



HAL
open science

Caractérisation fonctionnelle de formes mutées du récepteur des dihydropyridines responsables de Paralysie Périodique Hypokaliémique de type 1

Clarisse Fuster

► **To cite this version:**

Clarisse Fuster. Caractérisation fonctionnelle de formes mutées du récepteur des dihydropyridines responsables de Paralysie Périodique Hypokaliémique de type 1. Physiologie [q-bio.TO]. Université de Lyon, 2017. Français. NNT : 2017LYSE1268 . tel-01717926

HAL Id: tel-01717926

<https://theses.hal.science/tel-01717926>

Submitted on 26 Feb 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.



N°d'ordre NNT : 2017LYSE1268

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée à
L'Université Claude Bernard Lyon 1

EDISS ED205
Ecole Doctorale Interdisciplinaire Science et Santé

Spécialité de doctorat :
Discipline : Physiologie

Soutenue publiquement le 08/12/2017 par :

Clarisse FUSTER

Caractérisation fonctionnelle de formes mutées du
récepteur des dihydropyridines responsables de
Paralysie Périodique Hypokaliémique de type 1

Devant le jury composé de :

CHARNET, Pierre
NICOLE, Sophie
VIVAUDOU, Michel
JOSPIN, Maëlle

Directeur de recherche
Chargée de recherche
Directeur de recherche
Maître de conférences

Président du jury
Rapporteuse
Rapporteur
Examinatrice

ALLARD, Bruno

Professeur des Universités

Directeur de thèse



N°d'ordre NNT : 2017LYSE1268

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
L'Université Claude Bernard Lyon 1

EDISS ED205
Ecole Doctorale Interdisciplinaire Science et Santé

Spécialité de doctorat :
Discipline : Physiologie

Soutenue publiquement le 08/12/2017 par :

Clarisse FUSTER

Caractérisation fonctionnelle de formes mutées du
récepteur des dihydropyridines responsables de
Paralysie Périodique Hypokaliémique de type 1

Devant le jury composé de :

CHARNET, Pierre
NICOLE, Sophie
VIVAUDOU, Michel
JOSPIN, Maëlle

Directeur de recherche
Chargée de recherche
Directeur de recherche
Maître de conférences

Président du jury
Rapporteuse
Rapporteur
Examinatrice

ALLARD, Bruno

Professeur des Universités

Directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E. PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

Préambule

Mes travaux de thèse ont été réalisés sous la direction de Bruno Allard dans le laboratoire du Centre de Génétique et de Physiologie Moléculaire et Cellulaire (UMR CNRS 5534 – Université Lyon 1) puis dans l'Institut NeuroMyoGene (UMR CNRS 5310 – INSERM U1217 – Université Lyon 1). J'ai obtenu en 2014 une allocation de recherche du Ministère de l'Enseignement Supérieur à l'issue du concours annuel de l'Ecole Doctorale Interdisciplinaire Science-Santé (ED 205). J'ai aussi bénéficié d'un contrat d'activité d'enseignement complémentaire de 2014 à 2017 à l'Université Lyon 1. Enfin, j'ai obtenu un poste à mi-temps pour l'année 2017-2018 en tant qu'Attachée Temporaire d'Enseignement et de Recherche à l'Université Lyon 1.

Mes travaux réalisés au laboratoire ont donné lieu aux productions scientifiques suivantes :

Publications :

Zanou N, Mondin L, **Fuster** C, Seghers F, Dufour I, Clippele M, Schakman O, Tajeddine N, Iwata Y, Wakabayashi S, Voets T, Allard B and Gailly P. **2015**. Osmosensation in TRPV2 dominant negative expressing skeletal muscle fibres. *Journal of Physiology*, 593 : 3849-3863.

Fuster C, Perrot J, Berthier C, Jacquemond V and Allard B, **2017**. Elevated resting H⁺ current in the R1239H type 1 Hypokalemic Periodic Paralysis mutated Ca²⁺ channel. *Journal of Physiology*, 595 : 6417-6428.

Fuster C, Perrot J, Berthier C, Jacquemond V, Charnet P and Allard B. **2017**. Na leak with gating pore properties in hypokalemic periodic paralysis V876E mutant muscle Ca channel. *Journal of General Physiology*, doi: 10.1085/jgp.201711834.

Allard B and **Fuster** C. When closed Ca²⁺ channels carry H⁺: insights into the pathophysiology of type 1 hypokalemic periodic paralysis. *Journal of Physiology*, revue soumise sur invitation.

Affiches de congrès

1^{ier} Prix poster :

14^{ième} Journée de la Société Française de Myologie, Bordeaux, 23 au 25 novembre 2016

“Investigation of calcium current properties and leak conductance in mouse muscle fibers expressing the type 1 Hypokalemic Periodic Paralysis V876E mutant calcium channel” *Clarisse Fuster, Jimmy Perrot, Christine Berthier, Vincent Jacquemond, Bruno Allard*

Posters :

Journée des Doctorants de Lyon-Est, Lyon, 20 décembre 2016

“Investigation of calcium current properties and leak conductance in mouse muscle fibers expressing the type 1 Hypokalemic Periodic Paralysis V876E mutant calcium channel” *Clarisse Fuster, Jimmy Perrot, Christine Berthier, Vincent Jacquemond, Bruno Allard*

Journée de l'EDISS (Ecole Doctorale de Lyon), Lyon, 13 octobre 2016

“Investigation of calcium current properties and leak conductance in mouse muscle fibers expressing the type 1 Hypokalemic Periodic Paralysis V876E mutant calcium channel” *Clarisse Fuster, Jimmy Perrot, Christine Berthier, Vincent Jacquemond, Bruno Allard*

Congrès European Muscle Conference, Montpellier, 2 au 6 septembre 2016, S13.O5 -165

“Investigation of calcium current properties and leak conductance in mouse muscle fibers expressing the type 1 Hypokalemic Periodic Paralysis V876E mutant calcium channel” *Clarisse Fuster, Jimmy Perrot, Christine Berthier, Vincent Jacquemond, Bruno Allard*

Institut NeuroMyoGène, Aussois, 13 et 14 juin 2016

“Investigation of Ca²⁺ current properties and leak conductance in mouse muscle fibers overexpressing a type 1 Hypokalemic Periodic Paralysis mutant Ca²⁺ channel: possible role of external acidification in paralysis” *Clarisse Fuster, Jimmy Perrot, Christine Berthier, Vincent Jacquemond, Bruno Allard*

Congrès Channelopathy Meeting, Paris, 15 au 17 juin 2016

“Investigation of Ca²⁺ current properties and leak conductance in mouse muscle fibers overexpressing a type 1 Hypokalemic Periodic Paralysis mutant Ca²⁺ channel: possible role of external acidification in paralysis” *Clarisse Fuster, Jimmy Perrot, Christine Berthier, Vincent Jacquemond, Bruno Allard*

Congrès Myology, Lyon, 14 au 18 Mars 2016

“Investigation of Ca²⁺ current properties and leak conductance in mouse muscle fibers overexpressing a type 1 Hypokalemic Periodic Paralysis mutant Ca²⁺ channel: possible role of external acidification in paralysis” *Clarisse Fuster, Jimmy Perrot, Christine Berthier, Vincent Jacquemond, Bruno Allard*

Congrès Biophysical Society, Los Angeles, 27 février au 2 mars 2016, 2220-Pos Board B364

“Investigation of Ca²⁺ current properties and leak conductance in mouse muscle fibers overexpressing a type 1 Hypokalemic Periodic Paralysis mutant Ca²⁺ channel: possible role of external acidification in paralysis” *Clarisse Fuster, Jimmy Perrot, Christine Berthier, Vincent Jacquemond, Bruno Allard*

Présentations orales :

Séminaire Institut NeuroMyoGène, Lyon, 4 octobre 2016

“Ca²⁺ current properties and leak conductance in mouse muscle fibers expressing a type 1 Hypokalemic Periodic Paralysis mutant Ca²⁺ channel: possible role of external acidification in paralysis” *Clarisse Fuster, Jimmy Perrot, Christine Berthier, Vincent Jacquemond, Bruno Allard*

13^{ième} Journée de la Société Française de Myologie, Lyon, 23 au 25 novembre 2015

“Caractérisation fonctionnelle de formes mutées du récepteur des dihydropyridines responsables de Paralysie Périodique Hypokaliémique de type 1” *Clarisse Fuster, Jimmy Perrot, Christine Berthier, Vincent Jacquemond, Bruno Allard*

Journée de l'EDISS, Lyon, 15 octobre 2015

“Caractérisation fonctionnelle de formes mutées du récepteur des dihydropyridines responsables de Paralysie Périodique Hypokaliémique de type 1” *Clarisse Fuster, Jimmy Perrot, Christine Berthier, Vincent Jacquemond, Bruno Allard*

Résumé

Caractérisation fonctionnelle de formes mutées du récepteur des dihydropyridines responsables de Paralysie Périodique Hypokaliémique de type 1

La Paralysie Périodique Hypokaliémique de type 1 (HypoPP1) est une myopathie d'origine génétique, autosomique dominante, caractérisées par des épisodes de paralysies musculaires récurrentes pouvant durer quelques heures à quelques jours. Ces crises de paralysies sont accompagnées d'une hypokaliémie responsable d'arythmies cardiaques entraînant la mort dans les cas les plus graves. Les crises peuvent être déclenchées par un stress, une alimentation riche en glucides ou encore suite à un exercice physique intense. L'HypoPP1 est liée à une mutation dans le gène *CACNA1S* codant la sous-unité principale du canal calcique musculaire ($Ca_v1.1$). A l'exception d'une, toutes les mutations HypoPP1 conduisent au remplacement d'une des arginines les plus externes d'un des segments détecteurs de potentiel du canal, nommés S4, par un acide aminé neutre. Des études réalisées dans des modèles d'expression hétérologue de canaux potassiques ou sodiques, dont les structures sont très proches du $Ca_v1.1$, ont montré que des mutations similaires à l'HypoPP1 conduisaient à la création d'une voie de passage ionique dite "accessoire" au travers du domaine détecteur de potentiel générant un courant cationique entrant au potentiel de repos. Si une telle voie de passage ionique existe à travers $Ca_v1.1$ dans les cellules musculaires des patients souffrant d'HypoPP1, elle pourrait ainsi induire une dépolarisation des cellules musculaires au point de les rendre inexcitables, conduisant ainsi à la paralysie.

Mon travail a consisté à étudier les formes R1239H et V876E du $Ca_v1.1$ responsables d'HypoPP1 afin de déterminer si une telle voie de passage accessoire est présente dans les canaux calciques mutés. La mutation R1239H correspond à la substitution d'une histidine à la seconde arginine dans le segment S4 du domaine IV tandis que la mutation V876E présente la particularité de ne pas affecter un S4 mais un segment S3 dans le domaine III. Ce travail s'appuie sur l'expression *in vivo* du gène codant le $Ca_v1.1$ humain sain (WT) ou muté R1239H ou V876E dans les muscles des pattes arrière de souris puis sur l'analyse des mouvements ioniques en combinant des techniques d'électrophysiologie et de mesure des concentrations intracellulaires de H^+ ou de Na^+ par fluorescence sur fibre musculaire isolée.

L'étude de la mutation R1239H a montré qu'un influx de protons générant un courant entrant significativement plus important se développait au potentiel de repos dans les fibres exprimant la mutation en comparaison des cellules exprimant la forme WT. L'étude de la deuxième mutation V876E, sur laquelle aucune donnée fonctionnelle n'était disponible à ce jour, a révélé que cette mutation était elle aussi responsable d'un courant ionique accessoire mais dans ce cas-là porté par les ions Na^+ . Ce résultat est important car il montre que la formation d'un pore ionique accessoire constitue un mécanisme physiopathologique commun à différentes formes d'HypoPP affectant le canal calcique musculaire, y compris lorsque la mutation n'affecte pas directement un segment S4.

Mots-clés : muscle squelettique, $Ca_v1.1$, Paralysie Périodique Hypokaliémique, électrophysiologie, pore accessoire

Institut NeuroMyoGene – UMR 5310 – INSERM U1217

Université Claude Bernard Lyon 1

43 bd du 11 novembre 1918

69622 Villeurbanne cedex

Abstract

Functionnal charaterization of mutated dihydropyridine receptors inducing the type 1 Hypokalemic Periodic Paralysis

The type 1 Hypokalemic Periodic Paralysis (HypoPP1) is a muscle autosomal dominant genetic disease characterized by episodic attacks of paralysis lasting between a few hours to several days. These attacks are associated with hypokalemia which is responsible of cardiac arrhythmias leading to death in worst cases. Attacks are triggered by stress, high carbohydrate diet or during rest following exercise. HypoPP1 is caused by missense mutations in the gene CACNA1S encoding the main subunit of the voltage-gated calcium channel ($Ca_v1.1$) of skeletal muscle. In all but one, HypoPP1 mutations lead to the replacement of an outermost arginine in one of the voltage sensor segment, called S4, with a neutral amino-acid. Experiments performed with the closely structurally related voltage-gated K^+ and Na^+ channels showed that comparable mutations generate an accessory pathway called gating pore through which a depolarizing current flows at rest. If such an accessory pathway also exists in the skeletal muscle $Ca_v1.1$, it could initiate depolarization of skeletal muscle to the point of inexcitability and could lead to paralysis.

My work aimed at investigating the properties of HypoPP1-associated mutant $Ca_v1.1$ s R1239H and V876E in order to determine if such an accessory pathway is present in mutated $Ca_v1.1$. The R1239H mutation corresponds to the replacement of the second arginine in the S4 segment of domain IV by a histidine and the V876E mutation has the particularity to not affect a S4 segment but the S3 segment in domain III. In this work, we used *in vivo* gene expression of the wild type (WT) or mutated forms of the human $Ca_v1.1$ in the hind limb muscle of mice and analyzed ions fluxes by combining voltage-clamp and measurements of intracellular H^+ or Na^+ by fluorescence. The R1239H mutation was shown to induce a significant larger H^+ influx giving rise to a larger inward H^+ current at rest as compared to WT. The V876E mutation, which had never been investigated so far, was found to induce an elevated inward current at rest but in this case carried by Na^+ ions. These results have relevance because they suggest that the presence of an accessory pathway could be a physiopathological mechanism shared by different HypoPPs, even when the mutation does not directly affect a S4 segment.

Keywords: skeletal muscle, $Ca_v1.1$, Hypokalemic Periodic Paralysis, electrophysiology, gating pore

Institut NeuroMyoGene – UMR 5310 – INSERM U1217

Université Claude Bernard Lyon 1

43 bd du 11 novembre 1918

69622 Villeurbanne cedex

Sommaire

| | |
|---|-----------|
| Introduction | 14 |
| Historique | 16 |
| Chapitre I-Architecture et histo-physiologie du muscle squelettique | 16 |
| I Structure générale du système musculaire squelettique | 16 |
| 1.1 Organisation anatomique du muscle squelettique | 16 |
| 1.2 La fibre musculaire squelettique | 16 |
| 1.2.A Les différents types de fibre musculaire..... | 17 |
| 1.2.B Les fibres musculaires de types I..... | 17 |
| 1.2.C Les fibres musculaires de type II..... | 17 |
| II Ultrastructure de la fibre musculaire squelettique | 18 |
| 2.1 L'appareil contractile | 18 |
| 2.1.A Les myofibrilles..... | 18 |
| 2.1.B Les myofilaments épais et fins..... | 19 |
| 2.2 La contraction musculaire | 20 |
| 2.2.A Théorie du glissement des filaments..... | 20 |
| 2.2.B Rôle de l'ATP et du calcium dans les processus de contraction – relaxation..... | 20 |
| 2.3 Architecture principale du système membranaire | 21 |
| 2.3.A Les tubules transverses..... | 21 |
| 2.3.B Le réticulum sarcoplasmique..... | 21 |
| 2.3.C La triade..... | 21 |

| | |
|---|----|
| Chapitre II-Protéines impliquées dans l'homéostasie ionique des fibres musculaires squelettiques | 22 |
| I Flux ioniques et polarisation de repos | 22 |
| 1.1 La pompe Na^+/K^+ ATPase..... | 23 |
| 1.2 Les canaux potassiques..... | 24 |
| 1.3 Les canaux chlorure..... | 26 |
| 1.4 L'échangeur NKCC1..... | 26 |
| II Flux ioniques et potentiel d'action | 27 |
| 2.1 Les canaux sodium voltage-dépendants..... | 27 |
| 2.2 Les canaux potassium voltage-dépendants..... | 28 |
| III Les mouvements de calcium trans-sarcolemmaux | 30 |
| 3.1 Les voies d'entrée du calcium..... | 30 |
| 3.2 Les voies d'extrusion du calcium..... | 31 |
| IV Les mouvements de protons | 32 |
| 4.1 La lactate/ H^+ | 33 |
| 4.2 L'échangeur Na^+/H^+ | 34 |
| Chapitre III-Couplage Excitation-Contraction | 35 |
| I Le récepteur aux dihydropyridines | 35 |
| 1.1 Architecture moléculaire du DHPR..... | 35 |
| 1.1.A Cav1.1..... | 36 |
| 1.1.B Les sous-unités $\alpha_2\text{-}\delta$ | 37 |

| | |
|---|-----------|
| 1.1.C La sous-unité $\beta 1$ | 37 |
| 1.1.D La sous-unité γ | 37 |
| 1.2 La fonction de détecteur de potentiel du DHPR..... | 38 |
| 1.3 La fonction de canal calcique du DHPR..... | 39 |
| 1.4 Pharmacologie du DHPR..... | 40 |
| II Le récepteur à la ryanodine..... | 40 |
| 2.1 Structure de RyR1..... | 40 |
| 2.2 Régulation de RyR1..... | 41 |
| 2.2.A Régulation par les petites molécules : ATP, Ca^{2+} , Mg^{2+} et H^+ | 41 |
| 2.2.B Pharmacologie de RyR1..... | 41 |
| III Interactions DHPR - RyR1..... | 42 |
| 3.1 Régions d'interaction DHPR-RyR1..... | 42 |
| 3.2 La voltage-dépendance du CEC..... | 43 |
| 3.3 Couplage bidirectionnel entre le DHPR et RyR1..... | 44 |
| IV Repompement du Ca^{2+} par le RS..... | 45 |
| | |
| <i>Chapitre IV-La Paralysie Périodique Hypokaliémique de type 1</i>...46 | |
| I Caractéristiques de la maladie..... | 46 |
| 1.1 Historique..... | 46 |
| 1.2 Sémiologie de la Paralysie Périodique Hypokaliémique de type 1..... | 47 |

| | |
|---|-----------|
| 1.3 Génétique..... | 48 |
| II L'hypokaliémie dans l'HypoPP..... | 49 |
| 2.1 Inexcitabilité membranaire et dépolarisation paradoxale..... | 49 |
| 2.1.A Implication des Kir2.1 et 2.6 dans la dépolarisation membranaire..... | 51 |
| 2.1.B Rôle des KATP et effet de l'insuline dans l'HypoPP..... | 52 |
| III Lien entre la paralysie et le courant oméga ?..... | 53 |
| 3.1 Effet de mutations HypoPP sur le courant calcique de type L..... | 53 |
| 3.2 Effet de mutations HypoPP sur le courant sodique: Na _v 1.4..... | 54 |
| 3.3 Le <i>gating pore current</i> (<i>Gpc</i>)..... | 55 |
| 3.3.A Investigations fondamentales dans le canal K ⁺ VD..... | 55 |
| 3.3.B Investigations fondamentales dans un canal Na ⁺ VD..... | 56 |
| 3.4 Etude du <i>gating pore current</i> dans l'HypoPP2..... | 57 |
| 3.4.A Modèle de souris Transgénique HypoPP2..... | 57 |
| 3.5 Sélectivité ionique, conductance et bloqueurs du <i>gating pore current</i> | 58 |
| 3.6 Le <i>gating pore current</i> dans l'HypoPP1..... | 59 |
| 3.7 Propriétés biophysiques du <i>gating pore current</i> | 60 |
| 3.8 Mutations en dehors d'un segment S4 et <i>gating pore current</i> ?..... | 61 |
| IV Traitements médicaux de l'HypoPP..... | 61 |
| 4.1 Premiers traitements..... | 61 |
| 4.2 Acétazolamide..... | 62 |
| 4.3 Inhibiteurs de la NKCC..... | 63 |
| 4.4 Dichlorphénamide..... | 64 |
| Problématique..... | 65 |

| | |
|---|-----------|
| Matériels et Méthodes | 67 |
| I Matériel biologique | 67 |
| 1.1 Animaux | 67 |
| 1.2 Muscles | 67 |
| 1.3 Transfert de gènes in vivo | 67 |
| 1.3.A Plasmides d'expression..... | 67 |
| 1.3.B Technique d'électroporation <i>in vivo</i> chez la souris..... | 67 |
| 1.4 Préparation des muscles | 68 |
| II Electrophysiologie | 68 |
| 2.1 Enregistrements électrophysiologiques dans la fibre musculaire : <i>silicone-clamp</i> | 68 |
| 2.2 Appareillages électrophysiologiques | 69 |
| III Mesures de fluorescence | 69 |
| 3.1 Mesure du pH intracellulaire : BCECF | 70 |
| 3.1.A Caractéristiques de la sonde BCECF..... | 70 |
| 3.1.B Protocole d'utilisation de la sonde..... | 70 |
| 3.2 Mesure du Na⁺ intracellulaire | 71 |
| 3.2.A Caractéristiques de la sonde SBFI..... | 71 |
| 3.2.B Protocole d'utilisation de la sonde..... | 71 |
| IV Analyses des données | 71 |
| 4.1 Electrophysiologie | 71 |
| V Solutions | 72 |
| 5.1 Solutions section 1 | 72 |
| 5.1.A Solutions externes de TEA..... | 72 |
| 5.1.B Solutions externes de Tyrode..... | 73 |
| 5.1.C Solutions externes utilisées pour analyser le courant Kir..... | 73 |

| | |
|--|-----------|
| 5.1.D Solutions internes..... | 74 |
| 5.1.E Solutions internes utilisées pour la calibration du BCECF..... | 74 |
| 5.2 Solutions section 2..... | 75 |
| 5.2.A Solution externe : mesures de fluorescence en SBFI et du courant de fuite de Na ⁺ | 75 |
| 5.2.B Solution interne utilisée pour la mesure de fluorescence en SBFI..... | 75 |
| VI Analyses statistiques..... | 76 |
| Résultats..... | 77 |
| | |
| <i>Section 1 : Augmentation d'un courant protonique de repos dans le canal calcique muté R1239H responsable d'HypoPP1</i> | |
| | |
| <u>Article 1 :</u> Fuster, C., Perrot, J., Berthier, C., Jacquemond, V., & Allard, B., 2017. Elevated resting H⁺ current in the R1239H type 1 Hypokalemic Periodic Paralysis mutated Ca²⁺ channel. <i>The Journal of Physiology</i>, 595(20), pp.6417-6428. | |
| | |
| <i>Section 2 : Fuite sodique ayant les propriétés d'un gating pore dans le canal calcique voltage-dépendant muté V876E responsable d'HypoPP1</i> | |
| | |
| <u>Article 2 :</u> Fuster, C., Perrot, J., Berthier, C., Jacquemond, V., Charnet, P., & Allard, B., 2017. Na leak with gating pore properties in hypokalemic periodic paralysis V876E mutant muscle Ca channel. <i>The Journal of General Physiology</i>, doi: 10.1085/jgp.201711834. | |
| | |
| Discussion Générale et Perspectives..... | 86 |
| | |
| Références Bibliographiques..... | 97 |

Introduction

Le muscle squelettique est l'organe le plus imposant du corps et représente environ 40% de la masse totale de l'organisme. Cet organe est fondamental pour la réalisation de mouvements, se déplacer ou maintenir une posture. Il possède une architecture structurale organisée, régulière et complexe qui permet le phénomène de contraction musculaire. La contraction du muscle squelettique est caractérisée comme volontaire et est déclenchée par l'activité électrique du système nerveux. En effet, le potentiel d'action généré par l'activité neuronale se développe le long de la membrane plasmique des fibres musculaires et jusqu'en profondeur au niveau des tubules transverses où se situe le canal calcique voltage dépendant (DHPR pour récepteur aux dihydropyridines). Le DHPR fait face à un autre canal calcique (RyR1 pour récepteur à la Ryanodine de type 1) qui est situé dans la membrane du réticulum sarcoplasmique (RS). L'arrivée du potentiel d'action au niveau du DHPR déclenche l'ouverture de celui-ci qui à son tour permet l'ouverture du RyR1 entraînant le relargage du calcium (Ca^{2+}) contenu dans le RS et ainsi la contraction de la fibre. Cette séquence d'événement porte le nom de « couplage excitation-contraction » (CEC). Le DHPR possède deux fonctions, celle de détecteur de potentiel et celle de canal calcique à travers lequel diffuse du calcium suite à son ouverture.

Des mutations dans le gène qui code pour la principale sous-unité du DHPR induisent des pathologies musculaires. Parmi ces pathologies, on distingue la paralysie périodique hypokaliémique de type 1 (HypoPP1). Cette myopathie d'origine génétique est caractérisée par des épisodes de paralysie flaccide associés à une diminution importante de la concentration en potassium extracellulaire ($[\text{K}^+]_{\text{ext}}$). Ces événements sont déclenchés par l'ingestion de carbohydrate, après un exercice intense ou par le stress. Des expériences menées dans les canaux K^+ et Na^+ voltage-dépendants ont suggéré que les mutations HypoPP1 pourraient induire la formation d'une voie accessoire de conduction ionique transmembranaire au repos transportant des cations dont le gradient électrochimique est en faveur d'un influx. Ce courant est appelé courant ω pour le distinguer du courant calcique de type α à travers le pore du DHPR. Si un tel courant se développe, il pourrait induire une dépolarisation de la cellule musculaire au repos suffisamment importante pour conduire à une inactivation des canaux Na^+ voltage-dépendant et à la paralysie musculaire. A ce jour, seulement deux études témoignent de la présence éventuelle de ce courant oméga dans le cas de mutations responsables d'HypoPP1, l'une ayant recours à l'utilisation de souris transgéniques et l'autre à des cellules musculaires humaines issues de biopsies musculaires chez l'humain.

Dans ce contexte, mon travail de thèse a consisté à étudier les répercussions fonctionnelles de l'expression transitoire de deux formes mutées de $Ca_v1.1$ portant chacune une mutation responsable d'HypoPP1 et pour lesquelles la présence d'un courant oméga n'avait pas encore été démontrée. Les études se sont focalisées tout d'abord sur la caractérisation fonctionnelle de ces formes mutées du DHPR puis sur l'étude du courant oméga et enfin sur la détermination de l'espèce ionique portée par ce courant.

Le cheminement de la thèse sera conduit selon le plan suivant. Une première partie Historique contient un 1^{ier} chapitre rappelant l'ultrastructure de la cellule musculaire squelettique ; un 2^{ième} chapitre est consacré aux protéines impliquées dans l'homéostasie ionique des fibres musculaires squelettiques ; un 3^{ième} chapitre rapporte les données de la littérature sur le couplage excitation-contraction en portant une attention particulière au DHPR ; un dernier chapitre détaille l'ensemble des données de la littérature sur les mécanismes physiopathologiques de la Paralysie Périodique Hypokaliémique de type 1. Cette partie sera suivie des matériels et des méthodes utilisés dans ce travail de thèse. Les résultats sont ensuite présentés en 2 sections sous la forme de deux articles publiés. Une dernière partie consacrée à une discussion générale et des perspectives de travail clôture le manuscrit.

Historique

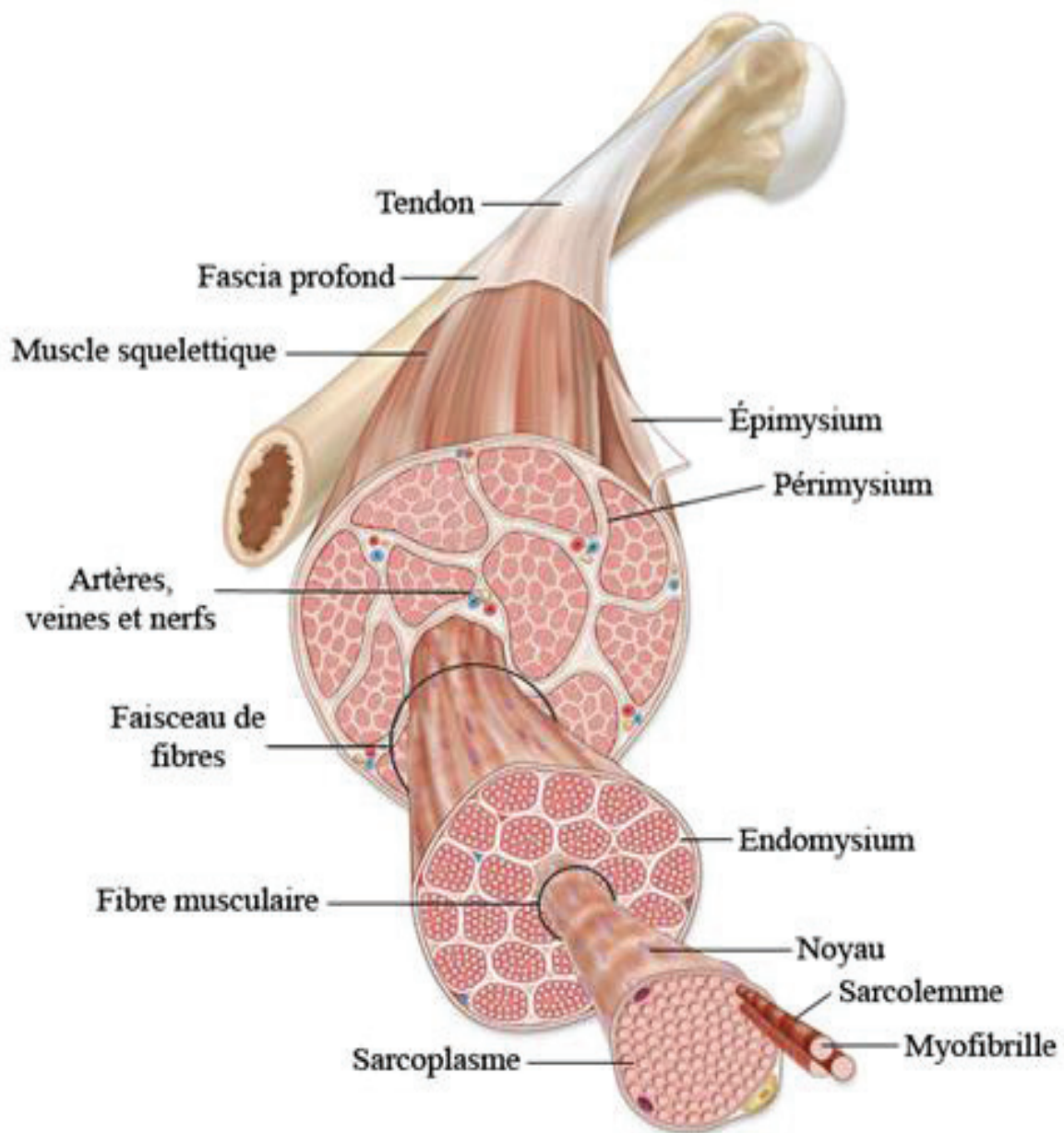


Figure 1 : Organisation macroscopique du muscle squelettique

Le muscle squelettique se rattache à l'os à ses deux extrémités par le tendon et est entouré du fascia. Chaque muscle squelettique est composé de nombreux faisceaux musculaires, eux-mêmes composés de nombreuses fibres musculaires. Les fibres musculaires sont constituées de myofibrilles.

