



HAL
open science

Le rôle de Cav β 4 dans la prolifération cellulaire et la régulation génique

Mohamad Rima

► **To cite this version:**

Mohamad Rima. Le rôle de Cav β 4 dans la prolifération cellulaire et la régulation génique. Neurosciences. Université Grenoble Alpes; Université Libanaise, 2016. Français. NNT : 2016GREAV062 . tel-01685369

HAL Id: tel-01685369

<https://theses.hal.science/tel-01685369>

Submitted on 16 Jan 2018

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE LA COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ
GRENOBLE ALPES ET DE L'UNIVERSITÉ LIBANAISE**

**préparée dans le cadre d'une cotutelle entre la
Communauté Université Grenoble Alpes et
*l'Université Libanaise***

Spécialité : **Neurosciences – Neurobiologie**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Mohamad RIMA

Thèse dirigée par Pr. **Michel DE WAARD** et Pr. **Ziad FAJLOUN**

préparée au sein de l'**Institut des Neurosciences de Grenoble**,
l'Institut du Thorax de Nantes et le **Centre Azm pour la Recherche
en Biotechnologies et ses Applications** dans l'**EDCSV** et l'**EDST**

Le rôle de $Ca_v\beta_4$ dans la prolifération cellulaire et la régulation génique

Thèse soutenue publiquement le « **17 octobre 2016** »,
devant le jury composé de :

Pr. Rita NABBOUT-AZZI

PU, Université Libanaise, Président

Pr. Stéphanie BARRERE-LEMAIRE

DR2, Institut de Génétique Fonctionnelle de Montpellier, Rapporteur

Pr. Nassim FARES

PU, Université Saint-joseph, Rapporteur

Pr. Philippe MERLE

PU-PH, Centre de recherche en cancérologie de Lyon, Examineur

Pr. Michel DE WAARD

DR1, Institut du Thorax, Directeur de thèse

Pr. Ziad FAJLOUN

PU, Université Libanaise, Directeur de thèse



Remerciements

En premier lieu, je voudrais remercier l'Association Azm et Saade pour m'avoir accordé une bourse de mobilité doctorale qui m'a permis de réaliser la présente thèse en cotutelle entre l'Université Grenoble Alpes et l'Université Libanaise.

Je tiens à remercier, mes directeurs de thèse, Pr. *Michel De Waard* et Pr. *Ziad Fajloun*, pour la confiance qu'ils m'ont accordée et le soutien qu'ils m'ont offert afin de mener cette thèse à ses bouts. Aussi, je suis profondément reconnaissant à Dr. *Michel Ronjat* pour l'aide morale et scientifique, et pour son esprit convivial et amical.

Je remercie Pr. *Stéphanie Barrère-Lemaire* et Pr. *Nassim Fares*, pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être rapporteurs et de consacrer un moment pour lire ma thèse. Je remercie notamment Pr. *Philippe Merle* et Pr. *Rita Nabbout-Azzi* de m'avoir fait l'honneur de participer au jury.

J'adresse également mes salutations au Pr. *Mohamad Khalil*, directeur du Centre Azm pour la recherche en Biotechnologie et ses Applications, Pr. *Frédéric Saudou*, directeur de l'Institut des Neurosciences de Grenoble et Pr. *Hervé Le Marec*, directeur de l'Institut du Thorax de Nantes qui m'ont donné la chance de montrer mes capacités de recherche dans leurs laboratoires. Je tiens à remercier aussi Pr. *Christelle Breton*, directrice de l'École Doctorale de chimie et Sciences du vivant (Grenoble) et Pr. *Fawaz El Omar*, directeur de l'École Doctorale en Sciences et Technologies (Liban) pour leur soutien.

Je tiens à remercier aussi Pr. *Chantal Gauthier* et Pr. *Flavien Charpentier* pour m'avoir accepté dans leur équipe de recherche, ainsi que Dr. *Juan Brusés* pour les fructueuses collaborations. Aussi, je remercie toute l'équipe du centre medical Reviva : Dr. *Albet Azar*, Dr. *Nehman Makdissy*, Mme. *Diana Chaker* et Mlle. *Jeanne D'arc Al Bacha* pour les collaborations intéressantes.

Je n'oublierai jamais remercier mes collègues du bureau: *Emmanuel* pour son aide et *Marwa* aussi pour son aide et pour les cours d'italien à la paillasse. Merci à vous les deux pour avoir accepté de manger un méga-muffin pour fêter n'importe quoi ou quand le moral nécessitait une dose de chocolat ! Un merci aussi à *Sawssan* pour son amitié et nos petites confidences.

J'adresse aussi mes remerciements à tous les membres de la famille « Institut du thorax » ; en particulier, *Valentine* et *Marine* pour m'avoir accueilli, *Benjamin* pour ses conseils utiles et son soutien moral et *Beatrice* pour sa gentillesse, son sourire et son gâteau.

Xavier, merci pour avoir toujours été là pour les questions de PCR, ainsi que pour supporter mes blablas sur n'importe quel sujet. Un grand merci pour *Salam* et *Zeina*, j'apprécie votre pouvoir magique de m'arracher de mon bureau avant 20h (parfois !). Un grand merci aux gens des autres équipes avec qui j'ai partagé les repas, et les after-lab. Merci à vous tous, grâce vous j'ai vécu une expérience inoubliable à Nantes.

Je ne me passerai pas sans remercier mes ami(e)s qui ont eu la peine de me supporter les moments de stress et de folie: *Riham* (Rihambo), *Zeinab* (Cotutelle), *Samarmar* (La star), *Sawssan* (Souzane) et *Julie* (Jouriyé). Je tiens à remercier aussi tous mes amis Grenoblois et Nantais pour tous les moments inoubliables qu'on a passé ensemble.

Je tiens à remercier particulièrement un ami qui m'a donné un autre sens de l'amitié ! Merci *Imad* (Le beik) pour me remonter le moral quand ça n'allait pas, surtout au moment de la rédaction. Merci aussi pour ton bon sens d'humeur et ton sourire.

Pour terminer, je me permets d'adresser quelques mots à ma famille mais en Libanais et je les traduirai ensuite.

من 3 سنين و تحديدا لما بلشت دكتوراه و أنا عكلان هم هاللحظة ، شو اكتب ؟ شو قول ؟
بأذار 2014، بالصدفة سمعت غنية و حسيت انو كلماتها بينفعو يكونو احلى تحية شكر للأهل بأي مناسبة. بهالغنية في
مطلع بقول:

" تيكبر حدا ... لازم يتعب حدا
و سنة بتسابق سنة ... هيك حكايات الدني "

اليوم ، و كل يوم بحب اشكر هالحدا (مصطفى و علا) اللي تعبوا و ربّوا و ضحّوا و حلموا لحتى كبروا هالحدا اللي عم
يكتب هالسطور و وصلوه لهون !
بقولو الإنسان ما في يختار عيلته، أنا بقول لو كان الخيار إلي، كنت إخرتن هنّ، هنّ اللي سهرو حتى وصلونا لهون. مرقتا
بكتير طلعات و نزلات بس الأهم انو وصلنا. وصلنا لأن النسيان نعمة، اي نعمة، بس كتير أشياء ما بتنتسا مثل هالجملّة: " يا
ابني، نحنا ما عنا لا قصور و لا أراضي نورتنك ياها. كل شي فينا نقدملكن ياه هو هالعلم اللي حيخليكن تحققوا كل شي
بتتمنو ". و بالفعل هالجملّة كنز بحد ذاتها !
اليوم، بهديكن هالنجاح و بحب قلكن : " كل عتمة خلفها هلال ... بيكمل حتى بتشرين "

Depuis 3 ans, et plus précisément dès le début de ma thèse et je m'inquiète pour ce moment ;
Qu'est ce qu'il faut écrire ? Quoi dire ?

En Mars 2014, j'ai écouté une chanson et je me suis rendu compte que ses paroles sont les
meilleurs pour dire Merci aux parents. Ces paroles disent :

« Pour que quelqu'un grandisse ... il faut que quelqu'un souffre
Et les années chassent les années ... ce sont les histoires de la vie »

Aujourd'hui, et chaque jours, je dis Merci à ces personnes (*Moustafa* et *Ola*) qui ont souffert, sacrifié et rêvé. Depuis des années et jusqu'au aujourd'hui ils continuent à rêver et à compter sur nous.

On dit souvent qu'une personne ne peut pas choisir sa famille. Moi je dis que si j'avais le choix, j'aurais choisi la mienne. Ensemble, on a vécu des moments « Ups » et des moments « Down », mais l'important est qu'on est arrivé. On est arrivé parce que l'oubli est une grâce, oui une grâce. Pourtant, beaucoup de choses sont inoubliables comme la phrase: « Mon fils, on n'a pas de châteaux ou des terrains pour vous offrir, tous ce qu'on peut vous assurer c'est votre éducation qui à son tour vous aidera à atteindre vos rêves ». Effectivement, ces mots sont un trésor en soi !

Aujourd'hui, je voudrais dédier ce travail à vous et je vous dis :

« Derrière chaque obscurité existe un croissant ... Qui se complète même en Octobre ! »

Je ne passerai pas sans remercier mes sœurs et mon frère; *Hind*, *Rouba* et *Rami*. Merci et mille Mercis! Pour vos sentiments, votre tendresse et votre amour. Pour terminer, je remercie aussi tout les membres de ma grande famille ; notamment mon *grand-père*, mes *grand-mères*, Merci pour tous l'amour que vous me montrer.

A vous tous, je dis un seul mot, enfin trois; Merci, Thanks, شكراً !

Résumé

Les canaux calciques dépendants du voltage sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires tels que la contraction musculaire, la libération des neurotransmetteurs et la régulation de l'expression génique. Ces canaux sont constitués d'une sous-unité canalaire α_1 , qui permet l'entrée des ions calciques dans le milieu intracellulaire, généralement associée à différentes sous-unités auxiliaires ($\alpha_2\delta$, γ et β) qui régulent les fonctions du canal. La sous-unité auxiliaire β ($Ca_v\beta$) joue un rôle capital dans l'adressage membranaire du canal et dans la régulation de ses propriétés biophysiques. Des études récentes décrivent cette sous-unité comme une protéine multifonctionnelle capable d'accomplir des fonctions indépendantes du canal. Quatre différentes isoformes de $Ca_v\beta$ sont codées par 4 gènes différents et caractérisées par des similarités structurales mais une distribution tissulaire différente. L'isoforme $Ca_v\beta_4$ est principalement exprimée dans le cerveau et le cervelet jouant ainsi un rôle important dans la régulation des courants calciques neuronaux. L'importance des fonctions neuronales de $Ca_v\beta_4$ a été soulignée par le fait que la mutation R482X de $Ca_v\beta_4$ a été associée à une forme d'épilepsie humaine. Cette mutation perturbe la localisation nucléaire de $Ca_v\beta_4$ et met en question ainsi les fonctions nucléaires de la sous-unité qui peuvent être altérées.

Ainsi, l'objectif de mon travail de thèse était d'étudier le rôle de $Ca_v\beta_4$ dans le contrôle de la division cellulaire et d'identifier des nouvelles voies de signalisation dans lesquelles $Ca_v\beta_4$ peut intervenir. Le projet comprend aussi un volet comparatif avec le mutant épileptique ($Ca_v\beta_{1-481}$) de $Ca_v\beta_4$.

Dans ce but, des cellules CHO exprimant de manière stable $Ca_v\beta_4$ ou son mutant épileptique ($Ca_v\beta_{1-481}$) ont été générées et la localisation subcellulaire des deux protéines ainsi que leur implication dans la prolifération et la progression du cycle cellulaire ont été étudiées. Dans ces cellules, $Ca_v\beta_4$ subit une translocation nucléaire et se retrouve préférentiellement dans les nucléoles. Néanmoins, la délétion de 38 acides aminés de l'extrémité C-terminale de $Ca_v\beta_4$, correspondante à la mutation R482X, empêche sa translocation nucléolaire. L'expression de $Ca_v\beta_4$ réduit considérablement la capacité proliférative des cellules. Cette réduction semble être dépendante de la localisation nucléaire, voir nucléolaire de $Ca_v\beta_4$, parce que le mutant $Ca_v\beta_{1-481}$ n'induit aucune inhibition de la prolifération. D'un autre côté, l'expression de chacune de ces protéines entraîne une modification du cycle cellulaire et l'altération de l'expression de certains gènes liés au cycle.

Étant donné que la voie de signalisation Wnt/ β -caténine est connue comme l'une des voies les plus importantes contrôlant la prolifération cellulaire, j'ai étudié l'effet de l'expression de $Ca_v\beta_4$ sur cette voie. J'ai ainsi pu montrer que $Ca_v\beta_4$, mais pas $Ca_v\beta_{1-481}$, réduit considérablement la transcription des gènes cibles de la β -caténine et ralentit la prolifération cellulaire. Cette inhibition est due à une interaction directe entre $Ca_v\beta_4$ et TCF4 qui empêche l'interaction de TCF4 avec la β -caténine et prévient la transcription des gènes cibles. D'un autre part, l'expression de $Ca_v\beta_4$ augmente au cours de la différenciation neuronale. L'ensemble de ces résultats suggèrent que $Ca_v\beta_4$ peut jouer un rôle dans le contrôle de la prolifération au cours du développement, en particulier dans les cellules neuronales.

Mots-clés: CCDV, $Ca_v\beta_4$, prolifération, Wnt, CSM

Abstract

The voltage gated calcium channels are involved in many cellular processes such as muscle contraction, neurotransmitter release and regulation of gene expression. These channels consist of the pore-forming subunit α_1 usually associated with different regulatory subunits: $\alpha_2\delta$, β and γ . The auxiliary subunit β ($\text{Ca}_v\beta$) plays a key role in regulating membrane trafficking of the channel and its biophysical properties. Recent studies describe this subunit as a multifunctional protein that can also perform calcium channel-independent functions such as gene regulation. Four different isoforms of $\text{Ca}_v\beta$ are encoded by 4 different genes and are characterized by structural similarities but different tissue distribution. $\text{Ca}_v\beta_4$ isoform is mainly expressed in the brain and cerebellum, thus, playing an important role in the regulation of neuronal calcium currents. The importance of $\text{Ca}_v\beta_4$ neuronal functions has been highlighted by its R482X mutation that was associated to a form of human epilepsy. This mutation disrupts the nuclear localization of $\text{Ca}_v\beta_4$ and raises the question about their nuclear functions that can be altered.

Thus, the aim of my thesis was to study the role of $\text{Ca}_v\beta_4$ in the control of cell division and to identify new signaling pathways in which $\text{Ca}_v\beta_4$ can intervene. The project also includes a comparative section with the epileptic mutant ($\text{Ca}_v\beta_{1-481}$) of $\text{Ca}_v\beta_4$.

To this end, CHO cells stably expressing $\text{Ca}_v\beta_4$, or its epileptic mutant ($\text{Ca}_v\beta_{1-481}$), were generated and the subcellular localization of the two proteins and their implication in the proliferation and cell cycle progression were studied. In these cells, $\text{Ca}_v\beta_4$ undergoes nuclear translocation and is found preferentially in the nucleoli. However, the deletion of 38 amino acids in the C-terminus domain of $\text{Ca}_v\beta_4$, corresponding to the R482X mutation, prevents its nucleolar translocation. In addition, the expression of $\text{Ca}_v\beta_4$ significantly reduces the proliferative rate of the cells. This reduction seems to be linked to $\text{Ca}_v\beta_4$ nuclear localization because the epileptic mutant is unable to slow down cell proliferation. On the other hand, the expression of each of these proteins is able to deregulate cell cycle progression and to alter the expression of many genes linked to the cycle.

Since the Wnt/ β -catenin pathway is known as one of the most important pathways controlling cell proliferation, I studied the effect of $\text{Ca}_v\beta_4$ expression on this signaling pathway. Indeed, $\text{Ca}_v\beta_4$, but not $\text{Ca}_v\beta_{1-481}$, substantially reduces the transcription of β -catenin-dependant genes and therefore slows down cell proliferation. This inhibition is due to a direct interaction between $\text{Ca}_v\beta_4$ and TCF4 that prevents the interaction of TCF4 with β -catenin, and thereafter negatively regulates the transcription of targeted genes.

On the other hand, the expression of $\text{Ca}_v\beta_4$ increases during neuronal differentiation. These findings suggest that $\text{Ca}_v\beta_4$ can play a role in the control of proliferation during development, particularly in neuronal cells.

Keywords: VGCC, $\text{Ca}_v\beta_4$, proliferation, Wnt, MSC

Liste des Abréviations

[Ca²⁺]_i : Concentration intracellulaire du calcium
a.a. : Acide Aminé
ABP : AID-Binding Pocket
AID : α_1 -Interaction Domain
AKAP150 : A Kinase Anchor Protein
AMPA : α -Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazole Propionic Acid
AR : Acidic region
BARP : VGCC- β -Anchoring and -Regulatory Protein
b-FGF : Basic Fibroblast Growth Factor
BID : β -Interaction Domain
BK_{Ca} : Canaux potassiques de grande conductance activés par le Ca²⁺
BrdU : Bromodésoxyuridine
BSA : Bovine Serum Albumin
BTB/POZ : Broad complex, Tramtrak, Bric à brac/Pox virus and zinc finger
Ca²⁺-CaM : Complexe calcium-calmoduline
CaM : Calmoduline
CaMK : Protéine Kinase Ca²⁺/Calmoduline-dépendante
CBP : CREB Binding Protein
CCAT : Calcium Channel-Associated Transcriptional regulator
CCDL : Canaux Calciques Dépendants d'un Ligand
CCDV : Canaux Calciques Dépendants du Voltage
CHO : Chinese Hamster Ovary
CK1 : Caséine Kinase 1
COS-7 : Fibroblast-like cell line
CRD : Cystein Rich Domain
CREB : cAMP Response Element-Binding protein
CSD : Chromo-Shadow Domain
CSM : Cellules Souches Mésoenchymateuses
CSN : Cellules Souches Neurales
Ct : Cycle threshold
CTD : Domaine C-Terminal de Ca_v α_1
Cy3 : Cyanine3
DAPI : 4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride
DHPR : DiHydroPyridine Receptor
DMEM/F-12 : Dulbecco's modified Eagle medium/Nutrient Mixture F-12
DRE : Downstream Response Elements
DREAM : Downstream Responsive Element Antagonist Modulator
DTT : Dithiothréitol
DVL : Dishevelled
EC : Excitation/Contraction

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF : Epidermal Growth Factor
eGFP : enhanced Green fluorescent protein
ER : Réticulum Endoplasmique
FBS : Sérum de vœu fœtal
FOCUS : Friendship of China and United States
FRAP : Fluorescence Recovery After Photobleaching
Fz : Frizzled
GBS : Groucho Binding Sequence
GDNF : Facteur Neurotrophe Dérivé de la Glie
GK : Guanylate Kinase
GPCR : G Protein-Coupled Receptor
Gro/TLE : Groucho/transducin-like enhancer of split
GSK3 : Glycogène Synthase Kinase 3
HAT : Histone AcetylTransferase
HDAC : Histones Désacétylases
HEK293 : Human Embryonic Kidney cell line
HEPES : 4-(2-HydroxyEthyl)-1-PiperazineEthaneSulfonic acid
HMG : High Mobility Group
HP1 γ : Heterochromatin Protein 1 γ
IgG : Immunoglobulin G
IP3 : Inositol Triphosphate
IP3R : IP3 Receptor
KO : Knock Out
LiCl : Chlorure de lithium
LRP6 : Low-density Lipoprotein Receptor related Protein
MAGUK : Membrane-associated guanylate kinases
MAPK ou Erk : Mitogen-Activated Protein Kinases
MCU : Uniporteur de Calcium Mitochondrial
MEK1 : Mitogen-Activated protein Kinase kinase
MSC : Mesenchymal Stem Cells
NaCl : Chlorure de Sodium
NCLX : Échangeurs mitochondriaux de Na⁺/Ca²⁺
NCX : Échangeur de Na⁺/Ca²⁺
NFAT : Nuclear Factor of Activated T-cells
NFATc1 : Nuclear Factor of Activated T-cells, cytoplasmic 1
NFATc4 : Nuclear Factor of Activated T-cells, cytoplasmic 4
NLC : Neuron-Like Cells
NLK : Nemo-like kinase
NLS : Séquence d'adressage nucléaire
NSP : Neurosphères
NT2N : Neural progenitor cell line
Pax6 : Paired Box 6
PBS : Phosphate-Buffered Saline

PC12 : Pheochromocytoma 12 cell line
PFA : ParaFormAldehyde
PH : Pleckstrin Homology
PKA : Proteine Kinase A
PKC : Proteine Kinase C
P-Loop : Pore-forming loop
PP2A : Phosphatase 2A
PSA : Pénicilline, Streptomycine et Amphotéricine B
PVDF : PolyVinyliDene Fluoride
PZQ : Praziquantel
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
rsk : Ribosomal s6 Kinase
RT-PCR : Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RyR: Récepteurs de la Ryanodine
SERCA : Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase
SH3 : SRC Homology 3
SNP : Single-Nucleotide Polymorphism
SOCE : Store-Operated Ca²⁺ Entry
SPCA : Secretory Pathway Ca²⁺-ATPase
SR : Réticulum Sarcoplasmique
TCF/LEF : T-Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor
TCR : T-Cell Receptor
TNIK : Traf2- and NCK-Interacting Kinase
TRP : Transient Receptor Potential
TR α : Thyroïd Receptor α
tsA201 : Transformed human kidney cell line
VGCC : Voltage-Gated Calcium Channel
VSD : Voltage-Sensing Domain
WRE : Wnt Response Element
ZF : Zinc Finger
 β -NFG : Nerve Growth Factor β

Abréviations des acides aminés

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

Liste des Figures

Figure 1. Représentation schématique des principales voies d'entrée/sortie et de libération/séquestration du Ca^{2+} impliquées dans la régulation de l'homéostasie de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dans les cellules des mammifères et leur protéines associées.

Figure 2. Organisation moléculaire des CCDVs.

Figure 3. Représentation schématique de la topologie transmembranaire prédite de $\text{Ca}_v\alpha_1$.

Figure 4. La structure des sous-unités des CCDVs.

Figure 5. L'activation des facteurs de transcription par des protéines liant le Ca^{2+} .

Figure 6. La régulation des facteurs de transcription par les protéines Ca^{2+} -dependantes qui font partie du complexe de signalisation du canal calcique.

Figure 7. Régulation des facteurs de transcription liant le Ca^{2+} par les CCDVs.

Figure 8. Les fragments des CCDVs ou leurs sous-unités qui agissent comme des facteurs de transcription.

Figure 9. Représentation schématique de $\text{Ca}_v\beta$.

Figure 10. Les différentes formes de l'interaction entre les domaines SH3 et GK de $\text{Ca}_v\beta$.

Figure 11. La structure du canal calcique voltage-dépendant ($\text{Ca}_v1.1$) de lapin à une résolution de 4,2 Å.

Figure 12. Les domaines structuraux et fonctionnels de BARP.

Figure 13. Représentation schématique de la nouvelle voie de signalisation de $\text{Ca}_v\beta_4$ et des étapes défectueuses pour son mutant épileptique β_{1-481} .

Figure 14. Activité transcriptionnelle induite par l'expression de β_4 .

Figure 15. Vue d'ensemble de la signalisation Wnt/ β -caténine.

Figure 16. La régulation du complexe de dégradation de la β -caténine.

Figure 17. Représentation schématique de la β -caténine et ses partenaires.

Figure 18. Représentation schématique de Kaiso.

Figure 19. Représentation schématique de TCF.

Figure 20. Propriétés de différenciation des cellules souches mésenchymateuses.

Figure 21. Schéma illustratif du système rapporteur de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine.

Figure 22. Caractérisation des CSM avant et après la différenciation.

Figure 23. L'expression de β_4 est corrélée à la différenciation neuronale.

Liste des Tableaux

Tableau 1. Les canaux calciques dépendants du voltage et leurs sous-unités α_1 correspondantes.

Tableau 2. Liste de toutes les sous-unités auxiliaires des CCVDs.

Tableau 3. La distribution tissulaire de $Ca_v\beta$.

Tableau 4. Conditions de transfection par la lipofectamine.

Tableau 5. Liste des amorces utilisées pour la PCR.

Tableau 6. Liste des anticorps utilisés pour la caractérisation des CSM.

Table des matières

Remerciments	I
Résumé	IV
Abstract	V
Abréviations	VI
Abréviations des Acides Aminés	IX
Liste des Figures	X
Liste des Tableaux	XI
Partie I. Bibliographie	
Chapitre I. Les canaux calciques et signalisation calcique	4
1. Canaux Calciques	4
2. L'homéostasie du calcium	4
3. Canaux Calciques Dépendant du Voltage	5
a. Généralité et Classification	5
b. Composition	6
4. La régulation de l'expression génique par les CCDVs	10
a. Régulation des facteurs de transcription par les protéines fixant le Ca^{2+} mais non associées au CCDVs	11
b. Régulation des facteurs de transcription par les protéines fixant le Ca^{2+} et associées au CCDVs	14
c. Régulation des facteurs de transcription par le Ca^{2+}	15
d. Régulation directe de la transcription par certains composants des CCDVs	16
5. Les mutations pathologiques des CCDVs altèrent la régulation génique	18
Chapitre II. La Sous-unité β	19
1. Découverte	19
2. Les isoformes de $\text{Ca}_v\beta$ et leur distribution tissulaire	19
3. Structure de $\text{Ca}_v\beta$	22
4. Les protéines partenaires de $\text{Ca}_v\beta$	24
a. $\text{Ca}_v\alpha_1$, le premier partenaire de $\text{Ca}_v\beta$	24
b. $\text{Ca}_v\beta$ et les protéines kinases: une relation complexe	27
c. Interaction de $\text{Ca}_v\beta$ avec des récepteurs membranaires et d'autres canaux ioniques.....	29
d. L'interaction de $\text{Ca}_v\beta$ avec les GTPases	31
e. L'interaction de $\text{Ca}_v\beta$ avec d'autres protéines	33
f. Les fonctions de $\text{Ca}_v\beta$ indépendantes du canal	36
5. Pathologies liées à $\text{Ca}_v\beta$	41
Chapitre III. La voie de signalisation des protéines Wnt	45
1. Généralités	45
2. Wnt et Frizzled	45
3. Signalisation Wnt/ β -caténine canonique	46
a. Mécanisme de la signalisation Wnt/ β -caténine	46
b. La β -caténine	49
c. Kaiso	51
d. Les facteurs de transcription TCF/LEF	52
4. Signalisation Wnt/ β -caténine et le développement cérébral	56
Chapitre IV. Les cellules souches mésenchymateuses	58
1. Généralités	58
2. Les cellules souches mésenchymateuses	58
3. Différenciation des cellules souches mésenchymateuses en cellules souches neurales.	59
4. Les CSM dans la médecine régénérative	60
5. Les limitations de l'application des CSM dans la médecine régénérative	61

Partie II. Objectifs	63
Partie III. Matériel et Méthodes	
1. Modèles cellulaires :	67
a. Lignée CHO :	67
b. Lignée FOCUS :	67
2. Plasmides et transfection :	67
3. Génération des lignées stables CHO :	68
4. Les lignées stables FOCUS :	69
5. Quantification de la prolifération cellulaire :	71
6. Synchronisation des cellules :	72
7. Extraction protéique et fractionnement subcellulaire :	73
8. Immunoprécipitation :	74
9. Electrophorèse et Western-blot :	74
10. Immunocytochimie des cultures cellulaires :	75
11. Analyse du cycle cellulaire :	76
12. Incorporation du BrdU :	77
13. Extraction d'ARN et RT-PCR :	77
14. Test de luciférase et CopGFP :	79
15. Différentiation des cellules souches en cellules neuronales :	80
a. Isolation et culture des CSM :	80
b. Différentiation des CSM en cellules neuronales :	80
c. Caractérisation des CSM par cytométrie en flux :	81
Partie IV. Résultats	
Chapitre I. Les partenaires protéiques de Ca _v β et leurs fonctions associées	83
Chapitre II. Le rôle de Ca _v β dans la prolifération cellulaire	100
Chapitre III. Ca _v β, un régulateur de la voie Wnt/β-caténine	128
Chapitre IV. Expression de Ca _v β ₄ au cours de la différenciation neuronale	149
1- Immunophénotypage des cellules	149
2- L'expression de β ₄ varie en fonction de la différenciation neuronale	151
Partie V. Discussion, perspectives et conclusion	
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	155
CONCLUSION	160
Partie VI. Références	161
Partie VII. Annexes	184

Bibliographie

Chapitre I.

Les canaux calciques et signalisation calcique

1. Canaux Calciques

Le calcium, sous sa forme ionisée Ca^{2+} , est l'un des plus importants seconds messagers de la physiologie cellulaire. Il contrôle de nombreux processus physiologiques tels que la contraction musculaire, la communication neuronale, la division, la différenciation et la migration cellulaire, ainsi que la transcription des gènes (Toth et al. 2016). La régulation rigoureuse de l'homéostasie calcique est donc essentielle au bon fonctionnement cellulaire.

Dans les conditions de repos, la concentration intracellulaire en calcium est de l'ordre de 100 nM, elle augmente fortement suite à un stimulus pour atteindre plusieurs centaines de μM . Ce flux calcique traversant la membrane plasmique provoque des changements dans l'excitabilité cellulaire, un mécanisme qui contrôle la concentration du calcium intracellulaire, et ainsi essentiel pour le fonctionnement des cellules eucaryotes (Buraei & Yang 2010).

2. L'homéostasie du calcium

L'homéostasie de la concentration du calcium intracellulaire $[\text{Ca}^{2+}]_i$ est déterminée par l'activité coordonnée d'une série de canaux calciques, de pompes à calcium, d'échangeurs et de protéines liant le calcium qui contrôlent de nombreuses fonctions cellulaires (Figure 1). Les voies majeures d'entrée du Ca^{2+} dans la cellule comprennent les canaux de la famille des 'transient receptor potential' (TRP), les canaux calciques dépendants du voltage (CCDV), les récepteurs purinergiques (ex. P2X) et les composants de la voie SOCE (pour 'Store-operated Ca^{2+} entry') STIM et ORAI1.

L'activation des récepteurs couplés aux protéines-G (GPCR), localisés au niveau de la membrane cellulaire, conduit à la production d'inositol triphosphate (IP3) et la stimulation subséquente des récepteurs de l'IP3 (IP3R) situés dans la membrane du réticulum endoplasmique (ER), ce qui conduit à la libération du Ca^{2+} stocké dans la lumière du ER. Le Ca^{2+} intracellulaire est séquestré dans les organites intracellulaires par plusieurs voies mettant en jeu une ATPase- Ca^{2+} (SERCA) qui se trouve dans la membrane du réticulum sarco/endoplasmique, une ATPase- Ca^{2+} de la voie sécrétoire (SPCA) et un uniporteur de calcium mitochondrial (MCU). Les récepteurs de la ryanodine « RyR » et les échangeurs

mitochondriaux de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCLX) régulent également la mobilisation du Ca^{2+} dans les organites. Le calcium intracellulaire peut être aussi expulsé hors de la cellule grâce à une ATPase- Ca^{2+} de la membrane plasmique (PMCA) qui avec l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) jouent un rôle dans le rétablissement de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de repos.

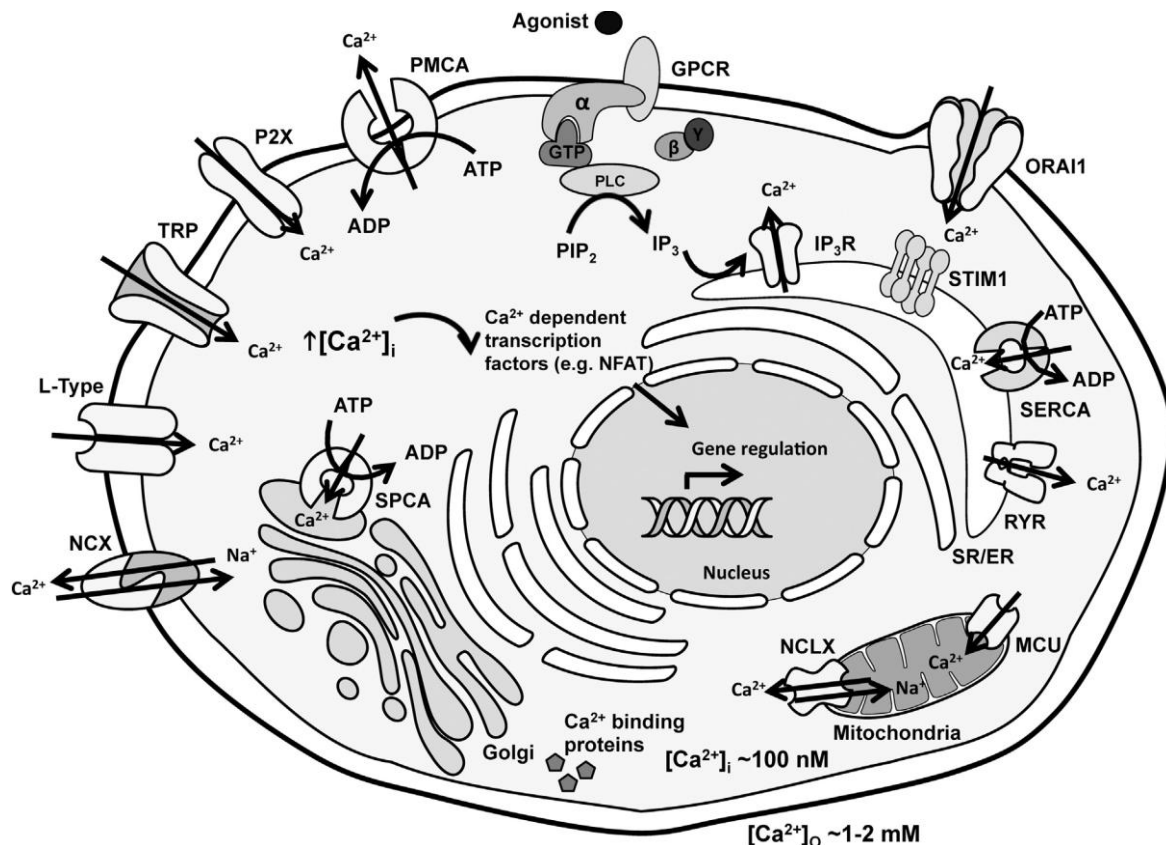


Figure 1. Représentation schématique des principales voies d'entrée/sortie et de libération/séquestration du Ca^{2+} impliquées dans la régulation de l'homéostasie de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dans les cellules des mammifères et leur protéines associées (Stewart et al. 2015).

3. Canaux Calciques Dépendants du Voltage

a. Généralité et Classification

Les canaux calciques dépendants du voltage sont, comme leur nom l'indique, régulés par le potentiel membranaire. Ces canaux sont généralement fermés quand la membrane plasmique est polarisée et leur ouverture se produit lors de la dépolarisation membranaire surtout quand le potentiel membranaire atteint un certain seuil. Ces canaux se trouvent au niveau de la membrane de cellules excitables (cellules musculaires, cellules gliales et neurones), mais également au niveau des cellules insensibles aux signaux électriques comme les lymphocytes.

En se basant sur leur sensibilité à la dépolarisation membranaire, les canaux calciques dépendants du voltage ont été classifiés en 2 familles : les canaux à haut seuil activés par une forte dépolarisation (canaux de type-L, -N, -P/Q, -R) et les canaux à bas seuil activés par de plus faibles dépolarisations (canaux de type-T) (Bean 1985; Miller 1992; Catterall et al. 2005). Les canaux de type-L ont d'abord été décrits comme étant responsables du couplage excitation/contraction dans les muscles squelettiques et cardiaques, tandis que les canaux de type-T ont été impliqués dans l'activité 'pacemaker' cardiaque (De Waard et al. 1995; Scott et al. 1996). Les canaux de type -N, -P/Q et -R ont été mis en évidence dans le système nerveux central et périphérique où ils jouent un rôle dans le contrôle de la libération des neurotransmetteurs (De Waard et al. 1995; Scott et al. 1996).

En plus de cette caractéristique biophysique, les canaux calciques dépendants du voltage diffèrent également dans leur composition en sous-unités (Figure 2). Les canaux à haut seuil comprennent une sous-unité transmembranaire formant le canal nommée α_1 ($\text{Ca}_v\alpha_1$), associée à un dimère $\alpha_2\delta$ ($\text{Ca}_v\alpha_2\delta$), une sous-unité β intracellulaire ($\text{Ca}_v\beta$) et une sous-unité transmembranaire supplémentaire nommée γ ($\text{Ca}_v\gamma$). Les canaux à bas seuil ne sont eux composés que de la sous-unité α_1 (Catterall et al. 2005).

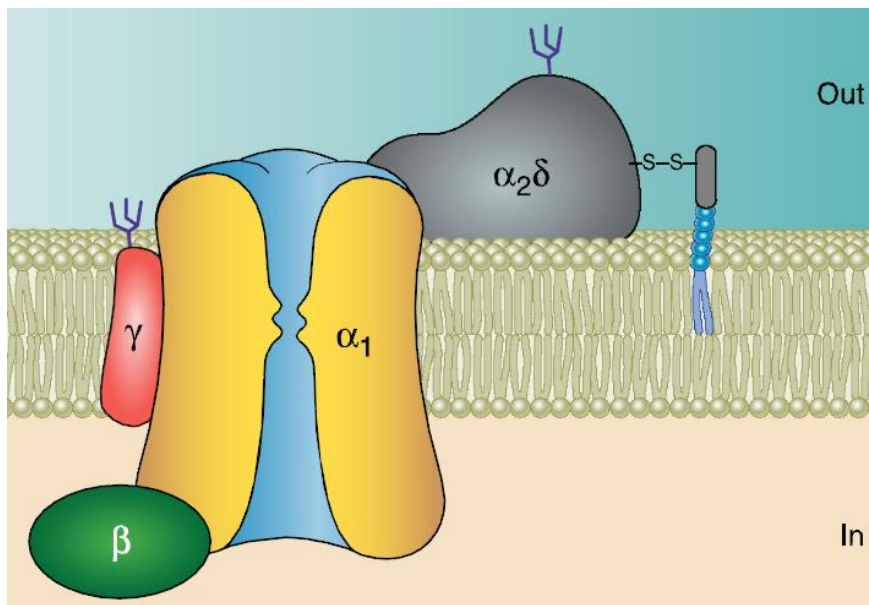


Figure 2. Organisation moléculaire des CCDVs (Buraei & Yang 2010): Composition, en sous-unités, des CCDVs activés à haut voltage

b. Composition

i. Sous-unité α_1

La sous-unité $\text{Ca}_v\alpha_1$ constitue le pore ionique ainsi que le senseur du voltage, qui transforme la dépolarisation en un influx calcique. Cette sous-unité est donc la principale parmi les différentes sous-unités des CCDVs. C'est une protéine de 190-250 kDa formée par 4 domaines homologues (I, II, III et IV), liées par des boucles cytoplasmiques (Figure 3). Chaque domaine contient six segments transmembranaires (S1-S6) qui composent deux domaines structuraux distincts, le domaine de détection du potentiel ('VSD' pour 'voltage-sensing domain') et le domaine formant le pore. Le premier domaine est formé par les quatre premiers segments (S1-S4) alors que le 2^{ème} comprend les segments S5 et S6 reliés par une boucle ('P-Loop' pour 'pore-forming loop') qui rentre dans la membrane formant ainsi le pore. Ces 4 boucles forment un filtre ionique sélectif où 4 acides aminés négatifs fortement conservés (glutamate ou aspartate), provenant chacun d'une boucle déterminent la sélectivité et la perméabilité au Ca^{2+} (Kim et al. 1993; Kuo & Hess 1993; Sather & McCleskey 2003).

De cette manière $\text{Ca}_v\alpha_1$ est considérée comme la sous-unité clé responsable des différents aspects pharmacologiques et biophysiques du canal tel que l'ouverture du pore, la sélectivité et le flux du calcium (Buraei & Yang 2010).

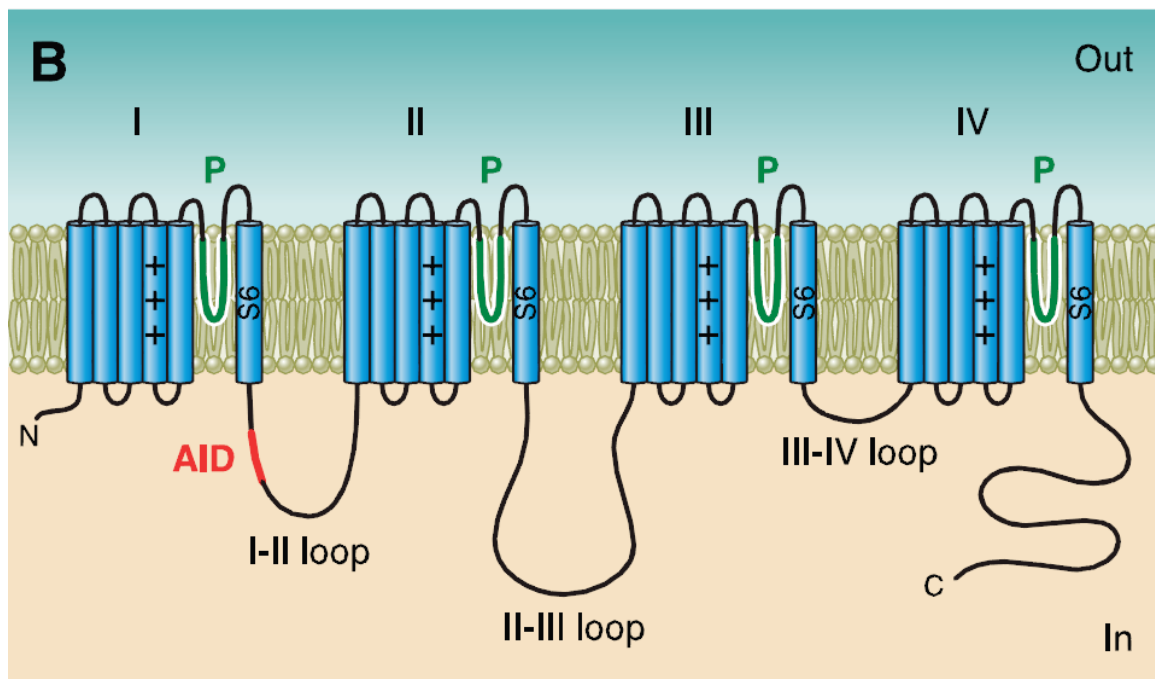


Figure 3. Représentation schématique de la topologie transmembranaire prédite de $\text{Ca}_v\alpha_1$ (Buraei & Yang 2010).

Il faut noter que la nomenclature du canal est basée sur la nature de la sous-unité α_1 qui le forme (Tableau 1). Chez les mammifères, cette sous-unité est codée par 10 gènes distincts. En se basant sur la similitude dans la séquence d'acides aminés, trois grandes familles de

sous-unités $Ca_v\alpha_1$ (Ca_v1 , Ca_v2 et Ca_v3), chacune contenant plusieurs membres, ont été définies. La famille Ca_v1 , correspondante aux canaux de type-L, est constituée de quatre membres nommés $Ca_v1.1$, $Ca_v1.2$, $Ca_v1.3$ et $Ca_v1.4$. Les trois membres de la famille Ca_v2 ($Ca_v2.1$, $Ca_v2.2$ et $Ca_v2.3$) correspondent aux canaux de type -P/Q, -N et -R respectivement. Les trois types de canaux Ca_v3 ($Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ et $Ca_v3.3$) correspondent aux canaux de type-T (Catterall et al. 2005; Catterall 2011). A cette sous-unité s'associent, sauf pour les canaux de type-T, les sous-unités auxiliaires β , $\alpha_2\delta$ et γ qui contrôlent l'assemblage, le ciblage et l'ancrage des canaux à la membrane cytoplasmique. Ces sous-unités auxiliaires modulent les paramètres biophysiques des CCDVs.

Tableau 1. Les canaux calciques dépendants du voltage et leurs sous-unités α_1 correspondantes.

Famille	Classification biophysique	Sous-unité α_1	Gènes
Ca_v1	L-type	$Ca_v1.1$	<i>CACNAIS</i>
		$Ca_v1.2$	<i>CACNAIC</i>
		$Ca_v1.3$	<i>CACNAID</i>
		$Ca_v1.4$	<i>CACNAIF</i>
Ca_v2	P/Q-type	$Ca_v2.1$	<i>CACNAIA</i>
	N-type	$Ca_v2.2$	<i>CACNAIB</i>
	R-type	$Ca_v2.3$	<i>CACNAIE</i>
Ca_v3	T-Type	$Ca_v3.1$	<i>CACNAIE</i>
		$Ca_v3.2$	<i>CACNAIG</i>
		$Ca_v3.3$	<i>CACNAIH</i>

ii. Sous-unité β

Les CCDVs de type -L, -P/Q, -N et -R contiennent aussi une sous-unité cytoplasmique, la sous-unité β . Cette sous-unité joue un rôle majeur dans la régulation du canal calcique et son adressage membranaire. Durant ma thèse, je me suis particulièrement intéressé à cette sous-unité qui sera décrite de façon plus détaillée dans le chapitre II.

iii. Sous-unité $\alpha_2\delta$

A ce jour là, quatre isoformes de cette sous-unité ont été identifiées (Tableau 2), correspondants à l'expression de quatre gènes différents et possédant plusieurs variants d'épissage. C'est une glycoprotéine membranaire formée par deux peptides (α_2 et δ), possédant une grande partie extracelulaire attachée à la membrane par le peptide δ . Ces deux peptides résultant du clivage d'un peptide correspondant à un ARNm unique, sont liés par un

pont disulfure (Klugbauer et al. 1999; Qin et al. 2002). Le peptide δ est relié à la membrane plasmique par un linker (glycosylphosphatidylinositol) et maintient le peptide α_2 extracellulaire en place (Figure 4) (Davies et al. 2010) permettant son interaction avec la sous-unité α_1 (Gurnett et al. 1997). La région correspondante sur α_1 qui interagit avec $\alpha_2\delta$ se trouve dans le 3^{ème} domaine. Concernant leurs fonctions, ces sous-unités peuvent modifier les propriétés biophysiques du canal, mais leur rôle principal est d'accroître les courants en favorisant l'adressage des sous-unités α_1 vers la membrane plasmique et/ou de les maintenir à ce niveau (Buraei & Yang 2010).

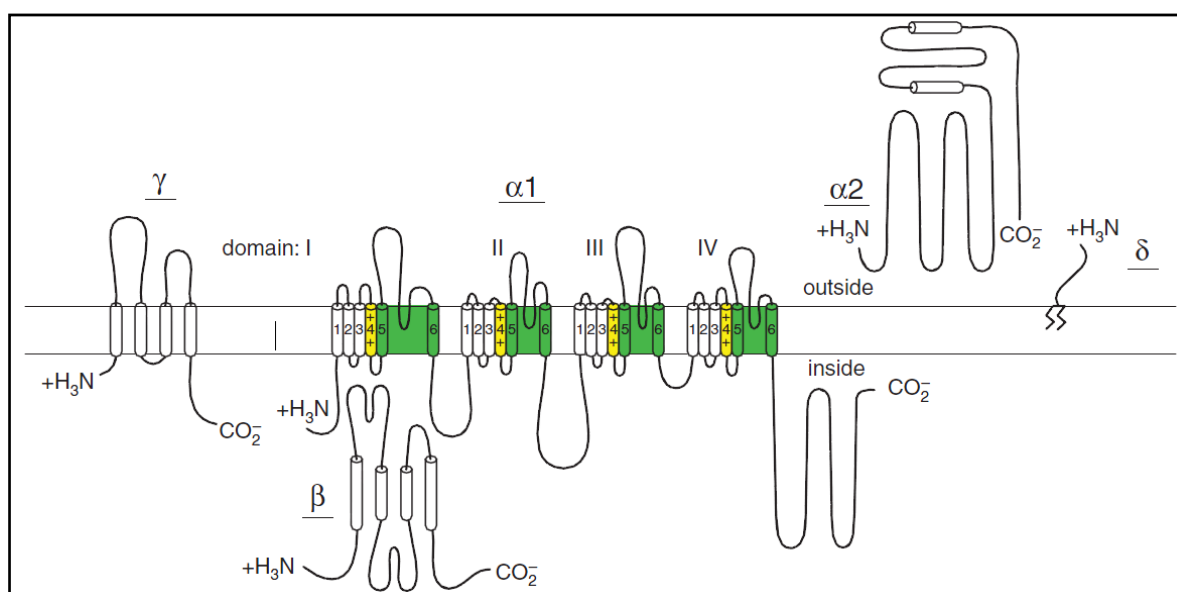


Figure 4. La structure des sous-unités des CCDVs (Catterall 2011). Les hélices α prédites sont représentées sous forme de cylindres; les longueurs des lignes corèlent approximativement aux longueurs des segments polypeptidiques et la ligne en zigzag sur la sous-unité δ illustre le motif d'ancrage de glycosylphosphatidylinositol.

iv. Sous-unité γ

Huit différents gènes codent les différentes isoformes de la sous-unité γ (Tableau 2). Cette dernière est formée de 4 segments transmembranaires et d'extrémités N- et C- terminales intracellulaires (Figure 4) (Buraei & Yang 2010).

Le domaine d'interaction de la sous-unité γ avec $Ca_v\alpha_1$ a été localisé sur la première moitié N-terminale de la protéine (Arikkath & Campbell 2003). Trois fonctions cellulaires différentes ont été proposées pour les membres de la famille des sous-unités γ : a) régulation de l'expression et des fonctions des CCDVs; b) régulation de l'adressage, de la localisation et des propriétés biophysiques des récepteurs AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole

propionic acid) et plus récemment; c) la régulation de l'agrégation cellulaire (Chen et al. 2007).

Parmi les huit sous-unités γ , γ_1 et γ_6 ont les effets les plus prononcés sur la densité du courant calcique porté pas la sous-unité α_1 (Arikkath et al. 2003; Hansen et al. 2004). γ_2 , γ_3 , γ_4 , γ_8 et probablement γ_7 agissent comme des protéines régulatrices du récepteur transmembranaire AMPA (Kato et al. 2007). Plus récemment, γ_2 a été impliquée dans les processus d'interactions intercellulaires. En effet, l'expression de cette sous-unité entraîne l'aggrégation des fibroblastes murins qui ne peuvent normalement pas former d'agrégats cellulaires (Price et al. 2005).

Tableau 2. Liste de toutes les sous-unités auxiliaires des CCDVs

Sous-unités auxiliaires	Iso formes
β	$\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4$
$\alpha_2\delta$	$\alpha_2\delta_1, \alpha_2\delta_2, \alpha_2\delta_3, \alpha_2\delta_4$
γ	$\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3, \gamma_4, \gamma_5, \gamma_6, \gamma_7, \gamma_8$

4. La régulation de l'expression génique par les CCDVs

L'idée suggérant l'implication des CCDVs dans la régulation génique n'est pas récente, elle remonte à une trentaine d'années. En effet, la première preuve provient de deux études simultanées publiées en 1986 (Greenberg et al. 1986; Morgan & Curran 1986).

La première étude montre que la dépolarisation chronique de cellules PC12 induit une augmentation du niveau d'expression du pro-oncogène *c-fos*. Le lien entre cet effet et les CCDVs a été établi par l'abolition de cet effet suite à l'utilisation d'un inhibiteur du canal de type-L « la nisoldipine », ainsi qu'en antagonisant la calmoduline par la trifluoropérazine ou la chlorpromazine. Il a été donc conclu que l'élévation de la $[Ca^{2+}]_i$ médiée par les CCDVs de type-L active l'expression de *c-fos* dépendante de la calmoduline (Morgan & Curran 1986). La deuxième étude montre que, dans les cellules PC12, l'expression de *c-fos* induite par l'activation des récepteurs nicotiques également résulte de l'activation des canaux de type-L, parce que cet effet est bloqué par le vérapamil, un autre inhibiteur des canaux de type-L (Greenberg et al. 1986).

A partir de ces études fondatrices, les canaux calciques voltage-dépendants ont été montrés comme étant impliqués dans le contrôle de l'expression de différents gènes.

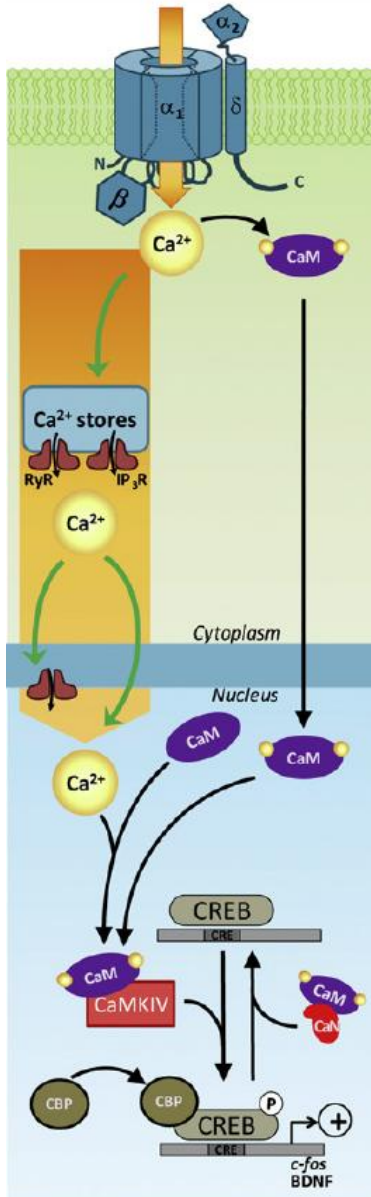


Figure 5. L'activation des facteurs de transcription par des protéines liant le Ca²⁺ (Barbado et al. 2009).

a. Régulation des facteurs de transcription par les protéines fixant le Ca²⁺ mais non associées au CCDVs

i. CCDVs de type-L

La calmoduline « CaM » est une protéine ubiquitaire capable de se lier aux ions Ca²⁺ présents dans le milieu intracellulaire. Cette liaison induit un changement conformationnel de la protéine formant ainsi un complexe calcium-calmoduline (CaM-Ca²⁺) qui permet l'activation de nombreuses protéines y compris la protéine kinase Ca²⁺/calmoduline-dépendante (CaMK). Cette kinase est impliquée dans la phosphorylation des facteurs de transcription et, par conséquent, dans la régulation de l'expression des gènes. De ce fait, il n'était pas surprenant que l'entrée du Ca²⁺ *via* les canaux calciques de type-L induise l'activation de la CaMK dans les neurones hippocampiques (Bading et al. 1993) et que ce processus soit lié à l'activation du promoteur de *c-fos*. En effet CaMKI, CaMKII et CaMKIV partagent la capacité de phosphoryler le facteur de transcription CREB au niveau de la Ser¹³³ (Chawla et al. 1998; Yokokura et al. 1997). Bien que la phosphorylation de CREB soit généralement considérée comme un événement favorisant son activation, la situation est apparemment plus complexe car CREB peut être également phosphorylé au niveau de la Ser¹⁴² par la CaMKII conduisant à son inhibition (Sun et al. 1994). La CaMKIV est considérée comme l'enzyme

la plus efficace de stimulation de la voie CREB car elle permet

le recrutement de la protéine de liaison à CREB ('CBP' pour 'CREB Binding Protein') au niveau de CREB (Figure 5) (Bito et al. 1996). Ces différentes données ont soulevé la question sur les mécanismes d'activation de la CaMK nucléaire par le Ca²⁺ entrant *via* les canaux de type-L.

Premièrement, l'accumulation nucléaire du complexe CaM-Ca²⁺ a été décrite comme cruciale pour l'activation des CaMKs. En effet, il a été suggéré que le Ca²⁺, entrant dans la cellule par les canaux de type-L, active la calmoduline qui se lie aux Ca²⁺ pour former le

complexe CaM-Ca²⁺ qui s'accumule dans le noyau (Deisseroth et al. 1998; Mermelstein et al. 2001). Dans les neurones pyramidaux hippocampiques, la CaM nucléaire est détectée dans 15 secondes après la stimulation et précède la phosphorylation de CREB. L'élévation de la CaM nucléaire induite par la dépolarisation a également été observée dans les cellules granulaires du cervelet, les neurones du néocortex et les cellules granulaires du gyrus denté. Cette translocation nucléaire n'est pas bloquée par la rupture des filaments d'actine ou des microtubules ni par le vidage des stocks intracellulaires de Ca²⁺ par la thapsigargine. Par contre, la translocation nucléaire de CaM-Ca²⁺ est inhibée par la fusion de la CaM à un peptide de liaison (M13) qui prévient le complexe CaM-Ca²⁺ de former des interactions dépendantes du Ca²⁺. Ceci suggère que la translocation nucléaire de CaM-Ca²⁺ exige une ou plusieurs protéines endogènes pour la stabilisation du complexe ainsi que pour son transport nucléaire (Mermelstein et al. 2001).

D'autre part, il a été montré que la voie de signalisation CREB, sous entendu l'activation de la CaMK, peut être activée par le calcium nucléaire seul et ne nécessite pas l'import des protéines cytoplasmiques dans le noyau (Hardingham et al. 2001). Cette étude montre que l'activation de la voie de signalisation CREB, induite par la stimulation des canaux de type-L, est maintenue après le blocage de l'import nucléaire par l'agglutinine du germe de blé. Dans ce cas, l'activation de la voie est exclusivement liée à l'augmentation de la concentration nucléaire de Ca²⁺ parce que le vidage des stocks intracellulaires de Ca²⁺ par l'acide cyclopiazonique ou la thapsigargine empêche l'activation de la voie CREB. Cette étude soutient les résultats précédents démontrant que l'injection d'un chélateur de Ca²⁺ adressé spécifiquement au noyau (BAPTA-D70), inhibe complètement l'activation de la voie CREB induite par l'activation des canaux de type-L (Hardingham et al. 1997; Chawla et al. 1998).

D'autres études montrent aussi un rôle important des phosphatases Ca²⁺-dépendantes dans la régulation de la voie CREB. La calcineurine est une phosphatase sérine/thréonine dépendante du calcium qui sert comme un modulateur et influence la déphosphorylation de CREB. En 1996, Liu et Graybiel ont montré que l'inhibition de la calcineurine par le FK506 dans des coupes striatales de nouveau-nés de rats peut maintenir la phosphorylation de CREB induite par l'activation des CCDVs de type-L (Liu & Graybiel 1996). Des études plus récentes ont contredit ces observations en suggérant que la calcineurine peut jouer un rôle positif dans l'expression des gènes sous la dépendance de CREB. De ce fait, l'inhibition de la calcineurine dans les cellules non-neuronales, comme les cellules chromaffines, bloque

l'expression du gène codant pour la proenkephaline qui est sous la dépendance de la voie CREB (Hahm et al. 2003). Également, dans les neurones corticaux de souris, l'inhibition de la calcineurine bloque l'expression des gènes dépendants de la voie CREB induite par la dépolarisation. Il est nécessaire de noter que cette inhibition n'influence pas le flux calcique induit par la dépolarisation ni la phosphorylation de CREB au niveau de la Ser¹³³ (Kingsbury et al. 2007). Ces résultats contradictoires mettent en premier plan la complexité des rôles joués par la calcineurine dans la régulation de la transcription dépendante de CREB.

Bien que l'implication des canaux de type-L dans le contrôle de la transcription soit la mieux caractérisée, certaines études suggèrent également l'implication des autres types de CCDVs dans le couplage excitation-transcription.

ii. CCDVs de type-N

Plusieurs travaux ont mis en évidence l'implication du flux calcique *via* les CCDVs de type-N dans la régulation de la transcription. Dans les neurones des ganglions sympathiques, cette régulation met en jeu le facteur de transcription NFATc1 (Hernández-Ochoa et al. 2007). En effet, l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire entraîne l'activation de la calcineurine, cette dernière déphosphoryle la partie N-terminale de NFATc qui correspond à la sous-unité du complexe de transcription NFAT. Ces modifications permettent la translocation nucléaire rapide de NFATc et la régulation de la transcription de différents gènes (Crabtree & Schreiber 2009). Il est important de noter que cette activation de NFATc1 repose uniquement sur l'activation des canaux calciques de type-N parce que cette voie d'activation est bloquée par la ω -conotoxine GVIA, un inhibiteur spécifique de ces canaux (Hernández-Ochoa et al. 2007).

En 2007, Zhao et al. ont montré que, suite à la dépolarisation des neurones des ganglions cervicaux supérieurs, la phosphorylation de CREB et l'augmentation en ARNm et en protéines de *c-fos* dépendent des CCDVs de type-N à des faibles fréquences de stimulation; par contre, à haute fréquence de stimulation la régulation de CREB engage exclusivement les CCDVs de type-L (Zhao et al. 2007). Dans le même contexte, il a été mis en évidence que l'activation spécifique des CCVD de type-N des neurones sensoriels primaires dissociés produit une augmentation de l'expression en ARNm et en protéines de la tyrosine hydroxylase (Brosenitsch & Katz 2001).

iii. CCDVs de type-P/Q

Les canaux calciques de type-P/Q ont également été impliqués dans une voie importante de régulation des gènes. En effet, le blocage de ces canaux dans les cellules granulaires du cervelet par la ω -agatoxine IVA entraîne l'inhibition de l'expression de l'ARNm de la syntaxine-1A, une protéine nécessaire pour la libération des neurotransmetteurs. Étant donné que les bloqueurs des canaux de type-N et -L n'inhibent pas l'expression de la syntaxine-1A, l'effet est donc spécifique aux canaux de type-P/Q. En outre, cet effet nécessite les réserves intracellulaires intactes de Ca^{2+} ainsi que les voies fonctionnelles des kinases : CaMKII et IV, PKA et MAPK (Sutton et al. 1999).

b. Régulation des facteurs de transcription par les protéines fixant le Ca^{2+} et associées au CCDVs

Cette voie implique également une modification des facteurs de transcription par des phosphatases ou des kinases activées par le Ca^{2+} mais elle diffère de la précédente par l'engagement de protéines qui peuvent directement interagir avec les CCDVs. En effet, il a été montré que l'activation des canaux de type-L dans les neurones corticaux induit la phosphorylation de la protéine CREB au niveau de la Ser¹³³ par la voie de signalisation MAPK (Dolmetsch et al. 2001). Cet effet est spécifique aux canaux de type-L puisque l'activation de CREB induite par la dépolarisation est insensible aux bloqueurs d'autres types de canaux calciques (-N et -P/Q). Dans ce cas, l'activation par le Ca^{2+} de la CaM liée au motif isoleucine-glutamine (domaine IQ) de l'extrémité C-terminal de $\text{Ca}_v1.2$ entraîne l'activation de la voie MAPK (Figure 6). Une mutation du domaine IQ empêchant la liaison de la CaM sur $\text{Ca}_v1.2$ sans affecter le courant calcique inhibe l'activation des gènes induite par la dépolarisation et dépendante de CREB. Ceci indique que le complexe CaM- Ca^{2+} non lié au canal est incapable d'induire la phosphorylation de CREB. Également, la MAPK/Erk peut phosphoryler la RSK (ribosomal s6 kinase) qui subit une translocation nucléaire et phosphoryle CREB (West et al. 2002). L'activation de la voie MAPK/Erk implique l'activation de Ras, une petite protéine G, suivie de la phosphorylation de MEK1 (Mitogen-activated protein kinase) par la MEK kinase. À son tour, MEK1 activée phosphoryle et active MAPK/Erk qui migre dans le noyau où elle phosphoryle CREB (Rosen et al. 1994). L'idée générale étant que CREB est déjà liée à ses régions spécifiques dans le promoteur des gènes régulés par CREB et que sa phosphorylation sur la Ser¹³³ par la MAPK favorise le recrutement de la CBP. L'implication de la CBP dans l'acétylation des histones et le

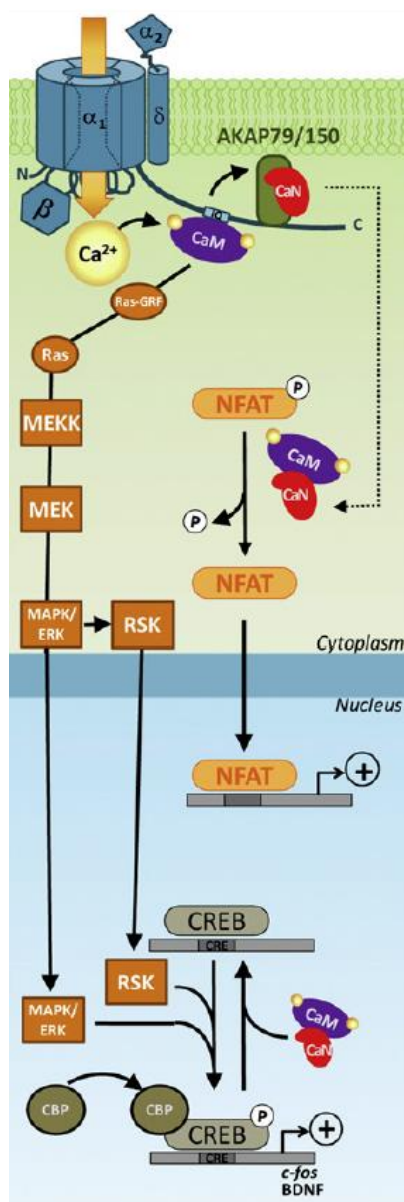


Figure 6. La régulation des facteurs de transcription par les protéines Ca^{2+} -dépendantes qui font partie du complexe de signalisation du canal calcique (Barbado et al. 2009).

recrutement ultérieur de la machinerie de transcription permet le remodelage de la chromatine et la transcription.

La voie de signalisation NFAT représente également un exemple intéressant de transcription initiée par la dépolarisation neuronale (Graef et al. 1999). Ce processus est lié aux canaux de types-L parce que leur inhibition empêche la transcription de gènes contrôlés par NFAT. Le mécanisme nécessite l'action de la calcineurine qui permet la déphosphorylation de NFATc4 et sa translocation nucléaire (Figure 6) (Beals et al. 1997).

En 2007, Oliveria et al. ont montré que l'ancrage de la calcineurine à $\text{Ca}_v1.2$ via la PKA AKAP79/150 est nécessaire à l'activation de la voie de régulation génique dépendante de la NFATc4 (Oliveria et al. 2007). En effet, l'inhibition de l'expression d'AKAP150 à l'aide d'ARNi entraîne l'inhibition de la translocation nucléaire de NFATc4, ce qui suggère que l'absence d'AKAP150 empêche la déphosphorylation de NFATc4 dépendante de la calcineurine.

Ces exemples montrent encore une fois l'implication des CCDVs et des protéines liant le calcium, qui leurs sont associées, dans diverses voies de régulation géniques.

c. Régulation des facteurs de transcription par le Ca^{2+}

Dans les études décrites ci-dessus, les facteurs de transcription étaient sous le contrôle des protéines liant le Ca^{2+} , tels que la CaM. Cependant, certains facteurs de transcription peuvent lier directement le Ca^{2+} ce qui met en évidence un lien direct entre le Ca^{2+} intracellulaire et la régulation de la transcription. Ce modèle de régulation est parfaitement illustré par le répresseur transcriptionnel DREAM (Downstream Responsive Element Antagonist Modulator). C'est une protéine de 29 kDa qui possède quatre motifs structuraux « EF hand ». Ce motif constitué de deux hélices α liées par une boucle formée d'une douzaine d'acides aminés a été caractérisé comme un site de fixation du Ca^{2+}

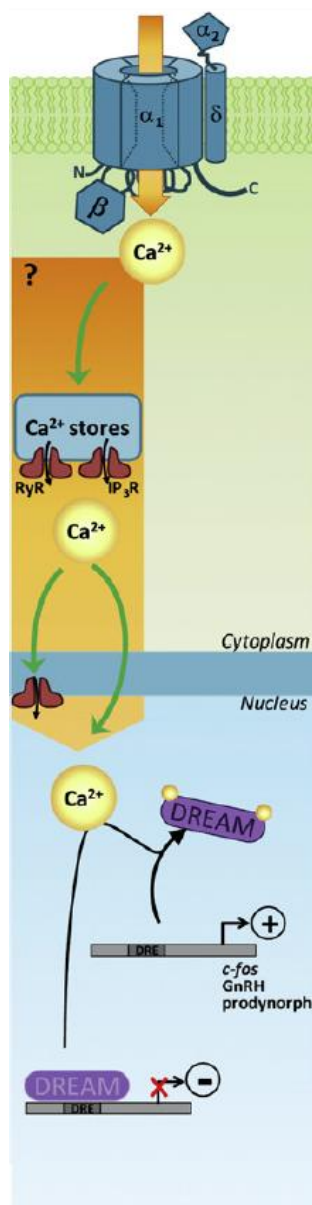


Figure 7. Régulation des facteurs de transcription liant le Ca^{2+} par les CCDVs (Barbado et al. 2009).

(Carrión et al. 1999; Carrión et al. 1998). La liaison du Ca^{2+} à DREAM permet sa dissociation de DRE (Downstream Response Elements) en favorisant son passage d'un état tétramérique à un état dimérique (Lusin et al. 2008). Dans ce cas de figure, le Ca^{2+} joue un rôle activateur de la transcription au niveau des promoteurs contenant un DRE. Parmi les gènes régulés par DRE on peut citer *c-fos* et *GnRH* qui code pour l'hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires (GnRH) (Carrión et al. 1999; Leclerc & Boockfor 2007). Dans des neurones immortalisés, l'utilisation de la nimodipine, un bloqueur des canaux de type-L, ou la neutralisation de DREAM à l'aide d'un anticorps spécifique empêche l'expression et la libération de GnRH. Ces observations établissent un lien direct entre l'entrée du calcium à travers les CCDVs de type-L et l'activation de DREAM (Leclerc & Boockfor 2007).

d. Régulation directe de la transcription par certains composants des CCDVs

Après une série d'études démontrant l'implication indirecte des CCDVs dans la régulation de la transcription, un nouveau concept commence à émerger décrivant les sous-unités des CCDVs comme régulateurs directs de la transcription. La première preuve d'une telle implication des domaines des canaux calciques dans la transcription a été apportée par Hibino et al. (Hibino et al. 2003). Dans cette étude, les auteurs ont mis en évidence un variant d'épissage particulier de β_4 , appelé β_{4c} , et montré que ce variant interagit avec HP1 γ (Heterochromatin Protein 1 γ), une protéine nucléaire impliquée dans la régulation génique et diminue son activité inhibitrice de la transcription. Le mécanisme de cette régulation sera détaillé ultérieurement (Chapitre II. Paragraphe 4.f).

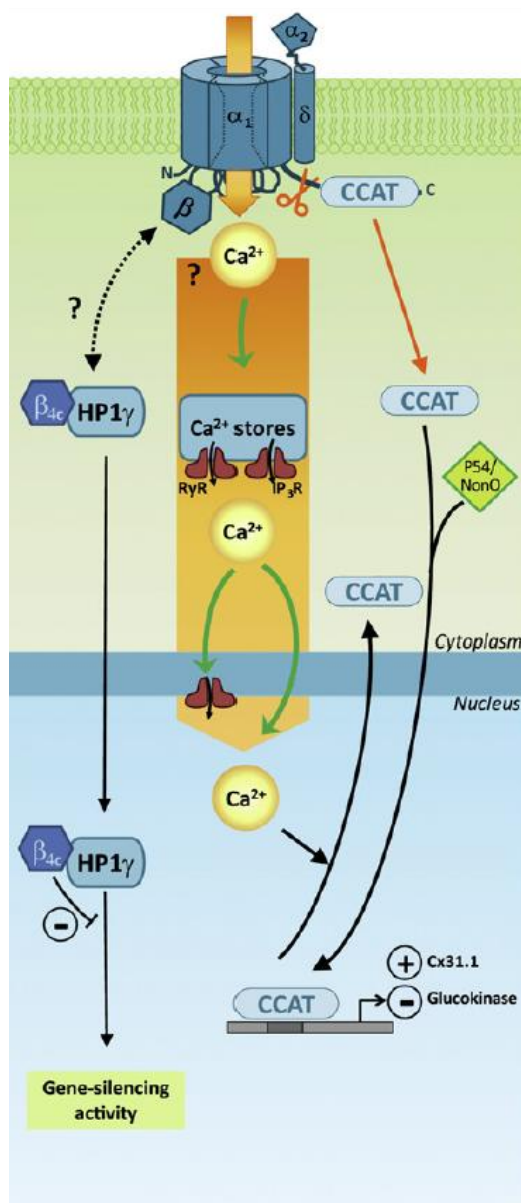


Figure 8. Les fragments des CCDVs ou leurs sous-unités qui agissent comme des facteurs de transcription (Barbado et al. 2009).

Un fragment de 60-75 kDa de la partie C-terminale de $Ca_v2.1$ a été aussi détecté dans le noyau des cellules de Purkinje du cervelet de souris et d'humains (Kordasiewicz et al. 2006).

Par la suite, d'autres études ont mis en évidence une translocation nucléaire de la sous-unité β des CCDVs et son interaction avec des protéines nucléaires et des facteurs de transcriptions. Ces études seront décrites de façon détaillées dans le paragraphe 4.f du chapitre II.

Plus récemment, un fragment protéolytique de l'extrémité C-terminale de $Ca_v1.2$ a été décrit comme un facteur de transcription (Gomez-Ospina et al. 2006). Ce fragment de 75 kDa, nommé « CCAT » (calcium channel-associated transcriptional regulator), a été détecté dans les noyaux des neurones au cours du développement et persiste aussi dans les neurones adultes. Il contient un domaine de rétention nucléaire, mais aucun signal de localisation nucléaire. Au cours de son trajet vers le noyau, ce fragment s'associe à une protéine nucléaire p54(nrb)/NonO qui intervient dans la régulation de la transcription (Shav-Tal & Zipori 2002). Ainsi, l'expression de plusieurs gènes est modifiée suite à la translocation nucléaire de CCAT. Parmi ces gènes, le gène codant pour la connexine Cx31.1, une protéine des jonctions communicantes « gap » qui joue un rôle essentiel dans l'extension des neurites, est régulée positivement en présence de CCAT. Il est important de noter que l'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} , résultant de l'ouverture des canaux calciques de type-L, déclenche l'exportation de CCAT à partir du noyau (Gomez-Ospina et al. 2006).

5. Les mutations pathologiques des CCDVs altèrent la régulation génique

Des mutations des gènes codant pour différentes sous-unités des CCDVs ont été associées à différentes pathologies (Pietrobon 2002; Kim 2014). Jusqu'à récemment, l'étude des pathologies liées aux canaux calciques a principalement porté sur les conséquences des mutations sur les propriétés biophysiques de ces canaux ainsi que sur leur adressage à la membrane plasmique. Compte tenu de l'implication directe de domaines ou sous-unité des CCDVs dans la régulation de l'expression des gènes, il devient aujourd'hui important d'étudier le lien entre les mutations touchant ces canaux et des défauts de transcription de certains gènes comme facteur important des pathologies associées à ces mutations. Ainsi, certaines études montrent que les pathologies associées aux mutations des CCDVs peuvent résulter de la modification de l'expression de certains gènes. Dans ce contexte, la mutation du gène codant pour la sous-unité $Ca_v2.1$ des canaux calciques de type-P/Q aboutit à un phénotype ataxique sévère. Dans ce modèle de souris, il a été remarqué que les niveaux d'ARNm et l'expression protéique des récepteurs de la ryanodine de type 1 et 3 sont altérés dans le cervelet (Sawada et al. 2008). Les taux d'ARNm du RyR de type 1 sont également modifiés chez les souris qui portent un autre type de mutation de $Ca_v2.1$ (Cicale et al. 2002). Le mécanisme cellulaire liant les mutations des CCDVs et l'expression de RyR n'est aujourd'hui pas connu. En considérant le rôle des CCDVs dans la régulation des gènes, des altérations transcriptomiques sont susceptibles d'être à la base d'une liste croissante des « channelopathies ».

Chapitre II.

La Sous-unité β

Parmi toutes les sous-unités auxiliaires, la sous-unité β ($\text{Ca}_v\beta$) a été décrite comme cruciale pour contrôler l'adressage de $\text{Ca}_v\alpha_1$ à la membrane plasmique ainsi que réguler ses propriétés biophysiques (De Waard & Campbell 1995; Walker & De Waard 1998). Cependant, un nombre croissant de protéines impliquées dans divers voies de signalisation cellulaire sont capables d'interagir avec $\text{Ca}_v\beta$, classant cette sous-unité comme une protéine multifonctionnelle. En débutant par un aperçu sur $\text{Ca}_v\beta$, ce chapitre résumera les différentes protéines partenaires de $\text{Ca}_v\beta$ et les fonctions cellulaires dans lesquelles ces complexes « $\text{Ca}_v\beta$ -protéine » sont impliqués.

1. Découverte

Les travaux sur la sous-unité $\text{Ca}_v\beta$ remontent à une étude décrivant la purification et l'identification, dans le muscle squelettique, des constituants du récepteur de la dihydropyridine ('DHPR' pour 'dihydropyridine receptor') qui est une molécule organique dont les dérivés constituent une classe de médicaments antagonistes du calcium. Durant cette étude, 3 sous-unités, liées d'une manière non covalente, ont été purifiées : la plus grande, de 160 kDa, nommée ensuite α , une autre de 53 kDa désignée par β , et une sous-unité γ de 32 kDa (Curtis & Catterall 1984). Les études ultérieures de purification ont montré que ces récepteurs sont actuellement formés des sous-unités α_1 (175 kDa), α_2 (143 kDa), β (52 kDa), δ (24–27 kDa) et γ (30 kDa). Les sous-unités α_2 et δ sont liées de manière post-traductionnelle par des ponts disulfures formant ainsi la sous-unité $\alpha_2\delta$ (Takahashi et al. 1987; Tanabe et al. 1987). Par la suite, la $\text{Ca}_v\beta$ était décrite comme la seule sous-unité entièrement cytosolique associée à un domaine cytoplasmique de la sous-unité α_1 (Pragnell et al. 1994). Récemment, la structure du complexe DHPR squelettique a été dévoilée par cryo-microscopie électronique, d'abord avec une résolution de 15 Å (Hu et al. 2015) et, plus récemment, avec une résolution de 4,2 Å (Wu et al. 2015).

2. Les isoformes de $\text{Ca}_v\beta$ et leur distribution tissulaire

Quatre gènes différents *CACNB1*, *CACNB2*, *CACNB3* et *CACNB4* codent quatre différentes isoformes de $\text{Ca}_v\beta$ (52-78 kDa) nommées $\text{Ca}_v\beta_1$, $\text{Ca}_v\beta_2$, $\text{Ca}_v\beta_3$ et $\text{Ca}_v\beta_4$, respectivement. Chacune de ces isoformes peut subir un épissage alternatif créant une vaste

collection de variants d'épissage avec des propriétés biophysiques et pharmacologiques distinctes (Etemad, Obermair, et al. 2014). Les isoformes de $Ca_v\beta$ participent à l'organisation des CCDVs et leur expression varie entre les tissus (Tableau 3) (Buraei & Yang 2013).

$Ca_v\beta_{1a}$ a été le premier variant d'épissage identifié, il semblait être le variant principal exprimé dans le muscle squelettique (Pragnell et al. 1991). Il a été démontré qu'il joue un rôle critique dans le couplage excitation/contraction, non seulement en contrôlant l'expression de $Ca_v1.1$ dans les tubules-T, mais aussi en favorisant le regroupement de quatre complexes DHPR dans une tétrade qui se couple à un seul RyR (Taylor et al. 2014). $Ca_v\beta_{1a}$ a également été décrit comme principalement exprimé dans le cœur de rat après la naissance (Chu et al. 2004). En effet, seuls deux variants d'épissage de $Ca_v\beta_1$ ($Ca_v\beta_{1a}$ et $Ca_v\beta_{1b}$) ont été observés dans les tissus du rat (Chu et al. 2004). Cependant, $Ca_v\beta_{1b}$ a été identifié comme le principal variant exprimé dans le cœur humain. $Ca_v\beta_{1b}$ est également exprimé dans le cerveau et a également été détecté dans le pancréas (Chu et al. 2004; Buraei & Yang 2010).

$Ca_v\beta_2$ semble être la sous-unité la plus abondante dans les myocytes auriculaires et prédominante dans le cœur du rat et les muscles lisses. En outre, $Ca_v\beta_2$ a été détectée à des faibles niveaux dans le cerveau et dans le muscle lisse de l'aorte, de la trachée et des poumons. $Ca_v\beta_2$ est également présente dans certains types de cellules neuronales incluant les cellules de Purkinje, les neurones pyramidaux de l'hippocampe et les photorécepteurs (Hullin et al. 1992; Chu et al. 2004; Herzig et al. 2007). Cinq variants de $Ca_v\beta_2$ ont été clonés à partir du myocarde humain et nommés $Ca_v\beta_{2a}$, $Ca_v\beta_{2b}$, $Ca_v\beta_{2c}$, $Ca_v\beta_{2d}$ et $Ca_v\beta_{2e}$. Ces variants montrent un profil d'expression différent dans chaque cavité cardiaque (Chu et al. 2004). $Ca_v\beta_{2a}$ a été détecté dans le tissu ventriculaire humain et a la particularité d'être le seul variant qui est palmitoylé (Chu et al. 2004; Buraei & Yang 2010; Buraei & Yang 2013; Restituto et al. 2000). D'autre part, l'ARNm de $Ca_v\beta_{2b}$ est fortement exprimé à la fois dans l'oreillette et le ventricule. Ce variant ne montre pas de changements significatifs avec l'âge, alors que l'expression de $Ca_v\beta_{2c}$, $Ca_v\beta_{2d}$ et $Ca_v\beta_{2e}$ diminue avec le développement. Dans les oreillettes et les ventricules, l'expression de $Ca_v\beta_{2c}$ est nettement supérieure à 4-5 semaines qu'à 16 semaines d'âge (Chu et al. 2004). De même, $Ca_v\beta_{2e}$ est principalement exprimé dans les ventricules à 4-5 semaines d'âge, ce variant est faiblement détecté à 16 semaines, mais pas du tout exprimé dans les oreillettes (Chu et al. 2004). L'ARNm de $Ca_v\beta_3$ a également été identifié dans le tissu ventriculaire humain, alors que la protéine est détectée dans le muscle

lisse où elle semble être principalement exprimée avec $Ca_v\beta_2$ (Hullin et al. 1992; Chu et al. 2004).

