly impact calmodulin binding and calcium-dependent inactivation. *J. Biol. Chem.* 283, 29301–29311.
- Olivares, L., Aragón, C., Giménez, C., and Zafra, F. (1997). Analysis of the Transmembrane Topology of the Glycine Transporter GLYT1. *J. Biol. Chem.* 272, 1211–1217.
- Ota, K., Sakaguchi, M., von Heijne, G., Hamasaki, N., and Mihara, K. (1998). Forced transmembrane orientation of hydrophilic polypeptide segments in multispinning membrane proteins. *Mol. Cell* 2, 495–503.
- Paetzel, M., Karla, A., Strynadka, N.C.J., and Dalbey, R.E. (2002). Signal Peptidases. *Chem. Rev.* 102, 4549–4580.
- Paladino, S., Sarnataro, D., Pillich, R., Tivodar, S., Nitsch, L., and Zurzolo, C. (2004). Protein oligomerization modulates raft partitioning and apical sorting of GPI-anchored proteins. *J. Cell Biol.* 167, 699–709.
- Parent, L., and Gopalakrishnan, M. (1995). Glutamate substitution in repeat IV alters divalent and monovalent cation permeation in the heart Ca<sup>2+</sup> channel. *Biophys. J.* 69, 1801–1813.
- Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N., and Catterall, W.A. (2011). THE CRYSTAL STRUCTURE OF A VOLTAGE-GATED SODIUM CHANNEL. *Nature* 475, 353–358.
- Petegem, F.V., Chatelain, F.C., and Minor, D.L. (2005). Insights into voltage-gated calcium channel regulation from the structure of the CaV1.2 IQ domain–Ca<sup>2+</sup>/calmodulin complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 1108–1115.
- Peterson, B.Z., DeMaria, C.D., Adelman, J.P., and Yue, D.T. (1999). Calmodulin is the Ca<sup>2+</sup> sensor for Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron* 22, 549–558.
- Pierleoni, A., Martelli, P.L., and Casadio, R. (2008). PredGPI: a GPI-anchor predictor. *BMC Bioinformatics* 9, 392.
- Pippucci, T., Parmeggiani, A., Palombo, F., Maresca, A., Angius, A., Crisponi, L., Cucca, F., Liguori, R., Valentino, M.L., Seri, M., et al. (2013). A novel null homozygous mutation confirms CACNA2D2 as a gene mutated in epileptic encephalopathy. *PloS One* 8, e82154.
- Poirier, S., Mamarbachi, M., Chen, W.-T., Lee, A.S., and Mayer, G. (2015). GRP94 Regulates Circulating Cholesterol Levels through Blockade of PCSK9-Induced LDLR Degradation. *Cell Rep.* 13, 2064–2071.
- Pollard, H., Toumaniantz, G., Amos, J.L., Avet-Loiseau, H., Guihard, G., Behr, J.P., and Escande, D.

- (2001). Ca<sup>2+</sup>-sensitive cytosolic nucleases prevent efficient delivery to the nucleus of injected plasmids. *J. Gene Med.* **3**, 153–164.
- Prevarskaya, N., Zhang, L., and Barritt, G. (2007). TRP channels in cancer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **1772**, 937–946.
- Pusch, M., Jordt, S.-E., Stein, V., and Jentsch, T.J. (1999). Chloride dependence of hyperpolarization-activated chloride channel gates. *J. Physiol.* **515**, 341–353.
- Rajendran, L., and Simons, K. (2005). Lipid rafts and membrane dynamics. *J. Cell Sci.* **118**, 1099–1102.
- Raybaud, A., Dodier, Y., Bissonnette, P., Simoes, M., Bichet, D.G., Sauvé, R., and Parent, L. (2006). The Role of the GX9GX3G Motif in the Gating of High Voltage-activated Ca<sup>2+</sup> Channels. *J. Biol. Chem.* **281**, 39424–39436.
- Richard, S., Perrier, E., Fauconnier, J., Perrier, R., Pereira, L., Gómez, A.M., and Bénitah, J.-P. (2006). “Ca(2+)-induced Ca(2+) entry” or how the L-type Ca(2+) channel remodels its own signalling pathway in cardiac cells. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **90**, 118–135.
- Robinson, P.J. (1997). Signal transduction via GPI-anchored membrane proteins. *Adv. Exp. Med. Biol.* **419**, 365–370.
- Robinson, P., Etheridge, S., Song, L., Shah, R., Fitzgerald, E.M., and Jones, O.T. (2011). Targeting of Voltage-Gated Calcium Channel  $\alpha 2\delta$ -1 Subunit to Lipid Rafts Is Independent from a GPI-Anchoring Motif. *PLoS ONE* **6**.
- Rook, M.B., Alshinawi, C.B., Groenewegen, W.A., Gelder, I.C. van, Ginneken, A.C.G. van, Jongsma, H.J., Mannens, M.M.A.M., and Wilde, A.A.M. (1999). Human SCN5A gene mutations alter cardiac sodium channel kinetics and are associated with the Brugada syndrome. *Cardiovasc. Res.* **44**, 507–517.
- Rosenbaum, T., and Simon, S.A. (2007). TRPV1 Receptors and Signal Transduction. In *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*, W.B. Liedtke, and S. Heller, eds. (Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis), p.
- Rougier, J.-S., and Abriel, H. (2015). Cardiac voltage-gated calcium channel macromolecular complexes. *Biochim. Biophys. Acta*.
- Ruiz-Canada, C., Kelleher, D.J., and Gilmore, R. (2009). Cotranslational and Posttranslational N-Glycosylation of Polypeptides by Distinct Mammalian OST Isoforms. *Cell* **136**, 272–283.
- Sadava, D.E., Hillis, D.M., and Heller, H.C. (2011). *Life: The Science of Biology* (W. H. Freeman).
- Sather, W.A. (2005). Selective Permeability of Voltage-Gated Calcium Channels. In *Voltage-Gated Calcium Channels*, (Springer US), pp. 205–218.
- Satin, J., and Schroder, E.A. (2009). Auto-regulation of Cardiac L-type Calcium Channels. *Trends Cardiovasc. Med.* **19**, 268–271.