D'après : <http://theses.ulaval.ca/archimede/fichiers/25962/ch03.html>

Chapitre I

Architecture et histo-physiologie du muscle squelettique

Le corps humain est constitué de 639 muscles de trois types différents, le tissu musculaire lisse, le tissu musculaire strié cardiaque et le tissu musculaire strié squelettique. Ce dernier type de tissu est composé de 570 muscles et représente 40% de la masse totale de l'organisme humain.

I STRUCTURE GENERALE DU SYSTEME MUSCULAIRE SQUELETTIQUE

1.1 Organisation anatomique du muscle squelettique

A chaque extrémité du muscle se trouve un tendon permettant la fixation de celui-ci au niveau du périoste, une membrane périphérique qui recouvre les os. Les groupes musculaires ayant la même fonction sont entourés par le fascia qui est une fine membrane fibreuse. Le muscle en lui-même est engainé d'une épaisse couche de tissu conjonctif appelée épimysium qui possède un rôle de soutien pour les fibres musculaires afin de maintenir une contraction homogène selon leur axe de raccourcissement. L'épimysium est à l'origine du périmysium qui cloisonne entre une dizaine et une centaine de fibres divisant le muscle en faisceaux. Le périmysium est à l'origine de l'endomysium qui constitue de fines cloisons de tissu conjonctif à l'intérieur des faisceaux et entoure individuellement les fibres musculaires (Figure 1).

1.2 La fibre musculaire squelettique

La fibre musculaire est l'unité fonctionnelle du muscle. Elle a une forme allongée et un diamètre situé entre 10 et 100 μm ; sa longueur chez l'Homme varie entre 2 mm (muscle stapédien de l'oreille interne) et 30 cm (muscle Sartorius au niveau de la cuisse). Les cellules musculaires possèdent une membrane plasmique appelée sarcolemme et leur milieu interne est appelé sarcoplasme. Une cellule musculaire est composée d'une centaine de noyaux résultant de la fusion de myoblastes durant la myogenèse au cours du développement embryonnaire. Ces noyaux sont retrouvés à la périphérie de la cellule sous le sarcolemme sur une cellule totalement différenciée. On retrouve une organisation très architecturée de la fibre musculaire dont chacune est formée d'un nombre important de myofibrilles (1 million/ mm^2) qui sont les éléments contractiles de la fibre, elles-mêmes constituées de myofilaments.

1.2.A Les différents types de fibre musculaire

Le muscle est un organe dont la réponse mécanique diffère d'un muscle à l'autre selon sa composition en fibres à contraction rapide ou lente. Les fibres musculaires communément appelées « rouges » ou « lentes » apparaissent claires à la coloration et sont appelées « fibres musculaires de type I ». Les fibres musculaires appelées « blanches » ou « rapides » apparaissent foncées à la coloration et sont appelées « fibres musculaires de type II ». Cette différence de couleur est due à la sensibilité au pH de l'ATPase myofibrillaire.

1.2.B Les fibres musculaires de types I :

Ces fibres musculaires sont sollicitées essentiellement pour le maintien de la posture ou pour un effort musculaire de durée élevée. Ces fibres sont relativement de faible diamètre et possèdent un métabolisme aérobie oxydatif dû à leur forte vascularisation et la présence importante de mitochondries et de myoglobine qui les rend résistantes à la fatigue.

1.2.C Les fibres musculaires de type II :

Parmi les fibres musculaires de type II, on distingue 3 sous-types ; les fibres de type IIa, IIb et IIc/x. Ces fibres de type II sont requises lors d'un effort intense, rapide et court puisqu'elles sont rapidement fatigables. Leur diamètre est plus important comparé à celui des fibres de type I et leur métabolisme est anaérobie glycolytique attribuable à leur faible vascularisation, faible taux de myoglobine et leur important taux en glycogène. Les fibres IIa ont une contraction moins rapide en comparaison des fibres IIb. Cependant elles sont moins résistantes à la fatigue que les fibres IIb. Les fibres IIc/x présentent une composition mixte entre les caractéristiques des fibres IIa et IIb.

En réalité, la plupart des muscles squelettiques sont un panaché de tous ces types de fibres. Dans le modèle d'étude de souris que j'ai utilisé, les muscles interosseux (IO) et *flexor digitorum brevis* (fdb) sont constitués en majeure partie de fibres de type II.

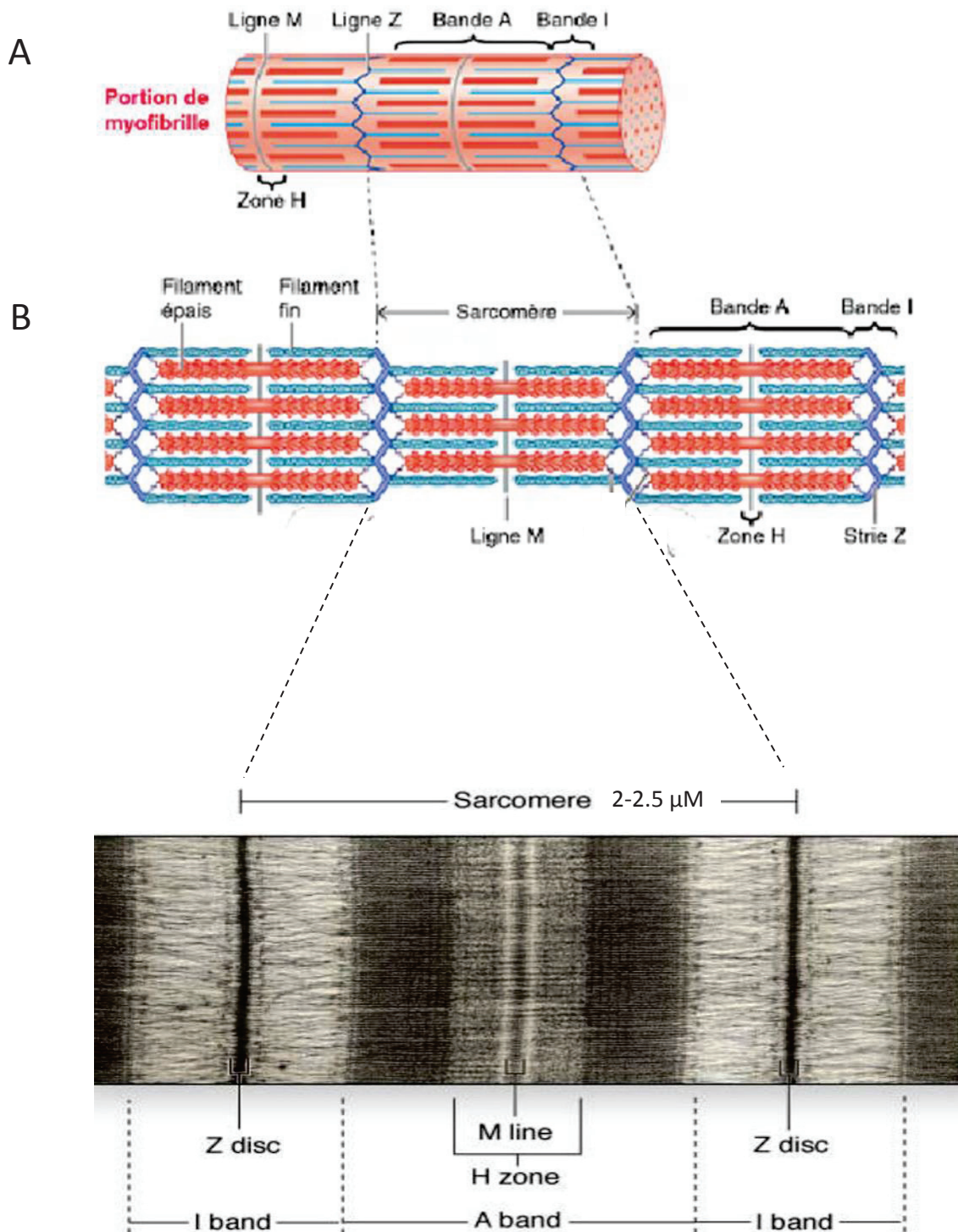


Figure 2 : Ultrastructure de la fibre musculaire squelettique

- A. Organisation schématique d'une myofibrille. Les striations observées au niveau macroscopique sont le résultat d'une organisation très régulière des myofilaments. Les striations des myofibrilles résultent d'une alternance de bandes claires et de bandes sombres.
- B. Disposition des myofilaments dans le sarcomère (panneau du haut). Cliché de microscopie électronique montrant l'organisation des myofilaments et les motifs auxquels ils donnent naissance sur une myofibrille.

D'après : *Physiologie Animale, Sherwood, Klandorf et Yancey, 2016.*

D'après : *Junquiera's Basic Histology, 14e, Mescher, 2016*

II ULTRASTRUCTURE DE LA FIBRE MUSCULAIRE SQUELETTIQUE

2.1 L'appareil contractile

La fibre musculaire squelettique présente une organisation ultrastructurale extrêmement poussée. Quatre-vingt pourcent de son volume intracellulaire est occupé par des myofibrilles, elles-mêmes composées de myofilaments, dont les interactions permettent de générer une réponse contractile.

2.1.A Les myofibrilles

Les myofibrilles sont des brins protéiques cylindriques et allongés disposés en parallèle les uns par rapport aux autres et parcourant toute la longueur de la cellule musculaire. Chaque myofibrille présente des striations transversales régulières avec une périodicité d'environ 2 μm , en phase d'une myofibrille à l'autre, donnant ainsi l'aspect strié à la cellule. Les striations résultent de l'alternance de bandes claires « I » pour isotrope et de bandes sombres « A » pour anisotrope. Les myofibrilles sont composées de deux types de myofilaments, les uns dits « épais » d'environ 10 nm de diamètre et de 1.6 μm de long et les autres dits « fins » d'environ 5 nm de diamètre et de 1 μm de long. C'est l'organisation et la disposition des myofilaments épais et fins qui donnent l'aspect strié à la myofibrille (Figure 2).

Bande Anisotrope :

La bande A est hétérogène puisqu'elle est constituée de myofilaments épais qui occupent toute la longueur de la bande A et de filaments fins qui les chevauchent sauf au centre de la bande A qui présente un aspect plus clair appelé bande H et qui ne contient donc que des filaments épais. Au centre de la bande H, se situe la « bande M » correspondant au milieu des myofilaments épais et apparaissant plus foncée.

Bande Isotrope :

La bande I est composée seulement de myofilaments fins qui s'insèrent sur la ligne Z (ou disque en trois dimensions) qui elle-même apparaît sombre et partage en son centre la bande I.

La région entre deux lignes Z comprend par définition une longueur complète de bande A et deux demi-bandes I. Cette région est appelée « sarcomère » et est l'unité contractile de la myofibrille. Elle mesure entre 2 et 2.5 μm de longueur au repos et est

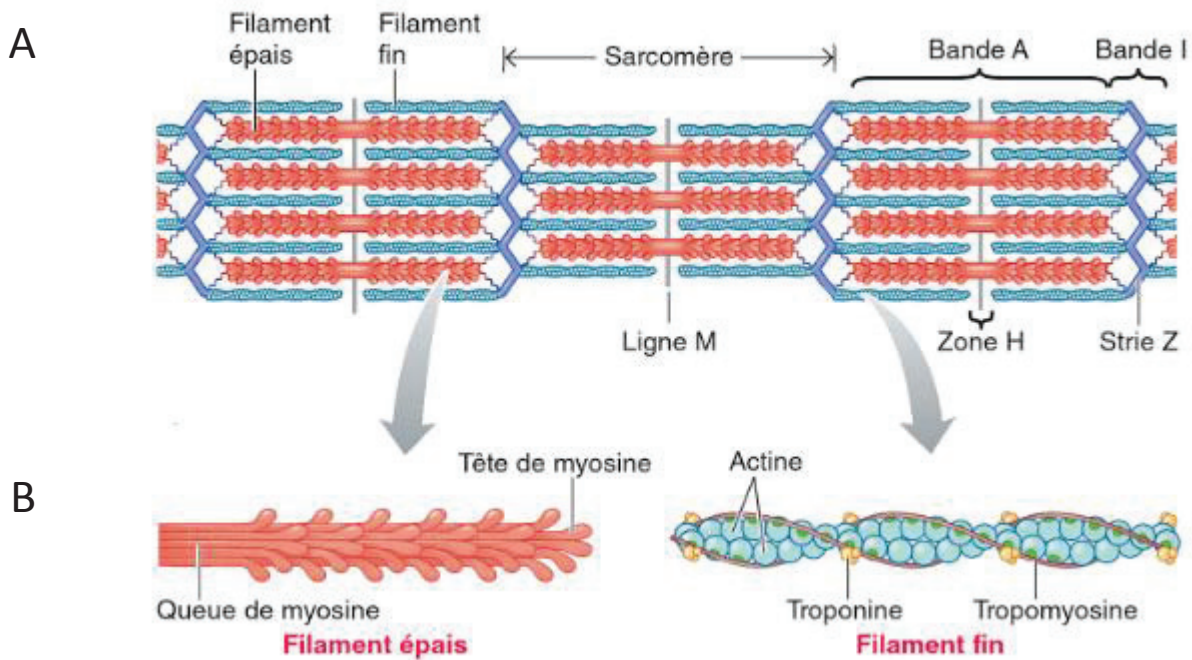


Figure 3 : Structure des myofilaments fins et épais

- A. Agencement des filaments fins et épais. La bande A est constituée des filaments fins et épais alors que la bande I n'est constituée que de filaments fins.
- B. Les filaments épais sont constitués de myosine, protéine asymétrique constituée d'une partie filamentaire et une partie globulaire correspondant respectivement aux queues et têtes de myosine. Le squelette des filaments fins est constitué de filament d'actine F autour desquels s'enroulent les filaments de tropomyosine associés à la troponine.

D'après : *Physiologie Animale, Sherwood, Klandorf et Yancey, 2016.*

susceptible de se réduire au maximum à une longueur équivalente à la longueur des filaments épais soit environ 1.6 μm durant une contraction maximale (*Franzini-Armstrong & Peachey, 1981*).

2.1.B Les myofilaments épais et fins

Les filaments épais sont formés essentiellement de la protéine polypeptidique myosine. Un filament épais est constitué de 300 à 400 molécules de myosine. La myosine est composée de 6 sous-unités, dont 2 chaînes lourdes (MHC : *Myosin Heavy Chain*, PM : 220 kDa) et 4 chaînes légères (MLC : *Myosin Light Chain*, PM : 15-30 kDa). La myosine est asymétrique et présente une tige cylindrique appelée « queue », composée de l'enroulement mutuel de la partie filamentaire des deux chaînes lourdes. Ces deux chaînes lourdes se séparent à l'extrémité N-terminale pour donner des parties globulaires qui s'assemblent avec deux chaînes légères formant ainsi les « têtes de myosine » des filaments. Les molécules de myosine s'agrègent par leurs queues pour donner naissance au filament épais et projettent leurs têtes en direction de la périphérie et des extrémités du filament. Les têtes de myosine possèdent deux sites fonctionnels jouant un rôle crucial dans le processus de contraction, un site ATPasique capable d'hydrolyser l'ATP en ADP + Pi et un site de fixation à l'actine G (Figure 3).

Le squelette des filaments fins est constitué d'actine F qui correspond à la polymérisation de protéines globulaires d'actine G (42 kDa) pour former une double hélice. Ces myofilaments fins sont ancrés au niveau de la ligne Z et se projettent en direction du centre des sarcomères. Chaque molécule d'actine possède un site de fixation à la myosine. La tropomyosine est une autre protéine appartenant au filament fin. C'est un dimère filamentaire formant une double hélice qui couvre environ 7 actines G. Ces tropomyosines s'enroulent autour de l'actine F sur toute sa longueur. Enfin, une dernière protéine, la troponine appartient aussi au filament fin et est constituée de 3 sous-unités, C (capable de fixer le Ca^{2+}), I (exerçant une action inhibitrice et s'associant à l'actine) et T (s'associant à la tropomyosine) (Figure 3). D'autres protéines qui composent les myofilaments exercent des actions régulatrices impliquées dans le processus de contraction ou des actions structurales en consolidant l'alignement des myofilaments, préservant l'espace inter-myofilament ou contribuant à la stabilité membranaire et la cohésion sarcomérique (exemple : titine, myoméline, nébuline, dystrophine).

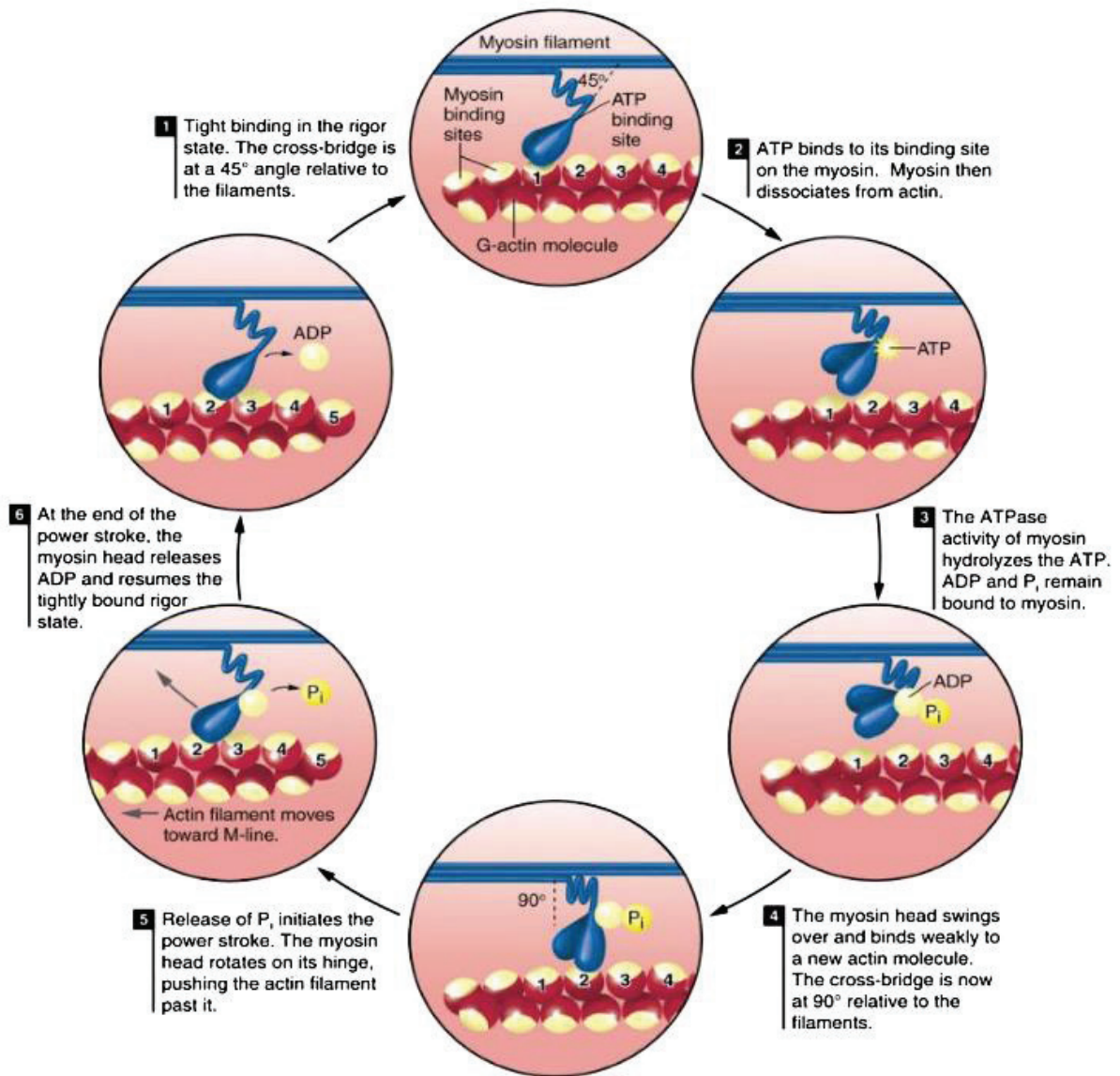


Figure 4 : Mécanismes moléculaires de la contraction musculaire

Le glissement du filament fin sur les filaments épais résulte d'un attachement – changement d'orientation – détachement cycliques des têtes de myosine. Voir texte pour détail.

D'après : *Frontela & Ochala, 2015*

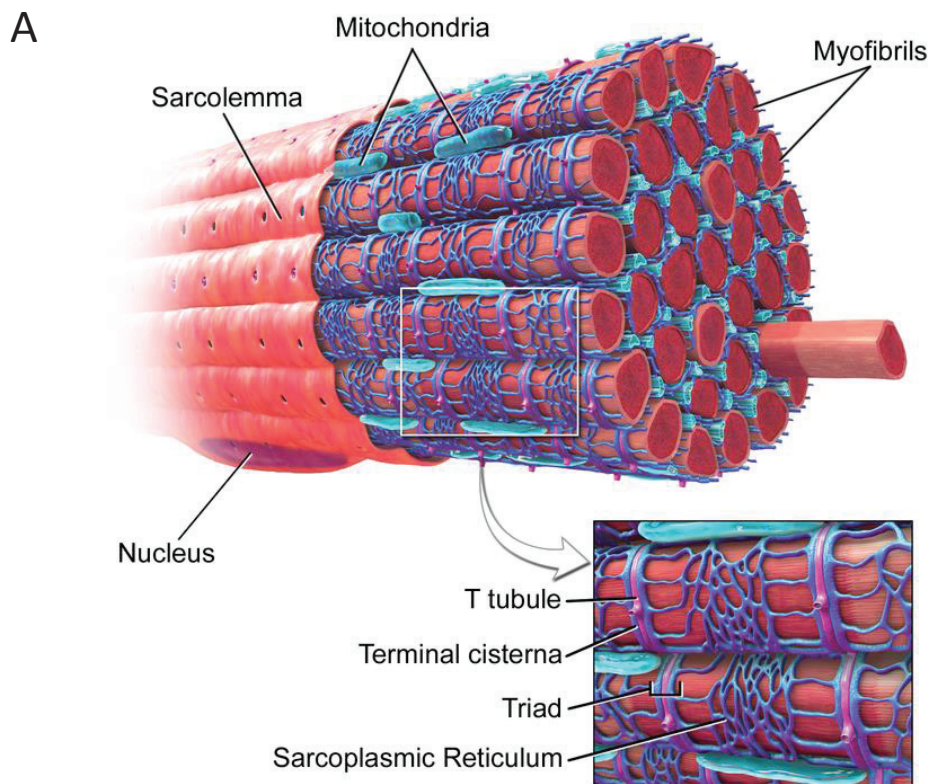
2.2 La contraction musculaire

2.2.A Théorie du glissement des filaments

Lors d'une contraction concentrique, le muscle se raccourcit. La longueur des myofilaments épais et fins restant identique, ce phénomène est causé par le raccourcissement de la taille des sarcomères résultant lui-même du glissement des myofilaments fins sur les myofilaments épais.

2.2.B Rôle de l'ATP et du calcium dans les processus de contraction – relaxation

Les têtes de myosine sont considérées comme des moteurs moléculaires puisqu'elles sont capables de se fixer sur les sites de liaison de l'actine et, en changeant leur orientation par rapport au filament fin, de faire glisser le filament d'actine le long du myofilament épais induisant ainsi le rapprochement des lignes Z. Ce processus de contraction est médié principalement par la présence de 2 molécules que sont l'ATP et le Ca^{2+} ainsi que les protéines régulatrices tropomyosine et troponine. L'interaction des filaments fins et épais se fait de manière cyclique. A des concentrations intracellulaires de Ca^{2+} de repos, la tropomyosine occupe sur l'actine F une position telle qu'elle masque les sites de fixation de l'actine réservés aux têtes de myosine. Le calcium libéré par le réticulum sarcoplasmique se lie à la troponine C et induit un changement de conformation de la troponine qui lui-même induit un glissement de la tropomyosine sur l'actine F démasquant ainsi les sites de fixation de la myosine sur l'actine. L'affinité de fixation entre la myosine et l'actine dépend également de l'hydrolyse de l'ATP en ADP + Pi, puisque lorsque l'ATP est fixé à la tête de myosine, l'interaction actine-myosine est inhibée tandis qu'elle est favorisée lorsque l'ATP est hydrolysé. Ainsi dès lors que l'ATP est hydrolysé, la tête de myosine se fixe à l'actine. La libération du Pi puis de l'ADP est associée à un changement d'orientation du cou de la tête de myosine induisant ainsi le glissement des filaments d'actine vers le centre du sarcomère (power stroke). Suite à cette étape, la tête de myosine se trouve fixée avec forte affinité à l'actine. Ce stade est appelé *rigor* et donne l'origine de la rigidité cadavérique (*rigor mortis*). Lorsqu'une molécule d'ATP se fixe de nouveau sur le site de liaison, l'affinité de la myosine pour l'actine diminue, induisant ainsi une séparation de ces deux éléments et un retour du cou de la tête de myosine à son orientation initiale. De nouveau, quand l'ATP est hydrolysé en ADP + Pi, la tête de myosine peut se fixer à l'actine au niveau d'un site plus rapproché de la ligne Z amorçant ainsi un nouveau cycle d'interaction (Figure 4).



B

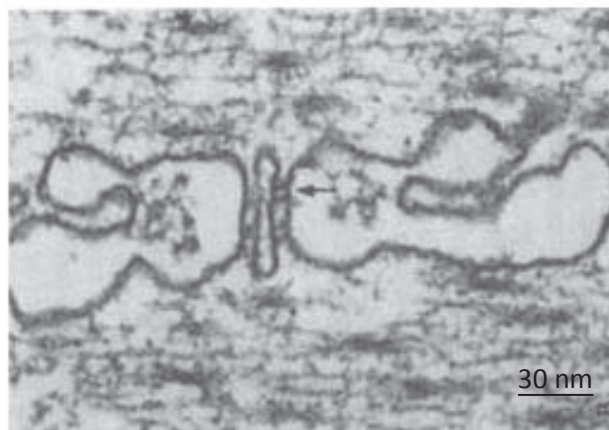


Figure 5 : Systèmes membranaires de la fibre musculaire squelettique

- A. Schéma représentant les systèmes membranaires spécifiques, le réticulum sarcoplasmique et les tubules transverse entourant les myofibrilles. La région au niveau de laquelle deux citernes terminales viennent en apposition de part et d'autre d'un tubule transverse correspond à la triade.
- B. Cliché de microscopie électronique montrant en coupe longitudinale une triade sur une fibre de grenouille (X114000).

D'après : *Blausen.com staff, "Medical gallery of Blausen Medical 2014*

D'après : *Paehey & Franzini-Armstrong, 1983*

2.3 Architecture principale du système membranaire

2.3.A Les tubules transverses

Les tubules transverses ou tubules T sont formés à partir de l'invagination du sarcolemme de façon transversale par rapport à ce dernier. Chez les mammifères, les tubules T sont localisés entre les bandes A et I du sarcomère. Leur rôle est de propager rapidement et en profondeur le signal électrique qui se déplace le long de la membrane plasmique. La majeure partie des tubules transverses font face au réticulum sarcoplasmique, lieu de stockage du Ca^{2+} activateur de la contraction (*Franzini-Armstrong & Porter, 1964*). Les tubules T contiennent une forte densité de récepteurs aux dihydropyridines impliqués dans le couplage excitation-contraction dont le rôle sera explicité dans un prochain chapitre (Figure 5A).

2.3.B Le réticulum sarcoplasmique

Le réticulum sarcoplasmique (RS) est un réseau interne de membrane individualisé dans le cytoplasme et contenant une forte concentration de Ca^{2+} (0,5 mM environ) (*Ziman et al., 2010 ; Sztretye et al., 2011*). On distingue trois domaines du RS : le réticulum fenestré domaine le plus large du RS, le réticulum longitudinal se développant longitudinalement le long des myofibrilles et le réticulum sarcoplasmique jonctionnel correspondant à des renflements appelés « citernes terminales » qui sont juxtaposées aux tubules transverses. Les réticulums fenestré et longitudinal s'étendent alternativement sur toute la longueur de la bande A et sur toute la longueur de la bande I alors que les citernes terminales se placent à l'aplomb des jonctions bandes A/bande I. La juxtaposition de deux citernes terminales de part et d'autre d'un tubule transverse est appelée « triade » (*Paechey & Franzini-Armstrong, 1983*).