Tableau 3. La distribution tissulaire de $Ca_v\beta$

Gènes	$Ca_v\beta$	Distribution tissulaire
<i>CACNB1</i>	β_1	Cortex cérébral, habenula, hippocampe, bulbe olfactif, muscle squelettique, cœur, rate et lymphocytes T
	β_{1a}	Muscle squelettique et cœur du rat postnatal
	β_{1b}	Cœur humain, cervelet, cortex cérébral, nerf et pancréas
	β_{1c}	Cerveau et rate
	β_{1d}	Cœur
<i>CACNB2</i>	β_2	Cœur, hippocampe, cervelet, noyaux pontiques, locus Niger, habenula, glande pinéale, noyaux thalamiques, cerveau, poumons, lymphocytes T et ostéoblastes.
	β_{2a}	Cœur, aorte et cerveau
	β_{2b}	Cœur, aorte et cerveau
	β_{2c}	Cœur et cerveau
	β_{2d}	Cœur (au début du développement)
<i>CACNB3</i>	β_3	Cervelet, cortex cérébral, habenula, hippocampe, bulbe olfactif, striatum, cœur, aorte, reins, poumons, muscle squelettique, muscle lisse, rate, thalamus, lymphocytes T et trachée
<i>CACNB4</i>	β_4	Cortex cérébral, gyrus denté, habenula, hippocampe, bulbe olfactif, striatum, thalamus et hypothalamus
	β_{4a}	Moelle épinière et cervelet
	β_{4b}	Moelle épinière et prosencéphale
	β_{4c}	Tronc cérébral et cervelet
<i>CACNB4</i>	β_{4d}	Tissus rénaux et cardiaques

$Ca_v\beta_3$ a été décrite dans le cerveau où elle est exprimée de manière prédominante dans le bulbe olfactif, le cortex, l'hippocampe et l'habenula. $Ca_v\beta_3$ est aussi présente dans le système vasculaire, particulièrement dans l'aorte et dans l'artère rénale, aussi bien dans le myocarde (Foell et al. 2004; Witcher et al. 1993; Hullin et al. 1992). $Ca_v\beta_4$ est exprimée dans les cellules de Purkinje et les cellules granulaires, son expression augmente avec le développement cérébral du rat (Castellano et al. 1993; Ludwig et al. 1997). Également, $Ca_v\beta_4$ a été décrite dans le cœur embryonnaire précoce où elle disparaît avant la naissance. Fortement exprimé dans le cerveau, $Ca_v\beta_{4b}$ est dominant dans le cervelet et l'hippocampe

avec une faible expression dans les reins, les testicules et les lymphocytes. L'épissage alternatif de la séquence N-terminale de $\text{Ca}_v\beta$ produit le variant $\text{Ca}_v\beta_{4a}$ caractérisé dans le système nerveux central (Helton et al. 2002; Helton & Horne 2002). Également, un variant d'épissage supplémentaire a été identifié dans les tissus rénaux et cardiaques du fœtus appelé $\text{Ca}_v\beta_{4d}$ (Chu et al. 2004).

3. Structure de $\text{Ca}_v\beta$

La séquence de la sous-unité β peut être divisée en cinq domaines en fonction des similitudes d'acides aminés entre les isoformes (Figure 9). $\text{Ca}_v\beta$ se compose de trois domaines conservés qui forment la région centrale « core région » et deux domaines fortement variables qui forment les extrémités N- et C-terminales. Pour la plupart des sous-unités β , ces domaines (N- et C- terminaux) n'ont pas été cristallisés et leurs structures 3D sont donc inconnues, à l'exception de la structure de la partie N-terminale de $\text{Ca}_v\beta_4$ qui a été déterminée par RMN. Elle se compose de deux hélices α et de deux feuillettes β antiparallèles (Vendel, Rithner, et al. 2006). Cependant, aucune structure des domaines C-terminaux n'a été encore identifiée.

Dans la région centrale se trouve un domaine homologue à Src 3 « SH3 » et un domaine Guanylate Kinase « GK » reliés entre eux par une région faiblement conservée « HOOK ». Cette région centrale « SH3-HOOK-GK » résume de nombreuses fonctions critiques des sous-unités $\text{Ca}_v\beta$ s et permet leur classification en tant que membres de la famille des guanylate kinase associée à la membrane, qui sont groupés sous le nom « MAGUK » (Buraei & Yang 2013). Le domaine SH3 médie les interactions protéine-protéine et a une séquence hydrophobe hautement conservée qui se lie aux séquences « PxxP » dans les protéines cibles (Buraei & Yang 2010; Buraei & Yang 2013). Le domaine GK conserve les caractéristiques structurales générales des guanylate kinases, qui catalysent le transfert du phosphate de l'ATP à la GMP afin de générer l'ADP et la GDP (Buraei & Yang 2010). Ce domaine contient également un site d'interaction protéine-protéine qui se lie au domaine « AID » (α_1 -interaction domain) de $\text{Ca}_v\alpha_1$, guidant ainsi l'assemblage du canal. Le domaine GK se lie également à d'autres protéines y compris les RGK, GTPases et les canaux BK_{Ca} (discutés ci-dessous) (Buraei & Yang 2010; Buraei & Yang 2013).

La longueur ainsi que la séquence en acides aminés de la région HOOK reliant les domaines SH3 et GK varient entre les isoformes de $\text{Ca}_v\beta$. La structure tridimensionnelle

d'une partie importante de cette région reste encore indéterminée en raison de sa faible densité en électrons (Dolphin 2003; Buraei & Yang 2010; Buraei & Yang 2013). Les données cristallographiques montrent que les domaines SH3 et GK interagissent entre eux et que cette interaction est importante pour la fonctionnalité de $\text{Ca}_v\beta$. Par conséquent, les mutations et les modifications post-traductionnelles qui affectent les domaines SH3 et GK de $\text{Ca}_v\beta$ altèrent la cinétique du canal (Buraei & Yang 2010; Buraei & Yang 2013).



Figure 9. Représentation schématique de $\text{Ca}_v\beta$. Les domaines SH3 et GK sont conservés dans tous les $\text{Ca}_v\beta$ s. Le BID (pour 'β-interaction domain') était le premier site d'interaction avec $\text{Ca}_v\alpha_1$ décrit. Plus tard, il a été remarqué que l'interaction avec $\text{Ca}_v\alpha_1$ engage des régions supplémentaires du domaine GK nommées ainsi ABP (pour 'AID-binding pocket').

Interactions des domaines SH3 et GK

Les domaines SH3 et GK de $\text{Ca}_v\beta$ peuvent établir deux types d'interactions: une interaction intramoléculaire et une interaction intermoléculaire. La première est indispensable au fonctionnement de la sous-unité (Figure 10A). En effet, des mutations ciblant l'interaction SH3/GK altèrent les cinétiques d'inactivation du canal et peuvent inhiber l'interaction entre $\text{Ca}_v\alpha_1$ et $\text{Ca}_v\beta$ (McGee et al. 2004; Takahashi et al. 2004). Une interaction intermoléculaire existe aussi entre SH3 et GK. Ainsi, une coexpression de $\text{N}_{\text{ter}}\text{-SH3}$ et GK-C_{ter} de $\text{Ca}_v\beta_{2a}$, est capable de rétablir une sous-unité fonctionnelle (Figure 10B). Cette sous-unité reconstituée restitue l'amplitude du courant native, l'adressage membranaire du canal et l'effet hyperpolarisant sur la courbe d'activation (Takahashi et al. 2004). Les mutations qui empêchent l'interaction intramoléculaire perturbent encore l'interaction intermoléculaire et donc le rétablissement de $\text{Ca}_v\beta_{2a}$. Ceci est le cas de la coexpression de $\text{N}_{\text{ter}}\text{-SH3}$ avec un $\text{GK}^*\text{-C}_{\text{ter}}$ possédant une délétion de cinq acides aminés (PYDVV) dans le domaine GK. Au contraire, la coexpression de $\text{N}_{\text{ter}}\text{-SH3}$ avec $\text{GK-}\Delta\text{C}$, ayant une délétion de 83 acides aminés en C-terminal, est capable de reconstituer une sous-unité $\text{Ca}_v\beta_{2a}$ mais sans restituer entièrement ses effets (Figure 10C) (Takahashi et al. 2005). Finalement, les sous-unités portant des mutations qui rompent l'interaction intramoléculaire mais qui ont au moins l'un de deux domaines (GK ou SH3) intacts peuvent interagir d'une façon intermoléculaire

(Figure 10D) et de restituer les effets de $Ca_v\beta$ (Takahashi et al. 2004). Ces études surlignent l'importance de ces interactions qui sont indispensables pour la fonctionnalité de la protéine.

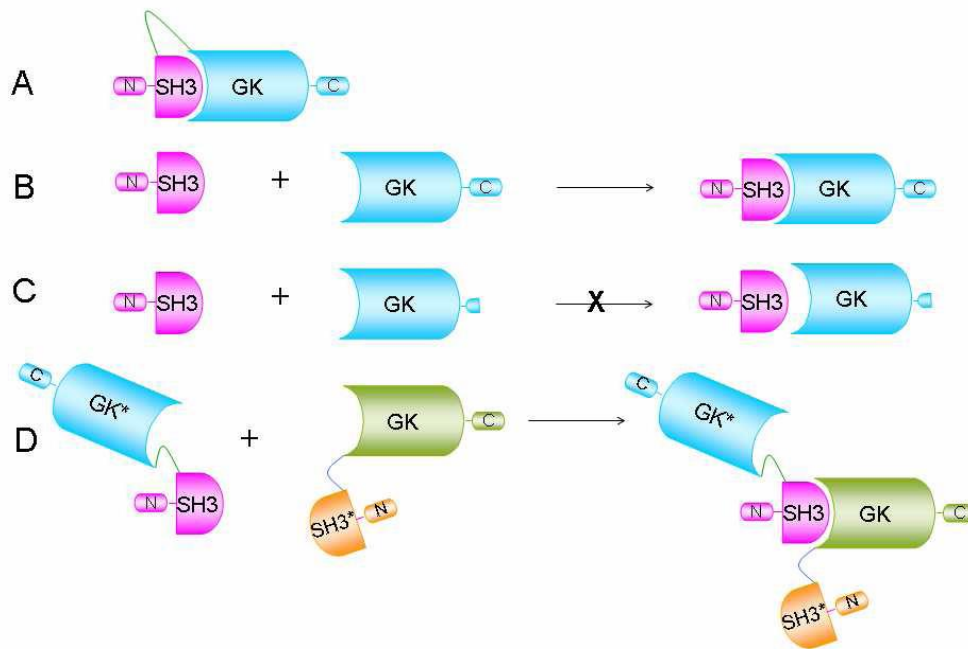


Figure 10. Les différentes formes de l'interaction entre les domaines SH3 et GK de $Ca_v\beta^*$.

4. Les protéines partenaires de $Ca_v\beta$

a. $Ca_v\alpha_1$, le premier partenaire de $Ca_v\beta$

La sous-unité α_1 a été la première protéine identifiée à interagir avec $Ca_v\beta$ et a donc été considérée comme son partenaire naturel. Jusqu'à récemment, la seule fonction connue de $Ca_v\beta$ était de moduler le ciblage à la membrane plasmique, les propriétés de transmission sélective, et l'activité de la sous-unité $Ca_v\alpha_1$. En effet, cette activité déclenche ou module d'importants processus physiologiques y compris l'expression génique et les couplages excitation/sécrétion et excitation/contraction (Rousset et al. 2005). Ainsi, $Ca_v\beta$ est considérée comme une protéine chaperon permettant l'expression à la membrane plasmique des sous-unités Ca_v1 et Ca_v2 (Walker & De Waard 1998).

*Abir Tadmouri. Les déterminants moléculaires et cellulaires de la mutation humaine R482X de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ impliqués dans l'épilepsie. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Joseph Fourier - Grenoble I, 2007. Français. <tel-00171896>

Plusieurs études se sont penchées sur les domaines protéiques impliqués dans l'interaction entre $Ca_v\alpha_1$ et $Ca_v\beta$. Tous les $Ca_v\beta$ s interagissent avec le domaine AID de 18 acides aminés situé dans la boucle cytoplasmique de $Ca_v\alpha_1$ entre les domaines transmembranaires I et II (De Waard & Campbell 1995; De Waard et al. 1994; Pragnell et al. 1994). En ce qui concerne la région de $Ca_v\beta$ qui interagit avec le domaine AID, une région dans le domaine GK nommée « BID » a d'abord été décrite comme étant le domaine d'interaction avec $Ca_v\alpha_1$ (De Waard et al. 1994; De Waard et al. 1996). Toutefois, l'élucidation récente de la structure de $Ca_v\beta_{2a}$ a dévoilé que la séquence de BID est profondément enfouie dans le domaine GK, rendant son interaction directe avec le domaine AID difficile. La structure 3D montre en fait que l'interaction avec AID engage trois régions du domaine GK qui forment une poche hydrophobique qui a été nommée « ABP » (AID binding pocket) (Opatowsky et al. 2004; Chen et al. 2004; Van Petegem et al. 2004; Almagor et al. 2012). La mutation de certains résidus d'acides aminés formant le domaine ABP affaiblit considérablement ou inhibe entièrement l'interaction entre $Ca_v\alpha_1$ et $Ca_v\beta$. De même, la mutation de certains résidus dans le BID modifie l'interaction entre $Ca_v\alpha_1$ et $Ca_v\beta$. Ces études structurales montrent aussi que le domaine AID adopte une forme α -hélicoïdale lors de son interaction avec $Ca_v\beta_{2a}$, ce qui suggère que l'interaction $Ca_v\alpha_1/Ca_v\beta$ a la capacité de modifier, en partie, la structure de $Ca_v\alpha_1$.

Comme mentionné précédemment, il est maintenant largement admis que $Ca_v\beta$ est absolument nécessaire à la sortie de $Ca_v\alpha_1$ du réticulum endoplasmique et son adressage à la membrane plasmique (Tareilus et al. 1997; Chien et al. 1995; Bichet et al. 2000; Jha et al. 2015). Dans une étude menée par Altier et ses collaborateurs, il a été montré qu'en l'absence de $Ca_v\beta$, les sous-unités $Ca_v1.2$ sont soumises à l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome. Néanmoins, en présence de $Ca_v\beta$, ces sous-unités sont correctement transportées vers la membrane plasmique. Ce mécanisme d'ubiquitination et de dégradation n'est cependant pas commun à tout les CCDVs. En effet, les sous-unités $Ca_v2.1$ ne sont pas ubiquitinées en absence de $Ca_v\beta$. Ces résultats démontrent que la voie d'exportation du réticulum endoplasmique varie entre les différentes familles de CCDVs (Altier et al. 2011).

Réversibilité de l'interaction entre $Ca_v\alpha_1$ et $Ca_v\beta$

Même si plusieurs études ont proposé que l'interaction $Ca_v\beta/AID$ se produit avec une forte affinité (2-54 nM) (De Waard et al. 1995), différents résultats suggèrent fortement que cette interaction est réversible (Hidalgo et al. 2006; García et al. 2002; Hidalgo & Neely 2007; Jangsangthong et al. 2011), soulevant la question de la permanence de l'interaction

$Ca_v\alpha_1/Ca_v\beta$. La réversibilité de l'interaction $Ca_v\alpha_1/Ca_v\beta$ a également été l'objet d'une étude utilisant la récupération de la fluorescence après photoblanchiment (FRAP) dans des myotubes dysgéniques. Cette étude a indiqué que, dans les triades du muscle squelettique, $Ca_v\beta_{1a}$ forme un complexe stable avec les sous-unités $Ca_v1.1$ et $Ca_v1.2$, tandis que $Ca_v\beta_{2a}$ et $Ca_v\beta_{4b}$ interagissent avec ces canaux d'une manière plus dynamique. En outre, la modification ou la suppression de certains résidus dans la boucle I-II de la sous-unité $Ca_v1.1$ ne modifie pas les propriétés dynamiques de $Ca_v\beta$. Cependant, la substitution d'un seul résidu dans l'ABP de $Ca_v\beta_{1a}$ (mutation M293A) diminue la stabilité du complexe $Ca_v\alpha_1/Ca_v\beta$, suggérant que la liaison à $Ca_v\alpha_1$ est sous le contrôle des propriétés intrinsèques de $Ca_v\beta$ (Campiglio et al. 2013). D'autre part, il a été montré que certaines protéines partenaires de $Ca_v\beta$ ou $Ca_v\alpha_1$ pourraient réguler la dissociation entre ces deux sous-unités (Dresviannikov et al. 2009), favorisant ainsi la régulation de l'afflux de calcium et de faciliter l'engagement de $Ca_v\beta$ dans des voies de signalisation cellulaire indépendante du calcium.

Enfin, il est intéressant de noter que certaines propriétés de déclenchement des CCDVs sont également définies par l'isoforme de $Ca_v\beta$ et sa capacité à établir des interactions supplémentaires avec $Ca_v\alpha_1$ qui n'impliquent pas le domaine AID. Ainsi, les domaines C-terminaux de certaines $Ca_v\beta$ sont capables d'interagir avec l'extrémité N-terminale ou l'extrémité C-terminale de $Ca_v\alpha_1$ (Walker & De Waard 1998). Plus récemment, une étude de cryo-microscopie électronique a dévoilé la structure globale du DHPR (Figure 11). Cette structure illustre la proximité de la sous-unité $Ca_v\beta_{1a}$ avec le domaine C-terminal de $Ca_v1.1$ indiquant la faisabilité de ce type d'interactions secondaires (Wu et al. 2015).

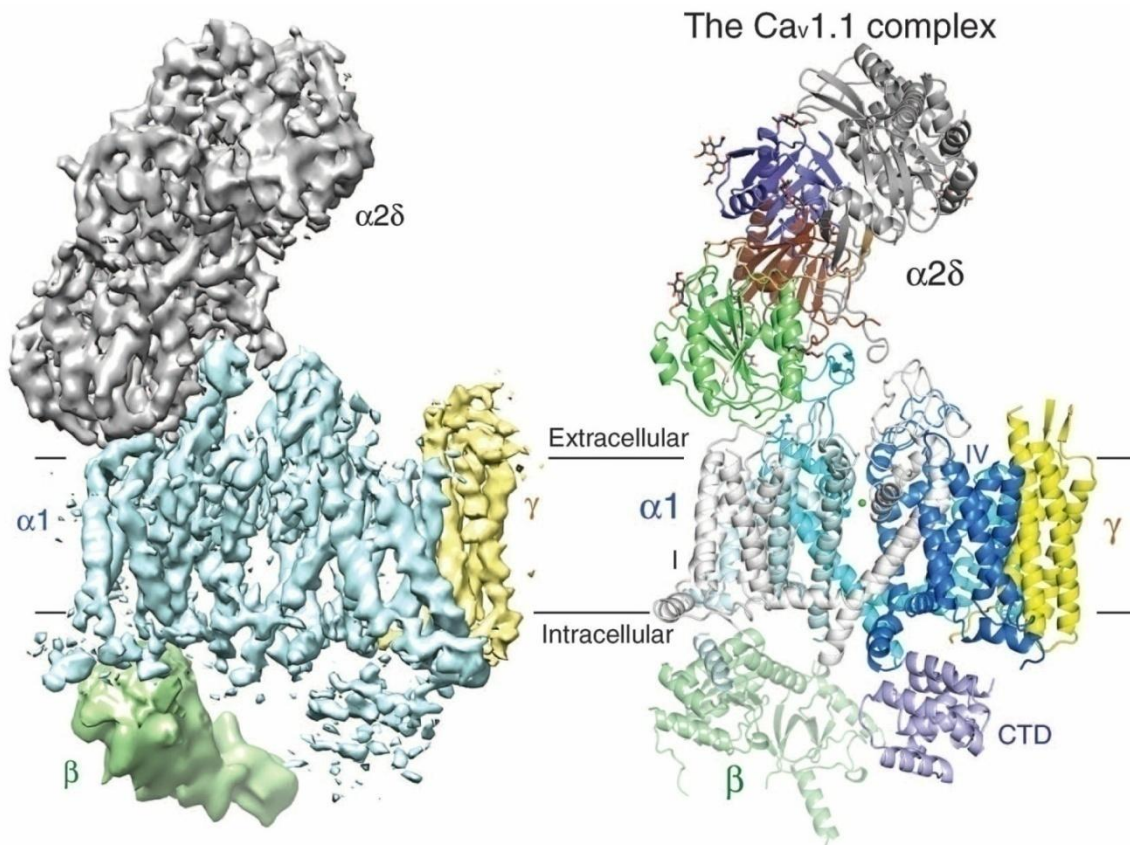


Figure 11. La structure du canal calcique voltage-dépendant ($Ca_v1.1$) de lapin à une résolution de 4,2 Å (Wu et al. 2015). La carte globale de densité de microscopie électronique sur la gauche est colorée en fonction des différentes sous-unités. Le model structural sur la droite est colorée en fonction des domaines. Le Ca^{2+} présumé est représenté comme une sphère verte. CTD : domaine C-terminal de $Ca_v\alpha_1$.

b. $Ca_v\beta$ et les protéines kinases: une relation complexe

Toutes les sous-unités β contiennent dans leurs séquences des sites potentiels de phosphorylation (Zamponi et al. 2015). Ceci suggère que la phosphorylation de $Ca_v\beta$ peut réguler les courants calciques portés par les CCDVs et/ou contrôler l'interaction de $Ca_v\beta$ avec un partenaire protéique. En effet, il a été décrit que la MAPK est capable de phosphoryler et de potentialiser les canaux calciques de type-L et -N dans les neurones des ganglions de la racine dorsale (Fitzgerald 2000). Dans les cellules COS-7, l'absence de $Ca_v\beta$ entraîne la disparition de cette régulation. Malheureusement, ce n'est pas clair si cette phosphorylation se produit sur $Ca_v\alpha_1$ ou $Ca_v\beta$ parce que tous les deux contiennent des sites potentiels de phosphorylation.

D'autres résultats indiquent que les courants cardiaques de type-L sont sous le contrôle de la voie du récepteur β -adrénergique par l'intermédiaire de la PKA. Là encore, le mécanisme moléculaire de cette régulation n'a pas encore été pleinement élucidé. Bünemann et ses

collaborateurs ont suggéré qu'au moins deux résidus de $\text{Ca}_v\beta_2$ (Ser^{478} et Ser^{479}) sont les sites potentiels de phosphorylation par la PKA qui a comme conséquence une stimulation des courants cardiaques (Bünemann et al. 1999). Cependant, ces résultats obtenus dans un système d'expression hétérologue ont été contredits par d'autres expériences réalisées dans des cardiomyocytes et des modèles d'animaux transgéniques générant ainsi un débat sur la possibilité et le rôle de la phosphorylation de $\text{Ca}_v\beta$ par PKA (pour revue, voir (Weiss et al. 2013)). Récemment, Brunet et al. ont décrits deux sites de phosphorylation de $\text{Ca}_v\beta$ *in vivo* (Brunet et al. 2015). Ces sites (Ser^{193} et Thr^{205}) se trouvent dans le domaine HOOK de $\text{Ca}_v\beta$ et sont conservés parmi ses isoformes. Cette étude révèle une nouvelle dimension de la régulation des CCDVs par phosphorylation des domaines HOOK des sous-unités $\text{Ca}_v\beta$ s.

La CaMKII (pour ' Ca^{2+} /Calmodulin-Dependent Kinase II') est l'une des enzymes les plus abondantes dans différents types cellulaires y compris les cellules musculaires et les neurones. Certaines études ont montré que la CaMKII est capable d'interagir, *in vitro*, avec $\text{Ca}_v\beta_{1b}$ mais pas $\text{Ca}_v\beta_3$ et $\text{Ca}_v\beta_4$ (Grueter et al. 2008). En outre, il a été démontré que la CaMKII peut phosphoryler $\text{Ca}_v\beta_{1b}$, $\text{Ca}_v\beta_3$ et $\text{Ca}_v\beta_4$, mais les conséquences physiologiques de ces phosphorylations restent peu claires (Grueter et al. 2008).

D'un autre côté, il a été montré que les souris knock-out pour $\text{Ca}_v\beta_3$ ont une plus grande capacité à contrôler une concentration élevée de glucose dans le sang que les souris sauvages en raison d'une sécrétion d'insuline significativement plus élevée (Berggren et al. 2004). Cette observation suggère que les canaux calciques régulent la sécrétion d'insuline. De même, l'utilisation des siRNA contre $\text{Ca}_v\beta_2$ et $\text{Ca}_v\beta_3$ augmente significativement le niveau de l'insuline sérique et aboutit à une homéostasie du glucose efficace. En revanche, la régulation de l'expression de $\text{Ca}_v\beta_1$ et $\text{Ca}_v\beta_4$ n'a pas montré des conséquences identiques. L'observation de la localisation des isozymes de PKC dans les cellules β pancréatiques isolées à partir des souris traitées avec des siRNA anti- $\text{Ca}_v\beta_2$ et - $\text{Ca}_v\beta_3$ a révélé que trois isozymes de la PKC (α , β II et ϵ) subissent une translocation vers la membrane plasmique en absence de $\text{Ca}_v\beta_2$ et $\text{Ca}_v\beta_3$. L'étude ainsi a suggéré que $\text{Ca}_v\beta_2$ et $\text{Ca}_v\beta_3$ inhibent l'activation de PKC et la sécrétion d'insuline par l'un des deux mécanismes suivants: 1) l'inhibition de la translocation des isozymes de PKC à la membrane, ou 2) la réduction de l'interaction entre les canaux calciques et les isozymes de la PKC (Rajagopal et al. 2014).

c. Interaction de $Ca_v\beta$ avec des récepteurs membranaires et d'autres canaux ioniques

i. Les récepteurs de la ryanodine (RyR)

Dans les cellules des muscles squelettiques, les canaux calciques de type-L, connus sous le terme DHPR, sont localisés dans des invaginations de la membrane plasmique appelées tubules-T. Dans ces cellules, le DHPR joue un rôle particulier car il est couplé à un autre canal calcique, le RyR situé dans la membrane du réticulum sarcoplasmique. La juxtaposition des tubules-T et de la membrane du réticulum sarcoplasmique permet le couplage physique du DHPR au RyR et forme une structure hautement organisée appelée la triade. Dans les tubules-T, les DHPRs sont organisés en tétrades correspondant à quatre DHPRs qui font face à un RyR.

Cette organisation particulière appelée la tétrade est nécessaire pour le couplage fonctionnel entre DHPR et RyR qui permet le transfert de l'information électrique détectée par le DHPR au RyR par un mécanisme connu sous le nom du couplage excitation/contraction (EC) (Flucher & Franzini-Armstrong 1996). Outre son rôle dans l'expression des DHPRs à la surface membranaire, l'isoforme de $Ca_v\beta$ du muscle squelettique ($Ca_v\beta_{1a}$) semble indispensable à la formation de la tétrade et au couplage EC. En fait, les courants des canaux de type-L peuvent être entièrement rétablis par l'expression des différents isoformes de $Ca_v\beta$ exogènes dans les cellules des muscles squelettiques isolés à partir d'embryons de souris knock-out pour $Ca_v\beta_{1a}$. Par contre, seulement $Ca_v\beta_{1a}$ et $Ca_v\beta_{1c}$ sont capables de normaliser le couplage EC (Schredelseker et al. 2005; Schredelseker et al. 2009).

En plus, il a été montré que $Ca_v\beta_{1a}$ interagit directement avec le RyR *via* une répétition (L478, V485, L492) située dans l'extrémité C-terminale de $Ca_v\beta_{1a}$ et dont la délétion conduit à la perte du couplage EC. En revanche, l'expression de $Ca_v\beta_{2a}$ portant la séquence correspondante de $Ca_v\beta_{1a}$ dans des myotubes issus de souris knock-out pour $Ca_v\beta_{1a}$ est suffisante pour rétablir le couplage EC (Sheridan et al. 2004). Au niveau du RyR, une région fortement chargée (KKKRRxxR) conduit l'interaction avec $Ca_v\beta_{1a}$ (Sheridan et al. 2004; Cheng et al. 2005). Enfin, la sous-unité $Ca_v\beta_{1a}$ semble organiser et faciliter l'interaction entre $Ca_v1.1$ et RyR. En effet, une étude de cryo-microscopie électronique du DHPR a souligné le rôle de $Ca_v\beta$ comme une ancre qui aide la boucle flexible II-III de $Ca_v\alpha_1$ à interagir avec RyR (Hu et al. 2015).

ii. $Ca_v\beta$ réduit la sensibilité de BK_{Ca} au calcium

Les canaux potassiques de grande conductance activés par le Ca^{2+} (BK_{Ca}) se trouvent dans les cellules excitables et non excitables, y compris les neurones, les myocytes, les cellules sécrétrices et les cellules épithéliales (Salkoff et al. 2006). Ces canaux activés par la dépolarisation de la membrane plasmique et la liaison du Ca^{2+} sur leur domaine intracellulaire sont impliqués dans plusieurs processus physiologiques dont l'excitabilité neuronale (Salkoff et al. 2006). De manière surprenante, Zou et ses collaborateurs ont décrit une association physique entre $Ca_v\beta_1$ et Slo1, la sous-unité formant le pore du canal BK_{Ca} (Zou et al. 2008). Deux régions distinctes de Slo1 sont impliquées dans cette interaction: (1) un motif de liaison à SH3 non-canonique (Tian et al. 2006) et (2) des sites de liaison du Ca^{2+} de Slo1 dites "calcium bowl" (Zou et al. 2008). De plus, cette interaction ne nécessite aucune autre sous-unité du canal (par exemple, la sous-unité formant le pore) ou toute autre protéine intermédiaire. Cette interaction entre le canal potassique et $Ca_v\beta_1$ ralentit la cinétique d'activation/inactivation du canal BK_{Ca} et diminue de manière significative sa sensibilité au Ca^{2+} . Les effets observés de $Ca_v\beta_1$ sur les canaux BK_{Ca} résultent de son interaction, *via* son domaine GK, avec le "calcium bowl" de Slo1 (Zou et al. 2008). Cependant, il a été suggéré que l'interaction de $Ca_v\beta_1$ avec le motif de liaison à SH3 stabilise l'interaction avec Slo1, ou peut contribuer à la formation d'autres complexes.

iii. Le Bestrophin-1 régule les CCDVs *via* $Ca_v\beta$

Le Bestrophin-1 est un canal anionique qui se trouve dans l'épithélium pigmentaire rétinien dont le dysfonctionnement conduit à différents types de dégénération rétinienne. Il est aujourd'hui bien établi que Bestrophin-1 peut réguler les CCDVs en modulant leur cinétique d'activation et leur activation dépendante du potentiel (Hartzell et al. 2008; Burgess et al. 2008; Rosenthal et al. 2006; Reichhart et al. 2010; Yu et al. 2008). En effet, il a été démontré que la régulation des canaux calciques de type-L par Bestrophin-1 est due à l'interaction de Bestrophin-1 avec la sous-unité $Ca_v\beta$. En fait, Bestrophin-1 co-immunoprécipite avec $Ca_v\beta_3$ et $Ca_v\beta_4$; Cependant, aucune interaction n'a été observée avec $Ca_v1.3$ quand cette sous-unité est exprimée seule. Il a été aussi montré, par microscopie confocale, que Bestrophin-1 colocalise avec $Ca_v\beta_3$ dans le cytoplasme. En revanche, en présence de $Ca_v1.3$, Bestrophin-1, $Ca_v\beta_3$ ou $Ca_v\beta_4$, les trois protéines sont retrouvées localisées au niveau de la membrane plasmique indiquant que l'interaction de Bestrophin-1 avec les canaux Ca^{2+} se fait par le biais de $Ca_v\beta$ (Milenkovic et al. 2011). Il a d'abord été

décrit que cette interaction implique un motif riche en proline de Bestrophin-1 (situé entre les acides aminés 330 et 346) et le domaine SH3 de $Ca_v\beta$ (Yu et al. 2008; Reichhart et al. 2010). En 2011, un nouveau motif également riche en proline de l'extrémité C-terminale de Bestrophin-1 (situé entre les acides aminés 468 et 486) a été identifié. Ce motif est encore requis pour la modulation des fonctions de $Ca_v\beta$ (Milenkovic et al. 2011). En effet, la délétion du premier motif affecte la liaison Bestrophin-1/ $Ca_v\beta$ mais pas le trafic de $Ca_v1.3$ à la membrane plasmique, alors que la délétion du second motif affecte la capacité de $Ca_v\beta$ à réguler l'expression du canal à la surface cellulaire (Reichhart et al. 2010; Milenkovic et al. 2011). Ces observations suggèrent donc que le premier motif riche en proline est requis pour la liaison entre $Ca_v\beta$ et Bestrophin-1, alors que le deuxième motif est impliqué dans le contrôle des propriétés régulatrices de $Ca_v\beta$ par Bestrophin-1 (Milenkovic et al. 2011).

d. L'interaction de $Ca_v\beta$ avec les GTPases

i. Les RGK GTPases: des inhibiteurs potentiels des CCVDs

Quatre membres constituent la famille des protéines RGK (Rad, Rem, Rem2, Gem/Kir). Ces protéines peuvent lier GDP et GTP, ainsi, elles possèdent une activité GTPase. Le rôle de cette activité GTPase dans les fonctions régulatrices des protéines RGK reste cependant mal compris. Rad a été le premier membre décrit parmi les RGKs qui inhibe le courant calcique (Béguin et al. 2001). Depuis, tous les membres de la famille des protéines RGK se sont dévoilés comme des puissants inhibiteurs des courants calciques. En effet, l'expression de chaque membre des RGKs avec $Ca_v\alpha_1$, $Ca_v\alpha_2\delta$ et $Ca_v\beta$, dans différents systèmes d'expression hétérologues, inhibe les courants calciques. Néanmoins, les courants générés par l'expression de $Ca_v\alpha_1$ seul semblaient être insensibles aux RGKs, suggérant que les RGKs inhibent les CCDVs par une interaction directe avec $Ca_v\beta$ (Béguin et al. 2001; Finlin et al. 2003; Seu & Pitt 2006). Cette interaction a été confirmée par des expériences de co-immunoprécipitation montrant que toutes les RGKs sont capables d'interagir avec toutes les isoformes de $Ca_v\beta$ (Béguin et al. 2001; Béguin et al. 2006; Buraei & Yang 2010). En accord avec ces résultats, l'activité des canaux de type-T, qui ne comprennent pas de sous-unité $Ca_v\beta$, n'est pas affectée par les protéines RGK (Chen et al. 2005; Finlin et al. 2003). Xu et ses collaborateurs ont montré que la surexpression de Rem régule négativement les courants calciques de type-L sans affecter le nombre des canaux à la surface des cellules (Xu et al. 2010). En présence de Rem, les courants calciques cardiaques de type-L ne sont plus régulés par la PKA. Cet effet peut être dû à un encombrement stérique ou à un masquage des sites de phosphorylation de $Ca_v\beta$ par l'interaction avec Rem. Récemment, certaines études ont cherché les détails de cette

interaction. En effet, il a été montré que trois résidus de Rem (R200, L227 et H229) sont critiques pour l'interaction Rem/Ca_vβ, *in vitro* (Beqollari et al. 2015). De l'autre côté, deux régions appartenant au domaine GK de Ca_vβ_{4a} ont été identifiées comme nécessaires pour son interaction avec Rem2. La première forme une poche hydrophobique bordée par 4 résidus critiques (L173, N261, H262 et V303), dont la mutation de chacun perturbe complètement la liaison. La deuxième région n'est pas si loin de la poche, elle contient 3 résidus (D206, L209 et D258) qui lorsqu'ils sont mutés individuellement l'affinité de l'interaction diminue (Xu et al. 2015).

Différents mécanismes ont été proposés pour expliquer les effets des RGKs sur les courants calciques. Le premier repose sur le concept général que les protéines RGK entrent en compétition avec l'interaction Ca_vβ/Ca_vα. Cette compétition peut prendre plusieurs formes: inhibition de l'association de Ca_vβ avec Ca_vα ou la réduction de la disponibilité de Ca_vβ dans le cytoplasme. Dans le premier scénario, la liaison des RGKs à Ca_vβ influence sa liaison à Ca_vα₁ et par conséquent l'adressage du canal à la membrane plasmique, en laissant Ca_vα₁ piégé dans le réticulum endoplasmique (Buraei & Yang 2010). Cependant, l'affinité de Ca_vβ₂ pour AID est plus élevée que celle de sa liaison à Rem (Finlin et al. 2006), ce qui rend peu probable que les RGKs dissocie le complexe Ca_vβ/Ca_vα₁ (Buraei & Yang 2010). Dans le second scénario, l'interaction des RGKs avec Ca_vβ aboutit à un ciblage du complexe Ca_vβ/RGK au noyau diminuant ainsi la concentration cytoplasmique de Ca_vβ et donc l'adressage de Ca_vα₁ à la membrane plasmique. Cependant, le rôle fonctionnel du complexe nucléaire Ca_vβ/RGK reste à élucider. Le second mécanisme est fondé sur le fait que Rem inhibe les courants calciques de type-N sans modifier la densité de Ca_vα₁ à la membrane plasmique (Chen et al. 2005). Ces résultats suggèrent que les protéines RGK peuvent aussi déréguler les CCDVs en interagissant avec Ca_vβ associée au canal, donc au niveau de la membrane plasmique. Ce mécanisme implique l'association du domaine C-terminal des RGKs aux phospholipides membranaires favorisant ainsi l'ancrage des RGKs dans la membrane. Enfin, le troisième mécanisme suggère que les protéines RGK induisent une internalisation des CCDVs diminuant ainsi leur expression à la surface cellulaire. Une étude a montré que dans les cellules HEK293 l'endocytose des canaux de type-L médiée par la dynamine est renforcée par Rem (Zerangue & Jan 1998). En conclusion, les RGKs apparemment influencent les courants calciques à deux niveaux différents: au niveau intracellulaire et au niveau membranaire. Ce double effet rappelle la multiplicité des rôles attribués à Ca_vβ.

ii. La dynamine: un lien entre les CCDV et l'endocytose

La dynamine est un membre de la famille des GTPases impliquées dans la fission de la membrane lors de l'endocytose (Takei et al. 2005; Hinshaw 2000). Elle se compose au moins de trois domaines: un domaine N-terminale portant l'activité GTPase, un domaine central et un domaine C-terminale effecteur GTPasique. Certaines dynamines montrent des domaines supplémentaires: un domaine PH (pour 'Pleckstrin Homology') qui se lie aux phospholipides et un domaine riche en proline qui peut interagir avec les domaines SH3 de plusieurs protéines (Hidalgo & Neely 2007). Étant donné que $Ca_v\beta$ possède un domaine SH3, la dynamine était soupçonnée d'être un partenaire potentiel de $Ca_v\beta$ (Hidalgo & Neely 2007). Plusieurs études ont démontré cette interaction (Gonzalez-Gutierrez et al. 2007; Miranda-Laferte et al. 2011). En 2007, Gonzalez-Gutierrez et al. ont montré que $Ca_v\beta_{2a}$ interagit par son domaine SH3 avec le domaine riche en proline de la dynamine dans des ovocytes de *Xenopus* (Gonzalez-Gutierrez et al. 2007). En effet, l'injection des domaines SH3 de $Ca_v\beta$ dans des ovocytes de *Xenopus* exprimant $Ca_v\alpha_1$ aboutit à l'internalisation des CCDVs et par conséquent un nombre réduit de canaux à la membrane plasmique. Cette observation a été expliquée par la présence de la dynamine endogène dans des ovocytes de *Xenopus*. En revanche, cet effet n'a pas été observé lorsque l'interaction entre la dynamine et le domaine SH3 a été bloquée par un petit peptide (dérivé du domaine riche en proline de la dynamine), connu pour perturber l'interaction avec d'autres domaines SH3 et inhiber l'endocytose des vésicules synaptiques. En outre, il a été montré que le domaine SH3 de $Ca_v\beta$ et $Ca_v\beta$ entière sont capables d'interagir *in vitro* avec la dynamine et d'entraîner l'internalisation du canal potassique « Shaker » (Gonzalez-Gutierrez et al. 2007). Ces observations suggèrent que l'interaction entre la dynamine et les domaines SH3 relie les CCDVs à la machinerie d'endocytose.

e. L'interaction de $Ca_v\beta$ avec d'autres protéines

i. BARP régule négativement les CCDVs via $Ca_v\beta$

Une étude récente a décrit pour la première fois une glycoprotéine membranaire nommée BARP (pour 'VGCC- β -anchoring and -regulatory protein'), qui est principalement exprimée dans les neurones. En effet, des niveaux élevés d'ARNm de BARP ont été détectés dans le cerveau, les îlots pancréatiques, et les cellules neuroendocrines (Béguin et al. 2014). Dans le cerveau et le cervelet, BARP co-immunoprécipite avec $Ca_v\beta_3$ et $Ca_v\beta_4$ mais pas avec $Ca_v\beta_1$, suggérant que dans les neurones BARP peut s'associer à des isoformes spécifiques de $Ca_v\beta$.

Lorsque surexprimé dans les cellules COS-1, BARP est capable de se lier à toutes les isoformes de $Ca_v\beta$ et de changer leurs localisations subcellulaires en absence de $Ca_v\alpha_1$. Après de nombreuses études montrant une distribution cytosolique et parfois nucléaire de $Ca_v\beta$, la surexpression de BARP localise les différents isoformes de $Ca_v\beta$ du cytoplasme vers la membrane plasmique. L'interaction entre $Ca_v\beta$ et BARP se fait grâce à deux domaines (Figure 12). Le domaine II interagit avec $Ca_v\beta_3$, $Ca_v\beta_{2a}$, $Ca_v\beta_{2b}$ et $Ca_v\beta_{4a}$ mais pas avec $Ca_v\beta_{1a}$, alors que le domaine I se lie à toutes les isoformes de $Ca_v\beta$. De plus, le domaine I interagit avec le domaine d'interaction à α_1 de $Ca_v\beta$ et interfère avec son association avec $Ca_v\alpha_1$. BARP n'a aucun effet sur l'expression de $Ca_v\alpha_1$ au niveau de la membrane plasmique, mais il inhibe l'activité du canal ce qui conduit à l'inhibition de l'exocytose dépendante du Ca^{2+} . Ainsi, BARP contrôle la localisation de $Ca_v\beta$ et son association avec $Ca_v\alpha_1$ pour réguler négativement l'activité des CCDVs. Ces résultats pourraient conduire à de nouvelles stratégies pour la conception d'inhibiteurs thérapeutiques des CCDVs (Béguin et al. 2014).

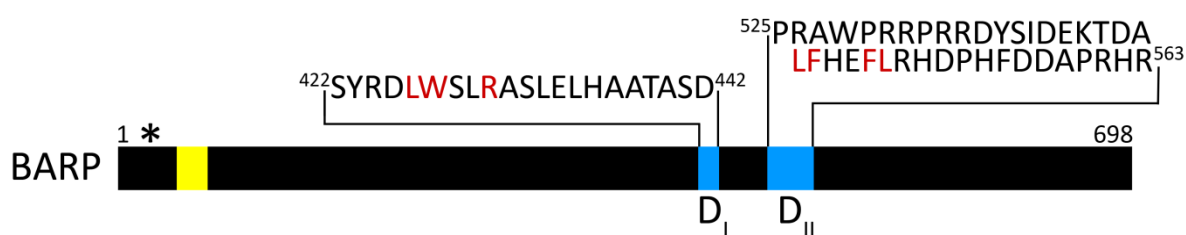


Figure 12. Les domaines structuraux et fonctionnels de BARP. Le site de glycosylation (*), la région transmembranaire (jaune) et les domaines I et II (bleu) qui fixent $Ca_v\beta$ sont illustrés. Les acides aminés en rouge sont cruciaux pour l'interaction avec $Ca_v\beta$.

ii. $Ca_v\beta$ et les protéines synaptiques

Plusieurs études ont montré que $Ca_v\beta$ interagit avec des protéines synaptiques (Kiyonaka et al. 2007; Vendel, Terry, et al. 2006). RIM1 est une protéine de l'espace pré-synaptique impliquée dans la transmission synaptique et la plasticité qui régule l'exocytose des vésicules synaptiques (Yang & Calakos 2011; Schoch et al. 2002). RIM1 se lie directement et avec une grande affinité à $Ca_v\beta_{4b}$ et $Ca_v\beta_{2a}$ par l'intermédiaire de la séquence SH3-HOOK-GK de $Ca_v\beta$ et le domaine C-terminal de RIM1. La conséquence de cette interaction est un changement hyperpolarisant de l'inactivation dépendante du potentiel. La surexpression de RIM1 dans les cellules PC12 et dans des neurones en culture active la libération des neurotransmetteurs. En effet, la libération d'acétylcholine est considérablement activée par RIM1 et par son domaine

C-terminal. Inversement, une inactivation accélérée du courant calcique et une inhibition de la libération d'acétylcholine sont observées quand un variant de $\text{Ca}_v\beta$ incapable de lier RIM1 est exprimé dans les cellules PC12. L'expression de ce variant inhibe également la libération de glutamate dans des neurones en culture (Kiyonaka et al. 2007). Ces observations mettent en évidence un rôle direct de $\text{Ca}_v\beta$ dans l'organisation de la libération des vésicules synaptiques *via* son interaction avec RIM1 (Kiyonaka et al. 2007; Buraei & Yang 2010; Weiss et al. 2011). Il a également été montré que l'extrémité N-terminale de $\text{Ca}_v\beta_3$ et $\text{Ca}_v\beta_{4a}$ se lie à la synaptotagmine I, un membre d'une grande famille de protéines neuronales qui fonctionne comme un détecteur de Ca^{2+} dans la libération des neurotransmetteurs (Südhof & Rizo 1996; Fernandez et al. 2001). Le rôle physiologique reste cependant à établir (Vendel, Terry, et al. 2006; Buraei & Yang 2010).

iii. Ahnak régule les courants de type-L via $\text{Ca}_v\beta_{2a}$

Le nombre croissant des protéines capables d'interagir avec $\text{Ca}_v\beta$ étend la fonctionnalité de cette sous-unité. Ahnak est un autre exemple de ces protéines: c'est une protéine ubiquitaire, de signalisation et d'échafaudage qui contrôle la perméabilité membranaire et l'homéostasie intracellulaire du Ca^{2+} (Shao et al. 2009). Plusieurs études ont montré que Ahnak interagit avec la sous-unité $\text{Ca}_v\beta$ dans divers types cellulaires, notamment les cellules musculaires cardiaques, les ostéoblastes et les lymphocytes T (Buraei & Yang 2010). L'interaction prend lieu dans des sites multiples de l'extrémité C-terminale d'Ahnak tandis que la région cible sur $\text{Ca}_v\beta_{2a}$ n'est pas encore identifiée. La capacité d'Ahnak d'être co-immunoprécipitée avec $\text{Ca}_v\beta_{1b}$, $\text{Ca}_v\beta_3$ et $\text{Ca}_v\beta_{2a}$ suggère que l'interaction se fait avec les domaines conservés (SH3 ou GK) de $\text{Ca}_v\beta$ (Shao et al. 2009; Alvarez et al. 2004; Haase et al. 1999). L'interaction d'Ahnak avec $\text{Ca}_v\beta_{2a}$ réduit l'activité du canal de type-L. En outre, $\text{Ca}_v\beta_{2a}$ et Ahnak peuvent être phosphorylées par la PKA ce qui conduit à un affaiblissement de la liaison entre les deux protéines et ainsi une régulation positive des courants de type-L (Haase et al. 2005). Par conséquent, il a été suggéré que l'interaction Ahnak/ $\text{Ca}_v\beta_{2a}$ réprime l'activité des canaux de type-L et que leur phosphorylation par la PKA les séparent pour lever cette inhibition (Haase et al. 2005; Haase 2007).

Une étude récente a montré que les lymphocytes T de souris déficientes pour l'expression d'Ahnak1 présentent une réponse défectueuse à une stimulation du récepteur des cellules T ('TCR' pour 'T-cell receptor'), *in vitro*, ce qui entraîne une réduction de la prolifération et une diminution de la production d'interleukine-2. Ces cellules sont aussi caractérisées par une

altération du flux calcique. Il a été suggéré que ce déficit provient d'une diminution de l'expression des canaux calciques de type-L à la membrane plasmique lié à un défaut d'interaction entre Ahnak1 et $Ca_v\beta$. Ainsi, Ahnak1 joue un rôle important dans la signalisation du calcium dans les lymphocytes T éventuellement par l'intermédiaire de $Ca_v\beta$ (Matza et al. 2008).

iv. L'actine: le partenaire le plus récemment identifié de $Ca_v\beta$

Le trafic des canaux ioniques à la surface cellulaire implique leur incorporation dans des vésicules qui se déplacent le long des filaments d'actine et des microtubules. Dans leur étude récente, Stölting et ses collaborateurs ont découvert une interaction directe entre $Ca_v\beta_2$ et les filaments d'actine. Cette interaction, démontrée *in vitro* et *in vivo*, implique à la fois les domaines SH3 et GK de $Ca_v\beta$ ce qui suggère que la liaison à l'actine est une propriété partagée par toutes les $Ca_v\beta$ s. D'autre part, la surexpression de $Ca_v\beta_2$ dans des cardiomyocytes stimule les courants de type-L sans modifier leur dépendance au voltage. Cette régulation positive des courants est décrite comme dépendante de l'interaction entre $Ca_v\beta$ et l'actine. En effet, en présence du cytochalasine D, un perturbateur de la polymérisation de l'actine, la surexpression de $Ca_v\beta_2$ n'entraîne plus une augmentation des courants de type-L. Ces résultats mettent en évidence l'importance de $Ca_v\beta$ pour l'expression des CCDVs à la surface cellulaire et pointent au éventuel mécanisme par lequel $Ca_v\beta$ contrôle l'adressage du canal à la membrane plasmique *via* son interaction avec l'actine (Stölting et al. 2015).

f. Les fonctions de $Ca_v\beta$ indépendantes du canal

Depuis plusieurs décennies, les fonctions décrites de $Ca_v\beta$ ont été exclusivement liées au canal calcique. Cependant, au cours des dernières années, plusieurs études ont indiqué que $Ca_v\beta$ peut accomplir un plus large éventail de fonctions comprenant des tâches indépendantes du canal. La première étude de ces fonctions a montré qu'un variant d'épissage alternatif de $Ca_v\beta_{4c}$, $Ca_v\beta_{4c}$, exprimée dans la cochlée de poulet et le cerveau, interagit directement avec Heterochromatin Protein 1 ($HP1\gamma$), une protéine nucléaire impliquée dans la régulation de l'expression génique (Hibino et al. 2003). Cette protéine contient un domaine modificateur de l'organisation de la chromatine dit « chromodomain » essentiel pour l'extinction des gènes, et un domaine « Chromo-Shadow Domain » (CSD) qui agit comme une plateforme pour l'assemblage d'une variété de protéines nucléaires (Platero et al. 1995). $Ca_v\beta_{4c}$ est un variant tronqué de $Ca_v\beta_4$ dépourvu de 90% de son domaine GK et de l'ensemble de son extrémité C-

terminale. $\text{Ca}_v\beta_{4c}$ et $\text{HP1}\gamma$ co-localisent dans le noyau des cellules ciliées de la cochlée. Leur co-expression dans des cellules tsA201 entraîne l'adressage de $\text{Ca}_v\beta_{4c}$ au noyau et l'inhibition de l'activité d'inactivation des gènes de $\text{HP1}\gamma$ d'une manière dose-dépendante (voir chapitre 1. Figure 8). Ces observations étaient spécifiques à $\text{Ca}_v\beta_{4c}$ parce qu'un variant plus long de $\text{Ca}_v\beta_4$ ne présente plus d'effet sur l'activité de $\text{HP1}\gamma$. En outre, l'expression de $\text{Ca}_v\beta_{4c}$ avec $\text{HP1}\alpha$ ou $\text{HP1}\beta$ également redirige $\text{Ca}_v\beta_{4c}$ vers le noyau, montrant que d'autres isoformes de HP1 peuvent se lier à $\text{Ca}_v\beta_{4c}$. En 2011, Xu et al. (Xu et al. 2011) ont confirmé et significativement étendu les résultats d'Hibino et al. (Hibino et al. 2003). Ils ont révélé que l'interaction prend lieu à travers un motif 'PXVXL' situé dans l'extrémité C-terminale de $\text{Ca}_v\beta_{4c}$, ce motif est bien connu pour être présent dans différentes protéines capables de s'associer à HP1 (Smothers & Henikoff 2000). La même étude montre que la séquence 'PVVLV' conservée dans le domaine GK des $\text{Ca}_v\beta$ s est nécessaire pour la liaison au CSD. Cependant, l'étude de la structure 3D de $\text{Ca}_v\beta$ montre que la séquence 'PVVLV' est enfouie dans le domaine GK, ce qui pourrait expliquer le manque d'interaction de $\text{Ca}_v\beta$ avec le CSD. En revanche, dans le domaine GK tronqué de $\text{Ca}_v\beta_{4c}$, la séquence 'PVVLV' pourrait être accessible et interagir avec d'autres protéines. Ces observations classent $\text{Ca}_v\beta_{4c}$ dans la famille des protéines PXVXL impliquées dans les processus de modifications épigénétiques (Xu et al. 2011).

L'idée que $\text{Ca}_v\beta$ joue un rôle dans la régulation des gènes a également été supportée par l'étude réalisée par Zhang et al. montrant que $\text{Ca}_v\beta_3$ interagit avec un nouveau variant d'épissage du facteur de transcription Pax6 (Zhang et al. 2010). Ce facteur de transcription est essentiel pour le développement des yeux et du système nerveux. Il comporte deux domaines de liaison à l'ADN reliés par un motif riche en glycine et un domaine de transactivation (riche en proline, sérine et thréonine) situé en C-terminal. ce nouveau variant d'épissage de Pax6, appelé Pax6(S), diffère de Pax6 par son extrémité C-terminale tronquée et par la présence d'une queue riche en sérine. L'expression de Pax6(S) avec le canal calcique comprenant $\text{Ca}_v\beta_3$ dans des ovocytes de *Xenopus* n'affecte pas les propriétés du canal, mais rend $\text{Ca}_v\beta_3$ capable de passer du cytoplasme vers le noyau pour réprimer l'activité transcriptionnelle de Pax6(S). $\text{Ca}_v\beta_{1b}$, $\text{Ca}_v\beta_{2a}$ et $\text{Ca}_v\beta_4$ sont également capables d'interagir avec Pax6(S) suggérant que l'interaction prend lieu dans un domaine conservé de $\text{Ca}_v\beta$. La queue riche en sérine de Pax6(S) est probablement responsable de l'interaction avec $\text{Ca}_v\beta$. Ces résultats montrent que $\text{Ca}_v\beta$ peut interagir directement avec un facteur de transcription et réguler son activité (Zhang et al. 2010).

En 2012, Tadmouri et al. ont également démontré la participation de $Ca_v\beta$ dans la régulation des gènes. Ce groupe a montré que $Ca_v\beta_4$ interagit physiquement avec B56 δ , une sous-unité régulatrice de la phosphatase 2A (PP2A), et rentre ensuite dans le noyau pour participer à la régulation de la transcription génique (Tadmouri et al. 2012). Dans cette étude, une nouvelle voie de signalisation a été caractérisée par laquelle $Ca_v\beta_4$ pourrait permettre un couplage direct entre l'excitabilité neuronale et la transcription des gènes (Figure 13).

Il a été proposé que, sous l'effet de la dépolarisation membranaire, $Ca_v\beta_4$ se dissocie de $Ca_v\alpha_1$, ce qui est en accord avec les observations antérieures sur la réversibilité de l'interaction $Ca_v\alpha_1/Ca_v\beta$. Néanmoins, les mécanismes par lesquels la dépolarisation peut modifier l'affinité de $Ca_v\beta$ pour $Ca_v\alpha_1$ n'ont pas encore été élucidés. $Ca_v\beta_4$ est alors capable d'interagir avec B56 δ et PP2A et d'être adressée vers le noyau où elle recrute HP1 γ . Le complexe protéique structuré par $Ca_v\beta_4$ s'associe au promoteur du gène de la tyrosine hydroxylase (TH) par l'intermédiaire du facteur de transcription TR α (pour 'Thyroid receptor α ') entraînant la déphosphorylation des histones H3 associés à ce promoteur et l'interaction de HP1 γ avec les histones déphosphorylés. La formation de ce complexe conduit ainsi à la répression de l'expression du gène de la TH en deux étapes, d'abord par un effet inhibiteur direct de $Ca_v\beta_4$ sur TR α , puis par le recrutement de HP1 γ qui favorise la compaction de la chromatine (Tadmouri et al. 2012).

Cette voie de signalisation est interrompue par la mutation R482X de $Ca_v\beta_4$, entraînant l'absence d'un domaine C-terminal de $Ca_v\beta_4$, associée à une forme d'épilepsie humaine (Escayg et al. 2000). Ce mutant est en effet incapable de former un complexe avec B56 δ , présente un défaut d'adressage au noyau ainsi que d'interaction avec HP1 γ et les histones. Par conséquent, cette mutation conduit à une interruption complète de la voie de signalisation de $Ca_v\beta_4$ (Tadmouri et al. 2012).

Cependant, l'existence du mutant épileptique de $Ca_v\beta_4$ (β_{1-481}) dans le noyau a été mise en doute par une étude montrant la présence de ce mutant dans le noyau des myotubes, des neurones de l'hippocampe et des cellules tsA201 (Etemad, Campiglio, et al. 2014). Ces résultats contradictoires montrent que les processus conduisant à la localisation nucléaire de $Ca_v\beta_4$ sont encore loin d'être élucidés. Ainsi, la présence ou pas de $Ca_v\beta$ dans le noyau peut dépendre de différents partenaires protéiques qui rendent difficile la comparaison entre les études et les types cellulaires.

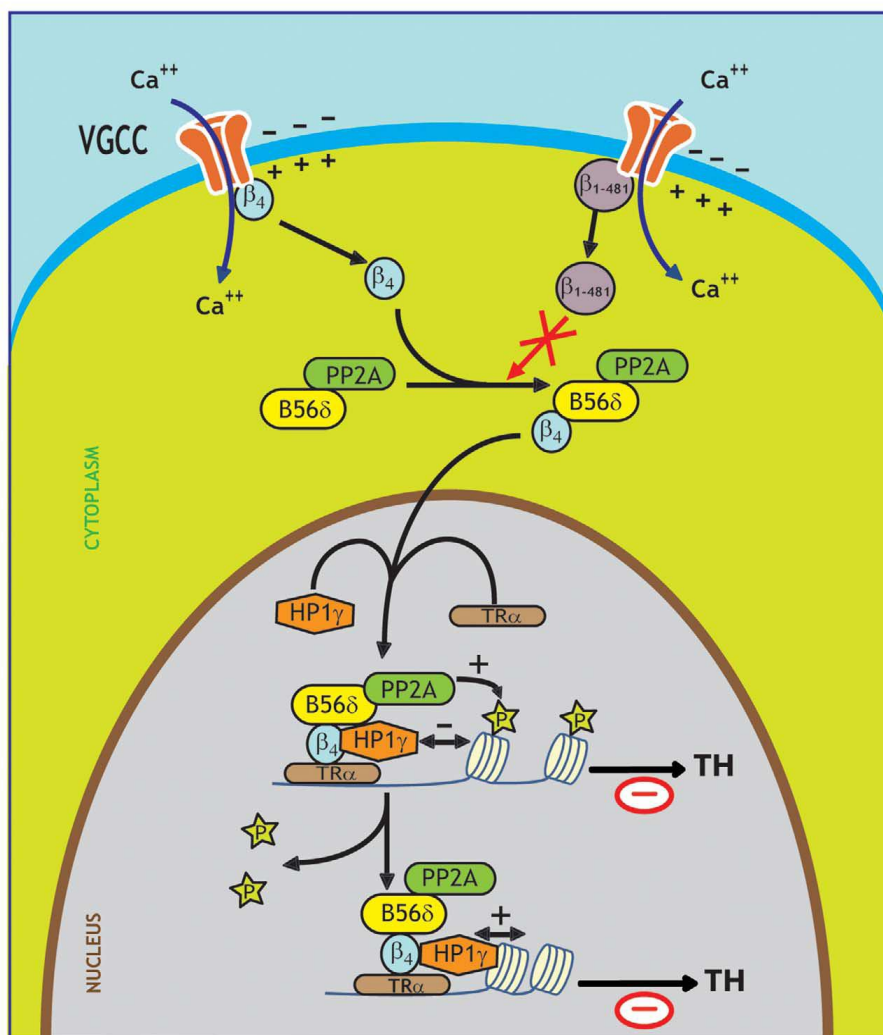


Figure 13. Représentation schématique de la nouvelle voie de signalisation de $Ca_v\beta_4$ et des étapes défectueuses pour son mutant épileptique β_{1-481} (Tadmouri et al. 2012).

Dans une autre étude, Ronjat et al. ont étudié l'impact de $Ca_v\beta_4$, ainsi que de son mutant épileptique, sur la régulation de plusieurs gènes *in vitro*. En effet, la surexpression de $Ca_v\beta_4$ dans les cellules HEK293 modifie l'expression d'un ensemble de gènes parmi lesquels un grand nombre est différemment régulé lorsque $Ca_v\beta_4$ est remplacé par le mutant épileptique (Ronjat et al. 2013). L'expression de β_4 entraîne la surexpression et l'inhibition de 49 et 27 gènes, respectivement. En se basant sur les annotations du projet « Gene Ontology », les transcrits ont été regroupés dans des groupes fonctionnels (Figure 14). Les résultats montrent que parmi les transcrits régulés, certains encodent des protéines avec des fonctions liées à la transcription et la signalisation. Plusieurs gènes régulés par $Ca_v\beta_4$ dans des cellules HEK293 ont été aussi régulés lors de la différenciation neuronale des cellules NG108-15, ce qui est en corrélation avec la translocation nucléaire de $Ca_v\beta_4$. Ces résultats renforcent le lien entre le ciblage nucléaire de $Ca_v\beta_4$ et la régulation génique (Ronjat et al. 2013).

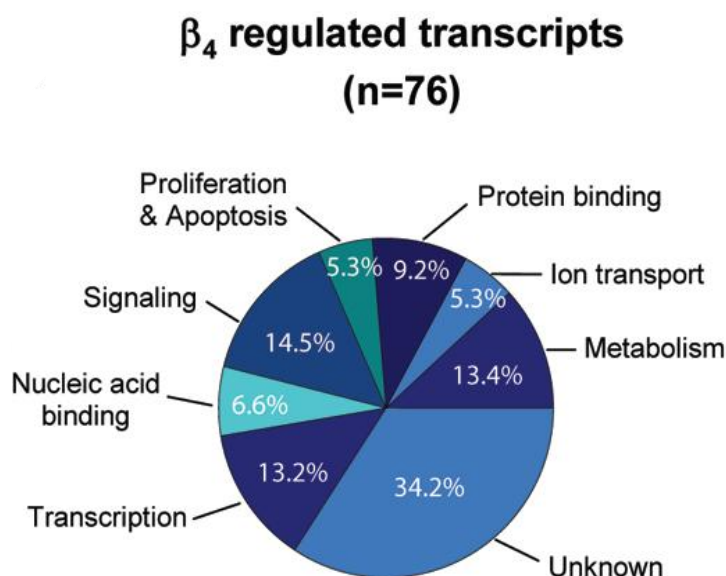


Figure 14. Activité transcriptionnelle induite par l'expression de β_4 (Ronjat et al. 2013). Classification fonctionnelle de l'ensemble des transcrits régulés par l'expression de β_4 dans les cellules HEK293.

Par la suite, plusieurs études ont été menées pour étudier l'implication des variants d'épissage de $\text{Ca}_v\beta_4$ dans la régulation génique. Plus récemment, un variant de $\text{Ca}_v\beta_4$ dépourvu du domaine N-terminal ($\text{Ca}_v\beta_{4e}$) a été identifié dans le cervelet de souris et les cellules granulaires du cervelet en culture (Etemad, Obermair, et al. 2014). Ce variant régule les courants de type-P/Q dans les cellules tsA201 et l'expression de $\text{Ca}_v2.1$ dans les neurones, par contre, il ne montre aucune propriété de ciblage nucléaire. La comparaison de $\text{Ca}_v\beta_{4e}$ avec deux autres variants de $\text{Ca}_v\beta_4$ ($\text{Ca}_v\beta_{4a}$ et $\text{Ca}_v\beta_{4b}$) montre que le nombre de gènes régulés par chaque variant est proportionnel à sa capacité de ciblage nucléaire ($\text{Ca}_v\beta_{4b} > \text{Ca}_v\beta_{4a} > \text{Ca}_v\beta_{4e}$). Ensemble, ces observations confirment la spécificité des fonctions accomplies par chaque variant de $\text{Ca}_v\beta_4$ dans les neurones où $\text{Ca}_v\beta_{4b}$ joue un double rôle dans la régulation du canal et de l'expression génique, alors que $\text{Ca}_v\beta_{4e}$ sert principalement à la régulation du canal calcique (Etemad, Obermair, et al. 2014). Encore une fois, cette étude renforce le lien entre le ciblage nucléaire de $\text{Ca}_v\beta_4$ et la régulation génique.

Une étude récente avec les mêmes perspectives a été réalisée sur les cellules progénitrices musculaires. Pendant le développement ou en réponse à des lésions musculaires chez les adultes, ces cellules sont capables de proliférer, se différencier, et fusionner pour former des myofibrilles matures. La prolifération de ces cellules est régulée par des facteurs de transcription tel que la myogénine qui agit comme un interrupteur pour passer de la prolifération à la différenciation (Taylor et al. 2014). Ainsi, et en accord avec les conclusions

de Tadmouri et al., $Ca_v\beta_{1a}$ a été décrit comme capable de reconnaître la région promotrice du gène de la myogénine, portant un site E-box non-canonique (Taylor et al. 2014). En effet, la perte de $Ca_v\beta_{1a}$ augmente l'ARNm de la myogénine ainsi que son niveau protéique ce qui laisse supposer que $Ca_v\beta_{1a}$ est un inhibiteur de l'expression de la myogénine. Il est intéressant de noter que cet effet inhibiteur de $Ca_v\beta_{1a}$ disparaît après la différenciation des cellules progénitrices musculaires, ce qui suggère que le rôle de $Ca_v\beta_{1a}$ varie au cours du développement et en fonction de ses partenaires protéiques (Taylor et al. 2014).

Ces études confirment l'idée que les $Ca_v\beta$ s sont des protéines multifonctionnelles qui constituent non seulement des sous-unités des canaux calciques, mais aussi des acteurs importants des mécanismes de régulation de la transcription des gènes.

5. Pathologies liées à $Ca_v\beta$

Compte tenu des rôles physiologiques importants de $Ca_v\beta$, il est logique que les mutations ou les délétions qui touchent cette sous-unité se traduisent par différentes pathologies chez l'homme ou la souris. Ainsi, ces protéines sont essentielles pour maintenir la fonctionnalité globale de l'organisme. Plusieurs études ont généré des souris mutantes nulles $Ca_v\beta$ ($Ca_v\beta$ -KO) et ont montré que certaines délétions pourraient être mortelles (pour revue, voir (Arikkath & Campbell 2003; Karunasekara et al. 2009; Dolphin 2003)). En fait, les souris $Ca_v\beta_1$ -KO homozygotes meurent à la naissance par asphyxie. Les fœtus de ces souris ont montré une réduction des courants de type-L et une masse musculaire réduite. Il est probable que ce phénotype est dû au fait qu'aucune autre isoforme de $Ca_v\beta$ est exprimée dans le muscle squelettique (Dolphin 2003). Il est intéressant de mentionner que les hétérozygotes sont asymptotiques, ce qui indique qu'il existe normalement un niveau suffisant de $Ca_v\beta_1$, de telle sorte la perte de ~50% de l'expression de $Ca_v\beta_1$ n'a pas d'effets néfastes évidents. De même, la mutation nulle $Ca_v\beta_2$ donne lieu à un phénotype embryonnaire léthal et cet effet peut être dû à des défauts dans le muscle cardiaque parce que $Ca_v\beta_2$ est l'isoforme du CCDV cardiaque. Il est possible de sauver les souris $Ca_v\beta_2$ -KO par l'expression transgénique de $Ca_v\beta_2$ dans le tissu cardiaque; pourtant, ces souris dévoilent des anomalies rétinienne avec une sensibilité réduite à la lumière (Ball et al. 2002). Les souris $Ca_v\beta_3$ -KO ont une apparence normale montrant que d'autres $Ca_v\beta$ pourraient être en mesure de remplacer les fonctions de $Ca_v\beta_3$ (Karunasekara et al. 2009). Ces souris ne montrent pas de changements morphologiques dans le cerveau, ni dans les poumons, le cœur, la rate, les reins, le pancréas, le foie, les testicules et les ovaires. Par contre, l'absence de $Ca_v\beta_3$ réduit les courants de type-

N et -L et altère la cinétique des courants de type-P/Q dans les ganglions cervicaux supérieurs (Arikkath & Campbell 2003). Ces souris $Ca_v\beta_3$ -KO montrent également des changements de comportement liés à la douleur notamment, une sensibilité réduite à la douleur inflammatoire et thermique sans aucune altération de la sensibilité à la douleur mécanique (Murakami et al. 2002). En outre, il a été montré que le développement du système visuel est perturbé chez ces souris (Cork et al. 2001). De plus, après un régime riche en sel, ces souris montrent une pression artérielle élevée, ce qui suggère une implication des CCDVs dans la régulation de la pression artérielle (Murakami et al. 2000). Du point de vue comportemental, ces souris sont caractérisées par une augmentation de l'agressivité, des niveaux réduits d'anxiété, une nociception modifiée, et des troubles de mémoire (Murakami et al. 2007). La souris léthargique (*lh/lh*) a été décrite comme étant porteuse d'une mutation dans le gène codant la sous-unité $Ca_v\beta_4$ aboutissant à une protéine tronquée qui se dégrade rapidement. Ces souris montrent des signes d'ataxie, des crises motrices focales spontanées et un comportement léthargique. Les souris léthargiques survivent de 15 à 60 jours, elles sont caractérisées par une réduction du poids corporel, des dysfonctionnements immunologiques et une mortalité élevée. Bien qu'ils récupèrent une grande partie de leurs fonctions immunitaires et du poids au cours du temps, une fertilité réduite est observée chez les souris qui survivent au-delà de deux mois. Il est important de mentionner que différents phénotypes sont observés entre les souris $Ca_v\beta_3$ -KO et $Ca_v\beta_4$ -KO, ce qui suggère que ces deux sous-unités ne sont pas fonctionnellement équivalentes (Burgess et al. 1999; Arikkath & Campbell 2003). Pour résumer, les études utilisant des modèles de souris $Ca_v\beta$ -KO montrent que la perte de $Ca_v\beta$ est létale, sinon, elle génère des insuffisances fonctionnelles dures.

D'un autre côté, les mutations qui touchent les gènes codant les sous-unités $Ca_v\beta$ ont été aussi associées à une variété de pathologies. L'analyse du polymorphisme nucléotidique « SNP » (pour 'single-nucleotide polymorphism') associé aux troubles psychiatriques, y compris la schizophrénie, les troubles bipolaires, les troubles dépressifs majeurs, les troubles du déficit de l'attention avec hyperactivité et les troubles du spectre autistique a révélé des SNPs à quatre loci. Parmi eux, un SNP a été identifié dans un intron du gène qui code la sous-unité $Ca_v\beta_2$ des CCDVs de type-L (Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium 2013). L'idée que la mutation de *CACNB2* peut être associée à des troubles neurologiques a été soutenue par une étude dans laquelle Breitenkamp et al. ont identifié trois mutations de *CACNB2* chez des patients souffrants des troubles du spectre autistique (Breitenkamp et al. 2014). Pris ensemble, ces résultats suggèrent que l'autisme peut être dû à

un dysfonctionnement des canaux calciques qui à son tour est lié à une mutation de $Ca_v\beta$. De plus, une des plus grandes études génétiques menées à ce jour pour identifier les loci associés à la schizophrénie a décrit *CACNB2* comme l'un des gènes les plus déséquilibrés, ce qui indique que le dysfonctionnement de cette sous-unité du canal peut jouer un rôle important dans l'étiologie des maladies psychiatriques sévères (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium 2014). En outre, ce gène a également été lié à des maladies cardio-vasculaires (pour revue, voir (Soldatov 2015)). Par exemple, dans une myocardiopathie hypertrophique obstructive, $Ca_v\beta_2$ est surexprimé, ce qui conduit probablement à une surexpression des canaux calciques (Haase et al. 1996; Wei et al. 2000). L'épilepsie myoclonique juvénile humaine a été associée à des variations dans les régions codantes et non-codantes de *CACNB4*. Une de ces mutations (R482X) conduit à la troncature des derniers 38 acides aminés de la protéine. Une deuxième mutation de *CACNB4* correspondante à la substitution d'une cystéine par une phénylalanine (C104F) a été enregistrée chez un patient souffrant d'une ataxie convulsive (Escayg et al. 2000). En 2008, une autre mutation de *CACNB4* correspondante à la substitution d'une arginine par une glutamine (R468Q) a été décrite. Cette mutation a été identifiée chez un jeune patient, ainsi que chez son père, atteint de l'épilepsie myoclonique sévère du nourrisson autrement appelée syndrome de Dravet (Ohmori et al. 2008). Ces observations révèlent l'association entre les mutations de $Ca_v\beta$ et un large éventail de troubles neurologiques et non neurologiques.

Le syndrome myasthénique de Lambert-Eaton est défini comme une maladie auto-immune dans laquelle les boucles extracellulaires des canaux calciques pré-synaptiques sont reconnues par des auto-anticorps conduisant à un défaut dans la transmission synaptique au niveau de la jonction neuromusculaire (Lang et al. 1981). Cependant, des anticorps anti- $Ca_v\beta_3$ et anti- $Ca_v\beta_4$ ont été détectés dans le sérum des patients atteints par cette pathologie (Raymond et al. 1999). La contribution de ces anticorps dans la maladie reste incertaine car $Ca_v\beta$ est une protéine intracellulaire et il est douteux qu'elle soit une cible pour ces anticorps dans le muscle intact.

La schistosomiase est une maladie parasitaire qui nuit au système nerveux et à d'autres organes internes. La maladie est une conséquence d'une infection parasitaire par des trématodes appelés schistosomes. Même si l'infection peut être traitée efficacement par le praziquantel (PZQ), le mécanisme d'action exact reste incertain. Récemment, il a été suggéré que le PZQ vise une variante de $Ca_v\beta$ chez ces schistosomes. En effet, il a été montré que

l'inhibition de l'expression de $Ca_v\beta$, par des siRNA, confère aux schistosomes une résistance au PZQ (Nogi et al. 2009). Bien que le mécanisme explicite reste à élucider, cette observation ouvre des nouvelles pistes de recherche intéressantes pour étudier la sous-unité $Ca_v\beta$ comme un site d'action de médicaments thérapeutiques.

Chapitre III.

La voie de signalisation des protéines Wnt

1. Généralités

La voie de signalisation des protéines Wnt joue un rôle important pendant le développement embryonnaire (Logan & Nusse 2004) et intervient dans l'auto-renouvellement des cellules souches qui servent à la réparation des tissus adultes, suite à un endommagement (Haegebarth & Clevers 2009). Elle est aussi impliquée dans les événements précoces du développement cérébral (Mulligan & Cheyette 2012). En effet, elle joue un rôle important dans la formation de la synapse et son remodelage, la croissance dendritique et d'arborisation, la neurotransmission, la neuroplasticité et la neurogenèse (Maguschak & Ressler 2012). En conséquence, elle régule de nombreux processus cellulaires, y compris la prolifération/sénescence, la différenciation cellulaire, la survie/l'apoptose, la régénération, la polarité et le mouvement cellulaire (Al-Harhi 2012).

2. Wnt et Frizzled

La voie de signalisation des protéines Wnt n'implique pas qu'un seul système de signalisation. En fait, elle regroupe une collection de systèmes de signalisation déclenchée par l'interaction entre le ligand Wnt et son récepteur Frizzled « Fz ». Wnt est une famille de glycoprotéines extracellulaires sécrétées. Ces protéines de 350-400 a.a. sont riches en cystéine et portent dans leur région N-terminale un peptide signal pour la sécrétion. La protéine murine « Wnt3a » représente la première protéine Wnt purifiée et caractérisée (Willert et al. 2003) du fait qu'elle est sécrétée efficacement (contrairement à la plupart des autres protéines Wnt). Le récepteur Fz est une protéine à sept domaines transmembranaires d'environ 650 a.a contenant un domaine riche en cystéine extracellulaire (CRD), qui est le site de liaison putatif pour les ligands Wnt (Vinson et al. 1989). La diversité des fonctions régulées par la voie Wnt est due à la diversité de ses acteurs; c'est un ensemble de 19 ligands, 10 récepteurs et/ou récepteurs alternatifs, ainsi qu'une gamme de transducteurs du signal. À cet égard, une multitude de combinaisons entre ces différents acteurs sont possibles.

La voie de signalisation peut être canonique, si elle dépend de la β -caténine, ou non canonique, donc indépendante de la β -caténine. Généralement, Wnt1/ 2/ 3/ 3a/ 8a/ 8b/ 10a/ 10b et Fz1/ 5/ 7/ 9 sont classés comme les éléments canoniques, alors que Wnt4/ 5a/ 5b/ 6/

7a/ 7b/ 11 et Fz2/ 3/ 4/ 6 sont désignés comme non canoniques (Pez et al. 2013). Le reste : Wnt2b/ 9a/ 9b/ 16 et Fz8/ 10 demeurent non classés (Huelsken & Behrens 2002).

3. Signalisation Wnt/ β -caténine canonique

La majorité des fonctions régulées par la voie Wnt, surtout la régulation de l'expression génique, mettent en jeu la β -caténine (cette protéine sera détaillée plus tard). En effet, l'interaction entre Wnt et son récepteur Fz, au niveau de la membrane plasmique, est communiquée aux gènes cibles par la translocation nucléaire de la β -caténine où elle interagit avec des protéines de liaison à l'ADN (DNA-binding proteins) qui reconnaissent des séquences spécifiques dans les promoteurs des gènes cibles.

L'interaction de la β -caténine avec ces facteurs de transcription est médiée par le domaine central formé de 12 répétitions dites 'armadillo' tandis que les domaines N- et C- terminaux portent des fonctions d'activation de la transcription (Orsulic and Peifer 1996; van de Wetering et al. 1997; Hsu et al. 1998). Ainsi, le recrutement de la β -caténine aux gènes cibles active la transcription par l'action de ces domaines ainsi que celle des coactivateurs (Mosimann et al. 2009; cadigan 2012).

a. Mécanisme de la signalisation Wnt/ β -caténine

En absence de Wnt (Figure 15A), la β -caténine est constamment dégradé, dans le cytoplasme, par l'action d'un complexe de dégradation composé de la protéine d'échafaudage « l'axine », le produit du gène suppresseur de tumeur *adenomatous polyposis coli* « APC », la caséine kinase 1 « CK1 » et la glycogène synthase kinase 3 « GSK3 ». La GSK3 et la CK1 phosphorylent séquentiellement la région N-terminale de la β -caténine, ce qui entraîne sa reconnaissance par la β -TrCP (une sous-unité de l'ubiquitine ligase E3), sa ubiquitination et sa dégradation par le protéasome (He et al. 2004). En effet, l'Axine coordonne la phosphorylation séquentielle de la β -caténine par CK1 α (Ser⁴⁵) puis par GSK3 (Thr⁴¹, Ser³⁷ et Ser³³) (Kimelman & Xu 2006). La phosphorylation des sérines 33 et 37 crée un site de liaison pour la β -TrCP, conduisant à l'ubiquitination de la β -caténine et à sa dégradation. Des mutations de la β -caténine au niveau et autour de ces résidus sérine et thréonine génèrent une β -caténine mutante qui s'échappe de la phosphorylation et la dégradation. Cette élimination continue de β -caténine l'empêche d'atteindre le noyau, ainsi, les gènes cibles sont réprimés par la famille des protéines TCF /LEF (T-cell factor/lymphoid enhancer factor).

La voie Wnt/ β -caténine est activée lorsqu'un ligand Wnt se lie à son récepteur transmembranaire Fz et son corécepteur LRP6 (low-density lipoprotein receptor related protein 6) ou LRP5 (Figure 15B). La formation du complexe Wnt-Fz-LRP6 ainsi que le recrutement de la protéine d'échafaudage Dishevelled (DVL) provoquent la phosphorylation et l'activation de LRP6 et le recrutement du complexe de dégradation aux récepteurs. Ces événements conduisent à l'inhibition de la phosphorylation de la β -caténine et par conséquent à sa stabilisation. La β -caténine, peut alors rentrer et s'accumuler dans le noyau pour former un complexe avec TCF/LEF et activer l'expression des gènes cibles (MacDonald et al. 2009) tel que l'*Axine2* et la *CycD1* (Jho et al. 2002; Shtutman et al. 1999).