- Schulla, V., Renström, E., Feil, R., Feil, S., Franklin, I., Gjinovci, A., Jing, X.-J., Laux, D., Lundquist, I., Magnuson, M.A., et al. (2003). Impaired insulin secretion and glucose tolerance in  $\beta$  cell-selective CaV1.2 Ca<sup>2+</sup> channel null mice. *EMBO J.* 22, 3844–3854.
- Schultz, S.G. (1996). *Molecular Biology of Membrane Transport Disorders* (Springer Science & Business Media).
- Schwarz, F., Fan, Y.-Y., Schubert, M., and Aebi, M. (2011). Cytoplasmic N-glycosyltransferase of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is an inverting enzyme and recognizes the NX(S/T) consensus sequence. *J. Biol. Chem.* 286, 35267–35274.
- Shakeri, B., Bourdin, B., Demers-Giroux, P.-O., Sauvé, R., and Parent, L. (2012). A Quartet of Leucine Residues in the Guanylate Kinase Domain of CaV $\beta$  Determines the Plasma Membrane Density of the CaV2.3 Channel. *J. Biol. Chem.* 287, 32835–32847.
- Sharma, D.K., Vidugiriene, J., Bangs, J.D., and Menon, A.K. (1999). A Cell-free Assay for Glycosylphosphatidylinositol Anchoring in African Trypanosomes DEMONSTRATION OF A TRANSAMIDATION REACTION MECHANISM. *J. Biol. Chem.* 274, 16479–16486.
- Sharma, P., Varma, R., Sarasij, R.C., Ira, null, Gousset, K., Krishnamoorthy, G., Rao, M., and Mayor, S. (2004). Nanoscale organization of multiple GPI-anchored proteins in living cell membranes. *Cell* 116, 577–589.
- Sharp, A.H., and Campbell, K.P. (1989). Characterization of the 1,4-dihydropyridine receptor using subunit-specific polyclonal antibodies. Evidence for a 32,000-Da subunit. *J. Biol. Chem.* 264, 2816–2825.
- Shaw, R.M., and Colecraft, H.M. (2013). L-type calcium channel targeting and local signalling in cardiac myocytes. *Cardiovasc. Res.* 98, 177–186.
- Sherwood, L. (2006). *Physiologie humaine: A Human Perspective* (De Boeck Supérieur).
- Shi, N., Ye, S., Alam, A., Chen, L., and Jiang, Y. (2006). Atomic structure of a Na<sup>+</sup>- and K<sup>+</sup>-conducting channel. *Nature* 440, 570–574.
- Shibatani, T., David, L.L., McCormack, A.L., Frueh, K., and Skach, W.R. (2005). Proteomic analysis of mammalian oligosaccharyltransferase reveals multiple subcomplexes that contain Sec61, TRAP, and two potential new subunits. *Biochemistry (Mosc.)* 44, 5982–5992.
- Shishioh, N., Hong, Y., Ohishi, K., Ashida, H., Maeda, Y., and Kinoshita, T. (2005). GPI7 Is the Second Partner of PIG-F and Involved in Modification of Glycosylphosphatidylinositol. *J. Biol. Chem.* 280, 9728–9734.
- Silverthorn, D.U. (2007). *Physiologie humaine: Une approche intégrée* (Pearson).
- Simon, S.M., and Blobel, G. (1991). A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Cell* 65, 371–380.