2.3.C La triade

La triade comprend trois éléments, un tubule transverse entouré de deux citernes terminales du réticulum sarcoplasmique. La triade est la structure permettant la transduction du signal électrique propagé sur le tubule transverse en relargage de Ca^{2+} contenu dans le RS. La distance qui sépare la membrane tubulaire à la membrane du RS est comprise entre 13 et 18 nm (*Somlyo, 1979*). Les différentes protéines exprimées au niveau de cette triade et impliquées dans les événements menant à la contraction seront décrites plus loin (Figure 5B).

Chapitre II

Protéines impliquées dans l'homéostasie ionique des fibres musculaires squelettiques

L'homéostasie ionique est indispensable au bon fonctionnement de l'organisme et au bon déroulement de nombreux mécanismes cellulaires. Dans la fibre musculaire, cette homéostasie conditionne en premier lieu l'activité électrique de la cellule, les mouvements de calcium transmembranaire et intracellulaire et la régulation du pH intracellulaire. A l'exception des protons, les ions ne pouvant être ni synthétisés, ni dégradés, l'homéostasie ionique passe essentiellement par la régulation de flux ioniques transmembranaires tributaires du gradient électrochimique existant pour ces ions de part et d'autre de la membrane. Dans le chapitre qui suit seront décrits successivement les flux ioniques responsables de la polarisation de repos, du potentiel d'action puis des mouvements de calcium et de protons.

I FLUX IONIQUES ET POLARISATION DE REPOS

La mesure du potentiel de repos dans les cellules musculaires squelettiques de souris à l'aide de la technique de microélectrode intracellulaire indique, selon les conditions expérimentales utilisées, des valeurs de potentiel interne entre -70 et -95 mV (*Head, 1993 ; Mathes et al., 1991*). Comme dans la majorité des cellules animales, cette polarisation négative résulte de la présence d'une forte conductance K^+ de repos qui permet d'établir le potentiel à des valeurs proches du potentiel d'équilibre des ions K^+ . En parallèle, il existe une conductance Na^+ de repos très faible et une conductance Cl^- très élevée représentant environ 2/3 de la conductance totale de la cellule (*Palade & Barchi, 1977*). La distribution transmembranaire du Cl^- étant cependant considérée comme passive, le potentiel d'équilibre des ions Cl^- s'établit à des valeurs proches du potentiel de repos de la cellule (voir cependant la partie sur le transporteur NKCC). Ainsi, on considère que la conductance Cl^- n'influence pas le potentiel de repos de la cellule musculaire mais conditionne plutôt ses propriétés d'excitation en modulant la résistance de membrane. Dans ces conditions, l'établissement et le maintien d'un gradient K^+ transmembranaire par la pompe Na^+/K^+ ATPase et la présence d'une forte conductance K^+ sont les principaux déterminants de la polarisation de repos.

1.1 La pompe Na^+/K^+ ATPase

Depuis la découverte de la Na^+/K^+ ATPase en 1957 par Jens Christian Skou, de nombreuses recherches ont été réalisées pour étudier le fonctionnement, l'expression et la physiologie de cette pompe (Skou, 1998). La $[\text{K}^+]_{\text{int}}$ est de 140-160 mM, et la $[\text{K}^+]_{\text{ext}}$ est de 3.5-5 mM. En revanche, la $[\text{Na}^+]_{\text{int}}$ est de 10-20 mM et la $[\text{Na}^+]_{\text{ext}}$ est de 140 mM. Etant donné que le potentiel de repos de la cellule est au-dessus du potentiel d'équilibre des ions K^+ (E_{K}) et en-dessous de E_{Na} , une sortie et une entrée permanente respectivement de K^+ et de Na^+ se développent à travers la membrane musculaire. L'activité de la pompe Na^+/K^+ ATPase permet de maintenir les gradients Na^+ et K^+ de repos en utilisant l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie pour extruder 3 ions de Na^+ et faire entrer 2 ions de K^+ contre les gradients électrochimiques respectifs de ces deux ions. Cette pompe est bien entendu aussi fortement sollicitée suite à l'émission de potentiels d'action. C'est une pompe ubiquitaire qui au repos consomme 20 à 30% de la production totale d'ATP pour son fonctionnement (Jorgensen et al., 2003). D'après plusieurs études, en considérant que 2% du K^+ est contenu dans le milieu extracellulaire, en activité maximale, la pompe Na^+/K^+ ATPase est capable de renouveler la totalité du K^+ extracellulaire en 30 secondes (pour revue, voir Cheng et al., 2013).

Cette pompe est constituée de 3 sous-unités, α , β et γ . La sous-unité α est la sous-unité catalytique et contient les sites de fixation du Na^+ , du K^+ et de l'ATP. La sous-unité β permet la maturation, le trafic et la stabilité du complexe à la membrane. La sous-unité γ aurait un effet d'inhibition sur l'activité de la pompe, mais son rôle reste encore flou, puisqu'en son absence la pompe reste fonctionnelle (pour revue, voir Clausen, 2017).

De nombreux régulateurs de la pompe ont été identifiés. L'activité est modulée par ses propres substrats, c'est-à-dire par une augmentation de la $[\text{Na}^+]_{\text{int}}$ et de la $[\text{K}^+]_{\text{ext}}$ mais aussi par :

- **L'insuline** est une hormone qui active sensiblement la pompe Na^+/K^+ ATPase. Son mécanisme d'action serait probablement d'augmenter l'affinité de la pompe pour le Na^+ intracellulaire, mécanisme qui a été démontré dans le muscle de grenouille (Kitasato et al., 1980) et dans le muscle soléaire de rat (Clausen & Kohn, 1977). D'ailleurs, une augmentation de la sécrétion d'insuline suivant l'ingestion de glucose peut suffire à provoquer une hypokaliémie (Natali et al., 1993).

- **Les catécholamines** ont été démontrées pour avoir un rôle activateur de la pompe. L'activation des récepteurs adrénergiques conduit à une augmentation de la production d'AMP cyclique par l'adénylate cyclase, second messenger qui active la protéine kinase A. La phosphorylation de la pompe qui en découle induit une augmentation de l'activité de la pompe Na^+/K^+ ATPase dans le muscle squelettique de rat qui s'élève à 91% de l'efflux de Na^+ et 94% l'influx de K^+ basaux (Clausen & Flatman, 1980). Cette activation est susceptible d'entraîner une hypokaliémie dans une situation de stress important où la libération de catécholamines est favorisée (Struthers et al., 1983).
- **Les hormones thyroïdiennes** ont été décrites pour avoir un effet activateur de l'expression de la sous-unité α et β de la pompe dans le muscle squelettique chez l'Homme et l'abondance de l'expression de la pompe est en corrélation avec le taux d'hormones thyroïdiennes dans le sang (Phakdeekitcharoen et al., 2007). De plus, des patients souffrant d'hypothyroïdie présentent une diminution de densité de pompes Na^+/K^+ ATPase dans le muscle squelettique pouvant atteindre moins 50%. Réciproquement, des patients souffrant d'hyperthyroïdie présentent une augmentation de densité de pompes pouvant atteindre plus 70% et sont en conséquence plus susceptibles de développer une hypokaliémie (Kjeldsen et al., 1984 ; Clausen, 2003 ; Lin & Huang, 2012).
- **L'exercice musculaire** augmente la densité de pompes dans le muscle squelettique entre 16 et 40% selon le type d'effort effectué (pour revue voir Clausen, 1998). En contrepartie, l'inactivité peut conduire à une diminution de 27% de la densité de pompes (Leivseth & Reikeras, 1994). De plus, l'activité de la pompe resterait augmentée au repos après un effort physique et serait capable d'induire une hypokaliémie post-exercice (Clausen, 2003).

1.2 Les canaux potassiques

Une classification fonctionnelle des canaux potassiques permet de distinguer les canaux K^+ ouverts au repos et les canaux activés pendant l'excitation musculaire. La principale classe de canaux K^+ ouverts au repos correspond aux canaux K^+ rectifieurs entrants (Kir). Les canaux potassiques rectifieurs entrants sont appelés ainsi car leur conductance est plus importante lorsqu'ils passent des courants entrants que lorsqu'ils passent des courants sortants. Cette rectification résulte d'un effet bloqueur du Mg^{2+} et des polyamines intracellulaires (Matsuda et al., 1987 ; Lopatin et al., 1994). La sous-unité principale du canal est composée de deux segments transmembranaires reliés par une boucle intramembranaire

constituant les parois du pore. Quatre de ces sous-unités sont nécessaires pour former un canal fonctionnel. Les K_{ir} sont classés en 7 sous-familles qui incluent la famille des K_{ir2} dont tous les sous-types sont exprimés dans le muscle squelettique ($K_{ir2.1}$, $K_{ir2.2}$, $K_{ir2.3}$ et $K_{ir2.4}$). Ces canaux sont constitutivement actifs au repos et permettent de maintenir le potentiel de repos proche du potentiel d'équilibre des ions K^+ . Ces canaux rectifieurs entrants sont paradoxalement sollicités en tant que porteur de courants sortants dans les conditions physiologiques puisque le potentiel d'équilibre des ions K^+ est systématiquement plus négatif que le potentiel interne de la cellule (*Hibino et al., 2010*).

On distingue aussi parmi les K_{ir} des canaux K^+ sensibles à l'ATP ($K_{ir6.1}$ et $K_{ir6.2}$ ou K_{ATP}) qui sont exprimés à forte densité dans le muscle squelettique. Le canal K_{ATP} est fonctionnel lorsque la protéine K_{ir} est associée à la sous-unité SUR appelée récepteur des sulfonylurées eu égard à sa capacité à fixer les molécules sulfonylurées telles que la glibenclamide qui se comporte comme un bloqueur du canal. Dans le muscle squelettique, est principalement exprimé le $K_{ir6.2}$ associé à la sous-unité SUR2A (*Inagaki et al., 1996*). Comme leur nom l'indique, l'activité des canaux est modulée par la concentration d'ATP mais aussi d'ADP intracellulaire. Plus spécifiquement, une augmentation du rapport ADP/ATP augmente leur probabilité d'ouverture et une diminution a l'effet inverse (*Allard & Lazdunski, 1992*). Ces canaux sont aussi la cible de médicaments appelés ouvreurs de canaux K^+ qui comme leur nom l'indique augmentent la probabilité d'ouverture du canal (*Allard & Lazdunski, 1993*). Leur sensibilité à l'ATP leur confère un rôle de lien fonctionnel entre le statut métabolique de la cellule et le maintien de l'excitabilité musculaire. En particulier, ils pourraient contribuer à la repolarisation membranaire qui suit le potentiel d'action (*Light et al., 1994*) ou assurer un rôle protecteur contre la fatigue musculaire par l'hyperpolarisation qu'ils induisent en réduisant l'excitabilité, diminuant l'amplitude du potentiel d'action et éventuellement la force musculaire (*Duty & Allen, 1995*).

Enfin, il existe une famille de canaux potassique K_{2p} subdivisée en 6 sous-familles : TASK, TWIK, TREK, TALK, THIK, TRESK. Ces canaux ont la particularité d'être agencés en dimère et chaque sous-unité possède 4 domaines transmembranaires (M1-M4), 2 domaines pores (P1 et P2). Ces canaux ont d'abord été caractérisés comme des canaux de fuite sélectifs au potassium, puis comme des canaux potassiques rectifieurs sortants dont la conductance augmente en réponse à une dépolarisation (*pour revue, voir Renigunta et al., 2015*). Il existe une seule étude qui montre l'expression de canaux K_{2p} dans le muscle squelettique chez

l'Homme. Leur rôle fonctionnel dans le muscle squelettique reste cependant largement controversé (Afzali et al., 2016).

1.3 Les canaux chlorure

Le muscle squelettique présente une conductance chlorure très importante qui constitue 2/3 de la conductance totale de membrane. La $[Cl^-]_{int}$ est de ~ 4 mM et la $[Cl^-]_{ext}$ sanguine est de ~ 110 mM. Cependant, en conditions expérimentales, la fibre musculaire est très souvent exposée à des concentrations de l'ordre de 150 mM. En référence à l'équation de Nernst, le potentiel d'équilibre E_{Cl^-} devrait s'établir à des valeurs négatives proches du potentiel de repos. Tel est en effet le cas mais on considère en fait que, dans la cellule musculaire, les ions chlorure se distribuant passivement de part et d'autre de la membrane, la concentration intracellulaire de Cl^- se fixe à une valeur telle que E_{Cl^-} soit égal au potentiel de repos de la cellule (Hodgkin & Horowitz, 1959). Cette conductance importante dans le muscle squelettique provient de l'expression à forte densité d'un canal chlorure ClC-1 qui est un canal spécifique du muscle squelettique (pour revue, voir Cannon, 2015). Le canal ClC-1 a la particularité de posséder 2 pores appelés « proto-pores », activés par la dépolarisation et qui jouent un rôle dans la repolarisation membranaire qui suit le potentiel d'action. Enfin, les ClC-1 sont inhibés par l'acide anthracène-9-carboxylique dont l'effet est dépendant du pH (Rychkov et al., 1997). De façon intéressante, l'expression du ClC-1 (rat ou humain) dans des cultures cellulaires (sf-9) ou dans des ovocytes a montré qu'une diminution de la $[Cl^-]_{ext}$ induit une diminution de la probabilité d'ouverture (P_o) du canal. De plus, une diminution du pH_{ext} réduit de 20-30% le courant maximal alors qu'une acidification intracellulaire augmente la P_o du canal. Enfin, le ClC-1 serait sensible à la $[ATP]_{int}$ puisqu'une augmentation de celle-ci diminue significativement l'activité du canal (Rychkov et al., 1996 ; Bennetts et al., 2005). De nombreux groupes de recherche étudient ce canal puisque plus de 130 mutations dans le canal sont responsables de myotonies congénitales, maladies musculaires génétiques caractérisées par une hyperexcitabilité membranaire causée par une réduction de la conductance de ClC-1 (Lossin & George, 2008).

1.4 L'échangeur NKCC1

Un autre transporteur électroneutre, l'échangeur NKCC (co-transporteur de Na^+ , K^+ , $2Cl^-$), participe à l'homéostasie ionique de repos. Ce transporteur fait entrer un ion K^+ , un ion Na^+ et 2 ions Cl^- en utilisant le gradient électrochimique entrant du Na^+ . Il est donc non-électrogène. Ce transporteur est particulièrement étudié dans le rein car il participe au

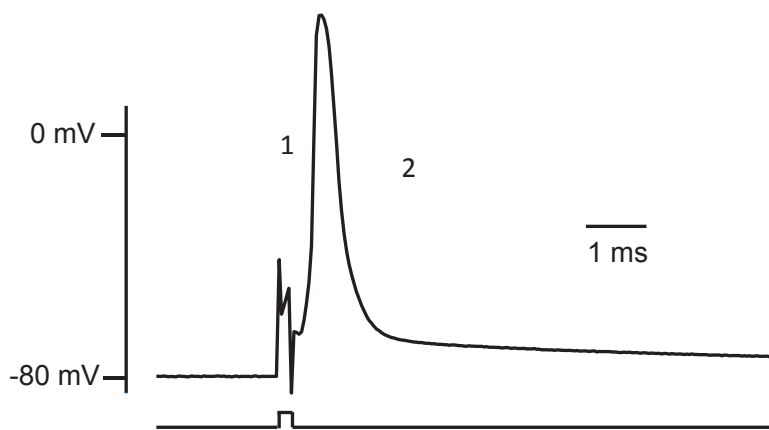


Figure 6 : Potentiel d'action musculaire

Le potentiel d'action présente une phase ascendante (1), une phase de repolarisation (2) et une phase de post-dépolarisation.

Enregistré au laboratoire sur une fibre musculaire squelettique de souris.

processus de réabsorption de Na^+ et est la cible de médicaments diurétiques. Cependant, il existe une isoforme ubiquitaire, NKCC1 que l'on retrouve exprimée dans le muscle squelettique de rat ou chez l'Homme (*pour revue, voir Russell et al., 2000*). L'étude de *Wu et al.* (2013a) a montré dans le muscle squelettique de souris que l'inhibition de la NKCC1 par le bumétanide permettrait de maintenir l'excitabilité membranaire du muscle malgré la présence d'une très faible $[\text{K}^+]_{\text{ext}}$ qui dans ce cas favorise la dépolarisation membranaire.

II FLUX IONIQUES ET POTENTIEL D'ACTION

En réponse à la dépolarisation locale au niveau de la plaque motrice déclenchée par l'activation des récepteurs nicotiques, la fibre musculaire squelettique développe un potentiel d'action. Cette réponse électrique constitue le signal responsable du déclenchement du processus de couplage excitation-contraction. L'ouverture des canaux Na^+ voltage-dépendants est responsable de la phase de dépolarisation appelée spike qui porte le potentiel interne en moins d'une milliseconde à des valeurs proches de E_{Na} , aux alentours de +40 mV. Il s'ensuit une phase de repolarisation, résultant de l'inactivation des canaux sodiques et de l'ouverture retardée de canaux K^+ voltage-dépendants. Les canaux K^+ rectifieurs entrants ainsi que les canaux chlorures contribuent aussi à ramener le potentiel interne à ses valeurs de repos. Contrairement au potentiel d'action de l'axone, le potentiel d'action de la cellule musculaire ne présente pas de phase de post-hyperpolarisation mais au contraire une phase de post-dépolarisation précoce appelée *early after-potential*. L'origine de cette phase est restée longtemps débattue. Elle résulte sans ambiguïté d'une activité électrique tubulaire puisqu'elle disparaît quand les cellules sont détubulées mais la nature des canaux ioniques impliqués reste controversée (Figure 6).

2.1 Les canaux sodium voltage-dépendants

Le gradient électrochimique Na^+ est très en faveur d'une entrée de Na^+ puisque d'une part la concentration extracellulaire de 140 mM est bien supérieure à la concentration intracellulaire qui n'est située qu'entre 10 et 20 mM et d'autre part, la cellule est polarisée à des valeurs négatives au repos. Le canal sodique voltage-dépendant du muscle squelettique est l'isoforme 1.4 et noté $\text{Na}_v1.4$. Dans les années 80 les travaux de recherche du groupe de Catterall ont permis de déterminer la structure moléculaire de ce canal, décrivant une sous unité principale α (260 kDa) et une plus petite sous-unité $\beta 1$ (~30 kDa). Comme pour les

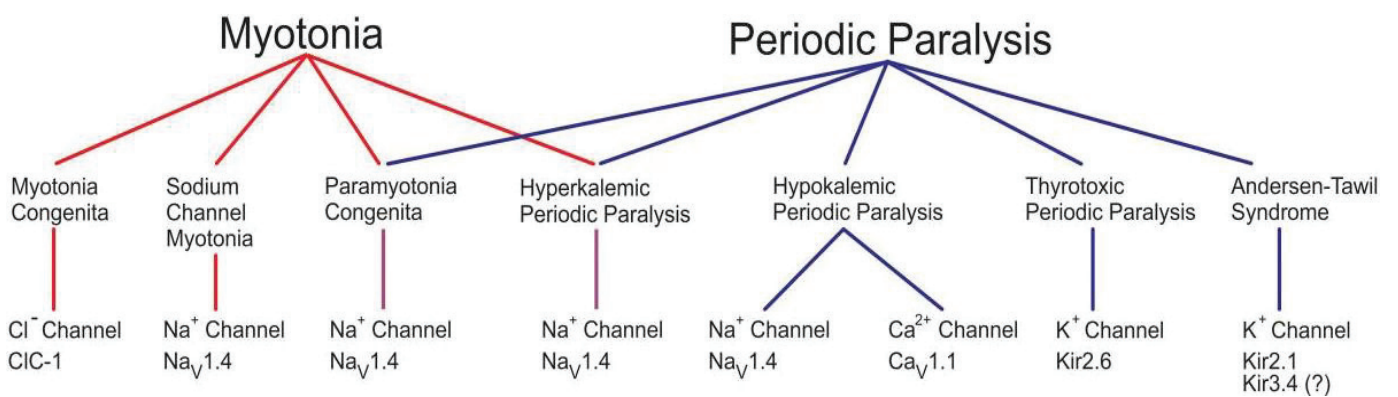


Tableau 1 : Canalopathies du muscle squelettique.

Dans le cas des canalopathies sodiques, les symptômes vont de la myotonie à la paralysie.

D'après : Cannon, 2015

autres canaux voltage-dépendants décrits plus loin dans ce manuscrit (DHPR, K_v), la structure moléculaire de la sous-unité α est très proche des autres sous-unités α appartenant à d'autres canaux voltage-dépendants. La sous-unité α du $Na_v1.4$ contient approximativement 2000 acides aminés organisés en 4 domaines transmembranaires homologues contenant chacun 6 segments transmembranaires (S1 à S6). Les S4 contiennent 5 à 6 acides aminés chargés positivement qui confèrent au canal sa sensibilité au voltage et forment avec les segments S1 à S3 le domaine voltage-dépendant (*voltage-sensing domain*). Les boucles intramembranaires liant les segments S5-S6 forment les parois du pore du canal et conditionnent la sélectivité sodique du canal. La sous-unité β participe au trafic et à l'adressage à la membrane du canal et module les cinétiques d'activation et d'inactivation de la sous-unité α (*pour revue, voir Catterall, 2014*). Ces canaux sont activés par la dépolarisation dont le $V_{1/2}$ se situe autour de -30 mV et la conductance maximale est obtenue à des valeurs de potentiel d'environ 0 mV (*Desaphy et al., 2016*). Ce canal présente 3 processus d'inactivation, une rapide qui ferme le canal en 1 ms, une lente qui ferme le canal en quelques secondes et une ultra-lente qui demande plusieurs minutes (*Hilber et al., 2002*). Les canaux Na_v sont bloqués par la tétrodotoxine (TTX), une neurotoxine qui se fixe au niveau du pore et empêche l'activation du canal (*Lee & Ruben, 2008*).

Certaines mutations dans le gène codant pour la sous-unité principale du $Na_v1.4$ sont responsables de canalopathies musculaires en modifiant les propriétés d'activation ou d'inactivation du canal. Les canalopathies affectant le canal Na^+ musculaire présentent un large spectre de perturbations de l'excitabilité allant de la myotonie à la paralysie, voire des formes mixtes (tableau 1) (*Amarouch & Abriel, 2015*). Plus spécifiquement, les mutations du canal Na^+ responsables de la Paralyse Périodique Hypokaliémique de type 2 seront abordées plus loin dans ce manuscrit.

2.2 Les canaux potassium voltage-dépendants

Les canaux K_v sont constitués de sous-unités principales α et accessoires β . Un canal fonctionnel nécessite la présence de 4 sous-unités principales (α) et de 4 sous-unités β . La sous-unité α a une structure proche d'un des domaines membranaires de la sous-unité α du canal Na^+ ou Ca^+ voltage-dépendant. Ainsi, les sous-unités α du canal K^+ possèdent 6 segments transmembranaires. Les S1-S4 forment le domaine sensible au voltage et chaque S4 est constitué d'acides aminés chargés positivement (arginine et lysine) responsables de la voltage-dépendance du canal. Les parois du pore sont constituées par les boucles entre les segments S5-S6. Il existe 12 familles de canaux K_v dont les sous familles $K_v1.1$, $K_v1.4$, $K_v1.7$,

$K_v1.8$, $K_v2.1$, $K_v3.1$, $K_v3.4$, $K_v5.1$, $K_v6.1$ sont exprimées dans le muscle squelettique (*pour revue, voir Gutman et al., 2005*). Les canaux K_v sont dans un état fermé au repos et aux valeurs hyperpolarisées et sont activés par la dépolarisation. La sortie de K^+ qui s'établit à travers ces canaux est nécessaire à la phase de repolarisation membranaire qui suit la phase de spike du potentiel d'action. Ces canaux présentent un $V_{1/2}$ de $\sim 5,7$ mV (*li et al., 2015*) et 2 types d'inactivation, une inactivation rapide appelé inactivation-N et une inactivation lente appelée inactivation-C en référence à l'implication de la partie N-terminale ou C-terminale de la protéine dans le processus d'inactivation du canal (*pour revue, voir Kurata & Fedida, 2006*). Les autres sous-unités β modulent les propriétés de la sous-unité α et pourraient être impliquées dans le processus d'inactivation du canal (*Pongs et al., 1999*). L'activation répétée des canaux K^+ voltage-dépendants à l'occasion de potentiels développés en train à haute fréquence induit une augmentation importante du K^+ interstitiel pouvant atteindre 8 mM chez l'Homme après 5 min d'exercice (*Lindinger, 1995*) et jusqu'à 52 mM dans les tubules transverses (*Clausen, 2008*). Cette accumulation de K^+ entraîne une dépolarisation maintenue après un train de potentiels d'action nommée *late after-depolarization* qui pourrait contribuer au développement du processus de fatigue en favorisant l'inactivation des canaux Na^+ voltage-dépendants. En reconcentrant le K^+ dans le milieu sarcoplasmique, la pompe Na^+/K^+ ATPase contribue de manière cruciale pendant cette phase à maintenir l'excitabilité musculaire. Enfin, ces canaux sont bloqués par le tétraéthylammonium (TEA), bloqueur des canaux potassiques non sélectif et la 4-aminopyridine (4-AP), bloqueur spécifique des canaux K^+ voltage-dépendants (*Glover, 1982*).

Une autre catégorie de canaux K^+ voltage-dépendants présents à forte densité sur la membrane musculaire correspond aux canaux K^+ activés par le calcium de grande conductance ($maxiK_{Ca}$ ou BK_{Ca} pour $BigK_{Ca}$). Ces canaux sont constitués d'une sous-unité α et β et s'organisent en tétramère (4 sous-unité α et 4 sous-unité β). La sous-unité α comprend 7 segments transmembranaires dont le segment S4 porte la voltage-dépendance de ce canal et la boucle S5-S6 constitue les parois du pore mais ils possèdent aussi 4 autres segments intracellulaires S7-S10 qui sont impliqués dans la détection de l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_{int}$ (*pour revue, voir Latorre & Brauchi, 2006*). La sous-unité β aurait un rôle dans la sensibilité au voltage et dans la sensibilité au Ca^{2+} intracellulaire (*McManus et al., 1995*). Ces canaux sont bloqués par le TEA et la charybdotoxine. Des expériences de patch clamp et de mesure de Ca^{2+} intracellulaire ont montré qu'ils pourraient jouer un rôle régulateur de l'excitabilité musculaire étant donné qu'ils peuvent être activés par la stimulation des récepteurs

nicotiniques ou la libération de Ca^{2+} par le RS (Allard et al., 1996 ; Jacquemond & Allard, 1998). L'acétazolamide, diurétique inhibiteur de l'anhydrase carbonique, s'est avérée augmenter la probabilité d'ouverture du canal (Tricarico et al., 2006). Les effets de cette molécule seront explicités plus en détail dans le dernier chapitre de cet historique.

III LES MOUVEMENTS DE CALCIUM TRANS-SARCOLEMMMAUX

3.1 Les voies d'entrée du calcium

Un influx calcique se développe au repos dans la cellule musculaire squelettique (Berbey & Allard, 2009). Les voies d'entrée empruntées par le calcium restent encore aujourd'hui controversées.

En 2001, Kurebayashi & Ogawa ont montré l'existence d'une voie SOCE pour *Store-Operated Calcium Entry* sur des faisceaux de fibres musculaires d'EDL de rat. En effet, ces auteurs ont montré que, suite à une forte déplétion du RS en Ca^{2+} déclenchée en absence de Ca^{2+} extracellulaire par un empoisonnement à la thapsigargine (un inhibiteur des Ca^{2+} ATPases du RS), la réintroduction du calcium dans le milieu extracellulaire entraîne une augmentation de l'influx de calcium dans la cellule. Il est suggéré que cette entrée de calcium contribuerait à reconstituer les stocks de Ca^{2+} dans le RS (*pour revue, voir Feldman et al., 2017*). Les protéines responsables de cette signalisation calcique sont le couple STIM1 (Roos et al., 2005) et ORAI (Feske et al., 2006). Ces protéines ont été caractérisées initialement dans des types cellulaires non-excitables comme les lymphocytes T et plus tard dans des tissus excitables tels que la fibre musculaire squelettique où STIM1 et ORAI1 sont exprimés (Lyfenko & Dirksen, 2008). L'hypothèse qui est avancée suggère que lorsque la $[\text{Ca}^{2+}]$ dans le RS diminue drastiquement, la partie intraluminaire de STIM1 liant le calcium réticulaire en condition de réplétion devient libre, ce qui entraîne une dimérisation des protéines STIM1 (Zhou et al., 2013), un changement de conformation du couple STIM1/ORAI1 et finalement l'ouverture du canal ORAI1 et l'entrée de calcium (*pour revue, voir Dirksen, 2009*).

Les canaux TRP (*Transient Receptor Potential*) sont des canaux perméables aux cations, impliqués dans de nombreux processus biologiques et dont la plupart sont perméables aux Ca^{2+} . Ces canaux sont constitués de 6 segments transmembranaires et s'assemblent en tétramère (*pour revue, voir Montell, 2005*). Il existe 6 familles de TRP qui comprennent les

TRPC (*Transient Receptor Potential Canonical*), eux-mêmes constitués de 5 sous-familles : TRPC1, TRPC2, TRPC3, TRPC4 et TRPC6. Ces isoformes ont été retrouvées dans le muscle squelettique de rongeur (*Vandebrouck et al., 2002*), cependant chez l'Homme, TRPC2 ne serait pas fonctionnel (pseudogène) (*Montell, 2005*). Une étude au laboratoire a montré que le canal TRPC1 serait localisé au niveau de la membrane du RS et serait assimilé à un canal de fuite (*Berbey et al., 2009*). Cependant dans la littérature il est largement admis que ce canal serait exprimé au niveau de la membrane (*Brinkmeier, 2011*). Leur mode d'activation reste controversé, puisque, selon les différents auteurs, ces canaux seraient soit spontanément actifs au repos, soit activés par un étirement de la membrane (*Allen et al., 2010*), soit activés par la déplétion en Ca^{2+} du RS et auraient alors un mode de fonctionnement proche de celui du couple STIM1/ORAI1 (*Freichel et al., 2001 ; Vandebrouck et al., 2002*).