Bien que la signalisation Wnt/ β -caténine soit généralement induite par la liaison des glycoprotéines Wnt à Fz, une signalisation atypique peut se produire. Des données plus ou moins récentes indiquent que la β -caténine est emballée dans les exosomes, ce qui entraîne une diminution des taux de β -caténine indépendamment de l'activité de GSK3 ou de la dégradation par le protéasome (Chairoungdua et al. 2010). De plus, des inhibiteurs pharmacologiques de l'activité de GSK3 tel que le chlorure de lithium (LiCl) peut induire la signalisation dépendante de la β -caténine même en absence de Wnt.

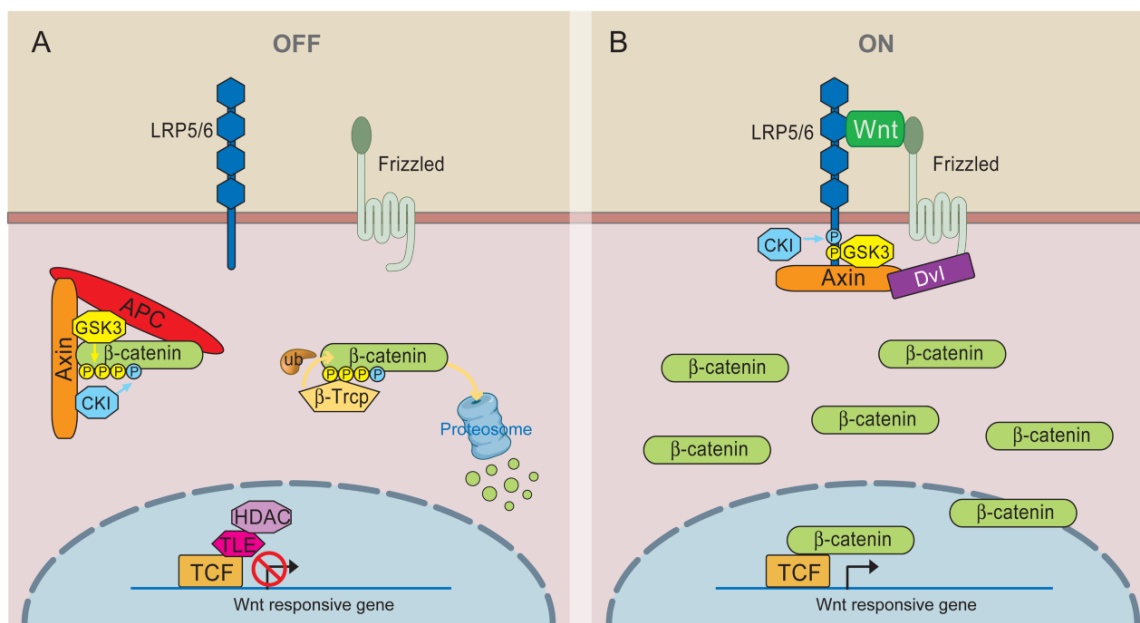


Figure 15. Vue d'ensemble de la signalisation Wnt/ β -caténine (MacDonald et al. 2009). (A) En l'absence de Wnt, la β -caténine forme un complexe avec l'axine, APC, GSK3 et CK1. Elle est ainsi phosphorylée par CK1 (en bleu) puis par la GSK3 (en jaune). La β -caténine phosphorylée est ensuite reconnue par la β -TrCP ce qui aboutit à sa dégradation par le protéasome. De ce fait, les gènes cibles sont réprimés par TCF-TLE/Groucho et les histones désacétylases (HDAC). (B) En présence de Wnt, un complexe de récepteurs se forme entre Fz et LRP5/6. Le recrutement de DVL par Fz conduit à la

phosphorylation de LRP5/6 et au recrutement de l'axine. Ceci perturbe la phosphorylation et la dégradation de la β -caténine médiée par l'axine, ce qui permet à la β -caténine de s'accumuler dans le noyau où elle sert comme un coactivateur de TCF pour activer l'expression des gènes cible.

Plusieurs aspects du complexe de dégradation de la β -caténine méritent d'être soulignés (Figure 16).

- 1- En plus de la β -caténine, GSK3 et CK1 phosphorylent également l'axine et l'APC, conduisant à une augmentation de leur association avec la β -caténine et donc favorisent la phosphorylation et la dégradation de la β -caténine (Huang & He 2008; Kimelman & Xu 2006).
- 2- Deux phosphatases « PP1 » et « PP2A » peuvent s'associer à l'Axine et/ou à l'APC et neutraliser l'action de la GSK3 et/ou la CK1 dans le complexe de dégradation. Ainsi, PP1 déphosphoryle l'Axine et favorise le désassemblage du complexe (Luo et al. 2007), tandis que PP2A déphosphoryle la β -caténine (Su et al. 2008). Chacune de ces phosphatases conduit ainsi à une réduction de la dégradation de la β -caténine. Il faut noter que PP2A peut avoir des rôles multiples et opposés dans la voie Wnt en fonction des sous-unités régulatrices associées particulières et des substrats (Kimelman & Xu 2006)

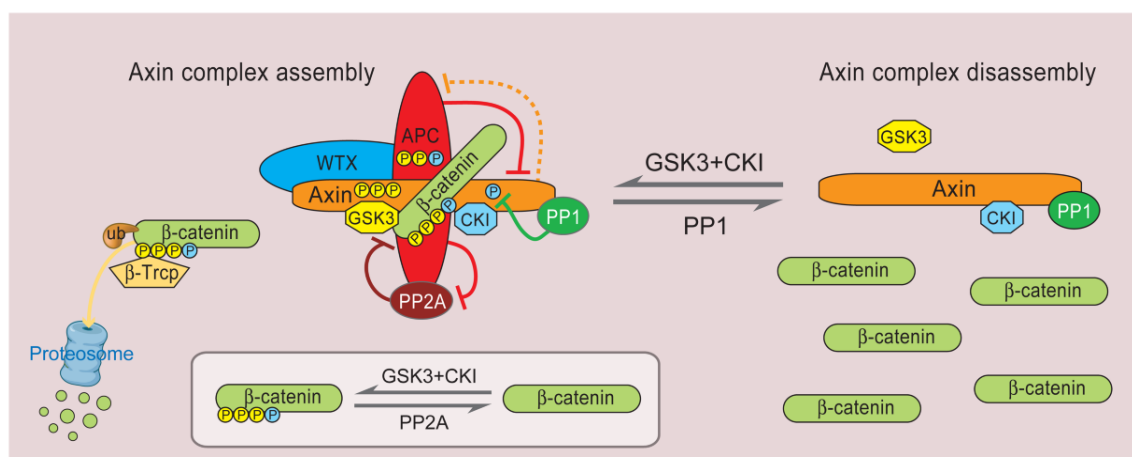


Figure 16. La régulation du complexe de dégradation de la β -caténine (MacDonald et al. 2009).

Les composants de base du complexe de dégradation : Axine, APC, GSK3 et CK1 favorisent la phosphorylation de la β -caténine pour sa dégradation par β -TrCP. En plus de la phosphorylation de β -caténine, la GSK3 (jaune) et la CK1 (bleu) phosphorylent également l'Axine et l'APC ce qui stabilise leur liaison à la β -caténine ainsi que le complexe de dégradation. L'encadrement montre la phosphorylation de la β -caténine (par CK1 et GSK3) et sa déphosphorylation (par PP2A). L'APC peut également agir pour empêcher la déphosphorylation de la β -caténine par PP2A. L'APC facilite paradoxalement la dégradation de l'Axine et réciproquement (indiqué par la ligne en pointillés). PP1 déphosphoryle l'Axine d'une manière à antagoniser sa phosphorylation par la CK1. Ceci régule négativement la liaison entre la GSK3 et l'Axine entraînant la dissociation du complexe.

b. La β -caténine

i. Structure et fonctions

Pour plus d'une décennie, les caténines (β , γ et p120) ont été considérées comme des cofacteurs pour une classe de molécules d'adhésion cellulaire transmembranaire connues sous le nom des cadhérines. Cependant, différentes études ont révélé que ces caténines sont des molécules multifonctionnelles qui peuvent passer du cytoplasme vers le noyau pour réguler l'expression génique tout en interagissant avec des facteurs de transcription. L'exemple le plus connu est la β -caténine qui joue un rôle majeur dans la voie Wnt canonique.

La β -caténine, codée par le gène *CTNNB1*, est un membre de la famille des protéines à domaine armadillo. Cette protéine (92 kDa) est caractérisée par une double fonctionnalité : au niveau de la membrane plasmique, elle fait partie du complexe d'adhésion cellulaire en liant les cadhérines au cytosquelette par l'intermédiaire de l' α -caténine. Alternativement, elle était décrite dans le cytoplasme et le noyau où elle forme un complexe actif avec TCF/LEF et régule la transcription des gènes cibles de la voie Wnt (Ozawa et al. 1989). Ainsi, elle est un élément clé de la voie Wnt canonique. Sa région centrale comprenant 12 répétitions armadillo sert pour la liaison aux partenaires, tels que l'Axine, l'APC, ainsi que les facteurs de transcription (T. a. Graham et al. 2000) (Figure 17). Les domaines C- et N- terminaux sont aussi importants. En effet le domaine C-terminal de la β -caténine contribue à la formation d'une multitude de complexes qui favorisent la transcription médiée par la β -caténine. Par contre, la phosphorylation de l'extrémité N-terminale de la β -caténine favorise sa dégradation.

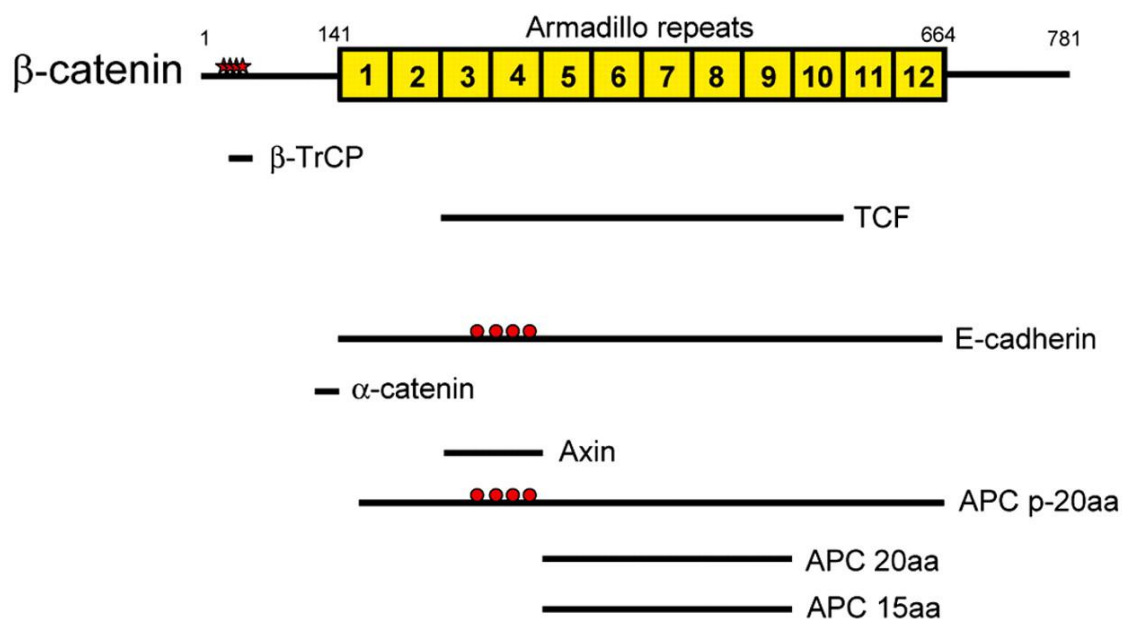


Figure 17. Représentation schématique de la β-caténine et ses partenaires (Xu & Kimelman 2007). Un résumé des régions de la β-caténine qui se lient aux partenaires décrits : les barres noires indiquent les régions de la β-caténine qui se lient aux différents partenaires, tandis que les points rouges indiquent les sites de la β-caténine qui se lient aux résidus Sérine/Thréonine phosphorylés du motif APC 20aa et des E-cadhérines. L'APC est la seule protéine qui contient plusieurs sites de liaison à la β-caténine. Elle contient deux types de motifs de liaison: trois répétitions de 15 acides aminés (APC 15aa) et sept répétitions de 20 acides aminés (APC 20aa). L'APC p-20aa représente la forme phosphorylée de la région APC 20aa. Les étoiles rouges indiquent les sites de β-caténine phosphorylés par CK1 et GSK3 qui créent le site de liaison pour β-TrCP.

ii. *Translocation nucléaire de la β-caténine*

La stabilisation de la β-caténine conduit à des niveaux nucléaires plus élevés ; par contre, le mécanisme par lequel la β-caténine est adressé vers, et retenu dans, le noyau n'est pas bien compris. Des études antérieures ont suggéré que la β-caténine rentre dans le noyau d'une façon indépendante des importines mettant en jeu une interaction directe avec les nucléoporines (Henderson & Fagotto 2002). En effet, le domaine central de la β-caténine est suffisamment homologue à un motif « HEAT » présent dans le domaine central des importines-β qui permet une interaction directe avec les protéines des pores nucléaires (Yokoya et al. 1999; Fagotto et al. 1998). Cette hypothèse est supportée par une étude sur les embryons de *Xenopus* qui montre que le domaine armadillo de la β-caténine tout seul était suffisant pour sa translocation nucléaire (Funayama et al. 1995). Bien que la fonction principale du domaine armadillo fût toujours liée à l'interaction entre les caténines et leurs partenaires, les preuves émergentes suggèrent que ce domaine peut également jouer un rôle dans la localisation nucléaire. En effet, ce domaine est le seul domaine fonctionnel de

l'importine- α , une protéine d'adressage nucléaire qui joue un rôle clé dans l'import nucléaire des protéines porteuses d'une séquence d'adressage nucléaire « NLS » (Conti et al. 1998). D'autre part, plusieurs protéines contenant le domaine armadillo (APC, β -caténine et p120 caténine) montrent une localisation nucléaire. Ces résultats renforcent l'idée que le domaine armadillo est important pour la localisation nucléaire et suggèrent que toute protéine ayant un domaine armadillo peut agir comme une protéine de translocation nucléaire. D'autres études suggèrent que l'interaction de TCF avec la β -caténine favorise sa translocation nucléaire (Revue dans (Morgan et al. 2014)).

c. *Kaiso*

Kaiso appartient à la famille des BTB/POZ (Broad complex, Tramtrak, Bric à brac/Pox virus and zinc finger): une famille de facteurs de transcription impliquée dans l'embryogenèse et le cancer. Cette famille est caractérisée par un domaine d'interaction protéine-protéine, hydrophobe, hautement conservé et situé en N-terminal dit « POZ domain » (Figure 18). Ce domaine ne sert pas seulement pour l'homodimérisation de Kaiso mais aussi pour son interaction avec d'autres protéines. Kaiso, comme les autres membres de cette famille, possède un domaine POZ dans son extrémité N-terminale qui facilite son homodimérisation. Dans son extrémité C-terminale, Kaiso dispose 3 motifs en doigts de zinc (ZF domain) responsables de la reconnaissance de l'ADN ainsi que la liaison à p120-caténine (Daniel & Reynolds 1999). Entre les domaines POZ et ZF se trouve deux régions acides (AR) impliquées dans la transcription (Cowell 1994). En 2004, Kelly et al. (Kelly, Otchere, et al. 2004) ont montré que Kaiso possède une séquence de localisation nucléaire fortement basique conservée entre les différents espèces (*Xenopus*, humain et souris). Dans cette même étude, une interaction a été montrée entre Kaiso et l'importine- α , suggérant ainsi que Kaiso utilise le mécanisme classique de translocation nucléaire médiée par l'importine- α/β (Kelly, Otchere, et al. 2004). Kaiso possède également des sites potentiels de phosphorylation (sérine/thréonine) mais le mécanisme et les conséquences de cette phosphorylation sont inconnues. L'identification de ce mécanisme ainsi que des kinases responsables de cette phosphorylation facilitera la compréhension des fonctions de Kaiso et dévoilera l'influence de sa phosphorylation sur sa distribution subcellulaire ainsi que son interaction avec d'autres protéines comme la p120-caténine.

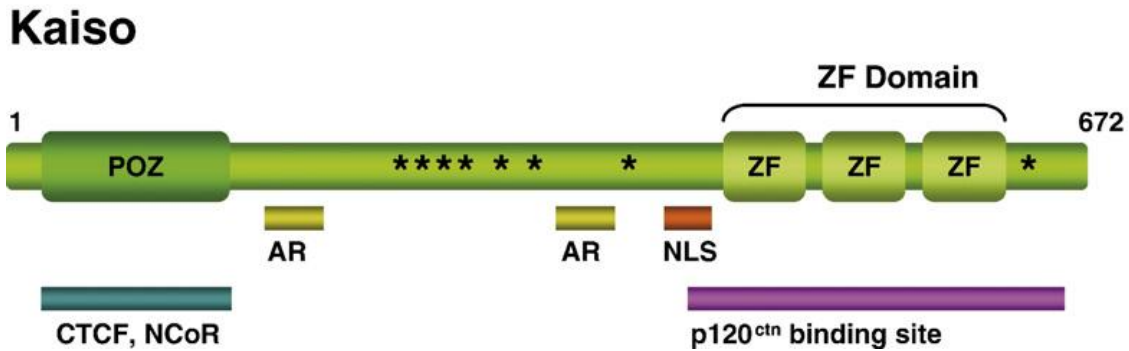


Figure 18. Représentation schématique de Kaiso (Daniel 2007). Les domaines structuraux et fonctionnels sont mis en évidence. Kaiso est caractérisée par un domaine d'interaction protéine-protéine POZ situé en N-terminal et un domaine en doigts de zinc ZF situé en C-terminale. Le signal de localisation nucléaire (NLS) et les deux régions fortement acides (AR) sont également indiqués. Kaiso a également plusieurs sites putatifs de phosphorylation (les astérisques).

Kaiso agit comme un corépresseur en inhibant l'activation des gènes médiée par β -caténine/TCF (Park et al. 2005). En effet, le chevauchement entre le site de liaison à la p120-caténine et le site de liaison à l'ADN a été considéré comme la première évidence que p120-caténine régule l'interaction entre Kaiso et l'ADN et par conséquent son activité transcriptionnelle. Même si l'idée la plus simple est que p120-caténine empêche l'interaction entre Kaiso et l'ADN, une autre hypothèse suggérant une séquestration de Kaiso dans le cytoplasme a été rejetée par Kelly et al. En effet, une forme défectueuse de p120-caténine bloquée dans le cytoplasme n'a pas pu inhiber Kaiso indiquant ainsi que la translocation nucléaire de p120-caténine est nécessaire pour l'inhibition de Kaiso (Kelly, Spring, et al. 2004). À ce jour, la liste des gènes cibles de la voie Wnt canonique continue à s'élargir (<http://www.stanford.edu/~rnusse/pathways/targets.html>) et il est important à savoir si p120-caténine/Kaiso régule ces cibles. Néanmoins, la détermination du mécanisme régulant l'interaction entre p120-caténine et Kaiso facilitera la compréhension de l'intersection entre les deux voies: p120-caténine/Kaiso et β -caténine/TCF.

d. Les facteurs de transcription TCF/LEF

La famille TCF/LEF est un groupe de facteurs de transcription qui se lient à l'ADN par un domaine de haute mobilité, d'où l'appellation 'HMG' (Pour 'high mobility group'). Du point de vue structural, quatre domaines sont conservés parmi tout les TCF/LEFs (Figure 19):

➤ Un domaine de liaison à la β -caténine

Le lien entre TCF/LEF et la voie Wnt a été conclu par double hybride suggérant que la β -caténine se lie avec LEF1 et TCF1 par un motif conservé dans le domaine N-terminal de TCF/LEF (Yokoya et al. 1999; Behrens et al. 1996; Huber et al. 1996; Molenaar et al. 1996; Van de Wetering et al. 1997; T. A. Graham et al. 2000; Poy et al. 2001)

➤ **Un domaine de liaison à l'ADN dit « HMG DBD » (pour ' HMG DNA-binding domain)**

Ce domaine regroupe un domaine HMG et un motif peptidique formé de résidus d'a.a. basiques dit « basic tail ». Ensemble, ces deux parties constituent le domaine de liaison à l'ADN dit « HMG DBD ». Ce domaine reconnaît les séquences d'ADN spécifiques avec une affinité de l'ordre des nanomolaires (Giese et al. 1991; van de Wetering & Clevers 1992; Love et al. 1995). Le motif peptidique « basic tail » est situé du côté C-terminal et séparé du domaine HMG par 9 résidus. Il agit comme un signal de localisation nucléaire pour l'interaction avec les importines (Giese et al. 1991; Prieve et al. 1998).

➤ **La séquence de liaison à Groucho GBS (Groucho binding sequence)**

En absence de la β -caténine, TCF/LEF inhibe la transcription des gènes par un processus mettant en jeu plusieurs corépresseurs parmi lesquels Groucho est le plus étudié. Ce répresseur appartient à la famille des répresseurs dite « Gro/TLE » (pour 'Groucho/transducin-like enhancer of split'). La partie N-terminal de Groucho est caractérisée par son domaine Q riche en glutamine. Par l'intermédiaire de ce domaine, Groucho interagit avec la partie centrale et le HMG DBD de TCF/LEF (Daniels & Weis 2005; Arce et al. 2009).

➤ **Un domaine dit 'C clamp'**

Ce petit domaine, riche en résidus basiques, aromatiques et en cystéine, est situé dans la partie C-terminal du domaine HMG DBD. La fonction de ce domaine a été définie en 2007 comme étant nécessaire pour la régulation génique dans des cellules cancéreuses humaines (Atcha et al. 2007). La structure de ce domaine n'est pas élucidée encore, par contre, il a été montré que ce domaine peut se lier à l'ADN constituant ainsi le second domaine de liaison à l'ADN (Atcha et al. 2007)

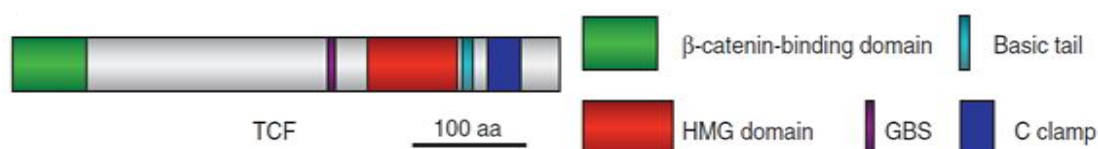


Figure 19. Représentation schématique de TCF (Cadigan & Waterman 2012) montrant ses différents domaines : le domaine de liaison à la β -caténine, la séquence de liaison à Groucho GBS, le domaine de liaison à l'ADN regroupant un domaine HMG et un motif « basic tail », et le domaine « C clamp ».

i. Hétérogénéité de TCF/LEF

Chez les vertébrés, la famille TCF/LEF s'est étendue à 4 Loci avec des promoteurs alternatifs. L'épissage alternatif et la diversité des promoteurs sont à la base de la diversité des TCF/LEFs.

Le résultat fonctionnel de cette hétérogénéité permet les différentes isoformes de TCF/LEF d'interpréter les signaux Wnt différemment. Également, les différentes isoformes de TCF/LEF peuvent se spécialiser pour réguler des gènes bien déterminés ou pour interagir avec des coactivateurs ou des corépresseurs. Pour les gènes dont l'expression est induite par Wnt/ β -caténine, le modèle standard se résume par une inhibition de la transcription par TCF/LEF, en absence du signal, qui se converti en une activation suite à l'association avec la β -caténine. Ce modèle est décrit chez les organismes qui contiennent un gène unique qui code TCF/LEF (*Drosophila*, *C.elegans*). Par contre, chez les vertébrés, le mécanisme est plus complexe suite à l'hétérogénéité de TCF/LEFs ainsi leurs capacités à inhiber ou activer la transcription des gènes cibles de la voie Wnt. Par exemple, TCF3 est connu généralement comme un répresseur des gènes régulés par la voie Wnt (Merrill et al. 2004; Kim et al. 2000). Par contre, TCF1 et LEF1 sont plutôt des activateurs (Reya et al. 2000; Kratochwil et al. 2002; Liu et al. 2005). Le mécanisme qui est à la base de ces différences fonctionnelles n'est pas connu, mais il parait qu'un motif recruteur des répresseurs situé dans la région centrale de la protéine et/ou sa partie C-terminal sont responsables de ces différences. Par exemple, un motif de 5 acides aminés (SxxSS) qui est présent obligatoirement dans TCF3 varie, suite à un épissage alternatif ; dans TCF4 et il est complètement absent dans TCF1 et LEF1 (Gradl et al. 2002; Pukrop et al. 2001; Liu et al. 2005).

Une étude dans un modèle de *Xenopus* a montré que les isoformes portant ce motif (SxxSS) agissent comme un répresseur tandis que ceux qui manquent ce motif sont plutôt des activateurs (Liu et al. 2005). Cette idée a été confirmée plus tard par une étude du carcinome hépatocellulaire humain. Dans cette étude, parmi les 14 isoformes d'épissage alternatif de

TCF4 exprimés dans les cellules cancéreuses du foie, ceux qui contenaient le motif 'SxxSS' sont suppresseurs de la croissance tumorale alors que ceux dépourvus de ce motif la favorisent (Tsedensodnom et al. 2011). Le fait que la présence ou pas de ce motif résultant d'un épissage alternatif indique que la prédominance des différents isoformes de TCF4 varie en fonction du type cellulaire. Cette variabilité peut être à la cause de la double fonctionnalité (activateur ou répresseur) de TCF4.

ii. TCF/LEF- β -caténine régule la modification des histones

En absence du signal, TCF/LEF recrute des corépresseurs à la chromatine des gènes cibles. Suite à l'association entre TCF/LEF et β -caténine, ces corépresseurs sont inactivés ou remplacés par des coactivateurs qui sont recrutés par une interaction avec la β -caténine. Ce processus de régulation génique met en jeu un mécanisme de modification de la chromatine, notamment l'acétylation des histones. En effet, l'addition de groupement d'acétyles aux résidus de Lysine à l'extrémité N-terminal des histones H3 et H4 est corrélée à l'activation de la transcription. Cette réaction est catalysée par des histones acétyltransférases HAT et neutralisée par les histones désacétylases HDAC. Parmi les HATs, la CBP et la protéine p300 peuvent se lier au domaine de transactivation située à l'extrémité C-terminale de la β -caténine et ainsi activer la transcription des gènes cibles (Teo & Kahn 2010; Mosimann et al. 2009). Le recrutement de CBP/p300 à la chromatine ainsi que l'activation de la transcription ont été corrélés à l'acétylation des histones H3 et H4 (Lyu et al. 2011; Badis et al. 2009; Parker et al. 2008; Sierra et al. 2006; Kioussi et al. 2002). Même si ces études ont décrit un rôle essentiel de l'acétylation des histones dans l'activation des gènes cibles de la voie Wnt, d'autres études n'ont pas trouvé une modification significative de l'acétylation des histones en réponse à l'activation de la voie (Wöhrlé et al. 2007; Blythe et al. 2010).

iii. L'expression et la régulation de TCF/LEF

L'expression et la localisation de TCF/LEF sont deux façons par lesquelles la voie Wnt régule l'activité de ces facteurs de transcription. Également, l'activité de TCF/LEF peut être régulée par un mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation vu la présence, dans leurs structures, de certains sites de phosphorylation. En effet, l'activation de la kinase NLK (Nemo-like kinase) par Wnt5a régule négativement la transcription suite à la phosphorylation de TCF4 et LEF1 ainsi que leur dissociation de l'ADN (Ishitani et al. 1999; Ishitani et al. 2003). TNIK (pour 'Traf2- and NCK-interacting kinase') est un deuxième exemple de kinase qui phosphoryle TCF dépendamment de Wnt et de β -caténine. Cette kinase phosphoryle

TCF3 et TCF4 (Shitashige et al. 2010) aboutissant à une activation de la transcription (Mahmoudi et al. 2009).

Un modèle a été proposé suggérant que la concentration nucléaire de TCF est importante, comme celle de la β -caténine, pour assurer un rapport proportionnel entre β -caténine et TCF (Phillips & Kimble 2009). De ce fait, une forte concentration de TCF peut aboutir à une répression plutôt qu'une activation de la transcription. En accord avec cette idée, une étude a montré que la détection des changements dans les signaux Wnt est plus fiable quand on surveille les quantités relatives des deux interactants (β -caténine et TCF) que lorsqu'on mesure les niveaux absolus de la β -caténine stabilisée (Goentoro & Kirschner 2009).

Ainsi, ça pourrai être probable que la voie Wnt régule la transcription des gènes en contrôlant la concentration nucléaire de TCF/LEF autant qu'elle fait pour la β -caténine.

4. Signalisation Wnt/ β -caténine et le développement cérébral

La voie de signalisation Wnt/ β -caténine est nécessaire pour le développement et la structuration du système nerveux central embryonnaire. Ainsi, l'altération de cette voie aboutit à des anomalies cérébrales. En effet, Wnt7a et Wnt7b stimulent la prolifération des cellules progénitrices neurales dans le cortex cérébral et augmentent le nombre des cellules qui peuvent générer des neurosphères primaires (Viti et al. 2003). Dans le même contexte, une autre étude a montré que des souris transgéniques exprimant une β -caténine stabilisée dans les précurseurs neuronaux développent un cerveau plus large que les souris sauvages, avec une augmentation de la surface du cortex cérébral. Également, chez ces souris, une plus grande proportion des précurseurs transgéniques rentre à nouveau dans le cycle cellulaire après la mitose, par rapport aux précurseurs de type sauvage. Ces résultats montrent que, chez les mammifères, la β -caténine peut fonctionner comme un interrupteur entre la prolifération et la différenciation des précurseurs au cours du développement neuronale (Chenn & Walsh 2002). Pr contre, la suppression conditionnée de la β -caténine dans les précurseurs neuronaux corticaux altère le développement de l'épithélium neuronal, diminue la prolifération cellulaire, perturbe les jonctions adhérentes et la migration radiale des neurones vers les couches superficielles (Machon et al. 2003). Une autre étude, *in vitro*, a montré que le renforcement de la signalisation de la β -caténine favorise la neurogenèse (Otero et al. 2004). Ces observations suggèrent que l'activation de la voie Wnt/ β -caténine favorise l'amplification des précurseurs neuronaux, tandis que son inhibition empêche leur auto renouvellement.

Étant donné les rôles critiques de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine dans le développement et l'homéostasie, il n'est pas surprenant que les mutations des acteurs de cette voie sont associées à un grand nombre de troubles héréditaires, le cancer et d'autres maladies. En tant que tel, le dysfonctionnement de la voie Wnt est associé à un certain nombre de troubles du système nerveux central, y compris l'autisme, la schizophrénie, les troubles de l'humeur, l'épilepsie et la maladie d'Alzheimer (Inestrosa et al. 2012).

Chapitre IV.

Les cellules souches mésenchymateuses

1. Généralités

Depuis plus de 60 ans, la recherche sur les cellules souches adultes a commencé. Les travaux primaires comprenaient deux types de cellules souches : les cellules souches embryonnaires et les cellules souches adultes. Ces travaux avaient comme but principal les applications clinique, ou dans d'autre terme la médecine régénérative. Pourtant, l'immunoséjour, la tumorigénicité et les problèmes éthiques ont toujours encombré l'avancement de ces travaux et l'arrivée à une application clinique fructueuse. Ces problèmes ont été résolus par l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses CSM ('MSC' pour 'Mesenchymal Stem Cells') adultes dans les transplantations autologues.

2. Les cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses sont douées d'une forte capacité d'autorenouvellement et sont multipotentes. En effet, ces cellules peuvent se différencier en de nombreux types cellulaires y compris les cellules cartilagineuses (chondrocytes), les cellules osseuses (ostéoblastes) et les cellules graisseuses (adipocytes) (Figure 20). L'avancement des travaux de recherches sur les CSM a montré que ces cellules peuvent aussi se différencier en de nombreux types de cellules qui ne font pas partie des tissus squelettiques comme les cellules nerveuses, les cellules du muscle cardiaque, les cellules hépatiques et les cellules endothéliales formant la couche interne des vaisseaux sanguins (Nombela-Arrieta et al. 2011). Ces cellules spécialisées se caractérisent ainsi par leurs propres structures et fonctions pour prendre place dans à un tissu particulier. La multipotentialité, *in vitro*, ainsi que la facilité d'isolement et d'expansion ont rapidement positionné les CSM comme agents thérapeutiques prometteurs en médecine régénérative et les ont fait l'objet de la recherche clinique intensive (Nurkovic et al. 2016).

Premièrement, les CSM ont été isolées à partir de la moelle osseuse. Néanmoins, ces cellules ont été également décrites dans d'autres types de tissus y compris le cordon ombilical, le sang périphérique, le foie fœtal et le tissu adipeux. L'isolement des CSM dérivées du tissu adipeux reste le plus utilisé à l'heure actuelle, vu la facilité de la méthode et

les larges quantités de cellules obtenues comparées avec celles isolées de la moelle osseuse (Tholpady et al. 2005; Fernyhough et al. 2008).

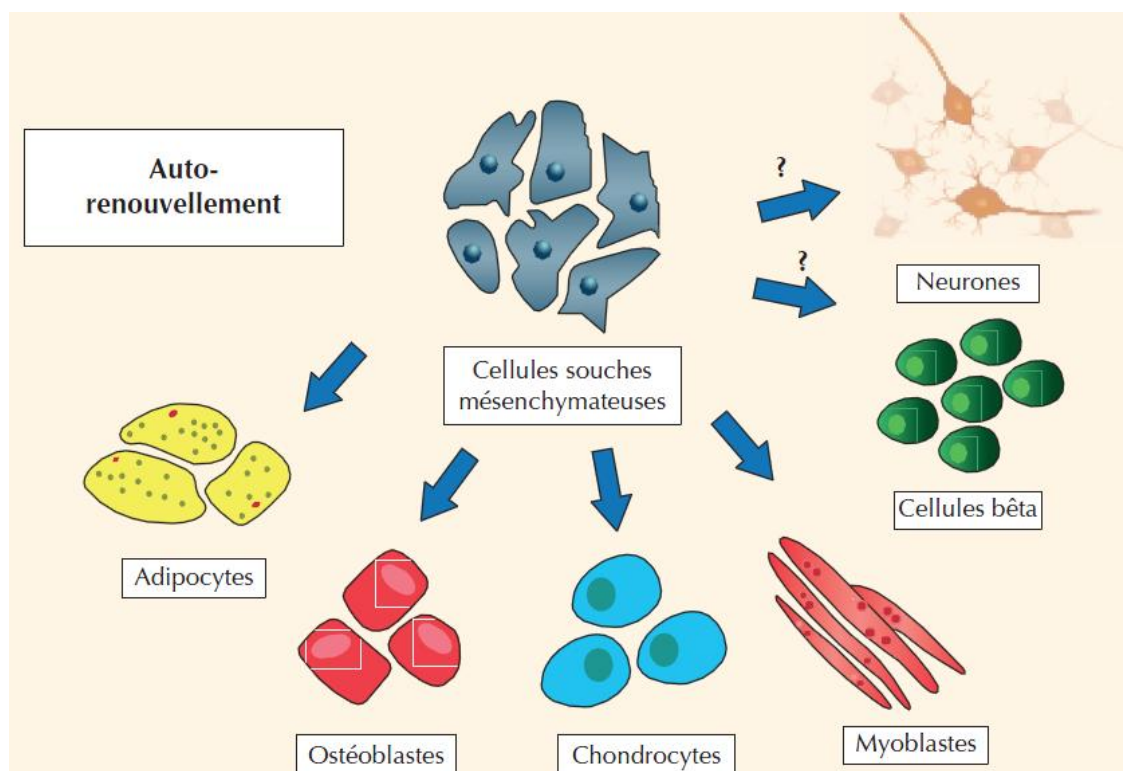


Figure 20. Propriétés de différenciation des cellules souches mésenchymateuses (Pers & Jorgensen 2013). Dans des conditions appropriées, les cellules souches mésenchymateuses sont capables de s'autorenouveler et de se différencier en différents types de lignées cellulaires.

3. Différenciation des cellules souches mésenchymateuses en cellules souches neurales

Différentes études ont décrit le potentiel des CSM de se différencier en des cellules souches neurales (CSN). En effet, Buzańska et al. ont montré en 2002 que pas plus que 5% des CSM peuvent se différencier et donner naissance à des cellules exprimant des marqueurs neuraux et gliales *in vitro* (Buzańska et al. 2002). Cette idée a été supporté par des études *in vivo* (Zhao et al. 2002; Hofstetter et al. 2002). Cependant, une autre étude a montré que la majorité des CSM (plus que 60%) peuvent se différencier en des CSN (Hermann et al. 2004). Le désaccord entre ces résultats obtenus peut être expliqué par plusieurs facteurs citons : la différence des protocoles d'isolement, des conditions et des milieux de cultures, la nature des facteurs de croissance utilisés et l'origine des CSM. Malgré le désaccord sur le rendement de la différenciation, la fonctionnalité des neurones dérivés des CSM était un point de rencontre entre ces différentes études. En effet, ces neurones présentent à la fois les processus axonaux

et dendritiques, sont capables de former des synapses, sont électriquement actifs et présentent une transmission synaptique fonctionnelle (Fu et al. 2008). De ce fait, l'idée suggérant un potentiel de différenciation neural chez les CSM a commencé de se propager en surlignant des applications thérapeutiques pour les maladies neurodégénératives.

Du point de vue expérimental, au cours des 15 dernières années, plusieurs approches de différenciation neuronales des CSM ont été décrites, *in vitro*. Woodbury et al. ont d'abord observé que les CSM peuvent se différencier en cellules exprimant des marqueurs neuronaux (tels que l'énolase2 et les neurofilaments) en présence du β -mercaptoéthanol et du diméthylsulfoxyde (Woodbury et al. 2000). Cependant, l'utilisation des produits chimiques pour induire la différenciation neuronale des CSM n'était pas entièrement convaincante parce que les cellules transformées ne montrent aucune activité électrophysiologique. Ainsi, il a été proposé que la transformation cellulaire peut être causé par des événements cellulaires plutôt qu'une différenciation (Liu et al. 2012). En effet, ces observations pourraient être un artefact de stress cellulaire dû à leur exposition à des substances chimiques toxiques. Cette hypothèse était fondée sur le fait que non seulement les CSM, mais aussi autres types de cellules (HEK293, PC12) réagissent rapidement suite à l'exposition au β -mercaptoéthanol ou au diméthylsulfoxyde en adoptant une apparence comparable aux cellules neuronales. Ceci est dû à la perturbation du cytosquelette plutôt qu'une vraie différenciation (Franco Lambert et al. 2009). Des mélanges de facteurs de croissance ont également été utilisés pour induire la différenciation neuronale des CSM (Song et al. 2002; Locatelli et al. 2003; Tohill et al. 2004). D'un autre côté, il y a des preuves suggérant une différenciation neuronale des CSM lorsqu'elles sont placées en co-culture avec des neurones ou des astrocytes (Song et al. 2002; Wislet-Gendebien et al. 2004). D'autres études ont démontré que l'expression de certains gènes particuliers peut améliorer la différenciation neuronal et de promouvoir la neurogenèse à partir des CSM (Kohyama et al. 2001; Dezawa et al. 2004).

4. Les CSM dans la médecine régénérative

Les propriétés intrinsèques d'auto-renouvellement et de multipotences des CSM sont très prometteuses dans le traitement de nombreuses maladies dégénératives ainsi que des lésions tissulaires. En tant que tel, les CSM représentent une fortune thérapeutique dans la médecine régénérative.

Depuis quelques dizaines d'années, des essais cliniques ont pris naissance visant l'application des CSM en médecine régénérative. La première étude clinique de thérapie

cellulaire contre l'accident vasculaire cérébral se basait sur la transplantation des cellules progénitrices neurales « NT2N » immortalisée dans la matière grise sous-corticale. Ces cellules ont été traitées avec de l'acide rétinoïque, ce qui conduit à leur différenciation en neurones fonctionnels. En conséquence, après leur transplantation dans des modèles animaux d'accident vasculaire cérébral, les cellules NT2N forment des synapses et des axones et conduisent à l'amélioration des paramètres électrophysiologiques (Kondziolka et al. 2000).

Subséquentement, au cours des dernières années, plusieurs études cliniques de thérapie cellulaires ont donné lieu à de nombreuses publications sur ce sujet (Lee et al. 2010; Bhasin et al. 2011; Honmou et al. 2011; Park et al. 2015). Dans ces études, les CSM ont été généralement appliquées par voie intraveineuse de 5-9 jours à 3-12 mois après l'accident vasculaire cérébral. Malgré l'absence des complications importantes, des conclusions définitives ne peuvent être tirées de ces études à cause du petit nombre de patients. Le traitement direct des nerfs périphériques endommagés par des CSM a également été démontré pour être efficace. En effet, de nombreuses études ont montré que ces traitements peuvent sauver une certaine dégrée de la fonction neurologique après la lésion (Guo et al. 2015; Wang et al. 2015; Foroutan et al. 2015). Par exemple, dans un modèle de rat ayant une lésion du nerf facial, le traitement par des MSC montre une amélioration de l'organisation axonale et l'épaisseur de la myéline comparé aux nerfs qui avaient seulement été suturé (Salomone et al. 2013). Dans une autre étude, l'injection des CSM chez un lapin ayant une lésion du nerf sciatique montre une meilleure récupération fonctionnelle et une meilleure régénération du nerf (Lasso et al. 2015).

5. Les limitations de l'application des CSM dans la médecine régénérative

Malgré ces études prometteuses, il est nécessaire de signaler que certaines limitations empêchent l'application des MSC dans la réhabilitation régénérative. Parmi ces limitations, on peut citer le processus de vieillissement qui modifie la fonctionnalité des CSM. Ainsi, leur activité proliférative diminue de manière significative en fonction de l'âge, ce qui limite leur potentiel de différenciation (Hwang 2014). La tumorigenèse est l'un des grands obstacles dans la thérapie cellulaire basée sur les CSM. En fait, il est possible qu'un petit nombre de cellules s'échappe et se développe dans le site de la greffe pour former une tumeur (Kim & de Vellis 2009). Également, il est possible que ces cellules acquièrent des mutations malignes qui les transforment en cellule cancéreuses (Reya et al. 2001; Miura et al. 2006). D'autres limites sont liées au côté pratique de l'application des CSM allant de la manipulation à la

commercialisation, ce qui rend difficile l'industrialisation de ces procédés. En effet, il est très important d'assurer des lignées cellulaires pures et non pas portantes des contaminations croisées avant que les thérapies par les CSM soient commercialisées (Torsvik et al. 2010).

Finalement, pour conclure d'une manière fiable à propos du potentiel thérapeutique des CSM, il est essentiel de mettre en place des processus efficaces et reproductibles d'isolement, de culture et de différenciation, de manière à obtenir une population homogène de CSM pour l'utilisation dans des applications cliniques. Ceci reste l'un des plus grands défis pour la réalisation d'un plus grands succès, voir une révolution, dans ce domaine.

Objectifs

L'histoire de $Ca_v\beta$ remonte à plusieurs décennies, cette protéine a été découverte suite à la purification et l'identification du DHPR en 1984. À cette époque, elle a été définie comme une sous-unité régulatrice des CCDVs, dont les principales fonctions consistent à contrôler l'adressage du canal à la membrane plasmique, sa régulation ainsi que ses propriétés biophysiques. En conséquence, durant les deux dernières décennies, la sous-unité $Ca_v\beta$ était considérée comme étant uniquement le partenaire de la sous-unité $Ca_v\alpha_1$. Néanmoins, après l'enchaînement des études fonctionnelles, d'autres fonctions ont été dévoilées et attribuées spécifiquement à $Ca_v\beta$.

Parmi les 4 isoformes de $Ca_v\beta$, nous nous sommes intéressés à l'isoforme neuronale $Ca_v\beta_4$ et son rôle nucléaire. Cette isoforme est principalement exprimée dans le cerveau et dans les cellules de Purkinje et les cellules granulaires du cervelet. En effet, la première évidence d'une fonction propre à $Ca_v\beta$, ainsi indépendante du canal, a montré qu'un variant de $Ca_v\beta_4$ peut interagir avec la protéine nucléaire (HP1 γ) et passer ensuite dans le noyau pour réguler la transcription génique. Plus récemment, B56 δ , la sous-unité régulatrice de la PP2A a été décrite comme un nouveau partenaire de $Ca_v\beta_4$. Cette interaction favorise la translocation nucléaire de $Ca_v\beta_4$ où elle organise un complexe protéique avec TR α qui participe à la régulation de la transcription. Le point commun entre ces études est que ces fonctions indépendantes du canal nécessitent la translocation de $Ca_v\beta$ vers le noyau afin de participer à la régulation génique. Même si cette responsabilité génique semblait être une fonction commune à toutes les sous-unités $Ca_v\beta$, des exceptions ont été récemment décrites. En fait, il a été montré que la translocation nucléaire de $Ca_v\beta_4$ varie entre les différents variants d'épissage; en conséquence, leur aptitude à participer dans des processus épigénétiques dépend de leur capacité de rentrer dans le noyau.

Ces études renforcent l'hypothèse parlant de la réversibilité de l'interaction entre $Ca_v\beta$ et $Ca_v\alpha_1$. Cette réversibilité laisse le choix à $Ca_v\beta$ d'être présente au niveau membranaire où elle régule le canal, dans le cytoplasme où elle interagit une gamme de protéines intracellulaire et ou dans le noyau où elle intervient dans la régulation de la transcription. Également, elles soulignent la divergence des fonctions de $Ca_v\beta$ et ainsi leur importance pour le fonctionnement cellulaire. L'importance de $Ca_v\beta_4$ neuronale aussi repose sur le fait que les mutations qui touchent cette sous-unité sont associées à une variété de pathologies humaines. En effet, une mutation du gène *CACNB4* humain correspondante à une terminaison prématurée (R482X) génère une protéine tronquée de 38 a.a du côté C-terminal ($Ca_v\beta_{1-481}$).

Cette mutation a été décrite chez des patients atteints d'une épilepsie juvénile myoclonique. Outre les différences décrites dans la régulation du canal calcique, ce mutant montre des difficultés dans l'adressage nucléaire comparé à la sous-unité $Ca_v\beta_4$ sauvage.

D'autre part, les études structurales révèlent que l'interaction entre $Ca_v\beta$ et $Ca_v\alpha_1$ ne nécessite que peu d'éléments structuraux de $Ca_v\beta$, permettent ainsi de penser à d'autres interactions moléculaires fortement favorables. Pareillement, la ressemblance, du point de vue structural, entre $Ca_v\beta$ et les protéines de la famille MAGUK suggèrent un rôle de $Ca_v\beta$ dans l'échafaudage protéique.

Récemment, notre équipe de recherche a dévoilé que l'expression de $Ca_v\beta_4$ dans un système d'expression hétérologue montre une modification dans le niveau d'expression d'un ensemble de gènes. Étant donné que parmi ces gènes certains sont impliqués dans la prolifération cellulaire, l'objectif de mes travaux de thèse était de rechercher le rôle potentiel de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ dans la prolifération cellulaire. Ce travail a été réalisé en exprimant d'une manière stable $Ca_v\beta_4$, dans un système d'expression hétérologue de cellules CHO, et en étudiant ainsi l'impact de la protéine sur la prolifération et le cycle cellulaire. Une étude comparative a été réalisée avec le mutant épileptique $Ca_v\beta_{1-481}$ qui montre des difficultés de translocation nucléaire. En effet, ce mutant n'influence que peu la cinétique du canal, ainsi, le phénotype neurologique caractérisé par les crises épileptiques ne peut pas être expliqué uniquement par cette dérégulation. Dans d'autres termes, c'est possible que le défaut de translocation nucléaire du mutant ainsi que son incapacité à accomplir certaines fonctions nucléaires soit à la base du phénotype épileptique.

Également, je me suis concentré sur l'identification de nouveaux partenaires protéiques de $Ca_v\beta_4$, ainsi que des nouvelles voies de signalisation qui peuvent témoigner une intervention de $Ca_v\beta_4$. D'un autre côté, une partie de mes travaux de thèse focalisait sur l'étude de l'expression de $Ca_v\beta_4$ au cours de la différenciation neuronale. Ceci a été aussi basé sur des observations préliminaires décrivant une variabilité de l'expression de $Ca_v\beta_4$ au cours de la différenciation neuronale.

Pour la réalisation de cette étude diverses techniques de biologie moléculaire, d'immunocytochimie, de microscopie confocale, de biochimie et de biologie cellulaire ont été utilisées.

Matériel et méthodes

Partie II.

Matériel et méthodes

1. Modèles cellulaires :

a. Lignée CHO :

Une lignée cellulaire issue d'ovaires d'hamsters chinois (CHO : Chinese Hamster Ovary) a été utilisée comme un système d'expression hétérologue pour $Ca_v\beta$. Les cellules ont été obtenues auprès de l'ATCC (ATCC CCL-61). Les lignées CHO ont été maintenues dans un milieu de culture complet composé de : DMEM/F-12 (Dulbecco's modified Eagle medium/ Nutrient Mixture F-12) supplémenté avec 10% de sérum de vœu fœtal (FBS), de la pénicilline (100 unités/ml) et de la streptomycine (10 $\mu\text{g/ml}$) et maintenu à 37°C dans un environnement humidifié avec 5 % de CO_2 .

b. Lignée FOCUS :

Nous avons utilisé une lignée d'hépatocytes cancéreuse (FOCUS : Friendship of China and United States) pour le projet Wnt. La lignée FOCUS a été maintenue à 37°C avec 5% de CO_2 dans un milieu DMEM-F12 supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (chauffé pendant 1h à 56°C), 1% de solution d'acides aminés non essentiels 1X (MEM Neaa, Gibco), 1% de pyruvate de sodium 1X (Gibco), pénicilline (100 unités/ml), streptomycine (10 $\mu\text{g/ml}$), hygromycine B (100 $\mu\text{g/mL}$), puromycine (0,5 $\mu\text{g/mL}$) et blasticidine (3 $\mu\text{g/mL}$).

2. Plasmides et transfection :

Les vecteurs d'expression et les constructions d'ADNc codant pour eGFP, β_4 -eGFP, β_{1-481} -eGFP, β_{L125P} -eGFP, SH3-eGFP, B56 δ -myc et B56 δ -shRNA ont été décrits précédemment (Tadmouri et al. 2012). Pour la génération des lignées CHO stables, les plasmides utilisés sont:

1. Le vecteur pEGFP-N1 (Clontech).
2. Le vecteur pEGFP-N1 dans lequel l'ADNc de rat codant à la sous-unité β_{4a} (*CACNB4*, numéro d'accès: L02315) a été cloné pour générer β_4 fusionné au domaine N-terminal de l'eGFP (β_4 -eGFP).
3. Le vecteur β_{4b} R482X/pEGFP-N1 codant le mutant épileptique de β_4 (β_{1-481} -eGFP).

Pour les transfections stables, les cellules CHO ont été ensemencées dans des boîtes de Petri de 100 mm et transfectées avec le plasmide désiré à 50% de confluence en utilisant le protocole classique de transfection par le phosphate de calcium (Melchers 2001). Brièvement, 10 µg d'ADN ont été mélangés avec 50 µL de CaCl₂ (2.5 M) et le volume a été ajusté à 500 µL avec de l'eau. Le mélange a été ensuite ajouté, goutte à goutte, dans 500 µL d'HBS 2X. Ainsi, la transfection a été effectuée en ajoutant le mélange goutte à goutte aux cellules. Après 8 heures d'incubation, les cellules ont été rincées 2 fois avec du milieu DMEM/F-12 sans sérum ni antibiotiques, puis remises dans un milieu complet.

Pour les transfections transitoires, la lipofectamine[®] (Thermo Fisher Scientific) a été utilisée selon les instructions du fournisseur mais en utilisant un ratio 1:1 d'ADN/Lipofectamine (Tableau 4). En effet, la lipofectamine chargé positivement forme un complexe avec les molécules d'acides nucléiques chargées négativement et permet donc leur pénétration à l'intérieur des cellules. Il faut noter que pour une meilleure viabilité cellulaire, il faut retirer les antibiotiques et le sérum du milieu durant la transfection. Ainsi, avant d'ajouter le complexe de transfection, les cellules sont rincées avec du PBS avant de rajouter du DMEM/F-12 sans sérum ni antibiotiques.

Tableau 4. Conditions de transfection par la lipofectamine

Conditionnement	Lipofectamine (µL)	ADN (µg)	Opti-MEM [®] (µL)	Milieu de culture (mL)
Boîte de pétri (10 cm)	30	30	2 x 750	10
Plaques 6 puits	4	4	2 x 250	2
Plaques 12 puits	1	1	2 x 100	1

3. Génération des lignées stables CHO :

Les cellules CHO parentales ont été transfectées avec les vecteurs codant pour eGFP, β₄-eGFP ou le mutant β₁₋₄₈₁-eGFP par le phosphate de calcium. Quarante-huit heures après la transfection, les cellules ont été détachées, triées en fonction de la fluorescence acquise grâce à l'eGFP avec un cymomètre en flux (BD FACS ARIA) et collectées dans des tubes simples. Les cellules CHO exprimant l'eGFP, β₄-eGFP ou β₁₋₄₈₁-eGFP ont été ainsi mises en culture dans un milieu de culture complet supplémentée par de la généticine (Gibco) (1 mg/ml). Par la suite et pendant environ 4 semaines, les cellules ont été répliquées deux fois par semaine à basse densité, puis réensemencées dans des plaques à 96 puits à une densité d'une cellule/puits. Après 7 jours de culture, les puits contenant une colonie de cellules isolées ont

été examinés par un microscope à fluorescence et les cellules eGFP positives ont été de nouveauensemencées dans des plaques à 6 puits. Les cellules qui dérivent de ces colonies isolées ont ensuite été analysées par cytométrie en flux (BD Accuri C6) et les cultures contenant plus que 95% des cellules eGFP positives ont été amplifiées, aliquotées et congelées dans un milieu de culture cellulaire complet contenant 10% de DMSO et stockés dans de l'azote liquide. Ensuite, les cellules ont été cultivées sans généticine et régulièrement examinées par cytométrie en flux pour déterminer si les cellules exprimant eGFP, β_4 -eGFP ou β_{1-481} -eGFP restaient stables.

4. Les lignées stables FOCUS :

Quatre lignées stables dérivées d'une lignée FOCUS ont été obtenues du Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), par une collaboration avec Dr. Philippe Merle.

Expérimentalement, un système rapporteur qui permet de mesurer l'activité transcriptionnelle de la β -caténine a été utilisé (Figure 21). D'abord, la construction (PGF1-TCF/LEF1) a été transduite dans les cellules d'intérêt, elle comporte : la séquence de la copGFP ainsi que celle de la luciférase Firefly sous la dépendance du promoteur minimal mCMV. En amont du mCMV se trouvent quatre répétitions des séquences reconnus par les facteurs de transcription TCF/LEF (appelées aussi « Wnt Response Element » ou « WRE »). En effet, la copGFP est une protéine fluorescente similaire à la GFP caractérisée par la présence d'un peptide déstabilisant sur son extrémité C-terminale ce qui raccourcit le temps de demi-vie de la protéine à 30 min. La luciférase est une enzyme qui catalyse la réaction de bioluminescence en oxydant la luciférine en oxyluciférine en présence d'oxygène, d'ATP et de Mg^{2+} , ceci aboutit alors à l'émission d'un photon (Inouye 2010). Ainsi, en quantifiant la lumière émise, par le test de luciférase, ou la fluorescence de la copGFP, par un cytomètre en flux, il est possible de mesurer l'activité transcriptionnelle de la β -caténine. En effet, en absence de β -caténine nucléaire, le promoteur mCMV est inactif et aucune luminescence ni fluorescence n'est observée (Figure 21A). Par contre, quand la voie canonique est activée, la β -caténine transloquée dans le noyau reconnaît TCF/LEF et se lie aux séquences «WRE » permettant d'activer le promoteur mCMV et de transcrire les gènes rapporteurs (Figure 21B). Comme contrôle négatif, un plasmide (PGF1-mCMV) dépourvu des séquences « WRE » a été utilisé (Figure 21C).

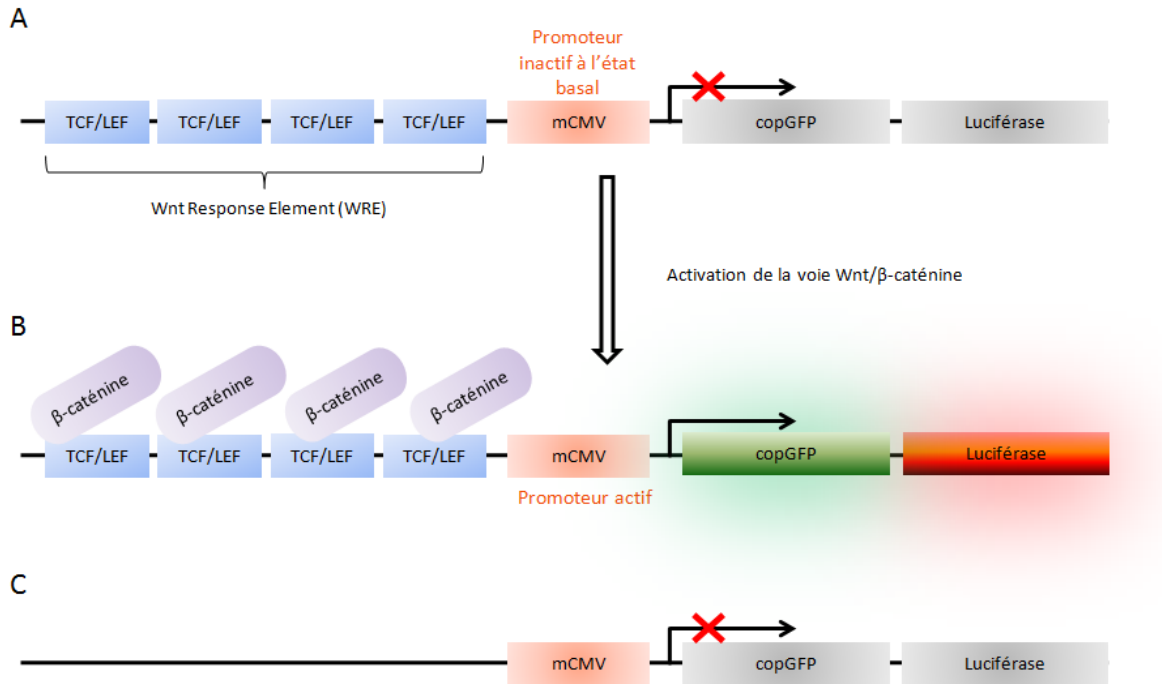


Figure 21. Schéma illustratif du système rapporteur de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine

Ainsi, des cellules FOCUS a été d'abord transduites avec : (1) des lentivirus codant pour le vecteur PGF1-TCF/LEF1 correspondant au système rapporteur actif, désignées par TCF (+) ou (2) des lentivirus codant pour le vecteur contrôle PGF1-mCMV correspondant au système rapporteur inactif désignées par TCF (-).

Les cellules ayant intégrées les plasmides ont été sélectionnées par leur résistance à la puromycine puis retransduites par des lentivirus codant pour : (1) Wnt3 et Fzd7 désignées par Wnt Fz ou (2) vecteur vide désignées par VV. De nouveau les cellules ayant intégré les plasmides ont été sélectionnées par leur résistance à l'hygromycine et la blasticidine. Subséquemment, les quarts lignées FOCUS sont :

1. TCF (+) Wnt Fz
2. TCF (+) VV
3. TCF (-) Wnt Fz
4. TCF (-) VV

La vérification de ces cellules a été effectuée au CRCL, par des tests de luciférase ainsi que par RT-PCR quantifiant l'expression de deux gènes, *CycD1* et *Axine2*, connus pour être cibles de la voie Wnt/ β -caténine.

5. Quantification de la prolifération cellulaire :

La quantification de la division des cellules CHO a été étudiée par différentes méthodes allant des méthodes classiques vers les plus spécifiques.

D'abord, Les cellules CHO parentales ont été mélangées avec celles exprimant de manière stable β_4 -eGFP ou eGFP à un ratio de 1:4. À partir de chaque suspension préparée, quatre autres ont été préparées par dilution en série (1:10, 1: 100, 1: 1 000, 1:10 000). Les cellules ont été ensuiteensemencées dans des plaques à 6 puits et incubées à 37°C, 5% de CO₂. Les suspensions cellulaires ont été fixées avec 4% de paraformaldehyde (PFA) pendant 20 min sur de la glace, lavées avec du PBS et centrifugées à 110 x g pendant 3 min. Le culot a été ensuite remis en suspension dans du PBS et stocké à 4°C à l'obscurité pour l'analyse ultérieure. La même procédure a été effectuée aux cellulesensemencées : à 90% de confluence, les cellules ont été culotées, fixées, lavées, remises en suspension dans du PBS et stockées à 4°C à l'obscurité. Les suspensions cellulaires ont été ensuite analysées par cytométrie en flux (BD Accuri C6) avec un laser d'excitation de 488 nm. Les valeurs relatives de fluorescence ont été déterminées par l'analyse de 100 000 événements pour chaque échantillon. Ainsi, le changement dans le ratio entre les cellules eGFP positives et négatives a été calculé en fonction du temps permettant de comparer la vitesse de division entre les différentes lignées.

Également, la prolifération cellulaire a été quantifiée par simple dénombrement cellulaire. 5 x 10⁵ cellules ont étéensemencées dans des boîtes de Petri de 100 mm et incubées à 37°C, 5% de CO₂. 24 et 48 heures plus tard, les cellules ont été rincées avec du PBS, typsinisées et remises en suspension dans du PBS. Le nombre des cellules a été ensuite calculé à l'aide d'une cellule de Malassez permettant d'estimer le temps de génération de chaque lignée.

Pour valider la spécificité de nos observations concernant la prolifération cellulaire, on a eu recours à un test spécifique de prolifération cellulaire : Cell Proliferation Dye eFluor[®] 670 (eBioscience). Le principe de ce test repose sur l'utilisation d'une molécule fluorescente qui se lie aux amines primaires des cellules conférant ainsi aux cellules un niveau quantifiable de fluorescence. Suite à chaque division, cette molécule se distribue d'une manière équivalente dans les cellules filles et la fluorescence se divise par deux. Ainsi, le suivi de la diminution de la fluorescence par cytométrie en flux permet de quantifier la capacité proliférative des cellules.

Du point de vue expérimental, le marquage a été effectué selon les instructions du fournisseur. Les cellules CHO ont été marquées avec 2,5 μM du marqueur pendant 10 min dans un bain marie de 37°C à l'obscurité. Le marquage a ensuite été arrêté par l'addition de 5 volumes de milieu complet froid et l'incubation des cellules pendant 5 min sur la glace. À la fin de l'incubation, les cellules ont été rincées 3 fois avec du milieu complet puis analysées par cytométrie en flux dans un système BD Accuri C6 avec un laser d'excitation de 640 nm. Des quantités variables de cellules (6×10^5 , 3×10^5 ou 1.5×10^5) ont ensuite étéensemencées dans des plaques à 6 puits d'une manière à obtenir 90% de confluence après 24, 48 ou 72 heures d'incubation. Lorsque les cultures cellulaires atteignaient 90% de confluence, elles ont été récoltées, remises en suspension dans du DMEM/F-12 sans rouge de phénol et la dilution du marqueur fluorescent a été évaluée par cytométrie en flux par l'analyse d'un minimum de 5000 événements pour chaque échantillon. Les pics obtenus ont été ensuite déconvolués et l'indice de prolifération a été calculé en utilisant le logiciel Modfit LTTM. Ce logiciel définit l'indice de prolifération comme étant la somme des cellules dans toutes les générations, divisé par le nombre de cellules mères théoriquement calculé présentes dès le début de l'expérience. Il constitue donc une mesure de l'augmentation du nombre de cellules dans la culture au cours de l'expérience.

6. Synchronisation des cellules :

Pour certaines expériences, il était nécessaire de synchroniser les cellules ou de les enrichir dans une phase du cycle cellulaire. Ainsi différentes méthodes ont été utilisées pour synchroniser les cellules en G0/G1, G1/S et G2/M. Les cellules CHO ont été enrichies en G0/G1 en les privant du sérum pendant 72 heures (Campisi et al. 1984). Brièvement, 2×10^6 cellules ont étéensemencées dans une boîte de Petri de 100 mm avec du milieu complet et incubées pendant 6 heures à 37°C. Une fois les cellules sont devenues adhérentes, le milieu complet a été éliminé et les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS. La synchronisation cellulaire a ensuite été déclenchée par l'addition du DMEM/F-12 sans sérum ni antibiotiques et l'incubation des cellules pendant 72 heures. La synchronisation des cellules en utilisant la thymidine et le nocodazole ont été réalisées comme décrit précédemment (Matsui et al. 2012). Le nocodazole est un agent antiméiotique qui interfère avec l'organisation des microtubules. Étant donné que la formation des microtubules est une condition importante pour que les cellules entrent en mitose, le nocodazole est donc considéré comme un bloqueur en G2/M. La thymidine est un inhibiteur du cycle cellulaire qui bloque les cellules en G1/S

en inhibant la synthèse de l'ADN (Jackman & O'Connor 2001). Expérimentalement, les cellules ont été bloquées en phase G1/S avec 2 mM de thymidine (Sigma-Aldrich) pendant 24 heures ou en G2/M avec 50 ng/ml de nocodazole (Sigma-Aldrich) pendant 24 heures. L'efficacité du synchronisme des cellules a été confirmée par cytométrie en flux après leur marquage par l'iodure de propidium.

7. Extraction protéique et fractionnement subcellulaire :

Pour préparer un extrait protéique total, les cellules ont été culottées et reprises dans le tampon de lyse pendant 30 min sur la glace. Le tampon de lyse est constitué de 10 mM Tris, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,5% Triton X-100 avec un cocktail d'inhibiteurs de protéase (Roche). La lyse cellulaire a été finalisée par sonication (6 x 10 secondes) et la concentration totale en protéines a été déterminée en utilisant le kit de dosage des protéines « PierceTM BCA Protein Assay ».

Le fractionnement subcellulaire a été réalisé comme décrit dans (Have et al. 2012). En bref, les cellules culotées à partir des boîtes confluentes ont été remises en suspension dans un tampon de lyse hypotonique (pH 7,9) composé de 10 mM HEPES-KOH, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,5 mM dithiothréitol (DTT) avec un cocktail d'inhibiteurs de protéase (Roche) et incubées pendant 5 min sur la glace. Les cellules ont été éclatées mécaniquement en utilisant un homogénéisateur pré-refroidi puis centrifugées pendant 5 minutes à 4°C, 200 x g. Le surnageant correspondant à la fraction cytoplasmique a été conservé et le culot a été remis en suspension dans une solution S1 (0,25 M sucrose, 10 mM MgCl₂), déposé sur une solution S2 (0,35 M sucrose, 0,5 mM MgCl₂) puis centrifugé pendant 5 min à 4°C, 1200 x g. Le culot a été remis en suspension dans S2 puis soniqué 6 x 10 secondes sur la glace. L'échantillon soniqué a été ensuite déposé sur une solution S3 (0,88 M sucrose, 0,5 mM MgCl₂) et centrifugé pendant 10 min à 4°C, 2000 x g. Le surnageant correspondant à la fraction nucléoplasmique a été conservé tandis que le culot a été remis en suspension dans S2, centrifugé pendant 5 min à 4°C, 2000 x g puis conservé, ce qui correspond à la fraction nucléolaire. Afin de valider toute étape de fractionnement, 2 µL de chaque culot et de surnageant ont été déposés sur une lame et observés à l'aide d'un microscope à contraste de phase. Il faut noter que toutes les solutions (S1, S2 et S3) ont été préparées dans de l'eau distillée et supplémentées par un cocktail d'inhibiteurs de protéase (Roche). La concentration des protéines dans chaque fraction a été déterminée en utilisant le kit de dosage des protéines « PierceTM BCA Protein Assay ».

8. Immunoprécipitation :

Avant l'incubation avec l'extrait cellulaire, les billes « Dynabeads[®] Protein G » (10003D, Thermo Fischer Scientific) ont été couplées avec l'anticorps immunoprécipitant. 50 µL de billes sont rincées 3 fois avec du PBS-Tween 0,1% puis remises dans 50 µL du tampon de rinçage. Ensuite, les billes sont incubées pendant 10 min avec 10 µg d'anticorps anti-GFP (11814460001, Roche) à température ambiante sous rotation. Après le couplage, le complexe billes-anticorps est rincé 2 fois avec du PBS-Tween 0,1%. Des IgG de souris (M5284, Sigma-Aldrich) ont été traités de la même manière que l'anticorps immunoprécipitant permettant l'obtention d'un complexe billes-IgG qui servira comme control négatif. Après l'extraction protéique totale (500 µL) à partir des cellules transfectées par les constructions désirées, 200 µL d'extrait protéique total sont ajoutés à chacun des deux complexes déjà préparés et 100 µL d'extrait protéique total sont dénaturés avec 25 µL du tampon de Laemmli 5X et stockés à -20°C. Les échantillons sont ensuite incubés pendant 30 min à température ambiante sous rotation. À la fin de l'incubation, les échantillons sont rincés 3 fois avec du PBS-Tween 0,1%. Le culot ainsi obtenu, correspondant au complexe billes-anticorps-antigène, est dénaturé dans 15 µL du tampon de Laemmli 5X, pendant 10 min, puis dilués avec 60 µL d'eau. Les échantillons sont ensuite chauffés durant 10 min à 70°C puis stockés à -20°C.

Il faut noter que pour l'IP via l'anticorps anti-myc couplé à la biotine (sc-40 B, Santa Cruz Biotechnology), des billes magnétiques couplées à la streptavidine « Dynabeads[®] Streptavidin M-280 » (11205D, Thermo Fischer Scientific) ont été utilisées. Ainsi, 200 µL d'extrait protéique total sont incubés, pendant une heure à température ambiante, avec 20 µg d'anticorps anti-myc. Ensuite, le complexe anticorps-antigène est incubé avec les billes magnétiques, déjà saturées pendant une heure par 1% BSA, à température ambiante pendant une heure. Les échantillons sont lavés 3 fois avec du PBS-Tween 0,1% et les protéines sont dénaturées dans 15 µL du tampon de Laemmli 5X pendant 10 min, diluées avec 60 µL d'eau, chauffées à 70°C puis stockés à -20°C. Dans ce cas, le control négative utilisé était des cellules qui n'expriment pas la protéine immunoprecipité.

9. Electrophorèse et Western-blot :

Une quantité égale de protéines totale de chaque échantillon a été séparée par électrophorèse SDS-PAGE dans un gel de séparation à 10%. Les protéines séparées ont ensuite été transférées vers une membrane en PVDF (Immobilon[®]-P, Millipore). La

membrane a été bloquée dans 5% du bloqueur « blotting-grade » (Bio-Rad) dans du PBS-Tween 0,1% pendant 1 heure à température ambiante puis rincée 3 fois avec du PBS-Tween 0,1%. L'incubation avec l'anticorps primaire a été effectuée à température ambiante pendant 3 heures à une dilution de 1:5000. Les différents anticorps utilisés dans ce travail sont : Un anticorps polyclonal de lapin anti-fibrillarine (ab5821, Abcam), un anticorps polyclonal de lapin anti-B56 δ (Martens et al. 2004), un anticorps polyclonal de lapin anti-GFP (A-11122, Thermo Fischer scientific), un anticorps polyclonal de lapin anti-myc (ab9106 ; Abcam), un anticorps monoclonal de lapin anti β -catenin (8480, cell signaling technology) et un anticorps polyclonal de lapin anti-TCF4 (ab185736, Abcam). Après 2 lavages avec du PBS-Tween 0,1%, la membrane a été mise en incubation avec l'anticorps secondaire à température ambiante pendant 45 min à une dilution 1:10000 : protéine A-HRP (ab7456; Abcam) ou un anti-IgG de lapin conjugué à l'HRP (sc-2004, Santa Cruz Biotechnology). Après 2 lavages avec du PBS-Tween 0,1%, les bandes ont été visualisées avec le système de détection ECL (Thermo Fischer Scientific).

10. Immunocytochimie des cultures cellulaires :

Il est important de signaler que pour les manipulations d'immunocytochimie le PBS utilisé contient du calcium et du magnésium pour maintenir les jonctions entre les cellules.

L'imagerie des cellules vivantes a été effectuée en ensemençant les cellules dans des lames à chambre « Lab-Tek ». Après 24 heures, les cellules ont été lavées avec du PBS et la membrane plasmique a été marquée avec la concanavaleine conjuguée à l'Alexa647 (5 μ g/ml) pendant 5 min à 37°C, 5% CO₂. Les noyaux cellulaires ont été visualisés en utilisant 5 μ g/ml de Hoechst 34580 (Thermo Fischer Scientific) et les protéines exprimées ont été visualisées directement par la fluorescence de l'eGFP.

Les cellules ensemençées sur des lamelles de verre ont été mises en incubation avec 5 μ g/ml de Hoechst 34580, lavées avec du PBS puis fixées avec du PFA 4% (PFA) dans du PBS pendant 30 min. Après fixation, les cellules ont été rincées avec du PBS puis perméabilisées avec du Triton X-100 0,1% dans du PBS. L'incubation avec les anticorps primaires a été réalisée pendant 2 heures à température ambiante. Les anticorps primaires suivants ont été utilisés pour l'immunofluorescence: un anticorps polyclonal de lapin anti-fibrillarine (ab5821, Abcam), un anticorps monoclonal de souris anti-SC35 (ab11826, Abcam), un anticorps polyclonal de lapin anti B56 δ (Martens et al. 2004), un anticorps polyclonal de lapin anti-TCF4 (ab185736, Abcam) et un anticorps polyclonal de lapin anti- β_4

(Kiyonaka et al. 2007). Les anticorps primaires anti-Fibrillarin et anti-SC35 ont été utilisées à 1 µg/ml alors que l'anti-B56δ et l'anti-TCF4 ont été utilisés à 1:200 et l'anti-β₄ à 1:500. Après l'incubation, les cellules ont été lavées 2 fois avec du PBS puis incubées avec les anticorps secondaires dilués à 1:500 pendant 45 min: un anti-lapin conjuguée à la cyanine3 (Cy3) (711-166-152, Jackson) ou un anticorps anti-souris conjugué à Cy3 (715-165-150, Jackson). Les lamelles ont été ensuite rincées deux fois avec du PBS et les lames ont été montées avec le milieu de montage « ProLong[®] Gold Antifade » (P36934, Thermo Fischer Scientific). Pour le projet Wnt/β-catenin, le noyau n'était pas marqué avec du Hoechst, par contre le milieu de montage utilisé pour monter les lames contenait du DAPI (P36931, Thermo Fischer Scientific).

Les images ont été acquises avec un microscope confocal LSM710 Zeiss ou un confocal Nikon A1. Les images ont été traitées par les logiciels ImageJ ou Fiji. La quantification des niveaux nucléaires de β₄ a également été réalisée en utilisant le logiciel ImageJ comme décrit dans (McCloy et al. 2014). En effet, le noyau de chaque cellule a été délimité et la surface ainsi que la densité intégrée ont été mesurées. Également plusieurs mesures du bruit du fond ont été effectuées. La fluorescence nucléaire = densité intégrée - (surface du noyau × moyenne de fluorescence des bruits du fond) a ensuite été calculée. La même procédure a été appliquée pour le calcul de la fluorescence cellulaire totale. Ainsi le rapport noyau/cytoplasme a été calculée par la formule : $qNCR = \text{fluorescence nucléaire} / (\text{fluorescence cellulaire total} - \text{fluorescence nucléaire})$. Pour mesurer le degré de colocalisation entre deux signaux différents de fluorescence, le logiciel Volocity (Perkin Elmer, USA) a été utilisé. Il permet de calculer du coefficient de corrélation de Pearson correspondant au coefficient de colocalisation. Ces analyses ont été effectuées à la plateforme d'imagerie « MicroPICell » de l'Université de Nantes.

11. Analyse du cycle cellulaire :

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques à 6 puits à une densité de 1×10^5 cellules/ml et incubées pendant 24 heures à 37°C, 5% CO₂. Les cellules ont été ensuite récoltées et fixées avec de l'éthanol 70% à -20°C pendant la nuit. Le lendemain, les cellules ont été lavées avec du PBS et marquées par l'iodure de propidium à l'obscurité pendant 30 min puis analysées par cytométrie en flux.

12. Incorporation du BrdU :

L'immunomarquage des cellules incorporant le bromodésoxyuridine (BrdU) et l'analyse par cytométrie en flux ont été réalisés en suivant les recommandations du fabricant (APC BrdU Flow Kit, BD Pharmingen™). Expérimentalement, les cellules ont été pulsées pendant 1h avec une solution de BrdU (1 mM) à 37°C, 5% CO₂. Ensuite, les cellules ont été rincées avec du PBS, récoltées et centrifugées pendant 3 minutes à 110 x g. Le culot a ensuite été fixé avec la solution BD Cytotfix/Cytoperm pendant 30 min sur la glace, lavé avec la solution BD Perm/Wash Buffer puis centrifugé pendant 3 min à 110 x g. Les cellules ont ensuite été incubées avec la solution de perméabilisation Cytoperm BD Plus pendant 10 min sur la glace. Après la perméabilisation, les cellules ont été rincées, refixées, rincées puis traitées avec de la DNase (300 µg/ml) pendant 1 heure à 37°C. Par la suite, les cellules ont été incubées avec des anticorps anti-BrdU conjugués à l'APC (1:100) pendant 20 min. Enfin, les cellules ont été lavées deux fois par la solution BD Perm/Wash et analysées par cytométrie en flux dans un système BD Accuri C6. Les cellules non incubées avec du BrdU et mises en incubation avec les anticorps anti-BrdU ont été utilisées comme témoin négatif.

13. Extraction d'ARN et RT-PCR :

Pour le projet prolifération, l'extraction de l'ARN a été réalisée en utilisant le kit d'extraction d'ARN NucleoSpin® (Macherey-Nagel, Allemagne) selon les instructions du fabricant. La concentration d'ARN et la pureté des échantillons ont été mesurées en utilisant le spectrophotomètre Nanodrop ND-1000. La qualité de l'ARN a été visualisée par électrophorèse sur gel d'agarose 2%. L'ADNc a été synthétisé à partir de 0,5 µg d'ARN en utilisant le kit de transcription inverse RT² First Strand (Qiagen, UK) selon les recommandations du fabricant. Les échantillons d'ADNc ainsi obtenues ont été stockés à -20°C.

La PCR quantitative a été réalisée dans un système de plaques à 96 puits préconçues (Chinese Hamster Cell Cycle (PAJJ-020Z, Qiagen) RT² Profiler™ PCR Array) qui permet d'étudier l'expression de 84 gènes liés au cycle cellulaire. Dans ces plaques les amorces de ces 84 gènes sont déjà introduites par le fournisseur ; ainsi, il suffit d'ajouter l'ADNc et le mélange du SYBR Green « RT² SYBR Green qPCR Master Mix » selon les instructions du fabricant. L'amplification a été réalisée par le StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). L'activation de la polymérase s'effectue à 95°C pendant 10 min,

suivie d'une amplification de 40 cycles comprenant 15 sec à 95°C et 1 min à 60°C. Les valeurs de Ct (Cycle threshold) ont été exportées et analysées par le modèle d'analyse de données « RT² Profiler PCR Array Data Analysis template V4 » qui est disponible sur le site Qiagen. L'expression génique relative a été calculée par la méthode de $\Delta\Delta CT$ et exprimée en « fold change ». L'analyse statistique de l'expression génique a été effectuée avec le test de « Student » et chaque valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative.

Pour le projet Wnt, les cellules FOCUS ont été transfectées par les vecteurs codant pour l'eGFP ou β_4 -eGFP. Vingt-quatre heures après la transfection, les cellules ont été récoltées, remises dans un tampon (0,7 mM EDTA, 0,2% FBS dans du PBS) sur la glace. Les cellules ont été ensuite triées à base de la fluorescence de l'eGFP à l'aide d'un FACS BD ARIA I (200 000 cellules/tube). Après centrifugation, les cellules ont été remises dans du « Extract-all » (Eurobio) et conservées à -80°C. La suite de l'expérience a été effectuée au CRCL où l'ARN a été extrait selon le protocole du fabricant « Eurobio ». L'ADNc a été synthétisé à partir de 250 ng d'ARN en utilisant le kit « M-MLV RT » (Invitrogen) selon les instructions du fabricant. La PCR en temps réel a été réalisée avec un appareil Light Cycler 480 (Roche) en utilisant le kit QuantiFast SYBR Green PCR (Qiagen) selon les instructions du fabricant. Le protocole de la PCR consiste à activer la polymérase à 95°C pendant 5 min, suivi d'une amplification de 40 cycles de 2 étapes chacun (10 sec à 95°C et 30 sec à 60°C). Les expériences ont été réalisées en triplicata et la normalisation de l'expression génique a été effectuée en utilisant le gène de ménage *18S*. Les analyses ont été effectuées en utilisant la méthode de $\Delta\Delta CT$ et les résultats ont été exprimés en « fold change ». Il faut noter que les amorces ont été conçues en utilisant le site Primer3 (Tableau 5).