- Skvirsky, R.C., Reginald, S., and Shen, X. (1995). Topology analysis of the colicin V export protein CvaA in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *177*, 6153–6159.
- Soldà, T., Galli, C., Kaufman, R.J., and Molinari, M. (2007). Substrate-Specific Requirements for UGT1-Dependent Release from Calnexin. *Mol. Cell* *27*, 238–249.
- Soldatov, N.M. (2003). Ca<sup>2+</sup> channel moving tail: link between Ca<sup>2+</sup>-induced inactivation and Ca<sup>2+</sup> signal transduction. *Trends Pharmacol. Sci.* *24*, 167–171.
- Song, J., Tan, H., Perry, A.J., Akutsu, T., Webb, G.I., Whisstock, J.C., and Pike, R.N. (2012). PROSPER: An Integrated Feature-Based Tool for Predicting Protease Substrate Cleavage Sites. *PLoS ONE* *7*.
- Splawski, I., Timothy, K.W., Decher, N., Kumar, P., Sachse, F.B., Beggs, A.H., Sanguinetti, M.C., and Keating, M.T. (2005). Severe arrhythmia disorder caused by cardiac L-type calcium channel mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 8089–8096.
- Stevens, V.L. (1995). Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol membrane anchors. *Biochem. J.* *310*, 361–370.
- Sun, P., Ensen, H., Myung, P.S., and Maurer, R.A. (1994). Differential activation of CREB by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinases type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity. *Genes Dev.* *8*, 2527–2539.
- Szpyt, J., Lorenzon, N., Perez, C.F., Norris, E., Allen, P.D., Beam, K.G., and Samsó, M. (2012). Three-Dimensional Localization of the  $\alpha$  and  $\beta$  Subunits and of the II-III Loop in the Skeletal Muscle L-type Ca<sup>2+</sup> Channel. *J. Biol. Chem.* *287*, 43853–43861.
- Tang, L., Gamal El-Din, T.M., Payandeh, J., Martinez, G.Q., Heard, T.M., Scheuer, T., Zheng, N., and Catterall, W.A. (2014). Structural basis for Ca<sup>2+</sup> selectivity of a voltage-gated calcium channel. *Nature* *505*, 56–61.
- Tang, S., Yatan, A., Bahinski, A., Mori, Y., and Schwartz, A. (1993). Molecular localization of regions in the L-type calcium channel critical for dihydropyridine action. *Neuron* *11*, 1013–1021.
- Taylor-Clark, T.E. Role of reactive oxygen species and TRP channels in the cough reflex. *Cell Calcium*.
- Tétreault, M.-P., Bourdin, B., Briot, J., Segura, E., Lesage, S., Fiset, C., and Parent, L. (2016). Identification of glycosylation sites essential for surface expression of the Ca $\nu$ 2 $\delta$  1 subunit and modulation of the cardiac CaV1.2 channel activity. *J. Biol. Chem.*
- Tiede, A., Bastisch, I., Schubert, J., Orlean, P., and Schmidt, R.E. (1999). Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositols in mammals and unicellular microbes. *Biol. Chem.* *380*, 503–523.
- Varma, R., and Mayor, S. (1998). GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature* *394*, 798–801.
- Waard, M.D., Witcher, D.R., Pragnell, M., Liu, H., and Campbell, K.P. (1995). Properties of the -Anchoring Site in Voltage-dependent Ca Channels. *J. Biol. Chem.* *270*, 12056–12064.

Wang, H.-G., Zhu, W., Kanter, R.J., Silva, J.R., Honeywell, C., Gow, R.M., and Pitt, G.S. (2016). A novel NaV1.5 voltage sensor mutation associated with severe atrial and ventricular arrhythmias. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *92*, 52–62.

Wei, X.Y., Perez-Reyes, E., Lacerda, A.E., Schuster, G., Brown, A.M., and Birnbaumer, L. (1991). Heterologous regulation of the cardiac Ca<sup>2+</sup> channel alpha 1 subunit by skeletal muscle beta and gamma subunits. Implications for the structure of cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *J. Biol. Chem.* *266*, 21943–21947.

Welply, J.K., Shenbagamurthi, P., Lennarz, W.J., and Naider, F. (1983). Substrate recognition by oligosaccharyltransferase. Studies on glycosylation of modified Asn-X-Thr/Ser tripeptides. *J. Biol. Chem.* *258*, 11856–11863.

Williams, M.E., Feldman, D.H., McCue, A.F., Brenner, R., Velicelebi, G., Ellis, S.B., and Harpold, M.M. (1992). Structure and functional expression of alpha 1, alpha 2, and beta subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. *Neuron* *8*, 71–84.

Wu, J., Yan, Z., Li, Z., Yan, C., Lu, S., Dong, M., and Yan, N. (2015). Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 complex. *Science* *350*, aad2395.

Wu, J., Yan, Z., Li, Z., Qian, X., Lu, S., Dong, M., Zhou, Q., and Yan, N. (2016). Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 at 3.6 Å resolution. *Nature* *537*, 191–196.

Yifrach, O., and MacKinnon, R. (2002). Energetics of pore opening in a voltage-gated K(+) channel. *Cell* *111*, 231–239.

Yu, S., Guo, Z., Johnson, C., Gu, G., and Wu, Q. (2013). Recent progress in synthetic and biological studies of GPI anchors and GPI-anchored proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* *17*, 1006–1013.

Zühlke, R.D., and Reuter, H. (1998). Ca<sup>2+</sup>-sensitive inactivation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels depends on multiple cytoplasmic amino acid sequences of the  $\alpha$ 1C subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *95*, 3287–3294.