3.2 Les voies d'extrusion du calcium

Dans la fibre musculaire squelettique au repos, la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$ se situe entre 50 et 100 nM. La $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ est de 2.5 mM et la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ est de l'ordre de 0.5 mM. Le gradient électrochimique pour le Ca^{2+} entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule est donc largement en faveur d'une entrée de Ca^{2+} tandis que ce gradient, est de part et d'autre de la membrane du RS en faveur d'un efflux du RS si l'on considère que le potentiel de membrane du RS est aux alentours de 0 mV. Ainsi, le maintien d'une faible concentration de Ca^{2+} cytosolique de repos nécessite que des processus de recapture du Ca^{2+} expulsent le Ca^{2+} cytosolique soit vers le compartiment externe soit en direction de la lumière du RS. (*Mallouk et al., 2000 ; Allen et al., 2010*). La Ca^{2+} ATPase SERCA assure la fonction de recapture de Ca^{2+} dans le RS. Ses propriétés seront décrites dans le chapitre sur le couplage excitation- contraction. Au niveau de la membrane plasmique, deux principaux transporteurs participent à la régulation du calcium intracellulaire : la pompe Ca^{2+} ATPase du sarcolemme (PMCA : *Plasma Membrane Ca^{2+} ATPase*) et l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX).

Il existe 4 isoformes de PMCA (PMCA 1-4). PMCA1 et 4 sont ubiquitaires, PMCA2 est exprimée dans l'utérus, le foie et les reins mais majoritairement dans le cerveau, et PMCA3 s'exprime dans le cerveau et transitoirement dans le muscle squelettique. Ces pompes sont constituées de 10 segments transmembranaires et la partie C-terminale (intracytoplasmique) possède un site de liaison à la calmoduline qui augmente son affinité pour le Ca^{2+} . Les PMCA fonctionnent grâce à l'hydrolyse de l'ATP et représentent un

transport actif d'extrusion du calcium contre son gradient électrochimique en échange de l'entrée d'un ion proton. Leur activité est très efficace mais leur capacité arrive rapidement à saturation lorsque le calcium intracellulaire augmente fortement (*pour revue, voir Brini et al., 2017*). Enfin, il a été démontré l'existence de molécules capable d'inhiber les PMCA de façon allostérique et appelées *caloxines* (*pour revue, voir Pande et al., 2011*).

L'échangeur NCX fonctionne essentiellement dans le sens de la sortie de 1 ion calcium en échange de l'entrée de 3 ions sodium (*pour revue, voir Blaustein & Lederer, 1999*). Son activité conduit donc au développement d'un courant entrant dépolarisant. Cependant, le sens de ce transport dans les conditions physiologiques est encore controversé puisque l'échangeur est capable de fonctionner dans un mode inverse en présence d'une forte concentration de Na^+ intracellulaire lors d'une dépolarisation membranaire (*Wasserstrom & Vites, 1996 ; Litwin et al., 1998*). Il existe 3 isoformes de NCX, le NCX1, NCX2 et NCX3. NCX1 a été le premier identifié et cloné à partir de tissu cardiaque. Le NCX1 est exprimé au niveau du cerveau et du rein alors que NCX2 et NCX3 sont exprimés dans le cerveau, le rein et le muscle squelettique (*pour revue, voir Brini et Carafoli, 2011*). Leur activité est dépendante de la concentration des ions transportés en particulier du gradient électrochimique de l'ion sodium pour extruder le Ca^{2+} . Cependant, son affinité faible pour le calcium induit une vitesse de prise en charge du calcium plus lente que les pompes PMCA. Le rôle de NCX est bien établi dans la cellule cardiaque. Son rôle dans la cellule musculaire squelettique est moins caractérisé. Cependant, dans le muscle squelettique de souris, l'échangeur pourrait être sollicité lors d'une contraction musculaire prolongée qui induit une forte augmentation intracellulaire de calcium (*Balnave & Allen, 1998*). La création de souris transgéniques NCX3^{-/-} a montré l'importance de cet échangeur dans le muscle squelettique, en particulier dans des conditions de forte $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$ lors d'importantes sollicitations musculaires menant à la fatigue (*Sokolow et al., 2004*).

IV LES MOUVEMENTS DE PROTONS

Dans les conditions physiologiques, le pH extracellulaire est en moyenne de 7.38 et le pH du milieu intracellulaire dans une cellule musculaire au repos est légèrement plus acide et se situe entre 7.09 et 7.33 (*Juel et al., 1990 ; Westerblad & Allen, 1992 ; Street et al., 2001*). Ainsi, il est admis que les protons ne sont pas distribués passivement de part et d'autre de la membrane musculaire car, si tel était le cas, à un potentiel de repos de -80 mV, le pH

intracellulaire devrait s'établir à des valeurs entre 5.8 et 6 afin que E_H soit égal à -80 mV (Juel, 2008). Ces conditions impliquent qu'un influx constant de protons se développe à travers la membrane au repos mais qui est en permanence compensé par l'activité d'extrusion de transporteurs puisque le pH intracellulaire reste à des valeurs proches de la neutralité. Lors d'un exercice musculaire, la $[H^+]_{int}$ augmente rapidement et le pH_i après un effort intense peut diminuer jusqu'à 6.5 (Juel et al., 1990). Plusieurs réactions métaboliques sont responsables d'une production de protons lorsque la cellule musculaire est en activité, notamment la glycolyse, la glycolyse et l'hydrolyse de l'ATP (pour revue, voir Robergs et al., 2004). Des recherches réalisées sur des fibres musculaires cardiaques (grenouille et lapin) et squelettiques pelées (rat) ou sur des fibres musculaires intactes de grenouille ont montré qu'une diminution de pH_i à 6.2 induisait une diminution de l'affinité des myofilaments pour le Ca^{2+} et ralentissait la relaxation des fibres (Fabiato & Fabiato, 1978 ; Blanchard et al., 1984). D'autres études ont montré que la réduction de pH_i diminuait l'activité de la pompe SERCA expliquant ainsi l'augmentation de $[Ca^{2+}]_{int}$ qui survient suite à une acidification intracellulaire (pour revue voir Fitts, 1994). Les effets délétères de l'acidification intracellulaire restent cependant controversés puisqu'en contrepartie, une acidification intracellulaire induirait une diminution de l'activité des canaux Cl^- et augmenterait l'excitabilité membranaire (pour revue, voir Pedersen et al., 2016).

Au repos comme en activité, différents transporteurs permettent de limiter l'acidification intracellulaire. L'antiport Na^+/H^+ et le symport $Na^+-HCO_3^-$ utilisent chacun le gradient électrochimique en faveur d'une entrée de Na^+ pour expulser les protons ou faire entrer des ions HCO_3^- et le symport lactate- H^+ couple l'expulsion du lactate produit pendant l'activité à l'expulsion des protons (Juel, 2008).

4.1 Le transporteur lactate/ H^+

Le lactate et les H^+ sont extrudés de la fibre musculaire squelettique par le co-transporteur des monocarboxylates (MCT : *Monocarboxylate Transporters*). Chez l'Homme, l'isoforme MCT4 est majoritairement retrouvé dans les fibres squelettiques de type II alors que l'isoforme MCT1 s'exprime en proportion plus importante dans les fibres musculaires de type I (Pilegaard et al., 1999). MCT4 permet de transporter un ions H^+ couplé à un ion lactate dans le sens d'une sortie alors que MCT1 est capable de transporter ce même couple soit en dehors de la cellule, soit, au contraire, de les faire entrer dans la cellule avec une stœchiométrie de 1:1 (Brøer et al., 1997). Le transporteur est donc non-électrogénique.

Plusieurs études du groupe de *Becker* ont été déterminantes pour montrer que certaines anhydrases carboniques (AC) étaient capables d'augmenter l'activité des MCT1 et MCT4. Ces études ont surtout été élaborées à partir de la co-expression d'anhydrase carbonique et des co-transporteurs de lactate/H⁺ dans des modèles d'œuf de *Xenope*. Chez les mammifères, on retrouve 16 isoformes d'AC qui sont des catalyseurs de la réaction d'hydratation réversible du CO₂ en HCO₃⁻ et H⁺. Certaines isoformes sont cytosoliques et d'autres sont liés à la membrane plasmique. Dans le muscle squelettique, les ACII et ACIII (cytosoliques) ainsi que l'ACIV (membranaire) sont largement exprimées (*pour revue, voir Supuran et al., 2003*). Le groupe de *Becker* a démontré par exemple que l'ACII est capable de lier la région C-ter de la MCT1 et permet d'augmenter l'activité du transporteur (*Becker et al., 2005*). Leur travail a aussi montré que l'activité de MCT1 et de MCT4 est augmentée en présence de l'ACIV. Cette activité est encore plus importante si l'ACII et l'ACIV sont exprimées ensemble et que les AC cytosoliques et membranaires sont capables de coopérer pour améliorer le transport des lactates/H⁺ (*Klier et al., 2014*).

4.2 L'échangeur Na⁺/H⁺

Il existe trois types d'échangeur Na⁺/H⁺, nommé NHE1-3 (*Sodium-Proton Exchanger 1-3*). NHE1 est l'isoforme exprimée dans le muscle squelettique. Son activité conduit à faire sortir un ion H⁺ contre l'entrée d'un ion Na⁺. Elle est donc non-électrogénique. Chez le rat, son expression est 4 fois supérieure dans des fibres de type IIb que dans des fibres de type I. Chez l'Homme, un exercice de haute intensité (3-4 fois par semaine pendant 8 semaines) augmente de 16% la densité protéique de l'échangeur NHE1 (*Juel et al., 2004*). *Li et al.* (2002) ont exprimé le NHE1 dans un modèle de lignée cellulaire et démontré que la ACII possède un site de fixation sur la partie C-ter de NHE1. L'utilisation d'un inhibiteur de la ACII (acétazolamide) induit ainsi une diminution de l'extrusion des H⁺ par le NHE1. Au repos, son activité est très faible et augmente fortement durant un exercice. L'utilisation de l'amiloride comme inhibiteur du NHE1 a démontré que le pH_i de repos était plus acide que dans une condition où le NHE1 n'était pas inactivé (*Juel, 1998*).

Chapitre III

Couplage Excitation-Contraction

Le couplage excitation-contraction (CEC) correspond à la série d'événements qui se succèdent depuis la propagation du potentiel d'action sur la membrane de la fibre musculaire squelettique jusqu'à l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire responsable du déclenchement du phénomène contractile (*Franzini-Armstrong & Jorgensen, 1994*). Le CEC implique les deux systèmes membranaires décrits ci-dessus : les tubules transverses, en continuité électrique avec le sarcolemme, et le réticulum sarcoplasmique (RS). La dépolarisation du sarcolemme puis de la membrane tubulaire par un potentiel d'action qui s'y propage déclenche au niveau de la triade la libération de Ca^{2+} par le RS. Le CEC implique principalement deux complexes protéiques que sont le récepteur aux dihydropyridines (DHPR) et le récepteur à la ryanodine de type 1 (RyR1) (*pour revue, voir Dulhunty, 2006*).

I LE RECEPTEUR AUX DIHYDROPYRIDINES

En réponse à l'excitation de la cellule musculaire par son motoneurone, des trains de potentiels d'action sont générés à la plaque motrice. Ces potentiels d'action se propagent de proche en proche sur la membrane de surface et en profondeur le long des tubules transverses. L'évènement initiateur du processus de couplage est un changement de configuration du DHPR déclenché par la dépolarisation membranaire.

1.1 Architecture moléculaire du DHPR

L'appellation DHPR fait référence aux 1,4-dihydropyridines, molécules utilisées dans le traitement de l'hypertension, qui après radio-marquage ont permis d'identifier des sites de forte affinité au niveau des tubules transverses (*Fosset et al., 1983*). Bien que le DHPR soit aussi présent dans la membrane de surface, c'est au niveau des tubules transverses que sa densité est la plus importante (*Jorgensen et al., 1989*). D'ailleurs, la perte de continuité électrique entre la membrane de surface et la membrane tubulaire suite à une détubulation par un choc osmotique inhibe totalement le processus de couplage (*Gage & Eisenberg, 1969 ; Zachar et al., 1972*). Les DHPR se regroupent par groupes de 4 nommés tétrades (*Block et al., 1988 ; Protasi et al., 2002*). Le DHPR est un hétéropentamère de 550 kDa composé d'une

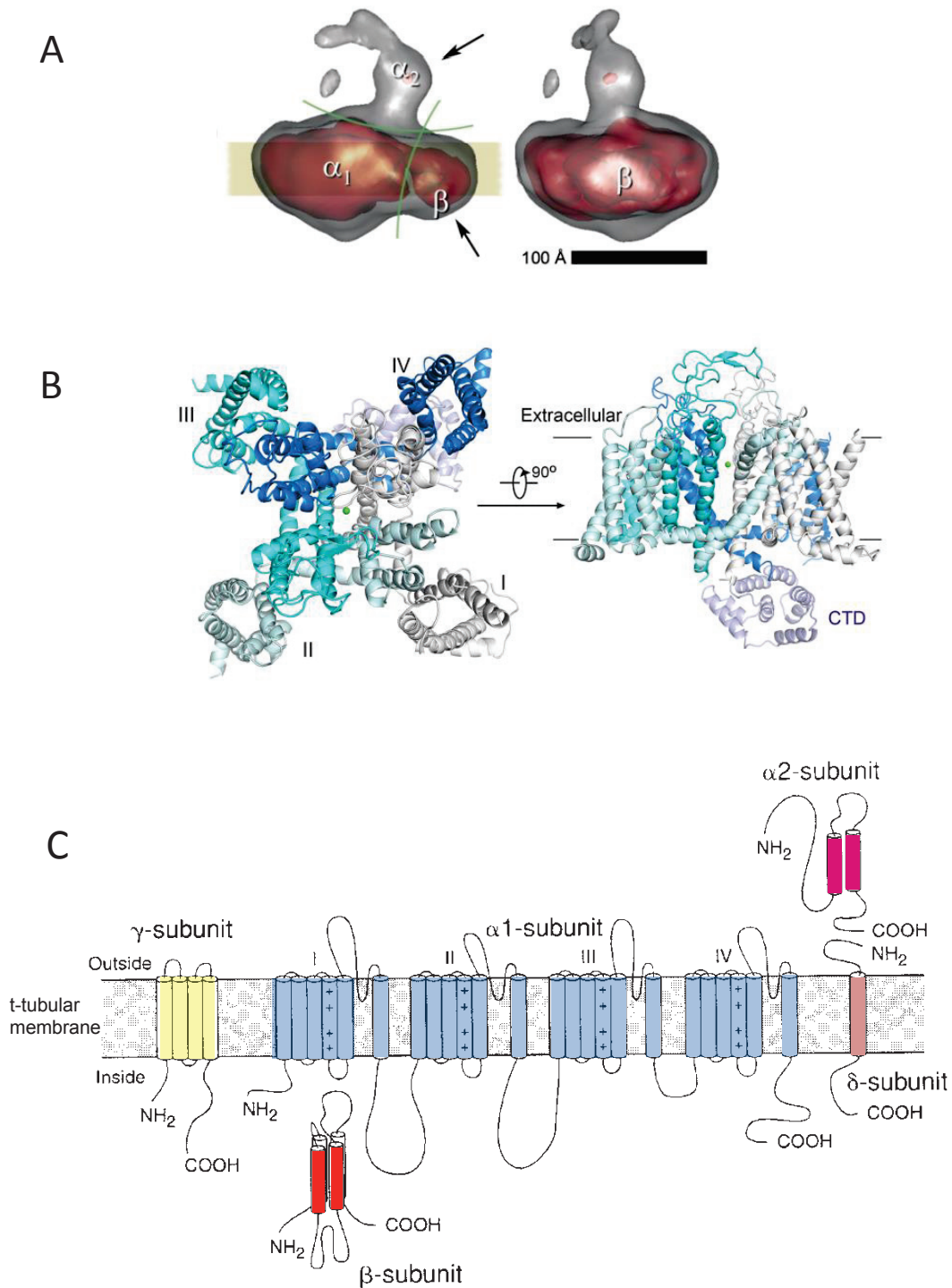


Figure 7 : Structure tridimensionnelle de la sous-unité $\alpha 1S$ de lapin et organisation membranaire.

- A. Observation de la sous-unité $\alpha 1S$ de lapin à une résolution de 23 Å. Les deux flèches représentent les sous-unités β et $\alpha 2\delta$. D'après *Wolf et al., 2003*.
- B. Structure 3D de la sous-unité $\alpha 1S$ de lapin à une résolution de 3.6 Å. D'après *Wu et al., 2016*.
- C. Organisation membranaire de la sous-unité $\alpha 1S$. Elle est composée de 4 domaines homologues (I-IV) constitués eux-mêmes de 6 segments transmembranaires (S1-S6). Les segments S4 sont composés de 5-6 acides aminés chargés positivement et constituent les détecteurs de potentiel de la sous-unité. Les boucles reliant les segments S5 et S6 composent les parois du pore. Le schéma indique aussi l'organisation des autres sous-unités accessoires du DHPR.

sous-unité $\alpha 1S$ encore appelée $Ca_v1.1$, des sous-unités $\alpha 2-\delta$, d'une sous-unité β et d'une sous-unité γ (*pour revue, voir Catterall, 2011*) et sa formation nécessite 44 exons. La structure tridimensionnelle du DHPR du lapin a d'abord été proposée par *Wolf et al. (2003)* à une résolution de 23 Å par microscopie cryo-électronique. *Wu et al. (2015, 2016)* ont successivement établi la structure tridimensionnelle de celui-ci à une résolution de 4.2 puis de 3.6 Å suivant la même technique (Figure 7A et 7B).

1.1.A Cav1.1

$Ca_v1.1$ ou sous unité $\alpha 1S$ est exclusivement exprimée dans le muscle squelettique (*pour revue, voir Bannister & Beam, 2013*). $Ca_v1.1$ a été le premier membre de la famille des Ca_v à avoir été cloné (*Tanabe et al., 1987*). $Ca_v1.1$ est codée par le gène CACNA1S (*Calcium Channel $\alpha 1$ skeletal muscle*) situé sur le chromosome 1 en position q32 et contient 1873 acides aminés. Elle représente la sous-unité principale de ce DHPR et assure une fonction de canal calcique à travers lequel diffusent des ions calcium mais aussi une fonction de détecteur de potentiel (*voltage sensor*) capable de coupler avec le récepteur de la ryanodine (voir ci-après) (*Rios & Pizarro, 1991 ; Melzer et al., 1995 ; Schneider et al., 1994*). Cette sous-unité est composée de 4 domaines membranaires (I, II, III, IV) reliés entre eux par des boucles cytoplasmiques (Figure 7C). Chacun des domaines comprend 6 segments transmembranaires de S1 à S6 (*Catterall, 2011*) qui sont connectés entre eux par des boucles extracellulaires ou intracellulaires qu'on nomme « linker ». Les boucles entre les segments S5-S6 de chaque domaine constituent les parois du pore du canal calcique (*pour revue, voir Varadi et al., 1999*). Les segments S4 contiennent 19 acides aminés et entre 5 et 6 d'entre eux sont des arginine ou lysine, acides aminés chargés positivement (*Catterall, 1995*). La présence de ces résidus chargés confère la sensibilité au voltage de $Ca_v1.1$. Ainsi, en conditions de potentiel imposé sur fibre isolée, il est possible de mesurer un déplacement des segments S4 dans le sens sortant sous la forme d'un petit courant appelé mouvement de charges intramembranaires détectable lorsque toutes les conductances ioniques sont bloquées (*Schneider & Chandler, 1973 ; Collet et al., 2003*). C'est d'ailleurs l'inhibition de ces courants par la nifédipine, une molécule de la famille des dihydropyridines, qui a permis initialement de proposer l'existence d'un DHPR en tant qu'initiateur du CEC dans la fibre musculaire de grenouille (*Rios & Brum, 1987*).

1.1.B Les sous-unités $\alpha 2$ - δ

Ces deux sous-unités proviennent du même gène (CACNA2D1 du chromosome 7q21.11) (De Jongh et al., 1990) et sont par la suite clivées (Jay et al., 1991). La sous-unité $\alpha 2$ (extracellulaire) est liée par un pont disulfure à une plus petite sous-unité δ (extracellulaire) fixée à la membrane par une ancre GPI. Ces sous-unités auraient un rôle dans le trafic membranaire de la sous-unité $\alpha 1S$ (Canti et al., 2005). Cependant, Obermair et al. (2005) ont montré qu'elles ont aussi une action régulatrice sur la densité du courant calcique de même que sur sa cinétique. Une perte de ces sous-unités n'induit pas de modification dans l'expression triadique du $Ca_v1.1$. De plus, bien que $\alpha 2$ - δ ne soient pas essentielles au CEC, elles auraient un rôle important dans la libération soutenue de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique en réponse à des dépolarisations prolongées ou des trains de potentiels d'action (Gach et al., 2008) (Figure 7C).

1.1.C La sous-unité $\beta 1$

Cette sous-unité provient du gène CACNB1 situé sur le chromosome 17 (q12). L'absence de la sous-unité $\beta 1$ induit une mort précoce à la naissance chez la souris. Cependant, des études menées dans des modèles différents tels que des lymphocytes, des myotubes ou encore chez le zebrafish montrent que $\beta 1$ permet de moduler le couplage excitation-contraction ainsi que le trafic du $Ca_v1.1$ jusqu'à la surface membranaire (Varadi et al., 1991 ; Lacerda et al., 1991 ; Gregg et al., 1996 ; Strube et al., 1996 ; Schredelseker et al., 2005). La sous-unité $\beta 1$ s'associe à la sous-unité principale au niveau de la boucle entre les domaines I et II (Pragnell et al., 1994 ; Van Petegem et al., 2004). Plus particulièrement la délétion des résidus 489 à 503 (C-terminal) de la sous-unité $\beta 1$ induit une réduction du relargage de Ca^{2+} dans le cytoplasme et une importante diminution du courant calcique de DHPR démontrant ainsi l'importance de la sous-unité $\beta 1$ dans l'interaction structurale entre $\alpha 1S$ et Ryr1 (Rebeck et al., 2011 ; Eltit et al., 2014) (Figure 7C)

1.1.D La sous-unité γ

$\gamma 1$ est codée par le gène CACNG1 dans le chromosome 17 (q24). Les souris dont le gène CACNG1 a été invalidé sont viables et morphologiquement normales bien que le courant Ca^{2+} soit plus important et que la cinétique d'inactivation du canal soit altérée en comparaison à des souris contrôles (Freise et al., 2000 ; Held et al., 2002). Il est avancé que cette sous-unité aurait un rôle endogène inhibiteur sur le courant calcique, protégeant ainsi la

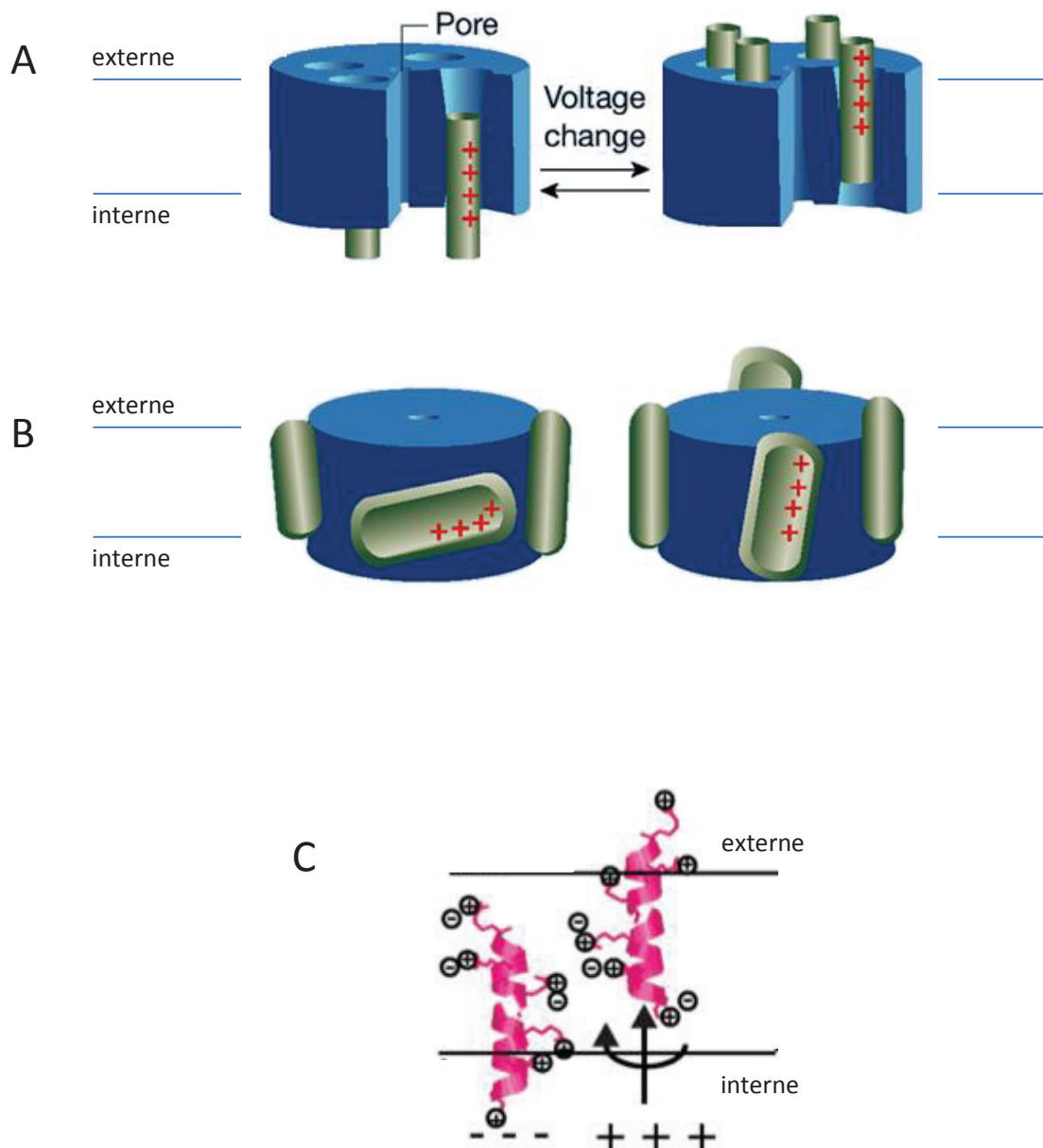


Figure 8 : Modélisation du mouvement des S4 lors de l'ouverture d'un canal voltage-dépendant

- A. Modèle *sliding helix* proposé par Catterall, 1986. Les segments S4 sont représentés en vert et se déplacent du côté interne de la membrane vers le côté externe de la membrane.
- B. Modèle *paddle* proposé par Jiang et al., 2003. Les segments S4 en vert se déplacent en pivotant vers le côté externe de la membrane et sont étroitement liés à la partie la plus interne du segment S3.
- C. Modèle *helix screw* proposé par Guy & Sheeramavu, 1986. Un segment S4 est représenté en rose et se déplace du côté interne de la membrane vers le côté externe en suivant un mouvement de rotation autour de son grand axe.

Modifiées à partir de : Blaustein & Miller, 2004 et Elinder et al., 2007

cellule musculaire d'une forte entrée de calcium lors d'une activité musculaire intense (Andronache et al., 2007) (Figure 7C).

1.2 La fonction de détecteur de potentiel du DHPR

Beam et al. (1986) ont montré qu'une mutation létale de type *muscular dysgenesis* (mdg) chez la souris conduisait à une extinction du CEC et une absence de courant calcique lent dans les myotubes. Un an plus tard le groupe de Numa a cloné le DHPR dans le muscle squelettique de lapin et proposé qu'il assurait le rôle de détecteur de potentiel du couplage EC et de canal calcique dans le tubule transverse. Plus tard, le même groupe a révélé que la réexpression de la sous-unité $\alpha 1S$ du DHPR dans des myotubes dysgéniques, modèles dans lesquels il s'est avéré que la sous-unité $Ca_v1.1$ n'était pas exprimée, permettait de restaurer le CEC, les mouvements de charges intramembranaires et le courant calcique de type L, définissant ainsi définitivement le DHPR comme l'acteur principal initiateur du CEC (Tanabe et al., 1990 ; Adams et al., 1990). En revanche, contrairement aux canaux sodiques ou potassiques voltage-dépendants, la très grande difficulté à exprimer la sous-unité $Ca_v1.1$ dans des systèmes hétérologues n'a pas permis d'étudier en détail la fonction de détecteur de potentiel de $Ca_v1.1$. La grande similitude de structure entre les domaines membranaires de $Ca_v1.1$ et les domaines membranaires des sous-unités α respectivement des canaux K^+ ou Na^+ suggère néanmoins que la dépolarisation induit des changements de configuration de $Ca_v1.1$ similaires à ceux des autres canaux voltage-dépendants. Les récentes données de microscopie cryo-électronique obtenues sur le DHPR ont d'ailleurs tendance à le confirmer (Wu et al., 2016). Dans les canaux K^+ , les segments S1-S4 de chaque domaine constituent le domaine de sensibilité au voltage dans son ensemble (en anglais *Voltage-Sensing-Domain* : VSD). Les segments S1 à S3 contiennent des acides aminés chargés négativement (acide aspartique (D), acide glutamique (E)) et des acides aminés aromatiques (tryptophane (W), phénylalanine (F) ou tyrosine (Y)) hautement conservés. Ces acides aminés constituent le GCTC pour « *Gating-Charge Transfert Center* » et sont suspectés stabiliser le VSD (Tao et al., 2010).