Pour le projet CSM, l'extraction d'ARN a été effectuée en utilisant le kit « RNAspin Mini » (GE Healthcare) et l'ADNc a été synthétisé à partir de 400 ng d'ARN en utilisant la transcriptase inverse « Superscript III » (Invitrogen) selon les instructions du fabricant. Pour la PCR, un mélange de 10 μ L du SYBR Green (4227848, Affymetrix), 2 μ L de chaque amorce (10 μ M) (Tableau 5) et 2 μ L d'ADNc a été préparé. L'amplification a été effectuée dans un système « Light Cycler » (Roche) selon les conditions suivantes: 1 cycle à 50°C pendant 2 min, 1 cycle à 95°C pendant 5 min, 45 cycles à 95°C pendant 3 sec et 60°C pendant 30 sec. Les expériences ont été réalisées en triplicata et la normalisation de l'expression génique a été effectuée en utilisant le gène de ménage *GAPDH*. Les analyses ont été effectuées en utilisant la méthode de $\Delta\Delta CT$ et les résultats ont été exprimés en « fold

change ». Il faut noter que les amorces utilisées pour ce projet ont été conçues en utilisant le site Roche.

Tableau 5. Liste des amorces utilisées pour la PCR

<i>Axine 2</i>	sens	ATGGTGAGGTCCACGGAAAC
	anti-sens	CTTCACACTGCGATGCATTT
<i>CycD1</i>	sens	AAGGCGGAGGAGACCTGCGCG
	anti-sens	ATCGTGCGGCATTGCGGC
<i>18s</i>	sens	GGACACGGACAGGATTGACA
	anti-sens	ACCCACGGAATCGAG-AAAGA
<i>CACNB4</i>	sens	TGTACCTGCATGGAATTGAAGA
	anti-sens	GGCCTGCTTGTGTAGGAATC
<i>GAPDH</i>	sens	CATGAGAAGTATGACAACAGCCT
	anti-sens	AGTCCTTCCACGATACCAAAGT

14. Test de luciférase et CopGFP :

Les cellules FOCUS ont été transfectées par les vecteurs codant pour eGFP, β_4 -eGFP, β_1 - $_{481}$ -eGFP ou β_{L125P} -eGFP. Vingt-quatre heures après la transfection, les cellules ont été récoltées, remises dans un tampon (0,7 mM EDTA, 0,2% FBS dans du PBS) sur la glace. Les cellules ont été ensuite triées à base de la fluorescence de l'eGFP à l'aide d'un FACS BD ARIA I. Seules les cellules eGFP positives ont été collectées dans des plaques à 96 puits (10^4 cellules/puits). Ensuite, l'activité de la luciférase a été quantifiée par le kit Dual-Glo[®] Luciferase Assay System (Promega Corporation, États-Unis) dans un luminomètre selon les instructions du fabricant. L'activité enzymatique de la luciférase a été exprimée en « fold change » par rapport au contrôle négatif (cellules transfectées par l'eGFP), qui a été donné la valeur arbitraire de 1.

Les cellules FOCUS ont été transfectées par les vecteurs codant pour β_4 -myc, TCF4-myc ou pcDNA comme témoin négatif. Vingt-quatre heures après la transfection, les cellules ont été détachées et analysées par cytométrie en flux dans un système BD Accuri C6 avec un laser de 488 nm. Les valeurs relatives de fluorescence ont été déterminées par l'analyse d'au moins 5 000 événements pour chaque échantillon. Les données obtenues ont été analysées à l'aide du logiciel FCS express 5 et l'intensité de fluorescence de la Cop-GFP a été exprimée en tant que le mode des pics.

15. Différentiation des cellules souches en cellules neuronales :

Toutes les études cliniques ont été menées selon les principes énoncés dans la déclaration d'Helsinki. Les échantillons étaient fournis par le centre de médecine régénérative « Reviva » avec l'approbation du conseil d'éthique de la recherche du « Middle East Institute of Health », Beyrouth, Liban. Ces échantillons correspondaient à des sujets humains libanais âgés de 25 à 40 ans, sans antécédent pathologique notable.

a. Isolation et culture des CSM :

Le tissu adipeux a été obtenu par liposuction de la graisse abdominale sous-cutanée, et introduit dans un tube de 50 mL. L'échantillon a été ensuite rincée par une solution de PBS supplémentée avec 5% d'un mélange d'antibiotiques « PSA » (pénicilline, streptomycine et amphotéricine B) et centrifugée à 300 x g pendant 3 min. le lavage a été répété 3 fois avec l'élimination, à chaque fois, du culot contenant des globules rouges. Pour éliminer la matrice extracellulaire, l'échantillon a été incubé avec de la collagénase de type 1 à 37°C sous rotation pendant la nuit. Après l'incubation, l'échantillon est centrifugé pendant 10 min à 600 x g, puis, 5 ml de sérum sont ajoutés au culot pour inhiber l'activité de la collagénase. Après une seconde centrifugation, le culot contenant les cellules estensemencé dans des flasks de 75 cm² en utilisant le DMEM/F-12 comme milieu de culture. À 80% de confluence, le passage des cellules a été effectué, donc en moyenne tous les deux jours, et la différenciation a été induite après le 3^{ème} passage.

b. Différentiation des CSM en cellules neuronales :

La différenciation des CSM en cellules neuronales est composée de deux étapes: d'abord une induction des CSM en Neurosphères « NSP » suivie par une différenciation finale en cellules neurales « NLC » (pour 'Neuron-Like Cells').

i. Induction des CSM en neurosphères :

À 80% de confluence les CSM sont rincées, trypsinisées, culotées et mises en culture dans des flasks de 25 cm² à une densité de 1 x 10⁶ cellules. Le milieu de culture utilisé est composé de : un milieu de culture basal « AdvanceSTEM Mesenchymal Stem Cell Basal Medium » supplémenté avec 10% de sérum « AdvanceSTEM Growth Supplement ». Ces deux produits sont obtenus du kit « Mesenchymal Stem Cell Expansion Kit » (SH30875.KT, GE Healthcare Life Sciences). Ce milieu est aussi supplémenté par 2% B27 (17504044, Gibco) et 1% PSA. Les cellules ont été incubées à 37°C, 5% de CO₂ pendant 14 jours (J0 -

J14). Pour les 16 jours suivants (J14 - J30), le milieu de culture a été supplémenté avec 20 ng/ml du facteur de croissance des fibroblastes humains (b-FGF) et 20 ng/ml du facteur de croissance épidermique humain (EGF). Le milieu de culture a été renouvelé tous les 3-4 jours.

ii. Différenciation finale des NSP en NLC :

Les NSP obtenues après 30 jours d'induction ont été collectées puis cultivées pour initier leur différenciation finale en NLC : neurones, astrocytes et oligodendrocytes. Dans ce but, les NSP ont été ensemencées dans des plaques à 6 puits à une densité de 1×10^5 cellules dans un milieu de culture basal « AdvanceSTEM Mesenchymal Stem Cell Basal Medium » supplémenté avec 10% de sérum « AdvanceSTEM Growth Supplement », 2% B27 (17504044, Gibco) et 1% PSA, 20 ng/ml de facteur de croissance des nerfs β (β -NFG) et 20 ng/ml du facteur neurotrophe dérivé de la glie (GDNF) à 37°C et 5% CO₂. La différenciation est effectuée pendant 7 jours (J30 - J37) durant lesquels le milieu a été renouvelé tous les 3-4 jours.

c. Caractérisation des CSM par cytométrie en flux :

Pour suivre la pureté des échantillons et le rendement de la différenciation, les cellules ont été analysées, à chaque stade de différenciation (J0, J30 et J37), par des marqueurs de surface spécifiques (Tableau 6). Expérimentalement, les cellules sont trypsinisées, centrifugées et remises dans du en suspension DMEM/F-12 sans rouge de phénol. 10^5 cellules sont mélangées avec 5 μ L d'anticorps et incubées à 4°C pendant 20 min à l'obscurité. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 300 x g pendant 7 min et le culot est rincé avec du DMEM/F-12 sans rouge de phénol puis remis en suspension dans ce même milieu. Les échantillons sont ensuite analysés par cytométrie en flux dans un système MACSQuant.

Tableau 6. Liste des anticorps utilisés pour la caractérisation des CSM.

Anticorps	Référence	Fournisseur
Anti CD34-vio-blue	130-095-393	Miltneyi Biotech
Anti CD45-PE	130-080-201	Miltneyi Biotech
Anti CD73-PE	130-095-182	Miltneyi Biotech
Anti CD105-vio-blue	130-099-666	Miltneyi Biotech
Anti CD90-APC	130-095-402	Miltneyi Biotech
Anti-nestine-FITC	N5413	Sigma-Aldrich

Résultats

Chapitre I.

Les partenaires protéiques de $Ca_v\beta$ et leurs fonctions associées

Protein partners of the calcium channel β subunit highlight new cellular functions

Mohamad Rima, Marwa Daghsni, Ziad Fajloun, Ridha M'rad, Juan L. Brusés, Michel Ronjat and Michel De Waard.

Revue publiée dans le journal « Biochem. J. »

Biochem. J. (2016) **473**, 1831–1844. doi:10.1042/BCJ20160125

Introduction :

Comme il est maintenant connu, le calcium est l'un des plus importants seconds messagers qui déclenche et régule différents processus cellulaires. Subséquemment, les CCDVs qui représentent la principale voie d'entrée de calcium dans les cellules sont important pour maintenir la fonctionnalité cellulaire. Ces canaux sont composés de différentes sous-unités dont chacune accomplit des rôles bien déterminés. Pour une longue période, la sous-unité auxiliaire $Ca_v\beta$ a fait l'objet de nombreuses études visant la compréhension de sa structure et ses fonctions. Parmi ces fonctions, certaines étaient liées au canal calcique, dont elle fait partie, mais d'autres sont complètement indépendantes des CCDVs. Certaines fonctions nécessitaient le détachement de $Ca_v\beta$ du canal, d'autres requéraient sa translocation vers le noyau et dans la majorité des cas ces fonctions mettaient en jeu une interaction entre $Ca_v\beta$ avec un ou plusieurs partenaires. Ainsi, $Ca_v\beta$ était capable de lier une variété de protéines, notamment des canaux, des récepteurs, des facteurs de transcriptions, des kinases, etc. Grace à chacun de ses partenaires $Ca_v\beta$ prend place dans une fonction différente, citons par exemple la régulation génique, l'endocytose et la régulation d'autres canaux. Ainsi, cette sous-unité auxiliaire est de plus en plus décrite comme une protéine multifonctionnelle.

Dans cette revue nous nous sommes concentrés sur les diverses fonctions cellulaires de $Ca_v\beta$ sur la base de l'identité de son partenaire. En commençant par un bref aperçu sur les CCDVs, cette revue a mis l'accent sur les différents partenaires protéiques de $Ca_v\beta$ et a résumé les fonctions cellulaires dans lesquelles les complexes structurés par $Ca_v\beta$ sont impliqués.

REVIEW ARTICLE

Protein partners of the calcium channel β subunit highlight new cellular functionsMohamad Rima*†, Marwa Daghni*‡, Ziad Fajloun†, Ridha M'rad‡, Juan L. Brusés§, Michel Ronjat*|| and Michel De Waard*||¹

*LabEx Ion Channels, Science and Therapeutics, INSERM UMR1087/CNRS UMR6291, l'institut du Thorax, Nantes F-44000, France

†AzM Center for Research in Biotechnology and its Application, Lebanese University, 1300 Tripoli, Lebanon

‡Laboratory of Human Genetics, Doctoral School of Science and Biotechnology, Faculty of Medicine of Tunis, University of Tunis El Manar, 1007 Tunis, Tunisia

§Department of Natural Sciences, Mercy College, Dobbs Ferry, NY 10522, U.S.A.

||Université de Nantes, Nantes F-44000, France

¶Smartox Biotechnology, 570 Rue de la Chimie, 38400 Saint-Martin d'Hères, France

Calcium plays a key role in cell signalling by its intervention in a wide range of physiological processes. Its entry into cells occurs mainly via voltage-gated calcium channels (VGCC), which are found not only in the plasma membrane of excitable cells but also in cells insensitive to electrical signals. VGCC are composed of different subunits, α_1 , β , $\alpha_2\delta$ and γ , among which the cytosolic β subunit ($\text{Ca}_v\beta$) controls the trafficking of the channel to the plasma membrane, its regulation and its gating properties. For many years, these were the main functions associated with $\text{Ca}_v\beta$. However, a growing number of proteins have been found to interact with $\text{Ca}_v\beta$, emphasizing the multifunctional role of this versatile protein.

Interestingly, some of the newly assigned functions of $\text{Ca}_v\beta$ are independent of its role in the regulation of VGCC, and thus further increase its functional roles. Based on the identity of $\text{Ca}_v\beta$ protein partners, this review emphasizes the diverse cellular functions of $\text{Ca}_v\beta$ and summarizes both past findings as well as recent progress in the understanding of VGCC.

Key words: calcium channels, gene expression and regulation, voltage-gated channels.

INTRODUCTION

Our ability to process and achieve all physiological functions relies on the communication between cells. The fastest mechanism of communication brings into play electrical signals generated by ion channels located across the plasma membrane. Indeed, these channels allow specific ions to diffuse through the lipid bilayer, thereby generating changes in membrane potential. This electrical signal triggers a number of cellular events among which the activation of voltage-gated calcium channels (VGCC) that results in a calcium influx. This remarkable feature that allows the combination of electrical and chemical activities, depends on different types of ligand- and voltage-gated channels, which are permeable to ions such as sodium (Na^+), potassium (K^+), chloride (Cl^-) and calcium (Ca^{2+}).

Calcium is one of the most important second messengers in the cell. It controls many physiological processes such as muscle contraction, neuronal communication, cell division and gene transcription. Its entry in cells occurs via VGCC which are found not only in the membrane of excitable cells, including muscle cells and neurons, but also in cells not sensitive to electrical signals such as glial cells and lymphocytes. VGCC were first characterized in skeletal muscle [1–4]. With these seminal works, it was shown that the skeletal muscle VGCC is a

multimeric protein complex, composed of a main pore-forming α_1 subunit ($\text{Ca}_v\alpha_1$) associated with auxiliary subunits: β , $\alpha_2\delta$ and γ ($\text{Ca}_v\beta$, $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$ and $\text{Ca}_v\gamma$ respectively). Later, the purification and characterization of the brain N-type Ca^{2+} channel confirmed the multimeric nature of VGCC but did not confirm the presence of a $\text{Ca}_v\gamma$ subunit as an associated entity to the channel [5–7]. All VGCC subunits are encoded by several genes (10 for $\text{Ca}_v\alpha_1$, 4 for $\text{Ca}_v\beta$, 4 for $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$ and 8 for $\text{Ca}_v\gamma$) increasing the phenotype diversity of calcium channels [8]. Besides regulating the channel, emerging evidence shows that these auxiliary subunits may undergo additional functions unrelated to the $\text{Ca}_v\alpha_1$ subunit (for review, see [9]). Among all auxiliary subunits, the cytosolic β subunit ($\text{Ca}_v\beta$) has been shown to control the trafficking of $\text{Ca}_v\alpha_1$ to the plasma membrane, its regulation and its gating properties [10,11]. However, a growing number of proteins involved in diverse aspects of cell signalling have been found to interact with $\text{Ca}_v\beta$, leading to this subunit being envisioned as a multifunctional protein. Interestingly, several recent studies highlight new $\text{Ca}_v\beta$ functions that are independent of its role in the regulation of the VGCC.

Beginning with a brief overview on VGCC, this review will focus on the different protein partners of $\text{Ca}_v\beta$ and on the cellular functions in which these β subunit-containing complexes are involved.

Abbreviations: ABP, AID-binding pocket; AID, α_1 -interaction domain; ASD, autism spectrum disorder; BARP, β -anchoring and -regulatory protein; BID, β -interaction domain; BK_{Ca} , large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ ; CaMKII, Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II; $\text{Ca}_v\beta$, voltage-gated calcium channel β subunit; CSD, chromo-shadow domain; DHPR, dihydropyridine receptor; ER, endoplasmic reticulum; GK, guanylate kinase; HVACC, high voltage-activated calcium channels; KO, knockout; LEMS, Lambert–Eaton myasthenic syndrome; LVACC, low voltage-activated calcium channels; MAPK, mitogen-associated protein kinase; MPC, muscle progenitor cells; NC, non-canonical; PKA, protein kinase A; RyR, ryanodine receptor; SNP, single-nucleotide polymorphism; SR, sarcoplasmic reticulum; VGCC, voltage-gated calcium channels.

¹ To whom correspondence should be addressed (email michel.dewaard@univ-nantes.fr).

Table 1 Ca²⁺ channel types and their corresponding α_1 subunits

Channel family	Current type	α_1 subunit	Gene name
Ca _v 1	L-type	Ca _v 1.1	<i>CACNA1S</i>
		Ca _v 1.2	<i>CACNA1C</i>
		Ca _v 1.3	<i>CACNA1D</i>
		Ca _v 1.4	<i>CACNA1F</i>
Ca _v 2	P/Q-type	Ca _v 2.1	<i>CACNA1A</i>
		Ca _v 2.2	<i>CACNA1B</i>
		Ca _v 2.3	<i>CACNA1E</i>
Ca _v 3	T-type	Ca _v 3.1	<i>CACNA1G</i>
		Ca _v 3.2	<i>CACNA1H</i>
		Ca _v 3.3	<i>CACNA1I</i>

VOLTAGE-GATED CALCIUM CHANNELS

Based on their sensitivity to membrane depolarization, VGCC were classified in two families: high voltage-activated calcium channels (HVACC), which are activated in response to large membrane depolarization, and low voltage-activated calcium channels (LVACC) that are activated by smaller depolarization [12]. Further studies divided VGCC into subtypes (L-, N-, P/Q-, R- and T-types) according to their biophysical (voltage-dependencies and kinetics of activation and inactivation) and pharmacological properties [8]. L-type channels were first described as responsible for the excitation/contraction coupling in skeletal and cardiac muscles, whereas T-type channels were involved in heart pacemaker activity [13,14]. N-, P/Q- and R-type channels were found to be mainly expressed in the central and peripheral nervous systems, playing a role in the control of neurotransmitter release [13,14]. In addition to these characteristics, VGCC also differ in their subunits composition. HVACC embody a principal transmembrane subunit α_1 (Ca_v α_1) known as the pore-forming subunit associated with a disulfide-linked dimer $\alpha_2\delta$ (Ca_v $\alpha_2\delta$), an intracellular β subunit (Ca_v β) and an additional transmembrane γ subunit (Ca_v γ) so far best characterized in the skeletal muscle Ca²⁺ channels. In contrast, LVACC are only composed of Ca_v α_1 [8].

A clearer subtype channel nomenclature is based on the different isoforms of the pore-forming subunit (Table 1, for review, see [15]). Three major families of α_1 subunits (Ca_v1, Ca_v2 and Ca_v3), each one containing several members, have been defined [8]. The Ca_v1 family includes four different L-type channels named Ca_v1.1, Ca_v1.2, Ca_v1.3 and Ca_v1.4. The three members of the Ca_v2 family (Ca_v2.1, Ca_v2.2 and Ca_v2.3) correspond to P/Q-type, N-type and R-type channels respectively. In addition, there are three types of Ca_v3 channels (Ca_v3.1, Ca_v3.2 and Ca_v3.3) corresponding to the T-type channels [8,16].

VOLTAGE-GATED CALCIUM CHANNEL β SUBUNIT (Ca_v β)

Discovery

Characterization in 1984, by Curtis and Catterall, of the skeletal muscle dihydropyridine receptor (DHPR) as the first identified VGCC, led to the discovery of Ca_v β . In that study, three non-covalently linked subunits were purified: α , β and γ (160, 53 and 32 kDa respectively) [2]. Further studies showed that the DHPR consisted of α_1 (175 kDa), α_2 (143 kDa), β (52 kDa), δ (24–27 kDa) and γ (30 kDa). Moreover, α_2 and δ are associated post-translationally via disulfide bonds into a unique subunit termed $\alpha_2\delta$ [17,18]. Ca_v β , corresponding to the 52 kDa protein, was later on described as the only entirely cytosolic subunit and was shown to associate with a cytoplasmic domain of α_1 subunit

[19]. Recently, the cryo-electron microscopy structure of the skeletal DHPR/L-type Ca²⁺ channel complex has been published, initially with a 15 Å resolution [20] and more recently with 4.2 Å resolution [21].

Ca_v β isoforms and tissue distribution

Four different genes *CACNB1*, *CACNB2*, *CACNB3* and *CACNB4* encode four different Ca_v β named Ca_v β_1 , Ca_v β_2 , Ca_v β_3 and Ca_v β_4 respectively. Each of Ca_v β can undergo alternative splicing creating a wide collection of splice variants with distinct biophysical and pharmacological properties [22]. As mentioned above, Ca_v β isoforms participate in the organization of various types of VGCC and, therefore, show a specific tissue distribution (Table 2) [23]. Ca_v β_{1a} was the first identified splice variant and appeared to be the main isoform expressed in the skeletal muscle [24]. It has been shown that it plays a critical role in excitation/contraction coupling, not only by controlling the expression of Ca_v1.1 in transverse tubules but also by promoting the clustering of four DHPR complexes in a tetrad that pairs to a single ryanodine receptor (RyR) [25]. Ca_v β_{1a} has also been described as the main isoform expressed in postnatal rat heart [26]. In fact, only two Ca_v β_1 splice variants (Ca_v β_{1a} and Ca_v β_{1b}) have been observed in rat tissue [26]. However, Ca_v β_{1b} was identified as the main Ca_v β expressed in human heart indicating that different Ca_v β splice variants may be expressed in the same tissue depending on the species or the age. Ca_v β_{1b} is also expressed in the brain where its distribution remains diffused as in human ventricular tissue, and it was also detected in the pancreas [26,27]. Ca_v β_2 seems to be the most abundant subunit expressed in atrial myocytes and appears to be predominant in rat heart and smooth muscle. In addition, Ca_v β_2 was detected at low levels in the brain and in the smooth muscle of the aorta, trachea and lung. Ca_v β_2 is also present in some neuronal cell types including cerebellar Purkinje cells, hippocampal pyramidal neurons and photoreceptors [26,28,29]. Five distinct Ca_v β_2 splice variants have been cloned from human myocardium named Ca_v β_{2a} , Ca_v β_{2b} , Ca_v β_{2c} , Ca_v β_{2d} and Ca_v β_{2e} . These five splice variants show different expression profiles in each heart chamber [26]. Ca_v β_{2a} was detected in human ventricular tissue and has the particularity to be the only subunit that mediates slow kinetics inactivation of Ca_v α_1 through palmitoylation [23,26,27,30]. On the other hand, Ca_v β_{2b} mRNA is highly expressed in both atria and ventricles. It does not show significant variations with age, whereas the expression of Ca_v β_{2c} , Ca_v β_{2d} and Ca_v β_{2e} decrease with development. In atria and ventricles, Ca_v β_{2c} expression is significantly higher at 4–5 weeks than at 16 weeks of age [26]. Likewise, the Ca_v β_{2e} isoform is mainly expressed in the ventricles at 4–5 weeks of age, it is weakly detected at 16 weeks and it is not detectable at any age in atria [26]. The Ca_v β_3 isoform mRNA was also identified in human ventricular tissue, whereas Ca_v β_3 was detected in smooth muscle where it appears to be the major isoform along with Ca_v β_2 [26,28]. Ca_v β_4 and Ca_v β_3 were both detected in the brain. Ca_v β_3 is predominantly expressed in olfactory bulb, cortex, hippocampus and habenula, whereas Ca_v β_4 is prominent in cerebellar Purkinje and granule cells and its expression increases with development in rat brain [31–33]. Previously, Ca_v β_4 was reported to be present in early embryonic heart and to disappear before birth with an additional splice variant identified in renal and fetal cardiac tissues termed Ca_v β_{4d} [26].

Ca_v β structure

Ca_v β subunits are highly homologous proteins sharing the particularity of containing specific interacting domains. The

Table 2 Tissue distribution of Ca_vβ

Gene name	Ca _v β splice variants	Tissue distribution	References
CACNB1	β ₁	Cerebral cortex, habenula, hippocampus, olfactory bulb, skeletal muscle, heart, spleen and T-cells	[24,31]
	β _{1a}	Skeletal muscle and postnatal rat heart	[24,26,31,33]
	β _{1b}	Human heart, cerebellum, cerebral cortex, nerve and pancreas	[26,31]
	β _{1c}	Brain and spleen	[31]
	β _{1d}	Heart	[14,53]
CACNB2	β ₂	Heart, hippocampus, cerebellum, pontine nucleus, substantia nigra, central grey, habenula, pineal gland, thalamic nuclei, cerebellum, lung, T-cells and osteoblasts	[14,29,33]
	β _{2a}	Heart, aorta and brain	[26,29]
	β _{2b}	Heart (predominant in human heart), aorta and brain	[26,28,29]
	β _{2c}	Heart and brain	[26,28,29]
	β _{2d}	Heart (only early in development)	[28,29]
	β _{2e}	Heart (only early in development)	[29]
CACNB3	β ₃	Cerebellum, cerebral cortex, habenula, hippocampus, olfactory bulb, striatum, heart, aorta, kidney, lung, skeletal muscle, smooth muscle, spleen, thalamus, T-cells and trachea	[26,28,32,33]
	β ₄	Brain stem, cerebral cortex, dentate gyrus, habenula, hippocampus, olfactory bulb, striatum, thalamus and hypothalamus	[26,28,33]
CACNB4	β ₄	Brain stem, cerebral cortex, dentate gyrus, habenula, hippocampus, olfactory bulb, striatum, thalamus and hypothalamus	[26,28,33]
	β _{4a}	Spinal cord and cerebellum	[54,55]
	β _{4b}	Spinal cord and forebrain	[54,55]

**Figure 1** Schematic representation of Ca_vβ

The SH3 and GK domains are conserved in all Ca_vβs. BID was the first identified interaction site that binds to Ca_vα₁. Later, it was found that the interaction with Ca_vα₁ engages additional regions of the GK domain, therefore, termed ABP (AID-binding pocket).

sequence can be divided into five domains based on amino acid similarities between subtypes (Figure 1). Ca_vβ consists of a conserved motif of three linked domains called the ‘core region’ flanked by highly variable N- and C-termini. The N- and the C-termini of most Ca_vβ subunits have not been crystallized and their 3D structure is therefore unknown, with the exception of the structure of the N-terminus of Ca_vβ₄ that has been determined by NMR [34]. It consists of a fold made up of two α-helices and two anti-parallel β-sheets. However, none of the C-termini structures have been identified yet [23,27]. The ‘core region’ is composed of two highly conserved domains: the Src homology (SH3) and the guanylate kinase (GK) domains connected by a weakly conserved HOOK region. This SH3–HOOK–GK core recapitulates many critical functions of Ca_vβ subunits and allows their classification as members of the membrane-associated GK protein family, which are grouped under the generic term of ‘MAGUK’ [23]. The Src homology (SH3) domain mediates specific protein–protein interactions. It has a highly conserved hydrophobic surface, the PxxP-binding site, which binds to PxxP-sequences in target proteins [23,27]. The GK domain maintains the general structural characteristics of GKs, which belong to the nucleotide monophosphate kinase family and catalyse the reversible phosphate conversion from ATP to GMP in order to generate ADP and GDP [27]. The GK domain also contains a protein–protein interaction site that binds to the α₁-interaction domain (AID) of Ca_vα₁, thereby guiding channel assembly. The GK domain also binds to other proteins including RGK, GTPases and Ca²⁺-activated K⁺ (BK_{Ca}) channels (discussed below) [23,27].

The length and amino acid sequence of the HOOK region linking the SH3 to the GK domain varies among Ca_vβ subunits.

The three-dimensional structure of a large portion of this region is still undetermined due to its low electron density [23,27,35]. Crystallographic data show that the SH3 and GK domains interact intra-molecularly and that this interaction is important for the functionality of Ca_vβ. Mutations and post-translational modifications affecting the SH3 and GK domain of Ca_vβ can alter the gating kinetics of the channel [23,27].

PARTNERS OF Ca_vβ

Ca_vβ and Ca_vα₁: a strong relationship

Ca_vα₁ was the first protein identified to interact with Ca_vβ and has therefore been considered as the natural partner of Ca_vβ. Until recently, the only function of this auxiliary subunit was to modulate the plasma membrane targeting, expression levels, gating properties and activity of Ca_vα₁, which triggers or modulates important physiological processes including gene expression, excitation–secretion and excitation–contraction coupling [36]. Effectively, Ca_vβ is considered a chaperone protein allowing the surface expression of Ca_v1 and Ca_v2 subunits, which are unable to reach the plasma membrane alone [11].

Several studies have investigated the protein domains involved in the interaction between Ca_vα₁ and Ca_vβ. All Ca_vβs interact with the 18-amino acid AID located in the cytoplasmic loop of Ca_vα₁ between transmembrane domains I and II [10,19,37]. Regarding the region of Ca_vβ that interacts with AID, a region in the GK domain (named BID for β-interaction domain) was first described as the interacting domain with Ca_vα₁ [37,38]. However, the recent elucidation of the crystal structure of Ca_vβ_{2a} revealed that the BID sequence is deeply buried within the GK domain making its direct interaction with AID difficult. Thus, it has been shown that the interaction with AID engages three regions of the GK domain sequence that form a hydrophobic cleft that was named AID-binding pocket (ABP) [39–42]. Mutation of some amino acid residues in the ABP significantly weakens or entirely inhibits the interaction between Ca_vα₁ and Ca_vβ. Similarly, mutation of some amino acid residues in the BID alters Ca_vα₁/Ca_vβ interaction, suggesting that modification of the BID could alter ABP/AID interaction. Interestingly, these

structural studies show that the AID adopts an α -helical structure when interacting with $\text{Ca}_v\beta_{2a}$, demonstrating that $\text{Ca}_v\alpha_1/\text{Ca}_v\beta$ interaction has the ability to modify $\text{Ca}_v\alpha_1$ structure to some extent.

As mentioned previously, it is now widely accepted that binding of $\text{Ca}_v\beta$ to the AID is absolutely required for the exit of $\text{Ca}_v\alpha_1$ from the endoplasmic reticulum (ER) and its trafficking to the plasma membrane [43–45]. In a previous study, Altier et al. [46] showed that in the absence of $\text{Ca}_v\beta$, $\text{Ca}_v1.2$ channels are subjected to ubiquitination and proteasomal degradation. However, in the presence of $\text{Ca}_v\beta$, $\text{Ca}_v1.2$ channels are properly folded and transported to the plasma membrane. This mechanism of ubiquitination and proteasomal degradation is not common to other types of HVACC, in that the $\text{Ca}_v2.1$ channels are not ubiquitinated in the absence of $\text{Ca}_v\beta$. These findings demonstrate that the export pathway from the ER varies among different channel families and suggest the presence of a still unidentified mechanism regulating L-type channels expression [46].

Although the $\text{Ca}_v\beta/\text{AID}$ interaction has been proposed to occur with high affinity (ranging from 2 to 54 nM) [13], several reports strongly suggested that this interaction is reversible [47–50], raising the question of the permanence of $\text{Ca}_v\alpha_1/\text{Ca}_v\beta$'s interaction. The reversibility of the $\text{Ca}_v\beta/\text{Ca}_v\alpha_1$ interaction has also been the subject of a study using FRAP analysis in dysgenic myotubes. This study reported that in skeletal muscle triads, $\text{Ca}_v\beta_{1a}$ forms a stable complex with $\text{Ca}_v1.1$ and $\text{Ca}_v1.2$, whereas $\text{Ca}_v\beta_{2a}$ and $\text{Ca}_v\beta_{4b}$ interact with these channels in a more dynamic manner. Moreover, modifications or deletions in the I–II loop of $\text{Ca}_v1.1$ did not alter the dynamic properties of $\text{Ca}_v\beta$. However, a single residue substitution in the ABP of $\text{Ca}_v\beta_{1a}$ (M293A mutation) decreased the stability of the $\text{Ca}_v\alpha_1/\text{Ca}_v\beta$ complex, suggesting that binding to $\text{Ca}_v\alpha_1$ is under the control of intrinsic properties of $\text{Ca}_v\beta$ [51]. On the other hand, reports also showed that some protein partners of $\text{Ca}_v\beta$ or $\text{Ca}_v\alpha_1$ could regulate the dissociation between these two subunits [52], thereby promoting calcium influx regulation and facilitating the engagement of $\text{Ca}_v\beta$ in calcium-independent cell signalling pathways.

Finally, of interest also, is the finding that some of the gating properties of VGCC are also defined by the nature of the $\text{Ca}_v\beta$ isoform, and by its ability to perform additional interactions with $\text{Ca}_v\alpha_1$ that do not involve the AID. As such, the C-termini of some $\text{Ca}_v\beta$ have been reported to interact with either the N-terminus or the C-terminus of $\text{Ca}_v\alpha_1$ [11]. A recent cryo-electron microscopy study of the overall structure of the DHPR illustrated the proximity of the $\text{Ca}_v\beta_{1a}$ subunit to the C-terminal domain of $\text{Ca}_v1.1$ indicating the plausibility of this type of secondary interaction [21].

$\text{Ca}_v\beta$ and protein kinases: a complex relationship

Phosphorylation is one of the most common mechanisms to regulate protein functions. VGCC do not break this rule. Indeed, cardiac L-type Ca^{2+} channels were among the first channels shown to be regulated by phosphorylation. Although phosphorylation of the cardiac $\text{Ca}_v\alpha_1$ is well documented, both in terms of the identification of the phosphorylation sites as well as their functional relevance, phosphorylation of $\text{Ca}_v\beta$ remains poorly understood. Nevertheless, all $\text{Ca}_v\beta$ subunits contain numerous putative phosphorylation sites in their sequences [15] suggesting that phosphorylation of $\text{Ca}_v\beta$ has the potential to up- or down-regulate VGCC-mediated currents, or alternatively, to regulate an interaction site with a protein partner. In fact, a previous study reported that mitogen-associated protein kinase

(MAPK) is capable of phosphorylating and potentiating L- and N-type calcium channels in dorsal root ganglion neurons [56]. This up-regulation required $\text{Ca}_v\beta$ in COS-7 cells because the MAPK-dependent up-regulation is abolished in the absence of $\text{Ca}_v\beta$. Unfortunately, it remains unknown if this phosphorylation occurs on $\text{Ca}_v\alpha_1$ or $\text{Ca}_v\beta$ because both contain potential MAPK phosphorylation sites.

Moreover, there is evidence indicating that cardiac L-type currents are under the control of the β -adrenergic receptor pathway, via protein kinase A (PKA); however, the molecular mechanism of this regulation has not yet been fully elucidated. Bünemann et al. [57] suggested that at least two residues (Ser⁴⁷⁸ and Ser⁴⁷⁹) of $\text{Ca}_v\beta_2$ are the potential phosphorylation sites for the PKA-mediated stimulation of cardiac L-type currents. Given that this study was done in a heterologous expression system, further experiments performed in transgenic animal models and cardiomyocytes contradicted this finding and thus generated a debate on whether $\text{Ca}_v\beta$ can be phosphorylated by PKA (for review, see [58]). Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II (CaMKII) is one of the most abundant enzymes in several cell types including muscle cells and neurons. Previous studies showed that CaMKII is able to associate with $\text{Ca}_v\beta_{1b}$ *in vitro* but not with $\text{Ca}_v\beta_3$ and $\text{Ca}_v\beta_4$ [59]. Also, it has been shown that CaMKII can phosphorylate $\text{Ca}_v\beta_{1b}$, $\text{Ca}_v\beta_3$ and $\text{Ca}_v\beta_4$, but the physiological consequences of this phosphorylation remain unclear [59]. Recently, a study was conducted in which $\text{Ca}_v2.2$ channels were expressed in *Xenopus* oocytes in various subunit combinations with or without $\text{Ca}_v\beta$ [60]. Using acetyl- β -methylcholine (MCh) (an activator of PKC α), as well as PKC isoenzymes α , β II or ϵ , $\text{Ca}_v2.2$ currents were potentiated when $\text{Ca}_v2.2$ was expressed alone. In contrast, MCh failed to potentiate currents when $\text{Ca}_v2.2$ was co-expressed with $\text{Ca}_v\beta_{1b}$, $\text{Ca}_v\beta_{2a}$, $\text{Ca}_v\beta_3$ or $\text{Ca}_v\beta_4$ and PKC isoenzymes failed to potentiate currents when $\text{Ca}_v2.2$ was co-expressed with $\text{Ca}_v\beta_{1b}$. In addition, MCh failed to potentiate $\text{Ca}_v2.2$ currents in the serine/threonine (Thr⁴²², Ser¹⁷⁵⁷ and Ser²¹³²) mutants of $\text{Ca}_v2.2$. These observations suggest that $\text{Ca}_v\beta$ compete with PKC for their target sites on $\text{Ca}_v2.2$ [60]. This notion was further supported by an *in vitro* study done by the same group [61].

$\text{Ca}_v\beta_3$ knockout (KO) mice showed a greater ability to control high glucose concentration in blood than wild-type mice owing to a significantly higher insulin secretion [62]. This finding led to the suggestion that calcium channels regulate the secretion of insulin. Similarly, down-regulation of $\text{Ca}_v\beta_2$ and $\text{Ca}_v\beta_3$ via specific siRNA increased serum insulin levels and caused an efficient glucose homeostasis. In contrast, down-regulation of $\text{Ca}_v\beta_1$ and $\text{Ca}_v\beta_4$ failed to show identical consequences. The observation of PKC isoenzymes localization in isolated pancreatic β -cells from $\text{Ca}_v\beta_2$ or $\text{Ca}_v\beta_3$ siRNA-injected mice revealed that three PKC isoenzymes PKC α , β II and θ translocated to the plasma membrane. The study suggested that $\text{Ca}_v\beta_2$ and $\text{Ca}_v\beta_3$ inhibit PKC activation via one of the two following possibilities: (1) inhibition of the translocation of PKC isoenzymes to the membrane or (2) reduction of the interaction between calcium channels and PKC isoenzymes and thus the secretion of insulin [61]. Altogether, these findings show that $\text{Ca}_v\beta$ regulates insulin secretion.

Interaction of $\text{Ca}_v\beta$ with membrane receptors and other ion channels

Ryanodine receptors

In skeletal muscle cells, L-type VGCC are localized at invaginations of the plasma membrane called T-tubules. These

channels were first characterized as the DHPRs. In these cells, the DHPR play a particular role since they are functionally coupled to another calcium channel, named the skeletal RyR, located within the sarcoplasmic reticulum (SR) membrane. The juxtaposition of the T-tubules and the SR membrane allows the physical coupling of the DHPR and the RyR and forms a highly organized structure named the triad. Within the T-tubules membrane, the DHPR is organized in tetrads corresponding to four functional DHPRs facing one RyR. This particular organization called the tetrad is required for the DHPR/RyR functional coupling, which allows the transfer of the electrical information sensed by the DHPR to the RyR through a mechanism known as the ‘excitation–contraction’ (EC) coupling [63,64]. In addition to its role in the surface expression of DHPRs, the skeletal muscle isoform of Ca_vβ (Ca_vβ_{1a}) appears to be indispensable for the formation of the tetrad and EC coupling [63,64]. In fact, L-type Ca²⁺ currents can be fully rescued by the expression of different exogenous Ca_vβ isoforms in skeletal muscle cells isolated from Ca_vβ_{1a}-KO mice embryos or zebrafish knockdowns, but only Ca_vβ_{1a} and Ca_vβ_{1c} are able to normalize EC coupling. In addition, Ca_vβ_{1a} was shown to interact directly with the RyR via a heptad repeat (L⁴⁷⁸-V⁴⁸⁵-L⁴⁹²) located in the C-terminus of Ca_vβ_{1a}. Deletion of this region leads to the loss of EC coupling. In contrast, expression of the Ca_vβ_{2a} subunit carrying the corresponding sequence of Ca_vβ_{1a} in Ca_vβ_{1a}-null myotubes is sufficient to recover EC coupling [65]. A highly charged region (KKKRRxxR) of the skeletal RyR was found to govern the interaction with Ca_vβ_{1a} [65,66]. Finally, the Ca_vβ_{1a} subunit seems to help organize Ca_v1.1/RyR interaction. Indeed, a cryo-electron microscopy study of the DHPR pointed to the role of Ca_vβ as an anchor that helps the flexible II–III loop of Ca_vα₁ to interact with RyR [20].

Ca_vβ slows BK_{Ca} Ca²⁺ sensitivity via Slo1

BK_{Ca} channels are found in excitable and non-excitable cells, including neurons, myocytes, secretory cells and epithelial cells [67]. Activation of these channels follows membrane depolarization and binding of cytosolic Ca²⁺ and plays important roles in several physiological processes including smooth muscle tone and neuronal excitability [67]. Surprisingly, Zou et al. [68] described a physical association between the L-type Ca²⁺ channel β subunit (Ca_vβ₁) and Slo1, the pore-forming subunit of BK_{Ca} channels. This interaction takes place at two distinct regions of Slo1: (1) a non-canonical (NC) SH3-binding motif previously revealed to link BK_{Ca} channels to the actin cytoskeleton [69] and (2) sites in the calcium bowl region of Slo1 [68]. Moreover, this interaction does not involve any other channel subunit (such as the pore-forming subunit) or any other intermediate protein. Consequently, this interaction between structural elements of a potassium channel and a calcium channel slows BK_{Ca} channels activation/deactivation kinetics and decreases significantly Ca²⁺ sensitivity. The observed effects of Ca_vβ₁ on BK_{Ca} channels gating were described as the result of its interaction with the calcium bowl region of Slo1. This interaction may be part of a mechanism modulating negative feedback control of voltage-dependent Ca²⁺ influx in excitable cells by accelerating membrane repolarization and inducing L-type deactivation [68].

Bestrophin-1 regulates VGCC via Ca_vβ

Bestrophin-1 is an anion channel found in the retinal pigment epithelium (RPE). Mutation of this channel leads to different types of retinal degeneration. It is well documented that

bestrophin-1 can regulate VGCC including modulation of activation kinetics, voltage-dependent activation and/or current amplitude [70–74]. Recently, it has been shown that the regulation of L-type Ca²⁺ channel activity by bestrophin-1 is due to the physical interaction of bestrophin-1 with Ca_vβ. In fact, bestrophin-1 co-immunoprecipitated with Ca_vβ₃ and Ca_vβ₄, however, no interaction was observed with Ca_v1.3 when this subunit was expressed alone. Confocal microscopy showed a uniform co-localization of bestrophin-1 and Ca_vβ₃ in the cytoplasm. In contrast, in the presence of Ca_v1.3, Ca_vβ₃ and bestrophin-1 or Ca_vβ₄ and bestrophin-1, all three proteins were found to be localized at the cell membrane indicating the preferential interaction of bestrophin-1 with Ca²⁺ channels through Ca_vβ [75]. It was first described that this interaction involves a proline-rich motif of bestrophin-1 (located between amino acids 330 and 346) and the SH3 domains of Ca_vβ [73,74]. More recently, Milenkovic et al. [75] reported a novel conserved proline-rich motif on the C-terminus of bestrophin-1 (located between the amino acids 468 and 486), which is also required for bestrophin-1-dependent modulation of Ca_vβ functions. The absence of the first proline-rich motif reduced the binding to Ca_vβ but did not affect the trafficking of Ca_v1.3 to the cell membrane, whereas a deletion mutant lacking the second proline-rich motif impaired the capacity of Ca_vβ to regulate the surface expression of the pore-forming subunit [73,75]. These observations led to the conclusion that the proline-rich motif between amino acid positions 330–346 is required for the binding between Ca_vβ and bestrophin-1, and that the other proline-rich motif between amino acid positions 468–486 is involved in the regulatory properties of Ca_vβ [75].

Interaction of Ca_vβ with GTPases

RGK GTPases: potential inhibitors of HVACC

Four members constitute the family of Ras-related monomeric small GTP-binding (RGK) proteins (Rad, Rem, Rem2, Gem/Kir). Although these proteins present important sequence differences compared with the Ras family, they conserved the ability to bind GDP and GTP as well as the GTPase activity. However, it is still unclear if and how this GTPase activity is related to the regulatory functions of RGK proteins. Rad was the first RGK shown to inhibit VGCC Ca²⁺ currents [76]. Since then, all members of the RGK family have been shown to be potent inhibitors of Ca²⁺ currents carried by VGCC. Co-expression of each RGK member with Ca_vα₁, Ca_vα₂δ and Ca_vβ in various heterologous expression systems, led to the inhibition of Ca²⁺ currents. However, Ca²⁺ currents generated by the expression of Ca_vα₁ alone appeared to be insensitive to any RGK, strongly suggesting that RGKs inhibit VGCC through their direct interaction with Ca_vβ [76–78]. This RGK/Ca_vβ interaction was corroborated by co-immunoprecipitation experiments and seems to be promiscuous since all RGK proteins were able to interact with any full-length Ca_vβ [27,76,79]. Consistent with this idea, the activity of T-type channels, which is independent of Ca_vβ, was not affected by RGK proteins [77,80].

In adult guinea pig heart cells, Xu et al. [81] showed that over-expression of Rem down-regulates L-type Ca²⁺ currents without affecting the number of channels at the cell surface. Interestingly, under these conditions, PKA failed to up-regulate L-type Ca²⁺ currents indicating that Rem somehow counteracts the normal PKA regulation of cardiac L-type currents. This effect may be due to a steric hindrance or a masking of PKA phosphorylation sites on Ca_vβ by Rem interaction.

More generally, different mechanisms have been proposed for the effects of RGK on VGCC Ca^{2+} currents. The first one relies on the general concept that the RGK proteins enter in competition for the interaction of $\text{Ca}_v\beta$ with $\text{Ca}_v\alpha$. This competition can take several forms (inhibition of association of $\text{Ca}_v\beta$ with $\text{Ca}_v\alpha$ or reduction of $\text{Ca}_v\beta$ availability in the cytoplasm). In the first case scenario, binding of RGK protein to $\text{Ca}_v\beta$ alters its binding to $\text{Ca}_v\alpha_1$ and consequently the trafficking of the channel to the plasma membrane, leaving $\text{Ca}_v\alpha_1$ trapped in the ER [27]. However, what is known so far is that $\text{Ca}_v\beta_2$ binds to AID with a higher affinity than it does with Rem [82], making unlikely that RGK proteins out compete $\text{Ca}_v\beta$ for $\text{Ca}_v\alpha_1$ once they are associated [27]. In the second case scenario, interaction of $\text{Ca}_v\beta$ with RGK proteins would lead to the targeting of the $\text{Ca}_v\beta$ /RGK complex to the nucleus decreasing the cytoplasmic concentration of $\text{Ca}_v\beta$ and the consequent targeting of the $\text{Ca}_v\alpha_1$ to the plasma membrane. Indeed, RGKs were shown to localize to the nucleus in a process depending on their interaction with CaM and 14-3-3 proteins. However, the putative functional role of the nuclear $\text{Ca}_v\beta$ /RGK complex remains to be elucidated. A second mechanism relied on the fact that Rem was also shown to inhibit VGCC without modifying the density of $\text{Ca}_v\alpha_1$ at the plasma membrane [80]. These results suggested the possibility that RGK proteins could inhibit VGCC gating by interacting with $\text{Ca}_v\beta$ associated with the channel complex at the plasma membrane. This mechanism would involve the association of the C-terminal domain of RGK with the negatively charged inositol 1,4,5-bisphosphate and triphosphate lipids (PIP lipids), thereby promoting the membrane anchoring of RGKs. Finally, the third mechanism suggests that RGK proteins induce the internalization of VGCC, thereby decreasing their surface expression. A study showed that in HEK293 cells, the dynamin-mediated endocytosis of L-type channels was enhanced by Rem [83]. In conclusion, RGKs apparently influence calcium channel currents at two different levels: at the intracellular and at the plasma membrane level. This dual effect is reminiscent of the multiplicity of roles assigned to $\text{Ca}_v\beta$.

Dynamin: a linker between HVACC and the endocytic machinery

Dynamin is a member of the large GTPases family of proteins involved in membrane fission during endocytosis [84,85]. It consists minimally of three domains: an N-terminus GTPase domain, a conserved middle domain and a C-terminus GTPase effector domain (GED). Some dynamins, such as mammalian dynamins I, II and III, show supplementary domains: a pleckstrin homology domain in charge of phospholipid binding and a proline-rich domain that can interact with SH3 domains of several proteins [49]. Since $\text{Ca}_v\beta$ -SH3 shares the general 3D structure of canonical SH3 domains, dynamin was suspected to be a potential interacting partner for $\text{Ca}_v\beta$ [49]. Several studies demonstrated that this interaction indeed occurs [86,87]. In 2007, Gonzalez-Gutierrez et al. [86] showed that $\text{Ca}_v\beta_{2a}$ interacts via its SH3 domain with the proline-rich domain (PRD) of dynamin in *Xenopus* oocytes. Injection of isolated $\text{Ca}_v\beta$ -SH3 domain into *Xenopus laevis* oocytes expressing $\text{Ca}_v\alpha_1$ led to the internalization of VGCC, and consequently, a reduced number of calcium channels at the plasma membrane. This observation was explained by the presence of endogenous dynamin in *Xenopus* oocytes. In contrast, this effect was not observed when the interaction between dynamin and SH3 domains was blocked by a small peptide (derived from the proline-rich domain of dynamin), known to disturb the interaction with other SH3 domains and to inhibit the endocytosis of synaptic vesicles. Moreover, the isolated SH3 domain and the full-length



Figure 2 Structural and functional domains of BARP

The N-glycosylation site (*), transmembrane region (yellow) and the $\text{Ca}_v\beta$ -interacting domains I and II (blue) are illustrated. Amino acids in red are crucial for the interaction with $\text{Ca}_v\beta$.

$\text{Ca}_v\beta$ were found to interact *in vitro* with dynamin and to internalize the distantly related *Shaker* potassium channel [86]. These observations suggest that the interaction between dynamin and SH3 domains links HVACC to the endocytic machinery.

Interaction of $\text{Ca}_v\beta$ with other proteins

BARP negatively regulates VGCC activity via $\text{Ca}_v\beta$

The interaction of VGCC with proteins of the secretory machinery highlights the importance of the coordination of Ca^{2+} entry and neurosecretion at the spatial and temporal levels. A recent study described a previously uncharacterized protein, VGCC- β -anchoring and -regulatory protein (BARP). This integral membrane glycoprotein is predominantly expressed in neurons and neuropeptide secretory cells. In fact, high BARP mRNA levels were located in brain, pancreatic islets and neuroendocrine cell lines (MIN6 and PC12), with no or weak expression in other tissues [88]. Interestingly, in the brain and cerebellum, BARP co-immunoprecipitated with $\text{Ca}_v\beta_3$ and $\text{Ca}_v\beta_4$ but not with $\text{Ca}_v\beta_1$ suggesting that BARP may associate with specific $\text{Ca}_v\beta$ in particular sub-cellular domains of neurons. When over-expressed in COS-1 cells, the protein was able to bind to all the different $\text{Ca}_v\beta$ isoforms and apparently to change their sub-cellular localization in the absence of $\text{Ca}_v\alpha_1$. Indeed, after many studies showing a cytosolic distribution with some nuclear targeting of $\text{Ca}_v\beta$ isoforms, over-expression of BARP localized the cytosolic $\text{Ca}_v\beta$ isoforms to the plasma membrane. The interaction between $\text{Ca}_v\beta$ and BARP involves two domains, namely domain I and domain II (Figure 2). Domain I was first described as the major interacting region of BARP with $\text{Ca}_v\beta$. Then, a truncated BARP that lacked domain I was able to interact with $\text{Ca}_v\beta$ leading to the identification of the second binding region, domain II. This second domain interacts with $\text{Ca}_v\beta_3$, $\text{Ca}_v\beta_{2a}$, $\text{Ca}_v\beta_{2b}$ and $\text{Ca}_v\beta_{4a}$ but not with $\text{Ca}_v\beta_{1a}$, whereas domain I binds to all $\text{Ca}_v\beta$ s. Moreover, domain I interacts with the α_1 interaction domain of $\text{Ca}_v\beta$ and interferes with the association between $\text{Ca}_v\beta$ and $\text{Ca}_v\alpha_1$. Interestingly, BARP does not have any effect on $\text{Ca}_v\alpha_1$ expression at the plasma membrane, but it inhibits Ca^{2+} channel activity, leading to the inhibition of Ca^{2+} -evoked exocytosis. Thus, BARP controls the localization of $\text{Ca}_v\beta$ and its association with $\text{Ca}_v\alpha_1$ to negatively regulate VGCC activity. These findings may lead to new strategies for the design of original therapeutic VGCC blockers [88].

Interaction with synaptic proteins: synaptotagmin I and RIM1

Previous studies showed that $\text{Ca}_v\beta$ interacts with synaptic proteins [89,90]. RIM1 is an important presynaptic protein involved in synaptic transmission and plasticity that regulates synaptic vesicle exocytosis [91,92]. RIM1 binds directly and with high affinity to $\text{Ca}_v\beta_{4b}$ and $\text{Ca}_v\beta_{2a}$. The SH3-HOOK-GK sequence of $\text{Ca}_v\beta$ and the COOH terminus of RIM1 mediate this interaction. The most pronounced effect of RIM1/ $\text{Ca}_v\beta$ interaction on HVACC is a hyperpolarizing shift of the voltage-dependence of inactivation

[27]. Moreover, RIM1 boosts neurotransmitter release when over-expressed in PC12 cells and cultured cerebellar neurons. In fact, acetylcholine release was considerably activated by full-length RIM1 and by its C-terminal domain. However, an accelerated inactivation of native Ca²⁺ currents and inhibition of vesicle docking and acetylcholine release were observed when a Ca_vβ construct (Ca_vβ-AID dominant negative) that interrupts the RIM1/Ca_vβ association was expressed in PC12 cells. Furthermore, this construct inhibited glutamate release in cultured cerebellar neurons [89]. These observations highlight a direct role of Ca_vβ in the organization of the synaptic vesicle release machinery via its interaction with RIM1 [27,89,93]. Also, it has been shown that the N-terminus of Ca_vβ₃ and Ca_vβ_{4a} binds to synaptotagmin I, a member of a large family of neuronal proteins that functions as a Ca²⁺ sensor in neurotransmitter release [94,95]. Unfortunately, the physiological impact of this interaction is so far unknown [27,90].

Ahnak up-regulates L-type currents via Ca_vβ_{2a}

The growing number of proteins that are able to interact with Ca_vβ expands the functionality of these subunits. Ahnak is another example of these proteins. It is a 700 kDa ubiquitous signalling and scaffolding protein that plays a regulatory role in controlling Ca²⁺ membrane permeability and intracellular Ca²⁺ homeostasis [96]. Many studies showed that Ahnak interacts with Ca_vβ in various cell types including cardiac muscle cells, osteoblasts and T-lymphocytes (for review, see [27]). The interaction takes place via multiple sites in the C-terminus of Ahnak while the target region on Ca_vβ_{2a} has not been identified. Given that Ahnak is able to co-immunoprecipitate with Ca_vβ_{1b}, Ca_vβ₃ and Ca_vβ_{2a}, the interaction seems to occur in the conserved SH3 or GK domains [96–98]. A reduction in L-type channel activity was conferred by the Ahnak/Ca_vβ_{2a} interaction. In addition, Ca_vβ_{2a} and Ahnak can be phosphorylated by PKA, leading to a weaker binding between the two proteins and an up-regulation of L-type current [99]. Consequently, it has been suggested that Ahnak/Ca_vβ_{2a} binding, under basal conditions, suppresses L-type channel activity and that PKA phosphorylation of both proteins uncouple Ca_vβ_{2a} from Ahnak in order to repress this inhibition [99,100].

Interestingly, a recent study showed that T-lymphocytes from Ahnak1-KO mice are defective in responding to TCR (T-cell receptor) stimulation *in vitro*, which results in low proliferation, low interleukin-2 production and impaired Ca²⁺ influx. It was suggested that this deficit comes from a decreased expression of L-type calcium channels at the plasma membrane, probably due to the lack of Ahnak1/Ca_vβ interaction. Thus, Ahnak1 plays an important role in T-cell Ca²⁺ signalling possibly through Ca_vβ. However further studies need to be conducted in order to validate this hypothesis [101].

Actin, the most recently identified partner of Ca_vβ

Trafficking ion channels to the cell surface involves their incorporation into vesicles that move along actin filaments and microtubules. In their recent study, Stölting et al. [102] uncovered a direct interaction between Ca_vβ₂ and actin filaments. The interaction was demonstrated *in vitro* as well as *in vivo*, it involves both, the SH3 and GK domains, suggesting that binding to actin is a property shared by all Ca_vβs. On the other hand, over-expression of Ca_vβ₂ in cardiomyocytes stimulated L-type currents without changing their voltage dependence of activation. This up-regulation of L-type currents has been shown to be dependent

on Ca_vβ/actin interaction. In fact, in the presence of cytochalasin D, which disrupts actin polymerization, over-expression of Ca_vβ₂ failed to stimulate L-type currents, as is observed in cells with intact actin cytoskeleton. Together, these findings highlight the importance of Ca_vβ for the surface expression of VGCC and point to a possible mechanism in which Ca_vβ promote the transport of the channel to the plasma membrane via its interaction with actin (Table 3) [102].

Ca²⁺ channel-independent functions of Ca_vβ: Ca_vβ, a potential gene regulator

For several decades, the described functions of Ca_vβ have been exclusively linked to VGCC. However, within the last few years, several studies indicated that Ca_vβ undergoes a wider spectrum of functions (Table 3) including calcium channel-independent tasks.

The first study that examined the calcium channel-independent functions showed that a Ca_vβ₄ splice variant 'Ca_vβ_{4c}', expressed in chicken cochlea and brain, interacts directly with the scaffolding domain of heterochromatin protein 1 γ (HP1γ) [103]. This nuclear protein is involved in gene silencing and transcriptional regulation [103]. It has a chromodomain essential for gene silencing, and a chromo-shadow domain (CSD) that acts as a scaffold assembling a variety of nuclear proteins [108]. Ca_vβ_{4c} is a truncated isoform of Ca_vβ₄ lacking 90% of its GK domain and the whole C-terminus. Indeed, Ca_vβ_{4c} and HP1γ were found to co-localize in the nucleus of cochlear hair cells, and when co-expressed in tsA201 cells, Ca_vβ_{4c} translocates from the cytoplasm to the nucleus and attenuates the gene silencing activity of HP1γ in a dose–response manner. These findings were specific since a longer isoform of Ca_vβ₄ had no effect on HP1γ-gene silencing activity. Furthermore, co-expression with either HP1α or HP1β also redistributed Ca_vβ_{4c} into the nuclei, showing that other isoforms of HP1 can bind Ca_vβ_{4c}. Using yeast two-hybrid assays with deletion mutants of CHCB2, the same group showed that the interaction requires the C-terminus of the CSD. Previously, Xu et al. [104] confirmed and significantly extended the preliminary findings of Hibino et al. [103]. They revealed that the primary CSD interaction takes place through a Ca_vβ_{4c} C-terminal PXVXL consensus motif, which is well known to be present in various HP1-associated proteins [109]. In the same study, they pointed to the conserved PVVLV sequence in the GK domains of all Ca_vβ as the key residues for binding to CSD. However, within full-length Ca_vβ, the PVVLV sequence is buried in the GK domain, which explains the lack of full-length Ca_vβ to interact with CSD.

In contrast, the truncated GK domain of Ca_vβ_{4c} makes the PVVLV sequence accessible for interacting with other proteins. These observations add the Ca_vβ_{4c} to a growing list of PXVXL protein family with epigenetic responsibilities [104]. As a result, the turning on of a set of genes located at specific loci of euchromatin suggests that this interaction is able to attenuate the suppressive effect of HP1γ, or alternatively, that it can promote the binding of HP1γ on a specific region of euchromatin leading to a positive effect on gene expression [104].

The notion that Ca_vβ plays a role in gene regulation was further supported in a study by Zhang et al. [105] showing that the full-length Ca_vβ₃ interacts with a novel splicing isoform of Pax6. This transcription factor is critical for the maturation of the eyes and the nervous system. It includes two DNA binding domains (paired domain and homeodomain), connected by a glycine-rich linker and a C-terminal transactivation domain rich in proline, serine and threonine. The isolated isoform, named Pax6(S), differs from Pax6 in its C-terminus, which consists of

Table 3 Protein partners of Ca_vβ and their associated functions

Subunit isoform	Protein partner	Effect	Mechanism	References
Ca _v β	RGK GTPases	Inhibits calcium channel function	Inhibition of the association between Ca _v β and Ca _v α ₁ , leading to a decreased channel abundance at the plasma membrane	[76,79]
Ca _v β _{2a}	Dynamin	Inhibits calcium channel function	Internalization of VGCC and, consequently, a reduced number of channels at the plasma membrane	[86]
Ca _v β ₁	Slo1	Inhibits BK _{Ca} channels	Slows BK _{Ca} channels activation/deactivation kinetics and decreases significantly their sensitivity to Ca ²⁺	[68]
Ca _v β ₃ /Ca _v β ₄	BARP	Negatively regulates VGCC activity	BARP modulates the localization of Ca _v β and its association with Ca _v α ₁ , thus inhibits Ca ²⁺ channel activity and Ca ²⁺ -evoked exocytosis	[88]
Ca _v β ₃ / Ca _v β ₄	Bestrophin-1	Regulates calcium channel function	The regulation is due to the physical interaction of bestrophin-1 with Ca _v β. Thus, mutation of bestrophin-1 reduces the ability of Ca _v β to guide Ca _v α ₁ to the cell membrane	[73–75]
Ca _v β _{4c}	HP1γ	Gene regulation	Attenuates the gene silencing activity of HP1γ	[103,104]
Ca _v β ₃	Pax6	Gene regulation	Ca _v β ₃ translocates from the cytoplasm to the nucleus and suppresses the transcriptional activity of Pax6	[105]
Ca _v β _{4a}	B56δ/TRα/HP1γ	Gene regulation	The complex binds to specific gene promoters and dephosphorylates histones that will be able to interact with HP1γ	[106,107]
Ca _v β _{4b} /Ca _v β _{2a}	RIM1	Hyperpolarizing shift of the voltage dependence of inactivation of HVACC	The interaction occurs between the 'core region' of Ca _v β and the C-terminus of RIM1	[89]
Ca _v β _{1a}	RyR	Crucial for DHPR formation, and thus for maintaining an efficient EC coupling	The interaction takes place between a heptad repeat (L478-V485-L492) located in the C-terminus of Ca _v β _{1a} and a highly charged region (KKKRRxxR) in the RyR	[65,66]
Ca _v β _{2a}	Ahnak	Reduction in cardiac L-type currents	The interaction occurs via several sites in the C-terminus of Ahnak while the target region on Ca _v β _{2a} is not defined. Given that Ahnak co-immunoprecipitates with Ca _v β _{1b} , Ca _v β ₃ and Ca _v β _{2a} , the interaction seems to be in the conserved GK or SH3 domains	[96–100]
Ca _v β ₂	Actin	Up-regulates cardiac L-type currents	The interaction involves both SH3 and GK domains conserved among all Ca _v βs	[102]

a truncated proline, serine and threonine domain and a unique serine-rich tail (S tail). In fact, co-expression of Pax6(S) with a Ca²⁺ channel complex including Ca_vβ₃ in *Xenopus* oocytes did not affect channel properties but made Ca_vβ₃ capable of translocating from the cytoplasm to the nucleus to repress the transcriptional activity of Pax6(S). Ca_vβ_{1b}, Ca_vβ_{2a} and Ca_vβ₄ were also able to interact with Pax6(S) and it is obvious that the S tail mostly endows the interaction between Pax6(S) and Ca_vβ. These findings provide evidence that a full-length Ca_vβ can also directly interact with a transcription factor and regulate its activity [105].

In 2012, Tadmouri et al. [106] also supported the idea of the involvement of Ca_vβ in gene regulation. This group showed that Ca_vβ₄ physically interacts with B56δ, a regulatory subunit of phosphatase 2A (PP2A), acquiring thus the ability to translocate to the nucleus and regulate gene activity. In this study, a novel signalling pathway was characterized in which Ca_vβ₄ directly couples neuronal excitability to gene transcription. Briefly, it was proposed that, under the effect of membrane depolarization, Ca_vβ₄ would first dissociate from Ca_vα₁, which would be in agreement with earlier observations on the reversibility of the Ca_vα₁/Ca_vβ interaction. Nevertheless, the mechanisms whereby depolarization may change the affinity of Ca_vβ for Ca_vα₁ have not been elucidated yet. Once free from this partner, Ca_vβ would then interact with B56δ and translocates along with PP2A to the nucleus, recruiting HP1γ along its travel route. Of course, a Ca_vα₁-independent life of Ca_vβ₄ that does not require a physical dissociation from Ca_vα₁ can also be envisioned. The protein complex constructed by Ca_vβ₄ associates with the tyrosine

hydroxylase (TH) gene promoter region through the nuclear transcription factor thyroid hormone receptor α (TRα). The resulting nuclear platform, constructed by Ca_vβ₄, binds to specific gene promoters regions, dephosphorylates histone H3 on Ser¹⁰ associated to these promoters and orients HP1γ interaction with the dephosphorylated histones, provided that these histones are also trimethylated on Lys⁹. The arrangement of this complex leads to gene repression: first by a direct inhibitory effect of Ca_vβ₄ on TRα and second by HP1γ recruitment known to promote heterochromatin formation [106]. An interesting observation is that this signalling pathway is interrupted by the human epileptic mutation of Ca_vβ₄ (R482X). This mutant is unable to form a complex with B56δ, to translocate to the nucleus and thus to interact with HP1γ and histones. Consequently, this mutation leads to a full disruption of the Ca_vβ₄ signalling pathway [106]. However, the nuclear localization ability of the human epileptic mutation of Ca_vβ₄ (R482X) has been questioned by a study showing the presence of this mutant in the nucleus of myotubes, hippocampal neurons and tsA201 cells [110]. These conflicting findings show that the processes leading to the nuclear localization of Ca_vβ₄ are still far from being understood. The presence or not of Ca_vβ in the nucleus may depend on a wealth of different protein partners, which makes difficult the comparison between studies and cell types.

In another study, Ronjat et al. [107] investigated the impact of Ca_vβ₄ as well as the human epileptic mutant on the regulation of several genes *in vitro*. Indeed, over-expression of Ca_vβ₄ in HEK293 cells modifies the expression of a set of genes

among which a large number are differently regulated when Ca_vβ₄ is replaced by the variant carrying the premature stop mutation associated with juvenile epilepsy [107,111]. Several genes regulated by Ca_vβ₄ in HEK293 cells were also regulated upon neuronal differentiation of NG108-15 cells, which correlates with the nuclear translocation of Ca_vβ₄. These findings strengthen the link between Ca_vβ₄ nuclear targeting and regulation of a specific set of genes [107].

Thereafter, several studies were conducted to investigate the implication of Ca_vβ₄ splice variants in gene regulation. More recently, a spliced Ca_vβ₄ subunit lacking the variable N-terminus domain (Ca_vβ_{4c}) was identified in mouse cerebellum and cultured cerebellar granule cells (CGCs) [22]. This variant regulates P/Q-type currents in tsA201 cells and surface expression of Ca_v2.1 in neurons. Comparing Ca_vβ_{4c} with two other full-length Ca_vβ₄ variants (Ca_vβ_{4a} and Ca_vβ_{4b}), Ca_vβ_{4c} is mostly abundant in the distal axon and does not show any nuclear-targeting property. Interestingly, the number of genes regulated by each Ca_vβ₄ splice variant was proportional to the level of their nuclear-targeting capacity (Ca_vβ_{4a} > Ca_vβ_{4b} > Ca_vβ_{4c}). Together, these observations support isoform-specific functions of Ca_vβ₄ splice variants in neurons, with Ca_vβ_{4b} playing a double role in channel and gene regulation, whereas the newly identified Ca_vβ_{4c} variant serves mainly in calcium-channel dependent functions [22].

A recent study with the same perspectives was conducted on muscle progenitor cells (MPC). During development or after activation in response to muscle damage in adults, MPC are able to proliferate, differentiate and fuse together to form mature myofibres. The proliferation of MPC is regulated by myogenic transcription factors such as myogenin, which acts as a switch for MPC to progress from proliferation to differentiation [25]. As described previously, many studies showed a nuclear localization of Ca_vβ [103,106]. Since the physiological importance of this localization remains blurred, Taylor et al. [25] investigated the nuclear function of Ca_vβ in MPC. Interestingly, they found that Ca_vβ_{1a} is expressed in proliferating MPC, before the expression of Ca_v1.1, and is localized within the nucleus. Loss of Ca_vβ_{1a} expression altered MPC expansion *in vitro* as well as *in vivo*, and led to significant changes in global gene expression. Thus, some genes were negatively regulated whereas others were positively regulated showing that Ca_vβ_{1a} may act as a positive or a negative regulator of gene expression in MPC [25].

In agreement with the findings of Tadmouri et al. [106], Ca_vβ_{1a} was found localized at the promoter region of several genes, preferably at NC E-box sites, which are found in some promoter regions acting as a protein-binding site [25]. In fact, the loss of Ca_vβ_{1a} increases myogenin mRNA and protein levels suggesting that Ca_vβ_{1a} acts as an inhibitor of myogenin expression. Thereby, Ca_vβ_{1a} was able to bind to a site of the Myog promoter carrying an NC E-box. Moreover, this effect disappeared after differentiation of MPC. Therefore, it has been suggested that under normal circumstances the Myog promoter is able to find a way to break out Ca_vβ_{1a}-mediated inhibition during differentiation [25].

These studies further support the notion that Ca_vβ are multifunctional proteins that not only constitute a subunit of calcium channels but also regulate gene transcription.

Interaction of Ca_vβ with pharmacologically active molecules: 4-AP requires Cavβ to stimulate HVACC

A recent study showed that aminopyridines potentiate Ca²⁺ currents via the intracellular Ca_vβ₃. In fact, aminopyridines such as 4-aminopyridine (4-AP) and 3,4-diaminopyridine (3,4-DAP)

are described as voltage-activated K⁺ channel (K_v) blockers and are widely prescribed to patients with multiple sclerosis [112], myasthenia gravis [113] and Lambert–Eaton syndrome [114] in order to improve neuromuscular functions. The conventional view is that blocking K_v channels with 4-AP leads to a prolonged duration of action potentials followed by Ca²⁺ influx and neurotransmitter release. However, Wu et al.'s [115] findings challenge this classical idea by showing that 4-AP and its various analogues are able to stimulate directly HVACC in dissociated neurons. The intracellular Ca_vβ is primarily responsible for this potentiating effect. Indeed, 4-AP was able to increase N- and L-type currents but not T-type currents.

By investigating in more details the structural determinants of this effect, it turned out that 4-AP, which has the amine at position 4 of the pyridine ring, is the most effective aminopyridine in stimulating HVACC and produces a greater effect than 3,4-DAP. Also, 4-AP analogues such as 4-(aminomethyl)pyridine, 4-(methylamino)pyridine and 4-di(methylamino)pyridine activate HVACC with a similar or greater effectiveness than 4-AP. This evidence suggests the existence of a variety of compounds, which are effective activators of HVACC [115]. The identification of the subunit involved in the HVACC-stimulatory effect was carried out by expressing Ca_v2.2, Ca_vβ₃ and Ca_vα₂δ subunits in HEK293 cells. In fact, 4-AP had only a small effect when Ca_v2.2 was expressed alone or in combination with Ca_vα₂δ. However, 4-AP had a profound effect on HVACC activity when Ca_vβ₃ was co-expressed with Ca_v2.2 or with Ca_v2.2 and Ca_vα₂δ, showing that Ca_vβ₃ is necessary for the HVACC-potentiating effect of 4-AP. Moreover, T-type channels, which do not require Ca_vβ for their activity, were insensitive to 4-AP in dissociated neurons and HEK293 cells boosting the hypothesis that 4-AP requires Ca_vβ to potentiate HVACC activity.

More recently, specific sites in the GK, HOOK and C-terminus domains of Ca_vβ₃ were identified, by a site-directed mutagenesis study as crucial for the potentiation of L-type and N-type currents by 4-AP [116]. Together, these findings indicate that 4-AP, as well as its analogues, are able to stimulate directly HVACC in neurons independently of K_v channels through Ca_vβ₃. This new information is not only important for understanding how 4-AP acts on HVACC but also for developing new strategies to treat patients with impaired neuromuscular functions.

IMPLICATION OF Ca_vβ IN DISEASES

Considering the important physiological roles of the Ca_vβ subunits, it is actually understandable that mutations or deletions of these essential auxiliary subunits result in a loss of function in humans or mice models. These proteins are essential to maintain the overall functionality of the organism. Several studies generated Ca_vβ-null mice by conventional gene targeting and showed that some of these deletions could be lethal (for review, see [35,117,118]). In fact, homozygous Ca_vβ₁-null mice die at birth from asphyxiation. The fetuses of these mice showed reduced L-type currents, reduced muscle mass and structural abnormalities. Of interest is the finding that heterozygotes are asymptomatic, indicating that there is normally a sufficient excess of Ca_vβ₁, such that loss of ~ 50% of the expression has no obvious deleterious effects. It is likely that the phenotype of the Ca_vβ₁ KO is due to the fact that no other Ca_vβ are expressed in skeletal muscle [35]. Equally, Ca_vβ₂-null mutation gives rise to an embryonic lethal phenotype and this effect could be due to the cardiac muscle defects since Ca_vβ₂ is an auxiliary subunit of cardiac VGCC. Rescuing Ca_vβ₂-null mice is possible by transgenic expression of Ca_vβ₂ in the cardiac

tissue. However, these mice reveal retinal abnormalities with reduced sensitivity to light [119]. $Ca_v\beta_3$ -null mice have a normal appearance showing that other $Ca_v\beta$ could be able to substitute for $Ca_v\beta_3$ functions [118]. These mice do not show morphological changes in the brain as well as in the lung, heart, spleen, kidney, pancreas, liver, testis and ovary. However, the deficiency in $Ca_v\beta_3$ reduces N- and L-type currents along with an alteration of P/Q-type current's kinetics in the superior cervical ganglia [117]. These $Ca_v\beta_3$ -null mice also showed changes in pain-related behaviour with reduced sensitivity to inflammatory pain, slightly reduced sensitivity to thermal pain and unaltered sensitivity to mechanical pain [120]. Moreover, the development of the visual pathway was shown to be disrupted in $Ca_v\beta_3$ -null mice [121]. In addition, after a high-salt diet, these mice showed an elevated blood pressure, suggesting an implication of VGCC in blood pressure regulation [122]. Furthermore, compared with wild-type mice, $Ca_v\beta_3$ -null mice showed an increased insulin release at high blood glucose concentration leading to more efficient blood glucose concentration regulation [62]. Behaviourally, these mice are characterized by increased aggressiveness, reduced levels of anxiety, altered nociception and memory impairment [123].

The lethargic (*lh/hh*) mouse was described as carrying a mutation in the gene encoding $Ca_v\beta_4$ leading to the expression of a truncated protein that is rapidly degraded. Lethargic mice showed signs of ataxia, spontaneous focal motor seizures and lethargic behaviour. The mice survive from 15 to 60 days with a reduction in body weight, immunological dysfunctions and increased mortality. Although they recover a large amount of their immune function and body weight over time, a reduced fertility is observed in mice that survive beyond 2 months of age. Also, it is important to mention that different phenotypes are observed between mice lacking $Ca_v\beta_3$ or $Ca_v\beta_4$ in the brain, suggesting that these subunits are not functionally equivalent [117,124]. To summarize, studies using $Ca_v\beta$ -KO mice models show that $Ca_v\beta$ loss of function are either lethal or generate harsh functional deficiencies.

Moreover, alteration of the expression levels of different $Ca_v\beta$ subunits has also been associated with a variety of human diseases. Interestingly, analysis of genome-wide single-nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with psychiatric disorders including schizophrenia, bipolar disorder, major depressive disorder, attention deficit-hyperactivity disorder and autism spectrum disorder (ASD) revealed SNPs at four loci. Among them, an SNP was identified within an intron of the brain-expressed gene encoding the $Ca_v\beta_2$ subunit of L-type VGCC [125]. The notion that mutation of *CACNB2* may be linked to neuronal disorders was further supported by a study in which Breitenkamp et al. [126] identified three mutations of *CACNB2* in ASD-patients. Taken together, these findings support the hypothesis that autism may be due to calcium channel dysfunction. Furthermore, one of the largest genome-wide association studies carried out so far to identify gene loci associated with schizophrenia found *CACNB2* as one of the genes with highest levels of disequilibrium, indicating that dysfunctions of this channel subunit may play an important role in the aetiology of severe psychiatric illness [127]. In addition, the *CACNB2* gene has also been linked to cardiovascular diseases (for review, see [128]). For example, in hypertrophic obstructive cardiomyopathy, $Ca_v\beta_2$ is up-regulated, which probably leads to the reported increase in Ca^{2+} channels expression [129,130]. Human juvenile myoclonic epilepsy was associated with variations in coding and non-coding regions of *CACNB4* [111]. One of these mutations (R482X) leads to the truncation of the last 38 amino acids of the protein [111]. Co-expression of the truncated protein

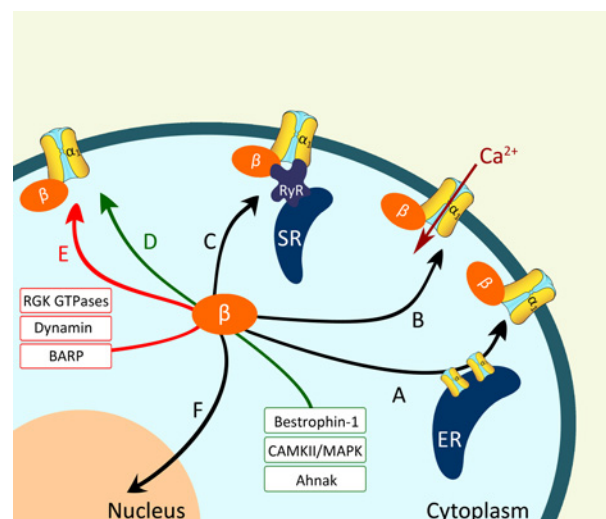


Figure 3 Main functions of $Ca_v\beta$

(A) $Ca_v\beta$ enhances $Ca_v\alpha_1$ localization from the ER to the plasma membrane. (B) $Ca_v\beta$ promotes VGCC gating. (C) In the SR of muscle cells, $Ca_v\beta$ interacts with the RyR and this interaction is critical for the excitation–contraction coupling. $Ca_v\beta$ also interacts with many intracellular proteins leading to an up (D, green arrow) or down (E, red arrow) regulation of VGCC. (F) $Ca_v\beta$ can also translocate into the nucleus where it partakes in transcriptional regulation. Partners of $Ca_v\beta$ include RGK proteins, receptors (RyR), ion channels (e.g. bestrophin), signalling proteins (such as kinases, dynamin and Ahnak) and transcription factors.

with $Ca_v2.1$ induces alterations of the gating kinetics of the channel, which are unlikely to be the causes of the pathology. Altogether, these observations reveal an association between mutations of $Ca_v\beta$ and a wide spectrum of neurological and non-neurological disorders ranging from weak to extremely severe.

Lambert–Eaton myasthenic syndrome (LEMS) is defined as an autoimmune disease in which the extracellular loops of presynaptic Ca^{2+} channels are recognized by autoantibodies leading to the disruption of the channel array at the neuromuscular junction and thus to a defect in synaptic transmission [131]. However, antibodies against $Ca_v\beta_3$ and $Ca_v\beta_4$ are also detectable in sera from LEMS patients [132]. The contribution of $Ca_v\beta$ autoantibodies in this disease remains unclear because $Ca_v\beta$ is an intracellular protein and it is unlikely to be a target for these antibodies in the intact muscle.

Schistosomiasis is a parasitic disease that harms the nervous system and other internal organs. The disease is the consequence of an infection by parasitic flatworms termed *Schistosoma*. Even though the infection can be effectively treated with praziquantel (PZQ), the exact mechanism of action remains unclear. Recently, it has been suggested that PZQ targets a variant of *Schistosoma*'s $Ca_v\beta$. In fact, a previous study showed that knocking down the expression of $Ca_v\beta$ in *Schistosoma*, using siRNA, confers a resistance to PZQ [133]. Although the explicit mechanism remains to be elucidated, this observation supports the idea discussed earlier that $Ca_v\beta$ could be a site of action of therapeutic drugs.

CONCLUSION

The current literature is positioning $Ca_v\beta$ at the crossroads of different signalling pathways (Figure 3). Thus, $Ca_v\beta$ is

evolving from a regulatory subunit of VGCC to a multifunctional protein.

As it appears, Ca_vα₁/Ca_vβ interaction is reversible, and Ca_vβ passes through three different life stages: firstly at the plasma membrane where it regulates Ca²⁺ channels, secondly in the cytoplasm for functions that for the most part remain to be determined and thirdly in the nucleus for gene regulation. This localization and functional diversity raises two major questions. How does Ca_vβ dissociate from Ca_vα₁? What determines its sub-cellular localization?

Channel activation by plasma membrane depolarization and associated calcium influx were the first described candidates to regulate the distribution of Ca_vβ within the cell [106,134].

However, more studies are needed to understand how voltage and Ca²⁺, or both together, coordinate their effort to promote Ca_vβ dissociation from the membrane and thus allow the cytoplasmic/nuclear distribution. Voltage and Ca²⁺ influx are not the only candidates in regulating the sub-cellular distribution of Ca_vβ. It appears that most of the identified Ca_vβ protein partners are also strong actors in Ca_vβ sub-cellular distribution. Evidence is arising that interaction of Ca_vβ with a given protein leads to important structural changes that are sufficiently important to promote or negatively affect its interaction with other proteins. The most compelling evidence for this particular behaviour of Ca_vβ comes from its assembly with B56δ that initiates the formation of a new protein complex by promoting the interaction with transcription factors, a phosphatase and a heterochromatin promoting protein, along with a new localization in the nucleus. The same holds true for the interaction of Ca_vβ with RGK proteins. Therefore, a particularly sensitive question to address in the future will be the understanding of the dynamics of molecular interactions that shape the contribution of Ca_vβ in various protein complexes, all performing seemingly different cellular functions.

A remaining question that has not been answered yet is how many protein complexes Ca_vβ can form? Obviously, the list of proteins that interact with Ca_vβ is likely to grow with the discovery of additional protein partners, making it more difficult to predict the number of complexes in which Ca_vβ may take part. An additional factor that needs further investigation is the implication of calcium in the multiplicity of Ca_vβ functions. Whatever the final picture may look like, it can already be assumed that Ca_vβ is a general 'chaperone' protein that helps bridging multiple different cellular functions including neuronal excitability, gene expression, excitation–contraction coupling and cell division and differentiation. The availability of conditional Ca_vβ-mutant mice and the development of new mutants disrupting protein interaction sites will notably help to boost our understanding of the physiological roles of Ca_vβ as well as the pathological consequences of their mutations and absence.

ACKNOWLEDGEMENTS

We gratefully acknowledge the financial support of the Azm & Saade association and the Lebanese University. Mohamad Rima is a doctoral fellow of the Azm & Saade association.

FUNDING

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche for the laboratory of Excellence [grant number ANR-11-LABX-0015].

REFERENCES

- Sharp, A.H., Imagawa, T., Leung, A.T. and Campbell, K.P. (1987) Identification and characterization of the dihydropyridine-binding subunit of the skeletal muscle dihydropyridine receptor. *J. Biol. Chem.* **262**, 12309–12315 [PubMed](#)
- Curtis, B.M. and Catterall, W.A. (1984) Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry* **23**, 2113–2118 [CrossRef PubMed](#)
- Leung, A.T., Imagawa, T., Block, B., Franzini-Armstrong, C. and Campbell, K.P. (1988) 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 [PubMed](#)
- Lai, F.A., Erickson, H.P., Rousseau, E., Liu, Q.Y. and Meissner, G. (1988) Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature* **331**, 315–319 [CrossRef PubMed](#)
- Witcher, D.R., De Waard, M., Sakamoto, J., Franzini-Armstrong, C., Pragnell, M., Kahl, S.D. and Campbell, K.P. (1993) Subunit identification and reconstitution of the N-type Ca²⁺ channel complex purified from brain. *Science* **261**, 486–489 [CrossRef PubMed](#)
- De Waard, M., Witcher, D.R. and Campbell, K.P. (1994) Functional properties of the purified N-type Ca²⁺ channel from rabbit brain. *J. Biol. Chem.* **269**, 6716–6724 [PubMed](#)
- Witcher, D.R., De Waard, M. and Campbell, K.P. (1993) Characterization of the purified N-type Ca²⁺ channel and the cation sensitivity of omega-conotoxin GVIA binding. *Neuropharmacology* **32**, 1127–1139 [CrossRef PubMed](#)
- Catterall, W.A., Perez-Reyes, E., Snutch, T.P. and Striessnig, J. (2005) International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure–function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol. Rev.* **57**, 411–425 [CrossRef PubMed](#)
- Hofmann, F., Belkacemi, A. and Flockerzi, V. (2015) Emerging alternative functions for the auxiliary subunits of the voltage-gated calcium channels. *Curr. Mol. Pharmacol.* **8**, 162–168 [CrossRef PubMed](#)
- De Waard, M. and Campbell, K.P. (1995) Subunit regulation of the neuronal alpha 1A Ca²⁺ channel expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* **485** (Pt 3), 619–634 [CrossRef PubMed](#)
- Walker, D. and De Waard, M. (1998) Subunit interaction sites in voltage-dependent Ca²⁺ channels: role in channel function. *Trends Neurosci.* **21**, 148–154 [CrossRef PubMed](#)
- Bean, B.P. (1985) Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology. *J. Gen. Physiol.* **86**, 1–30 [CrossRef PubMed](#)
- De Waard, M., Witcher, D.R., Pragnell, M., Liu, H. and Campbell, K.P. (1995) Properties of the alpha 1-beta anchoring site in voltage-dependent Ca²⁺ channels. *J. Biol. Chem.* **270**, 12056–12064 [CrossRef PubMed](#)
- Scott, V.E., De Waard, M., Liu, H., Gurnett, C.A., Venzke, D.P., Lennon, V.A. and Campbell, K.P. (1996) Beta subunit heterogeneity in N-type Ca²⁺ channels. *J. Biol. Chem.* **271**, 3207–3212 [CrossRef PubMed](#)
- Zamponi, G.W., Striessnig, J., Koschak, A. and Dolphin, A.C. (2015) The physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential. *Pharmacol. Rev.* **67**, 821–870 [CrossRef PubMed](#)
- Catterall, W.A. (2011) Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a003947 [CrossRef PubMed](#)
- Takahashi, M., Seagar, M.J., Jones, J.F., Reber, B.F. and Catterall, W.A. (1987) Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 5478–5482 [CrossRef PubMed](#)
- Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K., Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T. and Numa, S. (1987) Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* **328**, 313–318 [CrossRef PubMed](#)
- Pragnell, M., De Waard, M., Mori, Y., Tanabe, T., Snutch, T.P. and Campbell, K.P. (1994) Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I–II cytoplasmic linker of the alpha 1-subunit. *Nature* **368**, 67–70 [CrossRef PubMed](#)
- Hu, H., Wang, Z., Wei, R., Fan, G., Wang, Q., Zhang, K. and Yin, C.-C. (2015) The molecular architecture of dihydropyridine receptor/L-type Ca²⁺ channel complex. *Sci. Rep.* **5**, 8370 [CrossRef PubMed](#)
- 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 [PubMed](#)
- Etamad, S., Obermair, G.J., Bindreither, D., Benedetti, A., Stanika, R., Di Biase, V., Bartscher, V., Koschak, A., Kofler, R., Geley, S. et al. (2014) Differential neuronal targeting of a new and two known calcium channel β4 subunit splice variants correlates with their regulation of gene expression. *J. Neurosci.* **34**, 1446–1461 [CrossRef](#)
- Buraei, Z. and Yang, J. (2013) Structure and function of the β subunit of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Biochim. Biophys. Acta* **1828**, 1530–1540 [CrossRef PubMed](#)
- Pragnell, M., Sakamoto, J., Jay, S.D. and Campbell, K.P. (1991) Cloning and tissue-specific expression of the brain calcium channel beta-subunit. *FEBS Lett.* **291**, 253–258 [CrossRef PubMed](#)
- Taylor, J., Pereyra, A., Zhang, T., Messi, M.L., Wang, Z.-M., Hereñú, C., Kuan, P.-F. and Delbono, O. (2014) The Cavβ1a subunit regulates gene expression and suppresses myogenin in muscle progenitor cells. *J. Cell Biol.* **205**, 829–846 [CrossRef PubMed](#)
- Chu, P.-J., Larsen, J.K., Chen, C.-C. and Best, P.M. (2004) Distribution and relative expression levels of calcium channel beta subunits within the chambers of the rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **36**, 423–434 [CrossRef PubMed](#)

- 27 Buraei, Z. and Yang, J. (2010) The β subunit of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Physiol. Rev.* **90**, 1461–1506 [CrossRef PubMed](#)
- 28 Hullin, R., Singer-Lahat, D., Freichel, M., Biel, M., Dascal, N., Hofmann, F. and Flockerzi, V. (1992) Calcium channel beta subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNA from heart, aorta and brain. *EMBO J.* **11**, 885–890 [PubMed](#)
- 29 Herzig, S., Khan, IFY, Gründemann, D., Matthes, J., Ludwig, A., Michels, G., Hoppe, U.C., Chaudhuri, D., Schwartz, A., Yue, D.T. and Hullin, R. (2007) Mechanism of $\text{Ca}_v1.2$ channel modulation by the amino terminus of cardiac beta2-subunits. *FASEB J.* **21**, 1527–1538 [CrossRef](#)
- 30 Restituito, S., Cens, T., Barrere, C., Geib, S., Galas, S., De Waard, M. and Charnet, P. (2000) The [beta]2a subunit is a molecular groom for the Ca^{2+} channel inactivation gate. *J. Neurosci.* **20**, 9046–9052 [PubMed](#)
- 31 Powers, P.A., Liu, S., Hogan, K. and Gregg, R.G. (1992) Skeletal muscle and brain isoforms of a beta-subunit of human voltage-dependent calcium channels are encoded by a single gene. *J. Biol. Chem.* **267**, 22967–22972 [PubMed](#)
- 32 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 [PubMed](#)
- 33 Ludwig, A., Flockerzi, V. and Hofmann, F. (1997) Regional expression and cellular localization of the alpha1 and beta subunit of high voltage-activated calcium channels in rat brain. *J. Neurosci.* **17**, 1339–1749 [PubMed](#)
- 34 Vendel, A.C., Rithner, C.D., Lyons, B.A. and Horne, W.A. (2006) Solution structure of the N-terminal A domain of the human voltage-gated Ca^{2+} channel beta4a subunit. *Protein Sci.* **15**, 378–383 [CrossRef](#)
- 35 Dolphin, A.C. (2003) Beta subunits of voltage-gated calcium channels. *J. Bioenerg. Biomembr.* **35**, 599–620 [CrossRef PubMed](#)
- 36 Rousset, M., Cens, T. and Charnet, P. (2005) Alone at last! New functions for Ca^{2+} channel beta subunits? *Sci. STKE* **2005**, pe11 [PubMed](#)
- 37 De Waard, M., Pragnell, M. and Campbell, K.P. (1994) Ca^{2+} channel regulation by a conserved beta subunit domain. *Neuron* **13**, 495–503 [CrossRef PubMed](#)
- 38 De Waard, M., Scott, V.E., Pragnell, M. and Campbell, K.P. (1996) Identification of critical amino acids involved in alpha1-beta interaction in voltage-dependent Ca^{2+} channels. *FEBS Lett.* **380**, 272–276 [CrossRef PubMed](#)
- 39 Opatowsky, Y., Chen, C.-C., Campbell, K.P. and Hirsch, J.A. (2004) Structural analysis of the voltage-dependent calcium channel beta subunit functional core and its complex with the alpha 1 interaction domain. *Neuron* **42**, 387–399 [CrossRef PubMed](#)
- 40 Chen, Y., Li, M., Zhang, Y., He, L.-L., Yamada, Y., Fitzmaurice, A., Shen, Y., Zhang, H., Tong, L. and Yang, J. (2004) Structural basis of the alpha1-beta subunit interaction of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Nature* **429**, 675–680 [CrossRef PubMed](#)
- 41 Van Petegem, F., Clark, K.A., Chatelain, F.C. and Minor, D.L. (2004) Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel beta-subunit and an alpha-subunit domain. *Nature* **429**, 671–675 [CrossRef PubMed](#)
- 42 Almagor, L., Chomsky-Hecht, O., Ben-Mocha, A., Hendin-Barak, D., Dascal, N. and Hirsch, J.A. (2012) The role of a voltage-dependent Ca^{2+} channel intracellular linker: a structure–function analysis. *J. Neurosci.* **32**, 7602–7613 [CrossRef](#)
- 43 Tareilus, E., Roux, M., Qin, N., Olcese, R., Zhou, J., Stefani, E. and Birnbaumer, L. (1997) A *Xenopus* oocyte beta subunit: evidence for a role in the assembly/expression of voltage-gated calcium channels that is separate from its role as a regulatory subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 1703–1708 [CrossRef PubMed](#)
- 44 Chien, A.J., Zhao, X., Shirokov, R.E., Puri, T.S., Chang, C.F., Sun, D., Rios, E. and Hosey, M.M. (1995) Roles of a membrane-localized beta subunit in the formation and targeting of functional L-type Ca^{2+} channels. *J. Biol. Chem.* **270**, 30036–30044 [CrossRef PubMed](#)
- 45 Bichet, D., Cornet, V., Geib, S., Carlier, E., Volsen, S., Hoshi, T., Mori, Y. and De Waard, M. (2000) The I-II loop of the Ca^{2+} channel alpha1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron* **25**, 177–190 [CrossRef PubMed](#)
- 46 Altier, C., Garcia-Caballero, A., Simms, B., You, H., Chen, L., Walcher, J., Tedford, H.W., Hermosilla, T. and Zamponi, G.W. (2011) The $\text{Cav}\beta$ subunit prevents RFP2-mediated ubiquitination and proteasomal degradation of L-type channels. *Nat. Neurosci.* **14**, 173–180 [CrossRef PubMed](#)
- 47 Hidalgo, P., Gonzalez-Gutierrez, G., Garcia-Olivares, J. and Neely, A. (2006) The alpha1-beta-subunit interaction that modulates calcium channel activity is reversible and requires a competent alpha-interaction domain. *J. Biol. Chem.* **281**, 24104–24110 [CrossRef PubMed](#)
- 48 García, R., Carrillo, E., Rebolledo, S., García, M.C. and Sánchez, J.A. (2002) The beta1a subunit regulates the functional properties of adult frog and mouse L-type Ca^{2+} channels of skeletal muscle. *J. Physiol.* **545** (Pt 2), 407–419 [CrossRef PubMed](#)
- 49 Hidalgo, P. and Neely, A. (2007) Multiplicity of protein interactions and functions of the voltage-gated calcium channel beta-subunit. *Cell Calcium* **42**, 389–396 [CrossRef PubMed](#)
- 50 Jangsangthong, W., Kuzmenkina, E., Böhne, A.K. and Herzig, S. (2011) Single-channel monitoring of reversible L-type $\text{Ca}_v(2+)$ channel $\text{Ca}_v(\alpha_1)$ - $\text{Ca}_v(\beta)$ subunit interaction. *Biophys. J.* **101**, 2661–2670 [CrossRef PubMed](#)
- 51 Campiglio, M., Di Biase, V., Tuluc, P. and Flucher, B.E. (2013) Stable incorporation versus dynamic exchange of β subunits in a native Ca^{2+} channel complex. *J. Cell Sci.* **126** Pt 9, 2092–2101 [CrossRef PubMed](#)
- 52 Dresviannikov, A.V., Page, K.M., Leroy, J., Pratt, W.S. and Dolphin, A.C. (2009) Determinants of the voltage dependence of G protein modulation within calcium channel beta subunits. *Pflügers Arch.* **457**, 743–756 [CrossRef PubMed](#)
- 53 Cohen, R.M., Foell, J.D., Balijepalli, R.C., Shah, V., Hell, J.W. and Kamp, T.J. (2005) Unique modulation of L-type Ca^{2+} channels by short auxiliary beta1d subunit present in cardiac muscle. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **288**, H2363–H2374 [CrossRef PubMed](#)
- 54 Helton, T.D., Kojetin, D.J., Cavanagh, J. and Horne, W.A. (2002) Alternative splicing of a beta4 subunit proline-rich motif regulates voltage-dependent gating and toxin block of $\text{Cav}2.1$ Ca^{2+} channels. *J. Neurosci.* **22**, 9331–9339 [PubMed](#)
- 55 Helton, T.D. and Horne, W.A. (2002) Alternative splicing of the beta 4 subunit has alpha1 subunit subtype-specific effects on Ca^{2+} channel gating. *J. Neurosci.* **22**, 1573–1582 [PubMed](#)
- 56 Fitzgerald, E.M. (2000) Regulation of voltage-dependent calcium channels in rat sensory neurons involves a Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Physiol.* **527** Pt 3, 433–444 [CrossRef PubMed](#)
- 57 Bünenmann, M., Gerhardtstein, B.L., Gao, T. and Hosey, M.M. (1999) Functional regulation of L-type calcium channels via protein kinase A-mediated phosphorylation of the beta(2) subunit. *J. Biol. Chem.* **274**, 33851–33854 [CrossRef PubMed](#)
- 58 Weiss, S., Oz, S., Benmocha, A. and Dascal, N. (2013) Regulation of cardiac L-type Ca^{2+} channel $\text{Ca}_v1.2$ via the β -adrenergic-cAMP-protein kinase A pathway: old dogmas, advances, and new uncertainties. *Circ. Res.* **113**, 617–631 [CrossRef PubMed](#)
- 59 Grueter, C.E., Abiria, S.A., Wu, Y., Anderson, M.E. and Colbran, R.J. (2008) Differential regulated interactions of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II with isoforms of voltage-gated calcium channel beta subunits. *Biochemistry* **47**, 1760–1767 [CrossRef PubMed](#)
- 60 Rajagopal, S., Fields, B.L., Burton, B.K., On, C., Reeder, A.A. and Kamatchi, G.L. (2014) Inhibition of protein kinase C (PKC) response of voltage-gated calcium (Cav)2.2 channels expressed in *Xenopus* oocytes by $\text{Cav}\beta$ subunits. *Neuroscience* **280**, 1–9 [CrossRef PubMed](#)
- 61 Rajagopal, S., Fields, B.L. and Kamatchi, G.L. (2014) Contribution of protein kinase $\text{C}\alpha$ in the stimulation of insulin by the down-regulation of $\text{Cav}\beta$ subunits. *Endocrine* **47**, 463–471 [CrossRef PubMed](#)
- 62 Berggren, P.-O., Yang, S.-N., Murakami, M., Efanov, A.M., Uhles, S., Köhler, M., Moede, T., Fernström, A., Appelskog, I.B., Aspinwall, C.A. et al. (2004) Removal of Ca^{2+} channel beta3 subunit enhances Ca^{2+} oscillation frequency and insulin exocytosis. *Cell* **119**, 273–284 [CrossRef PubMed](#)
- 63 Schredelseker, J., Di Biase, V., Obermair, G.J., Felder, E.T., Flucher, B.E., Franzini-Armstrong, C. and Grabner, M. (2005) The beta 1a subunit is essential for the assembly of dihydropyridine-receptor arrays in skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 17219–17224 [CrossRef PubMed](#)
- 64 Schredelseker, J., Dayal, A., Schwerte, T., Franzini-Armstrong, C. and Grabner, M. (2009) Proper restoration of excitation–contraction coupling in the dihydropyridine receptor beta1-null zebrafish relaxed is an exclusive function of the beta1a subunit. *J. Biol. Chem.* **284**, 1242–1251 [CrossRef PubMed](#)
- 65 Sheridan, D.C., Cheng, W., Carboneau, L., Ahern, C.A. and Coronado, R. (2004) Involvement of a heptad repeat in the carboxyl terminus of the dihydropyridine receptor beta1a subunit in the mechanism of excitation–contraction coupling in skeletal muscle. *Biophys. J.* **87**, 929–942 [CrossRef PubMed](#)
- 66 Cheng, W., Altafaj, X., Ronjat, M. and Coronado, R. (2005) Interaction between the dihydropyridine receptor Ca^{2+} channel beta-subunit and ryanodine receptor type 1 strengthens excitation–contraction coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 19225–19230 [CrossRef PubMed](#)
- 67 Salkoff, L., Butler, A., Ferreira, G., Santi, C. and Wei, A. (2006) High-conductance potassium channels of the SLO family. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**, 921–931 [CrossRef PubMed](#)
- 68 Zou, S., Jha, S., Kim, E.Y. and Dryer, S.E. (2008) The beta 1 subunit of L-type voltage-gated Ca^{2+} channels independently binds to and inhibits the gating of large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels. *Mol. Pharmacol.* **73**, 369–378 [CrossRef PubMed](#)
- 69 Tian, L., Chen, L., McClafferty, H., Sailer, C.A., Ruth, P., Knaus, H.-G. and Shipston, M.J. (2006) A noncanonical SH3 domain binding motif links BK channels to the actin cytoskeleton via the SH3 adapter cortactin. *FASEB J.* **20**, 2588–2590 [CrossRef](#)
- 70 Hartzell, H.C., Qu, Z., Yu, K., Xiao, Q. and Chien, L.-T. (2008) Molecular physiology of bestrophins: multifunctional membrane proteins linked to best disease and other retinopathies. *Physiol. Rev.* **88**, 639–672 [CrossRef PubMed](#)

- 71 Burgess, R., Millar, I.D., Leroy, B.P., Urquhart, J.E., Fearon, I.M., De Baere, E., Brown, P.D., Robson, A.G., Wright, G.A., Kestelyn, P. et al. (2008) Biallelic mutation of BEST1 causes a distinct retinopathy in humans. *Am. J. Hum. Genet.* **82**, 19–31 [CrossRef PubMed](#)
- 72 Rosenthal, R., Bakall, B., Kinnick, T., Peachey, N., Wimmers, S., Wadelius, C., Marmorstein, A. and Strauss, O. (2006) Expression of bestrophin-1, the product of the VMD2 gene, modulates voltage-dependent Ca²⁺ channels in retinal pigment epithelial cells. *FASEB J.* **20**, 178–180 [PubMed](#)
- 73 Reichhart, N., Milenkovic, V.M., Halsband, C.-A., Cordeiro, S. and Strauss, O. (2010) Effect of bestrophin-1 on L-type Ca²⁺ channel activity depends on the Ca²⁺ channel beta-subunit. *Exp. Eye Res.* **91**, 630–639 [CrossRef PubMed](#)
- 74 Yu, K., Xiao, Q., Cui, G., Lee, A. and Hartzell, H.C. (2008) The best disease-linked Cl-channel hBest1 regulates Ca_v1 (L-type) Ca²⁺ channels via src-homology-binding domains. *J. Neurosci.* **28**, 5660–5667 [CrossRef](#)
- 75 Milenkovic, V.M., Krejцова, S., Reichhart, N., Wagner, A. and Strauss, O. (2011) Interaction of bestrophin-1 and Ca²⁺ channel β-subunits: identification of new binding domains on the bestrophin-1 C-terminus. *PLoS One* **6**, e19364 [CrossRef PubMed](#)
- 76 Béguin, P., Nagashima, K., Gono, T., Shibasaki, T., Takahashi, K., Kashima, Y., Ozaki, N., Geering, K., Iwanaga, T. and Seino, S. (2011) Regulation of Ca²⁺ channel expression at the cell surface by the small G-protein kir/Gem. *Nature* **411**, 701–706 [PubMed](#)
- 77 Finlin, B.S., Crump, S.M., Satin, J. and Andres, D.A. (2003) Regulation of voltage-gated calcium channel activity by the Rem and Rad GTPases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 14469–14474 [CrossRef PubMed](#)
- 78 Seu, L. and Pitt, G.S. (2006) Dose-dependent and isoform-specific modulation of Ca²⁺ channels by RGK GTPases. *J. Gen. Physiol.* **128**, 605–613 [CrossRef PubMed](#)
- 79 Béguin, P., Mahalakshmi, R.N., Nagashima, K., Cher, D.H.K., Ikeda, H., Yamada, Y., Seino, Y. and Hunziker, W. (2006) Nuclear sequestration of beta-subunits by Rad and Rem is controlled by 14-3-3 and calmodulin and reveals a novel mechanism for Ca²⁺ channel regulation. *J. Mol. Biol.* **355**, 34–46 [CrossRef PubMed](#)
- 80 Chen, H., Puhl, H.L., Niu, S.-L., Mitchell, D.C. and Ikeda, S.R. (2005) Expression of Rem2, an RGK family small GTPase, reduces N-type calcium current without affecting channel surface density. *J. Neurosci.* **25**, 9762–9772 [CrossRef](#)
- 81 Xu, X., Marx, S.O. and Colecraft, H.M. (2010) Molecular mechanisms, and selective pharmacological rescue, of Rem-inhibited Ca_v1.2 channels in heart. *Circ. Res.* **107**, 620–630 [CrossRef PubMed](#)
- 82 Finlin, B.S., Correll, R.N., Pang, C., Crump, S.M., Satin, J. and Andres, D.A. (2006) Analysis of the complex between Ca²⁺ channel beta-subunit and the Rem GTPase. *J. Biol. Chem.* **281**, 23557–23566 [CrossRef PubMed](#)
- 83 Zerangue, N. and Jan, L.Y. (1998) G-protein signaling: fine-tuning signaling kinetics. *Curr. Biol.* **8**, R313–R316 [CrossRef PubMed](#)
- 84 Takei, K., Yoshida, Y. and Yamada, H. (2005) Regulatory mechanisms of dynamin-dependent endocytosis. *J. Biochem.* **137**, 243–247 [CrossRef PubMed](#)
- 85 Hinshaw, J.E. (2000) Dynamin and its role in membrane fission. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 483–519 [CrossRef](#)
- 86 Gonzalez-Gutierrez, G., Miranda-Laferte, E., Neely, A. and Hidalgo, P. (2007) The Src homology 3 domain of the beta-subunit of voltage-gated calcium channels promotes endocytosis via dynamin interaction. *J. Biol. Chem.* **282**, 2156–2162 [CrossRef PubMed](#)
- 87 Miranda-Laferte, E., Gonzalez-Gutierrez, G., Schmidt, S., Zeug, A., Ponimaskin, E.G., Neely, A. and Hidalgo, P. (2011) Homodimerization of the Src homology 3 domain of the calcium channel β-subunit drives dynamin-dependent endocytosis. *J. Biol. Chem.* **286**, 22203–22210 [CrossRef PubMed](#)
- 88 Béguin, P., Nagashima, K., Mahalakshmi, R.N., Vigot, R., Matsunaga, A., Miki, T., Ng, M.Y., Ng, Y.J.A., Lim, C.H., Tay, H.S. et al. (2014) BARP suppresses voltage-gated calcium channel activity and Ca²⁺-evoked exocytosis. *J. Cell Biol.* **205**, 233–249 [CrossRef PubMed](#)
- 89 Kiyonaka, S., Wakamori, M., Miki, T., Uriu, Y., Nonaka, M., Bito, H., Beedle, A.M., Mori, E., Hara, Y., De Waard, M. et al. (2007) RIM1 confers sustained activity and neurotransmitter vesicle anchoring to presynaptic Ca²⁺ channels. *Nat. Neurosci.* **10**, 691–701 [CrossRef PubMed](#)
- 90 Vendel, A.C., Terry, M.D., Striegel, A.R., Iverson, N.M., Leuranguer, V., Rithner, C.D., Lyons, B.A., Pickard, G.E., Tobet, S.A. and Horne, W.A. (2006) Alternative splicing of the voltage-gated Ca²⁺ channel beta4 subunit creates a uniquely folded N-terminal protein binding domain with cell-specific expression in the cerebellar cortex. *J. Neurosci.* **26**, 2635–2644 [CrossRef](#)
- 91 Yang, Y. and Calakos, N. (2011) Munc13-1 is required for presynaptic long-term potentiation. *J. Neurosci.* **31**, 12053–12057 [CrossRef](#)
- 92 Schoch, S., Castillo, P.E., Jo, T., Mukherjee, K., Geppert, M., Wang, Y., Schmitz, F., Malenka, R.C. and Südhof, T.C. (2002) RIM1alpha forms a protein scaffold for regulating neurotransmitter release at the active zone. *Nature* **415**, 321–326 [CrossRef PubMed](#)
- 93 Weiss, N., Sandoval, A., Kiyonaka, S., Felix, R., Mori, Y. and De Waard, M. (2011) Rim1 modulates direct G-protein regulation of Ca_v2.2 channels. *Pflügers Arch.* **461**, 447–59
- 94 Südhof, T.C. and Rizo, J. (1996) Synaptotagmins: C2-domain proteins that regulate membrane traffic. *Neuron* **17**, 379–388 [CrossRef PubMed](#)
- 95 Fernandez, I., Araç, D., Ubach, J., Gerber, S.H., Shin, O., Gao, Y., Anderson, R.G., Südhof, T.C. and Rizo, J. (2001) Three-dimensional structure of the synaptotagmin 1 C2B-domain: synaptotagmin 1 as a phospholipid binding machine. *Neuron* **32**, 1057–1069 [CrossRef PubMed](#)
- 96 Shao, Y., Czymbek, K.J., Jones, P.A., Fomin, V.P., Akanbi, K., Duncan, R.L. and Farach-Carson, M.C. (2009) Dynamic interactions between L-type voltage-sensitive calcium channel Cav1.2 subunits and ahnak in osteoblastic cells. *A. J. Physiol. Cell Physiol.* **296**, C1067–C1078 [CrossRef](#)
- 97 Alvarez, J., Hamplova, J., Hohaus, A., Morano, I., Haase, H. and Vassort, G. (2004) Calcium current in rat cardiomyocytes is modulated by the carboxyl-terminal ahnak domain. *J. Biol. Chem.* **279**, 12456–12461 [CrossRef PubMed](#)
- 98 Haase, H., Podzuweit, T., Lutsch, G., Hohaus, A., Kostka, S., Lindschau, C., Kott, M., Kraft, R. and Morano, I. (1999) Signaling from beta-adrenoceptor to L-type calcium channel: identification of a novel cardiac protein kinase A target possessing similarities to AHNAK. *FASEB J.* **13**, 2161–2172 [PubMed](#)
- 99 Haase, H., Alvarez, J., Petzhold, D., Doller, A., Behlke, J., Erdmann, J., Hetzer, R., Regitz-Zagrosek, V., Vassort, G. and Morano, I. (2005) Ahnak is critical for cardiac Ca_v(V)1.2 calcium channel function and its beta-adrenergic regulation. *FASEB J.* **19**, 1969–1977 [CrossRef](#)
- 100 Haase, H. (2007) Ahnak, a new player in beta-adrenergic regulation of the cardiac L-type Ca²⁺ channel. *Cardiovasc. Res.* **73**, 19–25 [CrossRef PubMed](#)
- 101 Matza, D., Badou, A., Kobayashi, K.S., Goldsmith-Pestana, K., Masuda, Y., Komuro, A., McMahon-Pratt, D., Marchesi, V.T. and Flavell, R.A. (2008) A scaffold protein, AHNAK1, is required for calcium signaling during T cell activation. *Immunity* **28**, 64–74 [CrossRef PubMed](#)
- 102 Stölting, G., de Oliveira, R.C., Guzman, R.E., Miranda-Laferte, E., Conrad, R., Jordan, N., Schmidt, S., Hendriks, J., Gensch, T. and Hidalgo, P. (2015) Direct interaction of Ca_vβ with actin up-regulates L-type calcium currents in HL-1 cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* **290**, 4561–4572 [CrossRef PubMed](#)
- 103 Hibino, H., Pironkova, R., Onumere, O., Rousset, M., Charnet, P., Hudspeth, A.J. and Lesage, F. (2003) Direct interaction with a nuclear protein and regulation of gene silencing by a variant of the Ca²⁺-channel beta 4 subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 307–312 [CrossRef PubMed](#)
- 104 Xu, X., Lee, Y.J., Holm, J.B., Terry, M.D., Oswald, R.E. and Horne, W.A. (2011) The Ca²⁺ channel beta4c subunit interacts with heterochromatin protein 1 via a PXVXL binding motif. *J. Biol. Chem.* **286**, 9677–9687 [CrossRef PubMed](#)
- 105 Zhang, Y., Yamada, Y., Fan, M., Bangaru, S.D., Lin, B. and Yang, J. (2010) The beta subunit of voltage-gated Ca²⁺ channels interacts with and regulates the activity of a novel isoform of Pax6. *J. Biol. Chem.* **285**, 2527–2536 [CrossRef PubMed](#)
- 106 Tadmouri, A., Kiyonaka, S., Barbado, M., Rousset, M., Fablet, K., Sawamura, S., Bahemba, E., Pernet-Gallay, K., Arnoult, C., Miki, T. et al. (2012) Cacnb4 directly couples electrical activity to gene expression, a process defective in juvenile epilepsy. *EMBO J.* **31**, 3730–3744 [CrossRef PubMed](#)
- 107 Ronjat, M., Kiyonaka, S., Barbado, M., De Waard, M. and Mori, Y. (2013) Nuclear life of the voltage-gated Cacnb4 subunit and its role in gene transcription regulation. *Channels (Austin)* **7**, 119–125 [CrossRef PubMed](#)
- 108 Platero, J.S., Hartnett, T. and Eissenberg, J.C. (1995) Functional analysis of the chromo domain of HP1. *EMBO J.* **14**, 3977–3986 [PubMed](#)
- 109 Smothers, J.F. and Henikoff, S. (2000) The HP1 chromo shadow domain binds a consensus peptide pentamer. *Curr. Biol.* **10**, 27–30 [CrossRef PubMed](#)
- 110 Etemad, S., Campiglio, M., Obermair, G.J. and Flucher, B.E. (2014) The juvenile myoclonic epilepsy mutant of the calcium channel beta(4) subunit displays normal nuclear targeting in nerve and muscle cells. *Channels (Austin)* **8**, 334–343 [CrossRef PubMed](#)
- 111 Escayg, A., De Waard, M., Lee, D.D., Bichet, D., Wolf, P., Mayer, T., Johnston, J., Baloh, R., Sander, T. and Meisler, M.H. (2000) Coding and noncoding variation of the human calcium-channel β4-subunit gene CACNB4 in patients with idiopathic generalized epilepsy and episodic ataxia. *Am. J. Hum. Genet.* **66**, 1531–1539 [CrossRef PubMed](#)
- 112 Davis, F.A., Stefoski, D. and Rush, J. (1990) Orally administered 4-aminopyridine improves clinical signs in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **27**, 186–192 [CrossRef PubMed](#)
- 113 Lundh, H., Nilsson, O. and Rosén, I. (1979) Effects of 4-aminopyridine in myasthenia gravis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **42**, 171–175 [CrossRef PubMed](#)
- 114 Tim, R.W., Massey, J.M. and Sanders, D.B. (2000) Lambert–Eaton myasthenic syndrome: electrodiagnostic findings and response to treatment. *Neurology* **54**, 2176–2178 [CrossRef PubMed](#)
- 115 Wu, Z.-Z., Li, D.-P., Chen, S.-R. and Pan, H.-L. (2009) Aminopyridines potentiate synaptic and neuromuscular transmission by targeting the voltage-activated calcium channel beta subunit. *J. Biol. Chem.* **284**, 36453–36461 [CrossRef PubMed](#)

- 116 Li, L., Li, D., Chen, S.-R., Chen, J., Hu, H. and Pan, H. (2014) Potentiation of high voltage-activated calcium channels by 4-aminopyridine depends on subunit composition. *Mol. Pharmacol.* **86**, 760–772 [CrossRef PubMed](#)
- 117 Arikath, J. and Campbell, K.P. (2003) Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr. Opin. Neurobiol.* **13**, 298–307 [CrossRef PubMed](#)
- 118 Karunasekara, Y., Dulhunty, A.F. and Casarotto, M.G. (2009) The voltage-gated calcium-channel beta subunit: more than just an accessory. *Eur. Biophys. J.* **39**, 75–81 [CrossRef PubMed](#)
- 119 Ball, S.L., Powers, P.A., Shin, H.-S., Morgans, C.W., Peachey, N.S. and Gregg, R.G. (2002) Role of the beta(2) subunit of voltage-dependent calcium channels in the retinal outer plexiform layer. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**, 1595–1603 [PubMed](#)
- 120 Murakami, M., Fleischmann, B., De Felipe, C., Freichel, M., Trost, C., Ludwig, A., Wissenbach, U., Schwegler, H., Hofmann, F., Hescheler, J. et al. (2002) Pain perception in mice lacking the beta3 subunit of voltage-activated calcium channels. *J. Biol. Chem.* **277**, 40342–40351 [CrossRef PubMed](#)
- 121 Cork, R.J., Namkung, Y., Shin, H.S. and Mize, R.R. (2001) Development of the visual pathway is disrupted in mice with a targeted disruption of the calcium channel beta(3)-subunit gene. *J. Comp. Neurol.* **440**, 177–191 [CrossRef PubMed](#)
- 122 Murakami, M., Yamamura, H., Murakami, A., Okamura, T., Nunoki, K., Mitui-Saito, M., Muraki, K., Hano, T., Imaizumi, Y., Flockerzi, T. and Yanagisawa, T. (2000) Conserved smooth muscle contractility and blood pressure increase in response to high-salt diet in mice lacking the beta3 subunit of the voltage-dependent calcium channel. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **36** Suppl 2, S69–S73 [CrossRef PubMed](#)
- 123 Murakami, M., Nakagawasai, O., Yanai, K., Nunoki, K., Tan-No, K., Tadano, T. and Iijima, T. (2007) Modified behavioral characteristics following ablation of the voltage-dependent calcium channel beta3 subunit. *Brain Res.* **1160**, 102–112 [CrossRef PubMed](#)
- 124 Burgess, D.L., Biddlecome, G.H., McDonough, S.I., Diaz, M.E., Zilinski, C.A., Bean, B.P., Campbell, K.P. and Noebels, J.L. (1999) beta subunit reshuffling modifies N- and P/Q-type Ca^{2+} channel subunit compositions in lethargic mouse brain. *Mol. Cell. Neurosci.* **13**, 293–311 [CrossRef PubMed](#)
- 125 Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium (2013) Identification of risk loci with shared effects on five major psychiatric disorders: a genome-wide analysis. *Lancet* **381**, 1371–1379 [CrossRef PubMed](#)
- 126 Breitenkamp, A.F.S., Matthes, J., Nass, R.D., Sinzig, J., Lehmkuhl, G., Nürnberg, P. and Herzig, S. (2014) Rare mutations of CACNB2 found in autism spectrum disease-affected families alter calcium channel function. *PLoS One* **9**, e95579 [CrossRef PubMed](#)
- 127 Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium (2014) Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* **511**, 421–427 [CrossRef PubMed](#)
- 128 Soldatov, N.M. (2015) CACNB2: an emerging pharmacological target for hypertension, heart failure, arrhythmia and mental disorders. *Curr. Mol. Pharmacol.* **8**, 32–42 [CrossRef PubMed](#)
- 129 Haase, H., Kresse, A., Hohaus, A., Schulte, H.D., Maier, M., Osterziel, K.J., Lange, P.E. and Morano, I. (1996) Expression of calcium channel subunits in the normal and diseased human myocardium. *J. Mol. Med.* **74**, 99–104 [CrossRef PubMed](#)
- 130 Wei, S.K., Colecraft, H.M., DeMaria, C.D., Peterson, B.Z., Zhang, R., Kohout, T.A., Rogers, T.B. and Yue, D.T. (2000) Ca^{2+} channel modulation by recombinant auxiliary beta subunits expressed in young adult heart cells. *Circ. Res.* **86**, 175–184 [CrossRef PubMed](#)
- 131 Lang, B., Newsom-Davis, J., Wray, D., Vincent, A. and Murray, N. (1981) Autoimmune aetiology for myasthenic (Eaton–Lambert) syndrome. *Lancet* **2**, 224–246 [CrossRef PubMed](#)
- 132 Raymond, C., Walker, D., Bichet, D., Iborra, C., Martin-Moutot, N., Seagar, M. and De Waard, M. (1999) Antibodies against the beta subunit of voltage-dependent calcium channels in Lambert–Eaton myasthenic syndrome. *Neuroscience* **90**, 269–277 [CrossRef PubMed](#)
- 133 Nogi, T., Zhang, D., Chan, J.D. and Marchant, J.S. (2009) A novel biological activity of praziquantel requiring voltage-operated Ca^{2+} channel beta subunits: subversion of flatworm regenerative polarity. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **3**, e464 [CrossRef PubMed](#)
- 134 Subramanyam, P., Obermair, G.J., Baumgartner, S., Gebhart, M., Striessnig, J., Kaufmann, W.A., Geley, S. and Flucher, B.E. (2009) Activity and calcium regulate nuclear targeting of the calcium channel beta4b subunit in nerve and muscle cells. *Channels (Austin)* **3**, 343–355 [CrossRef PubMed](#)

Received 16 February 2016/8 March 2016; accepted 15 March 2016
Version of Record published 28 June 2016, doi:10.1042/BCJ20160125

Conclusion :

Dans cette revue nous avons résumé les différentes fonctions cellulaires qui mettent en jeu la sous-unité β des CCDVs. Jusqu'au moment de la soumission de cette revue, les études continuaient à sortir et à découvrir des nouvelles fonctions de $\text{Ca}_v\beta$. Ainsi, un grand progrès a été réalisé au cours des deux dernières décennies dans la compréhension de la biologie moléculaire, la structure, la fonction et la régulation de $\text{Ca}_v\beta$. L'idée émergente est que $\text{Ca}_v\beta$ est une protéine multifonctionnelle qui agit principalement comme une sous-unité régulatrice des CCDVs, mais aussi capable de s'engager dans des fonctions indépendantes du canal. Cependant, malgré ce nombre important d'études nous restons un peu loin de la compréhension complète de la souplesse de $\text{Ca}_v\beta$. À ce niveau, de nombreuses questions importantes restent à élucider :

Comment $\text{Ca}_v\beta$ favorise l'export de $\text{Ca}_v\alpha_1$ du RE ? Est-ce que la formation du complexe $\text{Ca}_v\beta/\text{Ca}_v\alpha_1$, par exemple, peut masquer un signal de rétention possible sur $\text{Ca}_v\alpha_1$?

Comment $\text{Ca}_v\beta$ se dissocie de $\text{Ca}_v\alpha_1$ pour accomplir ces différentes fonctions ? Est-il possible que cette dissociation soit déclenchée par le potentiel d'action ? Peut-elle mettre en jeu des changements structuraux au niveau de $\text{Ca}_v\beta$ réduisant ainsi son affinité à $\text{Ca}_v\alpha_1$? Ou, est-ce que le partenaire protéique, en interagissant avec $\text{Ca}_v\beta$, peut induire ce genre de changement structural ?

Quelles sont les facteurs qui régulent l'engagement de $\text{Ca}_v\beta$ dans l'une des voies de signalisation et pas l'autre ? Dans combien de complexes protéiques $\text{Ca}_v\beta$ peut prendre place ?

Toutes ces questions et encore d'autres restent sans une réponse claire connue. Néanmoins, ce qui est connu et même sûr, que la liste de protéines qui interagissent avec $\text{Ca}_v\beta$ va continuer à s'élargir avec la découverte de nouveaux partenaires de $\text{Ca}_v\beta$.

Malgré la présence et l'utilité des modèles de souris KO pour $\text{Ca}_v\beta$ dans ces études, l'obtention des structures à haute résolution de $\text{Ca}_v\beta$, seules ou complexées avec leurs partenaires, reste la solution la plus précieuse qui facilitera la compréhension de la fonctionnalité de $\text{Ca}_v\beta$.

Chapitre II.

Le rôle de $Ca_v\beta_4$ dans la prolifération cellulaire

Introduction :

L'idée de cet article repose sur les observations de notre équipe qui a montré que l'expression de $Ca_v\beta_4$ dans un système d'expression hétérologue montre un changement dans l'expression d'un ensemble de gènes. Le regroupement de ces gènes dans des groupes fonctionnels, a montré que certains sont impliqués dans la prolifération cellulaire. Ainsi la question a été posée : est-il possible que $Ca_v\beta_4$ possède la capacité de réguler la prolifération ? Si oui, cette régulation est elle positive ou négative ?

Du point de vue expérimental, toutes les études antécédentes ont été effectuées dans des systèmes d'expression où $Ca_v\beta_4$ a été transfectée transitoirement. Étant donné que les lignées cellulaires exprimant de manière stable notre protéine d'intérêt sont plus utiles lorsque l'expression génique est nécessaire à long terme, nous avons pensé à générer des lignées stables exprimant $Ca_v\beta_4$. Ainsi, outre leur utilité dans les études fonctionnelles, ces lignées offrent un matériel avantageux pour les études d'interaction protéine-protéine.

Dans notre étude nous avons commencé par la génération des lignées de cellules CHO exprimant la sous-unité $Ca_v\beta_4$ 'full-length', ou son mutant épileptique β_{1-481} , tous les deux fusionnés à l'eGFP en C-terminale. Après la validation de la stabilité des modèles cellulaires, des études de localisation subcellulaires ont été menées, ainsi que l'impact de $Ca_v\beta_4$ sur la prolifération et le cycle cellulaire a été étudié. L'étude comporte aussi un volet comparatif avec le mutant épileptique β_{1-481} qui montre des difficultés dans l'adressage nucléaire.

Ce travail a donné naissance à un article soumis dans le journal « Journal of Cell Science ».

The voltage-gated calcium channel β_4 subunit inhibits cell proliferation

Mohamad RIMA^{1, 2, 3}, Marwa DAGHSNI^{1, 2, 4}, Ziad FAJLOUN^{3, 5}, Michel RONJAT^{1, 2, 6}, Yasuo MORI⁷, Juan L. BRUSÉS⁸, Michel DE WAARD^{1, 2, 6, 9, *}

¹ INSERM UMR1087, LabEx Ion Channels Science and Therapeutics, Institut du Thorax, Nantes, F-44000 France.

² CNRS, UMR6291, Nantes, F-44000 France.

³ Azm Center for Research in Biotechnology and its Application, Lebanese University, 1300 Tripoli, Lebanon.

⁴ Université de Tunis El Manar, Faculté de Médecine de Tunis, LR99ES10 Laboratoire de Génétique Humaine, 1007 Tunis, Tunisie.

⁵ Faculty of sciences III, Lebanese University, 1300 Tripoli, Lebanon.

⁶ Université de Nantes, Nantes, F-44000 France.

⁷ Laboratory of Molecular Biology, Department of Synthetic Chemistry and Biological Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University, Kyoto, Japan.

⁸ Department of Natural Sciences, Mercy College, Dobbs Ferry, NY 10522, USA.

⁹ Smartox Biotechnology, 38400 Saint-Martin d'Hères, France.

*To whom correspondence should be sent. E-mail: michel.dewaard@univ-nantes.fr – Phone: +33 6 60 76 33 75.

ABSTRACT

β subunits of Voltage-Gated Calcium Channel (VGCC) represent cytosolic proteins that interact with VGCC and participate in the trafficking of the channel to the cell membrane and its regulation. Recent studies have determined that β subunits exert VGCC-independent functions when translocated to the nucleus, including control of gene expression. Mutations of the neuronal β_4 subunit are linked to human disorders including epilepsy and intellectual disabilities; however, it has not been determined whether the pathogenic phenotype is related to channel dysfunction or to other functions of the protein. This study investigated the subnuclear localization of β_4 subunit and its role in cell proliferation and cell cycle progression. Stably transfected Chinese Hamster Ovary (CHO)-K1 cells expressing either full-length β_4 or the C-terminally truncated epileptic mutant form β_{1-481} were generated. Cell proliferation and cell cycle progression were evaluated by *in vitro* assays and the subcellular localization was investigated by subcellular fractionation and confocal microscopy. Full-length β_4 localizes almost exclusively in the cell nucleus and concentrates into the nucleolar compartment. Deletion of the C-terminal 38 amino acids (β_{1-481}) partially disrupted the nuclear translocation and subnuclear localization of the protein. Cell proliferation was found to be reduced by the expression of β_4 . In contrast, the epileptic mutant did not affect cell proliferation, suggesting that nuclear localization of β_4 is required to regulate cell division. Analysis of β_4 subcellular distribution during the cell cycle revealed that β_4 is highly expressed in the nucleus at the G1/S transition phase and is translocated out of the nucleus during chromatin condensation and cell division. Also, full-length β_4 interfered with cell cycle progression by preventing cells from entering the S-phase via a mechanism involving B56 δ , a regulatory subunit of the phosphatase 2A (PP2A) that binds β_4 but not β_{1-481} . These results suggest that nuclear accumulation of β_4 at the G1/S transition phase affects the progression into S-phase resulting in a decrease in the rate of cell proliferation. Regulation of cell cycle exit is a critical step in determining the amount of neuronal precursors and neuronal differentiation suggesting that mutations of the β_4 subunit could affect neural development and formation of the mature central nervous system.

KEYWORDS:

Cell cycle; cell proliferation; $\text{Ca}_v\beta$; CHO cells; voltage-gated calcium channel; epilepsy.

INTRODUCTION

Variation in intracellular Ca^{2+} concentration is a widespread second messenger system regulating a diversity of key physiological functions. In response to action potentials, Ca^{2+} influx through VGCC, leads to different organ-specific cellular events including muscle contraction, neurotransmitter release, cell division, gene transcription and more generalized biochemical processes (1–3). VGCC are found at the plasma membrane of most excitable cells such as muscle cells and neurons, and in non-excitabile cells including glial cells and lymphocytes. Therefore, they represent the key signal transducers of membrane depolarization into Ca^{2+} influx (4).

Since the first description of VGCC in skeletal muscle cells, a number of studies have characterized their structure, function and regulation. VGCC are multimeric protein complexes composed of the main pore-forming α_1 subunit generally associated with the auxiliary subunits β , $\alpha_2\delta$ and γ . Among these, β subunits stand out as supporting an important set of regulatory functions. Indeed, they regulate the trafficking and the expression levels of the channel at the plasma membrane (5) and the gating properties and kinetics of the main α_1 subunit (6), which in turn modulates many physiological processes including gene expression (for review see (7)), excitation/secretion and excitation/contraction coupling (8,9).

The VGCC- β subunits comprise a group of proteins characterized by similar protein structure but different tissue distribution. The β_4 subunit is primarily expressed in the brain and is highly expressed in Purkinje and granule cells of the cerebellum. The expression levels of β_4 are developmentally regulated and increase with age in rat brain (10–12). In addition to its role in the regulation of calcium currents, the importance of β_4 in neural function is underscored by the fact that mutations of this subunit are associated with a variety of human pathologies including juvenile myoclonic epilepsy (13).

Until recently, it was believed that β subunits were only able to carry out calcium channel-dependent functions. However, there is now evidence that auxiliary β subunits may be directly involved in other cellular events that take place far away from the plasma membrane (14). Indeed, the short β_{4c} splice variant interacts with the nuclear protein heterochromatin protein 1 gamma (HP1 γ) and controls its repressive effect on gene transcription (15,16). In addition, the full-length β_3 subunit interacts and regulates the activity of an alternative spliced isoform of the transcription factor Pax6 (17). Finally, Tadmouri *et al.* demonstrated that by interacting with the regulatory subunit of phosphatase 2A (PP2A) B56 δ , β_4 translocates into the nucleus and organizes a protein complex that participates in

transcriptional regulation (18). This protein complex includes a transcription factor, the thyroid receptor α , which provides gene-specificity for the epigenetic regulation (18). The common point among these studies is that calcium channel-independent functions require the translocation of β subunits from the cytoplasm to the nucleus in order to partake in gene regulation. Even though this genetic responsibility seems to be a common function to all β subunits, exceptions have been recently elucidated. More precisely, it was demonstrated that nuclear translocation of β_4 is splice variant-dependent. As a consequence, their ability to interact with the epigenetic machinery depends on their nuclear-targeting capability (19). A previous analysis of the role of β_4 in the regulation of gene expression in HEK293 cells and in mice brain highlighted significant changes in the expression level of a set of genes involved in cell proliferation (20). Based on these observations, we investigated the possible role of the β_4 subunit on cell proliferation by stably expressing β_4 -eGFP in CHO cells and studying the impact of the protein on the cell cycle. A comparative study was performed with eGFP as a control and the epileptic mutant β_{1-481} -eGFP that is defective in B56 δ /PP2A association and epigenetic regulation.

MATERIAL AND METHODS

CHO cell culture

CHO cells were cultured in complete cell culture media containing Dulbecco's modified Eagle medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 units/mL) and streptomycin (10 μ g/mL) and maintained at 37°C in a humidified environment with 5% CO₂.

Plasmids and transfection

Expression vectors and cDNA constructs coding for eGFP, β_4 -eGFP, β_{1-481} -eGFP, B56 δ -myc and B56 δ -shRNA were previously described (18). Briefly, parental CHO cells were seeded onto 100 mm Petri dishes and transfected with the desired plasmid construct at 50% confluence using a conventional calcium-phosphate protocol (21). The plasmids used were: 1) the pEGFP-N1 vector (Clontech) 2) a pEGFP-N1 vector in which the full-length rat CACNB4 cDNA (accession number L02315) was cloned in frame upstream of eGFP to generate β_4 fused to the N-terminus of eGFP (β_4 -eGFP) and 3) the $\beta_{4b}R482X$ /pEGFP-N1 vector coding for β_4 epileptic mutant (β_{1-481} -eGFP) C-terminally fused to eGFP.

Generation of stably transfected CHO cell lines

Chinese Hamster Ovary (CHO)-K1 cells were obtained from ATCC (ATCC CCL-61), handled following ATCC recommendations, and cultured in complete cell culture medium. Parental CHO cells were transfected with the vectors coding for eGFP, β_4 -eGFP or the β_{1-481} -eGFP mutant. Forty-eight hours after transfection, the cells were detached, sorted by eGFP fluorescence with a BD Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) ARIA and collected in single tubes. CHO cells expressing eGFP, β_4 -eGFP, or β_{1-481} -eGFP were grown in tissue culture plates in complete culture medium supplemented with geneticin (Gibco) (1 mg/mL). The cells were replated twice a week at low density for approximately 4 weeks and then replated in 96 well-plates (96WP) at a calculated density of 1 cell/well. After 7 days in culture, wells containing a single cell colony were examined with a fluorescence microscope and eGFP-positive cells were replated in 6-well plates (6WP). Cells derived from single colonies were then analyzed by flow cytometry and cultures containing above 95% eGFP-positive cells were expanded, aliquoted and frozen in complete cell culture medium containing 10% DMSO, and stored in liquid nitrogen. Thereafter, cells were grown without geneticin and regularly examined by flow cytometry to determine whether the cells kept expressing eGFP, β_4 -eGFP or β_{1-481} -eGFP.

Cell proliferation test

Parental CHO cells were mixed with those stably expressing eGFP or β_4 -eGFP at a ratio of 1:4. From each suspension, four others were prepared by serial dilution (1:10, 1:100, 1:1 000, 1:10 000) and cultured in 6WP at 37°C, 5% CO₂. Aliquots of the cell suspensions were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 20 min on ice, washed with Phosphate-Buffered Saline (PBS) and centrifuged at 110 g for 3 min. The pellet was then resuspended in PBS and stored at 4°C in the dark for further analysis. The same procedure was carried out to the cultured cells. When they reached 90% confluence, cells were harvested, fixed, washed, resuspended in PBS, and stored at 4°C in the dark. Cell suspensions were analyzed by flow cytometry with a BD Accuri C6 system with a 488 nm excitation laser. Relative fluorescence values were determined by analyzing 100,000 events for each sample.

Cell counting

5×10^5 cells were seeded into 100 mm Petri dishes with complete medium. Twenty-four and 48 hrs after the plating, cells were washed, harvested, resuspended in PBS, and counted using a Malassez cell counting chamber.

Synchronization of cell cycle

CHO cells were enriched at G0/G1 by serum starvation (22). Briefly, 2×10^6 cells were plated into 100 mm Petri dishes with complete medium and incubated for 6 hrs at 37°C, 5% CO₂. Once the cells became adherent, the media was discarded, and cells were washed twice with PBS. Cell synchronization was then triggered by adding DMEM/F-12 without FBS and culturing the cells for an additional 72 hrs. Cell cycle synchronization using thymidine and nocodazole were carried out as previously described (23). Briefly, cells were blocked in G1/S with 2 mM thymidine (Sigma-Aldrich, France) for 24 hrs or in G2/M with 50 ng/mL nocodazole (Sigma-Aldrich, France) for 24 hrs. The efficiency of the cell synchrony was confirmed by flow cytometry of propidium iodide-stained cells.

Cell Proliferation assay

CHO cells were labeled with 2.5 μ M Cell Proliferation Dye eFluor[®] 670 (eBioscience) for 10 min at 37°C in the dark. The labeling was then stopped by adding 5 volumes of ice-cold complete media and incubating cells on ice for 5 min. At the end of the incubation period, cells were washed 3 times with complete media and analyzed by flow cytometry in a BD Accuri C6 system with a 640 nm excitation laser. Varying amounts of cells were then plated in 12WP to obtain 90% confluence after 24, 48 or 72 hrs of incubation. When cell cultures reached 90% confluence, cells were harvested, resuspended in DMEM/F-12 without phenol red, and the dilution of the fluorescent dye was assessed by flow cytometry by analyzing a minimum of 5,000 events for each sample. Obtained peaks were deconvoluted and the proliferation index was calculated using ModFit LT[™] software.

Protein extraction, subcellular fractionation and Western blotting

Total proteins were extracted from cultured cells using a lysis buffer consisting of 10 mM Tris (pH 7.5), 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5% Triton X-100 and protease inhibitor cocktail (Roche). Cells were incubated in lysis buffer on ice for 30 min. Cell lysis was completed by sonication (6 x 10 sec) and total protein content was determined by Pierce[™] BCA Protein Assay kit.

Subcellular fractionation was performed as described in (24). Briefly, cells collected from confluent dishes by trypsinization were resuspended in hypotonic lysis buffer consisting of 10 mM HEPES (pH 7.9), 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM dithiothreitol (DTT) and protease inhibitor cocktail (Roche), and incubated for 5 min on ice. Cells were mechanically disrupted using a pre-chilled Dounce homogenizer and centrifuged for 5 min at 4°C at 200 x

g. The supernatant was retained as cytoplasmic fraction and the pellet was resuspended in S1 solution (0.25 M sucrose, 10 mM MgCl₂), laid over S2 solution (0.35 M sucrose, 0,5 mM MgCl₂) and centrifuged for 5 min at 4°C at 1200 x g. After discarding the supernatant, the pellet was resuspended in S2 solution and sonicated on ice (6 x 10 sec). The sonicated sample was laid over S3 solution (0.88M sucrose, 0,5 mM MgCl₂) and centrifuged for 10 min at 4°C at 2000 x g. The supernatant was retained as nucleoplasmic fraction while the pellet was resuspended in S2 solution, centrifuged for 5 min at 4°C at 2000 x g and kept as nucleoli fraction. To validate each separation step, 2 µL from each pellet were observed under phase-contrast microscopy. All solutions (S1, S2 and S3) were prepared in distilled water and supplemented with protease inhibitor cocktail (Roche). Protein content was determined by PierceTM BCA Protein Assay kit and 10 µg of total protein from each sample were separated by SDS-PAGE in a 10% resolving gel. Separated proteins were then electro-transferred to Immobilon[®]-P PVDF Membrane (Millipore). The membrane was blocked in 5% blotting-grade blocker (Bio-Rad) in PBS-Tween 0.1% for 1 hr at room temperature, and then incubated for 3 hrs with 1:5,000 rabbit polyclonal anti-β₄ antibody as described in (25), rabbit polyclonal antibody anti-fibrillarin (ab5821, Abcam), rabbit polyclonal antibody anti-B56δ as previously described (26) or rabbit polyclonal anti-GFP (A-11122, Thermo Fisher Scientific). After washing with PBS-Tween 0.1%, blots were incubated with 1:10,000 HRP-conjugated protein A secondary antibody (ab7456, Abcam) at room temperature for 45 min. Bands were then visualized by ECL detection system (Thermo Fisher Scientific).

Cell labeling

Live cell imaging was carried out by culturing cells in Lab-Tek chamber slides. After 24 hrs, cells were washed with PBS, and the plasma membrane was labeled with 5 µg/mL Alexa647-conjugated concanavalin (Con A) for 5 min. Cell nuclei were visualized using 5 µg/mL Hoechst 34580 (Thermo Fisher Scientific) and expressed proteins were visualized directly by eGFP fluorescence. Cells cultured on glass cover slips were incubated with 5 µg/mL Hoechst 34580, washed with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 30 min, washed with PBS, and then permeabilized with 0.1% Triton X-100. The following primary antibodies were used for immunofluorescence: rabbit polyclonal antibody anti-fibrillarin (ab5821, Abcam), mouse monoclonal antibody anti-Sc35 (ab11826, Abcam) and rabbit polyclonal antibody anti-B56δ (26). Anti-fibrillarin and anti-Sc35 primary antibodies were used at 1 µg/mL while anti-B56δ was used at 1:200 for 2 hrs at RT. Cells were then washed and incubated with secondary antibodies: Cy3-conjugated anti-rabbit IgG (711-166-

152, Jackson) or Cy3-conjugated anti-mouse IgG (715-165-150, Jackson) diluted at 1:1500. Images were acquired with a LSM710 Zeiss Confocal microscope. Merged pictures were obtained by ImageJ software. Quantification of β_4 nuclear levels was also performed using ImageJ as described in (27). Briefly, an outline was drawn around each cell nucleus and the areas as well as the integrated density were measured, along with several adjacent background readings. The nuclear fluorescence = integrated density – (area of selected nucleus \times mean fluorescence of background readings), was then calculated. The same procedure was applied to calculate the total cellular fluorescence. The ratio between nuclear and cytoplasmic fluorescence qNCR was then calculated using the following formula: qNCR = nuclear fluorescence / (total cellular fluorescence - nuclear fluorescence). To measure the degree of colocalization among two different fluorescence signals, the Volocity software (Perkin Elmer, USA) was used. It allowed the calculation of Pearson correlation coefficient corresponding to the coefficient of colocalization. Analysis was performed at the Cellular and Tissular Imaging Core Facility of Nantes University (MicroPICell).

Cell cycle assay

Cells were seeded in 6WP at a density of 1×10^5 cells/mL and incubated for 24 hrs at 37°C, 5% CO₂. Cells were then collected and fixed in 70% ethanol at -20°C overnight. The next day, the cells were washed with PBS and stained with propidium iodide (PI) in the dark for 30 min at room temperature and analyzed by flow cytometry.

BrdU incorporation

Immunostaining of incorporated bromodeoxyuridine (BrdU) and flow cytometric analysis were performed following the manufacturer's recommendations (APC BrdU Flow Kit, BD Pharmingen™). Briefly, cells were incubated for 1 hr with BrdU solution (1 mM) at 37°C. At the end of the pulse, cells were washed with PBS, harvested, and centrifuged for 3 min at 110 x g. The pellet was then fixed with BD Cytotfix/Cytoperm buffer for 30 min on ice, washed with BD Perm/Wash buffer and centrifuged for 3 min at 110 x g. Cells were then permeabilized with BD Cytoperm Permeabilization buffer Plus for 10 min on ice. Cells were then fixed, washed and treated with DNase (300 μ g/mL) for 1 hr at 37°C. Afterwards, cells were incubated with fluorescently conjugated anti-BrdU antibodies (1:100) for 20 min at room temperature. Finally, cells were washed twice with BD Perm/Wash and analyzed by flow cytometry in a BD Accuri C6 system. Cells not treated with BrdU and incubated with anti-BrdU antibody were used as control.

RNA Isolation and RT² Profiler PCR Array examination

RNA extraction was performed using the NucleoSpin[®] RNA extraction Kit (Macherey-Nagel, Germany) according to the manufacturer instructions. RNA concentration and the purity of the samples were measured using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer. RNA quality was visualized on a 2% agarose gel electrophoresis. cDNA was synthesized from 0.5 µg RNA samples using an RT² First Strand Kit (Qiagen, UK) as recommended by the manufacturer. cDNA samples were stored at -20°C until required. Quantitative PCR was performed according to the RT² Profiler PCR array instructions on a StepOne Plus[™] Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The Chinese Hamster Cell Cycle RT² Profiler[™] PCR Array (PAJJ-020Z), which profiles a total of 84 cell-cycle related genes, was purchased from Qiagen.

PCR reactions were conducted using the RT²SYBR Green qPCR Master Mix according to the manufacturer instructions. Briefly, equal aliquots of cDNA and RT²SYBR Green qPCR Master Mix (25 µl) were added to each well of the PCR Array plate. The conditions of the PCR program consisted of an initial cycle at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. Cycle threshold (CT) values were exported and analyzed by RT²Profiler PCR Array Data Analysis template V4, which is available on Qiagen website. Relative gene expression was calculated by the $\Delta\Delta$ CT method and expressed as fold change.

Statistics

Student's two-tailed *t* test was used to calculate the statistical significance of differences between two sets of averaged data. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Generation of stably transfected cell lines

Cell lines stably expressing proteins of interest are useful tools in functional studies. Thus, to facilitate the study of the role of β_4 on cell proliferation and protein-protein interactions, we generated stably transfected CHO cell lines expressing recombinant full-length VGCC β_4 subunit or its epileptic mutant variant β_{1-481} both C-terminally fused to eGFP. CHO cells were transfected with the vectors expressing β_4 -eGFP, the epileptic mutant β_{1-481} -eGFP or eGFP. β_4 -eGFP, β_{1-481} -eGFP and eGFP transfected cells acquired fluorescence after transfection and monoclonal selection suggesting that cells were expressing correctly the desired proteins (Fig. 1A). Flow cytometry plots show that cell populations have homogenous levels of protein expression suggesting a successful selection and clonal

expansion. Cells transfected with β_{1-481} -eGFP expressed lower protein levels and wider fluorescence plot as determined by FACS measurements compared to those transfected with β_4 -eGFP and eGFP. This is presumably due to the instability of the mutant protein resulting in shorter protein half-life (18). Western blot analysis of cell lysates from transfected cells using anti-eGFP antibodies detected bands of the predicted molecular weights of ~ 90 , 86 and 32 kDa confirming the proper expression of β_4 -eGFP, β_{1-481} -eGFP or eGFP respectively (Fig. 1B). As expected, parental CHO cells do not show endogenous expression of β_4 -eGFP, β_{1-481} -eGFP, or eGFP. In order to evaluate stable expression of the different constructs, cell lines were analyzed weekly by flow cytometry. While the number of cells expressing eGFP or β_4 -eGFP remained above 98% positive, the percentage of cells expressing β_{1-481} -eGFP significantly decreased over time, requiring monthly selection with antibiotics. Nevertheless, experiments were carried out in cell cultures containing above 90% of cells expressing the protein of interest. These results indicate the successful generation of CHO cell lines stably expressing β_4 -eGFP, β_{1-481} -eGFP and eGFP, which were named CHO- β_4 -eGFP, CHO- β_{1-481} -eGFP and CHO-eGFP, respectively.

Subnuclear distribution of β_4

Analysis of confocal images was used to evaluate the expression and subcellular localization of β_4 and its epileptic mutant variant in stably transfected cell lines (Fig. 1C, D). Based on eGFP fluorescence, β_4 -eGFP is mostly localized in the nucleus (qNCR= 3.00 ± 0.78) where it associates with a particular type of nuclear bodies. The presence of β_4 -eGFP in the nucleus was also confirmed by using anti- β_4 antibodies (data not shown). In contrast to full-length β_4 -eGFP, eGFP and the epileptic mutant β_{1-481} -eGFP were evenly distributed in the nucleus and in the cytosol (qNCR= 1.10 ± 0.29 and 1.10 ± 0.25 , respectively). Interestingly, nuclear localization of β_4 -eGFP is not uniform. As determined by the absence of Hoechst dye staining, nuclear bodies containing high amounts of β_4 -eGFP lack DNA. However, no significant difference was observed between the sub-cellular localization of eGFP and β_{1-481} -eGFP, where both proteins were expressed in the cytoplasm as well as in the nucleus. Moreover, β_{1-481} -eGFP and eGFP do not show the particular nuclear localization of full-length β_4 -eGFP, as such, nuclear bodies that lack DNA do not contain high amounts of β_{1-481} -eGFP.

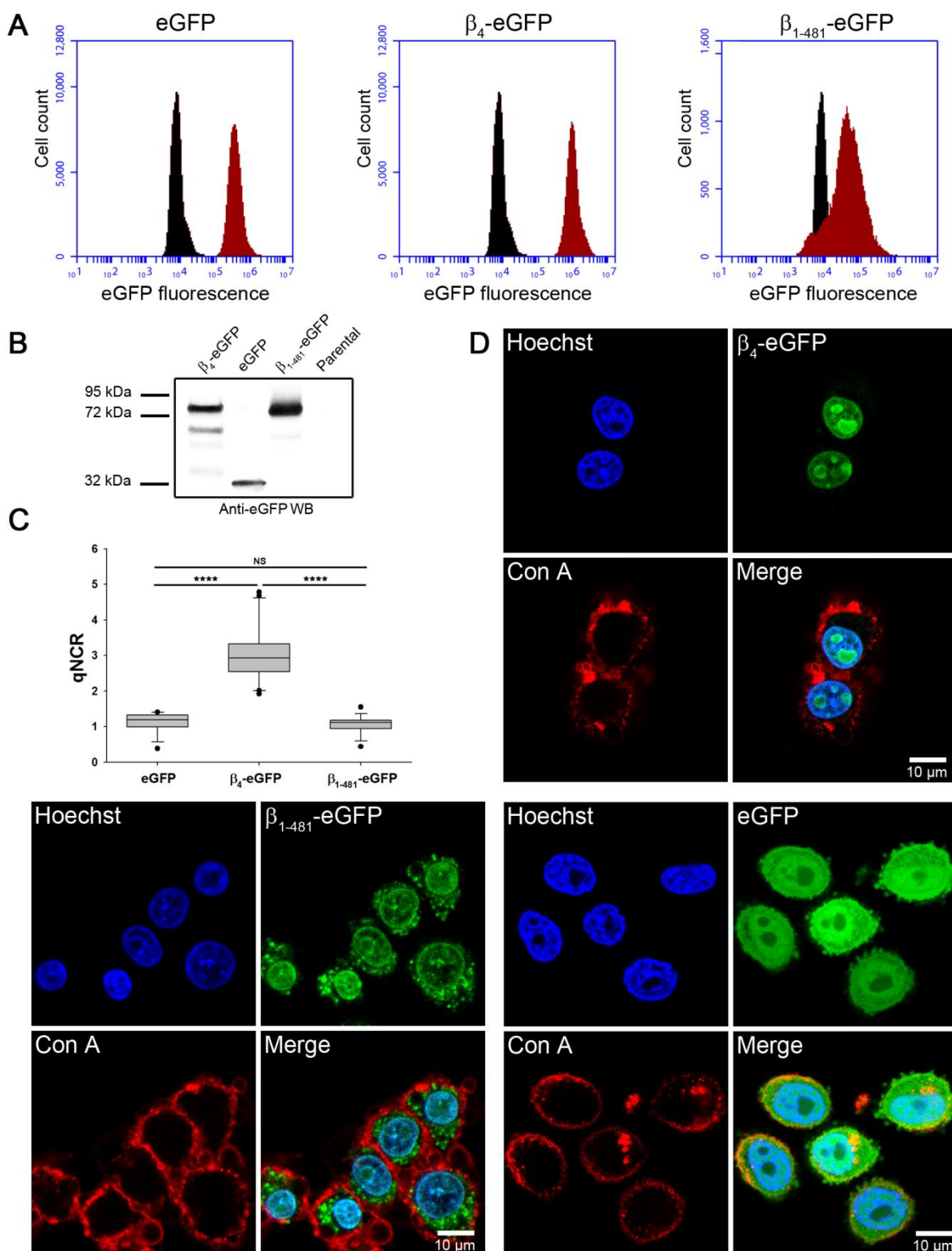


Fig. 1 Analysis of CHO cells stably expressing eGFP, β_4 -eGFP or β_{1-481} -eGFP. (A) Flow cytometry analysis of CHO-eGFP (left panel), CHO- β_4 -eGFP (middle panel) and CHO- β_{1-481} -eGFP (right panel) (red peaks) compared to parental CHO cells (black peaks). Plots show the number of cells against green fluorescence intensity. Note the higher levels of expression and the narrower peaks detected in cells expressing eGFP or β_4 -eGFP as compared to cells expressing β_{1-481} -eGFP. (B) Western blot analysis of protein expression in stably transfected CHO cell lines. CHO- β_4 -eGFP, CHO-eGFP, CHO- β_{1-481} -eGFP and parental CHO cells were lysed and 10 μ g of total protein from

each sample were separated by SDS-PAGE, electro-transferred to a PVDF membrane and immunoblotted with anti-eGFP antibodies. (C) qNCR values of eGFP fluorescence in each cell line (n=20 for each condition). NS, non-significant; **** $p < 0.0001$. (D) Representative confocal images of CHO cells expressing eGFP, β_4 -eGFP or β_{1-481} -eGFP (green) and labeled with Hoechst 34580 dye (blue) and concanavalin-Alexa647 (red) to detect DNA and the cell membrane respectively.

To evaluate the nature of the nuclear bodies containing β_4 -eGFP, we further investigated the colocalization of β_4 -eGFP with nucleolus and speckle markers. A specific nucleolar marker (fibrillarin) colocalizes with β_4 -eGFP as assessed by confocal microscopy (Fig. 2A). In contrast to full-length β_4 -eGFP, eGFP and the epileptic mutant β_{1-481} -eGFP did not colocalize with fibrillarin (Fig. 2B and 2C, respectively) indicating that although this mutant variant is detected in the nucleus, it does not adopt the nucleolar localization observed with the full-length β_4 . Pearson correlation coefficient (PCC) between fibrillarin labeling and β_4 -eGFP fluorescence was significantly higher than the PCC between fibrillarin labeling and eGFP or β_{1-481} -eGFP fluorescence (Fig. 2D). This finding was validated by Western blot analysis of nucleolar extracts showing a significant proportion of β_4 associated to the nucleolus, contrary to eGFP or β_{1-481} -eGFP (Fig. 2E). The sequence of full-length β_4 was analyzed with a specific program (NoD, Nucleolar localization sequence detector available at <http://www.compbio.dundee.ac.uk>). However, no NoLS was detected, suggesting that β_4 nucleolar translocation is dependent on its interaction with one or more molecular partners that probably cannot interact with the truncated variant β_{1-481} . Overall, these results provide evidence of a differential nuclear localization of β_4 -eGFP and point to the fact that besides its discrete interaction with DNA domains (18), β_4 -eGFP may also form part of an RNA processing machinery within the nucleus. Also, these findings suggest that the nuclear localization of β_4 -eGFP and its association with a particular type of nuclear bodies, the nucleolus, is probably due to a molecular interaction between β_4 and a component of these nuclear bodies, both of which are affected by the loss of the C-terminal 38 amino acids in the epileptic mutant β_{1-481} . Colocalization of β_4 -eGFP with the speckles was less obvious than with the nucleolus (Supplementary Fig. 1). In fact, confocal images show that a small fraction of β_4 -eGFP colocalized with Sc-35 (nuclear speckles marker), which is not the case of β_{1-481} -eGFP or eGFP. However, PCC between Sc-35 labeling and β_4 -eGFP fluorescence were lower than those with eGFP control. Moreover, PCC between Sc-35 labeling and β_4 -eGFP fluorescence were significantly similar to those of β_{1-481} -eGFP. Therefore, it can be concluded that β_4 and β_{1-481} are excluded from the speckles. Overall, these findings show that β_4 colocalizes specifically with the nucleolus but not with speckles.

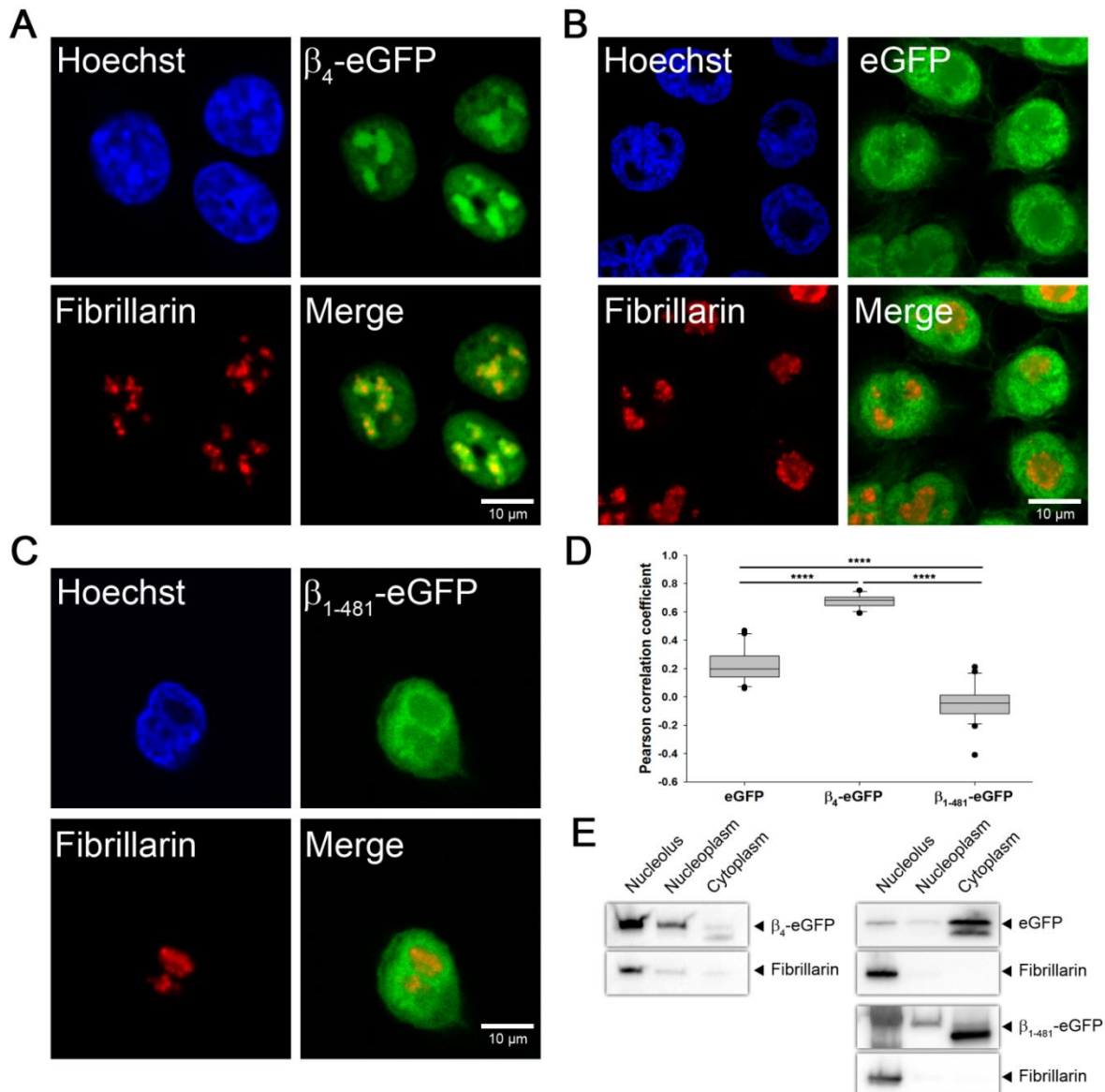


Fig. 2 Nucleolar localization of β_4 . Representative confocal images of CHO cells expressing (A) β_4 -eGFP, (B) eGFP or (C) β_{1-481} -eGFP (green). Cells were labeled with Hoechst 34580 dye (blue) and anti-fibrillarin (red) to detect DNA and the nucleolus, respectively. (D) Pearson correlation coefficient between eGFP fluorescence and anti-fibrillarin labeling in each cell line (n=20). **** p <0.0001. (E) Detection of β_4 in nucleolar extract by immunoblotting: CHO- β_4 -eGFP, CHO-eGFP and CHO- β_{1-481} -eGFP cells were fractionated and 10 μ g of total protein from each sample were separated by SDS-PAGE, electro-transferred to a PVDF membrane and immunoblotted with anti-eGFP and anti-fibrillarin antibodies.

β_4 expression enhances B56 δ presence in the nucleolus

B56 δ is a regulatory subunit of phosphatase 2A (PP2A) that was previously described as able to bind β_4 in a SH3/GK interaction-dependent manner and to contribute to its nuclear localization (18). Since endogenous B56 δ is expressed in CHO cells, we further investigated the colocalization of β_4 and B56 δ . Interestingly, when compared to eGFP cells, CHO- β_4 -eGFP cells showed an increased level of endogenous B56 δ in the nucleolus, as seen by

confocal images (Fig. 3A, B). However, the expression of β_{1-481} -eGFP, which is unable to bind B56 δ , did not change the subcellular distribution of B56 δ (Fig. 3C). This finding was therefore validated by Western blot analysis of nucleolar extracts showing the presence of B56 δ in the nucleolus (Fig. 3D, E and F). Moreover, the PCC between B56 δ labeling and β_4 -eGFP fluorescence was significantly higher than those with eGFP or β_{1-481} -eGFP (Fig. 3G).

β_4 nuclear localization varies with the cell cycle

Based on the above observations of β_4 -eGFP nuclear localization, we investigated whether the subcellular localization of β_4 -eGFP varies during the cell cycle. To this end, CHO- β_4 -eGFP cells were synchronized at G0/G1, G1/S and G2/M transition phases of the cycle by serum withdrawal, treatment with thymidine or nocodazole respectively. Interestingly, confocal images showed that the subcellular distribution of β_4 -eGFP appears to be cell cycle-dependent. In fact, fluorescence intensity quantification showed that the qNCR of β_4 -eGFP varies during the cell cycle. While the lowest level of nuclear localization was observed at the G0/G1 phase, qNCR increases at the G1/S phase and reaches its highest level at the G2/M transition phase (Fig. 4A). Contrariwise, qNCR values of CHO-eGFP cells remain constant during the cell cycle (Fig. 4B).

To examine the localization of β_4 -eGFP during mitosis, CHO- β_4 -eGFP cells were synchronized at the G2/M transition phase by treating the cells with nocodazole for 24 hrs. Thereafter, nocodazole was washed out and the cells were allowed to progress in mitosis for 1 hr in complete medium. Confocal images showed that the structure of the nuclear bodies associated with β_4 -eGFP varies during the cell cycle (Fig. 4C). In some cases, the nuclear bodies were very rounded and bright, while in others, they looked heteromorphous. In both cases, untreated and in cells at G₂/M, β_4 -eGFP does not appear to localize to the cytoplasm. However, during chromatin condensation in mitotic cells, the nuclear bodies associated with β_4 -eGFP dispersed and in turn, the protein is detected in the cytoplasm (Fig. 4C, lower row). This redistribution may occur as a consequence of the dissociation of the nuclear membrane during mitosis and the dispersion of the RNA processing machinery associated with the nuclear bodies opening the possibility for passive diffusion of β_4 -eGFP into the cytoplasm. Altogether these findings indicate that the β_4 -eGFP nuclear localization is dynamically regulated during the cell cycle, and probably through the action of protein partners that promote or not its translocation to the nucleus and its association with subnuclear structures.