Yang & Horn (1995) ont étudié le mouvement des segments S4 dans le canal sodique voltage-dépendant $Na_v1.4$ et montrent que ces mouvements permettent un changement de conformation du canal qui induit l'ouverture du pore. Plus précisément, deux charges du segment S4 se déplaceraient de la partie interne de la membrane vers le côté extracellulaire

| Famille des Ca_v 's | Nomenclature et type de courant | Gène | Lieu principal d'expression tissulaire |
|-----------------------|---------------------------------|---------|--|
| Ca_v1 | $Ca_v1.1$ Type L | CACNA1S | Muscle squelettique |
| | $Ca_v1.2$ Type L | CACNA1C | Muscle cardiaque / Muscle lisse / Cerveau |
| | $Ca_v1.3$ Type L | CACNA1D | Cerveau / Nœud atrioventriculaire / Rein |
| | $Ca_v1.4$ Type L | CACNA1F | Photorécepteurs de la Rétine |
| Ca_v2 | $Ca_v2.1$ Type Q/P | CACNA1A | Cellules de Purkinje / Cochlée |
| | $Ca_v2.2$ Type N | CACNA1B | Cerveau |
| | $Ca_v2.3$ Type R | CACNA1E | Cerveau / Muscle cardiaque / Rétine / Cochlée |
| Ca_v3 | $Ca_v3.1$ Type T | CACNA1G | Cerveau |
| | $Ca_v3.2$ Type T | CACNA1H | Cerveau / Rein / Foie / Muscle cardiaque / Muscle squelettique (fœtus) |
| | $Ca_v3.3$ Type T | CACNA1I | Cerveau |

Tableau 2 : Nomenclature des canaux calciques voltage-dépendants

Les canaux sont classés selon une nomenclature rationalisée qui s'inspire de la nomenclature des canaux potassiques voltage-dépendants. Dans ce tableau, les canaux sont organisés en fonction de leur famille d'appartenance qui fait référence à leur sous-unité α et leur type de courant.

D'après Ertel et al., 2000 ; Zamponi et al., 2015

(Yang *et al.*, 1996). Le mouvement de ces S4 a fait sujet à de nombreux débats et trois modèles ont été proposés au cours de ces dernières années (Figure 8). Le modèle « *sliding helix* » de Catterall (1986), le modèle « *helical-screw* » de Guy & Seetharamulu (1986) et enfin le modèle « *paddle* » de Jiang (2003). Le modèle du mouvement des segments S4 serait en réalité un mixte des trois modèles précédents proposés (Delemotte *et al.*, 2011). En parallèle, sur le plan structural, la cristallisation du canal potassique KcsA (canal potassique de bactérie *Streptomyces lividans*) puis plus tard de K_v1.2 ont contribué à mieux comprendre les structures moléculaires des canaux voltage-dépendants et amélioré les connaissances concernant le passage des ions à travers le filtre de sélectivité (Doyle *et al.*, 1998 ; Jiang *et al.*, 2001 ; Long *et al.*, 2005).

1.3 La fonction de canal calcique du DHPR

En parallèle de la fonction de *voltage sensor*, Ca_v1.1 a aussi une fonction de canal calcique voltage-dépendant. Il existe 10 gènes distincts qui codent pour des canaux calciques voltage-dépendants chez l'Homme répartis en 3 groupes, les Ca_v1, les Ca_v2 et les Ca_v3. Une nomenclature rationalisée (tableau 2) prenant exemple sur la nomenclature des canaux potassiques voltage-dépendants est à présent admise (Chandy & Gutman, 1993 ; Ertel *et al.*, 2000). Le « Ca » fait référence aux ions calcium qui passent à travers le canal et le « v » fait référence à leur dépendance au voltage. La nomenclature des gènes suit cette même logique, les lettres « CN » traduisent « *channel* » et l'initiale « A1 » suivi d'une lettre est attribuée aux canaux afin de définir leur sous-unité principale « α » et le type de courant.

Comme dans la plupart des canaux Ca_v, le rapport de perméabilité pour le Ca²⁺ contre le Na⁺ ou contre le K⁺ est supérieur à 1000 et la vitesse maximale de passage des ions Ca²⁺ est de 10⁶ ions/s (*pour revue, voir Sather & McCleskey, 2003*). La présence d'un résidu glutamate (motif EEEE) par domaine situés dans les boucles S5-S6 (domaine I : position 292, domaine II : position 614, domaine III : position 1014, domaine IV : position 1323) conditionne la sélectivité du canal aux ions divalents tels que le Ca²⁺, Ba²⁺, Mg²⁺ et le Sr²⁺ (Yang *et al.*, 1993 ; Ellinor *et al.*, 1995 ; Wu *et al.*, 2016).

Les canaux calciques Ca_v1.1 transitent par trois états. L'état « fermé », l'état « ouvert » où les ions calcium peuvent passer à travers le canal et produire ainsi un courant mesurable et l'état « inactivé » correspondant à un état non conducteur différent de l'état fermé. Le passage d'un état à l'autre est voltage- et temps-dépendant. Ca_v1.1 génère des courants à haut seuil

d'activation ou HVA (*High Voltage Activated*) et de type L pour Long-lasting. Les caractéristiques électrophysiologiques de ce canal dans le muscle squelettique sont les suivantes : le seuil d'activation du canal se situe autour de -30 mV, le potentiel de demi-activation ($E_{1/2}$) se situe entre -10 et 0 mV, le potentiel d'inversion (E_{rev}) est proche de 66 mV et la pente (k) est de 6.2 mV. La conductance maximale macroscopique dans des fibres musculaires adultes se situe entre 55 et 200 S/F en présence d'une $[Ca^{2+}]_{ext}$ physiologique (2 à 2.5 mM). La cinétique de ce canal est relativement lente, la constante d'activation qui représente le temps en ms pour atteindre le courant maximal est d'environ 100 ms et la constante d'inactivation est d'environ 1 s (*Szentesi et al., 2001 ; Collet et al., 2003*).

1.4 Pharmacologie du DHPR

Le DHPR est sensible aux dihydropyridines (DHP) qui peuvent avoir un rôle agoniste sur le canal comme le Bay K 8444, ou un rôle antagoniste comme la nifédipine. Enfin, certains ions divalents ou trivalents tels que le Nickel (Ni^{2+}), le Cadmium (Cd^{2+}), le Cobalt (Co^{2+}), le lanthane (La^{3+}), le Gadolinium (Gd^{3+}) agissent comme des bloqueurs puisqu'ils présentent une perméabilité très faible (*Bannister et al., 2009 et pour revue, voir Jones 1998*).

II LE RECEPTEUR A LA RYANODINE

Le RyR est un canal calcique ancré dans la membrane du réticulum sarcoplasmique responsable de la libération de calcium dans le cytosol. Le récepteur à la ryanodine a été nommé ainsi car celui-ci est capable de lier avec forte affinité la molécule de ryanodine, un alcaloïde végétal provenant de la plante *Ryania*. Il existe trois isoformes de récepteurs à la ryanodine, RyR1, RyR2 et RyR3. RyR1 est l'isoforme majoritairement exprimée dans le muscle squelettique chez le mammifère et l'Homme (*Takeshima et al., 1989 ; Zorzato et al., 1990*). La technique de réincorporation du canal RyR1 dans des bicouches lipidiques a permis d'étudier les caractéristiques fonctionnelles de ce canal et ainsi d'évaluer la conductance de ce canal à environ 110 pS (en présence de 54 mM de Ca^{2+} du côté luminal) (*Smith et al., 1988*).

2.1 Structure de RyR1

RyR1 est un homotétramère de 2.2 MDa dont chaque tétramère fait environ 565 kDa. Le gène codant pour RyR1 a été cloné dans le muscle de lapin, puis le muscle humain

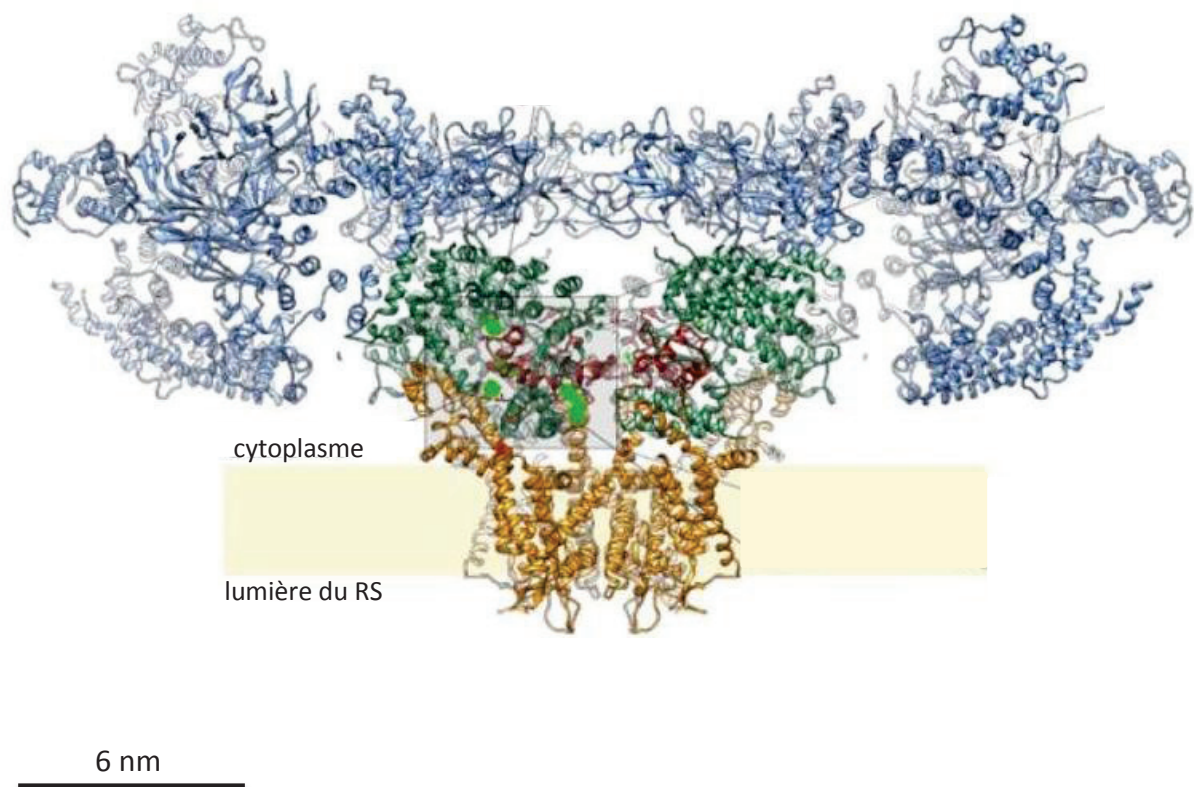


Figure 9 : Le récepteur de la ryanodine

Reconstruction tridimensionnelle du récepteur à la ryanodine 1. Les régions verte et bleue représentent la large partie cytoplasmique tandis que la région orange correspond à la portion transmembranaire qui inclut le pore. RyR1 est vu de profil inséré dans la membrane.

D'après : *Clarke & Hendrickson, 2016*

(*Takeshima et al., 1989 ; Zorzato et al., 1990*). Ce proéminent canal en forme de champignon est ancré dans la membrane des citernes terminales du RS au niveau de la zone jonctionnelle faisant face aux tubules transverses dont 80% de sa masse est contenue dans le cytosol (*Wagenknecht & Samsó, 2002*). Chaque tétramère est constitué de 6 segments transmembranaires dont les segments S5-S6, le segment P et le segment *helix* de chaque tétramère forment le domaine pore du canal. Les segments S1-S4 forment un « *pseudo VSD* » et interagissent avec le domaine pore de chacune des sous-unités adjacentes. Les boucles N-terminales de chaque sous-unité sont très volumineuses et traversent presque tout l'espace triadique donnant naissance à des structures appelées pieds qui représentent la structure cytoplasmique de ce canal. Ces données structurales ont été mises en évidence grâce aux techniques de cryo-microscopie électronique (*Zalk et al., 2015 ; Yan et al., 2015 ; Clarke & Hendrickson, 2016 ; et pour revue, voir Samsó, 2017*) (Figure 9).

2.2 Régulation de RyR1

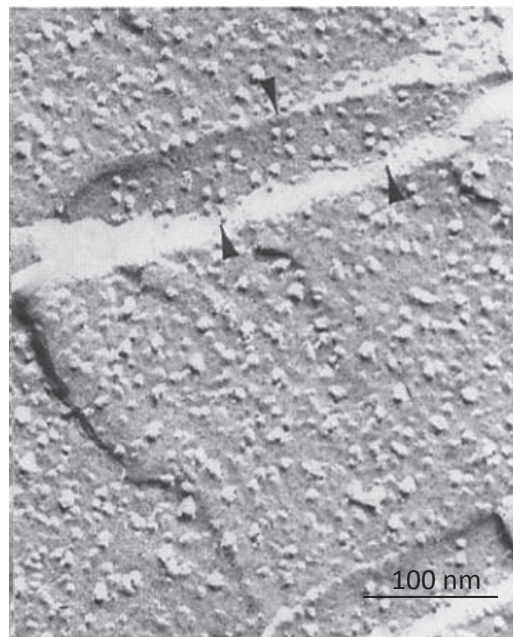
2.2.A Régulation par les petites molécules : ATP, Ca²⁺, Mg²⁺ et H⁺

La technique de réincorporation du canal RyR1 dans des bicouches lipidiques a montré un effet activateur de l'ATP sur RyR1. L'ouverture maximale nécessite cependant la présence conjointe de Ca²⁺ (*Smith et al., 1986*). Le calcium induit des effets opposés sur le canal RyR1 selon sa concentration côté cytosolique. En effet, RyR1 est activé par des concentrations micromolaires de Ca²⁺. Ce phénomène est qualifié de Ca²⁺-induced Ca²⁺ release. En revanche, lorsque la concentration est de l'ordre de plusieurs centaines de micromolaires, les RyR1 sont inhibés (*Meissner et al., 1997*).

On attribue au Mg²⁺ un rôle antagoniste sur les RyRs puisque celui-ci entre en compétition avec le Ca²⁺ sur les sites de liaison au calcium (les sites A) et permet la fermeture des RyRs après que ces derniers aient été activés par l'ATP (en absence de Ca²⁺). Cependant, le Mg²⁺ a aussi un rôle inhibiteur direct puisqu'il est capable de se lier sur des sites distincts des sites calciques et induire la fermeture des RyRs (*Laver et al., 2004*).

Enfin, plusieurs études réalisées dans les années 90 ont montré qu'une réduction de pH intracellulaire ou dans le RS induisait une diminution de la probabilité d'ouverture des RyRs et une diminution de sa conductance (*Ma et al., 1988 ; Rousseau & Pinkos, 1990*). L'IC50 est atteinte pour un pH cytoplasmique d'environ 6.5 (*Laver et al., 2000*).

A



B

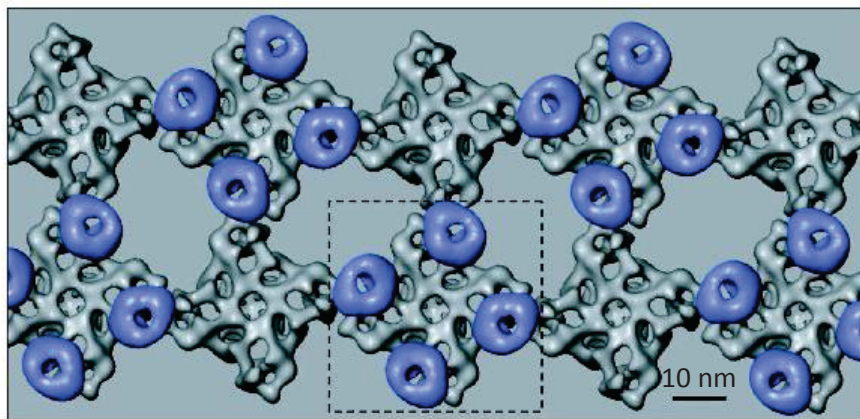


Figure 10 : Présentation des tétrades de DHPR et de leur interaction physique avec les RyR1

A. Observation au microscope électronique de tétrades de DHPR disposées en quinconce (têtes de flèche).

B. Modèle en 3D de l'agencement en face à face des tétrades de DHPR (en bleu) et des RyR1 (en gris). Un RyR1 sur deux est couplé avec 1 tétrade de DHPR.

D'après : *Block et al., 1988*

D'après : *Serysheva, 2004*

2.2.B Pharmacologie de RyR1

- De nombreuses substances pharmacologiques sont capables de contrôler l'activité du canal et sont couramment utilisées en laboratoire. En condition de réincorporation en bicouches lipidiques, la ryanodine à faible concentration (10 nM) augmente la probabilité d'ouverture des RyR1 alors qu'une forte concentration (50-150 μ M) bloque le canal (*Meissner, 1986 ; Nagasaki & Fleischer 1988*). En revanche, sur une fibre musculaire intacte, la ryanodine induit de manière dose-dépendante une ouverture partielle du canal au potentiel de repos capable de vider les réserves calciques du RS (*Collet & Jacquemond, 2002*).
- Le dantrolène se comporte comme un inhibiteur de RyR1 qui bloque le relargage de calcium contenu dans le RS (*Hainaut & Desmedt, 1974*). Il est utilisé comme traitement d'urgence en anesthésie pour enrayer la libération exacerbée de Ca^{2+} déclenchée par les anesthésiques halogénés dans les crises d'hyperthermie maligne (*Kolb et al., 1982*).
- Le 4-chloro-m-crésol (4-CmC) et la caféine se comportent comme des agonistes des RyRs capables de provoquer leur ouverture (*Zorzato et al., 1993 ; Rousseau et al., 1988*).

III INTERACTIONS DHPR - RYR1

3.1 Régions d'interaction DHPR-RyR1

L'hypothèse actuellement la plus défendue propose que le CEC du muscle squelettique passe par une interaction directe entre le DHPR et RyR1. Des données de microscopie électronique ont tout d'abord révélé que des structures tétraédriques, correspondant vraisemblablement aux RyR1, étaient distribuées en deux rangées parallèles sur la partie jonctionnelle du RS faisant face aux tubules transverses (*Block et al., 1988*). Côté tubule, la même étude a montré que des groupes de 4 particules nommés tétrades, correspondant vraisemblablement à des groupes de quatre DHPR, étaient eux aussi disposés en deux rangées parallèles mais en quinconce. A l'issue de ce travail, il a été proposé qu'un RyR1 sur deux se trouve face à une tétrade de DHPR, suggérant ainsi une interaction directe entre le canal calcique du RS et quatre DHPR (Figure 10). Selon ce modèle de couplage mécanique, la dépolarisation induirait un changement de conformation du DHPR qui lui-même déclencherait directement l'ouverture de RyR1. La disposition particulière des tétrades de DHPR en quinconce laisserait 50% des RyR1 non couplés aux DHPR. Il est vraisemblable

que les RyR1 non couplés sont activés par le calcium libéré par les RyR1 couplés adjacents via le phénomène de Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release (*Endo et al., 2009*). Des expériences d'expression de sous-unités $\alpha 1$ chimères associant différentes régions appartenant soit à $\alpha 1\text{S}$ squelettique soit à $\alpha 1\text{C}$ cardiaque dans des myotubes dysgéniques (mdg) ont proposé que l'interaction DHPR/RyR1 impliquerait majoritairement la boucle entre les domaines II et III de $\text{Ca}_v1.1$ (*Nakai et al., 1998*). L'utilisation de peptides de synthèse composés des acides aminés appartenant à cette boucle ont parallèlement indiqué que deux régions spécifiques dans cette boucle notées peptide A (671-690) et peptide C (724-760) étaient capables respectivement soit de déclencher la libération de Ca^{2+} par des vésicules isolées de RS soit de l'inhiber (*El-Hayek et al., 1995*). Plus tard, *Wilkins et al. (2001)* et *Kugler et al. (2004)* ont prouvé que le peptide C était vraisemblablement un activateur de la libération de calcium au même titre que le peptide A et que les résidus 739 (alanine), 741 (phénylalanine), 742 (proline) et 744 (asparagine) étaient essentiels pour le couplage. En utilisant le modèle de myotubes mdg et l'expression de chimères $\alpha 1\text{S}$ et C, *Nakai et al. (1998)* ont montré que l'insertion des acides aminés 725 à 742 de la boucle II-III squelettique dans une matrice $\alpha 1\text{C}$ cardiaque permettait de déclencher un couplage de type squelettique, suggérant ainsi que cette région de la boucle exercerait une action activatrice sur RyR1 au même titre que le peptide A.

Une interaction entre RyR1 et la boucle entre les domaines III et IV a été décrite et des mutations dans cette boucle induisent une altération de la voltage-dépendance de CEC suggérant que cette région est directement impliquée dans la transmission du signal entre le DHPR et RyR1 (*Bannister et al., 2008*). Enfin, la sous-unité $\beta 1\text{S}$ s'est avérée interagir avec RyR1 dans sa partie C-terminale (*Beurg et al., 1999*), au niveau des acides aminés 3201-3661 du RyR1 et permettrait d'augmenter le signal initialement activé par la boucle II-III de l' $\alpha 1\text{S}$ (*Cheng et al., 2005*).

3.2 La voltage-dépendance du CEC

Le couplage E-C est un processus voltage-dépendant et la libération de calcium du RS est contrôlée par le potentiel de membrane. Lors d'une dépolarisation membranaire, la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$ augmente subitement puis lorsque le potentiel de membrane retourne à la valeur de repos, la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$ diminue pour revenir à une valeur de repos. Ce phénomène est appelé « transitoire calcique ». Dans des fibres musculaires squelettiques de souris adultes, le potentiel seuil de détection d'un transitoire calcique est entre -40 et -55 mV (*Delbono et al.,*

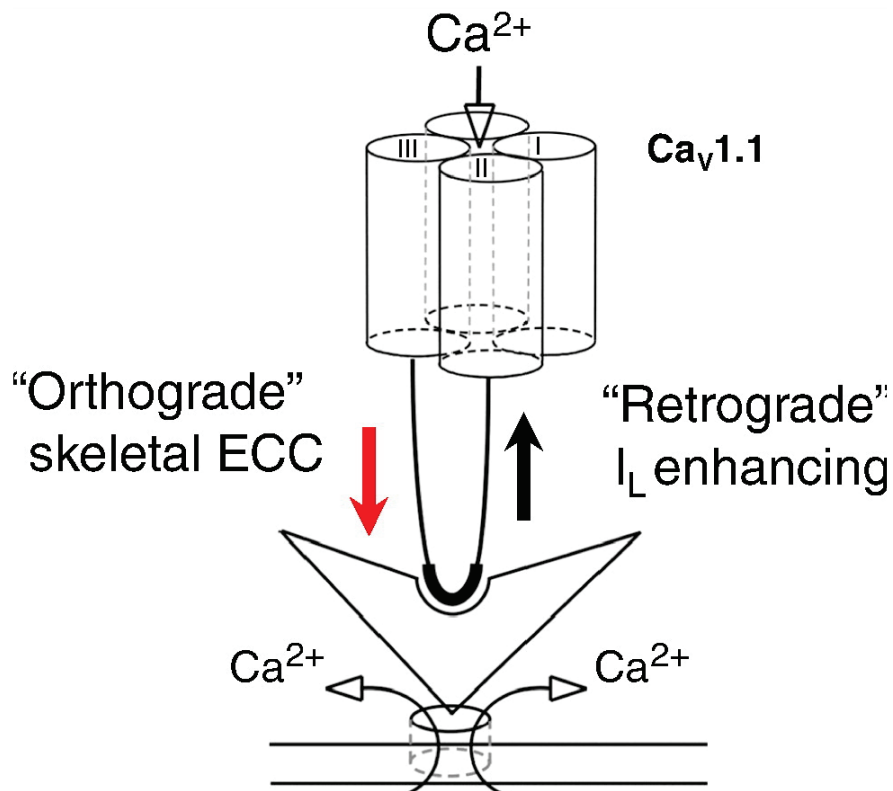


Figure 11: Couplage bidirectionnel entre DHPR et RyR1

La communication entre le DHPR et le RyR1 est bidirectionnelle. Le signal orthograde est représenté par la flèche rouge et indique que $\text{Ca}_v1.1$ contrôle l'ouverture de RyR1. Le signal rétrograde est symbolisé par la flèche noire et indique que l'activité de RyR1 conditionne l'amplitude du courant calcique à travers $\text{Ca}_v1.1$.

D'après : *Bannister & Beam, 2013*

1993 ; Jacquemond, 1997). Cette libération de calcium par le RS n'est pas soutenue dans le temps et subit un processus d'inactivation (Miledi et al., 1983). Dans le cas d'activations prolongées, la déplétion calcique du RS pourrait aussi contribuer à l'effondrement progressif du transitoire calcique (Robin & Allard, 2013). Les processus d'activation et d'inactivation du CEC sont médiés par les mouvements de charges intramembranaires des segments S4 que nous avons déjà présentés dans le paragraphe 1.1.A. En effet, les mouvements de charges déclenchés par la dépolarisation précèdent la libération de calcium et augmentent avec la même voltage-dépendance que les transitoires calciques (Kovacs et al., 1979 ; Melzer et al., 1986). Le contrôle voltage-dépendant de l'ouverture de RyR1 est assuré par le DHPR. La probabilité d'ouverture de RyR1 au potentiel de repos n'est cependant pas nulle puisque dans ces conditions de repos une fuite de Ca^{2+} permanente du RS se développe. Le contrôle du DHPR sur RyR1 semble aussi s'exercer sur des gammes de potentiel proches du potentiel de repos et contrôler ainsi la fuite calcique du RS (Robin & Allard, 2012).

3.3 Couplage bidirectionnel entre le DHPR et RyR1

L'observation selon laquelle l'amplitude du courant Ca^{2+} lent à travers le DHPR était réduite de 30 fois dans des myotubes dyspédiques (dépourvus de RyR1) a permis de montrer que l'interaction entre le DHPR et le RyR1 était bidirectionnelle (Nakai et al., 1996) (Figure 11). On définit ainsi un couplage orthograde dans lequel l'activation du RyR1 est induite par le changement de conformation du DHPR et un couplage rétrograde dans lequel la présence et/ou l'activité de RyR1 contrôle la fonction de canal calcique du DHPR. Des conditions expérimentales identiques à celles utilisées avec des myotubes mdg pour mettre en évidence le rôle de la boucle II-III dans le couplage orthograde ont permis de montrer qu'une région équivalente de la boucle II-III était impliquée dans le couplage rétrograde (Grabner et al., 1999 ; Bannister & Beam, 2009). Enfin, des expériences d'expression de RyR chimères associant différentes régions appartenant soit à RyR1 squelettique soit à RyR2 cardiaque dans des myotubes dyspédiques ont proposé que les couplages orthograde et rétrograde impliquent majoritairement la région de RyR1 comprise entre les acides aminés 1635 et 2636 (Nakai et al., 1998).

Le Ca^{2+} extracellulaire, par sa seule présence, module le CEC. Pizarro et al. (1989) ont démontré l'existence d'un site de fixation externe au niveau du DHPR nommé *priming site* qui doit être occupé par le Ca^{2+} pour que le couplage soit fonctionnel. Ainsi, l'absence de Ca^{2+} externe réduit l'amplitude des transitoires calciques, déplace les courbes de son

activation vers des valeurs de voltage négatives mais aussi potentialise la fuite de Ca^{2+} du RS de repos (Robin & Allard, 2012). Le rôle de l'entrée de calcium à travers le DHPR déclenchée par la dépolarisation reste controversé. Deux souris transgéniques portant une mutation de $\text{Ca}_v1.1$ conduisant à un canal calcique non-conducteur ont été générées. Il a été montré sur l'une de ces souris que l'absence de courant calcique n'induisait aucune modification du CEC, suggérant ainsi que cet influx calcique ne joue aucun rôle (Dayal et al., 2017). Sur l'autre de ces souris et des expériences de mesure de Ca^{2+} dans la lumière du RS sur des souris contrôles ont au contraire démontré que l'influx de Ca^{2+} à travers le DHPR contribuait à maintenir les réserves de Ca^{2+} du RS (Lee et al., 2015 ; Robin & Allard, 2015).

Un grand nombre de protéines identifiées à la triade et qualifiées d'accessoires ou de mineures se sont révélées capables soit de moduler le processus de CEC soit de conditionner l'architecture triadique. Parmi les plus étudiées, on compte la calséquestrine, la triadine, la junctine, la junctate, FKBP12, Stac3, la calmoduline, la junctophiline (pour revue, voir Dulhunty et al., 2017). Leur rôle fonctionnel reste encore à ce jour méconnu.

IV REPOMPAGE DU Ca^{2+} PAR LE RS

La relaxation de la fibre musculaire est déclenchée d'une part par le retour du potentiel interne de la cellule à ses valeurs de repos qui met fin à la libération de Ca^{2+} par le RS et d'autre part par le retour des concentrations de Ca^{2+} cytosolique à des valeurs de repos. La baisse des concentrations de Ca^{2+} résulte de l'activité des Ca^{2+} ATPases présentes dans la membrane du RS principalement longitudinal. Les protéines SERCA (*Sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase*) assurent cette fonction de recapture de Ca^{2+} . Il existe plusieurs isoformes de cette protéine ubiquitaire (Otsu et al., 1993). SERCA1a est exprimée dans le muscle squelettique. SERCA2a est exprimée dans le muscle lent, le cœur et le muscle lisse et SERCA2b est présente dans le muscle lisse et les cellules non-excitables. Enfin, SERCA3 est exprimée dans tous les types cellulaires. La SERCA utilise l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour faire entrer dans le RS deux ions calcium contre leur gradient électrochimique en échange de deux ions hydrogène (Zhang et al., 2000). Comme nous l'avons vu précédemment, au repos, il existe une fuite permanente de calcium via le RyR1 malgré l'action répressive qu'exercent les DHPR sur l'ouverture du canal. La SERCA est ainsi non seulement responsable de la diminution de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$ pendant la phase de relaxation

mais aussi en grande partie du maintien de la $[Ca^{2+}]_{int}$ autour des 100 nM au repos. Son activité est inhibée si la $[Ca^{2+}]_{RS}$ augmente et s'amplifie lorsque la $[Ca^{2+}]_{int}$ augmente (*Fryer & Stephenson, 1996 ; Kurebayashi & Ogawa, 2001*). Il existe une multitude d'inhibiteurs des pompes SERCA mais les deux inhibiteurs classiquement utilisés en laboratoire sont la thapsigargine et l'acide cyclopiazonique (CPA). Cependant, la thapsigargine se lie de façon irréversible à la SERCA contrairement au CPA (*pour revue, voir Michelangeli & East, 2011*).