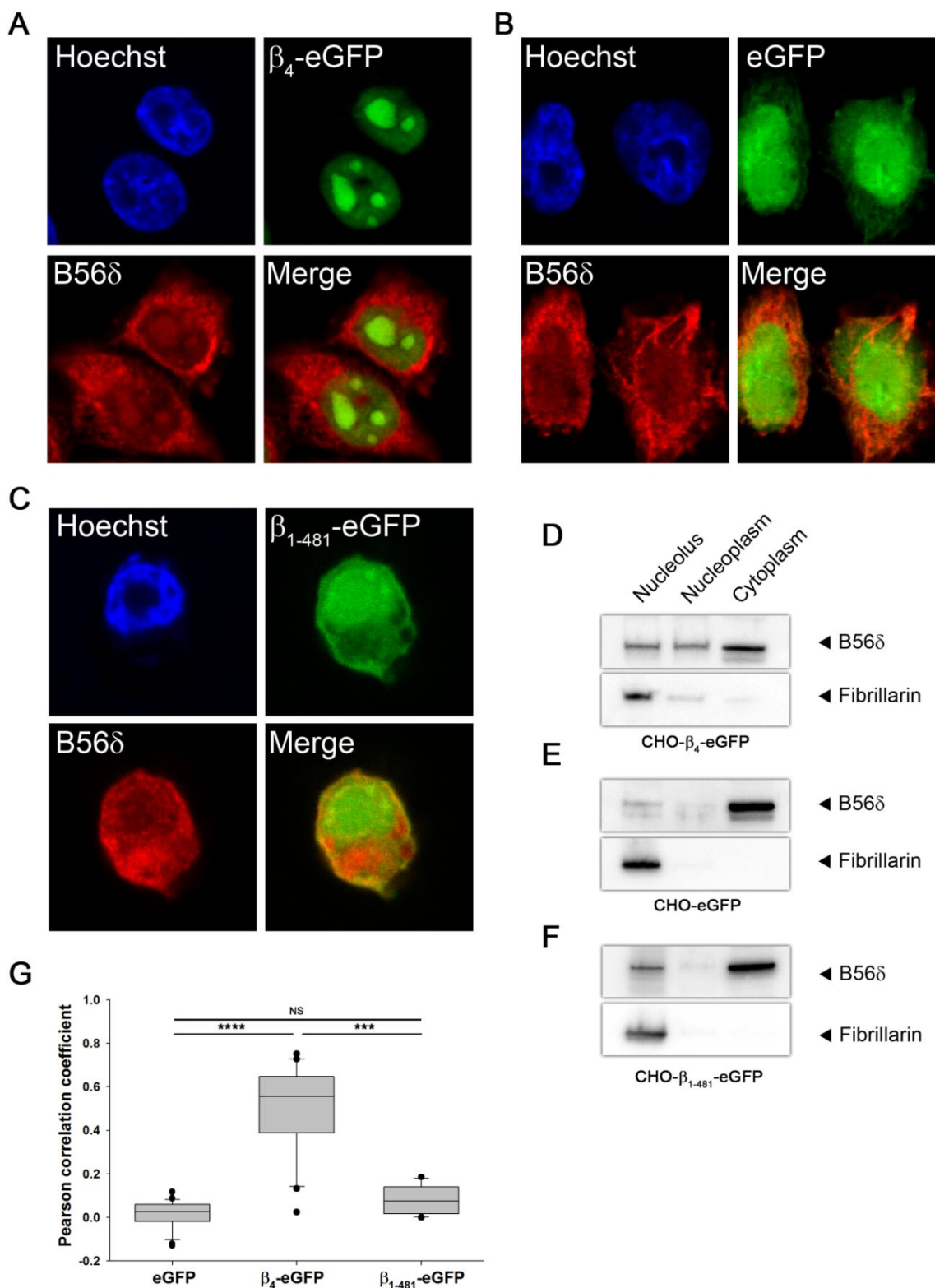


Fig. 3 Nucleolar localization of B56 δ . Representative confocal images of CHO cells expressing (A) β_4 -eGFP, (B) eGFP or (C) β_{1-481} -eGFP (green). Nuclei were labeled with Hoechst 34580 dye (blue) and endogenous B56 δ were labeled with anti-B56 δ (red). (D, E, F) Detection of B56 δ in nucleolar extract by immunoblotting: CHO- β_4 -eGFP, CHO-eGFP and CHO- β_{1-481} -eGFP cells were fractionated and 10 μ g of total protein from each sample were separated by SDS-PAGE, electro-transferred to a PVDF membrane, and immunoblotted with anti-fibrillarin and anti-B56 δ antibodies. (G) Pearson

correlation coefficient between eGFP fluorescence and anti-B56δ labeling in each cell line (n=20). NS, non-significant; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

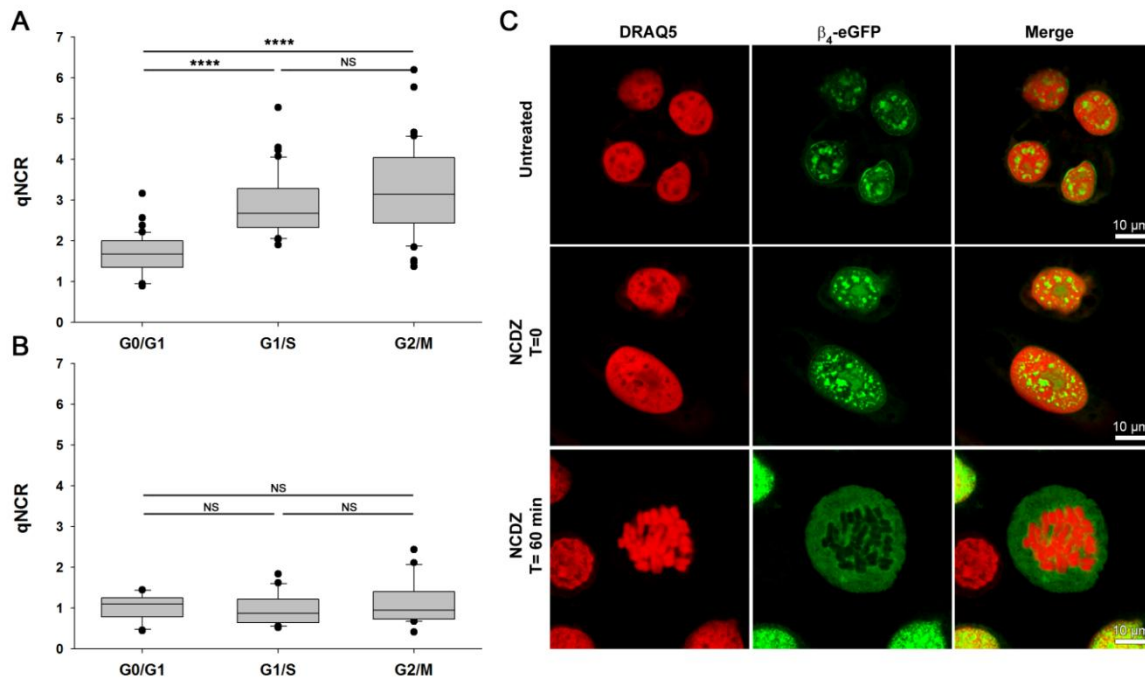


Fig. 4 β_4 subcellular localization varies during the cell cycle progression. (A) CHO- β_4 -eGFP and (B) CHO-eGFP cells were synchronized by serum deprivation or treatment with thymidine and nocodazole (NCDZ). Samples were then stained with Hoechst 34580 and β_4 was visualized by eGFP fluorescence. Images were acquired with a LSM710 Zeiss Confocal microscope and the intensity of eGFP fluorescence was quantified using ImageJ and displayed as box-plots (n=50 for each condition). NS, non-significant; **** $p < 0.0001$. (C) Confocal images of CHO- β_4 -eGFP cells left untreated (upper row) or treated with NCDZ (50 ng/mL) for 6 hrs. At the end of NCDZ treatment, cells were fixed (T=0 min, middle row) or washed and cultured without NCDZ for 60 min before fixing (T=60 min, lower row). All cells were incubated with the DNA dye DRAQ5 for 30 min before fixing. Upper row: non-dividing cells. Middle row: non-dividing CHO cells treated with NCDZ. Lower row: Cell with condensed chromatin undergoing mitosis.

β_4 -eGFP inhibits cell proliferation

To investigate the effect of β_4 -eGFP on cell proliferation, parental CHO cells were mixed with those stably expressing eGFP or β_4 -eGFP at a ratio of 1:4. From each cell suspension, four serial diluted samples were prepared (1:10, 1:100, 1:1 000, 1:10 000) and plated in 6WP. The percentage of eGFP-positive cells was assessed after 4, 7, 9, and 11 days by flow cytometry. The results show that the percentage of CHO- β_4 -eGFP cells decreased significantly over time to reach 27% after 11 days. In contrast, the percentage of parental cells increased and reached 73%, suggesting that parental CHO cells were dividing faster than CHO- β_4 -eGFP cells (Fig. 5A). However, no significant decrease was observed when

comparing CHO-eGFP to parental cells even over 11 days (Fig. 5B) indicating the specific role of β_4 in this process.

To verify this observation, we investigated the possible effect of β_4 -eGFP on cell division by quantifying the rate of cell growth. CHO- β_4 -eGFP, CHO-eGFP and parental CHO cells were plated at equal densities and counted 24 and 48 hrs later. CHO- β_4 -eGFP cell cultures showed significantly fewer cells at 24 and 48 hrs compared with to CHO-eGFP and parental CHO cell cultures (Fig. 5C). Moreover, the estimated rate of CHO- β_4 -eGFP cell division was approximately half as compared with parental CHO cells. While parental and CHO-eGFP cells divided every 18 hrs, CHO- β_4 -eGFP divided every 35 hrs. These results strongly suggest a role of β_4 in slowing cell division.

The effect of β_4 on cell proliferation was further validated using the Cell Proliferation Dye eFluor[®] 670 test to track cell proliferation over 24, 48 and 72 hrs. To this end, cells were synchronized at the G0/G1 phase before labeling and the proliferation rate was assessed. The results show that the proliferation index of CHO- β_4 -eGFP was significantly lower than that of CHO-eGFP cells (after 72 hrs, proliferation index= 9.0 ± 0.2 and 16.2 ± 0.4 for CHO- β_4 -eGFP and CHO-eGFP, respectively) (Fig. 5D). Altogether these findings suggest that the expression of β_4 -eGFP in CHO cells severely affects cell proliferation.

The structural integrity of β_4 has been described as essential for its nuclear targeting and its interaction with some protein partners (18). To further investigate the specificity of the inhibition of cell proliferation, we examined whether the mutant of β_4 , deficient in nuclear localization, could produce the same effect on cell proliferation. Thus, we examined the β_{1-481} -eGFP epileptic mutant (13) that does not show a specific nuclear localization as observed for full-length β_4 (Fig. 1D). Tracking the proliferation of CHO- β_{1-481} -eGFP cells was also carried out over 24, 48 and 72 hrs after G0/G1 cells enrichment. The proliferation index did not vary between CHO- β_{1-481} -eGFP and CHO-eGFP (Fig. 5D) suggesting that the preservation of β_4 structural integrity is necessary to inhibit cell proliferation. In conclusion, these findings suggest that the inhibitory effect on cell proliferation may be linked to the translocation of β_4 into the nucleus and/or its association with specific protein partners, which in turn requires the preservation of β_4 structural integrity.

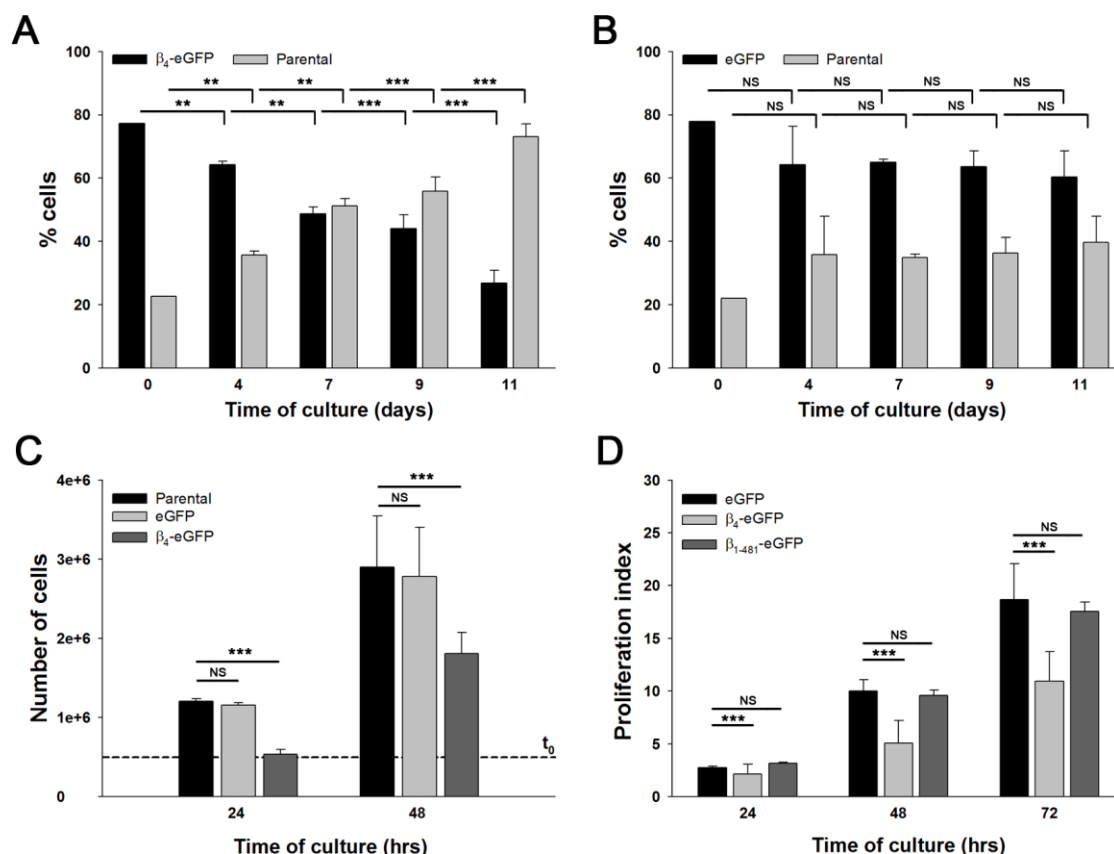


Fig. 5 β_4 decreases the division rate of CHO cells. Quantification of (A) CHO- β_4 -eGFP and (B) CHO-eGFP cells proliferation compared to parental CHO cells expressed as % eGFP(+) versus % eGFP (-) cells over 11 days (n=6). (C) Quantification of parental and stably transfected CHO cell growth after 2 days in culture (n=3). (D) Quantification of synchronized CHO- β_4 -eGFP and CHO- β_{1-481} -eGFP cell proliferation expressed as proliferation index. The proliferation index was calculated using ModFit LT™ based on the decrease of Cell Proliferation Dye eFluor® 670 signal (n=3). NS, non-significant; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

β_4 interferes with cell cycle progression

Cell cycle stages were measured by flow cytometry as described earlier. The cell cycle, as assessed by PI incorporation, was divided into G0/G1, S, and G2/M phases. Compared to the eGFP control, results show that CHO- β_4 -eGFP cells display changes in cell cycle profile (**Fig. 6A**). In fact, the percentage of cells in the G0/G1 and G2/M phases is slightly increased in CHO- β_4 -eGFP. More significantly, a reduction in S-phase proportions is observed when comparing CHO- β_4 -eGFP to CHO-eGFP ($15.9 \pm 0.1\%$ for control and $8.7 \pm 0.2\%$ for CHO- β_4 -eGFP). The decreased proportion of cells in S-phase may indicate a failure to enter the DNA synthesis phase. On the other hand, cells that express the epileptic mutant show a lower level of reduction in S-phase proportions ($15.9 \pm 0.1\%$ for control and $12.9 \pm 0.5\%$ for CHO- β_{1-481} -eGFP) which remains nevertheless significant. The fact that CHO- β_{1-481} -eGFP cells

also display a form of cell cycle progression alteration is indicative that these changes cannot be linked only to nuclear and nucleolar localization of β_4 -eGFP.

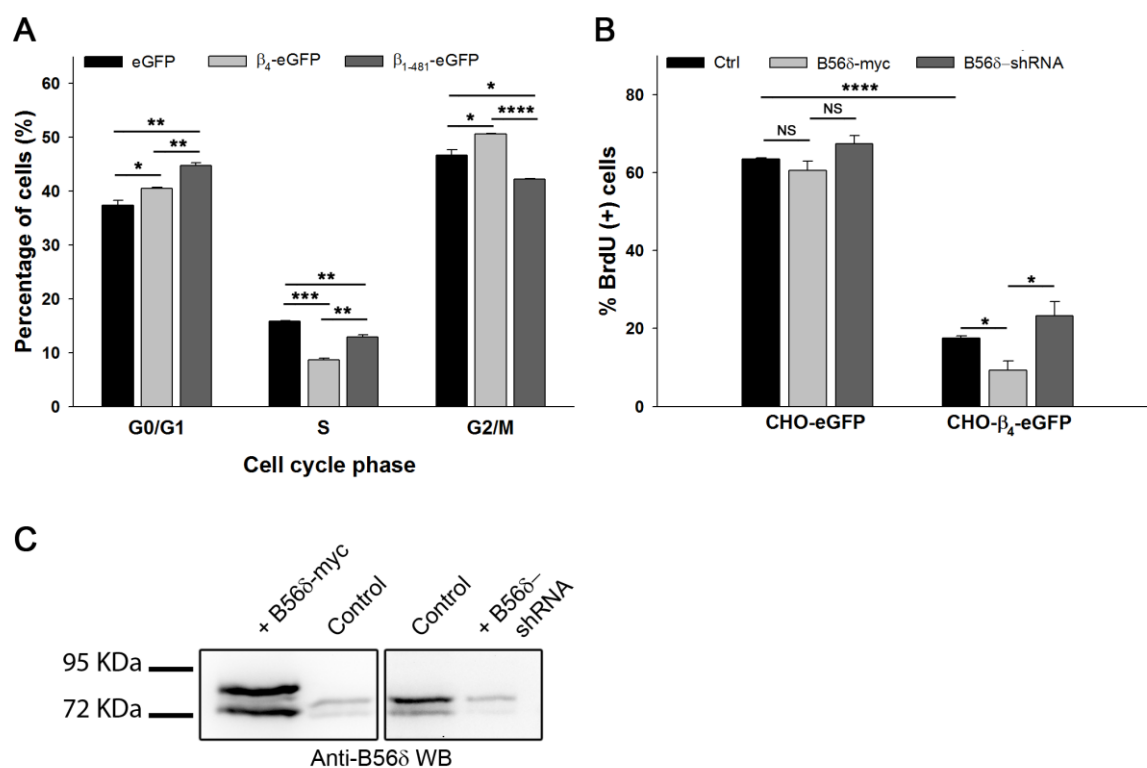


Fig. 6 β_4 changes cell cycle profile and prevents cells from entering S-phase. (A) Cell cycle analysis using propidium iodide in CHO-eGFP, CHO- β_4 -eGFP and CHO- β_{1-481} -eGFP cells after 24 hrs of incubation (n=3). (B) Effect of β_4 -eGFP expression on BrdU incorporation in CHO cells: cultured CHO cells stably expressing eGFP or β_4 -eGFP were pulsed for 1 hr with BrdU. At the end of the pulse, cells were detached, fixed, permeabilized, immunostained with anti-BrdU antibodies and analyzed by flow cytometry in a BD Accuri C6 system. The effect of β_4 expression on BrdU incorporation is also shown after over-expression of B56 δ -myc or reduction of endogenous B56 δ level by shRNA: 24 hrs before the pulse, CHO cells were transfected by construct coding for B56 δ -myc or B56 δ shRNA (n=3). (C) Expression of endogenous B56 δ (control) and B56 δ -myc in CHO cells. The effect of B56 δ -shRNA on endogenous B56 δ expression in CHO cells as shown by Western blot. NS, non-significant; * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001; **** p <0.0001.

β_4 prevents cells from entering S-phase by interacting with B56 δ

As discussed earlier, the cell cycle progression is modified in cells that express β_4 , in particular in S-phase proportions. Analysis of BrdU incorporation rates in the stably transfected cell lines showed that the percentage of BrdU positive cells is significantly lower in CHO- β_4 -eGFP cells as compared to eGFP control cells (% BrdU (+) cells = $63.4 \pm 0.4\%$ for control and $17.5 \pm 0.6\%$ for CHO- β_4 -eGFP) (Fig. 6B). This finding suggests that β_4 inhibits cell proliferation probably by an alteration of the dynamics of the cycle. The milder

alterations observed with the epileptic mutant have however no consequences on cell proliferation.

We further studied if the effect of β_4 on cell cycle is B56 δ -dependent. Indeed, BrdU incorporation rate was evaluated after over expression of B56 δ -myc or reduction of endogenous B56 δ using B56 δ -shRNA (18). Exogenous B56 δ -myc accentuates the inhibitory effect of β_4 and further reduces the percentage of cells in S-phase (% BrdU (+) cells dropping from $17.5 \pm 0.6\%$ to $9.3 \pm 2.3\%$ in the presence of B56 δ -myc). Conversely, expression of B56 δ -shRNA, reducing the level of endogenous B56 δ in CHO cells (Fig. 6C), leads to an increase of cells in S-phase (% BrdU (+) cells rising from $17.5 \pm 0.6\%$ to $23.2 \pm 3.7\%$) (Fig. 6B). Altogether these data indicate that β_4 prevents cells from entering S-phase in a manner that involves, in part, B56 δ .

Since both β_4 and β_{1-481} were able to induce changes in cell cycle profile, we investigated the mechanism mediating the effect on cell cycle by analyzing the gene expression profile of a set of genes involved in the cell cycle. In fact, the expression of β_4 results in a significant up- and down-regulation of 5 and 21 genes respectively. In addition, the expression of β_{1-481} leads also to a significant up- and down-regulation of 5 and 21 genes respectively (Fig. 7). Among these regulated transcripts, 8 are only regulated by β_4 , 11 are only regulated by β_{1-481} and 15 are commonly regulated by β_4 and β_{1-481} of which 12 are downregulated and only one transcript is upregulated in presence of β_4 or β_{1-481} . Interestingly, two transcripts are differently regulated in presence of β_4 or β_{1-481} : while *Cdc34*, encoding the ubiquitin-conjugating enzyme E2 R1, is downregulated with β_4 and upregulated with β_{1-481} , *CycD1* that encodes cyclin D1 is upregulated with β_4 and downregulated with β_{1-481} . *Cdc34* is a member of the large family of ubiquitin ligases (UBC) required for the G1 to S transition. The specific targets of this *Cdc34* ubiquitin ligase remain unknown, but have been proposed to be the G1 cyclins (28). *CycD1* is also known as a regulator of G1/S transition, it is maximally expressed in early G1, where most cells in S and G2/M phases are cyclin D1-negative. These findings show that the expression of β_4 or β_{1-481} changes cell cycle profile, which maybe be in part due to the regulation of a set of genes that regulate cell cycle progression. The changes in gene expression induced by β_4 are however more susceptible to alter cell proliferation than the set of genes regulated by β_{1-481} .

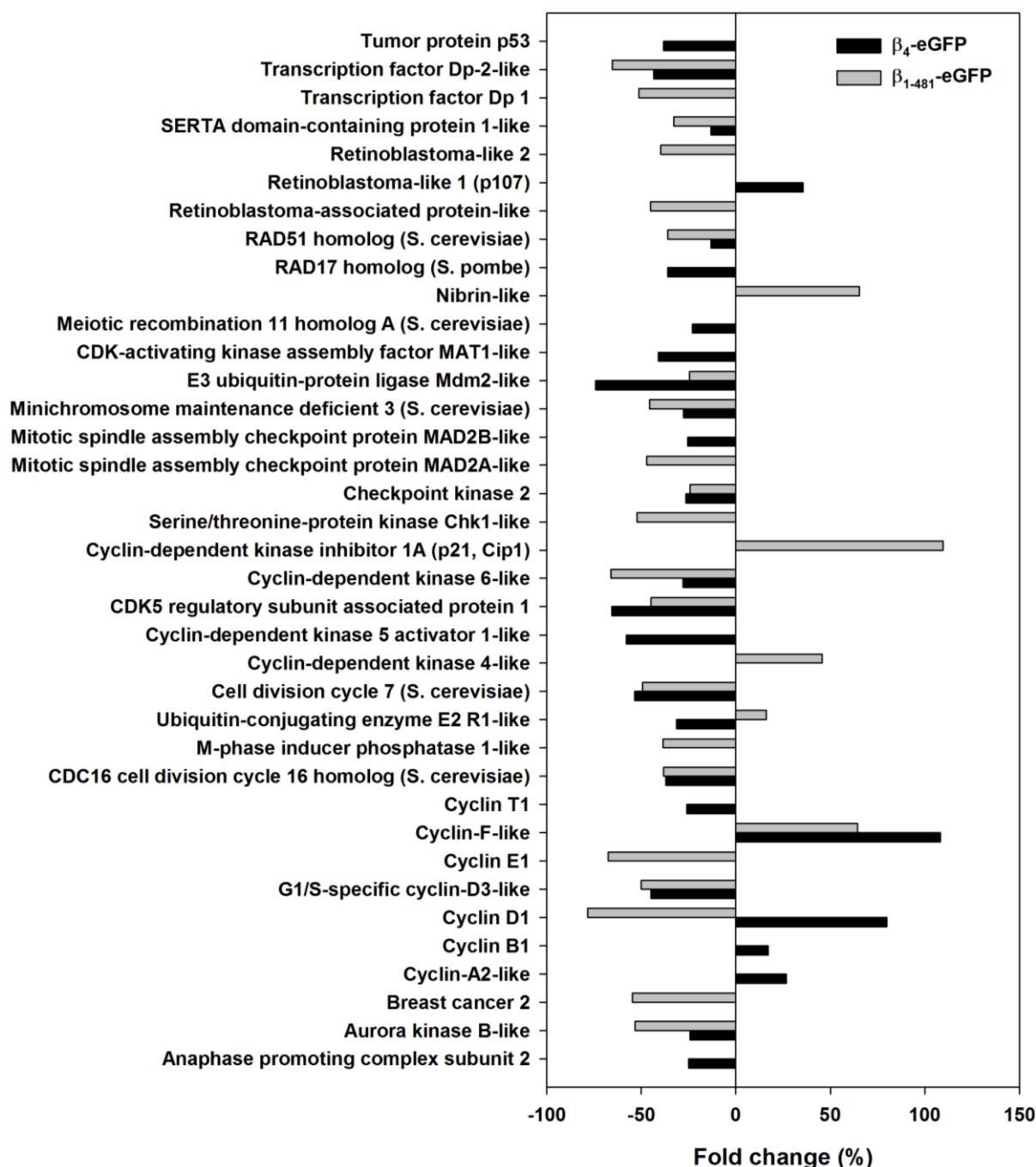


Fig. 7 β_4 and β_{1-481} expression modify the transcription profile of a set of genes involved in cell cycle. Histogram showing only significantly ($p < 0.05$) regulated genes in CHO- β_4 -eGFP cells (black) and CHO- β_{1-481} -eGFP cells (gray) compared to CHO-eGFP cells. Relative gene expression was calculated by the $\Delta\Delta$ CT method and expressed as fold change.

DISCUSSION

Conceptually, VGCC- β subunits are evolving from the status of a channel-regulatory subunit to the one of a multifunctional protein with diverse cellular roles. Herein, we add novel evidences to this evolving concept by describing several new findings. To facilitate the study of the role of β_4 at the cellular level, a CHO cell line stably expressing β_4 was generated

and fully characterized. While β_4 exhibits a specific nuclear localization, which was previously highlighted in other cell types and in mice brain (15,16,18,19), we now evidence that β_4 is not homogeneously distributed in the nucleus and is largely localized in nuclear bodies lacking DNA. We also demonstrate for the first time that the VGCC- β_4 subunit plays a major role in cell proliferation and cell cycle progression.

Concerning the subnuclear distribution of β_4 , one of our hypotheses was that these structures might correspond to speckles or nucleolus. However, a refined investigation indicates that β_4 is mostly localized within the nucleolar compartments. Furthermore, the subcellular localization of β_4 varies greatly during the cell cycle where a nuclear accumulation occurs during the progression of the cycle. These results may highlight an important nuclear-dependent role of β_4 and probably a large set of unrevealed functions. Tadmouri et al. have previously shown that the epileptic mutant of β_4 , lacking a part of its C-terminal domain, is less effective in nuclear targeting (18). Our results are coherent with these earlier data where we demonstrate that β_{1-481} loses its specific nuclear localization, but they extend these findings by demonstrating that this mutant does not accumulate in the nucleolus. The concomitant accumulation of B56 δ in nucleolus, an exclusive partner of β_4 , tends to indicate that this PP2A regulatory subunit is authorized to accompany β_4 during its accumulation in the nucleolus. Interestingly, however, the absence of B56 δ accumulation in the nucleolus in presence of β_{1-481} , on which B56 δ is unable to bind, strongly suggest that it is β_4 that conducts B56 δ into the nucleolus and not the opposite way around.

In addition to these findings, we demonstrate that β_4 inhibits CHO cell proliferation. These findings open the intriguing and exciting possibility that β_4 could operate as a molecular switch regulating the transition between cell proliferation and cell differentiation. It would be tempting to link this effect to the nuclear accumulation of β_4 and/or its particular localization in nucleolus, a structure known to play a regulatory role in cell division and cell cycle progression (29). Indeed, this effect on cell proliferation is not observed with β_{1-481} , the epileptic mutant, that does not accumulate in the nucleus and is absent from nucleolar bodies. Also, nuclear localization of β_4 was previously observed in hippocampal neurons and was also correlated with cell differentiation (18). This being said, the possibility remains that the two observations are mechanistically disconnected and are by essence only circumstantial. Further work will be required to link the two phenomena but an obvious molecular candidate of interest to investigate in the future is B56 δ that is required to connect β_4 to PP2A. The latter is one of the most versatile phosphatase involved in cell division. Indeed, PP2A is known to dephosphorylate over 300 substrates involved in cell cycle, thus regulating most

pathways and cell cycle checkpoints (30). While our studies have all been conducted on cell lines, they also need confirmation in native tissues, namely the developing brain, the locus of the epileptogenesis role of β_{1-481} . In this context, we would recognize precise monitoring of neurogenesis, neuronal migration and differentiation in brain areas where β_4 is mostly expressed in young mice.

As interesting complement to these results, overexpression of β_4 or β_{1-481} in stably transfected CHO cell lines modifies their cell cycle profiles by preventing cells from entering S-phase. The effect is accentuated when B56 δ is overexpressed in CHO- β_4 cells suggesting that the mechanism involves, in part, B56 δ . Also, the effect is less pronounced with β_{1-481} , which is defective in binding B56 δ . As a protein partner of β_4 , B56 δ participates to the process of gene regulation by both facilitating nuclear accumulation and epigenetic modifications of β_4 -regulated genes (18). This finding may point to a cooperative mechanism involving B56 δ and β_4 in the regulation of cell division. This being stated, the effect of β_4 on cell cycle cannot be inferred to B56 δ only, since β_{1-481} that does not interact with B56 δ , also produces alterations in the cell cycle. They occur differently, in a way that does not globally impact cell proliferation in return. In agreement, both β_4 and β_{1-481} expression leads to the regulation of a set of cell cycle-related genes. Interestingly, some of these genes are commonly regulated by β_4 or β_{1-481} , while others are exclusively regulated by one of the protein but not by the other. This indicates that B56 δ cannot be solely responsible for the regulation of these genes but that alteration of other signaling pathways or gene regulation mechanisms must be involved. Alternatively, it should be emphasized that a set of the regulated genes may also be altered, not because of the direct involvement of β_4 or β_{1-481} in gene regulation, but as a consequence of the alteration in cell cycle and cell proliferation. Nevertheless, our findings open new exciting avenues of research on the role of VGCC- β subunits in cell cycle progression and cell proliferation.

In conclusion, our data demonstrate that, besides its role in VGCC targeting and regulation of its biophysical properties, β_4 participates in a variety of novel functions as a nuclear protein. We also show that expression of β_4 -eGFP in CHO cells, which do not endogenously express the β_4 subunit of VGCC, induces a decrease in the rate of cell division and affect cell cycle progression. These findings provide a critical evidence of the potential role of β_4 in cell proliferation, which will notably help in the exploration of ion channels as molecular biomarkers and therapeutic targets for various diseases linked to cell division alterations.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge the financial support of the Azm & Saade association and the Lebanese University. Mohamad Rima is a doctoral fellow of the Azm & Saade association. The Laboratory of Excellence “Ion Channels, Science and Therapeutics” consortium is supported by an Agence Nationale de la Recherche grant N°ANR-11-LABX-0015.

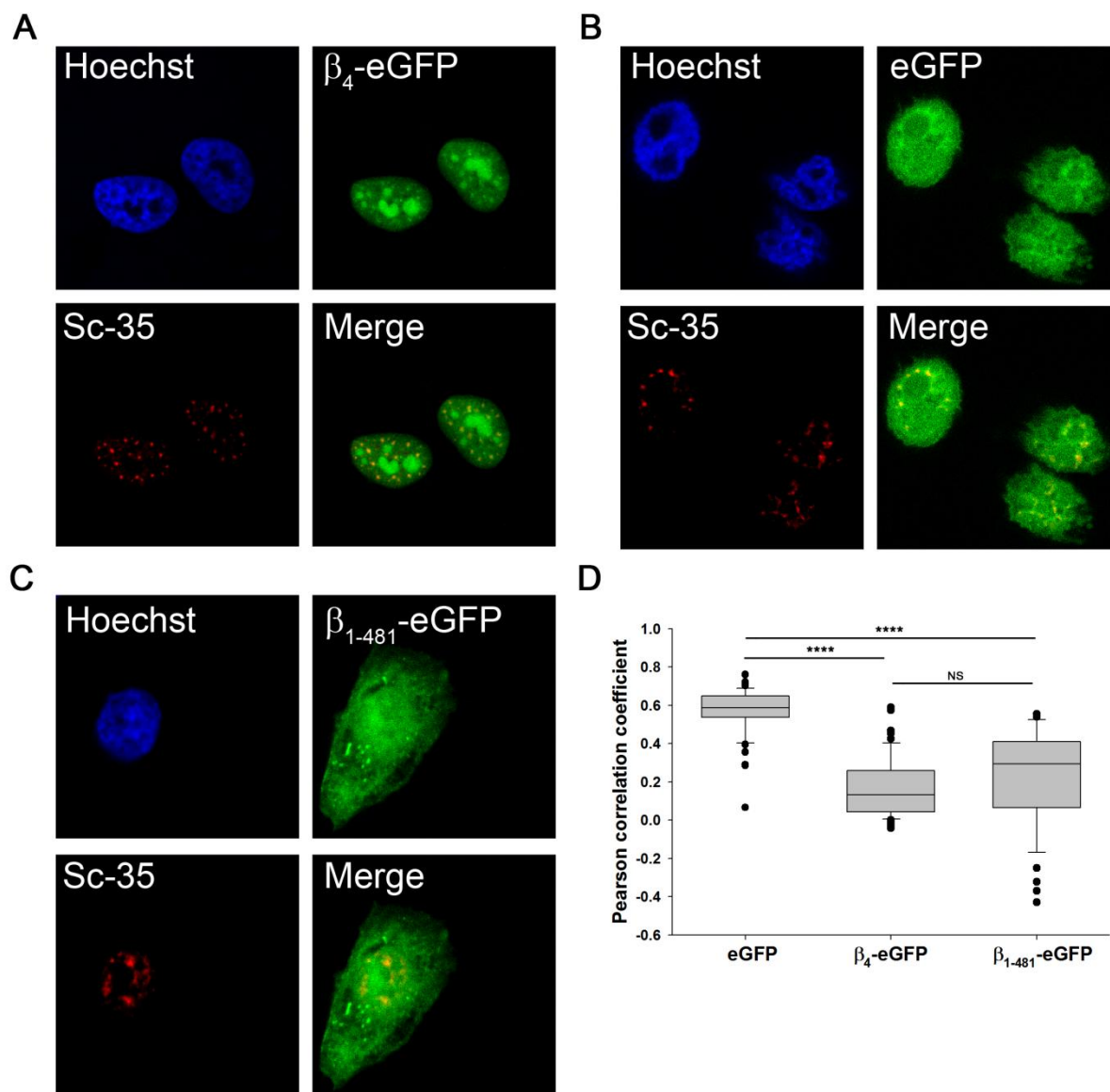
REFERENCES

1. Flavell SW, Greenberg ME. Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. *Annu Rev Neurosci*. 2008;31:563–90.
2. Deisseroth K, Mermelstein PG, Xia H, Tsien RW. Signaling from synapse to nucleus: The logic behind the mechanisms. *Current Opinion in Neurobiology*. 2003. p. 354–65.
3. Greer PL, Greenberg ME. From Synapse to Nucleus: Calcium-Dependent Gene Transcription in the Control of Synapse Development and Function. *Neuron*. 2008. p. 846–60.
4. Catterall W a. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011 Aug;3(8):1–23.
5. Bichet D, Cornet V, Geib S, Carlier E, Volsen S, Hoshi T, et al. The I-II loop of the Ca²⁺ channel alpha1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron*. 2000 Jan;25(1):177–90.
6. De Waard M, Campbell KP. Subunit regulation of the neuronal alpha 1A Ca²⁺ channel expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol*. 1995 Jun 15;485 (Pt 3):619–34.
7. Barbado M, Fablet K, Ronjat M, De Waard M. Gene regulation by voltage-dependent calcium channels. *Biochim Biophys Acta*. Elsevier B.V.; 2009 Jun;1793(6):1096–104.
8. Catterall WA. Interactions of presynaptic Ca²⁺ channels and snare proteins in neurotransmitter release. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1999. p. 144–59.
9. Rousset M, Cens T, Charnet P. Alone at last! New functions for Ca²⁺ channel beta subunits? *Sci STKE*. 2005 Mar 15;2005(275):pe11.
10. Castellano A, Wei X, Birnbaumer L, Perez-Reyes E. Cloning and expression of a third calcium channel beta subunit. *J Biol Chem*. 1993 Feb 15;268(5):3450–5.
11. Ludwig a, Flockerzi V, Hofmann F. Regional expression and cellular localization of the alpha1 and beta subunit of high voltage-activated calcium channels in rat brain. *J Neurosci*. 1997 Feb 15;17(4):1339–49.

12. Powers P a, Liu S, Hogan K, Gregg RG. Skeletal muscle and brain isoforms of a beta-subunit of human voltage-dependent calcium channels are encoded by a single gene. *J Biol Chem.* 1992 Nov 15;267(32):22967–72.
13. Escayg A, De Waard M, Lee DD, Bichet D, Wolf P, Mayer T, et al. Coding and noncoding variation of the human calcium-channel beta4-subunit gene CACNB4 in patients with idiopathic generalized epilepsy and episodic ataxia. *Am J Hum Genet.* 2000 May;66(5):1531–9.
14. Rima M, Daghani M, Fajloun Z, M'rad R, Bruses JL, Ronjat M, et al. Protein partners of the calcium channel subunit highlight new cellular functions. *Biochem J.* 2016;473:1831–44.
15. Hibino H, Pironkova R, Onwumere O, Rousset M, Charnet P, Hudspeth a J, et al. Direct interaction with a nuclear protein and regulation of gene silencing by a variant of the Ca²⁺-channel beta 4 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jan 7;100(1):307–12.
16. Xu X, Lee YJ, Holm JB, Terry MD, Oswald RE, Horne W a. The Ca²⁺ channel beta4c subunit interacts with heterochromatin protein 1 via a PXVXL binding motif. *J Biol Chem.* 2011 Mar 18;286(11):9677–87.
17. Zhang Y, Yamada Y, Fan M, Bangaru SD, Lin B, Yang J. The ?? subunit of voltage-gated Ca²⁺ channels interacts with and regulates the activity of a novel isoform of Pax6. *J Biol Chem.* 2010 Jan 22;285(4):2527–36.
18. Tadmouri A, Kiyonaka S, Barbado M, Rousset M, Fablet K, Sawamura S, et al. Cacnb4 directly couples electrical activity to gene expression, a process defective in juvenile epilepsy. *EMBO J.* Nature Publishing Group; 2012 Sep 12;31(18):3730–44.
19. Etemad S, Obermair GJ, Bindreither D, Benedetti A, Stanika R, Di Biase V, et al. Differential neuronal targeting of a new and two known calcium channel β 4 subunit splice variants correlates with their regulation of gene expression. *J Neurosci.* 2014 Jan 22;34(4):1446–61.
20. Ronjat M, Kiyonaka S, Barbado M, De Waard M, Mori Y. Nuclear life of the voltage-gated Cacnb4 subunit and its role in gene transcription regulation. *Channels.* 2013;7(2):119–25.
21. Melchers F. Foreword. *Current Protocols in Immunology.* Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2001. p. 1–9.
22. Campisi J, Morreo G, Pardee AB. Kinetics of G1 transit following brief starvation for serum factors. *Exp Cell Res.* 1984 Jun;152(2):459–66.
23. Matsui Y, Nakayama Y, Okamoto M, Fukumoto Y, Yamaguchi N. Enrichment of cell populations in metaphase, anaphase, and telophase by synchronization using nocodazole and blebbistatin: A novel method suitable for examining dynamic changes in proteins during mitotic progression. *Eur J Cell Biol.* Elsevier GmbH.; 2012 May;91(5):413–9.

24. Have S, Hodge K, Lamond AI. Dynamic Proteomics : Methodologies and Analysis. *Funct Genomics*. 2012;815:181–200.
25. Kiyonaka S, Wakamori M, Miki T, Uriu Y, Nonaka M, Bito H, et al. RIM1 confers sustained activity and neurotransmitter vesicle anchoring to presynaptic Ca²⁺ channels. *Nat Neurosci*. 2007 Jun;10(6):691–701.
26. Martens E, Stevens I, Janssens V, Vermeesch J, G??tz J, Goris J, et al. Genomic Organisation, Chromosomal Localisation Tissue Distribution and Developmental Regulation of the PR61/B??? Regulatory Subunits of Protein Phosphatase 2A in Mice. *J Mol Biol*. 2004 Feb 27;336(4):971–86.
27. McCloy R a., Rogers S, Caldon CE, Lorca T, Castro A, Burgess A. Partial inhibition of Cdk1 in G2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. *Cell Cycle*. 2014;13(9):1400–12.
28. Plon SE, Leppig K a, Do HN, Groudine M. Cloning of the human homolog of the CDC34 cell cycle gene by complementation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(November):10484–8.
29. Andersen JS, Lyon CE, Fox AH, Leung AKL, Lam YW, Steen H, et al. Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr Biol*. 2002;12(01):1–11.
30. Wlodarchak N, Xing Y. PP2A as a master regulator of the cell cycle. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2016;9238(May):1–23.

Supplementary Figures



Supplementary Fig. 1 Sub-nuclear localization of β_4 : Representative confocal images of CHO cells expressing (A) β_4 -eGFP, (B) eGFP or (C) β_{1-481} -eGFP (green). Nucleus was labeled with Hoechst 34580 dye (blue) and speckles were labeled with anti-Sc-35 and visualized with Cy3-conjugated anti-mouse IgG (red). (D) Pearson correlation coefficient between eGFP fluorescence and anti-Sc-35 labeling in each cell line (n=50). NS, non-significant; **** p<0.0001.

Chapitre III.

Ca_vβ₄, un régulateur de la voie Wnt/β-caténine

Introduction:

Dans la première partie du travail, nous avons pu montrer que Ca_vβ₄ joue un rôle inhibiteur de la prolifération cellulaire. Ainsi, nous avons passé à chercher les causes qui peuvent être derrière ce phénotype observé. Notre hypothèse s'est établie sur les études antérieures décrivant Ca_vβ₄ dans la régulation génique. En effet nous avons suggéré que l'implication de Ca_vβ₄ dans certaines voies de signalisation, qui régule la division cellulaire, peut être l'origine de nos observations.

Parmi les différentes voies de signalisation décrites, nous avons choisi la voie de signalisation Wnt qui est connue comme l'une des voies les plus importantes régulant la prolifération cellulaire. Cette voie joue aussi un rôle important pendant le développement embryonnaire et cérébral où elle intervient dans la formation des synapses, la croissance dendritique et la neurogenèse.

Dans ce cadre, nous avons utilisé des lignées hépatocellulaires dérivées de carcinome humain (FOCUS) qui ont été manipulées pour tenir une voie Wnt constitutivement active. Un autre avantage de ces cellules est leur expression, d'une manière stable, d'un gène rapporteur sous la dépendance de la voie Wnt permettant d'étudier le rôle de Ca_vβ₄ au niveau transcriptionnel. Ainsi, dans ce modèle cellulaire, l'impact de Ca_vβ₄ sur la prolifération a été validé, et les causes ont été recherchées en posant la question : est-il possible que Ca_vβ₄ prend partie dans la voie Wnt ? Si oui, comment ? Est-il réalisable que l'un des acteurs de la voie soit un partenaire de Ca_vβ₄ ? L'étude comporte aussi un volet comparatif avec le mutant épileptique β₁₋₄₈₁ qui montre des difficultés dans l'adressage nucléaire.

Les résultats de ce travail font l'objet d'un article qui est en cours de préparation.

Downregulation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway by *CACNB4*

Mohamad RIMA^{1, 2, 3}, Marwa DAGHSNI^{1, 2, 4}, Ziad FAJLOUN³, Michel RONJAT^{1, 2, 5},
Philippe Merle⁶, Juan L. BRUSÉS⁷, Michel DE WAARD^{1, 2, 5, 8, *}

¹ INSERM, UMR1087, LabEx Ion Channels Science and Therapeutics, l'institut du thorax, Nantes, F-44000 France.

² CNRS, UMR6291, Nantes, F-44000 France.

³ Azm Center for Research in Biotechnology and its Application, Lebanese University, 1300 Tripoli, Lebanon.

⁴ Université de Tunis El Manar, Faculté de Médecine de Tunis, LR99ES10 Laboratoire de Génétique Humaine, 1007 Tunis, Tunisie.

⁵ Université de Nantes, Nantes, F-44000 France.

⁶ Cancer Research Center of Lyon, UMR INSERM 1052, CNRS 5286, Lyon Cedex 03, France.

⁷ Department of Natural Sciences, Mercy College, Dobbs Ferry, NY 10522, USA.

⁸ Smartox Biotechnology, 38400 Saint-Martin d'Hères, France.

ABSTRACT

In our previous findings, we showed that the β_4 subunit of Voltage-Gated Calcium Channel (VGCC) is able to partake in cell proliferation and cell cycle regulation. Here we investigate the mechanism by which the subunit reduces cell proliferation. Several lines of evidence suggest that β_4 mediates this function by regulating gene expression. Since the Wnt/ β -catenin signaling pathway is known as one of the most important pathways regulating cell proliferation, the effect of β_4 on the Wnt/ β -catenin pathway was studied *in vitro*. Results show that β_4 inhibits the transcriptional activity of the TCF/LEF promoter and that this inhibition requires nuclear localization of β_4 . In contrast to full-length β_4 , mutants that are unable to translocate to the nucleus do not inhibit the TCF/LEF transcriptional activity. β_4 acts through a direct interaction with TCF4 and this interaction is lost with a SH3-mutated variant of β_4 (L125P), suggesting that β_4 bind to TCF4 *via* its SH3 domain. Interestingly, exogenous expression of TCF4 normalizes the transcriptional activity of TCF/LEF caused by β_4 suggesting that TCF4 is being occupied by β_4 . Together, these findings highlight the role of β_4 in the Wnt/ β -catenin signaling pathway and provide a framework for understanding how alterations of this pathway may contribute to the etiology of neurological disorders.

KEYWORDS:

Cell proliferation; β subunit; voltage-gated calcium channel; epilepsy; FOCUS cells; Wnt/ β -catenin.

INTRODUCTION

Voltage-Gated Calcium Channel (VGCC) is a multimeric protein complex found not only at the plasma membrane of most excitable cells, but also in non-excitable cells such as lymphocytes. In response to action potential, Ca^{2+} entry through VGCC, regulates different organ-specific cellular events including muscle contraction, neurotransmitter release, cell division and gene transcription (Flavell & Greenberg 2008; Deisseroth et al. 2003; Greer & Greenberg 2008). On the structural level, VGCCs are composed of a main pore-forming α_1 subunit generally associated with the auxiliary subunits β , $\alpha_2\delta$ and γ . Among all auxiliary subunits, the β subunits ($\text{Ca}_v\beta$) exhibit an important set of regulatory functions. It mediates the trafficking and regulates the expression level of α_1 at the plasma membrane (Bichet et al. 2000). Moreover, $\text{Ca}_v\beta$ takes in charge the regulation of α_1 gating properties and kinetics (De Waard & Campbell 1995), which in turn contribute to many physiological processes including gene expression, excitation/secretion and excitation/contraction coupling (Catterall 1999; Rousset et al. 2005).

Among the four isoforms of $\text{Ca}_v\beta$, the β_4 subunit is primarily expressed in the brain where it is mostly found in Purkinje and granule cells of the cerebellum. In addition to its responsibility in regulating calcium currents, the importance of β_4 in neural function rely on the fact that mutations of this subunit were associated with a variety of human pathologies including juvenile myoclonic epilepsy (Escayg et al. 2000). For several decades, it was assumed that $\text{Ca}_v\beta$ functions were only linked to calcium channel. However, recent studies suggest that $\text{Ca}_v\beta$ may be directly involved in cellular events that take place in the nucleus, including gene regulation (Hibino et al. 2003; Xu et al. 2011; Zhang et al. 2010; Tadmouri et al. 2012). In our latest findings, we investigated the subnuclear localization of the neuronal β_4 subunit in heterologous expression system and studied its role on cell proliferation and cell cycle progression. Our results showed that full-length β_4 localizes almost exclusively in the cell nucleus and concentrates into the nucleolar compartments. Moreover, cell proliferation was found to be reduced by the expression of β_4 . In contrast, β_4 epileptic mutant β_{1-481} that shows difficulties in entering the nucleus do not affect cell proliferation suggesting that nuclear accumulation of β_4 is required to inhibit cell proliferation. However, the mechanism by which β_4 inhibits cell proliferation has not been described yet.

The Wnt signaling pathway plays an important role during embryonic and brain development (Logan & Nusse 2004; Mulligan & Cheyette 2012) and is known as one of the

most important pathways regulating cell proliferation (Al-Harathi 2012). In the nervous system, it plays an important role in synapse formation and remodeling, dendritic growth and arborization, neurotransmission, neuroplasticity and neurogenesis (Maguschak & Ressler 2012). Given the critical roles of the Wnt signaling pathway, it is not surprising that alteration of this pathway is associated with many pathologies including cancer and neurological diseases (Inestrosa et al. 2012). The pathway relies on the stabilization and nuclear translocation of β -catenin that activate genes transcription. Briefly, in the absence of Wnt, β -catenin, a protein involved in intercellular junctions of epithelial tissues, is phosphorylated by GSK3 β and degraded by the proteasome. However, activation of the pathway by Wnt binding to frizzled receptor “Fz” results in the stabilization of cytoplasmic β -catenin. The latter can then translocate into the nucleus where it interacts with members from the TCF/LEF transcription factors family. This complex binds then to DNA consensus sequence, referred to the Wnt responsive element, and activate transcription of many genes especially those that encode proteins necessary for the proliferation (Cyclin D1, MYC, etc.) (MacDonald et al. 2009; Graham et al. 2000; Cadigan & Waterman 2012).

In this study we extend our previous findings highlighting the role of the VGCC- β_4 subunit on cell proliferation by looking for the possible mechanism that is behind this phenotype. To this end, we studied the proliferation rate of a hepatocellular carcinoma-derived cell lines (FOCUS), which have been manipulated to hold firm a constitutively active Wnt signaling pathway. Also, we investigated the transcriptional activity of the pathway in presence of β_4 . Consequently, we show that the inhibition of cell proliferation by β_4 is linked, in part, to the repression of the Wnt signaling pathway that is disrupted by the epileptic mutant β_{1-481} .

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

CHO cells were cultured in complete cell culture media containing Dulbecco’s modified Eagle medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 units/mL) and streptomycin (10 μ g/mL). FOCUS cells were cultured in complete cell culture media containing Dulbecco’s modified Eagle medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% Sodium Pyruvate, 1% MEM Non-Essential Amino Acids, penicillin (100 units/mL), streptomycin (10 μ g/mL), hygromycin B (100 μ g/mL), puromycin (0,5 μ g/mL)

and blasticidin (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Cells were maintained at 37°C in a humidified environment with 5% CO_2 . Cells were replated and used for the experiments when they reached 85% confluence. Four different FOCUS cell lines were kindly obtained from Dr. Philippe Merle (MD/PhD, Centre de recherche en cancérologie de Lyon). These cell lines were manipulated in order to over express Wnt and Fz along with a TCF/LEF reporter gene. Briefly, the reporter gene encode for the cop-GFP as well as Firefly luciferase, both under the control of the mCMV minimal promoter. Upstream the mCMV four repetitions of Wnt Response Element (WRE) recognized by the transcription factors TCF/LEF are located (TCF (+)). As a negative control, a plasmid lacking WRE sequences was used (TCF (-)). Moreover, these cells were transduced in order to over express Wnt and Fz (Wnt Fz). As a negative control, cells were transduced by empty vectors (VV). Thus the four different FOCUS cell lines used in this study are: TCF (+) Wnt Fz; TCF (+) VV; TCF (-) Wnt Fz; TCF (-) VV.

Plasmids and Transfection

Expression vectors and cDNA constructs coding for pcDNA, eGFP, β_4 -eGFP, β_{1-481} -eGFP, β_{L125P} -eGFP and β_4 -myc were as previously described (Tadmouri et al. 2012). Plasmid coding for TCF4-myc, Kaiso and β -catenin were a gift from Mireia Duñach (PhD, Universitat Autònoma de Barcelona). CHO and FOCUS cells were transfected using Lipofectamine 2000 as per the manufacturer instructions.

Cell proliferation test

FOCUS cells were labeled with 2.5 μM Cell Proliferation Dye eFluor[®] 670 (eBioscience) for 10 min at 37°C in the dark. The labeling was then stopped by adding 5 volumes of ice-cold complete media and incubating cells on ice for 5 min. At the end of the incubation period, cells were washed 3 times with complete media and analyzed by flow cytometry in a BD Accuri C6 system with a 640 nm laser. Varying amounts of cells were then plated in 12 well-plates (12WP) to obtain 90% confluence after 24, 48 or 72 hrs of incubation. When culture reached 90% confluence, cells were harvested, resuspended in DMEM/F-12 without phenol red, and the dilution of the fluorescent dye was assessed by flow cytometry by analyzing a minimum of 5 000 events for each sample. Obtained peaks were deconvoluted and the proliferation index was calculated using ModFit LT[™] software.

Luciferase reporter assay

FOCUS cells were transfected with the vectors coding for eGFP, β_4 -eGFP, β_{1-481} -eGFP or β_{L125P} -eGFP. Twenty-four hours after the transfection, cells were detached, sorted by eGFP

fluorescence in a BD Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) ARIA I and Diva version 6.1.2 software. Based on eGFP fluorescence, only transfected cells (eGFP positive cells) were collected in 96WP. Firefly luciferase activity was then quantified with the Dual-Glo® Luciferase Assay System as per the manufacturer instructions (Promega Corporation, USA) in a PHERAstar FS microplate reader. The firefly luciferase enzyme activity was expressed as fold change compared to negative control, which was given the arbitrary value of 1.

Cop-GFP reporter assay

FOCUS cells were transfected with the vectors coding for β_4 -myc, TCF4-myc or pcDNA as negative control. Twenty-four hours after the transfection, cells were detached and analyzed by flow cytometry in a BD Accuri C6 system with a 488 nm laser. Relative fluorescence values were determined by analyzing at least 5 000 events for each sample. Obtained data were analyzed using FCS express 5 and cop-GFP fluorescence intensity was expressed as the mode of the peaks.

Quantitative RT-PCR

FOCUS cells were transfected with the vectors coding for eGFP or β_4 -eGFP. Twenty-four hours after the transfection, cells were detached, sorted by eGFP fluorescence with a BD Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) ARIA I. Based on eGFP fluorescence, 200 000 transfected cells (eGFP positive cells) were collected in single tubes. Total RNA of sorted cells was extracted using Extract-all (Eurobio) according to the manufacturer protocol. Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 250 ng of total RNA using M-MLV RT (Invitrogen) supplemented with DNaseI (Roche) according to the instructions of the manufacturer. Primers were selected by using the Primer3 website. To amplify *Axin2* mRNA the following primers were used: 5'-ATGGTGAGGTCCACGGAAAC-3' and 5'-CTTCACACTGCGATGCATTT-3'. The primers 5'-AAGGCGGAGGAGACCTGCGCG-3' and 5'-ATCGTGCGGCATTGCGGC-3' were used for *CycD1*; and 5'-GGACACGGACAGGATTGACA-3' and 5'-ACCCACGGAATCGAGAAAGA-3' were used for *18s*. Real-time PCR was performed with a light cycler 480 (Roche) using the QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen) according to the manufacturer instructions. The cycling protocol was 5 min at 95°C followed by 40 cycles of 2 steps each (10 s at 95°C and 30 s at 60°C). Experiments were performed in triplicate and normalization of gene expression was performed using the housekeeping gene 18S. Relative gene expression was calculated by the $\Delta\Delta$ CT method and expressed as fold change.

Protein extraction, Immunoprecipitation and Western blotting

Total proteins were extracted from cultured cells using a lysis buffer consisting of 10 mM Tris (pH 7.5), 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5% Triton X-100 and protease inhibitor cocktail (Roche). Cells were incubated in the lysis buffer on ice for 30 min and Cell lysis was completed by sonication.

Prior to the incubation with the cell extract, Dynabeads[®] Protein G (10003D, Thermo Fisher Scientific) were coupled with the immunoprecipitating antibody. 50 µL of beads were washed 3 times with PBS-Tween 0.1% and resuspended in 50 µL of the washing buffer. Then the beads were incubated for 10 min with 10 µg of anti-GFP antibody (11814460001, Roche) at room temperature under rotation. After coupling, the beads-antibody complex was washed 2 times with PBS-Tween 0.1%. Mouse IgG (M5284, Sigma) were treated in the same manner as the immunoprecipitating antibody to obtain a beads-IgG complex that serves as a negative control. Thereafter, protein extracts were added to each of the two previously prepared complexes. The samples were incubated for 30 min at room temperature under rotation. At the end of the incubation, samples were rinsed 3 times with PBS-Tween 0.1%. The obtained pellet, corresponding to the complex beads-antibody-antigen, was denatured in 15 µl of Laemmli buffer 5X for 10 min and then diluted with 60 µl of water. Samples were then heated for 10 min at 70°C then stored at -20°C. Note that for the IP *via* anti-myc antibodies coupled to biotin (sc-40 B, Santa Cruz Biotechnology) magnetic beads coupled to streptavidin "Dynabeads[®] M-280 Streptavidin» (11205D, Thermo Fisher Scientific) were used. In this case, the negative control consisted of cells that do not express the immunoprecipitated protein.

Samples were separated by SDS-PAGE in a 10% resolving gel. Separated proteins were then electro-transferred to Immobilon[®]-P PVDF Membrane (Millipore). The membrane was blocked in 10% blotting-grade blocker (Bio-Rad) in PBS-Tween 0.1% for 1 hr at room temperature, and then incubated for 3 hrs with 1:5 000 primary antibody: rabbit polyclonal anti-GFP (A-11122, Thermo Fischer Scientific), rabbit polyclonal anti-myc (ab9106, Abcam), rabbit monoclonal anti β-catenin (8480, Cell Signaling Technology) and rabbit polyclonal anti-TCF4 (ab185736, Abcam). After 2 washes with PBS-Tween 0.1%, blots were incubated with anti-rabbit IgG conjugated to HRP (sc-2004, Santa Cruz Biotechnology) at room temperature for 45 min. Bands were then visualized with the ECL detection system (Thermo Fischer scientific).

Cell Labeling

Cells cultured on glass cover slips were washed with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 15 min. After PBS washing, cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100. eGFP-tagged constructs were visualized directly using GFP fluorescence. Endogenous proteins were labeled for 1–2 h with primary antibody: TCF4 was labeled with rabbit polyclonal anti-TCF4 antibody (ab185736, Abcam). After PBS washing, cells were incubated for 45 min with Cy3-conjugated anti-rabbit secondary antibody (1:500) (711-166-152, Jackson). Samples were then mounted in « ProLong[®] Gold Antifade » (P36931, Thermo Fischer Scientific) and images were acquired with a Nikon A1 Confocal microscope. Merged pictures were obtained by FiJi software.

Statistics

Student two-tailed *t* test was used to calculate the statistical significance of differences between two sets of averaged data; $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

β_4 regulates cell proliferation in vitro

In our previous observations, β_4 expression in CHO cells showed a reduction in cell proliferation. Here, the effect of β_4 on FOCUS cell proliferation was analyzed using the Cell Proliferation Dye eFluor[®] 670. To this end, cells were transfected by the plasmids coding for β_4 -eGFP or eGFP. Twenty four hrs later, cells were labeled with the dye and the proliferation rate was assessed over 24, 48 and 72 hrs. Results show that the proliferation index of β_4 -eGFP expressing cells was significantly lower than those expressing eGFP (after 72 hrs, proliferation index = 9 ± 0.2 and 16.2 ± 0.4 for β_4 -eGFP and eGFP, respectively) (Figure 1A). These results are in agreement with our previous findings on CHO cell lines showing that the expression of β_4 reduces cell division rate. Assessment of β_4 subcellular distribution in FOCUS cells shows that β_4 -eGFP is mostly localized in the nucleus where it associates with nucleolar compartments. In contrast to β_4 -eGFP, eGFP is evenly distributed in the nucleus and in the cytosol (Figure 1B), which is in agreement with our previous observations on CHO cells.

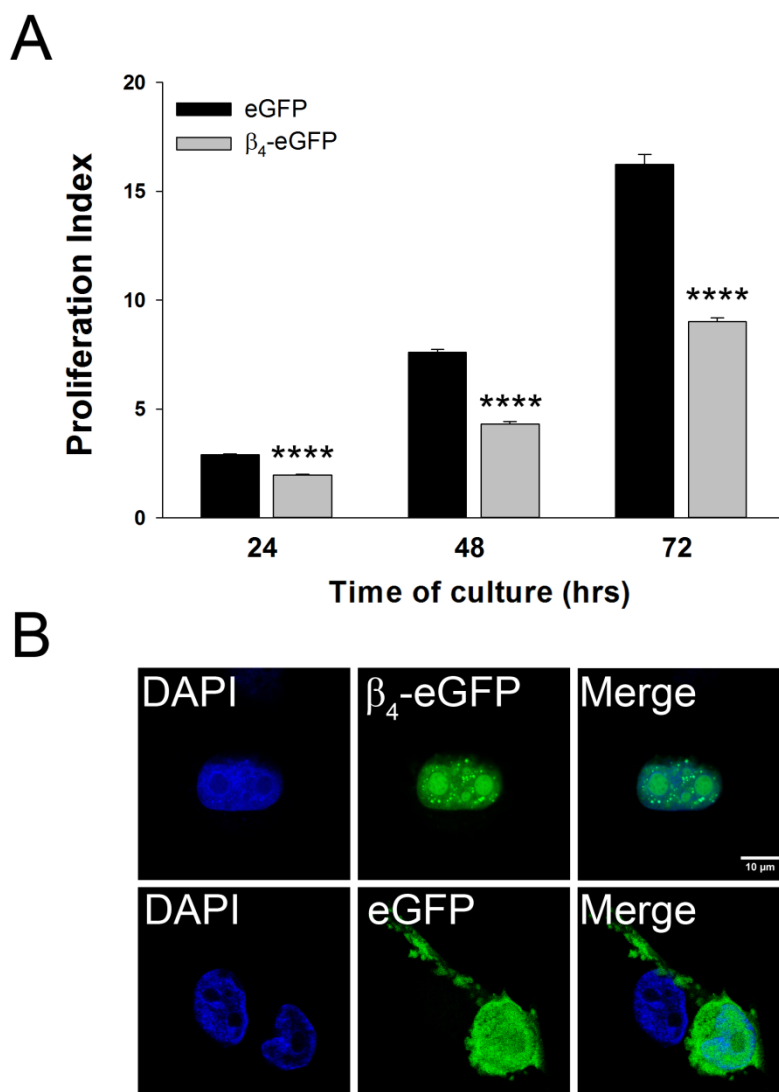


Figure 1. β_4 regulates cell proliferation of FOCUS cells. (A) Quantification of FOCUS (TCF (+) Wnt Fz) cell proliferation expressed as proliferation index. The proliferation index was calculated using ModFit LT™ based on the decrease of Cell Proliferation Dye eFluor® 670 signal (n=3). **** p <0.0001. (B) Representative confocal images of FOCUS (TCF (+) Wnt Fz) cells expressing β_4 -eGFP and eGFP (green) and labeled with DAPI (blue) to visualize the nucleus.

β_4 regulates the transcriptional activity of β -catenin

Next it was asked, whether the observed phenotype may be associated with an intervention in the Wnt signaling pathway that is well known as a regulator of cell division. Therefore, FOCUS cell lines were transfected by the plasmids coding for β_4 -eGFP or eGFP as control, and luciferase reporter activity was measured 24 hrs after the transfection (Figure 2A). β_4 expression results in a 2-fold decrease of the luciferase reporter gene activity in cells over expressing Wnt and Fz (0.95 ± 0.08 for eGFP and 0.44 ± 0.07 for β_4 -eGFP). A significant decrease was also observed in cells that do not over express Wnt (0.28 ± 0.03 for

eGFP and 0.18 ± 0.06 for β_4 -eGFP), which may point to the endogenous activity of the pathway in this hepatocellular carcinoma-derived cell line. However, any significant changes were observed in cells expressing the TCF (-) reporter gene, pointing to the specificity of the inhibition. These observations were additionally validated by measuring cop-GFP reporter gene expression (Figure 2B). FOCUS cell lines were transfected by β_4 -myc or an empty plasmid (pcDNA) as control. Twenty-four hrs after the transfection, cop-GFP expression was quantified with a BD Accuri C6 system. The results show that β_4 expression leads to a significant decrease of the cop-GFP reporter gene activity in cells over expressing Wnt and Fz. These findings show that β_4 expression inhibits the transcription of TCF reporter gene. To further confirm this inhibition, the expression of two well known Wnt-target genes, *CycDI* and *Axin2* (Jho et al. 2002; Shtutman et al. 1999), were investigated by qRT-PCR. As shown in Figure 2C, *CycDI* mRNA level decreased significantly in presence of β_4 (1 ± 0.1 for eGFP and 0.4 ± 0.1 for β_4 -eGFP). Moreover, the transcription of *Axin2* was totally inhibited by β_4 expression (1 ± 0.1 for eGFP and 0.05 ± 0.1 for β_4 -eGFP). Together, these observations suggest that the VGCC- β_4 subunit is able to partake in the Wnt signaling pathway in order to repress the transcriptional activity of β -catenin.

β_4 intervenes downstream GSK3 β

To determine whether β_4 intervention takes place upstream or downstream GSK3 β , the reporter gene expression was assessed after LiCl treatment. In fact, LiCl is a chemical activator of the Wnt signaling pathway (Klein & Melton 1996). It inhibits GSK3 β activity, thus, prevents β -catenin phosphorylation and degradation leading to its nuclear accumulation and activation of Wnt-target genes. FOCUS cell lines were transfected by β_4 -myc or an empty plasmid (pcDNA) as control. Twenty-four hrs after the transfection, cells were treated with LiCl (20 mM) for 24 hrs and then cop-GFP expression was quantified with a BD Accuri C6 system. Our results (Figure 2D) show that even after the induced activation of the pathway by LiCl, β_4 was able to reduce significantly the expression of cop-GFP reporter gene. These findings demonstrate that β_4 intervenes downstream GSK3 β , likely within the nucleus.

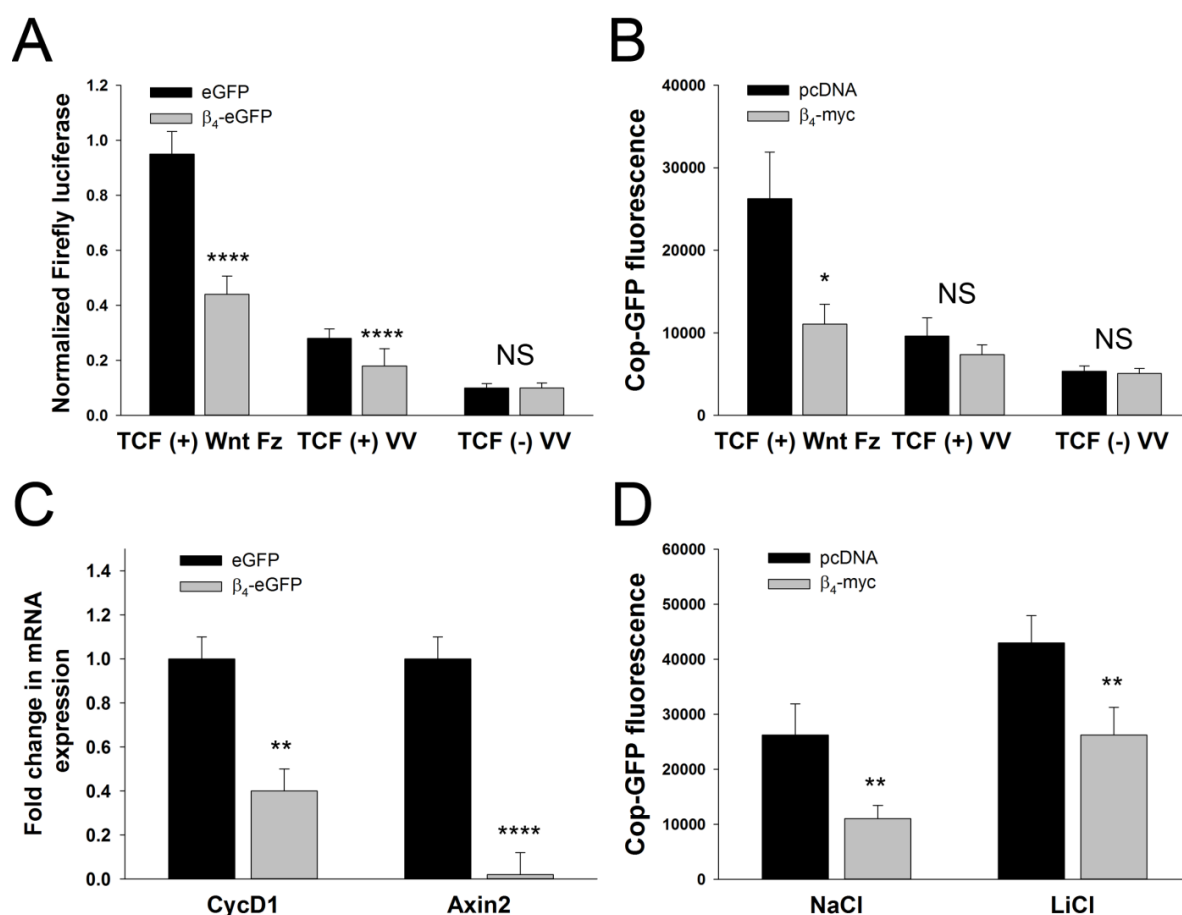


Figure 2. β_4 regulates the transcriptional activity of the TCF/LEF promoter. (A) Luciferase expression measured in the absence and presence of β_4 in FOCUS cells. The firefly luciferase enzyme activity was expressed as fold change compared to eGFP transfected FOCUS (TCF (+) Wnt Fz) cells, which were given the arbitrary value of 1. (B) CopGFP expression measured in the absence and presence of β_4 in FOCUS cell lines. (C) qRT-PCR experiments showing downregulation of *CycD1* and *Axin2* expression in cells expressing β_4 . Data were normalized using the *18s* housekeeping gene. (D) CopGFP expression measured after chemical activation of FOCUS (TCF (+) Wnt Fz) cells with 20 mM LiCl. 20 mM of NaCl were used as a negative control. (n=3). NS, non-significant; ** p <0.01; *** p <0.001; **** p <0.0001.

β_4 mutant variants do not alter the transcriptional activity of β -catenin

The structural integrity of β_4 , namely the SH3/GK internal interaction have been described as essentials for its nuclear targeting and its interaction with some protein partners (Tadmouri et al. 2012). To further investigate in the details of the inhibition of the transcriptional activity, we examined whether mutants of β_4 , deficient in nuclear localization, could produce the same effect on the reporter gene expression. We first examined the epileptic β_{1-481} -eGFP mutant, corresponding to the R482X mutation leading to the loss of 38 amino acids in the C-terminal domain of the protein (Escayg et al. 2000). This mutation has previously been shown to impair the specific nuclear localization of β_4 (Figure 3A, upper

panel). The luciferase reporter gene activity wasn't influenced by the expression of the β_{1-481} -eGFP mutant (Figure 3B) suggesting that the nuclear localization of β_4 is necessary to inhibit gene expression.

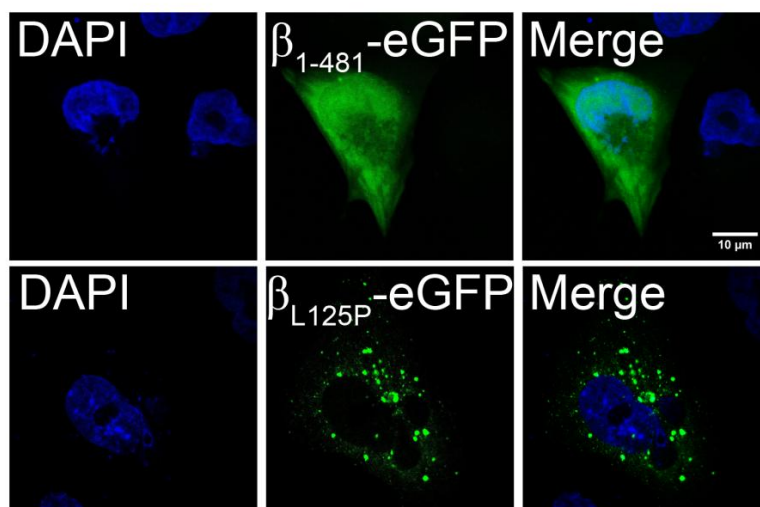
The secondly studied mutant (β_{L125P} -eGFP) is known to disrupt the SH3/GK interaction (McGee et al. 2004; Takahashi et al. 2004) and was also described as unable to enter the nucleus (Tadmouri et al. 2012). Confocal images of transfected FOCUS cells show that β_{L125P} -eGFP is completely excluded from the nucleus (Figure 3A, lower panel) as was previously reported for other cell lines (Tadmouri et al. 2012). Here again, no significant difference in luciferase expression was observed between β_{L125P} -GFP transfected cells and control (Figure 3B). These findings support the hypothesis that β_4 inhibitory effect of the Wnt signaling pathway requires its nuclear translocation, which is affected by the alteration of its structural integrity.

TCF4 a new protein partner of β_4

To determine whether β_4 inhibitory effect is due to an interaction with a key player of the Wnt pathway, three potential nuclear candidates have been suggested to interact with β_4 : Kaiso, β -catenin and TCF4. Immunoprecipitation of β_4 -eGFP in CHO cells resulted in co-precipitation of TCF4-myc (Figure 4A). However, any interaction of TCF4-myc was detected with eGFP, suggesting that the immunoprecipitation occurs specifically *via* β_4 (Figure 4B). This finding was further validated in FOCUS cell lines where immunoprecipitation of β_4 -eGFP results in co-precipitation of endogenous TCF4 (Figure 4C). However, neither Kaiso-myc nor β -catenin was immunoprecipitated with β_4 in CHO cells (data not shown).

Interestingly, β_{1-481} -eGFP mutant of β_4 co-immunoprecipitated with TCF4-myc (Figure 4D) suggesting that binding to TCF4 do not require the C-terminal domain of β_4 and may be mediated by another specific domain of β_4 . This issue was further addressed by investigating the interaction of the β_{L125P} -eGFP mutant with TCF4. Interestingly, this mutant wasn't able to co-immunoprecipitate with TCF4-myc in CHO cells (Figure 4E) suggesting that the preservation of β_4 structural integrity is required for this interaction. Since the β_{L125P} -eGFP variant of β_4 carries the mutation in its SH3 domain, it has been asked whether the interaction occurs *via* the SH3 domain of β_4 . Thus, co-immunoprecipitation experiments were carried out in CHO cells using a truncated construct of β_4 consisting of its SH3 domain (SH3-eGFP). Results show that TCF4-myc co-immunoprecipitates with SH3-eGFP (Figure 4F) suggesting that the interaction of TCF4 with β_4 is mediated by its SH3 domain.

A



B

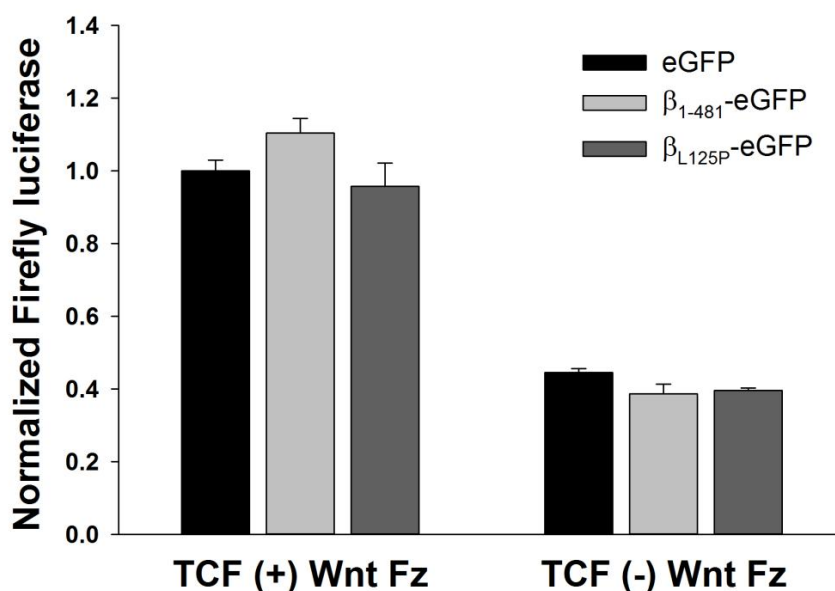


Figure 3. TCF/LEF transcriptional activity is not influenced by β_4 mutants. (A) Representative confocal images of FOCUS (TCF (+) Wnt Fz) cells expressing β_{1-481} -eGFP and β_{L125P} -eGFP (green) and labeled with DAPI (blue) to visualize the nucleus. (B) Luciferase expression measured in the absence and presence of mutants of β_4 in FOCUS cells. The firefly luciferase enzyme activity was expressed as fold change compared to eGFP transfected FOCUS (TCF (+) Wnt Fz) cells, which were given the arbitrary value of 1. $n=3$.

On another hand, confocal images of FOCUS (TCF (+) Wnt Fz) cells (Figure 5A) showed that a higher level of endogenous TCF4 concentrates in regions containing β_4 -eGFP. Nevertheless, this observation was lost with eGFP transfected cells. Moreover, neither β_{1-481} -eGFP nor β_{L125P} -eGFP mutants did not colocalize with TCF4. All together, these findings

show that β_4 interacts with TCF4 and that the interaction requires the preservation of β_4 structural integrity.