Chapitre IV

La Paralysie Périodique Hypokaliémique de type 1

La paralysie périodique hypokaliémique de type 1 (HypoPP1) est une maladie génétique autosomique dominante. C'est une myopathie rare qui a une prévalence de 1/100000 et présente une pénétrance incomplète où les Hommes développent des symptômes plus sévères que chez les femmes. Les symptômes principaux sont l'apparition d'une paralysie dite flaccide des muscles squelettiques associée à une hypokaliémie. Le muscle cardiaque, le muscle du diaphragme ainsi que les muscles intervenant dans la déglutition sont épargnés. Cependant, en cas de forte hypokaliémie, le rythme cardiaque peut être affecté et entraîner le décès du patient. Au long terme, les crises de paralysie deviennent moins fréquentes mais les patients connaissent une faiblesse musculaire chronique nécessitant vers l'âge de 40-50 ans une aide au déplacement par déambulateur ou fauteuil roulant. Néanmoins l'espérance de vie est normale.

I CARACTERISTIQUES DE LA MALADIE

1.1 Historique

Historiquement, la paralysie périodique est connue depuis des centaines d'années. Musgrave en 1687 rencontre une jeune fille présentant les symptômes de la maladie et en fait la description exacte en 1727. Au fil du temps, des caractéristiques plus précises sont détaillées. En 1874, Hartwig découvre que durant une crise de paralysie musculaire, le muscle est inexcitable et que suite à un effort physique, la crise se déclenche au repos. La paralysie périodique hypokaliémique est aussi appelée maladie de Westphal, médecin qui en 1885 en décrit les principales particularités. En 1895, Goldflam observe des lésions au niveau musculaire et décrit la présence de vacuoles au sein de muscles de certains patients. C'est en 1929 que Kuttner trouve que les crises de paralysie périodique sont associées à une hypokaliémie, ce qui sera confirmé par Biemond & Daniels en 1934. Trois ans plus tard, Aitken montre qu'un traitement thérapeutique à base de sel de potassium diminue la fréquence et la sévérité des crises (*Bradley, 1969*).

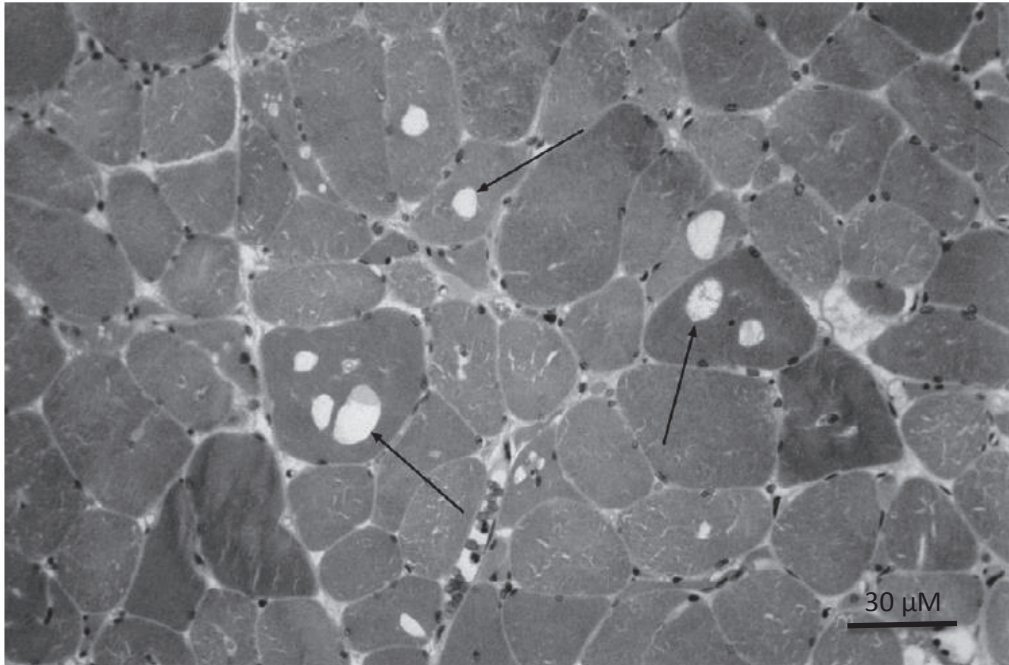


Figure 12 : Observation de vacuoles (flèches) dans des fibres musculaires squelettiques humaines à partir d'une coupe transversale de muscle de patient HypoPP.

D'après : *Basali & Prayson, 2015*

1.2 Sémiologie de la Paralyse Périodique Hypokaliémique de type 1

L'HypoPP1 se traduit par l'apparition intempestive de paralysies musculaires réversibles dites flaccides qui sont appelées crises de paralysie. Ces paralysies musculaires débutent aux extrémités des membres inférieurs ou supérieurs et peuvent affecter un ou plusieurs membres jusqu'à la totalité du corps en épargnant les muscles de la déglutition, respiratoires et cardiaques. Ces paralysies sont accompagnées d'une hypokaliémie qui se traduit par une baisse de $[K^+]$ dans le sang. La concentration physiologique de K^+ se situe autour de 5 mM. Les patients atteints d'HypoPP présentent régulièrement une kaliémie proche de 3.5 mM en dehors des crises, et une kaliémie < 2.5 mM durant une crise de paralysie, pouvant atteindre des valeurs proches de 1 mM dans les cas les plus graves (*Tricarico & Camerino, 2011*). Lorsque l'hypokaliémie est très importante, le rythme cardiaque devient arythmique avec un allongement de l'intervalle QT. Quand bien même les muscles respiratoires ne sont pas affectés, plusieurs patients ont montré des difficultés respiratoires durant les crises de paralysie HypoPP (*Kil & Kim, 2010*) pouvant mener au décès du patient (*Lehmann-Horn et al., 2004 ; Ke et al., 2009*).

Les signes précédant les crises (prodromes) qui ont été rapportés décrivent une fatigue, transpiration, somnolence, soif et une difficulté à uriner (strangurie) probablement causée par une accumulation d'eau dans les muscles squelettiques. Il est reporté dans certains cas des nausées et de façon exceptionnelle des vomissements. La durée, la fréquence et la sévérité des crises sont variables. Les crises surviennent en particulier au cours de la nuit ou tôt le matin, elles peuvent durer quelques heures ou quelques jours et apparaître plusieurs fois par semaine ou quelques fois par an. Une raideur ou une fatigue peut persister durant quelques jours ou semaines, spécifiquement dans les jambes. Ces paramètres dépendent principalement de la mutation, du sexe, de l'âge et du facteur déclencheur des crises. Les premières crises apparaissent avant l'âge de 20 ans. Cependant, il existerait une corrélation entre la mutation et l'âge de la première crise. Parfois, les crises de paralysie lorsqu'elles sont incomplètes peuvent être raccourcies par un exercice très faible et habituellement, les muscles retrouvent leur capacité contractile dans l'ordre inverse au développement de la paralysie. Les crises sont plus régulières entre l'âge de 15 ans et 35 ans et diminuent ensuite. Chez 25% des patients, une faiblesse musculaire chronique s'installe entre l'âge de 40 et 50 ans nécessitant une aide à la marche (*dans GeneReview, Vicart et al., 2002*). Dans de nombreux cas, cette faiblesse musculaire serait favorisée par la manifestation d'une myopathie vacuolaire (apparition de vacuoles au sein des muscles squelettiques) (Figure 12). Dans d'autres cas, la

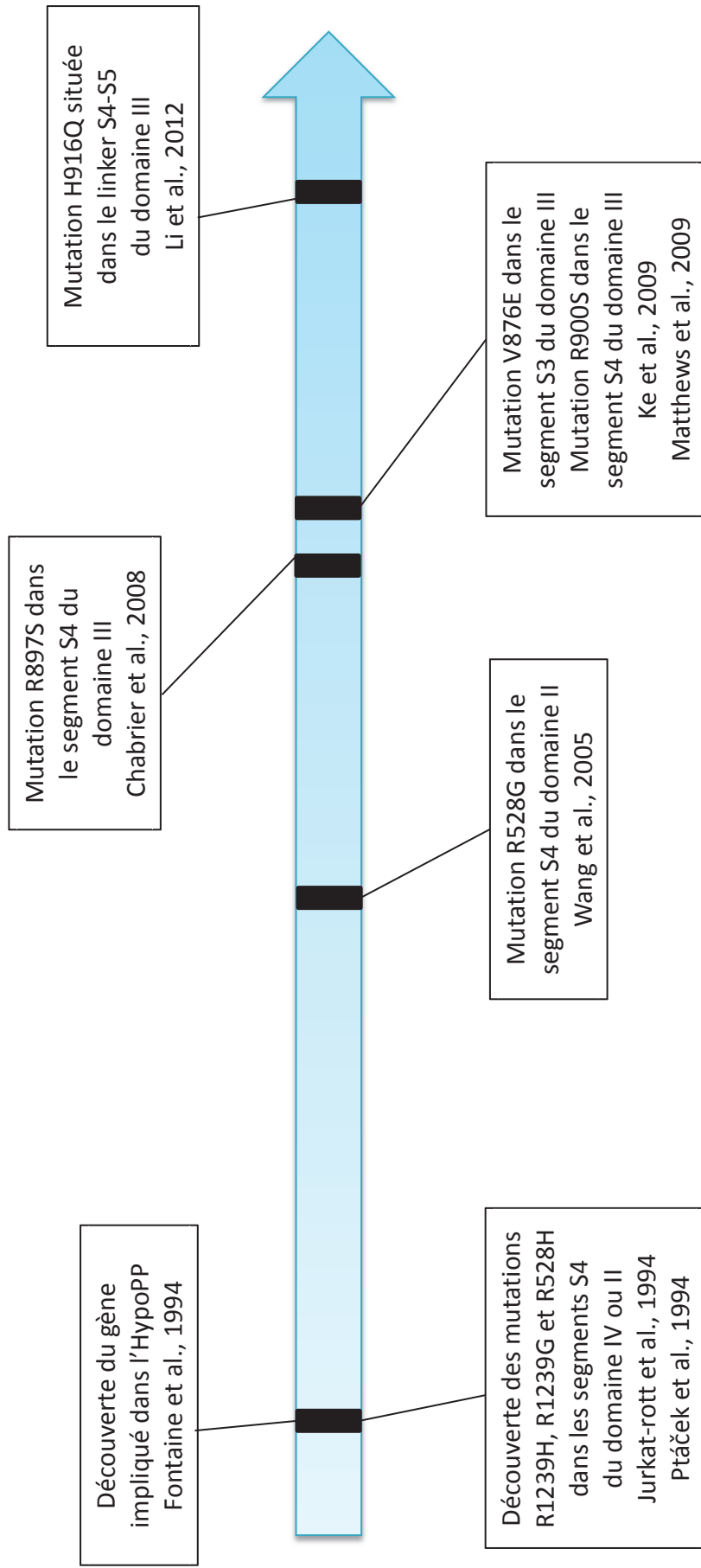


Figure 13 : Chronologie des découvertes génétiques concernant les mutations responsables d'HypoPP1

formation d'agrégats tubulaires a pu être observée (*Miller et al., 2004*). Les crises de paralysie sont déclenchées par divers facteurs. Les plus courantes sont les crises survenant après un repas riche en carbohydrates, un effort physique intense, une exposition au froid ou un stress. D'autres déclencheurs ont été décrits comme une consommation importante d'alcool, le manque de sommeil, l'immobilité, les menstruations ou encore les grossesses. Bien que les effets physiologiques des déclencheurs des crises de paralysie ne soient pas tous bien compris, il semblerait que l'activation de la pompe Na^+/K^+ ATPase soit une des causes principales. En effet, comme vu plus haut (chapitre II), l'activité physique, l'adrénaline et l'insuline jouent un rôle activateur de la pompe Na^+/K^+ ATPase causant une diminution de la $[\text{K}^+]_{\text{ext}}$ favorisant alors les crises (*pour revue, voir Buruma & Schipperheyn, 1979*).

1.3 Génétique

Dans les années 90, les recherches se sont accentuées dans le domaine de la génétique afin de découvrir le gène et la protéine impliqués dans la pathologie. En 1994, *Fontaine et al.* étudient les polymorphismes génétiques de 3 familles distinctes atteintes d'HypoPP et découvre que une ou des mutations se situent sur le chromosome 1 en position q31-32, soit dans la région codant pour la sous-unité principale du DHPR. Au cours de cette même année, 3 mutations génétiques ont été révélées. *Jurkat-Rott et al.* (1994) découvrent 2 mutations, l'une résulte du remplacement d'un acide aminé arginine en position 528 par un acide aminé histidine (R528H), situé dans le segment S4 du domaine II de l' $\alpha 1\text{S}$. L'autre, résulte du remplacement d'un acide aminé arginine en position 1239 par un acide aminé histidine (R1239H), situé dans le segment S4 du domaine IV de l' $\alpha 1\text{S}$. Au même moment, *Ptáček et al.* (1994) publie un article décrivant une nouvelle mutation située dans le segment S4 du domaine IV localisée en position 1239 et causant le remplacement d'une arginine par une glycine (R1239G). La chronologie des découvertes génétiques d'HypoPP1 est détaillée dans la figure 13. Ces mutations sont les premières mutations identifiées dans $\text{Ca}_v1.1$ conduisant à une pathologie musculaire. A ce jour seule une autre pathologie, l'hyperthermie maligne a été associée à des mutations dans CACNA1S (*pour revue, voir Beam et al., 2017*).

La plupart des cas d'HypoPP sont causés par la mutation R528H ou R1239H (*Fouad et al., 1997*). Mais le nombre important de cas d'HypoPP où la génétique reste inconnue suggère l'existence d'autres mutations sur le même gène ou sur d'autres gènes (*Plassart et al., 1994*). En effet, *Bulman et al.* (1999) ont révélé une nouvelle mutation dans le gène codant la

$\alpha 1S$

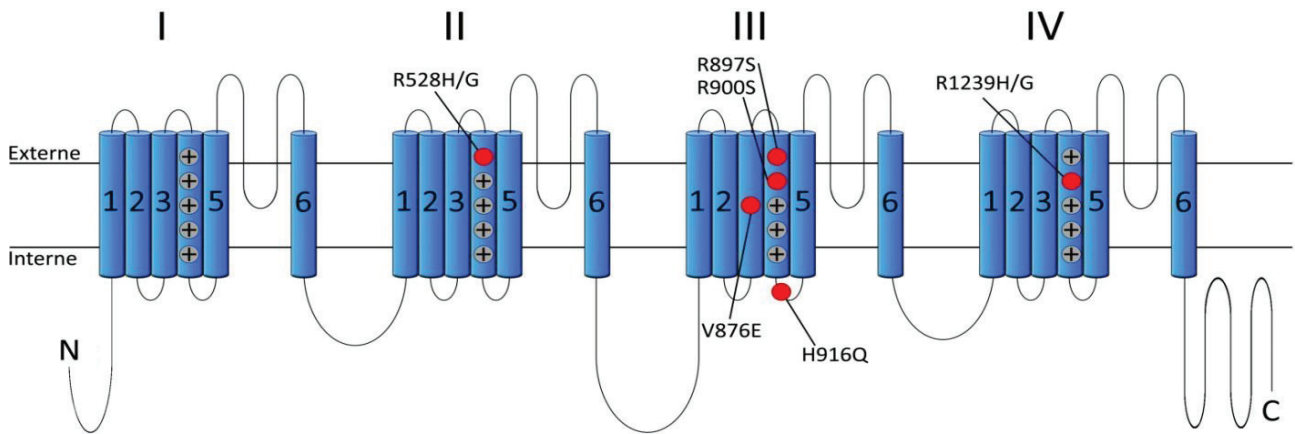


Figure 14 : Localisation des mutations HypoPP1 dans la sous-unité $\alpha 1S$

Il existe 8 mutations responsables d'HypoPP1. Toutes sont situées dans un segment S4 du domaine II, III ou IV, excepté la V876E située dans le S3 du domaine III et la H916Q située dans le linker S4-S5 du domaine III.

sous-unité principale du $\text{Na}_v1.4$, *SCN4A*, située dans le segment S4 du domaine II. Elle induit le remplacement de l'arginine en position 669 par une histidine (R669H). *Jurkat-Rott et al.* (2000) ont révélé de nouveau une mutation dans le segment S4 du domaine II induisant le remplacement de l'arginine en position 672 par une histidine (R672H).

Les mutations localisées dans le gène *CACNA1S* sont responsables de la paralysie périodique hypokaliémique de type I ou HypoPP1. Les mutations localisées dans le gène *SCN4A* sont responsables d'HypoPP2. Depuis la première identification génétique des mutations responsables d'HypoPP, 18 mutations ont été identifiées, dont 8 dans le gène *CACNA1S* (*Ke et al., 2009 ; Matthews et al., 2011 ; Li et al., 2012*) (Figure 14). Soixante-dix à 80% des cas d'HypoPP résultent de mutations dans le gène *CACNA1S* et 10% dans le gène *SCN4A*, tandis que 10-20% sont des cas de paralysie périodique thyrotoxique (TPP) ou des cas sporadiques (*Matthews et al., 2009*). Indépendamment du gène impliqué, les mutations HypoPP sont toutes localisées dans un segment S4 et consistent toutes en le remplacement d'une arginine, chargée positivement, par un acide aminé neutre (par exemple : glycine) ou par un acide aminé moins positif tel que l'histidine (Domaine II, III ou IV) (*Cannon, 2010 ; Matthews & Hanna, 2010*). Cependant, en 2009, *Ke et al.*, étendent le spectre des mutations génétiques responsables d'HypoPP1. Ils établissent un screening génétique d'une famille sud-américaine sur 4 générations dont 9 membres sur 20 étaient atteints d'HypoPP. Après une recherche génétique approfondie dans le gène *CACNA1S*, ils montrent que la valine en position 876 est remplacée par un acide glutamique (V876E). Cette nouvelle mutation ne se localise pas dans un segment S4 mais dans le segment adjacent S3 du domaine III, ce qui donne une singularité à la localisation d'une mutation responsable d'HypoPP1. *Yang et al.* (2015) rapportent un nouveau cas d'HypoPP1 où la mutation V876E a été identifiée chez une jeune femme d'origine asiatique. La V876E n'est pas la seule mutation retrouvée en dehors d'un S4 puisqu'en 2012 *Li et al.* participent au screening génétique d'une famille chinoise et découvrent que la mutation responsable d'HypoPP1 dans cette famille est localisée dans la boucle interne liant le segment S4 au segment S5 du domaine III. Avant notre étude, la recherche des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la maladie s'est focalisée sur les mutations localisées dans un segment S4, en particulier, les mutations R528H et R1239H.

II L'HYPOKALIEMIE DANS L'HYPOPP

2.1 Inexcitabilité membranaire et dépolarisation paradoxale

Les premières investigations sur l'HypoPP ont montré qu'en dehors de l'événement

d'une crise de paralysie, l'électromyogramme est normal, mais que lorsque la paralysie s'installe, l'excitabilité musculaire est profondément altérée (*Engel et al., 1965 ; Engel & Lambert, 1969*). La mesure électromyographique de l'activité électrique musculaire montre que les potentiels d'action musculaires lors de contractions volontaires répétées (*Compound Muscle Action Potential*) restent d'amplitude stable au cours du temps alors qu'ils diminuent chez les patients HypoPP, témoignant ainsi d'une perte d'excitabilité membranaire (*Cannon, 2010*).

Dans les HypoPP, la perte d'excitabilité membranaire est probablement due à une dépolarisation membranaire qui s'installe durant les crises (*Creutzfeldt et al., 1963*). Une étude sur les muscles intercostaux de 3 patients HypoPP a mis en évidence une réduction du potentiel de repos (V_{rest}) lorsque les fibres étaient baignées d'un milieu physiologique et qu'en condition hypokaliémique ($[K^+]_{ext} = 1 \text{ mM}$), le V_{rest} se stabilise à -50 mV (*Rüdel et al., 1984 ; Ruff, 1999*). Il est très vraisemblable qu'une telle dépolarisation membranaire maintenue induit l'inactivation des canaux Na^+ voltage-dépendants et la perte d'excitabilité musculaire.

Cette dépolarisation qui se produit pendant les crises est qualifiée de paradoxale puisque l'hypokaliémie qui y est associée devrait porter le potentiel de membrane musculaire à des valeurs plus négatives et non pas plus positives comme il est observé. Bien que la conductance chlorure soit dominante dans la cellule musculaire au repos, c'est la forte conductance potassique de repos principalement représentée par les canaux K^+ rectifieurs entrants (K_{ir}) qui conduit le potentiel interne à s'établir à des valeurs proches du potentiel d'équilibre des ions K^+ (E_K). D'autres canaux actifs au repos, dont la nature moléculaire est méconnue, transportant des courants entrants vraisemblablement cationiques, contribuent à éloigner de quelques millivolts le potentiel de repos de la cellule vers des valeurs moins négatives que E_K . Le potentiel interne de repos se stabilise ainsi à une valeur où ces courants entrants sont d'intensité équivalente aux courants sortants qui s'écoulent à travers les canaux K_{ir} . Dans ces conditions, d'après l'équation de Nernst, une diminution de la concentration extracellulaire de K^+ est censée occasionner une hyperpolarisation en portant E_K vers des valeurs plus négatives pour lesquelles un nouvel équilibre entre courants entrants et sortants est atteint. Cependant, la diminution de la concentration extracellulaire de K^+ induit en parallèle une baisse de conductance des canaux K_{ir} au point que, lorsque cette baisse est très prononcée, les courants entrants viennent à dominer sur les courants sortants K^+ et portent ainsi le potentiel de repos à des valeurs dépolarisées pour lesquelles un nouvel équilibre entre les deux types de courant est atteint. La forte rectification entrante des canaux K_{ir} , fait qu'une valeur de dépolarisation très importante doit être atteinte au point d'activer des canaux K^+

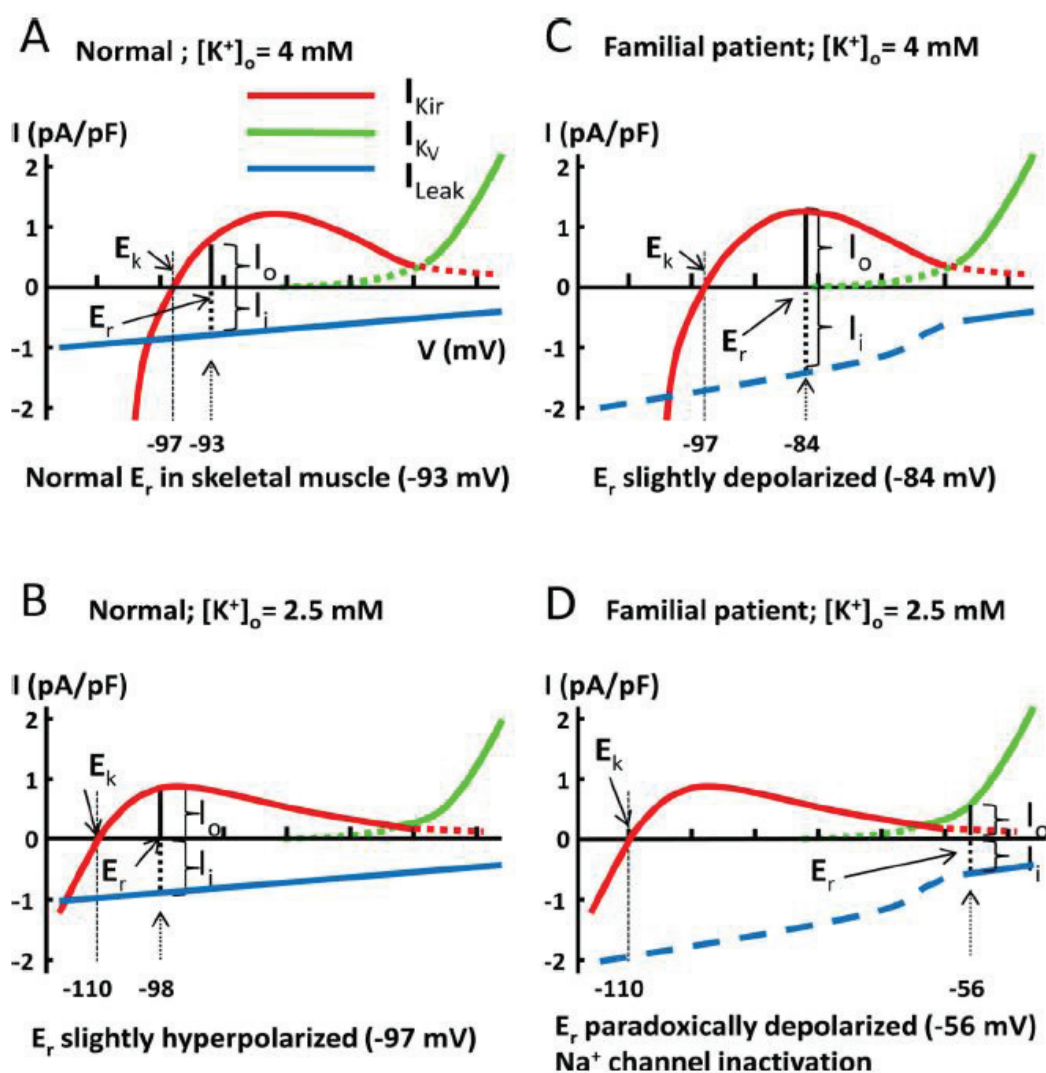


Figure 15 : Modèles de dépolarisation paradoxale chez des patients HypoPP

- A. Chez un sujet sain, en présence de 4 mM de K^+ externe, le potentiel de membrane au repos (E_r) s'établit à une valeur pour laquelle la sortie de K^+ est exactement compensée par un courant entrant de fuite.
- B. Chez un sujet sain, lorsque la concentration extracellulaire de K^+ est abaissée à 2.5 mM, le potentiel de membrane est décalé vers des valeurs de potentiel négatif puisque E_k prend des valeurs plus négatives. Malgré la baisse de conductance K^+ le courant sortant K^+ parvient à compenser le courant entrant de fuite.
- C. Chez un patient HypoPP, en présence de 4 mM de K^+ externe, la présence d'un courant de fuite élevé conduit à dépolariser la cellule à une valeur où la sortie de K^+ parvient à compenser le courant entrant.
- D. Chez un patient HypoPP, lorsque la concentration extracellulaire de K^+ est abaissée à 2.5 mM, la baisse de conductance K^+ à travers les K_{ir} ne permet pas de générer un courant sortant capable de compenser le fort courant entrant. Dans ces conditions, la cellule se dépolarise à des valeurs de potentiel qui activent le courant K^+ voltage-dépendant et pour lesquels le courant sortant K^+ parvient à compenser le courant entrant de fuite.

D'après Cheng et al., 2013

voltage-dépendants pour qu'un nouvel équilibre entre courants entrants et sortants soit obtenu. Cette dépolarisation paradoxale peut être observée dans des fibres musculaires de patients sains comme dans des fibres musculaires de patients HypoPP. Cependant, chez un patient sain, elle est observée pour des concentrations extracellulaires de K^+ de l'ordre de 1 mM tandis que chez des patients HypoPP, une diminution de la $[K^+]_{ext}$ à 2.5 mM voir 3.5 mM est suffisante pour induire une dépolarisation paradoxale des fibres (Cannon, 2015). Ainsi, il a été proposé qu'un courant dépolarisant anormalement élevé se développait au potentiel de repos dans les fibres de patients atteints d'HypoPP (pour revue, voir Cheng et al., 2013) (Figure 15).

2.1.A Implication des Kir2.1 et 2.6 dans la dépolarisation membranaire

L'hypothèse selon laquelle l'inhibition des K_{ir} pourrait rendre compte de la dépolarisation paradoxale a été confirmée par l'utilisation du baryum, un bloqueur des K_{ir} (Alagem et al., 2001). Il est d'une part connu qu'une intoxication au baryum induit une paralysie musculaire (Allen, 1943). En 2008, Struyk & Cannon ont mesuré le V_{rest} dans des fibres musculaires squelettiques de souris exposées à des solutions externe contenant du baryum (50 μ M) ou de faibles concentrations de K^+ . Ces deux conditions se sont avérées inhiber les Kir et provoquer une dépolarisation. De plus, en présence de baryum dans la solution externe, la dépolarisation paradoxale a été déclenchée non pas en présence de 1 mM de K^+ mais en présence de 2 mM de K^+ , ce qui suggère que l'inhibition des K_{ir} précipite la dépolarisation membranaire à l'occasion d'une hypokaliémie. Une autre étude sur la paralysie périodique thyrotoxique (association des symptômes de l'HypoPP avec un hyperthyroïdisme) a démontré que certaines mutations hétérozygotes dans le gène codant pour le canal $K_{ir}2.6$ (KCNJ18) induisaient chez ces patients non seulement une diminution de l'expression membranaire des $K_{ir}2.6$ non mutés mais aussi un effet dominant négatif sur les courants des $K_{ir}2.1$. Chez certains malades, la diminution des courants K_{ir} pourrait donc rendre compte de leur susceptibilité à développer des crises de paralysie musculaire associées à une hypokaliémie (Cheng et al., 2011).

Jurkat-rott et al. (2009) ont réalisé une série d'expériences qui apporte des éléments de compréhension clefs sur le phénomène de dépolarisation paradoxale chez les patients HypoPP. Dans cette étude, le potentiel de repos a été mesuré dans des fibres musculaires issues de biopsies de personnes saines et de patients atteints d'HypoPP2 ou d'HypoPP1. Cette étude montre une « distribution bimodale » du potentiel de repos (V_{rest}), c'est-à-dire que le V_{rest} se stabilise soit autour de -80 mV comme attendu, état appelé « P1 », soit à une valeur

plus dépolarisée autour de -60 mV, état appelé « P2 ». 95% des fibres saines sont à l'état P1 dans un milieu contenant 4 mM de K^+ , tandis que dans un milieu contenant seulement 1.5 mM de K^+ , 87% des fibres saines sont à un état P1 de -99 mV, donc un état très hyperpolarisé comme est censée l'induire une baisse de K^+ externe, et 13% à l'état P2 de -60 mV résultant vraisemblablement de l'inhibition de la conductance K_{ir} . Chez les patients HypoPP, la valeur de P1 varie en fonction de la mutation. Chez les patients HypoPP1, 91% des fibres de patients ayant les mutations R528H/G sont à l'état P1 de -75 mV en présence de 4 mM de K^+ alors que 76% des fibres de patients ayant les mutations R1239H/G sont au même état P1. Enfin, dans un milieu contenant 1.5 mM de K^+ , 17% des fibres musculaires R528H/G sont à l'état P1 (-80 mV) et de façon spectaculaire, seulement 1% des fibres musculaires R1239H/G sont à l'état P1 (-72 mV). Cette étude démontre non seulement que les mutations HypoPP potentialisent l'effet dépolarisant paradoxal induit par l'hypokaliémie mais suggère aussi que cette potentialisation de l'effet dépolarisant paradoxal résulte du développement d'un courant dépolarisant anormalement élevé au potentiel de repos dans les fibres de patients.

2.1.B Rôle des K_{ATP} et effet de l'insuline dans l'HypoPP

Comme présenté dans les chapitres précédents, les canaux K^+ ATP-dépendants (K_{ATP}) sont des canaux présents en forte densité à la membrane plasmique des fibres musculaires squelettiques. *Tricarico et al.* (1998) ont montré que l'activité des K_{ATP} était significativement réduite dans un modèle de rat déplété en K^+ par un régime pauvre en K^+ . Le même groupe a plus tard observé que l'expression des K_{ATP} était diminuée dans des fibres musculaires obtenues à partir de biopsies musculaires de patients HypoPP1 (R528H) (*Tricarico et al.*, 1999). Ces résultats suggèrent que la réduction de conductance K^+ de repos dans les crises de paralysie pourrait impliquer les canaux K^+ ATP-dépendants bien qu'il soit difficile de concevoir que ces canaux soient actifs au potentiel de repos.

L'effet hypokaliémiant de l'insuline par son action activatrice de la pompe Na^+/K^+ ATPase a été décrit dans le chapitre II. L'insuline pourrait cependant aussi avoir un effet sur les canaux K_{ATP} puisque, chez des rats déplétés en K^+ , l'activité résiduelle des K_{ATP} de fibres musculaires traitées 30 min avec de l'insuline est abolie et entraîne une dépolarisation alors que, chez des rats normokaliémiques, ce traitement induit une hyperpolarisation (*Tricarico et al.*, 1998). Dans d'autres types cellulaires, comme les cellules épithéliales ou les cellules β -pancréatiques, les K_{ATP} sont fonctionnellement couplés à la pompe Na^+/K^+ ATPase et la stimulation de la pompe induit une activation du courant sortant porté par les K_{ATP} et induit une hyperpolarisation alors qu'une inhibition de la pompe diminue l'activité des K_{ATP} (*Hurst*

et al., 1993 ; *Ding et al.*, 1996). Dans les muscles squelettiques une telle liaison entre la pompe Na^+/K^+ ATPase et les K_{ATP} est suggérée puisque la ouabaine et le glibenclamide, inhibiteurs respectifs de la pompe et des K_{ATP} , s'opposent à l'hyperpolarisation induite par l'insuline chez des rats normokaliémiques (*Lannaccone et al.*, 1989 ; *Tricarico et al.*, 1997).

Ruff et al. (1999) rapportent des résultats similaires sur des fibres musculaires de patients HypoPP. Lorsque des fibres musculaires saines sont exposées à un milieu contenant des faibles concentrations de K^+ (2.5 à 1 mM), le potentiel de membrane est porté à des valeurs de potentiel plus négatives (-93 mV dans 4 mM contre -100 mV dans 1 mM) alors qu'il est porté à des valeurs plus positives dans des fibres musculaires HypoPP (-87 mV dans 4 mM contre -63 mV dans 1 mM). Enfin, à l'aide du même protocole mais avec une solution contenant de l'insuline, l'effet hyperpolarisant est potentialisé dans les fibres saines tandis que l'effet dépolarisant est amplifié dans les fibres HypoPP. La conclusion apportée à ce travail est que l'insuline potentialise la dépolarisation de la membrane dans les fibres HypoPP en réduisant les courants K_{ir} .

III LIEN ENTRE LA PARALYSIE ET LE COURANT OMEGA ?

Le lien qui existe entre les mutations HypoPP1 et la paralysie musculaire est longtemps resté méconnu. Etant donné que les mutations HypoPP affectent dans leur grande majorité les segments détecteurs de potentiel des sous-unités principales α et $\alpha 1$ des canaux voltage-dépendants respectivement Na^+ et Ca^{2+} , les premières études se sont concentrées sur la fonction canal de ces protéines en faisant l'hypothèse que la mutation en modifiait ses propriétés. Les mutations se sont effectivement avérées produire des changements des propriétés des courants Na^+ et Ca^{2+} s'écoulant à travers les canaux mais qui pouvaient difficilement expliquer la survenue des crises de paralysie. La découverte d'un « *gating pore* » dans le domaine voltage-sensible des canaux K^+ puis Na^+ voltage-dépendants à l'occasion d'études structure-fonction a constitué une étape clef dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans les HypoPP.

3.1 Effet de mutations HypoPP sur le courant calcique de type L

Comme décrit précédemment, le canal $\text{Ca}_v1.1$ s'exprime très mal dans les systèmes hétérologues. Ainsi, les études portant sur les effets de mutations HypoPP1 sur les propriétés des canaux calciques sont peu nombreuses et les résultats sont souvent contradictoires. La première étude électrophysiologique réalisée par *Sipos et al.* en 1995 montre sur un modèle de

myotubes en culture obtenus à partir de biopsies de patients que le courant calcique de type L n'est pas modifié pour la mutation R528H mais que la courbe d'inactivation est décalée de 40mV vers les valeurs négatives de potentiel. Pour la mutation R1239H, seul le courant de type L s'est avéré être plus faible comparé au contrôle cependant la conductance maximale n'a pas été mesurée dans cette étude. *Lapie et al.* (1996) ont utilisé un autre modèle d'étude en exprimant soit la sous-unité $\alpha 1S$ contrôle soit mutée R528H dans des fibroblastes de souris (Ltk). Leur étude montre que la densité de courant de type L est diminuée de 70 % dans les fibroblastes exprimant la mutation HypoPP1. Cependant, les courants de type L contrôles sont largement inférieurs à la normale suggérant que l'expression de la sous-unité $\alpha 1S$ dans un modèle de fibroblaste est loin d'être optimale. L'expression de la mutation R528H dans une lignée de myotubes dysgéniques de souris (dépourvus de DHPR) n'a montré aucune différence significative dans les propriétés du courant de type L (dépendance au voltage, densité, inactivation et vitesse d'activation) (*Jurakt-rott et al.*, 1998). Sur des myotubes de patients R528H, les courbes d'activation et d'inactivation sont décalées vers des valeurs de potentiel plus négatifs, avec un $V_{1/2}$ de 8.6 mV dans les R528H contre 14.3 mV dans les contrôles pour l'activation et un $V_{1/2}$ de -9.4 mV dans les R528H contre -1.1 mV dans les contrôles pour l'inactivation (*Jurkat-rott et al.*, 1998). Dans cette même étude, l'analyse des transitoires calciques n'a montré aucune différence significative entre les fibres R528H et les fibres saines.

Dans l'ensemble, une réduction du courant calcique pourrait rendre compte de la faiblesse musculaire observée pendant les crises d'HypoPP en considérant que cette réduction de courant témoigne en parallèle d'une diminution de la fonctionnalité du DHPR en tant qu'initiateur du couplage excitation-contraction. En revanche, dans ces conditions, la faiblesse musculaire devrait être permanente et non survenir sous forme de crises. Ainsi, il est peu probable que l'HypoPP découle directement de modifications de la fonction de courant calcique ou détecteur de potentiel du DHPR.

Plus récemment l'équipe de *Beam* a montré que la co-expression de *STAC3* (*SH3 and Cysteine-rich domain 3*) gène codant pour une protéine localisée à la triade et qui lorsqu'il est muté induit la myopathie *Native American*, permettait l'adressage à la membrane de $Ca_v1.1$ dans des systèmes d'expression hétérologue (*Polster et al.*, 2015). La co-expression de toutes les autres sous-unités s'avère néanmoins nécessaire pour révéler les fonctions de canal et de voltage-sensor de $Ca_v1.1$ (*Polster et al.*, 2016). Cette approche pourrait permettre à l'avenir de faciliter les études des effets des mutations de $Ca_v1.1$ sur la fonctionnalité de la protéine.

3.2 Effet de mutations HypoPP sur le courant sodique: Na_v1.4

En parallèle des études effectuées sur les mutations HypoPP1, des recherches ont été menées sur les effets fonctionnels de mutations HypoPP2 dans le Na_v1.4.

L'expression de la protéine Na_v1.4 est bien plus facilement obtenue dans des systèmes hétérologues tels que les ovocytes ou les HEK (*Human Embryonic Kidney*) en comparaison de Ca_v1.1. Les données récoltées sur les mutations HypoPP2 sont relativement équivalentes à celles des mutations HypoPP1. Les mutations R669H et R672G/H situées dans le SCN4A induisent une réduction du courant sodique et une courbe d'inactivation décalée vers des valeurs de potentiel plus négatives. De plus il a été démontré une augmentation de la période réfractaire relative, un ralentissement et une diminution de l'amplitude des PA (*Struyk et al., 2000 ; Jurkat-Rott et al., 2000; Kuzmenkin et al., 2002*). Mais de façon similaire à l'HypoPP1, ces altérations biophysiques peuvent difficilement expliquer l'apparition de crises de paralysies spontanées.

3.3 Le *gating pore current* (Gpc)

Des études structure-fonction initialement réalisées sur le canal K⁺ voltage-dépendant ont conduit à mettre en évidence une conductance accessoire dans le canal qui n'implique pas le pore conduisant les ions K⁺ et qui se manifeste uniquement lorsqu'une mutation conduit au remplacement d'une arginine par un acide aminé neutre dans un segment S4. Cette voie de perméation est appelée «pore ω» pour la distinguer de la voie de perméation principale appelée pore α. Elle est aussi couramment appelée *gating pore* étant donné que le courant ω s'écoule à travers le domaine détecteur de voltage contrôlant l'ouverture du canal, donc son « *gating* », et qui dans les conditions normales permet le déplacement des segments S4. Les courants ω ont tout d'abord été étudiés d'un point de vue fondamental afin de mieux comprendre les changements de conformation du domaine de sensibilité au voltage. Les mutations HypoPP consistant elles aussi en une substitution des arginines dans les segments S4, un courant ω a plus tard été recherché dans les canaux Na⁺ et Ca²⁺ mutés.

3.3.A Investigations fondamentales dans le canal K⁺ VD

Comme vu précédemment, le canal K⁺ voltage-dépendant partage des similitudes structurales et fonctionnelles avec les autres canaux voltage-dépendants tel que le Ca_v1.1 ou le Na_v1.4. Le groupe de *Bezánilla* a tenté de déterminer l'ampleur du déplacement des segments S4 avec la dépolarisation dans le canal K⁺ voltage-dépendant de type *Shaker* en titrant dans ce segment les résidus détecteurs de potentiel avec des protons à différentes valeurs de pH des

milieux intra- et extra-cellulaire et mesurant les mouvements de charge. Les valeurs de pKa des résidus chargés arginines étant trop basiques, ces résidus ont été remplacés individuellement par des histidines. De manière surprenante, après substitution de chacune des arginines, excepté la plus externe, les segments S4 se sont comportés comme des transporteurs de protons par protonation et déprotonation successives (*Starace et al. 1997 ; Starace & Bezanilla, 2001*). A l'occasion d'une autre étude, les mêmes auteurs ont montré que lors du remplacement de l'arginine la plus externe par une histidine, cette histidine détectait aussi le changement de potentiel et permettait de faire transiter des protons mais non plus sous la forme d'un transport par protonation/déprotonation mais à travers un pore sélectif aux protons ouvert aux potentiels négatifs (*Starace & Bezanilla, 2004*). Cette conductance protonique s'est révélée dépendante du voltage. En effet, en présence de solutions externe et interne tamponnées respectivement à 5 et 7.4, le courant entrant aux potentiels négatifs s'avère rectifier dans le sens entrant. La rectification entrante s'amorce au potentiel seuil des courants produits par les mouvements de charge intramembranaire. Ce résultat indique que le pore protonique est ouvert aux potentiels négatifs puis se ferme avec la dépolarisation en réponse au mouvement dans le sens sortant des charges du S4. Cette étude princeps établit d'une part qu'un pore accessoire est susceptible de se former dans le domaine de détection du potentiel d'un canal voltage-dépendant. Elle montre d'autre part que l'acide aminé chargé le plus externe du S4, à lui-seul, obstrue ce pore accessoire et sépare deux crevasses hydrophiles appartenant respectivement au milieu interne et externe. Cet acide aminé focalise ainsi tout le champ électrique au niveau d'une région sensible au voltage extrêmement restreinte. *Tombola et al. (2005)* ont prolongé ces études en montrant que le remplacement de la première arginine du S4 par différents acides aminés (alanine, cystéine, histidine, sérine et valine) induit aussi à des potentiels hyperpolarisés un courant de fuite nommé par le groupe « courant ω ». L'utilisation de l'agitoxine II révèle que le courant ω est toujours mesuré alors que le courant α est bloqué, confirmant à nouveau que les ions portés par le courant ω passent à travers un «pore accessoire» obstrué quand l'arginine sépare les compartiments externe et interne et perméant lorsqu'un autre acide aminé est substitué.

3.3.B Investigations fondamentales dans un canal Na^+ VD

Le courant oméga a été mis en évidence dans un autre canal voltage-dépendant, le canal sodique exprimé dans le cerveau, $\text{Na}_v1.2$. Le remplacement des deux arginines les plus externes par un glutamate (RR850/853QQ) dans le segment S4 du domaine II induit de même un courant de fuite observé à des valeurs de potentiels entre -20 et -140 mV qui est non

seulement bloqué par la dépolarisation mais est aussi en corrélation avec le mouvement de charges des segments S4. Les auteurs montrent cependant que la double mutation est nécessaire pour l'observation de ce courant de fuite. De plus, la sélectivité de ce courant de fuite ne serait pas protonique mais potassique. Ce courant de fuite a été renommé par le groupe « *gating pore current* » : I_{gp} (Sokolov et al., 2005).

3.4 Etude du *gating pore current* dans l'HypoPP2

La mise en évidence d'un *gating pore current* dans les canaux Na^+ et K^+ voltage-dépendants a conduit à rechercher si celui-ci était aussi présent lorsque des mutations naturelles équivalentes affectaient les canaux Na^+ ou Ca^{2+} dans l'HypoPP. Entre 2007 et 2012, de nombreuses études ont été menées tout d'abord sur le canal sodique VD muté de type HypoPP2 dans le muscle squelettique pour rechercher un *gating pore current*. Les 5 mutations HypoPP localisées dans le DII/S4 et exprimées dans des ovocytes donnent naissance à un *gating pore current* activé à des valeurs de potentiel hyperpolarisées (Sokolov et al., 2007 ; Struyk & Cannon, 2007 ; Struyk et al., 2008 ; Gosselin-Badaroudine et al., 2012). La mutation située dans le DIII/S4 (R1132Q) est aussi été caractérisée par la présence d'un *gating pore current* pour des valeurs de potentiel hyperpolarisées (Francis et al., 2011). Ce *gating pore current* activé à des valeurs hyperpolarisées s'est aussi révélé être potentialisé par la dépolarisation préalable de la membrane plasmique. En effet, la mutation R666G induit un *Gpc* plus fort lorsque le potentiel de membrane est maintenu au préalable à 0 mV que lorsque celui-ci est maintenu à -100 mV (Sokolov et al., 2010).

3.4.A Modèle de souris Transgénique HypoPP2

Le groupe de Stephen Cannon (2011) a généré une lignée de souris transgénique hétéro- ou homo-zygotes pour la mutation HypoPP2 R669H située dans le DII/S4 du canal Na^+ voltage-dépendant musculaire squelettique $\text{Na}_v1.4$. Ce nouveau modèle d'étude a permis de travailler sur l'animal entier et d'étudier les conséquences fonctionnelles de la mutation dans des conditions où le canal est dans son environnement physiologique. Les tests de force montrent que seuls les muscles de souris homozygotes développent une force réduite en comparaison des muscles de souris contrôles. En présence d'un milieu physiologique contenant seulement 2 mM de K^+ , la force développée par les muscles de souris contrôles est légèrement réduite, diminuée d'environ 50% dans les muscles de souris hétérozygotes et nulle dans les muscles de souris homozygotes. Parallèlement, en présence d'ouabaïne, bloqueur de la pompe Na^+/K^+ ATPase, la force des muscles de souris homozygotes est diminuée de 25%,

indiquant ainsi que la pompe Na^+/K^+ ATPase est fortement sollicitée dans ces muscles pour maintenir le V_{rest} . Dans les fibres musculaires saines, le V_{rest} est hyperpolarisé de 9 mV lorsque le $[\text{K}^+]_{\text{ext}}$ est réduit à 2 mM alors que le V_{rest} se stabilise à des valeurs dépolarisées aux alentours de -70 mV dans les fibres musculaires des souris hétérozygotes. Enfin, le groupe a mis en évidence la présence d'un courant de fuite pouvant correspondre à un *gating pore current* à des valeurs de potentiels inférieures à -20 mV après soustraction des courbes courant/potentiel obtenues dans les fibres saines à celles obtenues dans les fibres de souris homozygotes. La conductance de ce *gating pore* est estimée à 7 nS/nF à -90 mV dans les fibres de souris (Figure 17). Cependant, pour une raison inconnue, les souris ne développent pas de crises de paralysie musculaire.

3.5 Sélectivité ionique, conductance et bloqueurs du *gating pore current*

Suite à la découverte d'un *gating pore current* dans des canaux K^+ VD et surtout dans le canal $\text{Na}_v1.4$ dont les mutations sont responsables d'HypoPP2, les études se sont focalisées sur la sélectivité ionique de ce courant de fuite, de sa conductance et, à des fins thérapeutiques, la recherche de molécules capables de bloquer ce courant.

Les différentes études de mutations responsables d'un *gating pore current* dans le canal K^+ VD rapportent dans leur grande majorité un courant de fuite de type potassique. Pour exemple, la mutation R362C permet un passage préférentiel pour le guanidinium puis, dans l'ordre décroissant, pour le césium, le potassium et le lithium (Tombola et al., 2005).

Dans le canal sodique, le *gating pore current* est en majeure partie porté par des ions Na^+ excepté pour les mutations R663H, R219H et R1125H. Pour exemple, les mutations R666G et R1125Q dans le $\text{Na}_v1.4$ de rat (équivalentes aux mutations R672G et R1132Q dans le $\text{Na}_v1.4$ humain) induisent un *gating pore* perméable au césium et au potassium mais qui laisse aussi facilement passer le sodium et le lithium (Sokolov et al., 2007 ; Francis et al., 2011). Le remplacement d'une des deux arginines les plus externes d'un segment S4 par une histidine (DI, DII ou DIII) conduit à une sélectivité protonique.

Deux études s'appuyant soit sur l'expression de la mutation HypoPP2-R669H du canal sodique $\text{Na}_v1.4$ dans des ovocytes soit dans des souris transgéniques hétérozygotes pour la même mutation ont estimé que la conductance du *gating pore current* représenterait environ 1% de la conductance total de repos dans le cas d'une expression hétérozygote (Mi et al., 2014 ; Wu et al., 2011). Cette faible valeur de conductance incite à penser que dans le cas de l'HypoPP2, le courant de fuite de repos n'est pas à lui-seul responsable de la paralysie mais

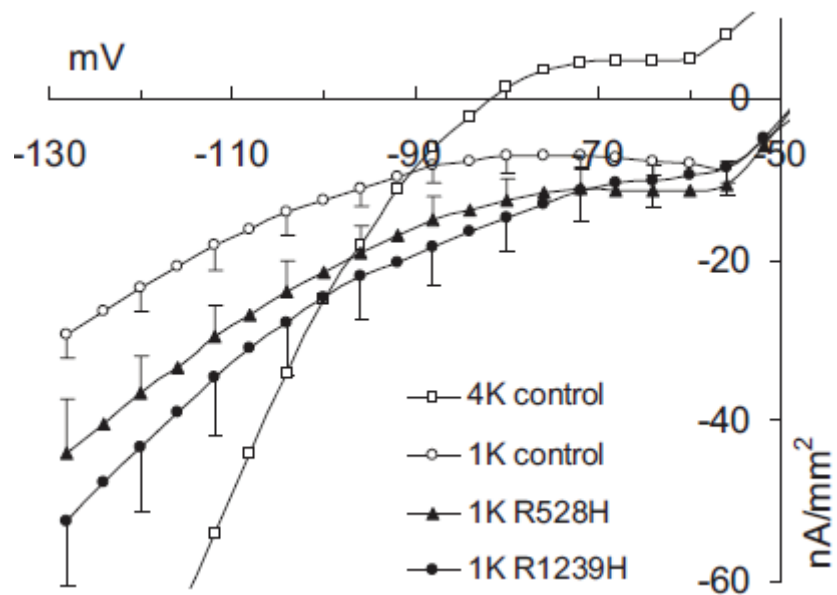


Figure 16 : Conductance globale de membrane mesurée en condition de voltage-clamp dans des fibres musculaires issues de biopsie de patients contrôles ou porteurs des mutations R528H ou R1239H en présence de différentes concentrations de K^+ externe.

La présence de 1 mM K^+ induit à une baisse de conductance potassique et conduit à révéler un courant de fuite entrant plus important dans les fibres R528H et R1239H. La solution externe ne contient pas de chlore.

que d'autres phénomènes tels qu'un découplage entre les mouvements de charge et le pic de courant Na^+ susceptible d'induire une diminution de la vitesse de dépolarisation et de l'amplitude du potentiel d'action, sont aussi responsables d'une excitabilité réduite. De nombreux bloqueurs ont été expérimentés mais les résultats obtenus restent contradictoires. A ce jour, aucun bloqueur sélectif n'a été proposé puisque la plupart d'entre eux affectent aussi le courant α .

3.6 Le *gating pore current* dans l'HypoPP1

Il existe seulement deux études qui décrivent la présence d'un courant de fuite pouvant s'apparenter à un *gating pore current* dans le cadre de mutations HypoPP1. La première a été réalisée en 2009 par *Jurkat-Rott et al.* sur des patients HypoPP1 porteurs des mutations R528H ou R1239H. Les patients ont tout d'abord subi des tests d'imagerie par résonance magnétique (IRM) qui ont montré une surcharge en Na^+ intracellulaire dans des muscles qui avaient été exposés au froid. Cette augmentation de $[\text{Na}^+]_{\text{int}}$ était accompagnée d'une augmentation de la teneur en eau des muscles faisant apparaître des œdèmes. L'analyse électrophysiologique en conditions de potentiel imposé sur des fibres issues de biopsies des patients montre la présence d'un courant de fuite entrant beaucoup plus important dans les fibres R528H et R1239H lors de la diminution de la $[\text{K}^+]_{\text{ext}}$ à 1 mM pour des valeurs de potentiel négatives. Après soustraction des courbes courant/potentiel chez les patients normaux et HypoPP1, la conductance de membrane pour ce courant de fuite mesurée dans la partie linéaire de la courbe aux valeurs de potentiel hyperpolarisées a pour valeur $12 \mu\text{S}/\text{cm}^2$ pour la mutation R528H et $19.5 \mu\text{S}/\text{cm}^2$ pour la mutation R1239H (Figure 16).

La seconde étude a été réalisée par le groupe de *Cannon* qui en 2012 a généré des souris transgéniques portant la mutation HypoPP1 R528H hétéro- ou homo-zygote dans le $\text{Ca}_v1.1$. Les analyses de *grip-test* montrent que la force musculaire des souris homozygotes mâles et femelles est plus faible comparée aux souris contrôles (WT) et que la force musculaire des souris hétérozygotes femelles (F) n'est pas différente des souris WT (F) alors qu'elle est significativement plus faible pour les mâles hétérozygotes (M). La diminution de la $[\text{K}^+]_{\text{ext}}$ à 2 mM entraîne une réduction de 60% de la force chez les souris homozygotes (M/F) alors que comme précédemment, les souris hétérozygotes F ont une force similaire aux WT contrairement aux souris hétérozygotes M qui présentent une réduction de force de 60% au bout de 30 min d'exposition à la solution hypopotassique. Chez l'Homme, les familles qui présentent la même mutation HypoPP1-R528H montrent une pénétrance incomplète de la

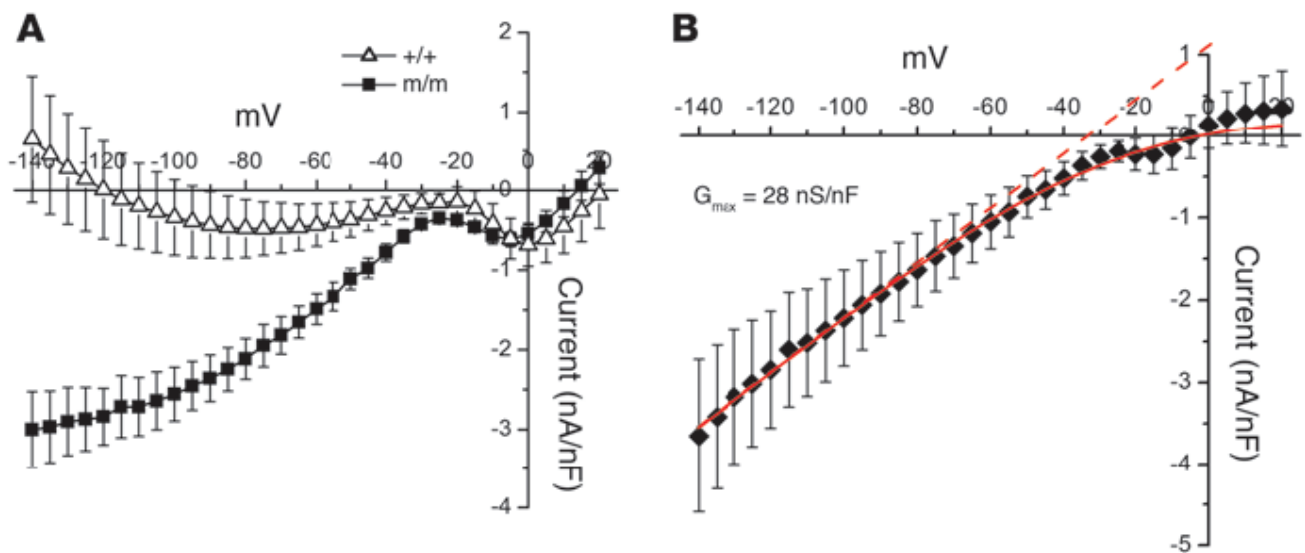


Figure 17 : Conductance de fuite mesurée dans des fibres de souris saines ou transgéniques homozygotes pour la mutation HypoPP1 R528H.

A. Les courants représentés correspondent aux courants de fuite La^{3+} -sensibles. Ils ont été obtenus en soustrayant les courants persistant en présence de La^{3+} aux courants mesurés en son absence.

B. Différence de courant La^{3+} -sensible entre les fibres saines et les fibres $\text{R528H}^{-/-}$.

La solution externe est dépourvue de Na^+ , K^+ , Cl^- et contient du Co^{2+} , Ba^{2+} , TTX, 9AC, 4AP).

maladie chez les femmes (*Elbaz et al., 1995*). Les souris transgéniques HypoPP1-R528H^{m/-} de cette étude pourraient aussi présenter une pénétrance incomplète de la maladie montrant ainsi des résultats similaires aux souris WT concernant les analyses de *grip-test* décrits ci-dessus. Le groupe a étudié le *Coumpound Muscle Action Potential* (CMAP) qui représente l'excitabilité du muscle suite à des stimulations répétées du nerf sciatique. L'excitabilité musculaire s'est avérée être diminuée de 50% dans les muscles de souris R528H^{m/-} et R528H^{-/-}. Contrairement à leur précédente étude sur les souris transgéniques portant la mutation du canal sodique R669H (HypoPP2), l'analyse des potentiels d'action n'a montré aucune altération chez les souris R528H^{m/-} et R528H^{-/-} suggérant que l'expression des canaux sodique Na_v1.4 n'est pas affectée chez ces souris. Pour mettre en évidence un courant de fuite élevé dans les fibres musculaires R528H^{-/-}, les auteurs ont utilisé des bloqueurs pour annihiler les conductances sodique, calcique, potassique et chlore (TTX, Co²⁺, Ba²⁺, 4AP et 9AC). De plus, ils ont utilisé le lanthane (La³⁺), un ion trivalent que *Sokolov et al. (2010)* ont démontré être capable de bloquer le *gating pore current* dans le cas de la mutation HypoPP2-R666G dans le canal sodique Na_v1.4. Dans ces conditions, le groupe de *Cannon* a mis en évidence un courant de fuite entrant La³⁺-sensible par soustraction de la courbe courant/potentiel obtenue dans les fibres WT à celle obtenue dans les fibres homozygotes R528H. Ce courant de fuite est détecté pour des valeurs de potentiel inférieures à -40 mV et est bloqué par la dépolarisation de la membrane. La conductance mesurée dans les fibres homozygotes R528H atteint 28 nS/nF (Figure 17). Le niveau d'expression de la Ca_v1.1 a été estimé en mesurant les mouvements de charges intramembranaires en présence d'un bloqueur de la conductance calcique (Co²⁺ et La³⁺). Les résultats ont montré une réduction des mouvements de charges dans les fibres hétérozygotes et homozygotes R528H traduisant une diminution de l'expression de la sous-unité Ca_v1.1. Cependant, la densité de courant dans les fibres R528H^{-/-} a été diminuée de 53% alors que les mouvements de charge ont été diminués de 36%, laissant alors suggérer que la diminution de la densité de courant ne peut pas provenir seulement d'une baisse d'expression de la sous-unité et ainsi que la mutation R528H réduirait aussi en partie les mouvements de charge intramembranaire.