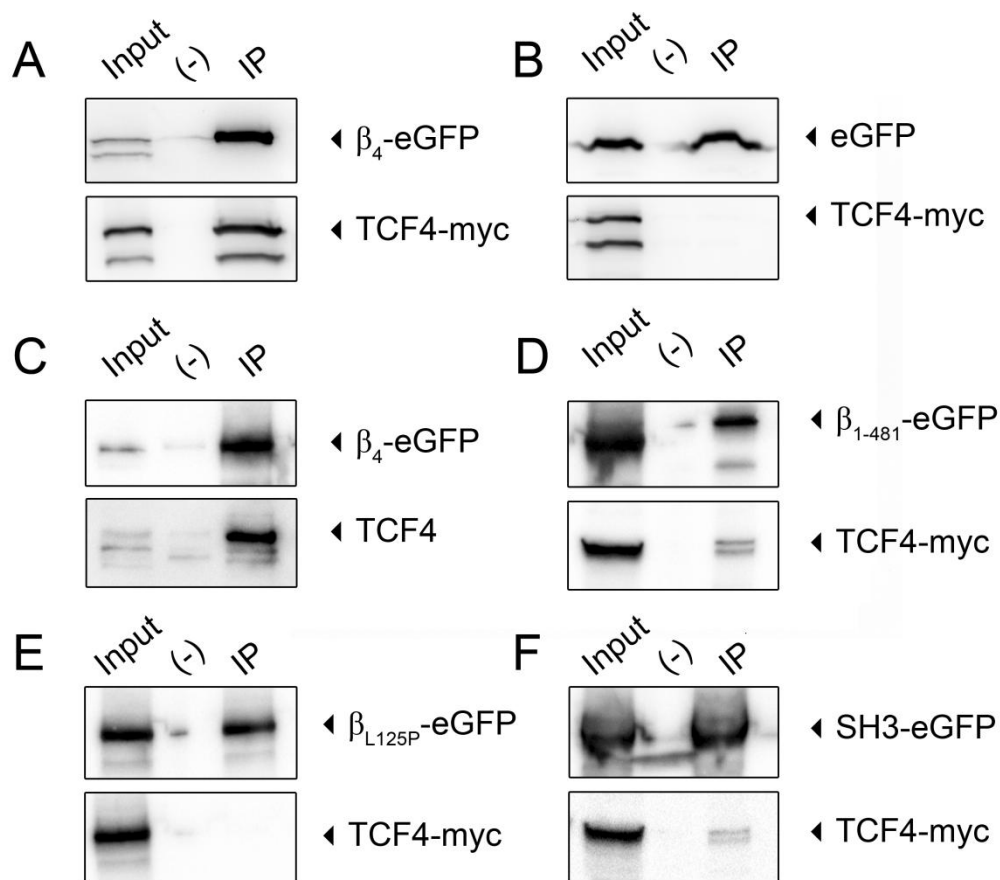


Figure 4. β_4 interacts with TCF4 *in vitro*. (A) Immunoprecipitation of TCF4-myc by β_4 -eGFP expressed in CHO cells. (B) Lack of co-immunoprecipitation shows the absence of TCF4-myc/eGFP interaction. (C) Immunoprecipitation of endogenous TCF4 by β_4 -eGFP expressed in FOCUS cells. (D) Western blot analysis of TCF4-myc immunoprecipitated by β_{1-481} -eGFP expressed in CHO cells. (E) Lack of co-immunoprecipitation shows the absence of TCF4-myc/ β_{L125P} -eGFP interaction in CHO cells. (F) Immunoprecipitation of TCF4-myc by SH3-eGFP expressed in CHO cells. Expression of eGFP-tagged proteins was verified by the observation of cell fluorescence. eGFP-tagged proteins were immunoprecipitated by mouse anti-GFP antibody (11814460001, Roche) and detected by western blot using rabbit polyclonal anti-GFP (A-11122, Thermo Fischer Scientific). TCF4-myc was detected using rabbit polyclonal anti-myc (ab9106, Abcam), while rabbit polyclonal anti-TCF4 (ab185736, Abcam) was used to detect endogenous TCF4.

β_4 inhibitory effect is counteracted by over expression of TCF4

One of the possible mechanisms by which β_4 reduces the transcriptional activity of TCF/LEF promoter may be by occupying TCF4 which will no longer be available to bind β -catenin and to activate its transcriptional activity. To investigate this hypothesis, cop-GFP reporter activity was measured after exogenous expression of TCF4 in presence/absence of β_4 . As seen in figure 5B, β_4 expression results in a significant decrease of the cop-GFP

reporter gene activity. This effect is completely lost when TCF4-myc is co-expressed along with β_4 .

These results show that in presence of β_4 , TCF4 is able to rescue the transcriptional activity of TCF/LEF promoter and, therefore, to ride up cop-GFP expression to its normal level, strongly suggesting a competitive binding between β_4 and β -catenin on TCF4.

DISCUSSION

In this study we extend our previous findings describing the role of the VGCC- β_4 subunit in cell division and epigenetic regulation (Tadmouri et al. 2012). To this end, a human hepatocellular carcinoma cell line (FOCUS) was used to study the possible impact of the VGCC- β_4 subunit on the Wnt signaling pathway. This manipulated cell line is characterized by the stable expression of a double reporter gene (Luciferase/cop-GFP) both under the control of TCF/LEF promoter. Moreover, these cells possess the advantage of stably expressing Wnt3 and Fz7 that lead to a constitutively activated pathway. Our results show that expression of β_4 in FOCUS cells decreases their division rate which is in agreement with our earlier observations on other cell line. Also, β_4 exhibits a nuclear localization with a particular sub nuclear distribution that was already shown to match the nucleolus. On another hand, our results show that the expression of β_4 results in a drastic decrease in the transcriptional activity of TCF/LEF promoter. The involvement of β_4 in the pathway occurs in the nucleus. In fact, LiCl is a chemical activator of the Wnt signaling pathway that act by inhibiting GSK3 β leading to the translocation of β -catenin into the nucleus. Even in presence of LiCl, β_4 was able to repress the transcriptional activity of TCF/LEF promoter suggesting that the intervention of β_4 occurs at the nuclear level of the pathway. This finding was in concurrence with the nuclear localization of β_4 and was strengthened by the fact that mutants of β_4 that are unable to enter the nucleus do not repress the transcriptional activity of the reporter gene.

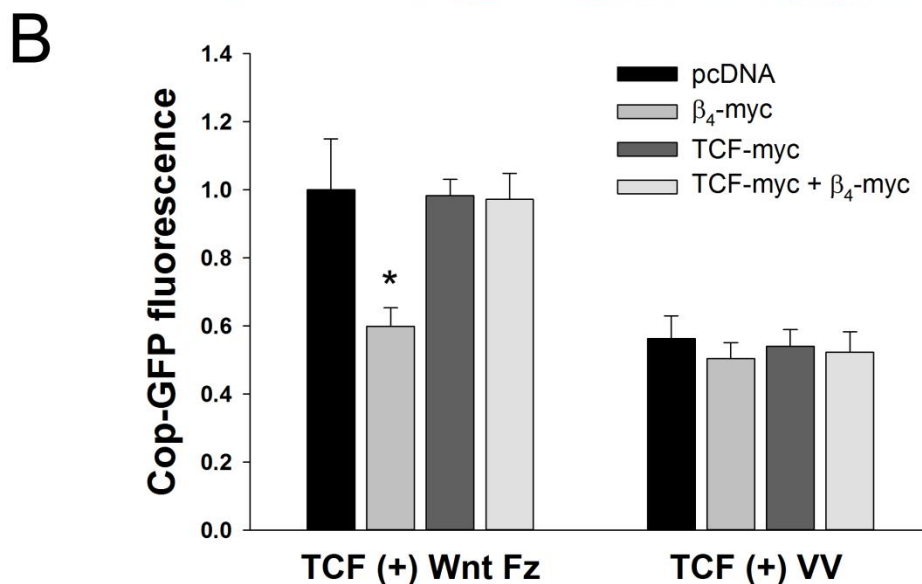
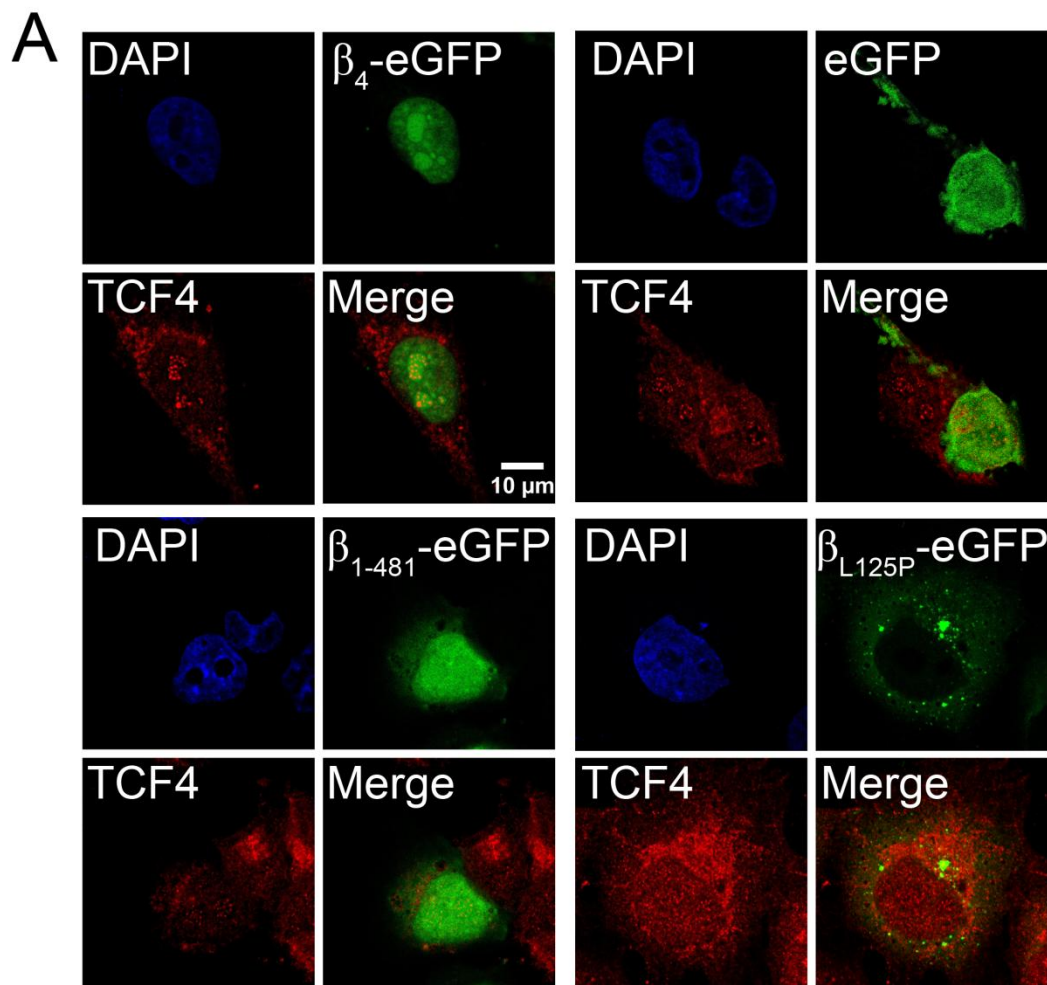


Figure 5. β_4 execute its inhibitory effect by occupying TCF4. (A) Representative confocal images of FOCUS (TCF (+) Wnt Fz) cells expressing β_4 -eGFP, eGFP, β_{1-481} -eGFP and β_{L125P} -eGFP (green) and labeled with DAPI (blue) to visualize the nucleus. Endogenous TCF4 was labeled with rabbit polyclonal anti-TCF4 and visualized using a Cy3-conjugated anti-rabbit secondary antibody (B) copGFP expression measured in the absence and presence of β_4 after exogenous expression of TCF4-myc in FOCUS cell lines. * $p < 0.05$.

VGCC- β subunits were already described to bind some transcriptions factors and to modify their transcriptional activity (Hibino et al. 2003; Xu et al. 2011; Zhang et al. 2010; Tadmouri et al. 2012). From this point, different nuclear actors of the Wnt signaling pathway have been suggested to bind β_4 . Neither Kaiso nor β -catenin was able to bind β_4 *in vitro*; however, β_4 was able to interact with TCF4. The interaction requires the preservation of β_4 structural integrity and was abolished when the SH3 domain of β_4 was mutated. Contrariwise, the truncated construct of β_4 consisting of its SH3 domain was able to bind TCF4 suggesting that β_4 interact with TCF4 *via* its SH3 domain. This observation is in agreement with earlier reports describing the SH3 domain of VGCC- β subunits as a protein-binding domain (for review, see (Buraei & Yang 2010; Buraei & Yang 2013)).

Since the transcriptional activity can be rescued by exogenous TCF4, we suggest that β_4 exerts its inhibitory effect by occupying TCF4 which will no longer be available to bind β -catenin and to activate the expression of Wnt-target genes. However, different scenarios by which β_4 occupies TCF4 can be suggested. First, one may think that the β -catenin binding domain of TCF4 become unavailable after its binding to β_4 . This may be due to a direct involvement of this domain in the interaction with β_4 or simply to a steric hindrance. On another hand, since β_4 was already shown to translocate to the nucleolus and that this domain is well known for proteins sequestration (Boisvert et al. 2007), it is likely to propose that β_4 may sequester TCF4 in the nucleolus decreasing its nuclear concentration. Recently, a model has been proposed suggesting that the nuclear concentration of TCF is important, such as that of β -catenin, to ensure a proportional ratio between β -catenin and TCF (Phillips & Kimble 2009). Thus, a reduced concentration of TCF4, due to its nucleolar sequestration by β_4 , is suspected to be the reason behind β_4 inhibitory effect.

Another mechanism may be suggested in which PP2A/B56 δ dephosphorylates TCF4. Indeed, it is well documented that regulation of some transcription factors involves a mechanism of phosphorylation/dephosphorylation mediated by protein kinases and phosphatases, respectively (Wlodarchak & Xing 2016). The TCF family of transcription factors also follows this rule; thus, their activity may be regulated by phosphorylation/dephosphorylation due to the presence in their structures of potential phosphorylation sites. For example, Traf2- and NCK interacting kinase “TNIK” is a kinase that phosphorylates TCF3 and TCF4 (Shitashige et al. 2010) leading to the activation of their transcriptional activity (Mahmoudi et al. 2009). B56 δ is a regulatory subunit of phosphatase 2A (PP2A) that was previously depicted as able to bind β_4 and thus contribute to its nuclear localization by structuring a complex made of β_4 /B56 δ /PP2A (Tadmouri et al. 2012). Based

on this fact, it may be possible that by its binding to β_4 , TCF4 is dephosphorylated by PP2A leading to the repression of their transcriptional activity. Thus, different mechanisms can be proposed and worth being investigated.

In conclusion, we show that, *in vitro*, the VGCC- β_4 is able to interact with the transcription factor TCF4 and repress Wnt-target gene expression. The *in vivo* implication of β_4 in controlling Wnt-target gene expression remains to be deciphered. Given the critical roles of the Wnt/ β -catenin in the development and homeostasis, it is not surprising that its alteration is associated with many diseases including cancer and other neurological pathology. Consequently, this work opens exciting perspectives for understanding the underlying molecular causes of some neurological pathologies in which the Wnt signaling pathway have been implicated.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge the financial support of the Azm & Saade association and the Lebanese University. Mohamad Rima is a doctoral fellow of the Azm & Saade association. The Laboratory of Excellence “Ion Channels, Science and Therapeutics” consortium is supported by an Agence Nationale de la Recherche grant N°ANR-11-LABX-0015.

REFERENCES

- Al-Harhi, L., 2012. Wnt/ β -catenin and its diverse physiological cell signaling pathways in neurodegenerative and neuropsychiatric disorders. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 7(4), pp.725–730.
- Bichet, D. et al., 2000. The I-II loop of the Ca²⁺ channel α_1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the β subunit. *Neuron*, 25(1), pp.177–90.
- Boisvert, F. et al., 2007. The multifunctional nucleolus. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8, pp.574–85.
- Buraei, Z. & Yang, J., 2013. Structure and function of the β subunit of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Biochimica et biophysica acta*, 1828(7), pp.1530–40.
- Buraei, Z. & Yang, J., 2010. The β subunit of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Physiological reviews*, 90(4), pp.1461–506.
- Cadigan, K.M. & Waterman, M.L., 2012. TCF/LEFs and Wnt signaling in the nucleus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4, pp.1–22.

- Catterall, W.A., 1999. Interactions of presynaptic Ca²⁺ channels and snare proteins in neurotransmitter release. In *Annals of the New York Academy of Sciences*. pp. 144–159.
- Deisseroth, K. et al., 2003. Signaling from synapse to nucleus: The logic behind the mechanisms. *Current Opinion in Neurobiology*, 13(3), pp.354–365.
- Escayg, A. et al., 2000. Coding and noncoding variation of the human calcium-channel beta4-subunit gene CACNB4 in patients with idiopathic generalized epilepsy and episodic ataxia. *American journal of human genetics*, 66(5), pp.1531–9.
- Flavell, S.W. & Greenberg, M.E., 2008. Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. *Annu Rev Neurosci*, 31, pp.563–590.
- Graham, T. a. et al., 2000. Crystal structure of a beta-catenin/Tcf complex. *Cell*, 103, pp.885–96.
- Greer, P.L. & Greenberg, M.E., 2008. From Synapse to Nucleus: Calcium-Dependent Gene Transcription in the Control of Synapse Development and Function. *Neuron*, 59(6), pp.846–860.
- Hibino, H. et al., 2003. Direct interaction with a nuclear protein and regulation of gene silencing by a variant of the Ca²⁺-channel beta 4 subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(1), pp.307–312.
- Inestrosa, N.C., Montecinos-Oliva, C. & Fuenzalida, M., 2012. Wnt signaling: Role in Alzheimer disease and schizophrenia. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 7, pp.788–807.
- Jho, E. et al., 2002. Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Molecular and cellular biology*, 22(4), pp.1172–83.
- Klein, P.S. & Melton, D.A., 1996. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, pp.8455–8459.
- Logan, C.Y. & Nusse, R., 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual review of cell and developmental biology*, 20, pp.781–810.
- MacDonald, B.T., Tamai, K. & He, X., 2009. Wnt/beta-Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Developmental Cell*, 17(1), pp.9–26.
- Maguschak, K.A. & Ressler, K.J., 2012. A role for WNT/b-catenin signaling in the neural mechanisms of behavior. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 7, pp.763–773.
- Mahmoudi, T. et al., 2009. The kinase TNIK is an essential activator of Wnt target genes. *The EMBO journal*, 28, pp.3329–40.

- McGee, A.W. et al., 2004. Calcium channel function regulated by the SH3-GK module in beta subunits. *Neuron*, 42(1), pp.89–99.
- Mulligan, K.A. & Cheyette, B.N.R., 2012. Wnt signaling in vertebrate neural development and function. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 7, pp.774–787.
- Phillips, B.T. & Kimble, J., 2009. A New Look at TCF and b-Catenin through the Lens of a Divergent *C. elegans* Wnt Pathway. *Developmental Cell*, 17, pp.27–34.
- Rousset, M., Cens, T. & Charnet, P., 2005. Alone at last! New functions for Ca²⁺ channel beta subunits? *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, 2005(275), p.p.e11.
- Shitashige, M. et al., 2010. Traf2- and Nck-interacting kinase is essential for Wnt signaling and colorectal cancer growth. *Cancer Research*, 70, pp.5024–5033.
- Shtutman, M. et al., 1999. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, pp.5522–7.
- Tadmouri, A. et al., 2012. Cacnb4 directly couples electrical activity to gene expression, a process defective in juvenile epilepsy. *The EMBO Journal*, 31(18), pp.3730–3744.
- Takahashi, S.X., Miriyala, J. & Colecraft, H.M., 2004. Membrane-associated guanylate kinase-like properties of beta-subunits required for modulation of voltage-dependent Ca²⁺ channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(18), pp.7193–8.
- De Waard, M. & Campbell, K.P., 1995. Subunit regulation of the neuronal alpha 1A Ca²⁺ channel expressed in *Xenopus* oocytes. *The Journal of physiology*, 485 (Pt 3), pp.619–34.
- Wlodarchak, N. & Xing, Y., 2016. PP2A as a master regulator of the cell cycle. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 9238(May), pp.1–23.
- Xu, X. et al., 2011. The Ca²⁺ channel beta4c subunit interacts with heterochromatin protein 1 via a PXVXL binding motif. *Journal of Biological Chemistry*, 286(11), pp.9677–9687.
- Zhang, Y. et al., 2010. The β subunit of voltage-gated Ca²⁺ channels interacts with and regulates the activity of a novel isoform of Pax6. *Journal of Biological Chemistry*, 285(4), pp.2527–2536.

Chapitre IV.

Expression de $Ca_v\beta_4$ au cours de la différenciation neuronale

De nombreuses études associent aujourd'hui plusieurs fonctions à une seule protéine. Ceci est aussi le cas de la sous-unité β des CCDVs, qui semble être une protéine multifonctionnelle. Cette diversité est due à la divergence des isoformes et de leurs variants d'épissage, à la possibilité de $Ca_v\beta$ d'être présente dans différents compartiments cellulaires, à sa capacité de lier plusieurs protéines ainsi qu'à la variabilité de l'expression de certaines isoformes au cours du développement. Par exemple, l'expression des variants $Ca_v\beta_{2c}$, $Ca_v\beta_{2d}$ et $Ca_v\beta_{2e}$ diminue, alors que l'expression de $Ca_v\beta_{1b}$ et de $Ca_v\beta_4$ est régulée positivement au cours du développement. En effet, dans les oreillettes et les ventricules, l'expression de $Ca_v\beta_{2c}$ est nettement supérieure à 4-5 semaines qu'à 16 semaines d'âge (Chu et al. 2004). De même, $Ca_v\beta_{2e}$ est principalement exprimé dans les ventricules à 4-5 semaines d'âge, ce variant est faiblement détecté à 16 semaines (Chu et al. 2004). Par contre, l'expression de l'isoforme neuronale $Ca_v\beta_4$ augmente avec le développement cérébral du rat (Castellano et al. 1993; Ludwig et al. 1997). Ces résultats montrent que la protéine n'est pas exprimée d'une manière constante et que son expression varie en fonction de l'état de différenciation des cellules.

Dans la majorité de ces études, les niveaux protéiques de $Ca_v\beta$, mais pas de son ARNm, ont été étudiés. Par la suite, nous nous sommes intéressés à étudier l'expression de $Ca_v\beta_4$ durant la différenciation neuronale. Dans ce but, des CSM ont été induites en NSP puis différenciées en NLC. Après la validation de la différenciation et de la pureté des échantillons par cytométrie en flux, l'expression de $Ca_v\beta_4$ a été quantifiée par RT-PCR.

RESULTATS

1- Immunophénotypage des cellules

Pour suivre la pureté de nos échantillons ainsi que le rendement de la différenciation, les cellules ont été analysées, à chaque étape de différenciation, pour leur expression des marqueurs de surface spécifiques par cytométrie en flux. D'abord il était nécessaire de vérifier la présence des marqueurs spécifiques aux CSM tels que CD105, CD90 et CD73. Les résultats montrent qu'à J0 plus ou moins 50% des cellules expriment ces marqueurs et que ce pourcentage diminue suite à la différenciation pour devenir négligeable dans les NLC (Figure

22A). Egalement, il était nécessaire de vérifier l'absence des marqueurs hématopoïétiques pour assurer la qualité des préparations et vérifier l'absence de cellules hématopoïétiques. Les anticorps utilisés étaient dirigés contre l'antigène des cellules progénitrices hématopoïétiques CD34 et une protéine transmembranaire de type I dite « CD45 ». Les résultats de ces deux marquages montrent que dans les échantillons de CSM, NSP et NLC, le pourcentage des cellules hématopoïétiques était négligeable (Figure 22B). Ensemble, ces résultats montrent la pureté des préparations de CSM et qu'il n'y a pas eu une excroissance de cellules hématopoïétiques à partir des précurseurs purifiés lors de la différenciation. Pour vérifier la réussite de la différenciation, l'expression d'un autre marqueur « la Nestine » a été étudiée. Cette protéine des filaments intermédiaires, qui est exprimée par les cellules souches neurales, est régulée négativement lors de leur différenciation. Dans nos échantillons, 54% des cellules à J0 (MSC) exprimaient la Nestine, cette expression diminue progressivement en fonction de la différenciation pour devenir négligeable à J37 (NLC) (Figure 22C). Le niveau élevé de cellules exprimant la Nestine dans les échantillons de MSC n'était pas étonnant, ceci a été déjà décrit dans certaines études (Wong et al. 2014; Xie et al. 2015; Liu et al. 2013) et souligne la pluripotence de ces cellules progénitrices. Il faut noter que la morphologie des cellules a été suivie par microscopie à contraste de phase (Figure 22D) vérifiant ainsi chaque stade cellulaire.

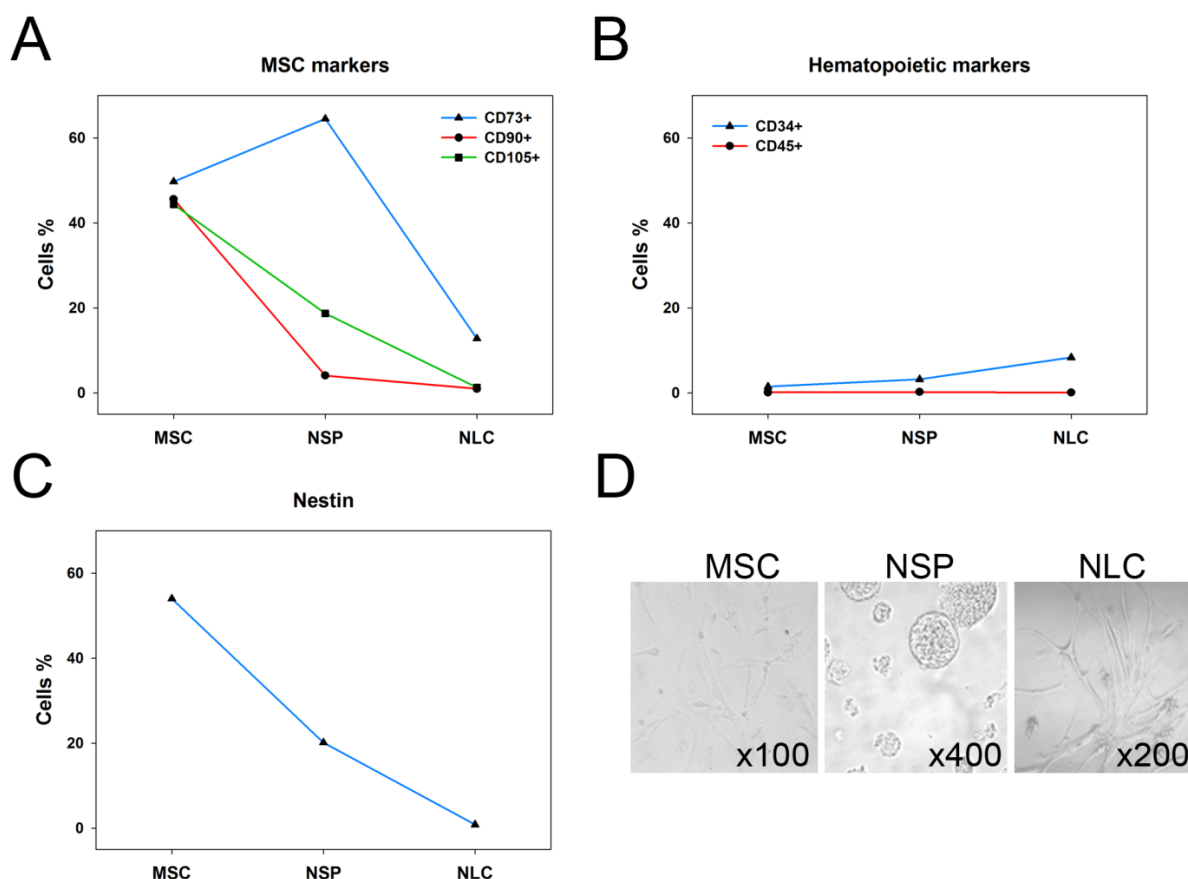


Figure 22. Caractérisation des CSM avant et après la différenciation : (A), (B) et (C) Immunophénotypage des cellules souches mésenchymateuses dérivées de tissu adipeux (MSC), des neurosphères (NSP) et des cellules neuronales (NLC) par cytométrie en flux. (D) Les CSM, NSP et NLC vues en microscope à contraste de phase.

2- L'expression de β_4 varie en fonction de la différenciation neuronale

La sous-unité β_4 des CCDVs a été déjà décrite comme étant une protéine capable de subir une translocation nucléaire et cette observation a été déjà validée dans des modèles cellulaires et dans des cultures de neurones. Récemment, notre équipe de recherche a montré que la distribution subcellulaire de β_4 est dépendante de la maturité des neurones (Tadmouri et al. 2012; Ronjat et al. 2013). Subséquemment, Nous avons pensé à étudier le niveau d'expression de β_4 dans les cellules souches neuronales et les neurones différenciés, tous les deux dérivées des CSM, et observer si cette expression varie suite à la différenciation.

Dans ce but, des échantillons d'ARNm ont été extraits à partir des trois stades cellulaires (MSC, NSP, NLC), retranscrits en ADNc puis analysés par Q-PCR. Les niveaux d'expression des gènes ont été normalisés à la GAPDH et la quantification relative a été réalisée en utilisant la méthode de $\Delta\Delta Ct$. Les niveaux d'ARNm dans les SCM ont été choisis comme référence et ont été arbitrairement normalisés à 1. Les résultats montrent que l'expression de

β_4 augmente en fonction de la différenciation. En effet, deux fois plus d'ARNm de β_4 ont été détectées dans les NSP alors que les NLC expriment 6 fois plus de β_4 par rapport aux MSC et 3 fois plus par rapport aux NSP (Figure 23). Ces résultats dévoilent une corrélation entre l'expression de β_4 et le degré de différenciation neuronale.

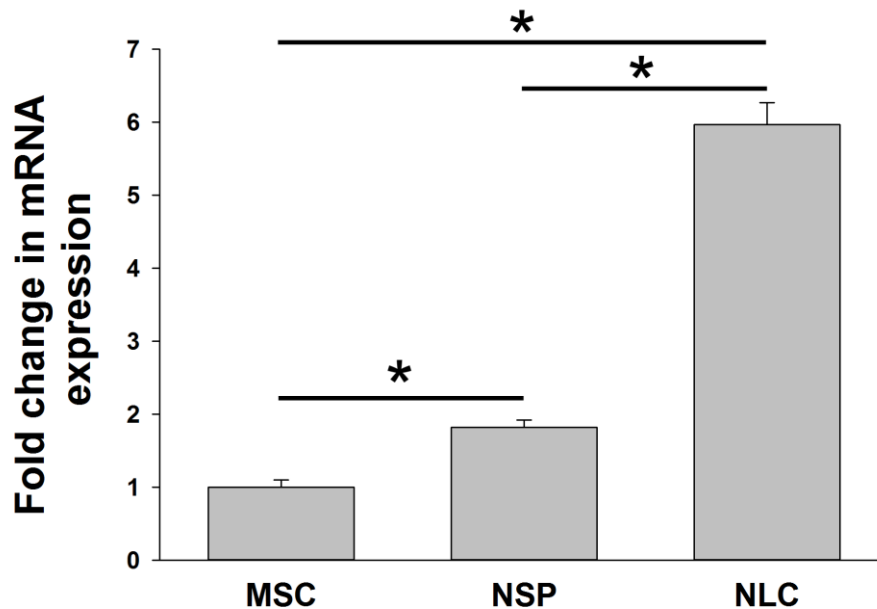


Figure 23. L'expression de β_4 est corrélée à la différenciation neuronale. L'ARNm de β_4 a été analysé par RT-PCR. Les niveaux d'expression des gènes ont été normalisés à la GAPDH et la quantification relative a été réalisée en utilisant la méthode de $\Delta\Delta Ct$. Le niveau d'ARNm dans les CSM a été choisi comme référence et a été arbitrairement normalisé à 1. Les données sont exprimées en tant que moyen \pm écart-type. n=3, * p <0.05.

DISCUSSION

De nombreux troubles neurologiques tels que la maladie de Parkinson, la sclérose en plaques et la maladie d'Alzheimer sont dus à la perte de neurones et de cellules gliales. Les études émergentes se sont focalisées sur la capacité des CSM à se différencier en cellules souches neuronales comme une solution pour traiter ces troubles.

Dans notre étude, nous avons utilisé le tissu adipeux comme source pour générer des cellules souches neurales dérivées des CSM. Ces cellules sont facilement accessibles en grandes quantités avec un minimum de méthodes invasives. La caractérisation de ces cellules par cytométrie en flux a montré la réussite de la purification ainsi que la fiabilité du protocole de différenciation.

D'autre part, depuis une dizaine d'années les études ont dévoilé le potentiel de la sous unité β des CCDVs comme une protéine nucléaire ayant des fonctions cruciales telles que la régulation génique, la régulation de la prolifération et du cycle cellulaire. L'isoforme neuronal β_4 a été aussi décrit comme capable de subir une translocation nucléaire dans des modèles d'expression hétérologues ainsi que dans les neurones (Hibino et al. 2003; Xu et al. 2011; Ronjat et al. 2013; Tadmouri et al. 2012; Zhang et al. 2010; Etemad et al. 2014). Aussi, cette translocation est corrélée à la différenciation, où des niveaux nucléaires plus élevés de β_4 ont été détectés dans les neurones proportionnellement à leur état de différenciation. Dans cette partie du travail, nous avons étudié l'expression de β_4 dans les cellules souches neuronales et suivi cette expression après leur différenciation en cellules neuronales. Nos résultats montrent qu'aux différents stades cellulaires l'expression de β_4 n'est pas uniforme où elle augmente suite la différenciation des cellules souches en cellules neuronales. Ceci peut être dû aux obligations fonctionnelles dépendantes du canal calcique, ou même à des fonctions qui peuvent être accomplies loin de la membrane plasmique.

Vue l'importance de la sous unité β_4 dans le système nerveux, les mutations qui touchent cette sous-unité ont été liées à différentes pathologies. En conséquence, ce modèle de cellules neuronales dérivées des CSM s'avère promettant d'une part pour la compréhension du canal calcique mais aussi pour fournir un matériel efficace pour les tentatives d'utiliser les CSM pour la thérapie cellulaire. A cet effet, ces résultats préliminaires peuvent être plus élargis en étudiant la translocation nucléaire de $\text{Ca}_v\beta_4$ au cours de la différenciation, l'expression des autres composants du canal calcique, de la fonctionnalité des neurones et leur fiabilité dans le traitement des maladies neurodégénératives.

Discussion, perspectives et conclusion

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Au cours des dix dernières années plusieurs études ont mis en évidence la participation directe d'un fragment de la sous-unité $Ca_v\alpha_1$ et la sous-unité $Ca_v\beta$ des canaux calciques dépendants du voltage à différentes voies de signalisation contrôlant l'expression de gènes. Ainsi, la sous-unité $Ca_v\beta$, longtemps considérée comme une sous-unité uniquement régulatrice des CCDVs, apparaît comme une protéine multifonctionnelle. De nombreuses protéines sont aujourd'hui associées à plusieurs fonctions et la situation « plusieurs fonctions pour une même protéine » semble se généraliser.

Au cours de mon travail de thèse, je me suis intéressé à étudier le rôle de l'isoforme neuronale $Ca_v\beta_4$, dans le contrôle de la division cellulaire et la régulation génique. Cette dernière a été déjà décrite dans plusieurs études antérieures (Hibino et al. 2003; Tadmouri et al. 2012; Etemad et al. 2014; Ronjat et al. 2013), ainsi l'objectif était d'identifier de nouvelles voies de signalisation dans lesquelles $Ca_v\beta_4$ peut intervenir. Expérimentalement, ces études ont été menées dans des systèmes d'expression où $Ca_v\beta_4$ a été transfectée transitoirement. Étant donné que les lignées cellulaires exprimant de manière stable notre protéine d'intérêt sont plus utiles pour étudier son effet à long terme, nous avons généré une lignée cellulaire CHO stable exprimant la sous-unité $Ca_v\beta_4$. Pour pouvoir mener une étude comparative avec le mutant épileptique de $Ca_v\beta_4$, une lignée cellulaire CHO stable exprimant $Ca_v\beta_{1-481}$ a été aussi générée.

Dans la première partie du travail nous avons étudié la localisation de $Ca_v\beta_4$ dans notre modèle cellulaire. En effet, la localisation nucléaire de $Ca_v\beta$ a été décrite dans différentes études précédentes; néanmoins, aucune étude n'a articulé la distribution subnucléaire de $Ca_v\beta_4$. Ainsi, nous avons étudié cette distribution et décrit, pour la première fois, la localisation nucléolaire de $Ca_v\beta_4$. Effectivement, par microscopie confocale et western blot, nous avons pu montrer la présence préférentielle de $Ca_v\beta_4$ dans les nucléoles. Cette localisation est exclusive pour $Ca_v\beta_4$ et nécessite probablement son extrémité C-terminale ou sa capacité à lier certaines protéines. Ces suggestions ont été basées sur le fait que le mutant épileptique de $Ca_v\beta_4$ est déficient pour l'adressage nucléolaire. En effet, la délétion de 38 acides aminés dans l'extrémité C-terminale de $Ca_v\beta_4$, correspondante à la mutation R482X, empêche sa translocation nucléolaire, d'un facteur de 7, versus la sous-unité native.

Du point de vue fonctionnel, l'expression de $Ca_v\beta_4$ inhibe la prolifération cellulaire *in vitro*. Etant donné que le mutant épileptique de $Ca_v\beta_4$ n'a aucun effet sur la prolifération, cette inhibition semble être sous la dépendance de la localisation nucléaire, voir nucléolaire, de $Ca_v\beta_4$. Bien que le nucléole soit principalement associé à la biogenèse des ribosomes, plusieurs preuves montrent qu'il possède des fonctions supplémentaires. Certaines de ces fonctions, comprennent la régulation de la mitose, la progression du cycle cellulaire et la prolifération (Boisvert et al. 2007). Ainsi, il est probable que la localisation de $Ca_v\beta_4$ dans le nucléole soit à la base de l'inhibition de la division cellulaire par un mécanisme qui reste à élucider. D'un autre côté, en présence de $Ca_v\beta_4$ la localisation nucléaire et nucléolaire de B56 δ , une sous-unité régulatrice de la phosphatase PP2A, sont favorisées. Cette dernière est l'une des phosphatases les plus polyvalentes impliquées dans la division cellulaire. En effet, PP2A est connue à déphosphoryler plus de 300 substrats impliqués dans le cycle cellulaire, régulant ainsi presque toutes les voies principales et les points de contrôle du cycle cellulaire (Wlodarchak & Xing 2016). De ce fait, il est probable que $Ca_v\beta_4$ supporte la translocation nucléaire de B56 δ , sous entendu PP2A, favorisant ainsi la régulation de la prolifération.

En outre, nous avons montré que $Ca_v\beta_4$ dérégule la progression du cycle cellulaire en empêchant les cellules de rentrer dans la phase S du cycle. Le mécanisme n'implique qu'en partie B56 δ parce que le mutant épileptique $Ca_v\beta_{1-481}$, qui ne fixe pas B56 δ , est aussi capable de modifier le profil du cycle cellulaire. Afin de comprendre ces observations, une analyse transcriptomique a été réalisée en étudiant le profil d'expression génique d'un ensemble de gènes impliqués dans le cycle cellulaire. Comme prévu, et puisque le variant épileptique montre une distribution subcellulaire différente que $Ca_v\beta_4$, les deux sous-unités exhibent un profil de régulation génique différentiel. Parmi les transcrits régulés, certains sont uniquement contrôlés par l'une des deux protéines ($Ca_v\beta_4$ ou $Ca_v\beta_{1-481}$) alors que d'autres sont régulés par les deux. Ces observations confèrent au mutant épileptique des responsabilités de régulation génique qui diffère de ceux de $Ca_v\beta_4$. Ceci peut être du aux différents partenaires protéiques, non encore identifiés, qui peuvent se lier à $Ca_v\beta_4$ mais pas à $Ca_v\beta_{1-481}$, ou inversement.

La deuxième partie de notre travail consistait à étendre nos résultats et chercher les causes derrière l'impact de $Ca_v\beta_4$ sur la prolifération cellulaire. Pour cela, nous nous sommes basés sur les études antérieures décrivant $Ca_v\beta_4$ dans la régulation génique. En d'autres termes, nous avons suggéré que l'origine de nos observations sur la prolifération cellulaire peut être

du à une implication directe de $Ca_v\beta_4$ dans une voie de signalisation qui régule la division cellulaire.

Parmi les différentes voies de signalisation potentielles, nous avons choisi la voie Wnt qui est connue comme l'une des voies les plus importantes régulant la prolifération et la différenciation cellulaire. Cette voie joue un rôle important pendant le développement embryonnaire et cérébral et intervient dans le maintien des cellules souches (Al-Harthi 2012). Dans notre étude, nous avons montré que $Ca_v\beta_4$ est impliquée dans la répression de l'expression des gènes cibles de la voie Wnt. Cette inhibition se produit dans le noyau suite à l'interaction de $Ca_v\beta_4$ avec le facteur de transcription TCF4, qui est un acteur crucial de la voie.

Contrairement à la sous-unité $Ca_v\beta_4$, le mutant épiléptique est incapable de réprimer l'expression génique mais il interagit avec TCF4. Ceci montre que cette interaction ne nécessite pas l'extrémité C-terminale de $Ca_v\beta_4$. Le deuxième mutant qui était testé dans ce projet porte une mutation ponctuelle (L125P), au niveau du domaine SH3, qui rompt l'interaction intramoléculaire SH3/GK. Ce mutant est aussi incapable de réprimer l'expression génique et ne se lie pas à TCF4. Ceci nous a laissé penser que l'interaction de $Ca_v\beta_4$ avec TCF4 se produit *via* le domaine SH3. Effectivement, les expériences d'immunoprécipitation ont validé notre hypothèse qui est en accord avec les rapports antérieurs décrivant le domaine SH3 des $Ca_v\beta_s$ en tant qu'un domaine de liaison aux protéines (Buraei & Yang 2010; Buraei & Yang 2013). Ainsi, ces résultats sont les premiers à montrer une inhibition directe de la voie Wnt par $Ca_v\beta_4$ ayant comme conséquence une réduction de la prolifération cellulaire.

D'un autre côté, nous avons mis en évidence une expression différentielle de $Ca_v\beta_4$ au cours de la différenciation neuronal. En effet, l'expression de $Ca_v\beta_4$ augmente lors de la différenciation des CSN en neurones, toutes les deux dérivées des CSM. Ceci peut être dû à des obligations fonctionnelles dépendantes du canal calcique, ou même à des fonctions propres à $Ca_v\beta_4$. Ce travail peut être complété en étudiant l'expression des autres composants des CCDVs ainsi que la fonctionnalité de ces canaux. Par conséquent, ce travail ouvre des nouvelles pistes de recherche visant la compréhension du canal calcique et peut fournir un matériel efficace pour les essais d'utilisation des CSM pour la thérapie cellulaire des maladies neurodégénératives.

En gros, cette étude révèle un coté non exploré de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta_4$ dans la prolifération et caractérise une nouvelle voie de régulation de l'expression génique par $\text{Ca}_v\beta_4$. Cette régulation a été décrite *in vitro* et nécessite ainsi sa validation *in vivo*.

La souris léthargique constitue un modèle naturel d'épilepsie humaine, permettant de comprendre la mutation R482X et ses conséquences. Cette mutation génère une protéine tronquée ($\text{Ca}_v\beta_{1-481}$) qui n'influence que très peu les cinétiques du canal. Ainsi, le phénotype neurologique, caractérisé par l'apparition des crises d'épilepsie, ne peut pas être expliqué uniquement par cette légère dérégulation. Dans d'autres termes, le phénotype épileptique peut être, en partie, lié au défaut de translocation nucléaire de $\text{Ca}_v\beta_{1-481}$, ainsi, à son incapacité d'accomplir des fonctions nucléaires importantes. Étant donné que les deux fonctions de $\text{Ca}_v\beta_4$ décrites dans cette étude sont abolies avec la forme mutante épileptique de la protéine, une étude comparative entre des souris sauvages et des souris léthargiques paraît intéressante. Expérimentalement, il est possible de quantifier les CSN, de déterminer leur capacité proliférative et de comparer ces deux paramètres entre les deux modèles de souris sauvage et léthargique. Également, il est possible de quantifier, par microscopie confocale, les neurones en utilisant des coupes de cerveaux issues de ces deux modèles de souris. Ceci permettra d'abord de comprendre le rôle $\text{Ca}_v\beta_4$ dans la prolifération dans son milieu natif et d'étudier le lien possible entre le phénotype épileptique et les défauts fonctionnels de $\text{Ca}_v\beta_{1-481}$. Dans ces mêmes modèles, une étude comparative de l'expression des gènes cibles de la voie Wnt s'avère prometteuse. Elle permettra de valider nos observations *in vivo* et de comprendre le mécanisme de régulation génique en détails.

Ce travail peut aussi être complété par un éventail de manipulations; d'abord il est important de déchiffrer le dynamisme de la translocation nucléaire, voir subnucléaire, de $\text{Ca}_v\beta_4$. Dans ce contexte, les techniques de FRAP et de FLIP (Fluorescence loss in photobleaching) permettront d'étudier la mobilité de $\text{Ca}_v\beta_4$ dans les différents sens: du cytoplasme vers le noyau, ou inversement, et du noyau vers le nucléole, ou inversement. Également, il sera intéressant de déterminer, au sein de chaque compartiment cellulaire, la fraction de $\text{Ca}_v\beta_4$ libre *versus* la fraction liée à d'autres composants cellulaires. Ceci permettra de comprendre le mécanisme de translocation nucléaire, voir nucléolaire, de $\text{Ca}_v\beta_4$. D'un autre côté, l'évolution des techniques analytiques et des bases de données peptidiques sont utiles dans les études protéomiques visant l'identification des partenaires de $\text{Ca}_v\beta_4$. En effet, l'immunoprécipitation de $\text{Ca}_v\beta_4$ et l'identification de ses partenaires protéiques par

spectrométrie de masse (MALDI) est envisageable. Ceci permettra de définir les complexes protéiques qui peuvent être structurés par $\text{Ca}_v\beta_4$ et d'ouvrir des nouvelles pistes de recherche sur ses fonctions.

CONCLUSION

En conclusion, la sous-unité $\text{Ca}_v\beta_4$, admise comme une protéine régulatrice du canal calcique, possède d'autres activités indépendantes de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha_1$, y compris la prolifération cellulaire. Outre sa localisation nucléaire, $\text{Ca}_v\beta_4$ est présente préférentiellement dans le nucléole, le site de régulation de plusieurs processus cellulaires. La localisation nucléaire de $\text{Ca}_v\beta_4$ a pour rôle de réprimer l'activité transcriptionnelle de la voie Wnt et par conséquent la prolifération cellulaire. D'un autre côté, durant la différenciation des cellules souches en cellules neuronales l'expression de $\text{Ca}_v\beta_4$ augmente. Ceci peut classer $\text{Ca}_v\beta_4$ comme un interrupteur moléculaire entre la prolifération et la différenciation cellulaire. Des patients, souffrant d'une épilepsie myoclonique juvénile portent des mutations de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta_4$. Cette forme mutée de la protéine ne peut pas réguler la prolifération cellulaire ni l'expression des gènes cibles de la voie Wnt. Par conséquent, le phénotype épileptique peut être dû à l'absence de régulation de la voie Wnt connue pour être dérégulée dans les maladies neurodégénératives.

Références

- Al-Harathi, L., 2012. Wnt/b-catenin and its diverse physiological cell signaling pathways in neurodegenerative and neuropsychiatric disorders. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 7(4), pp.725–730.
- Almagor, L. et al., 2012. The role of a voltage-dependent Ca²⁺ channel intracellular linker: a structure-function analysis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(22), pp.7602–13.
- Altier, C. et al., 2011. The Cav β subunit prevents RFP2-mediated ubiquitination and proteasomal degradation of L-type channels. *Nature neuroscience*, 14(2), pp.173–80.
- Alvarez, J. et al., 2004. Calcium current in rat cardiomyocytes is modulated by the carboxyl-terminal ahnak domain. *The Journal of biological chemistry*, 279(13), pp.12456–61.
- Arce, L., Pate, K.T. & Waterman, M.L., 2009. Groucho binds two conserved regions of LEF-1 for HDAC-dependent repression. *BMC cancer*, 9, p.159.
- Arikkath, J. et al., 2003. Gamma 1 subunit interactions within the skeletal muscle L-type voltage-gated calcium channels. *The Journal of biological chemistry*, 278, pp.1212–1219.
- Arikkath, J. & Campbell, K.P., 2003. Auxiliary subunits: Essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Current Opinion in Neurobiology*, 13(3), pp.298–307.
- Atcha, F.A. et al., 2007. A Unique DNA Binding Domain Converts T-cell Factors into Strong Wnt effectors. *Molecular and cellular biology*, 27, pp.8352–8363.
- Bading, H., Ginty, D.D. & Greenberg, M.E., 1993. Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways. *Science (New York, N.Y.)*, 260, pp.181–186.
- Badis, G. et al., 2009. Diversity and complexity in DNA recognition by transcription factors. *Science (New York, N.Y.)*, 324, pp.1720–3.
- Ball, S.L. et al., 2002. Role of the beta(2) subunit of voltage-dependent calcium channels in the retinal outer plexiform layer. *Investigative ophthalmology & visual science*, 43(5), pp.1595–603.
- Barbado, M. et al., 2009. Gene regulation by voltage-dependent calcium channels. *Biochimica et biophysica acta*, 1793(6), pp.1096–104.
- Beals, C.R. et al., 1997. Nuclear localization of NF-ATc by a calcineurin-dependent, cyclosporin- sensitive intramolecular interaction. *Genes and Development*, 11, pp.824–834.
- Bean, B.P., 1985. Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology. *The Journal of general physiology*, 86(1), pp.1–30.
- Béguin, P. et al., 2014. BARP suppresses voltage-gated calcium channel activity and Ca²⁺-evoked exocytosis. *The Journal of cell biology*, 205(2), pp.233–49.

- Béguin, P. et al., 2006. Nuclear sequestration of beta-subunits by Rad and Rem is controlled by 14-3-3 and calmodulin and reveals a novel mechanism for Ca²⁺ channel regulation. *Journal of molecular biology*, 355(1), pp.34–46.
- Béguin, P. et al., 2001. Regulation of Ca²⁺ channel expression at the cell surface by the small G-protein kir/Gem. *Nature*, 411(6838), pp.701–6.
- Behrens, J. et al., 1996. Functional Interaction of β -Catenin with the Transcription Factor LEF-1. *Nature*, 382, pp.638–642.
- Beqollari, D. et al., 2015. Functional assessment of three Rem residues identified as critical for interactions with Ca²⁺ channel beta subunits. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 467, pp.2299–2306.
- Berggren, P.-O. et al., 2004. Removal of Ca²⁺ channel beta3 subunit enhances Ca²⁺ oscillation frequency and insulin exocytosis. *Cell*, 119(2), pp.273–84.
- Bhasin, A. et al., 2011. Autologous mesenchymal stem cells in chronic stroke. *Cerebrovascular diseases extra*, 1, pp.93–104.
- Bichet, D. et al., 2000. The I-II loop of the Ca²⁺ channel alpha1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron*, 25(1), pp.177–90.
- Bito, H., Deisseroth, K. & Tsien, R.W., 1996. CREB phosphorylation and dephosphorylation: A Ca²⁺- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell*, 87, pp.1203–1214.
- Blythe, S.A. et al., 2010. β -catenin primes organizer gene expression by recruiting a histone H3 arginine 8 methyltransferase, Prmt2. *Developmental Cell*, 19, pp.220–231.
- Boisvert, F. et al., 2007. The multifunctional nucleolus. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8, pp.574–85.
- Breitenkamp, A.F.S. et al., 2014. Rare mutations of CACNB2 found in autism spectrum disease-affected families alter calcium channel function. *PloS one*, 9(4), p.e95579.
- Brosenitsch, T.A. & Katz, D.M., 2001. Physiological patterns of electrical stimulation can induce neuronal gene expression by activating N-type calcium channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21, pp.2571–2579.
- Brunet, S. et al., 2015. Phosphorylation sites in the Hook domain of CaV β subunits differentially modulate CaV1.2 channel function. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 87, pp.248–256.
- Bünemann, M. et al., 1999. Functional regulation of L-type calcium channels via protein kinase A-mediated phosphorylation of the beta(2) subunit. *The Journal of biological chemistry*, 274(48), pp.33851–4.

- Buraei, Z. & Yang, J., 2013. Structure and function of the β subunit of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Biochimica et biophysica acta*, 1828(7), pp.1530–40.
- Buraei, Z. & Yang, J., 2010. The β subunit of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Physiological reviews*, 90(4), pp.1461–506.
- Burgess, D.L. et al., 1999. beta subunit reshuffling modifies N- and P/Q-type Ca^{2+} channel subunit compositions in lethargic mouse brain. *Molecular and cellular neurosciences*, 13(4), pp.293–311.
- Burgess, R. et al., 2008. Biallelic mutation of BEST1 causes a distinct retinopathy in humans. *American journal of human genetics*, 82(1), pp.19–31.
- Buzańska, L. et al., 2002. Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features in vitro. *Journal of cell science*, 115, pp.2131–8.
- Cadigan, K.M. & Waterman, M.L., 2012. TCF/LEFs and Wnt signaling in the nucleus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4, pp.1–22.
- Campiglio, M. et al., 2013. Stable incorporation versus dynamic exchange of β subunits in a native Ca^{2+} channel complex. *Journal of cell science*, 126(Pt 9), pp.2092–101.
- Campisi, J., Morreo, G. & Pardee, A.B., 1984. Kinetics of G1 transit following brief starvation for serum factors. *Experimental Cell Research*, 152(2), pp.459–466.
- Carrión, A.M. et al., 1999. DREAM is a Ca^{2+} -regulated transcriptional repressor. *Nature*, 398, pp.80–4.
- Carrión, M., Mellström, B. & Naranjo, J.R., 1998. Protein kinase A-dependent derepression of the human prodynorphin gene via differential binding to an intragenic silencer element. *Molecular and cellular biology*, 18, pp.6921–9.
- Castellano, A. et al., 1993. Cloning and expression of a third calcium channel beta subunit. *The Journal of biological chemistry*, 268(5), pp.3450–5.
- Catterall, W. a et al., 2005. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacological reviews*, 57(4), pp.411–25.
- Catterall, W. a, 2011. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(8), pp.1–23.
- Chairoungdua, A. et al., 2010. Exosome release of b-catenin: A novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *Journal of Cell Biology*, 190, pp.1079–1091.
- Chawla, S. et al., 1998. CBP: a signal-regulated transcriptional coactivator controlled by nuclear calcium and CaM kinase IV. *Science (New York, N.Y.)*, 281, pp.1505–1509.

Chen, H. et al., 2005. Expression of Rem2, an RGK family small GTPase, reduces N-type calcium current without affecting channel surface density. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(42), pp.9762–72.

Chen, R.S. et al., 2007. Calcium channel gamma subunits: A functionally diverse protein family. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 47, pp.178–186.

Chen, Y. et al., 2004. Structural basis of the alpha1-beta subunit interaction of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Nature*, 429(6992), pp.675–80.

Cheng, W. et al., 2005. Interaction between the dihydropyridine receptor Ca²⁺ channel beta-subunit and ryanodine receptor type 1 strengthens excitation-contraction coupling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(52), pp.19225–30.

Chenn, A. & Walsh, C.A., 2002. Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science*, 297, pp.365–369.

Chien, A.J. et al., 1995. Roles of a membrane-localized beta subunit in the formation and targeting of functional L-type Ca²⁺ channels. *The Journal of biological chemistry*, 270(50), pp.30036–44.

Chu, P.-J. et al., 2004. Distribution and relative expression levels of calcium channel beta subunits within the chambers of the rat heart. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 36(3), pp.423–34.

Cicale, M. et al., 2002. Decreased gene expression of calretinin and ryanodine receptor type 1 in tottering mice. *Brain Research Bulletin*, 59, pp.53–58.

Conti, E. et al., 1998. Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin α . *Cell*, 94, pp.193–204.

Cork, R.J. et al., 2001. Development of the visual pathway is disrupted in mice with a targeted disruption of the calcium channel beta(3)-subunit gene. *The Journal of comparative neurology*, 440(2), pp.177–91.

Cowell, I.G., 1994. Repression versus activation in the control of gene transcription. *Trends in Biochemical Sciences*, 19, pp.38–42.

Crabtree, G.R. & Schreiber, S.L., 2009. SnapShot: Ca²⁺-Calcineurin-NFAT Signaling. *Cell*, 138.

Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2013. Identification of risk loci with shared effects on five major psychiatric disorders: a genome-wide analysis. *Lancet (London, England)*, 381(9875), pp.1371–9.

Curtis, B.M. & Catterall, W.A., 1984. Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry*, 23(10), pp.2113–8.

Daniel, J.M., 2007. Dancing in and out of the nucleus: p120ctn and the transcription factor Kaiso. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1773, pp.59–68.

Daniel, J.M. & Reynolds, A.B., 1999. The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. *Molecular and cellular biology*, 19, pp.3614–23.

Daniels, D.L. & Weis, W.I., 2005. Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 12, pp.364–371.

Davies, A. et al., 2010. The alpha2delta subunits of voltage-gated calcium channels form GPI-anchored proteins, a posttranslational modification essential for function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, pp.1654–1659.

Deisseroth, K., Heist, E.K. & Tsien, R.W., 1998. Translocation of calmodulin to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons. *Nature*, 392, pp.198–202.

Dezawa, M. et al., 2004. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *Journal of Clinical Investigation*, 113, pp.1701–1710.

Dolmetsch, R.E. et al., 2001. Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. *Science (New York, N.Y.)*, 294, pp.333–9.

Dolphin, A.C., 2003. Beta subunits of voltage-gated calcium channels. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 35(6), pp.599–620.

Dresviannikov, A. V. et al., 2009. Determinants of the voltage dependence of G protein modulation within calcium channel beta subunits. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 457(4), pp.743–56.

Escayg, A. et al., 2000. Coding and noncoding variation of the human calcium-channel beta4-subunit gene CACNB4 in patients with idiopathic generalized epilepsy and episodic ataxia. *American journal of human genetics*, 66(5), pp.1531–9.

Etemad, S., Obermair, G.J., et al., 2014. Differential neuronal targeting of a new and two known calcium channel β 4 subunit splice variants correlates with their regulation of gene expression. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 34(4), pp.1446–61.

Etemad, S., Campiglio, M., et al., 2014. The juvenile myoclonic epilepsy mutant of the calcium channel beta(4) subunit displays normal nuclear targeting in nerve and muscle cells. *Channels (Austin, Tex.)*, 8(4), pp.334–43.

Fagotto, F., Gluck, U. & Gumbiner, B.M., 1998. Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of beta-catenin. *Curr Biol*, 8, pp.181–190.

- Fernandez, I. et al., 2001. Three-dimensional structure of the synaptotagmin 1 C2B-domain: synaptotagmin 1 as a phospholipid binding machine. *Neuron*, 32(6), pp.1057–69.
- Fernyhough, M.E. et al., 2008. Mature adipocytes may be a source of stem cells for tissue engineering. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 368, pp.455–457.
- Finlin, B.S. et al., 2006. Analysis of the complex between Ca²⁺ channel beta-subunit and the Rem GTPase. *The Journal of biological chemistry*, 281(33), pp.23557–66.
- Finlin, B.S. et al., 2003. Regulation of voltage-gated calcium channel activity by the Rem and Rad GTPases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24), pp.14469–74.
- Fitzgerald, E.M., 2000. Regulation of voltage-dependent calcium channels in rat sensory neurones involves a Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. *The Journal of physiology*, 527 Pt 3, pp.433–44.
- Flucher, B.E. & Franzini-Armstrong, C., 1996. Formation of junctions involved in excitation-contraction coupling in skeletal and cardiac muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, pp.8101–8106.
- Foell, J. et al., 2004. Molecular heterogeneity of calcium channel beta-subunits in canine and human heart: evidence for differential subcellular localization. *Physiological genomics*, 17, pp.183–200.
- Foroutan, K.S. et al., 2015. Bone marrow mesenchymal stem cell and vein conduit on sciatic nerve repair in rats. *Trauma Monthly*, 20, pp.32–35.
- Franco Lambert, A.P. et al., 2009. Differentiation of human adipose-derived adult stem cells into neuronal tissue: Does it work? *Differentiation*, 77, pp.221–228.
- Fu, L. et al., 2008. Derivation of neural stem cells from mesenchymal stemcells: evidence for a bipotential stem cell population. *Stem cells and development*, 17, pp.1109–1121.
- Funayama, N. et al., 1995. Embryonic axis induction by the armadillo repeat domain of beta-catenin: Evidence for intracellular signaling. *Journal of Cell Biology*, 128, pp.959–968.
- García, R. et al., 2002. The beta1a subunit regulates the functional properties of adult frog and mouse L-type Ca²⁺ channels of skeletal muscle. *The Journal of physiology*, 545(Pt 2), pp.407–19.
- Giese, K., Amsterdam, A. & Grosschedl, R., 1991. DNA-binding properties of the HMG domain of the lymphoid-specific transcriptional regulator LEF-1. *Genes and Development*, 5, pp.2567–2578.
- Goentoro, L. & Kirschner, M.W., 2009. Evidence that Fold-Change, and Not Absolute Level, of b-Catenin Dictates Wnt Signaling. *Molecular Cell*, 36, pp.872–884.
- Gomez-Ospina, N. et al., 2006. The C Terminus of the L-Type Voltage-Gated Calcium Channel CaV1.2 Encodes a Transcription Factor. *Cell*, 127, pp.591–606.

Gonzalez-Gutierrez, G. et al., 2007. The Src homology 3 domain of the beta-subunit of voltage-gated calcium channels promotes endocytosis via dynamin interaction. *The Journal of biological chemistry*, 282(4), pp.2156–62.

Grادل, D., König, A. & Wedlich, D., 2002. Functional diversity of Xenopus lymphoid enhancer factor/T-cell factor transcription factors relies on combinations of activating and repressing elements. *Journal of Biological Chemistry*, 277, pp.14159–14171.

Graef, I. a et al., 1999. L-type calcium channels and GSK-3 regulate the activity of NF-ATc4 in hippocampal neurons. *Nature*, 401, pp.703–708.

Graham, T. a. et al., 2000. Crystal structure of a beta-catenin/Tcf complex. *Cell*, 103, pp.885–96.

Graham, T.A. et al., 2000. Crystal structure of a beta-catenin/Tcf complex. *Cell*, 103, pp.885–96.

Greenberg, M.E., Ziff, E.B. & Greene, L. a, 1986. Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. *Science (New York, N.Y.)*, 234, pp.80–3.

Grueter, C.E. et al., 2008. Differential regulated interactions of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II with isoforms of voltage-gated calcium channel beta subunits. *Biochemistry*, 47(6), pp.1760–7.

Guo, Z.-Y. et al., 2015. Human umbilical cord mesenchymal stem cells promote peripheral nerve repair via paracrine mechanisms. *Neural regeneration research*, 10, pp.651–8.

Gurnett, C. a, Felix, R. & Campbell, K.P., 1997. Extracellular interaction of the voltage-dependent Ca²⁺ channel alpha2delta and alpha1 subunits. *The Journal of biological chemistry*, 272, pp.18508–18512.

Haase, H. et al., 2005. Ahnak is critical for cardiac Ca(V)1.2 calcium channel function and its beta-adrenergic regulation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19(14), pp.1969–77.

Haase, H., 2007. Ahnak, a new player in beta-adrenergic regulation of the cardiac L-type Ca²⁺ channel. *Cardiovascular research*, 73(1), pp.19–25.

Haase, H. et al., 1996. Expression of calcium channel subunits in the normal and diseased human myocardium. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 74(2), pp.99–104.

Haase, H. et al., 1999. Signaling from beta-adrenoceptor to L-type calcium channel: identification of a novel cardiac protein kinase A target possessing similarities to AHNAK. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13(15), pp.2161–72.

Haegebarth, A. & Clevers, H., 2009. Wnt signaling, lgr5, and stem cells in the intestine and skin. *The American journal of pathology*, 174, pp.715–721.

Hahm, S.H. et al., 2003. A calcium-initiated signaling pathway propagated through calcineurin and cAMP response element-binding protein activates proenkephalin gene transcription after depolarization. *Mol Pharmacol*, 64, pp.1503–1511.

Hansen, J.P. et al., 2004. Calcium channel gamma6 subunits are unique modulators of low voltage-activated (Cav3.1) calcium current. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 37, pp.1147–1158.

Hardingham, G.E. et al., 1997. Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature*, 385, pp.260–265.

Hardingham, G.E., Arnold, F.J. & Bading, H., 2001. Nuclear calcium signaling controls CREB-mediated gene expression triggered by synaptic activity. *Nature neuroscience*, 4, pp.261–267.

Hartzell, H.C. et al., 2008. Molecular physiology of bestrophins: multifunctional membrane proteins linked to best disease and other retinopathies. *Physiological reviews*, 88(2), pp.639–72.

Have, S., Hodge, K. & Lamond, A.I., 2012. Dynamic Proteomics : Methodologies and Analysis. *Functional Genomics*, 815, pp.181–200.

He, X. et al., 2004. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development*, 131, pp.1663–1677.

Helton, T.D. et al., 2002. Alternative splicing of a beta4 subunit proline-rich motif regulates voltage-dependent gating and toxin block of Cav2.1 Ca²⁺ channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(21), pp.9331–9.

Helton, T.D. & Horne, W. a, 2002. Alternative splicing of the beta 4 subunit has alpha1 subunit subtype-specific effects on Ca²⁺ channel gating. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(5), pp.1573–82.

Henderson, B.R. & Fagotto, F., 2002. The ins and outs of APC and b-catenin nuclear transport. *EMBO Reports*, 3, pp.834–839.

Hermann, A. et al., 2004. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *Journal of cell science*, 117, pp.4411–4422.

Hernández-Ochoa, E.O. et al., 2007. Ca²⁺ signal summation and NFATc1 nuclear translocation in sympathetic ganglion neurons during repetitive action potentials. *Cell Calcium*, 41, pp.559–571.

Herzig, S. et al., 2007. Mechanism of Ca(v)1.2 channel modulation by the amino terminus of cardiac beta2-subunits. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21(7), pp.1527–38.

Hibino, H. et al., 2003. Direct interaction with a nuclear protein and regulation of gene silencing by a variant of the Ca²⁺-channel beta 4 subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(1), pp.307–312.

Hidalgo, P. et al., 2006. The alpha1-beta-subunit interaction that modulates calcium channel activity is reversible and requires a competent alpha-interaction domain. *The Journal of biological chemistry*, 281(34), pp.24104–10.

Hidalgo, P. & Neely, A., 2007. Multiplicity of protein interactions and functions of the voltage-gated calcium channel beta-subunit. *Cell calcium*, 42(4-5), pp.389–96.

Hinshaw, J.E., 2000. Dynamin and its role in membrane fission. *Annual review of cell and developmental biology*, 16, pp.483–519.

Hofstetter, C.P. et al., 2002. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, pp.2199–2204.

Honmou, O. et al., 2011. Intravenous administration of auto serum-expanded autologous mesenchymal stem cells in stroke. *Brain*, 134, pp.1790–1807.

Hu, H. et al., 2015. The molecular architecture of dihydropyridine receptor/L-type Ca²⁺ channel complex. *Scientific reports*, 5, p.8370.

Huang, H. & He, X., 2008. Wnt/b-catenin signaling: new (and old) players and new insights. *Current Opinion in Cell Biology*, 20, pp.119–125.

Huber, O. et al., 1996. Nuclear localization of β -catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mechanisms of Development*, 59, pp.3–10.

Huelsken, J. & Behrens, J., 2002. The Wnt signalling pathway. *Journal of Cell Science*, 115, pp.3977–3978.

Hullin, R. et al., 1992. Calcium channel beta subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNA from heart, aorta and brain. *The EMBO journal*, 11(3), pp.885–90.

Hwang, E.S., 2014. Senescence suppressors: Their practical importance in replicative lifespan extension in stem cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71, pp.4207–4219.

Inestrosa, N.C., Montecinos-Oliva, C. & Fuenzalida, M., 2012. Wnt signaling: Role in Alzheimer disease and schizophrenia. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 7, pp.788–807.

Inouye, S., 2010. Firefly luciferase: An adenylate-forming enzyme for multicatalytic functions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67, pp.387–404.

Ishitani, T. et al., 2003. The TAK1-NLK Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade Functions in the Wnt-5a / Ca²⁺ Pathway To Antagonize Wnt / β -Catenin Signaling. *Society*, 23, pp.131–139.

Ishitani, T. et al., 1999. The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF. *Nature*, 399, pp.798–802.

Jackman, J. & O'Connor, P.M., 2001. Methods for synchronizing cells at specific stages of the cell cycle. *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S. Bonifacino ... [et al.]*, Chapter 8, p.Unit 8.3.

Jangsangthong, W. et al., 2011. Single-channel monitoring of reversible L-type Ca(2+) channel Ca(V) α (1)-Ca(V) β subunit interaction. *Biophysical journal*, 101(11), pp.2661–70.

Jha, a. et al., 2015. Essential roles for Cav 2 and Cav1 channels in thymocyte development and T cell homeostasis. *Science Signaling*, 8, pp.ra103–ra103.

Jho, E. et al., 2002. Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Molecular and cellular biology*, 22(4), pp.1172–83.

Karunasekara, Y., Dulhunty, A.F. & Casarotto, M.G., 2009. The voltage-gated calcium-channel beta subunit: more than just an accessory. *European biophysics journal : EBJ*, 39(1), pp.75–81.

Kato, A.S. et al., 2007. New transmembrane AMPA receptor regulatory protein isoform, γ -7, differentially regulates AMPA receptors. *Journal of Neuroscience*, 27, pp.4969–4977.

Kelly, K.F., Spring, C.M., et al., 2004. NLS-dependent nuclear localization of p120ctn is necessary to relieve Kaiso-mediated transcriptional repression. *Journal of cell science*, 117, pp.2675–86.

Kelly, K.F., Otchere, A. a, et al., 2004. Nuclear import of the BTB/POZ transcriptional regulator Kaiso. *Journal of cell science*, 117, pp.6143–52.

Kim, C.H. et al., 2000. Repressor activity of Headless/Tcf3 is essential for vertebrate head formation. *Nature*, 407, pp.913–6.

Kim, J.-B., 2014. Channelopathies. *Korean journal of pediatrics*, 57(1), pp.1–18.

Kim, M.S. et al., 1993. Structural determinants of ion selectivity in brain calcium channel. *FEBS Letters*, 318, pp.145–148.

Kim, S.U. & de Vellis, J., 2009. Stem cell-based cell therapy in neurological diseases: A review. *Journal of Neuroscience Research*, 87, pp.2183–2200.

Kimelman, D. & Xu, W., 2006. b-Catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene*, 25, pp.7482–7491.

Kingsbury, T.J. et al., 2007. Calcineurin activity is required for depolarization-induced, CREB-dependent gene transcription in cortical neurons. *Journal of Neurochemistry*, 103, pp.761–770.

Kioussi, C. et al., 2002. Identification of a Wnt/Dvl/b-catenin --> Pitx2 pathway mediating cell-type-specific proliferation during development. *Cell*, 111, pp.673–685.

- Kiyonaka, S. et al., 2007. RIM1 confers sustained activity and neurotransmitter vesicle anchoring to presynaptic Ca²⁺ channels. *Nature neuroscience*, 10(6), pp.691–701.
- Klugbauer, N. et al., 1999. Molecular diversity of the calcium channel alpha2delta subunit. *The Journal of Neuroscience : The official Journal of the Society for Neuroscience*, 19, pp.684–91.
- Kohyama, J. et al., 2001. Brain from bone: efficient “meta-differentiation” of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent. *Differentiation; research in biological diversity*, 68, pp.235–44.
- Kondziolka, D. et al., 2000. Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke. , 55, pp.565–569.
- Kordasiewicz, H.B. et al., 2006. C-termini of P/Q-type Ca²⁺ channel alpha1A subunits translocate to nuclei and promote polyglutamine-mediated toxicity. *Human Molecular Genetics*, 15, pp.1587–1599.
- Kratochwil, K. et al., 2002. FGF4, a direct target of LEF1 and Wnt signaling, can rescue the arrest of tooth organogenesis in Lef1^{-/-} mice. *Genes and Development*, 16, pp.3173–3185.
- Kuo, C.-C. & Hess, P., 1993. Characterization of the high-affinity Ca²⁺ binding sites in the L-type Ca²⁺ channel pore in rat pheochromocytoma cells. *Journal of Physiology*, 466, pp.657–682.
- Lang, B. et al., 1981. Autoimmune aetiology for myasthenic (Eaton-Lambert) syndrome. *Lancet (London, England)*, 2(8240), pp.224–6.
- Lasso, J.M. et al., 2015. Xenotransplantation of human adipose-derived stem cells in the regeneration of a rabbit peripheral nerve. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery*, 68, pp.e189–e197.
- Leclerc, G.M. & Boockfor, F.R., 2007. Calcium influx and DREAM protein are required for GnRH gene expression pulse activity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 267, pp.70–79.
- Lee, J.S. et al., 2010. A long-term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 28, pp.1099–1106.
- Liu, F. et al., 2005. Distinct roles for *Xenopus* Tcf/Lef genes in mediating specific responses to Wnt/beta-catenin signalling in mesoderm development. *Development*, 132, pp.5375–85.
- Liu, F.C. & Graybiel, A.M., 1996. Spatiotemporal dynamics of CREB phosphorylation: Transient versus sustained phosphorylation in the developing striatum. *Neuron*, 17, pp.1133–1144.

- Liu, J. et al., 2012. Electrophysiological properties and synaptic function of mesenchymal stem cells during neurogenic differentiation - a mini-review. *International Journal of Artificial Organs*, 35(October 2016), pp.323–337.
- Liu, Y. et al., 2013. Characteristics and neural-like differentiation of mesenchymal stem cells derived from foetal porcine bone marrow. *Bioscience reports*, pp.351–360.
- Locatelli, F. et al., 2003. Neuronal differentiation of murine bone marrow Thy-1- and Sca-1-positive cells. *J Hematother Stem Cell Res*, 12, pp.727–734.
- Logan, C.Y. & Nusse, R., 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual review of cell and developmental biology*, 20, pp.781–810.
- Love, J.J. et al., 1995. Structural basis for DNA bending by the architectural transcription factor LEF-1. *Nature*, 376, pp.791–5.
- Ludwig, a, Flockerzi, V. & Hofmann, F., 1997. Regional expression and cellular localization of the alpha1 and beta subunit of high voltage-activated calcium channels in rat brain. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 17(4), pp.1339–1349.
- Luo, W. et al., 2007. Protein phosphatase 1 regulates assembly and function of the beta-catenin degradation complex. *The EMBO journal*, 26, pp.1511–21.
- Lusin, J.D. et al., 2008. NMR structure of DREAM: Implications for Ca²⁺-dependent DNA binding and protein dimerization. *Biochemistry*, 47, pp.2252–2264.
- Lyu, J., Jho, E.-H. & Lu, W., 2011. Smek promotes histone deacetylation to suppress transcription of Wnt target gene brachyury in pluripotent embryonic stem cells. *Cell research*, 21, pp.911–21.
- MacDonald, B.T., Tamai, K. & He, X., 2009. Wnt/beta-Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Developmental Cell*, 17(1), pp.9–26.
- Machon, O. et al., 2003. Role of beta-catenin in the developing cortical and hippocampal neuroepithelium. *Neuroscience*, 122, pp.129–143.
- Maguschak, K.A. & Ressler, K.J., 2012. A role for WNT/b-catenin signaling in the neural mechanisms of behavior. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 7, pp.763–773.
- Mahmoudi, T. et al., 2009. The kinase TNIK is an essential activator of Wnt target genes. *The EMBO journal*, 28, pp.3329–40.
- Martens, E. et al., 2004. Genomic Organisation, Chromosomal Localisation Tissue Distribution and Developmental Regulation of the PR61/B??? Regulatory Subunits of Protein Phosphatase 2A in Mice. *Journal of Molecular Biology*, 336(4), pp.971–986.
- Matsui, Y. et al., 2012. Enrichment of cell populations in metaphase, anaphase, and telophase by synchronization using nocodazole and blebbistatin: A novel method suitable for

examining dynamic changes in proteins during mitotic progression. *European Journal of Cell Biology*, 91(5), pp.413–419.

Matza, D. et al., 2008. A scaffold protein, AHNAK1, is required for calcium signaling during T cell activation. *Immunity*, 28(1), pp.64–74.

McCloy, R. a. et al., 2014. Partial inhibition of Cdk1 in G2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. *Cell Cycle*, 13(9), pp.1400–1412.

McGee, A.W. et al., 2004. Calcium channel function regulated by the SH3-GK module in beta subunits. *Neuron*, 42(1), pp.89–99.

Melchers, F., 2001. Foreword. In *Current Protocols in Immunology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., pp. 1–9.

Mermelstein, P.G. et al., 2001. Calmodulin priming: nuclear translocation of a calmodulin complex and the memory of prior neuronal activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, pp.15342–7.

Merrill, B.J. et al., 2004. Tcf3: a transcriptional regulator of axis induction in the early embryo. *Development (Cambridge, England)*, 131, pp.263–274.

Milenkovic, V.M. et al., 2011. Interaction of bestrophin-1 and Ca²⁺ channel β -subunits: identification of new binding domains on the bestrophin-1 C-terminus. *PloS one*, 6(4), p.e19364.

Miller, R.J., 1992. Voltage-sensitive Ca²⁺ channels. *The Journal of biological chemistry*, 267(3), pp.1403–6.

Miranda-Laferte, E. et al., 2011. Homodimerization of the Src homology 3 domain of the calcium channel β -subunit drives dynamin-dependent endocytosis. *The Journal of biological chemistry*, 286(25), pp.22203–10.

Miura, M. et al., 2006. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem cells*, 24, pp.1095–1103.

Molenaar, M. et al., 1996. XTcf-3 transcription factor mediates b-catenin-induced axis formation in xenopus embryos. *Cell*, 86, pp.391–399.

Morgan, J.I. & Curran, T., 1986. Role of ion flux in the control of c-fos expression. *Nature*, 322, pp.552–5.

Morgan, R.G. et al., 2014. Factors affecting the nuclear localization of beta-catenin in normal and malignant tissue. *Journal of Cellular Biochemistry*, 115(January), pp.1351–1361.

Mosimann, C., Hausmann, G. & Basler, K., 2009. β -catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, pp.276–86.

Mulligan, K.A. & Cheyette, B.N.R., 2012. Wnt signaling in vertebrate neural development and function. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 7, pp.774–787.

- Murakami, M. et al., 2000. Conserved smooth muscle contractility and blood pressure increase in response to high-salt diet in mice lacking the beta3 subunit of the voltage-dependent calcium channel. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 36 Suppl 2, pp.S69–73.
- Murakami, M. et al., 2007. Modified behavioral characteristics following ablation of the voltage-dependent calcium channel beta3 subunit. *Brain research*, 1160, pp.102–12.
- Murakami, M. et al., 2002. Pain perception in mice lacking the beta3 subunit of voltage-activated calcium channels. *The Journal of biological chemistry*, 277(43), pp.40342–51.
- Nogi, T. et al., 2009. A novel biological activity of praziquantel requiring voltage-operated Ca²⁺ channel beta subunits: subversion of flatworm regenerative polarity. *PLoS neglected tropical diseases*, 3(6), p.e464.
- Nombela-Arrieta, C., Ritz, J. & Silberstein, L.E., 2011. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nature Publishing Group*, 12(2), pp.126–131.
- Nurkovic, J. et al., 2016. Mesenchymal stem cells in regenerative rehabilitation. *Journal of physical therapy science*, 28, pp.1943–8.
- Ohmori, I. et al., 2008. A CACNB4 mutation shows that altered Cav2.1 function may be a genetic modifier of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Neurobiology of Disease*, 32, pp.349–354.
- Oliveria, S.F., Dell'Acqua, M.L. & Sather, W.A., 2007. AKAP79/150 Anchoring of Calcineurin Controls Neuronal L-Type Ca²⁺ Channel Activity and Nuclear Signaling. *Neuron*, 55, pp.261–275.
- Opatowsky, Y. et al., 2004. Structural analysis of the voltage-dependent calcium channel beta subunit functional core and its complex with the alpha 1 interaction domain. *Neuron*, 42(3), pp.387–99.
- Otero, J.J. et al., 2004. Beta-catenin signaling is required for neural differentiation of embryonic stem cells. *Development (Cambridge, England)*, 131, pp.3545–3557.
- Ozawa, M., Baribault, H. & Kemler, R., 1989. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *The EMBO journal*, 8, pp.1711–7.
- Park, J. II et al., 2005. Kaiso/p120-Catenin and TCF/b-Catenin complexes coordinately regulate canonical Wnt gene targets. *Developmental Cell*, 8, pp.843–854.
- Park, K. et al., 2015. Therapeutic physical exercise in neural injury: friend or foe? *Journal of physical therapy science*, 27, pp.3933–5.
- Parker, D.S. et al., 2008. Wingless signaling induces widespread chromatin remodeling of target loci. *Molecular and cellular biology*, 28, pp.1815–28.

- Pers, Y. & Jorgensen, C., 2013. Mise au point Cellules souches mésenchymateuses : actualités et perspectives thérapeutiques dans les maladies auto-immunes. , 19(3), pp.207–214.
- Van Petegem, F. et al., 2004. Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel beta-subunit and an alpha-subunit domain. *Nature*, 429(6992), pp.671–5.
- Pez, F. et al., 2013. Wnt signaling and hepatocarcinogenesis: Molecular targets for the development of innovative anticancer drugs. *Journal of Hepatology*, 59(5), pp.1107–1117.
- Phillips, B.T. & Kimble, J., 2009. A New Look at TCF and b-Catenin through the Lens of a Divergent *C. elegans* Wnt Pathway. *Developmental Cell*, 17, pp.27–34.
- Pietrobon, D., 2002. Calcium channels and channelopathies of the central nervous system. *Molecular neurobiology*, 25, pp.31–50.
- Platero, J.S., Hartnett, T. & Eissenberg, J.C., 1995. Functional analysis of the chromo domain of HP1. *The EMBO journal*, 14(16), pp.3977–86.
- Powers, P. a et al., 1992. Skeletal muscle and brain isoforms of a beta-subunit of human voltage-dependent calcium channels are encoded by a single gene. *The Journal of biological chemistry*, 267(32), pp.22967–72.
- Poy, F. et al., 2001. Structure of a human Tcf4-beta-catenin complex. *Nature structural biology*, 8, pp.1053–1057.
- Pragnell, M. et al., 1994. Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the alpha 1-subunit. *Nature*, 368(6466), pp.67–70.
- Pragnell, M. et al., 1991. Cloning and tissue-specific expression of the brain calcium channel beta-subunit. *FEBS letters*, 291(2), pp.253–8.
- Price, M.G. et al., 2005. The alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazolepropionate receptor trafficking regulator “stargazin” is related to the claudin family of proteins by its ability to mediate cell-cell adhesion. *Journal of Biological Chemistry*, 280, pp.19711–19720.
- Prieve, M.G. et al., 1998. Differential importin-alpha recognition and nuclear transport by nuclear localization signals within the high-mobility-group DNA binding domains of lymphoid enhancer factor 1 and T-cell factor 1. *Molecular and cellular biology*, 18, pp.4819–4832.
- Pukrop, T. et al., 2001. Identification of two regulatory elements within the high mobility group box transcription factor XTTCF-4. *J Biol Chem*, 276, pp.8968–8978.
- Qin, N. et al., 2002. Molecular cloning and characterization of the human voltage-gated calcium channel $\alpha_2\delta_4$ subunit. *Mol Pharmacol*, 62, pp.485–496.
- Rajagopal, S., Fields, B.L. & Kamatchi, G.L., 2014. Contribution of protein kinase Ca in the stimulation of insulin by the down-regulation of Cav β subunits. *Endocrine*, 47(2), pp.463–71.

Raymond, C. et al., 1999. Antibodies against the beta subunit of voltage-dependent calcium channels in Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Neuroscience*, 90(1), pp.269–77.

Reichhart, N. et al., 2010. Effect of bestrophin-1 on L-type Ca²⁺ channel activity depends on the Ca²⁺ channel beta-subunit. *Experimental eye research*, 91(5), pp.630–9.

Restituto, S. et al., 2000. The [beta]2a subunit is a molecular groom for the Ca²⁺ channel inactivation gate. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(24), pp.9046–52.

Reya, T. et al., 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414, pp.105–111.

Reya, T. et al., 2000. Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism. *Immunity*, 13, pp.15–24.

Ronjat, M. et al., 2013. Nuclear life of the voltage-gated Cacnb4 subunit and its role in gene transcription regulation. *Channels*, 7(2), pp.119–125.

Rosen, L.B. et al., 1994. Membrane depolarization and calcium influx stimulate MEK and MAP kinase via activation of Ras. *Neuron*, 12, pp.1207–1221.

Rosenthal, R. et al., 2006. Expression of bestrophin-1, the product of the VMD2 gene, modulates voltage-dependent Ca²⁺ channels in retinal pigment epithelial cells. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(1), pp.178–80.

Rousset, M., Cens, T. & Charnet, P., 2005. Alone at last! New functions for Ca²⁺ channel beta subunits? *Science's STKE: signal transduction knowledge environment*, 2005(275), p.pe11.

Salkoff, L. et al., 2006. High-conductance potassium channels of the SLO family. *Nature reviews. Neuroscience*, 7(12), pp.921–31.

Salomone, R. et al., 2013. Bone marrow stem cells in facial nerve regeneration from isolated stumps. *Muscle & nerve*, 48, pp.423–9.

Sather, W.A. & McCleskey, E.W., 2003. Permeation and selectivity in calcium channels. *Annu Rev Physiol*, 65, pp.133–159.

Sawada, K. et al., 2008. Differential alterations in expressions of ryanodine receptor subtypes in cerebellar cortical neurons of an ataxic mutant, rolling mouse Nagoya. *Neuroscience*, 152, pp.609–617.

Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2014. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature*, 511(7510), pp.421–7.

Schoch, S. et al., 2002. RIM1alpha forms a protein scaffold for regulating neurotransmitter release at the active zone. *Nature*, 415(6869), pp.321–6.

- Schredelseker, J. et al., 2009. Proper restoration of excitation-contraction coupling in the dihydropyridine receptor beta1-null zebrafish relaxed is an exclusive function of the beta1a subunit. *The Journal of biological chemistry*, 284(2), pp.1242–51.
- Schredelseker, J. et al., 2005. The beta 1a subunit is essential for the assembly of dihydropyridine-receptor arrays in skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(47), pp.17219–24.
- Scott, V.E. et al., 1996. Beta subunit heterogeneity in N-type Ca²⁺ channels. *The Journal of biological chemistry*, 271(6), pp.3207–12.
- Seu, L. & Pitt, G.S., 2006. Dose-dependent and isoform-specific modulation of Ca²⁺ channels by RGK GTPases. *The Journal of general physiology*, 128(5), pp.605–13.
- Shao, Y. et al., 2009. Dynamic interactions between L-type voltage-sensitive calcium channel Cav1.2 subunits and ahnak in osteoblastic cells. *American journal of physiology. Cell physiology*, 296(5), pp.C1067–78.
- Shav-Tal, Y. & Zipori, D., 2002. PSF and p54nrb/NonO - Multi-functional nuclear proteins. *FEBS Letters*, 531, pp.109–114.
- Sheridan, D.C. et al., 2004. Involvement of a heptad repeat in the carboxyl terminus of the dihydropyridine receptor beta1a subunit in the mechanism of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Biophysical journal*, 87(2), pp.929–42.
- Shitashige, M. et al., 2010. Traf2- and Nck-interacting kinase is essential for Wnt signaling and colorectal cancer growth. *Cancer Research*, 70, pp.5024–5033.
- Shtutman, M. et al., 1999. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, pp.5522–7.
- Sierra, J. et al., 2006. The APC tumor suppressor counteracts b-catenin activation and H3K4 methylation at Wnt target genes. *Genes and Development*, 20, pp.586–600.
- Smothers, J.F. & Henikoff, S., 2000. The HP1 chromo shadow domain binds a consensus peptide pentamer. *Current biology : CB*, 10(1), pp.27–30.
- Soldatov, N.M., 2015. CACNB2: An Emerging Pharmacological Target for Hypertension, Heart Failure, Arrhythmia and Mental Disorders. *Current molecular pharmacology*, 8(1), pp.32–42.
- Song, H., Stevens, C.C.F. & Gage, F.H.F., 2002. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature*, 417, pp.39–44.
- Stewart, T. a., Yapa, K.T.D.S. & Monteith, G.R., 2015. Altered calcium signaling in cancer cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1848, pp.2502–2511.

Stölting, G. et al., 2015. Direct interaction of CaV β with actin up-regulates L-type calcium currents in HL-1 cardiomyocytes. *The Journal of biological chemistry*, 290(8), pp.4561–72.

Su, Y. et al., 2008. APC Is Essential for Targeting Phosphorylated β -Catenin to the SCF β -TrCP Ubiquitin Ligase. *Molecular Cell*, 32, pp.652–661.

Südhof, T.C. & Rizo, J., 1996. Synaptotagmins: C2-domain proteins that regulate membrane traffic. *Neuron*, 17(3), pp.379–88.

Sun, P. et al., 1994. Differential activation of CREB by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity. *Genes & development*, 8, pp.2527–2539.

Sutton, K.G. et al., 1999. P/Q-type calcium channels mediate the activity-dependent feedback of syntaxin-1A. *Nature*, 401, pp.800–804.

Tadmouri, A. et al., 2012. Cacnb4 directly couples electrical activity to gene expression, a process defective in juvenile epilepsy. *The EMBO Journal*, 31(18), pp.3730–3744.

Takahashi, M. et al., 1987. Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(15), pp.5478–82.

Takahashi, S.X. et al., 2005. A CaV β SH3/guanylate kinase domain interaction regulates multiple properties of voltage-gated Ca²⁺ channels. *J Gen Physiol*, 126, pp.365–377.

Takahashi, S.X., Miriyala, J. & Colecraft, H.M., 2004. Membrane-associated guanylate kinase-like properties of beta-subunits required for modulation of voltage-dependent Ca²⁺ channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(18), pp.7193–8.

Takei, K., Yoshida, Y. & Yamada, H., 2005. Regulatory mechanisms of dynamin-dependent endocytosis. *Journal of biochemistry*, 137(3), pp.243–7.

Tanabe, T. et al., 1987. Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature*, 328(6128), pp.313–8.

Tareilus, E. et al., 1997. A *Xenopus* oocyte beta subunit: evidence for a role in the assembly/expression of voltage-gated calcium channels that is separate from its role as a regulatory subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(5), pp.1703–8.

Taylor, J. et al., 2014. The Cav β 1a subunit regulates gene expression and suppresses myogenin in muscle progenitor cells. *Journal of Cell Biology*, 205(6), pp.829–846.

Teo, J.L. & Kahn, M., 2010. The Wnt signaling pathway in cellular proliferation and differentiation: A tale of two coactivators. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, pp.1149–1155.

Tholpady, S.S. et al., 2005. The cellular plasticity of human adipocytes. *Annals of plastic surgery*, 54, pp.651–656.

Tian, L. et al., 2006. A noncanonical SH3 domain binding motif links BK channels to the actin cytoskeleton via the SH3 adapter cortactin. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(14), pp.2588–90.

Tohill, M. et al., 2004. Rat bone marrow mesenchymal stem cells express glial markers and stimulate nerve regeneration. *Neuroscience Letters*, 362, pp.200–203.

Torsvik, A. et al., 2010. Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: Putting the research field on track - Letter. *Cancer Research*, 70, pp.6393–6396.

Toth, A.B., Shum, A.K. & Prakriya, M., 2016. Regulation of neurogenesis by calcium signaling. *Cell Calcium*, 59(2-3), pp.124–134.

Tsedensodnom, O. et al., 2011. Identification of T-cell factor-4 isoforms that contribute to the malignant phenotype of hepatocellular carcinoma cells. *Experimental Cell Research*, 317, pp.920–931.

Vendel, A.C., Terry, M.D., et al., 2006. Alternative splicing of the voltage-gated Ca²⁺ channel beta4 subunit creates a uniquely folded N-terminal protein binding domain with cell-specific expression in the cerebellar cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(10), pp.2635–44.

Vendel, A.C., Rithner, C.D., et al., 2006. Solution structure of the N-terminal A domain of the human voltage-gated Ca²⁺ channel beta4a subunit. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 15(2), pp.378–83.

Vinson, C.R., Conover, S. & Adler, P.N., 1989. A *Drosophila* tissue polarity locus encodes a protein containing seven potential transmembrane domains. *Nature*, 338, pp.263–4.

Viti, J., Gulacsi, A. & Lillien, L., 2003. Wnt regulation of progenitor maturation in the cortex depends on Shh or fibroblast growth factor 2. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23, pp.5919–5927.

De Waard, M. et al., 1996. Identification of critical amino acids involved in alpha1-beta interaction in voltage-dependent Ca²⁺ channels. *FEBS letters*, 380(3), pp.272–6.

De Waard, M. et al., 1995. Properties of the alpha 1-beta anchoring site in voltage-dependent Ca²⁺ channels. *The Journal of biological chemistry*, 270(20), pp.12056–64.

De Waard, M. & Campbell, K.P., 1995. Subunit regulation of the neuronal alpha 1A Ca²⁺ channel expressed in *Xenopus* oocytes. *The Journal of physiology*, 485 (Pt 3), pp.619–34.

De Waard, M., Pragnell, M. & Campbell, K.P., 1994. Ca²⁺ channel regulation by a conserved beta subunit domain. *Neuron*, 13(2), pp.495–503.

- Walker, D. & De Waard, M., 1998. Subunit interaction sites in voltage-dependent Ca²⁺ channels: role in channel function. *Trends in neurosciences*, 21(4), pp.148–54.
- Wang, P. et al., 2015. Intramuscular injection of bone marrow mesenchymal stem cells with small gap neurorrhaphy for peripheral nerve repair. *Neuroscience Letters*, 585, pp.119–125.
- Wei, S.K. et al., 2000. Ca(2+) channel modulation by recombinant auxiliary beta subunits expressed in young adult heart cells. *Circulation research*, 86(2), pp.175–84.
- Weiss, N. et al., 2011. Rim1 modulates direct G-protein regulation of Ca(v)2.2 channels. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 461(4), pp.447–59.
- Weiss, S. et al., 2013. Regulation of cardiac L-type Ca²⁺ channel CaV1.2 via the β -adrenergic-cAMP-protein kinase A pathway: old dogmas, advances, and new uncertainties. *Circulation research*, 113(5), pp.617–31.
- West, A.E., Griffith, E.C. & Greenberg, M.E., 2002. Regulation of transcription factors by neuronal activity. *Nature Reviews Neuroscience*, 3, pp.921–931.
- Wislet-Gendebien, S. et al., 2004. Nestin-positive mesenchymal stem cells favour the astroglial lineage in neural progenitors and stem cells by releasing active BMP4. *BMC neuroscience*, 5, p.33.
- Van de Wetering, M. et al., 1997. Armadillo coactivates transcription driven by the product of the Drosophila segment polarity gene dTCF. *Cell*, 88, pp.789–799.
- Van de Wetering, M. & Clevers, H., 1992. Sequence-specific interaction of the HMG box proteins TCF-1 and SRY occurs within the minor groove of a Watson-Crick double helix. *The EMBO journal*, 11, pp.3039–3044.
- Willert, K. et al., 2003. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*, 423, pp.448–452.
- Witcher, D.R. et al., 1993. Subunit identification and reconstitution of the N-type Ca²⁺ channel complex purified from brain. *Science (New York, N.Y.)*, 261, pp.486–489.
- Wlodarchak, N. & Xing, Y., 2016. PP2A as a master regulator of the cell cycle. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 9238(May), pp.1–23.
- Wöhrle, S., Wallmen, B. & Hecht, A., 2007. Differential control of Wnt target genes involves epigenetic mechanisms and selective promoter occupancy by T-cell factors. *Molecular and cellular biology*, 27, pp.8164–77.
- Wong, A., Ghassemi, E. & Yellowley, C.E., 2014. Nestin expression in mesenchymal stromal cells: regulation by hypoxia and osteogenesis. *BMC Veterinary Research*, 10, p.173.
- Woodbury, D. et al., 2000. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 61, pp.364–370.

Wu, J. et al., 2015. Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 complex. *Science (New York, N.Y.)*, 350(6267), p.aad2395.

Xie, L. et al., 2015. Characterization of Nestin, a Selective Marker for Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells International*, 2015.

Xu, W. & Kimelman, D., 2007. Mechanistic insights from structural studies of beta-catenin and its binding partners. *Journal of cell science*, 120, pp.3337–3344.

Xu, X. et al., 2015. Solution NMR and calorimetric analysis of Rem2 binding to the Ca²⁺ channel β_4 subunit: A low affinity interaction is required for inhibition of Cav2.1 Ca²⁺ currents. *FASEB Journal*, 29, pp.1794–1804.

Xu, X. et al., 2011. The Ca²⁺ channel β_4c subunit interacts with heterochromatin protein 1 via a PXVXL binding motif. *Journal of Biological Chemistry*, 286(11), pp.9677–9687.

Xu, X., Marx, S.O. & Colecraft, H.M., 2010. Molecular mechanisms, and selective pharmacological rescue, of Rem-inhibited CaV1.2 channels in heart. *Circulation research*, 107(5), pp.620–30.

Yang, Y. & Calakos, N., 2011. Munc13-1 is required for presynaptic long-term potentiation. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(33), pp.12053–7.

Yokokura, H. et al., 1997. Isolation and comparison of rat cDNAs encoding Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I isoforms. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1338, pp.8–12.

Yokoya, F. et al., 1999. beta-catenin can be transported into the nucleus in a Ran-unassisted manner. *Molecular biology of the cell*, 10, pp.1119–31.

Yu, K. et al., 2008. The best disease-linked Cl⁻ channel hBest1 regulates Ca²⁺ V1 (L-type) Ca²⁺ channels via src-homology-binding domains. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(22), pp.5660–70.

Zamponi, G.W. et al., 2015. The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. *Pharmacol Rev*, 67, pp.821–870.

Zerangue, N. & Jan, L.Y., 1998. G-protein signaling: fine-tuning signaling kinetics. *Current biology: CB*, 8(9), pp.R313–6.

Zhang, Y. et al., 2010. The beta subunit of voltage-gated Ca²⁺ channels interacts with and regulates the activity of a novel isoform of Pax6. *Journal of Biological Chemistry*, 285(4), pp.2527–2536.

Zhao, L.-R. et al., 2002. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Experimental neurology*, 174, pp.11–20.

Zhao, R., Liu, L. & Rittenhouse, A.R., 2007. Ca²⁺ influx through both L- and N-type Ca²⁺ channels increases c-fos expression by electrical stimulation of sympathetic neurons. *European Journal of Neuroscience*, 25, pp.1127–1135.

Zou, S. et al., 2008. The beta 1 subunit of L-type voltage-gated Ca²⁺ channels independently binds to and inhibits the gating of large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Molecular pharmacology*, 73(2), pp.369–78.

Annexes

Identification of L-Amino Acid Oxidase (Mb-LAAO) with Antibacterial Activity in the Venom of *Montivipera bornmuelleri*, a Viper from Lebanon

Mohamad Rima^{a,f}, Claudine Accary^{a,f}, Katia Haddad^b, Riyad Sadek^c, Souad Hraoui-Bloquet^d, Jean C. Desfontis^e and Ziad Fajloun^{a,b,*}

^aLaboratory of Applied Biotechnology, Azm Center for Research in Biotechnology and its Applications, Doctoral School of Science and Technology, Lebanese University, Tripoli, Lebanon; ^bDepartment of Biology, Faculty of Science, Section III, Lebanese University, El Kobeh, Lebanon; ^cAmerican University, Department of Marine Sciences, Beirut, Lebanon; ^dFaculty of Science II (Fonar), Lebanese University, B.P. 90656 Jdeidet El Maten, Lebanon; ^eLUNAM, Oniris, Unit of Animal Pathophysiology and Functional Pharmacology, Nantes, France

Abstract: The L-amino acid oxidase (LAAO) is a multifunctional enzyme, able to partake in different activities including antibacterial activity. In this study, a novel LAAO (Mb-LAAO) was isolated from the venom of *M. bornmuelleri* snake using size exclusion chromatography followed by RP-HPLC and partially characterized. However, the molecular weight of the Mb-LAAO determined by ESI-MS and SDS-PAGE was 59 960.4 Da. Once the enzymatic activity test confirming the enzyme's identity (transformation of L-leucine) was done, the Mb-LAAO was evaluated for its antibacterial activity against Gram-negative bacteria. It showed a remarkable effect against *M. morgani* and *K. pneumoniae*. Moreover, no cytotoxic activity was observed for Mb-LAAO against human erythrocytes arguing for an exploration of its pharmaceutical interest.

Keywords: Antibacterial effect, LAAO activity, L-amino acid oxidase, LC-ESI-MS analysis, *Montivipera bornmuelleri*.

INTRODUCTION

Nature has been a source of medicinal products for thousands of years, among which snake venoms form a rich source of bioactive molecules, such as peptides, proteins and enzymes with important pharmacological activities. While the original native snake venom compounds are usually unsuitable as therapeutics, interventions by medicinal chemists as well as scientists and clinicians in pharmaceutical research and development have made it possible to use the snake venom proteins as therapeutics for multiple disorders based on the available structural and functional information. Snake venoms, with their cocktail of individual components, have great potential as therapeutic agents for human diseases [1-3]. A large number of proteins have been purified and characterized from snake venoms. The most common enzymes in snake venoms include Phospholipase A2, Proteinase, Nucleotidase, Phosphodiesterase, and L-Amino Acid Oxidase [4].

L-amino acid oxidases (LAAOs, EC 1.4.3.2) are enantioselective flavoenzymes catalyzing the oxidative deamination of a wide range of L-amino acids. During the reductive half reaction, the amino acid substrate is oxidized to the imino acid with concomitant reduction of the flavin cofactor (flavin adenine dinucleotide or FAD). The imino acid product of oxidation undergoes a non-enzymatic hydrolysis to give the respective α -keto acid and ammonia. An oxidative

half reaction completes the catalytic cycle reoxidizing the FAD with molecular oxygen and producing hydrogen peroxide. LAAO activity has been detected in a wide range of organisms, both eukaryotic and prokaryotic [5]. The LAAOs isolated from snake venoms are the most well characterized members of this enzyme family. These enzymes are found in high concentrations in venomous snakes. Several biological activities of LAAOs from snakes have been reported, including apoptosis-inducing activity on various human cell lines [6] as well as antibacterial [7] and anti-HIV activity [8]. It has been shown that these effects could be correlated to the production of a highly localized concentration of H₂O₂ [9-11]. In fact, the finding that LAAO-induced apoptosis is distinct from that caused by exogenous hydrogen peroxide supports the idea that the mode of hydrogen peroxide delivery is an important factor in inducing apoptotic activity. Such findings have generated an increasing interest in the application of venom LAAOs as a target for the treatment of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) [8].

Due to this variety of functions, LAAOs has been the subject of a number of biophysical, biochemical, spectroscopic and kinetic studies in order to understand its evolution in *Viperidae* venom and its mechanisms of action in snake-bites.

M. bornmuelleri is one of the venomous viper species found in Lebanon at altitudes above 1800m. Its small size, rarely exceeding 60 cm, is due to adaptation to the cold climate of its habitat [12]. This specie is listed as endangered by the International Union for the Conservation of Nature based on its limited geographic range estimated to be less than 20,000 km². Very little is known about the biology of

*Address correspondence to this author at the Azm Center for Research in Biotechnology and its Applications, Doctoral School of Science and Technology, Lebanese University, El Mittein Street, Tripoli, Lebanon; Tel: + 961 6 213 255, Fax: + 961 6 213 383, E-mail: zfajloun@ul.edu.lb

^fBoth authors contributed equally to this work.

this rare species; however the Lebanon viper is likely to have aspects in common with other members of the viper family (*Viperidae*) [13].

Many of the early efforts in venom research were directed towards the identification, characterization and purification of proteins that are found in abundance in venoms or in most natural components. With the advent of more sophisticated purification techniques, there have been studies of new and interesting protein components that are found in smaller quantities. In our previous studies, we have demonstrated the presence of different components within the venom of *M. bornmuelleri* such as PLA2, metalloproteinase and serine-proteinase [12]. In this work, we describe the identification and partial characterization of a novel LAAO from *M. bornmuelleri* venom named Mb-LAAO. In addition to enzymatic activity the Mb-LAAO was evaluated for bactericidal activity against *Morganella morganii* and *Klebsiella pneumonia*, two gram-negative bacteria, and its hemolytic effect toward human erythrocytes was equally established.

EXPERIMENTAL

Materials

Venom was manually milked from *M. bornmuelleri* vipers, freeze-dried into crystal shape, and stored at -20°C in a dry, cold and light-free place. Ammonium acetate, Formic acid (FA), SDS, Tris-glycine buffer, Coomassie Brilliant blue, ethanol, acetic acid, methanol, mercaptoethanol, glycerol, bromophenol blue, acetonitrile (ACN), L-Leucine and trifluoroacetic acid (TFA) were from Sigma-Aldrich (USA). Muller Hinton agar and Imipenem disk were purchased from Bio-Rad. Bacterial strains were obtained from Strain Bank at Azm center for the research in biotechnology and its applications.

HPLC

Five milligrams of lyophilized crude venom was suspended in 0.2 ml of 0.05M ammonium acetate buffer, pH 8.2. A total of 200 μl (25mg/ml) was injected into a Waters 300SW (PROTEIN-PAKTM, 7.5x300mm) size-exclusion column. The column was previously equilibrated with the elution buffer (0.05M ammonium acetate buffer, pH 8.2). The collection process required 60min at a flow rate of 0.5 ml/min. A UV/VIS (Agilent G1314D-VWD) detector was used to monitor absorbencies at 280 nm. HyStarTM V 3.2 software was used to control the pumps and store data. All the collected fractions were subjected to the LC-ESI-MS analysis.

LC-ESI-MS Analysis

On-line LC-ESI-MS analysis of collected fractions was performed on a Restek Ultra II C18 column (25 cm length, 4.6 mm inner diameter and 5 μm diameter of grafted silica particles). 20 μL of each fraction were injected into the system automatically and eluted with a linear gradient of 0% to 100% buffer B [ACN +0.1% FA] in 40 min then 100% Buffer A [water +0.1% FA] for 5 min at a flow rate of 0.75 ml/min ($\lambda=280$ nm). Fractions were injected manually into the LC-ESI-MS system and analyzed in positive ion mode. ESI spectra were acquired using an Esquire 3000 type from Bruker. Data processing was performed with the aid of the

following Softwares: 44.0 Hystar Version 3.2, Hystar Post Processing, Esquire Control Version 1.3 and Data analysis compass.

Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide Gel Electrophoresis

Each fraction was applied to Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) according to a modified technique of Laemmli (1970). Separating gels 12% and stacking gel 4% were used.

The samples mixed with Tris-HCl (1.25 M, pH 6.8), SDS 10%, 2-Mercaptoethanol, Glycerol, Bromophenol Blue 0.1%, were heated for 5 min in a boiling water bath and then placed into ice. Twenty μL of each sample was then loaded onto a gel, and electrophoresis was carried out using Tris-Glycine (pH 8.3) with SDS 10% buffer at a constant voltage (60 V for 2 h). The gel was stained for 15 min in 0.1% Coomassie brilliant blue R-250. Destaining was carried out in a solution containing 10% ethanol and 7.5 % acetic acid, until the background became clear. The molecular weights of the protein bands were determined using protein standard markers (6.5-200 kDa).

Antibacterial Activity

Each fraction collected by exclusion chromatography was screened for antibacterial activity against *M. morganii* and *K. pneumonia* by disc-diffusion method. The strains were inoculated into the agar for 24 hours at 37°C . A colony of each strain was placed in 5 mL of 0.9% NaCl, vortexed, and then inoculated by flooding onto sterile MH agar plates (90-mm diameter). The surface of the medium was allowed to dry for about 3 min. sterile paper discs were then placed onto the MH agar surface and 20 μl of each fraction were added per disc in duplicate. The blank disc containing 20 μl of 0.05M ammonium acetate buffer, pH 8.2, served as a normal control. The plates were incubated at 37°C for 24 h. The antimicrobial activity is related to the diameters of the inhibition of growth recorded in millimeter around the disks.

LAAO Activity

LAAO activity was determined by spectrophotometrical method using L-Leucine as substrate [14]. The reaction was performed in a 96 well plate, which each contain 100 μL of L-Leucine (0.05M) and 20 μL of the sample to be tested. After measuring the absorbance at 450 nm the plate was incubated at 37°C for 2 h. The reaction was then stopped by the addition of 100 μL of Trifluoroacetic acid (TFA 27%) and once again the absorbance was measured. An increase in absorbance at 450 nm indicates the presence of enzyme activity.

Hemolytic Activity on Human Blood Agar Plate

Human blood agar plates were prepared by adding 5 ml of RBCs to 95 ml of sterile nutrient agar aseptically and the solution was poured immediately into the Petri dishes. After solidification, the wells are cut into the agar (6 mm diameter) then loaded with 20 μl of test solutions. The plates were observed for hemolysis after 24 h of incubation at room temperature [15].

RESULTS AND DISCUSSION

In fact, the crude venom of *M. bornmuelleri* was fractionated by size exclusion chromatography (SEC) according to the protocol described in the experimental part, and six fractions with different times of retention were collected. The SEC chromatogram is represented in (Fig. 1). Each peak was collected in one defined fraction. Thus, six fractions (fraction A, B, C, D, E and F) corresponding to six represented peaks were pooled. The separate passage of each fraction through RP-HPLC coupled to ESI mass spectrometer (LC-ESI-MS) has enabled directly the mass analysis of various components present in each fraction and eluted from the C_{18} column. High molecular weight proteins were observed in fractions A and B. Contrariwise, low molecular weight proteins about 14 kDa to 20 kDa were found in fractions C through F.

The analysis using LC-ESI-MS of fraction A corresponding to the first peak on SEC chromatogram (grey color in Fig. 1) showed the presence of few components with dominance of a mass equal to 59 960.4 Da at a retention time

around 27 min. The appearance of the peak in (Fig. 2A) at 27 min suggests the purity of the matching protein. The potential Mb-LAAO displayed on one ion peak protonated with $75H^+$ at $m/z = m/z$ 800.5 corresponding to the same mass equivalent to 59 960.4 Da. This value of experimental mass obtained added to the specific activity test (shown later) confirms the identity of LAAO.

The obtained results show clearly that, the combination of Waters 300SW PROTEIN-PAK™, (7.5x300mm) size-exclusion column and LC-ESI-MS using Restek Ultra II C_{18} column coupled to Electrospray Ionisation Mass Spectrometer is very useful in detecting LAAO from the crude venom of *M. bornmuelleri*.

Figure 3 describes the electrophoretic profile of fraction A, B, C, D, E and F all obtained by HPLC (size exclusion column). Fraction A showed a single band of 60 kDa, approximately similar to the one obtained by ESI-MS confirming the success of Mb-LAAO's isolation from the venom of *M. bornmuelleri*.

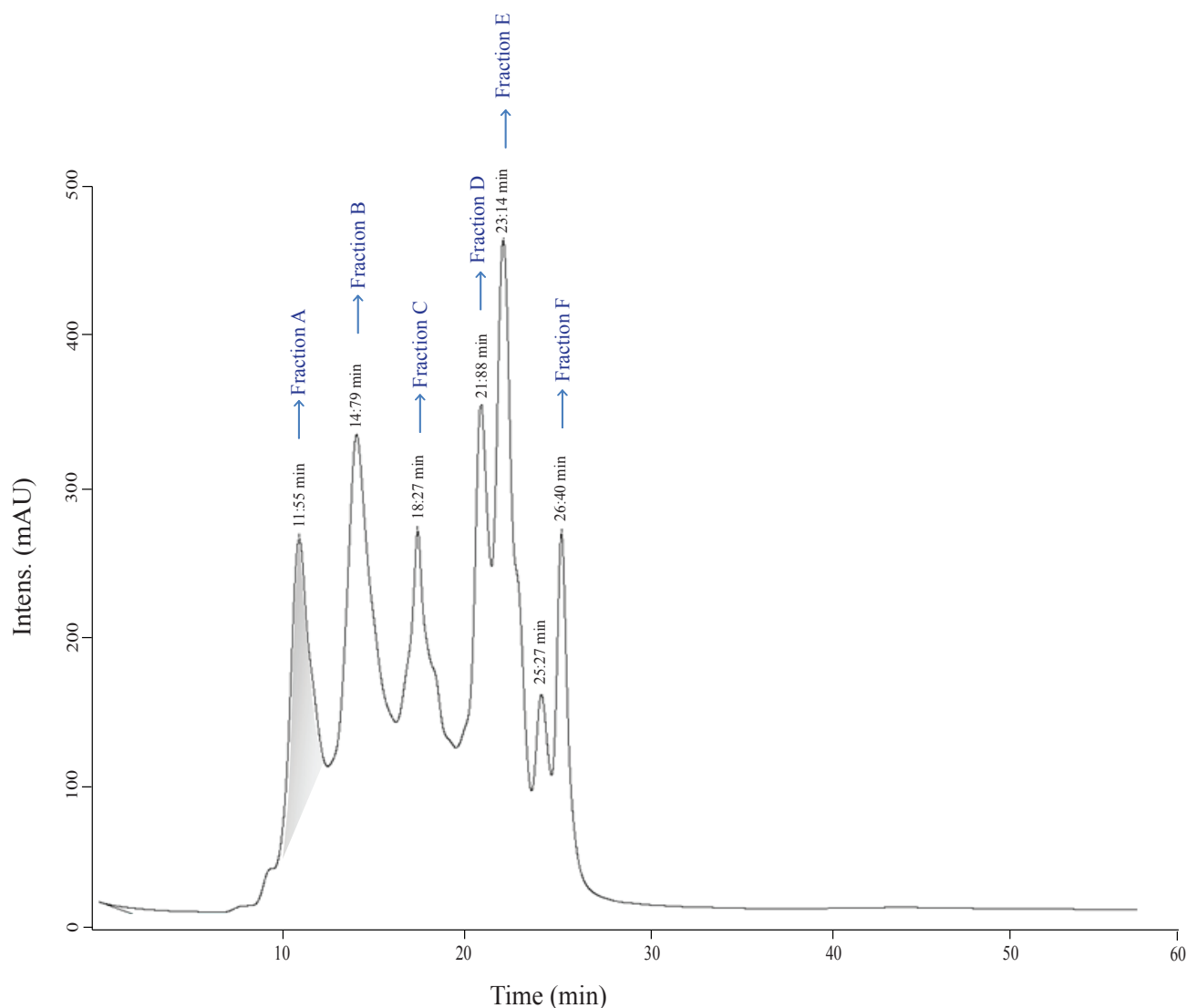


Fig. (1). SE chromatogram. The absorbance was measured at 280 nm. The retention time of each peak obtained is indicated in min. Each peak corresponds in one fraction. The grey-shaded area (peak 1/fraction A) indicates the location of Mb-LAAO using ESI-MS and specific activity assays.

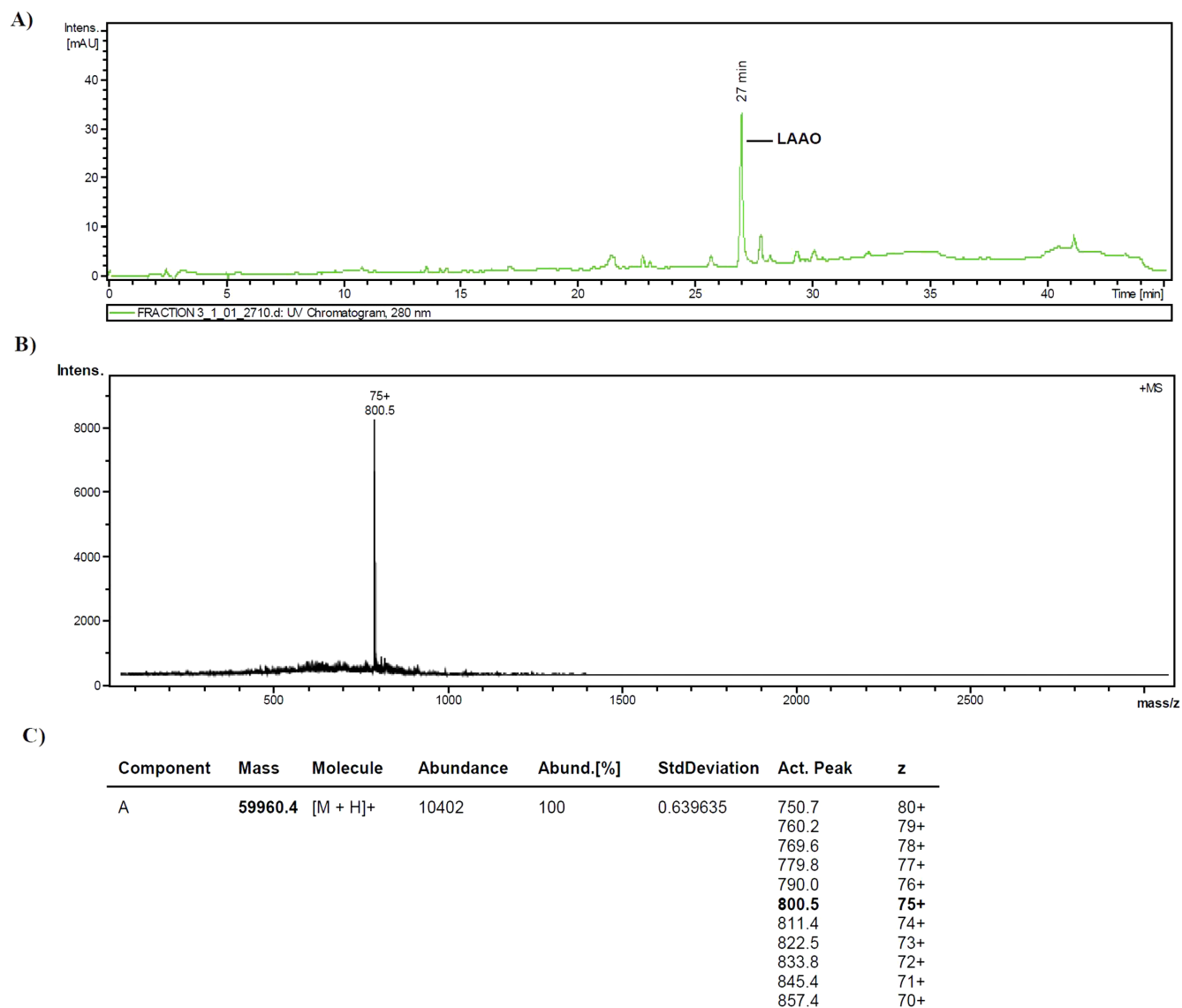


Fig. (2). **A)** Analytical C_{18} reversed-phase profile of peak1/fraction A obtained by Waters 300SW PROTEIN-PAKTM, 7.5x300 mm SEC. The extracted LAAO was eluted at 27 min using a gradient of 0% to 100% ACN in 40 min then 100% water for 5 min at a flow rate of 0.75 ml / min. **B)** ESI mass spectrum (MS) of peak1/fraction A. The peak obtained corresponds to the mass of the protonated ion of LAAO ($M + 75H^+$). **C)** Different characteristics of LAAO's mass value obtained after analysis. They correspond to the molecular weight of LAAO (Mass = 59 960.4 Da), the amplitude of abundance, the percentage of abundance, the standard deviation, the mass values protonated and the number of protons hooked for each one; all correspond to the same molecule: the LAAO.

Comparing a part of these results with previous studies concerning the characterization of snake venoms shows mass matching with the theoretical masses found in the bibliography: Fry *et al.* [16] summarized that the molecular weights found for many LAAOs range from 55 to 59 kDa, in which differences can be observed depending on the procedure used for the determination. In this study, the molecular weight of LAAO was found around 59 kDa belonging to the same range. Nevertheless, others with molecular weight of 2 281 Da and 13 664 Da are supposed to belong to Sarafotoxin and PLA₂ proteins families, respectively (data not shown). Henceforth, definitive assignment of these proteins detected in *M. bornmuelleri*'s venom can only be done through spe-

cific activity study. That's why all fractions collected from SEC were screened for LAAO, hemolytic (on blood agar) and antibacterial activity.

Studies have shown that LAAO is one of the major components of snake venoms, which possess numerous biological functions and is thought to contribute to the toxicity of the venom [17]. LAAO is a classical flavoprotein that catalyzes the oxidative deamination of L-amino acids, converting them into keto-acids, ammonia and hydrogen peroxide (H_2O_2) [6]. Here, LAAO activity was detected in *M. bornmuelleri*'s crude venom and fraction A using L-Leucine as substrate. Table 1 shows the results obtained by the enzymatic activity

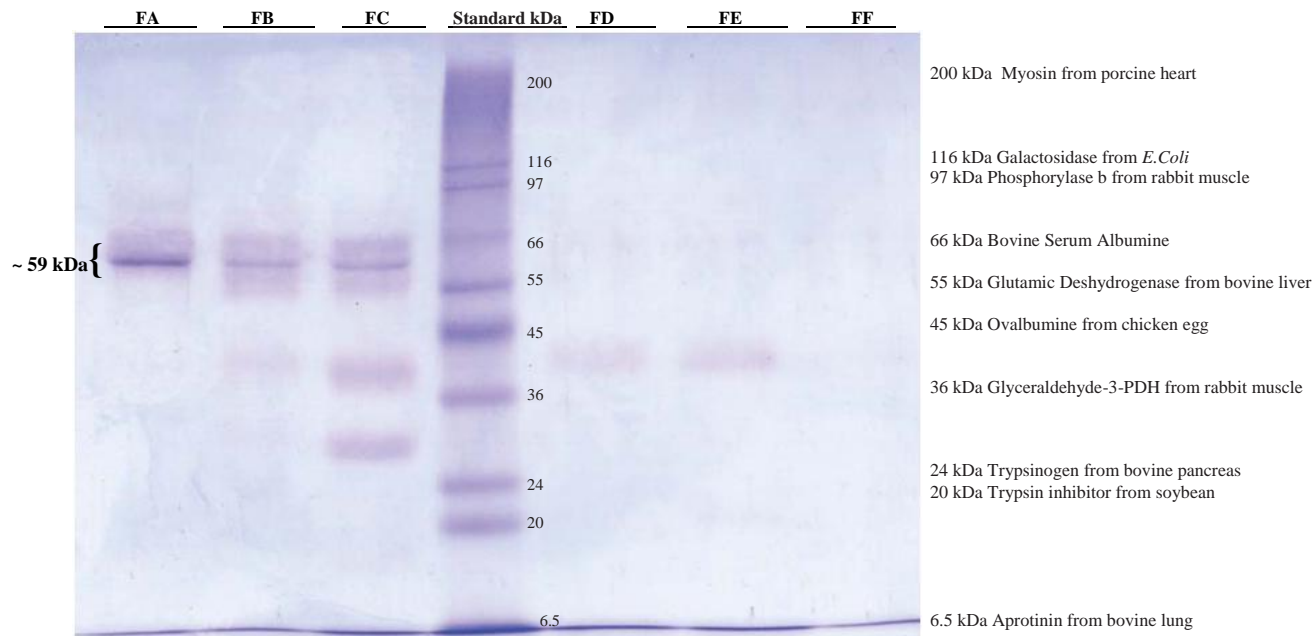


Fig. (3). SDS PAGE profile of the different fractions collected by SEC. From left to right: FA: Fraction A, FB: Fraction B, FC: Fraction C, Standard: Molecular marker, FD: Fraction D, FE: Fraction E and FF: Fraction F. The gel was stained for 15 min with 0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 and destained by 7.5% (v/v) acetic acid.

Table 1. Enzymatic activity testing of the fractions collected by SEC measured using L-Leucine as substrate. A negative control using a placebo having no enzymatic activity is also indicated.

Absorbance	Negative Control	Fraction A Mb-LAAO	Fraction B	Fraction C	Fraction D	Fraction E	Fraction F
To	0.069	0.126	0.148	0.149	0.15	0.177	0.182
T	0.078	0.157	0.135	0.149	0.146	0.145	0.146

testing of the fractions collected by SEC. It shows the presence of an increase in absorbance at 450 nm. Indeed, compared to the other samples and to the control, fraction A was the unique fraction showing an increase in absorbance (0.126 to 0.157) when the sample was added to the L-Leucine indicating the presence of LAAO activity. This result came to assure those obtained with ESI-MS and SDS-PAGE analysis that fraction A contains potential LAAO enzymes.

For the hemolytic test, after 24h of incubation at room temperature, fraction A did not show any hemolytic activity due to the absence of enlightenment around the well containing the sample which is not the case of the positive control which shows a clearly enlightened area (data not shown).

Several studies described the antibacterial activity of snake venoms [18]. In our previous work- accepted for publication in “Frontiers in Toxinology” (2013 Edition, Bentham Science Publishers) - the antibacterial effect of *M. bornmuelleri*'s crude venom was studied. It exhibits large inhibition zones on both gram positive and negative strains.

Based on these data, fractions A to F were assayed for antibacterial activity against two gram-negative bacteria (*M. morgani* and *K. pneumonia*). The results (Table 2) showed that Fractions B, C, D, E and F failed to exhibit any antibacterial activity against the two selected bacteria. However, Fraction A which contains Mb-LAAO as judged by enzymatic activity testing, ESI-MS and SDS-PAGE was the only one able to ban the growth of two gram negative bacteria. A clear zone of inhibition (8 mm) was seen against *M. morgani* followed by 6 mm for *K. pneumoniae*. Compared with imipenem which was used as control, the crude venom of *M. bornmuelleri* demonstrated equally a significant antibacterial activity against the two strains. It exhibits large inhibition zones with a diameter of 19 mm for *M. morgani* and 10 mm for *K. pneumoniae*. These results correlate with other studies concerning the antibacterial activity of LAAO isolated from viper's venom. In a previous study, LAAO isolated from *B. atrox* and *C.s adamanteus* was found to have a strong effect against *S. aureus* and *P. mirabilis* [18].

Table 2. The antibacterial activity of the fractions and the crude venom of *M. bornmuelleri* measured using standard disk-diffusion test on Muller Hinton agar *M. morgani* and *K. pneumoniae*. The Negative (Water/Ammonium acetate) and the Positive control (imipenem antibiotic) are also indicated.

Bacterial strains	Fraction A Mb-LAAO	Fraction B	Fraction C	Fraction D	Fraction E	Fraction F	Crude venom	Negative control	Positive control
<i>M. morgani</i>	8 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	19 mm	0 mm	23 mm
<i>K. pneumoniae</i>	6 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	10 mm	0 mm	30 mm

CONCLUSION

In conclusion, an LAAO enzyme named Mb-LAAO was isolated and partially characterized for the first time from the venom of *M. bornmuelleri*. The isolated Mb-LAAO reveals an oxydase effect that highlights its identity, given that the enzymatic test performed on L-leucine as substrate is a specific test (enzyme/substrate). Mb-LAAO exhibits a considerable antimicrobial effect against *M. morgani* and *K. pneumoniae*. Moreover, any cytotoxic activity against human erythrocytes was observed. This is why this protein deserves further studies leading to the determination of its N-terminal sequence, its mechanism of action and its potential pharmacological applications.

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thanks Dr. Monzer Hamze and Mrs. Taha Abdou and Karim El Soufi for their technical support. We are deeply appreciative to the National Council for Scientific Research (CNRS-Lebanon) and Agence Universitaire de la Francophonie (AUF) for the financial support and the funding of our work.

ABBREVIATIONS

IUCN	=	International union for conservation of nature
LC-ESI-MS	=	Liquid chromatography coupled to electrospray ionisation mass spectrometry
Mb-LAAO	=	L-Amino acid oxidase from <i>Montivipera bornmuelleri</i> , venom
PLA ₂	=	Phospholipase A ₂
RBCs	=	Red blood cells
RP-HPLC	=	Reverse phase high pressure liquid chromatography
SDS-PAGE	=	Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis
SEC	=	Size exclusion chromatography

REFERENCES

- [1] De Menezes, R.R.; Torres, A.F.; Da Silva, T.S.; De Sousa, D.F.; Lima, D.B.; Norjosa, D.B.; Nogueira, N.A.; Oliveira, M.F.; de Oliveira, M.R.; Monteiro, H.S.; Martins, A.M. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothropoides lutzi* venom. *Nat. Prod. Commun.*, **2012**, 7(1), 71-74.
- [2] Evangelista, J.S.; Evangelista, J.J.; Evangelista, I.L.; Nojosa, D.M.; Nascimento, N.R.; Souza, M.H.; Alves, R.S.; Martins, A.M.; Moraes, M.E.; Monteiro, H.S. Hypotensive effects of the *Crotalus durissus cascavella* venom: involvement of NO. *Nat. Prod. Commun.*, **2011**, 6(6), 871-894.
- [3] Koh, D.C.I.; Armugam, A.; Jeyaseelan, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*, **2006**, 63(24), 3030-3041.
- [4] Torres, A.M.; Wong, H.Y.; Desai, M.; Mochhala, S.; Kuchel, P.W.; Kini, R.M. Identification of a novel family of proteins in snake venoms purification and structural characterization of nawaprin from naja nigricollis snake venom. *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278(41), 40097-40104.
- [5] Curti, B.; Ronchi, S.; Simonetta, M.P. Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes, edited by F. Muller, **1992**, USA.
- [6] Du, X.Y.; Clemetson, K.J. Snake venom L-amino acid oxidases. *Toxicon*, **2002**, 40(6), 659-665.
- [7] Stiles, B.G.; Sexton, F.W.; Weinstein, S.A. Antibacterial effects of different snake venoms: Purification and characterization of antibacterial proteins from *Pseudechis australis* (Australian king brown or mulga snake) venom. *Toxicon*, **1991**, 29(9), 1129-1141.
- [8] Zhang, Y.J.; Wang, J.H.; Lee, W.H.; Wang, Q.; Liu, H.; Zheng, Y.T.; Zhang, Y. Molecular characterization of *Trimeresurus stejnegeri* venom L-amino acid oxidase with potential anti-HIV activity. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, **2003**, 309(3), 598-604.
- [9] Suhr, S.M.; Kim, D.S. Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1996**, 224(1), 134-139.
- [10] Suhr, S.M.; Kim, D.S. Comparison of the apoptotic pathways induced by L-amino acid oxidase and hydrogen peroxide. *J. Biochem.*, **1999**, 125(2), 305-309.
- [11] Murakawa, M.; Jung, S.K.; Iijima, K.; Yonehara, S. Apoptosis-inducing protein, AIP, from parasite-infected fish induces apoptosis in mammalian cells by two different molecular mechanisms. *Cell Death Differ.*, **2001**, 8(3), 298-307.
- [12] Hraoui-Bloquet, S.; Sadek, R.; Accary, C.; Hleihel, W.; Fajloun, Z. An ecological study of the lebanon mountain viper *Montivipera bornmuelleri* (Werner, 1898) with a preliminary biochemical characterization of its venom. *Lebanese Sci. J.*, **2012**, 13(1), 89-101.
- [13] The Ultimate Multimedia Guide to the World's Endangered Species. <http://www.arkive.org/>
- [14] Liu, S.; Yang, F.; Zhang, Q.; Sun, M.Z.; Gao, Y.; Shao, S. "Anatomical" view of the protein composition and protein characteristics for *Gloydus shedaoensis* Snake Venom via proteomics approach. *Anat. Rec.*, **2011**, 294(2), 273-282.
- [15] Karthikayalu, S.; Rama, V.; Kirubakaran, R.; Venkatesan, R. Hemolytic toxin from the soft coral *Sarcophyton trocheliophorum*: isolation and physiological characterization. *J. Venom. Anim. Toxin. S.*, **2010**, 16(1), 107-120.
- [16] Fry, B.G.; Wüster, W.; Ramjan, R.; Fadol, S.; Jackson, T.; Martelli, P.; Kini, R.M. Analysis of Colubroidea snake venoms by liquid chromatography with mass spectrometry: evolutionary and toxicological implications. *Rapid Commun. Mass. Sp.*, **2003**, 17(18), 2047-2062.

[17] Samel, M.; Vija, H.; Rönholm, G.; Siigur, J.; Kalkkinen, N.; Siigur, E. Isolation and characterization of an apoptotic and platelet aggregation inhibiting l-amino acid oxidase from *Vipera berus* (common viper) venom. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Proteomics*, **2006**, *1764*(4), 707-714.

[18] Perumal Samy, R.; Gopalakrishnakone, P.; Thwin, M.M.; Chow, T.K.V.; Bow, H.; Yap, E.H.; Thong, T.W.J. Antibacterial activity of snake, scorpion and bee venoms: a comparison with purified venom Phospholipase A2 enzymes. *J. Appl. Microbiol.*, **2007**, *102*(3), 650-659.

Effect of the *Montivipera bornmuelleri* snake venom on human blood: coagulation disorders and hemolytic activities

Claudine Accary^{1,£}, Mohamad Rima^{1,£}, Achraf Kouzayha^{1,2}, Walid Hleihel³, Riyad Sadek⁴, Jean Claude Desfontis⁵, Ziad Fajloun^{1,2,**}, Souad Hraoui-Bloquet^{6,*}

¹ Laboratory of Applied Biotechnology, Azm Center for the Research in Biotechnology and its Application, Doctoral School for Sciences and Technology, Tripoli, Lebanon

² Faculty of Sciences, Biochemistry Department, Section III, Lebanese University, Tripoli, Lebanon

³ Faculty of Medical Science, USEK, Kaslik-Jounieh, Lebanon

⁴ American University, Biology Department, Beirut, Lebanon

⁵ LUNAM, Oniris, Unit of Animal Pathophysiology and Functional Pharmacology, Nantes, France

⁶ Faculty of Sciences II (Fanar), Lebanese University, B.P. 90656 Jdeidet El Maten, Lebanon

[£] Both authors contributed equally to this work

Corresponding Author & Address:

Souad Hraoui-Bloquet*

Faculty of Sciences II (Fanar), Lebanese University, B.P. 90656 Jdeidet El Maten, Lebanon; Phone: +961 1 68 69 83;

Email: sdbloquet@yahoo.com

Ziad Fajloun**

Laboratory of Applied Biotechnology, Azm Center for the Research in Biotechnology and its Applications, Doctoral School for Sciences and Technology, Lebanese University, El Mittein Street, Tripoli, Lebanon; Phone: + 961 6 213 255, Fax: + 961 6 213 383, Email: zfajloun@ul.edu.lb

Published: 9th June, 2014

Accepted: 9th June, 2014

Received: 16th February, 2014

Open Journal of Hematology, 2014, 5-4

© Hraoui-Bloquet and Fajloun et al.; licensee Ross Science Publishers

ROSS Open Access articles will be distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided that the original work will always be cited properly.

Keywords: *M. bornmuelleri*, blood clotting, cytotoxicity, hemolysis, phospholipases A2

ABSTRACT

Viper's venom is a source of biopharmaceutical compounds, hence the need to assess the effect of this animal extract on human blood. Here, we studied the blood coagulation disorders and hemolytic activities of the venom of M. bornmuelleri viper. The pro-coagulant and anticoagulant effects are analyzed with venom concentrations ranging from 0.4 to 0.0031 mg/mL. Thus, the PT is way above the normal value indicating an anticoagulant activity whereas for the aPTT, the high concentration of the venom showed an anticoagulant activity, but a pro-coagulant effect was occurred when the venom concentration decreases to 0.05 and/or 0.025 mg/mL. Hemolytic tests, performed in suspension (30% RBCs) and on blood agar plate (5% RBCs), show that an increased concentration of the venom going until 1.6 mg cannot produce a hemolytic effect, even in the presence of Ca²⁺ (hemolysis < 0.5%). Also, on the blood agar plate no hemolytic area appeared even with 0.04 mg of the lyophilized venom. Otherwise, the venom was able to induce a low hemolytic activity (hemolysis = 1.3 %) by acting on L- α -PC used as substrate. In this case, the destruction of erythrocytes increased proportionally to the added amount of phospholipids which are hydrolyzed to fatty acids and lysophospholipids (two toxic substances for RBCs), probably due to the presence of PLA2 in the venom and which are known by their ability to hydrolyze lecithin

INTRODUCTION

Snake's venom is a complex mixture of proteins, nucleotides and inorganic ions. This combination gives an array of toxicity to the venom, where the peptides and polypeptides are responsible for a variety of toxic properties [1]. The snake crude venom has a wide spectrum of biological activities, such as neurotoxic, cardiotoxic, cytotoxic and antibacterial activity [1-3]. Furthermore, some viper venom components show antitumor and antiangiogenic activities [4]. Due to this broad range of biological functions, the snake venom and its bioactive components have been the subject of many scientific articles in different research fields, including biochemistry, biophysics, toxicology, pharmacology and medicine [1, 5-7].

According to their ability to shorten or prolong the blood clotting process, snake venom proteins that affect blood coagulation can functionally be classified as pro-coagulant or anticoagulant proteins. Pro-coagulant proteins are either serine proteinases or metalloproteinases. They induce blood coagulation either by specifically activating zymogen, one of the blood coagulation factors, or by directly converting soluble fibrinogen into an insoluble fibrin clot [8]. However, those which prolong the blood coagulation process are proteins or glycoproteins. Some of these anticoagulant proteins exhibit enzymatic activities, such as PLA2 and proteinase, whereas others do not exhibit any enzymatic activity. The mechanism of anticoagulant activity of only a few of these proteins is well understood [9]. Thus, venoms of *Crotalidae* and *Viperidae* snakes were considered as complex mixtures of numerous molecules that can possess both pro-coagulant and anticoagulant properties [10-12]. Pro-coagulant molecules, especially from the *Viperidae*, have been used in medical applications and diagnosis such as RVV-factor X activator (RVVX) a well-known pro-coagulant from Russell's viper venom (RVV) useful for measuring a lupus anticoagulant [13].

Moreover, the assessment of the blood effect of snake venoms concerning the coagulopathy and hemolytic activity is not a recent concept. In fact, since 1961, Rosenfeld and collaborators had conducted a study on the hemolytic effects of 29 snake venoms [14]. All

these venoms have shown indirect hemolytic activities except those of *M. frontalis*, *B. cotiara*, *B. jararaca*, *N. naja*, *B. caeruleus* and various other Indian and South American viper venoms which have revealed a more potent hemolytic effect. In 1979, a study was performed on 24 other snakes' venoms for their ability to hemolysis washed human RBCs in the presence of albumin and Ca^{2+} [15]. Except for *Crotalus h. horridus*, all venoms hemolysed the RBCs to a varying degree. The majority of the venoms hydrolyzed membrane phospholipids in the presence or absence of albumin, as long as Ca^{2+} was present. A correlation was found between fatty acid cleaved and hemolytic activities. These results suggested that membrane damage as evidenced by membrane phospholipid splitting is a prerequisite to hemolysis in this system [16].

M. bornmuelleri is one of venomous viper species found in Lebanon. Very little is known about the biology of this endemique and rare species. *M. bornmuelleri* venom has been the subject of some previous studies conducted by our team of researchers [17, 18]. Our earlier results about the characterization of the *M. bornmuelleri* venom demonstrated that it is a complex mixture of proteins and enzymes and, has considerable biological effects such as pro-inflammatory and antibacterial activities. Henceforth, the impact evaluation of *M. bornmuelleri* venom on human blood concerning the coagulation disruption and hemolytic activities, designing the principal aim of this work, seems essential to assess the important exploration of the interest biomolecules presented in this natural extract.

MATERIALS AND METHODS

A. Materials

Venom was manually milked from *M. bornmuelleri* vipers, freeze-dried into crystal shape, and stored at -20°C in a dry, cold and light-free place. In our study, the lyophilized venom was dissolved in PBS to obtain a solution of 20 mg/mL. L- α -PC and Triton X-100 were from Sigma-Aldrich. The calcium chloride was from Riedel-de Haën. The nutrient agar was purchased from Bio-Rad. Pacific Hemostasis Thromboplastin-DS, Pacific Hemostasis aPTT XL, Pacific Hemostasis Calcium Chloride reagents were obtained from

Fisher Diagnostics Company. The products: Collagen/EPI and Collagen ADP cartridges were purchased from Siemens Healthcare Diagnostics.

B. Methods

1. Human plasma coagulation effect

PT and aPTT tests were performed in a certificated medical laboratory using Behring coagulation system according to the manufacturer's instructions. Freshly aspirated blood from healthy volunteer who had not taken any drugs for at least 2 weeks prior to sampling was collected in 3.2% sodium citrate tube and used directly. Samples were centrifuged for 10 min at 4000 rpm, and the plasma was recuperated. Venom was mixed to the plasma to get a range of concentrations of 0.5, 0.25, 0.125, 0.05, 0.025 mg/mL. PT test was performed on plasma 100µL incubated for 1min at 37°C. Coagulation is initiated by addition of 200 µL of Pacific Hemostasis Thromboplastin-DS reagent. Results are expressed as the time needed for clot formation. Positive and negative controls were used to evaluate the results obtained in the presence of the venom. For the realization of aPTT test, 100 µL of plasma were mixed to 100 µL of Pacific Hemostasis aPTT-XL reagent and incubated 2 min at 37°C. Coagulation is initiated by adding 100 µL of calcium chloride. The time needed for clot formation is called activated partial thromboplastin time.

2. Hemolytic activity

2.1. Direct hemolytic activity: The toxicity of the *M. bornmuelleri* venom on RBCs was evaluated using fresh human blood. Blood was collected aseptically from healthy volunteers into tubes treated with EDTA and centrifuged at 3000 rpm for 5 min. The supernatant was discarded and the pellet containing RBCs were washed thrice with PBS by repeated centrifugation at 3000 rpm for 5 min. Thereafter, thirty percent RBCs suspension was prepared and a volume of 300 µL was taken in each tube and treated with different amounts of a solution of venom (20 mg/ml). The tube considered as positive control contains 200 µL of distilled

water and 100 µL of RBCs, whereas the negative control contains 200 µL of PBS and 100 µL of RBC. All tubes were then incubated at 4°C for 30 min and centrifuged at 3000 rpm for 5 min. Absorbance of the supernatants were measured at 540 nm and the values obtained with the positive control represented a 100% hemolysis. The percentage of hemolysis was then calculated using the following formula:

$$\% \text{ Hemolysis} = \left[\frac{A_{\text{Tube}} - A_{\text{negative control}}}{A_{\text{positive control}}} \right] \times 100$$

2.2. Hemolytic activity on human blood agar plate: Human blood agar plates were prepared by adding 5 mL of RBCs to 95 mL of sterile nutrient agar aseptically and the solution was poured immediately into the Petri dishes. After solidification, the wells are cut into the agar (6 mm diameter) then loaded with 20 µL of test solutions with different concentrations of *M. bornmuelleri* venom. The plates were observed for hemolysis after 24 h of incubation at room temperature.

2.3. Hemolytic activity in the presence of divalent ions (Ca^{2+}): In this experiment, calcium ions (20 mM) were incubated with the test solutions of *M. bornmuelleri* venom for evaluating their effects on erythrocyte lysis. 2.9 mg of $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ were dissolved in 1 mL of PBS, the resulting solution were used for the preparation of the RBCs suspension (30% V/V). After treatment with different amounts of venom test solutions, the tubes were incubated and centrifuged as described earlier, and the degree of hemolysis was calculated after measuring the absorbance of the released hemoglobin into the supernatant at 540 nm. In this case, the tube considered as positive control contains 200 µL of distilled water and 100 µL of RBCs, whereas the negative control contains 200 µL of PBS and 100 µL of RBCs in the presence of CaCl_2 .

3. Indirect hemolytic activity

Indirect hemolysis involves the conversion of lecithin to lysolecithin and

fatty acids, which are known to induce hemolysis of erythrocytes. Erythrocyte suspensions were incubated with different amounts of venom samples in the presence of 30 µg/mL lecithin and 1.25 mM CaCl₂. The tubes were then incubated and centrifuged as described earlier, and the degree of hemolysis was calculated after measuring the absorbance of the supernatant at 540 nm.

Table 1: Prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT) performed using Behring coagulation system.

<i>M. bornmuelleri</i> venom concentrations [mg/mL]	PT in seconds	aPTT in seconds
Standard	13	25-40
Control	12.5	33.4
0.4	> 200	> 150
0.2	> 200	> 150
0.1	> 200	> 150
0.05	> 200	16.9
0.025	51.5	18.6
0.0125	31.3	22.6
0.00625	31.3	26.8
0.003125	26.5	34.2

RESULTS AND DISCUSSION

1. Human plasma coagulation effects

PT and aPTT tests were performed to evaluate the effect of *M. bornmuelleri* venom on the blood coagulation cascade. Results obtained for PT and aPTT tests shown in [Table 1](#) are compared to the standard used for system calibration. For venom concentration ≥ 0.05 mg/mL, there was a total anticoagulation activity in PT test with time exceeding 200 seconds. This effect decreases with a lower concentration of the crude venom, even a concentration of 0.0031 mg/mL still exhibit an anti-coagulant activity. In aPTT test, the venom has shown an anti-coagulant action with high concentration ≥ 0.1 mg/mL but when concentration decreases to 0.05 and 0.025 mg/mL, the clotting time went down the normal value pointing to a pro-coagulant activity of the crude venom of *M. bornmuelleri*. Below these concentrations, the crude venom has no action on blood coagulation and aPTT value returns to normal. The crude venom of *M. bornmuelleri* showed both pro-coagulant and anticoagulant activities with different concentrations; PT and aPTT are both

disrupted suggesting that the defect lies in multiple pathways or in the common pathway of the coagulation cascade.

In general, *Viperidae* venoms mainly cause hemorrhaging and coagulation disorders. Over the years, many toxins affecting blood circulation have been isolated and characterized from various viper venoms [19]. Some affect platelet aggregation, whereas others affect blood coagulation cascade. Venom proteins that affect blood coagulation can be classified as pro-coagulant or anticoagulant proteins based on their ability to shorten or prolong the blood-clotting process [11, 12]. Pro-coagulant proteins are either serine-proteases or metalloproteases [8]. These factors inhibit blood coagulation by different mechanisms. Some of these anti-coagulant proteins exhibit enzymatic activities, such as PLA2 and proteinase, whereas others do not exhibit any enzymatic activity [20, 21]. Moreover, Dambisya et al. (1994) discussed previously the presence of numerous molecules in the compound venomous of the *Viperidae* family that can possess both pro-coagulant and anti-coagulant properties [22]. In fact, these authors reported that the different concentrations of *C. hodostoma* (Malayan pit viper) venom showed the dual effects (pro and anti-coagulant). These observations are relevant to our results obtained of the *M. bornmuelleri* venom on the coagulation cascade. In future work, confirmation tests should be done for better analysis and in order to localize the action of the crude venom to certain activation step(s) in the cascade.

2. Hemolytic activity

2.1. Direct hemolytic activity

To evaluate the potential of *M. bornmuelleri* venom to induce hemolysis, 30% suspensions of human RBCs were treated with different amounts of *M. bornmuelleri* venom (1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 40 and 80 µL from initial solution at 20 mg/mL). After incubation at 4°C for 30 min, the tubes were centrifuged and the absorbance of the supernatants was measured at 540 nm. These values were used to determine the percentage of hemolysis in each tube depending on the

amount of venom used. The results, shown in [figure 1](#), prove that the venom has no direct hemolytic activity on a 30% suspension of RBCs. Indeed, we noticed that even when 80 μL of the venom solution were added (equivalent to 1.6 mg of crude venom) the supernatant is clear,

its absorbance is negligible and the percentage of hemolysis is always lower than 1%. These results suggest that the components of the venom cannot act in a direct way on RBCs membrane and therefore induce its hemolysis.

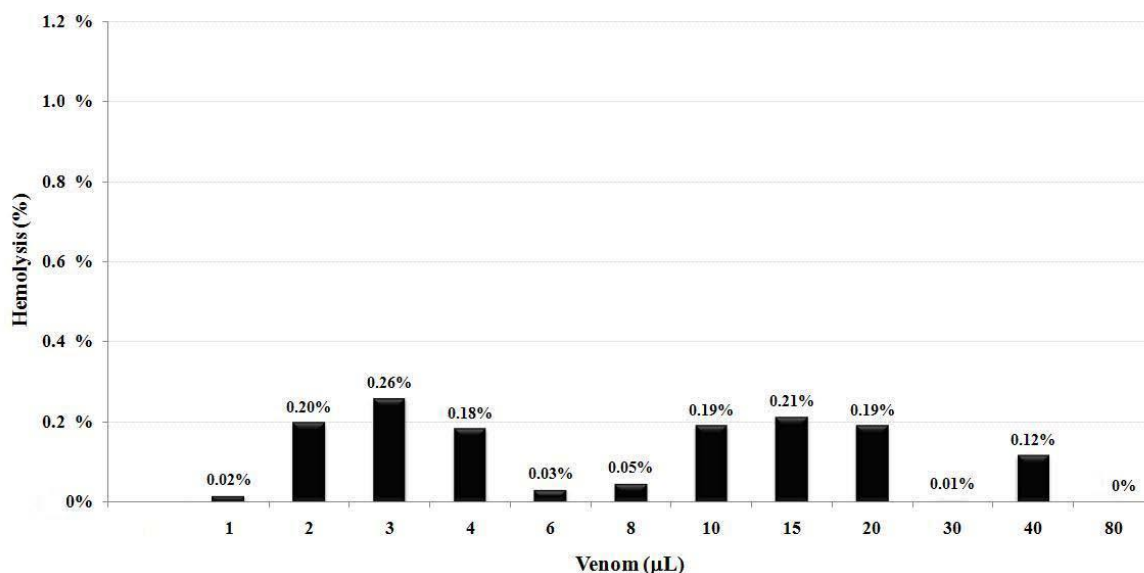


Figure 1: Direct hemolytic activity of the *M. bornmuelleri* venom. Hemolysis was determined by an absorbance reading at 540 nm after treating the RBC suspension with 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30, 40 and 80 μL of the venom solution (concentrated at 20 mg/mL) and compared to hemolysis achieved with water (reference for 100% hemolysis). The data are means of triplicate experiments.

Since our principal aim is to study the *M. bornmuelleri* venom for the development of new biopharmaceutical compounds, it is necessary that this natural extract don't affect human cells, particularly the RBCs. Indeed, it is now important to mention that our observations, demonstrating *-in vitro-* the absence of the direct hemolytic activity, could be considered as sensitive results to express the degree of cytotoxicity of any substance derived from the *M. bornmuelleri* venom. This idea is supported by some previous studies showing that the neutralization of the hemolytic power of the animal venom tested on rabbit, sheep, or human erythrocytes seems to correlate with the neutralization of venom lethality in mice [23, 24].

2.2. Hemolytic activity on human blood agar plate

Another test was conducted to

evaluate the hemolytic activity using Petri dishes containing nutrient agar supplemented by RBCs (5%). However, it allows the assessment of hemolysis that appears as an easily visible light area on the agar. 20 μL of the crude venom (from initial concentration at 20 mg/mL), 20 μL of Triton X-100 (positive control) and 20 μL of PBS have been introduced into the wells dug in the agar. Results represented in [figure 2](#) were observed after 24h of incubation at room temperature. They show an absence of enlightenment around the well containing the venom. Therefore, the absence of hemolytic activity was further confirmed also on blood agar plate, while 40 μg of *M. bornmuelleri* venom didn't show any hemolytic halo. This proves that this venom under these conditions, does not exercise any hemolytic effect, which isn't the case of the positive control which shows a clearly enlightened area.



Figure 2: Hemolytic activity of the *M. bornmuelleri* venom on blood agar plate. E: control (PBS buffer, pH 7.4), T: Triton X-100, V: crude venom

2.3. Hemolytic activity in the presence of divalent ions (Ca^{2+})

Most snake venoms contain phospholipases that hydrolyze free or membrane phospholipids into fatty acids and lysophospholipids. Some of these PLA2 require Ca^{2+} for their activity [4], that's why the hemolytic activity of *M. bornmuelleri* venom was tested in the presence of Ca^{2+} at a concentration of 20 mM. Results obtained didn't differ from the previous one demonstrating that even in the presence of Ca^{2+} , the hemolysis was similar or lower the negative control (data not shown). It's well known that these divalent ions play an important role in hemolysis by increasing the activity of several hemolytic toxins [25], that's why the absence of hemolysis even in presence of Ca^{2+} justify our previous results saying that *M. bornmuelleri* venom is unable to induce direct hemolysis.

3. Indirect hemolytic activity

Hemolytic activities observed with animal venoms can be categorized into two groups: those which lyse erythrocytes directly or indirectly (i.e., requiring the presence of lecithin or free fatty acids) in order to induce hemolysis [26]. In this case, phospholipases cannot act on membrane phospholipids but

induce hemolysis by lysophospholipids known by their surfactant power.

Since *M. bornmuelleri* venom didn't show any direct hemolytic activity under previous conditions, it was necessary to study the possible indirect hemolytic activity. In the presence of lecithin (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and CaCl_2 (1.25 mM), RBCs suspension was treated with 10, 20, 40 and 80 μL of the venom solution (concentration at 20 mg/mL). The result shows that the percentage of hemolysis increases in a dose-dependent manner, contrary to previous tests (Figure 3).

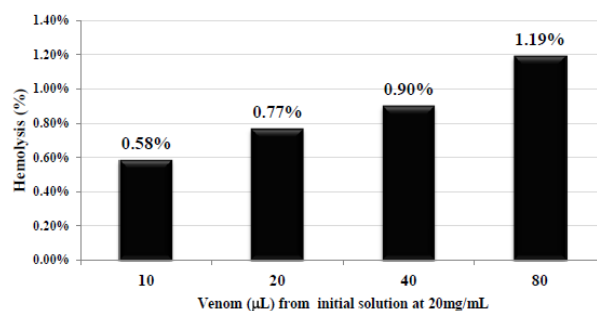


Figure 3: Indirect hemolytic activity of the *M. bornmuelleri* venom. Hemolysis was determined by an absorbance reading at 540 nm, after treating the RBC suspension with 10, 20, 40 and 80 μL of the venom solution (concentrated at 20 mg/mL) in presence of lecithin (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and CaCl_2 (1.25 mM), and compared to hemolysis achieved with water (reference for 100% hemolysis). The data are means of triplicate experiments.

This augmentation is significant; it reaches 1.2 % after the addition of 80 μL of venom, on the other side the maximum percentage of lysed RBCs has not exceeded 0.3 % in the previous tests. These results could be explained by the presence of PLA2 able to hydrolyze free lecithin but unable to induce direct hemolysis. In fact, PLA2 are enzymes that hydrolyze the sn-2 ester bond of phospholipids, and are abundant in the venoms of snakes and insects as well as in mammalian pancreatic juices. It is well known that PLA2 in snake venom are associated with various pathological symptoms in poisonings. Our findings could be compared to the hemolytic activity of the purified PLA2 from crown-of-thorns starfish *A. planci* spines venom against sheep erythrocytes: In the presence of PC, PLA2 caused hemolysis at a much higher level than in the absence of PC, suggesting that purified PLA2s from *A. planci*

venom were very weak as to direct hemolysis, but exhibited indirect hemolytic activity [27].

Compared to other vipers, *V. palestinae* and *V. russellii* venoms showed the presence of PLA2, which is inefficient in inducing neither lysis nor substantial phospholipid splitting of washed erythrocytes, unless it was fortified with the direct lytic factor fraction derived from Cobra venom. Actually the synergy between cytotoxin and phospholipase is noticed and their cross-contamination induced a significant increase in the cytolytic power of one or the other [23, 28].

Also, PLA2 fractions (phosphatide acyl-hydrolase, EC 3.1.14) isolated from the Cobra venoms were devoid of hemolytic activity and caused no significant breakdown of phospholipids in the intact erythrocytes. Another protein component derived from the same venoms (the direct lytic factor) was weakly hemolytic but showed no phospholipase activity. The two fractions, when combined, produced strong hemolysis and concomitant hydrolysis of erythrocyte phospholipids to lysophospholipids [28].

CONCLUSION

In this study, we demonstrated the dual effect of *M. bornmuelleri* venom on human blood coagulation. Thus, the venom showed -pro- or anti-coagulant activities at different concentrations; extrinsic and intrinsic pathways are both disrupted suggesting that the defect lies in multiple pathways or in the common pathway of the coagulation cascade.

We also showed that *M. bornmuelleri* venom does not induce direct hemolysis of a 30% suspension of RBCs even in the presence of 1.6 mg of lyophilized venom. Contrariwise, hemolytic

activity is recorded in case where the lecithin is added to the suspension. This activity increases proportionally to the added amount of venom it refers to the presence of PLA2 known by their ability to hydrolyze lecithin. On the other side, the absence of cytotoxins or other components known as direct lytic factor could explain the lack of direct hemolytic activity. Finally, *M. bornmuelleri* venom is still not extensively explored and further investigated on its component may be a useful tool for a better understanding of its action mechanism and may lead to a new range of molecules with pharmaceutical interest.

ABBREVIATIONS

PT – Prothrombine Time

aPTT – activated Partial Thromboplastine Time

PLA2 – Phospholipase A2

L- α -PC – L- α -Phosphatidylcholine

RBCs – Red Blood Cells

PBS – Phosphate Buffered Saline

EDTA – Ethylene Diamine Tetraacetic Acid

EC 3.1.14 – Enzyme Commission number

CONFLICT OF INTEREST

No conflict of interest about this work

ACKNOWLEDGEMENT

We would like to thank Dr. Wissam Mansour and Mrs Jiana Al Masri for their technical supports. We are deeply appreciative to the National Council for Scientific Research (CNRS-Lebanon) and Francophone University Agency (AUF) for the financial support and the funding of our work.


REFERENCES

- [1] Koh DCI, Armugam A, Jeyaseelan K. Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cell Mol Life Sci.* **2006**; 63: 3030-41. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-006-6315-0>
- [2] Doley R, Kini RM. Protein complexes in snake venom. *Cell Mol Life Sci.* **2009**; 66: 2851-71. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-009-0050-2>
- [3] Perumal Samy R, Gopalakrishnakone P, Thwin MM, Chow TKV, Bow H, Yap EH, Thong TWJ.

- Antibacterial activity of snake, scorpion and bee venoms: a comparison with purified venom phospholipase A2 enzymes. *J Appl Microbiol.* **2007**; 102: 650-9.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03161.x>
- [4] Zouari-Kessentini R, Srairi-Abid N, Bazaa A, El Ayeb M, Luis J, Marrakchi N. Antitumoral Potential of Tunisian Snake Venoms Secreted Phospholipases A2. *Biomed Res Int.* **2013**; 2013: 391389.
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/391389>
- [5] El-Refael MF, Sarkar NH. Snake venom inhibits the growth of mouse mammary tumor cells in vitro and invivo. *Toxicon.* **2009**; 54: 33-41.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.03.017>
- [6] Guimarães-Gomes V, Oliveira-Carvalho AL, Junqueira-de-Azevedo IL, S Dutra DL, Pujol-Luz M, Castro HC, Ho PL, Zingali RB. Cloning, characterization, and structural analysis of a C-type lectin from *Bothrops insularis* (BiL) venom. *Arch Biochem Biophys.* **2004**; 432: 1-11.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2004.08.018>
- [7] Stocker K. Use of snake venom proteins in medicine. *Schweiz Med Wochenschr.* **1999**; 129: 205.
- [8] Kini RM, Rao VS, Joseph JS. Pro-coagulant proteins from snake venoms. *Haemostasis.* **2001**; 31: 218-24.
- [9] Kornalik F. The influence of snake venom proteins on blood coagulation. In: Harvey AL, editor. *Snake Toxins*. New York: Pergamon Press. **1991**; pp. 323-383.
- [10] Braud S, Bon C, Wisner A. Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie.* **2000**; 82: 851-9.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0300-9084\(00\)01178-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0300-9084(00)01178-0)
- [11] Matsui T, Fujimura Y, Titani K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochim Biophys Acta.* **2000**; 1477: 146-56.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0167-4838\(99\)00268-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00268-X)
- [12] White J. Snake venoms and coagulopathy. *Toxicon.* **2005**; 45: 951-67.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.030>
- [13] Derksen RH, de Groot PG. Tests for lupus anticoagulant revisited. *Thromb Res.* **2004**; 114: 521-6.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2004.06.009>
- [14] Rosenfeld G, Kelen EMA, Nudel F. Hemolytic Activity of Animal Venoms. I. Classification in Different Types and Activities. *Memorias do Instituto Butantan.* **1960**; 30: 117-32.
- [15] Condrea E. Hemolytic effects of snake venoms. In: Snake venoms. *Handbook of Experimental Pharmacology.* **1979**; 52: 448-79.
- [16] Tu AT, Homma M, Hong BS. Hemorrhagic, myonecrotic, thrombotic and proteolytic activities of viper venoms. *Toxicon.* **1969**; 6: 175-8.
[http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101\(69\)90117-2](http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101(69)90117-2)
- [17] Hraoui-Bloquet S, Sadek R, Accary C, Hleihel W, Fajloun Z. An ecological study of the montane *Montivipera bornmuelleri* (Werner,1898) viper including preliminary biochemical characterization of venom. *Lebanese Science Journal.* **2012**; 13: 89-101.
- [18] Accary C, Souad Hraoui-Bloquet S, Hamze M, Sadek R, Hleihel W, Desfontis JC, Fajloun Z. Preliminary proteomic analysis and biological characterization of the crude venom of *Montivipera bornmuelleri*; a viper from Lebanon. *Frontiers in Toxicology.* **2013**; In press.
- [19] Suntravat M, Nuchprayoon I, Pérez JC. Comparative study of anti-coagulant and pro-coagulant properties of 28 snake venoms from families Elapidae, Viperidae, and purified Russell's viper venom-factor X activator(RVV-X). *Toxicon.* **2010**; 56: 544-53.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.05.012>
- [20] Meier J, Stocker K. Effects of snake venoms on hemostasis. *Crit Rev Toxicol.* **1991**; 21: 171-82.
<http://dx.doi.org/10.3109/10408449109089878>
- [21] Kornalik F. The influence of snake venom proteins on blood coagulation. In: Harvey AL. (ed.) *Snake Toxins*. **1991**; Pergamon Press, New York, pp 323-383.
- [22] Dambisya YM, Lee TL, Gopalakrishnakone P. Action of *Calloselas marhodostoma* (Malayan pit viper) venom on human blood coagulation and fibrinolysis using computerized thromboelastography (CTEG). *Toxicon.* **1994**; 32: 1619-26.
[http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)90320-4](http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101(94)90320-4)
- [23] Chippaux JP. Venins de serpent et envenimations. *IRD Orstom.* **2002**.
- [24] Maček P, Belmonte G, Pederzoli C, Menestrina G. Mechanism of action of equinatoxin II, a cytolytic venom from the sea anemone *Actinia equine* L. belonging to the family of actinoporins. *Toxicology.* **1994**; 87: 205-27.
[http://dx.doi.org/10.1016/0300-483X\(94\)90252-6](http://dx.doi.org/10.1016/0300-483X(94)90252-6)
- [25] Celedón G1, González G, Lissi E, Cerda T, Martínez D, Soto C, Pupo M, Pazos F, Lanio ME, Alvarez C. Effect of calcium on the hemolytic activity of *Stichodactyla helianthus* toxin sticholysin II on human erythrocytes. *Toxicon.* **2009**; 54: 845-50.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.06.017>
- [26] Rosenfeld G, Kelen EMA, Nudel F. Hemolytic Activity of Animal Venoms. I. Classification in Different Types and Activities. *Memorias do Instituto Butantan.* **1960**; 30: 117-32.
- [27] Lee CC, Tsai WS, Hsieh HJ, Hwang DF. Hemolytic activity of venom from crown-of-thorns starfish *Acanthaster planci* spines. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* **2013**; 19: 22.
<http://dx.doi.org/10.1186/1678-9199-19-22>

[28] Condrea E, De Vries A, Mager J. Hemolysis and splitting of human erythrocyte phospholipids by

snake venoms. *Biochim Biophys Acta*. 1964; 84: 60-73.

 Publish with **ROSS Science Publishers** and every scientist can easily read your work for free!

Your research papers will be:

- available for free to the entire scientific community
- peer reviewed and published immediately after acceptance
- cited in renowned open repositories upon indexation of the journal
- owned by yourself — author keeps the copyright