3.7 Propriétés biophysiques du *gating pore current*

La position de l'acide aminé qui remplace les acides aminés chargés positivement dans le S4 influe sur la voltage-dépendance du *gating pore current*. En effet, il a été montré que pour le remplacement de la première ou seconde charge positive (en général l'arginine), le courant oméga se révèle à des valeurs hyperpolarisées plus négatives que -20 ou -40 mV

(Sokolov *et al.*, 2007 ; Struyk & Cannon, 2007 ; Struyk *et al.*, 2008 ; Sokolov *et al.*, 2010 ; Gosselin-Badaroudine *et al.*, 2012) alors que si la substitution affecte une arginine du côté le plus interne du segment S4, le courant oméga peut être activé à des valeurs dépolarisées (Fan *et al.*, 2013 ; Moreau *et al.*, 2015).

3.8 Mutations en dehors d'un segment S4 et *gating pore current* ?

En 2009 et 2012, des mutations dans la sous-unité Ca_v1.1 localisées en dehors d'un S4, l'une située dans le S3/DIII et l'autre dans la boucle interne S4-S5 du domaine III ont été identifiées chez des patients présentant un tableau clinique HypoPP (Ke *et al.*, 2009 ; Li *et al.*, 2012). Aucune étude électrophysiologique n'a été réalisée pour ces mutations de type HypoPP1.

A l'heure actuelle, il existe une seule étude structure-fonction où une mutation en dehors d'un S4 a révélé produire un *gating pore current* (Campos *et al.*, 2007). Cette étude, dans le canal K⁺, a consisté à générer une première mutation dans le segment S2 qui induisait le remplacement de l'isoleucine en position 287 par une histidine (I287H) et une deuxième mutation dans le segment S4 induisant le remplacement de l'isoleucine 241 par une histidine (I241H). De façon surprenante, lorsque le pH_e était acide (pH5) les deux mutations ont induit un courant de fuite porté par des ions protons pour des valeurs de potentiel hyperpolarisées. L'analyse de la position de ces isoleucines dans le canal montre que celles-ci sont situées dans la même région que la première arginine du segment S4 du canal, suggérant alors que les segments adjacents aux segments S4 font partie intégrante de la formation du septum hydrophobe du canal, et qu'une mutation dans cette région peut perturber la perméabilité du canal et mener à la formation d'un *gating pore*.

IV TRAITEMENTS MEDICAUX DE L'HYPOPP

L'HypoPP est une maladie incurable. Il existe néanmoins plusieurs traitements qui parviennent à prévenir les crises de paralysie ou à en limiter la sévérité.

4.1 Premiers traitements

Les stratégies d'évitement consistent tout d'abord à abroger les facteurs déclencheurs des crises, tels que l'exercice intense, l'immobilité prolongée ou encore l'ingestion importante de carbohydrates. Depuis les années 1900, la supplémentation orale ou intraveineuse en K⁺ est

souvent requise dans le but de raccourcir la durée des crises ou de normaliser la kaliémie. Il est conseillé aux patients de prendre ce traitement de K^+ avant le couché étant donné que les crises surviennent durant la nuit ou au matin. D'autres études thérapeutiques ont montré que le spironolactone avait un effet bénéfique sur la diminution de la fréquence des crises. En effet, le spironolactone est un diurétique d'épargne du K^+ qui limite l'excrétion de K^+ en jouant un rôle d'antagoniste compétitif de l'aldostérone, hormone minéralocorticoïde qui augmente la réabsorption de Na^+ et la sécrétion de K^+ (*Buruma & Schipperheyn, 1979*).

4.2 Acétazolamide

A l'origine, l'acétazolamide est un médicament utilisé contre le mal aigu des montagnes, l'hypertension oculaire ou encore l'alcalose métabolique. En 1962, un nouveau traitement avec l'acétazolamide a été mis en place par *McArdle* pour le traitement de la Paralysie Périodique Hyperkaliémique (HyperPP). L'acétazolamide (ACT) est un inhibiteur de l'anhydrase carbonique qui catalyse la conversion d'une molécule de CO_2 avec une molécule de H_2O en formant une molécule de H^+ et de HCO_3^- (et inversement). En 1968, *Resnick* rapporte que l'ACT a un effet prophylactique dans l'HypoPP. Au premier abord, ce résultat semble contraire à la logique de traitement puisque l'ACT diminue la kaliémie. Cependant, les premiers patients ayant eu recours à ce type de médication montrent une diminution de la fréquence et de la sévérité des crises de paralysie. Les effets bénéfiques de l'ACT pourraient passer par une acidification métabolique que le médicament est connu pour induire puisqu'une acidification métabolique provoquée par l'administration de chlorure d'ammonium enrayer la survenue des crises. De plus, il a été montré qu'une alcalose métabolique peut au contraire provoquer une crise de paralysie qu'il est possible de stopper avec une injection intraveineuse d'ACT. D'autres effets potentiellement bénéfiques de l'ACT ont été montrés, notamment sa capacité à augmenter de 50% l'activité des canaux K^+ calcium-dépendants (KCa) *in vitro* et de diminuer l'apparition de vacuoles dans les fibres musculaires de rats déplétés en K^+ (*Tricarico et al., 2000 et 2008*).

Néanmoins, le traitement à l'ACT n'est efficace que chez 50% des patients. De façon surprenante, la plupart des patients HypoPP2 ne présentent aucune amélioration ou au contraire présentent une aggravation des crises de paralysie lors de la prise de l'ACT. De façon aussi étonnante, les résultats montrent une réduction de la sévérité et de la fréquence des crises plus marquée lorsque les patients HypoPP1 portent une mutation de type R>H (*Matthews et al., 2011*). Enfin, des expériences de mesure de courants Cl^- dans des cellules HEK293T transfectées avec le canal Cl^- musculaire ClC-1 ont suggéré que l'ACT aurait des

effets bénéfiques en activant directement le canal chlore et déplaçant ainsi le V_{rest} vers des potentiels de membrane hyperpolarisés (Eguchi *et al.*, 2006).

4.3 Inhibiteurs de la NKCC

Les patients qui ne supportent pas l'acétazolamide ou chez lesquels il n'a plus d'effet après un traitement prolongé ont recours à des traitements alternatifs tels que le bumétanide, un diurétique bloqueur des NKCC (voir chapitre II). En effet, le NKCC1 exprimé dans le muscle squelettique utilise le gradient électrochimique du Na^+ pour faire entrer un ion K^+ et deux ions Cl^- augmentant ainsi la concentration intracellulaire de Cl^- , qui, n'étant plus distribué passivement, favorise la dépolarisation (Geukes Foppen *et al.*, 2002). Wu *et al.* (2013a *et b*) ont entrepris des tests avec cette drogue sur des souris transgéniques HypoPP2 (R669H) et HypoPP1 (R528H). Dans les deux types de souris transgéniques, les résultats *in vitro* ont montré que l'utilisation de bumétanide (75 μM) permet de maintenir le développement de force durant une hypokaliémie (2 mM) qu'il soit ajouté en même temps que la solution hypokaliémique ou 30 min après. La préservation de la force musculaire par le bumétanide a aussi été démontrée dans le cas de l'utilisation d'une solution hypertonique connue pour induire une augmentation de l'activité de la NKCC1 dans le muscle squelettique de rat (Gosmanov *et al.*, 2003). L'inhibition de la NKCC induite par le bumétanide aurait un rôle protecteur en limitant l'accumulation de Cl^- dans le cytoplasme. De plus, son rôle protecteur sur la perte de force serait supérieur à celui de l'ACT. Enfin, pour confirmer ces résultats, les chercheurs ont expérimenté sur les souris transgéniques HypoPP1-R528H un autre inhibiteur de la NKCC, le furosémide. Les résultats *in vitro* ont montré que le furosémide (15 μM) prévenait la perte de force lors d'une hypokaliémie (2 mM) lorsqu'il était ajouté en même temps que la solution appauvrie en K^+ mais qu'il ne permettait pas de rétablir la perte de force occasionnée par cette hypokaliémie si celui-ci était ajouté 30 min après l'exposition des muscles à la solution contenant 2 mM de K^+ . Bien que le bumétanide et le furosémide soient deux bloqueurs de la NKCC, les résultats montrent que la perte de force engendrée par une hypokaliémie peut être annulée par le bumétanide mais ne peut pas être annulée par le furosémide. Cette différence de résultats pourrait être expliquée par le fait que le furosémide serait 10 fois moins efficace que le bumétanide (*pour revue, voir Russell et al.*, 2000). Bien que le traitement chronique avec ces agents entraîne une augmentation de la perte de K^+ dans les urines, leur utilisation pourrait s'avérer bénéfique chez des patients ne pouvant pas être traités avec l'ACT.

4.4 Dichlorphénamide

Le dichlorphénamide (DCP) est aussi un inhibiteur de l'anhydrase carbonique utilisé dans le traitement des glaucomes ou des acidoses respiratoires. Le dichlorphénamide a été testé dans des essais cliniques de phase I et II. Des résultats très prometteurs ont été obtenus puisque le traitement a induit une diminution de la fréquence et de la sévérité des crises chez des patients HypoPP1 (*Tawil et al., 2000*). En 2016, un essai clinique de phase III appelé « HYP-HOP » a été élaboré. L'essai comprenait un test en double aveugle sur des patients atteints de Paralysie Périodique Hyperkaliémique (HYP) ou des patients atteints d'HypoPP (HOP). La première phase consistait à donner aux patients un traitement de 9 semaines avec un placebo ou avec le dichlorphénamide, puis ce même traitement pendant 1 an. Les résultats ont montré une diminution de la fréquence des crises de paralysies pour les patients HypoPP traités avec le DCP (*Sansone et al., 2016*). Ce médicament constituerait une alternative chez des patients souffrant d'HypoPP2 ou ne supportant plus l'ACT.

Problématique

A la lecture de la littérature sur l'HypoPP1, il apparaît assez clairement que les crises de paralysie résultent d'un état anormalement dépolarisé des fibres musculaires conduisant à l'inactivation des canaux Na^+ et la perte d'inexcitabilité. En revanche, les mécanismes physiopathologiques qui contribuent à maintenir les fibres dans cet état dépolarisé restent flous. Il est peu probable qu'une modification des propriétés de détecteur de potentiel ou de canal calcique voltage-dépendant du DHPR soit responsable de cet état dépolarisé, puisque, si tel était le cas, la faiblesse musculaire devrait être permanente. Il est d'autre part difficile d'entrevoir le lien de cause à effet susceptible d'exister entre la modification de l'influx calcique à travers les DHPR et/ou du contrôle de l'ouverture de RyR1 par le DHPR et cette dépolarisation.

Les recherches menées sur les canaux Na^+ et K^+ voltage-dépendants conduisent à proposer une hypothèse bien plus plausible selon laquelle les mutations HypoPP1 engendreraient un pore accessoire, distinct du pore conducteur des ions Ca^{2+} , portant un courant dépolarisant au potentiel de repos. Les études des groupes de *Lehmann-Horn* et de *Cannon* tendent à le démontrer. Ces deux groupes décrivent en effet un courant de fuite dépolarisant exacerbé se développant au potentiel de repos dans des cellules musculaires respectivement de patients HypoPP1 et de souris transgéniques. Cependant plusieurs questions subsistent. D'une part, dans ces deux modèles d'étude, une myopathie est installée comme en témoignent les perturbations ultrastructurales mises en évidence dans les fibres musculaires. Dans ces conditions, les modifications des propriétés électriques des cellules révélées dans ces études pourraient en partie résulter de ces altérations ultrastructurales et ne pas rendre compte des conséquences directes des mutations. D'autre part, si le développement d'un courant de fuite est avéré, en revanche la nature des ions transportés par ces courants de fuite n'est pas connue. L'identification des ions portés par ce courant apparaît pourtant cruciale pour connaître quelles sont les conditions qui précipitent ou enrayent les crises de paralysie. Enfin, à ce jour, seules les mutations HypoPP de type 1 ou 2 affectant des résidus arginine des segments S4 ont été étudiées. La mutation V876E affecte un segment S3 et pourtant induit des symptômes HypoPP1 très sévères. La question se pose de savoir si un courant de fuite se développe aussi dans le cas de cette mutation et, si ce courant est présent, s'il présente les caractéristiques d'un *gating pore current*.

Dans ce contexte, les objectifs de ce travail de thèse ont été d'étudier les conséquences fonctionnelles de l'expression « aigüe » de $Ca_v1.1$ humains sauvages, mutés R1239H et V876E dans la fibre musculaire squelettique de souris afin de s'affranchir des répercussions structurales inhérentes aux modèles utilisés jusqu'à présent. En utilisant les techniques de potentiel imposé et de mesure des changements de concentrations de H^+ ou de Na^+ à l'aide d'indicateurs fluorescents, nos études ont consisté à (i) mesurer de manière comparée les courants Ca^{2+} de type L dans les fibres exprimant les différents gènes transfectés, (ii) rechercher la présence d'un courant de fuite au potentiel de repos s'apparentant à un *gating pore current* dans les fibres exprimant les formes R1239H et V876E, et (iii) déterminer la nature des ions portés par ces courants de fuite.

Matériels & Méthodes

Ce travail de thèse a fait l'objet d'expérimentations animales réalisées dans le respect des directives du Ministère Français de l'Agriculture (87/848), de la Communauté Européenne (86/609/EEC) et du comité d'expérimentation animale de l'université Lyon 1.

I MATÉRIEL BIOLOGIQUE

1.1 Animaux

Les animaux utilisés dans ce travail sont des souris mâles Swiss OF1 (Charles Rivers Laboratories, l'Arbresle, France) âgés de 4 semaines à leur arrivée à l'animalerie du laboratoire.

1.2 Muscles

Les fibres musculaires squelettiques utilisées dans l'expérimentation sont issues des muscles interosseux (IO) ou des muscles *flexor digitorum brevis* (*fdb*) situés au niveau des pattes arrière des souris. Ces muscles sont essentiellement constitués de fibre de type IIa.

1.3 Transfert de gènes *in vivo*

1.3.A Plasmides d'expression

Trois plasmides pCMV6-AC-GFP ont été achetés par le laboratoire à la société Origene (MA, USA). Les plasmides contiennent soit la séquence génétique de la sous-unité $\alpha 1S$, CACNA1S humaine (NM_000069) saine (Wild Type, WT), soit la séquence codant le gène CACNA1S qui comporte la mutation HypoPP1 R1239H au niveau de la deuxième arginine du segment S4 du domaine IV (R1239H), soit la séquence codante pour le gène CACNA1S qui comporte la mutation HypoPP1 V876E située dans le segment S3 du domaine III (V876E). Chaque plasmide a été amplifié séparément dans des bactéries compétentes (X-Gold) et isolés par utilisation d'un kit de biologie moléculaire (MegaPrep Endofree, Qiagen). L'étiquette protéique de fluorescence verte (Turbo-Green Fluorescent Protein, Turbo-GFP) est placée en C-terminale.

1.3.B Technique d'électroporation *in vivo* chez la souris

L'expression de la sous-unité $\alpha 1S$ humaine (WT ou mutée) est obtenue avec la méthode de transfert de gène *in vivo* par électroporation. Les souris sont anesthésiées par inhalation d'isoflurane (3%, 900 ml/min) en utilisant l'appareil d'anesthésie (Univentor 400 Anaesthesia Unit, Univentor, Zejtun, Malta). Les souris sont placées devant un masque libérant un flux continu d'isoflurane (3 ml/min, 3%). Une solution de 20 μ l de NaCl

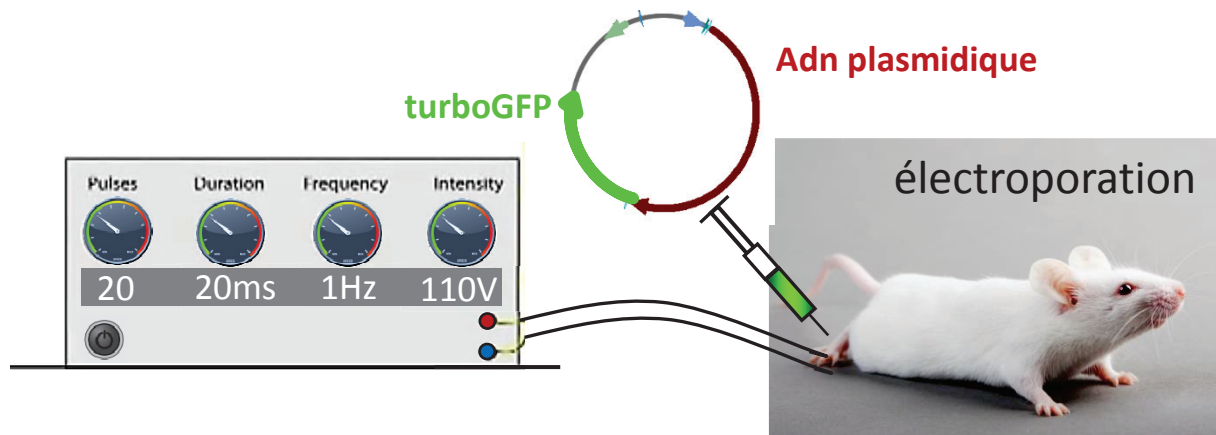


Figure 18 : Principe du transfert de gène *in vivo* par la technique d'électroporation

L'ADN plasmidique contenant la séquence d'ADN d'intérêt couplée à la TurboGFP est injecté au niveau de la paume de la patte postérieure de l'animal. Des chocs électriques sont appliqués à l'aide d'un électroporateur afin de permettre l'entrée du plasmide dans les cellules musculaires squelettiques.

contenant l'enzyme hyaluronidase (2 mg/ml) est injectée dans les pattes arrière des souris au niveau des muscles IO et *fdb*. Les souris sont remises dans leur cage pendant environ 1h, temps nécessaire à l'action de la hyaluronidase. De nouveau, les souris sont anesthésiées et maintenues endormies grâce au masque. Les plasmides sont injectés au niveau des pattes arrière des souris (50 µg d'ADN plasmidique dans un volume final de 20 µl de NaCl). Deux aiguilles d'électroporation en platine sont insérées dans la patte arrière et deux séries de 10 pulses de 170 V/cm d'amplitude et de 20 ms de durée sont appliquées à une fréquence de 1 Hz à l'aide du stimulateur ECM 830 Electro Square Porator, BTX (Figure 18).

Les souris sont ensuite installées dans la salle de quarantaine de l'animalerie du laboratoire. Afin que l'expression de la protéine Ca_v1.1 soit optimale, il est nécessaire d'attendre une période d'environ 1 mois.

1.4 Préparation des muscles

Après environ 1 mois, les souris sont anesthésiées avec l'isoflurane comme décrit précédemment puis elles sont euthanasiées par dislocation cervicale. Les muscles IO et *fdb* sont récupérés après dissection et placés dans une solution de Tyrode contenant 2 mg/ml de l'enzyme collagénase de type I pendant 45 min à 37°C afin de procéder à la dissociation enzymatique des muscles. A la fin de l'incubation, les muscles sont réintroduits dans une solution de Tyrode à température ambiante puis conservés au froid (4°C) sur la nuit.

II ELECTROPHYSIOLOGIE

2.1 Enregistrements électrophysiologiques dans la fibre musculaire : *silicone-clamp*

Le *silicone-clamp* est une technique développée et utilisée au laboratoire (Jacquemon, 1997 ; Collet et al., 2004). Cette technique adaptée à des fibres musculaires de petite taille comme les IO et les *fdb* (0.4 à 1 mm de long et 20 à 50 µm de diamètre) consiste à isoler électriquement la fibre musculaire en la recouvrant d'une fine couche de silicone sur la majeure partie de sa longueur en ne laissant émerger de la gaine qu'une portion libre de fibre d'environ 100 µm. La réduction de la surface membranaire assure un contrôle quasi optimal du potentiel de membrane des fibres.

La technique consiste tout d'abord à appliquer une fine couche de silicone (Rhodia 70428, Rhône-Poulenc, France) sur une lame de verre circulaire (35 mm). Une goutte de milieu de culture (650 µl) contenant 10% de sérum de veau fœtal (MI199, Eurobio) est déposée au centre de la lame de verre puis les muscles sont triturés mécaniquement dans la

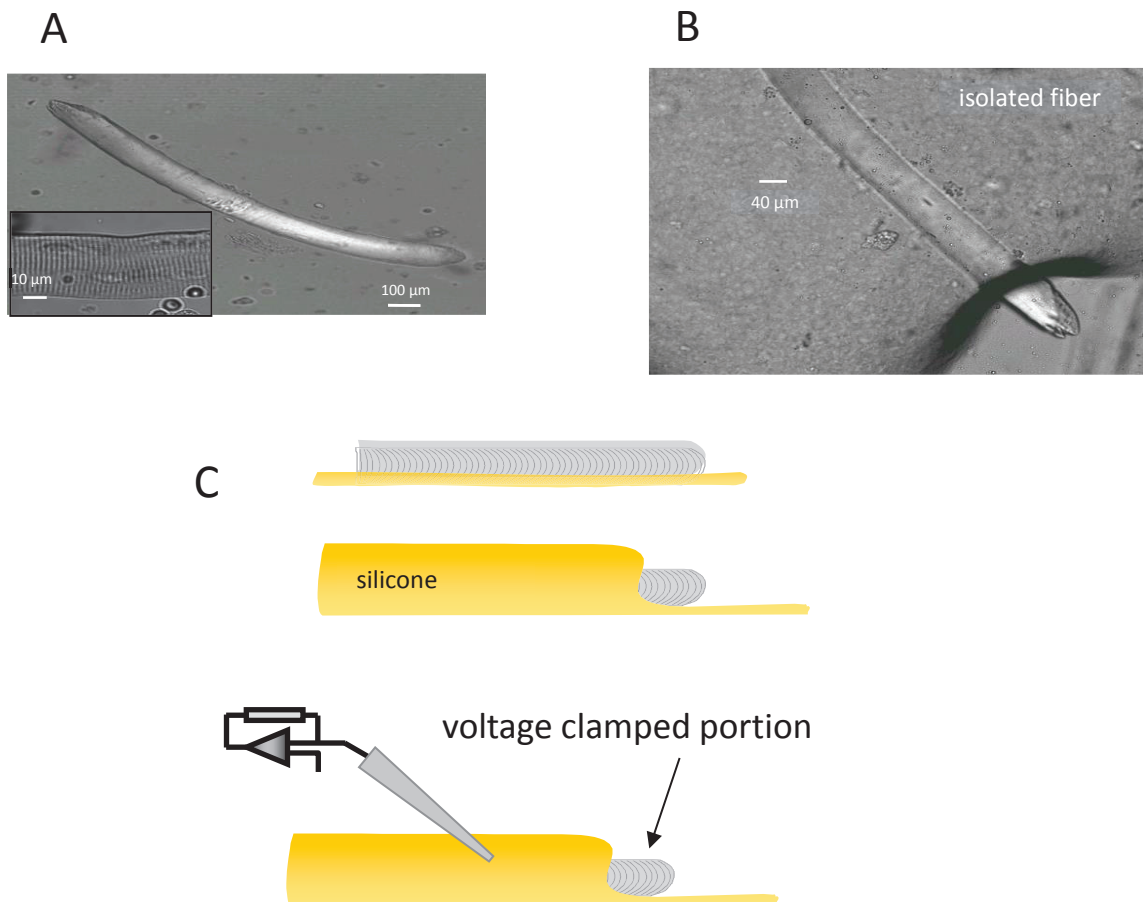


Figure 19 : Principe de la méthode électrophysiologique de *silicone-clamp*

- A. Après dissociation enzymatique et mécanique, les fibres musculaires squelettiques isolées sont disposées sur une couche de graisse de silicone.
- B. Les cellules sont ensuite recouvertes de cette même graisse sur leur majeure partie. Une électrode est ensuite empalée dans la cellule au niveau de la portion de la cellule recouverte de silicone afin d'imposer le potentiel et d'enregistrer les courants ioniques générés au niveau de la partie libre de la cellule.
- C. Illustration des différentes étapes de la technique.

D'après Jacquemond, 1997

goutte du milieu de culture afin de détacher et d'isoler quelques fibres sur la lame de verre. Environ 90% de la fibre est recouvert de la même graisse de silicone. Pour les cellules turbo-GFP positives, la zone d'expression est laissée émergée de la graisse afin que les enregistrements électrophysiologiques se fassent au niveau de la région d'expression de la sous-unité transfectée. Le milieu de culture est remplacé par un milieu correspondant à la solution externe d'enregistrement et une électrode de *patch-clamp* (borosilicate glass, Harvard) de 3-5 M Ω de résistance et contenant une solution intracellulaire est insérée dans la graisse. Le potentiel imposé est réglé sur -80 mV. L'électrode est ensuite introduite dans la cellule jusqu'au fond de la lame afin de briser légèrement la pointe, permettant ainsi la dialyse du contenu de l'électrode dans le cytoplasme de la cellule pendant 20 minutes (Figure 19).

2.2 Appareillages électrophysiologiques

Le poste d'électrophysiologie se compose d'un microscope inversé, d'un micromanipulateur d'un amplificateur (RK-400, Bio-Logic, Claix, France), d'un convertisseur analogique-numérique (Digidata 1400A, Molecular Devices) et d'un ordinateur. Les impulsions de potentiel et les acquisitions des signaux de courant et de potentiel sont contrôlées par le logiciel pClamp10 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). La résistance série est compensée de façon analogique afin de contrôler au mieux le potentiel, son amplitude et sa cinétique.

III MESURES DE FLUORESCENCE

Les mesures de fluorescence sont réalisées à l'aide d'un microscope à fluorescence équipé d'un objectif x40 à immersion à huile. L'excitation des indicateurs est émise par un monochromateur (Cairn Research, Kent, United Kingdom) via une fibre optique. La fluorescence émise est recueillie à l'aide d'une caméra CCD (*Charge-coupled device*) (Roper Scientific, Evry, France). L'excitation et l'acquisition des signaux sont contrôlées à l'aide du logiciel MetaFluor (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Durant toute la durée de l'enregistrement, la cellule est maintenue à -80 mV et les courants capacitifs sont mesurés via l'application d'une impulsion hyperpolarisante de 10 mV précédant chaque impulsion dépolarisante ou rampe.

3.1 Mesure du pH intracellulaire : BCECF

3.1.A Caractéristiques de la sonde BCECF

Le BCECF (2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein, Thermo Fischer, France) est une sonde utilisée comme indicateur de pH intracellulaire. La forme non soluble free-acid (FA-BCECF) est diluée à 100 μ M dans la solution intracellulaire et dialysée dans la cellule. Le signal de fluorescence est obtenu après une excitation alternative de 490 nm et 450 nm et dont la longueur d'émission est mesurée à 510 nm. La longueur d'onde à 450 nm correspond au point isobestique de la sonde. La double excitation permet d'utiliser un rapport des fluorescences $R = F_{490}/F_{440}$ et ainsi de s'affranchir des variations de fluorescence qui ne sont pas en lien avec des variations de pH. Les variations de fluorescence de la sonde dépendent directement des variations de pH intracellulaire. En milieu acide, les H^+ se fixent sur le fluorophore BCECF ce qui induit une diminution de fluorescence de la sonde, au contraire, lorsque le milieu est alcalin la fluorescence de la sonde augmente.

La conversion du signal de fluorescence en une valeur de pH est effectuée au moyen de l'équation de Hill : $pH_i = pK_a + \log [(R-R_{min})/(R_{max}-R)]$ ou le pK_a est la constante de dissociation des H^+ , R est le ratio F_{490}/F_{440} , R_{min} et R_{max} correspondent aux H^+ liés à la sonde ou H^+ libres respectivement. Le pK_a *in vitro* de la sonde est donné pour 6.90.

3.1.B Protocole d'utilisation de la sonde

Le logiciel MetaFluor permet de positionner une zone de mesure de forme circulaire au niveau de la portion libre de fibre au niveau de laquelle la mesure d'intensité de fluorescence sera réalisée (région d'intérêt). Une zone circulaire de mesure de même surface est ajoutée dans le fond afin de soustraire la fluorescence parasite. Le temps d'exposition aux longueurs d'excitation varie entre 15 et 30 ms selon l'intensité de fluorescence émise. La fréquence d'enregistrement des images est de 0.2 Hz et la mesure de l'intensité de fluorescence se fait sur la région d'intérêt sélectionnée.

Dans une série d'expériences, la sonde a été étalonnée. A la fin de chaque enregistrement, la cellule est exposée à 3 solutions hyperpotassiques tamponnées à différents pH et contenant un ionophore protonique (nigéricine) selon l'ordre suivant : pH 7, pH 8 puis pH 5,5. Cette expérience permet d'imposer un pH_i identique au pH_e appliqué. Ce changement de solution à 3 pH différents permet de déterminer le R_{min} (à pH 5,5), le R_{max} (à pH 8) et le pK_a de chaque cellule. Ces trois paramètres sont calculés en ajustant aux valeurs mesurées l'équation de Hill : $pH_i = pK_a + \log [(R-R_{min})/(R_{max}-R)]$.

Les vitesses d'acidification ont été évaluées en ajustant une équation linéaire aux variations du rapport de fluorescence ou du pH_i .

3.2 Mesure du Na^+ intracellulaire

3.2.A Caractéristiques de la sonde SBFI

Le SBFI (Na^+ -binding benzofuran isophthalate, Thermo Fisher, France) est une sonde utilisée comme indicateur de Na^+ intracellulaire. C'est une forme non soluble et donc imperméable aux membranes. La sonde est diluée à 200 μM dans la solution intracellulaire et dialysée dans la cellule. Le signal de fluorescence est obtenu après une excitation alternative à 340 nm et 380 nm où la longueur d'onde à 380 nm correspond au point isobestique de la sonde. L'émission de fluorescence est mesurée à 510 nm. La fixation du sodium sur la sonde SBFI induit le déplacement du spectre d'excitation de la sonde à 340 nm dans un milieu riche en Na^+ . La double excitation permet une utilisation ratiométrique de l'indicateur en mesurant un rapport des fluorescences émises en réponse alternativement à une excitation à 340 nm et à 380 nm (F340/F380), s'affranchissant ainsi des variations de fluorescence indépendantes de la modification des concentrations de Na^+ . Une augmentation de la concentration intracellulaire de Na^+ se traduit par une augmentation du rapport de fluorescence émise par le SBFI.

3.2.B Protocole d'utilisation de la sonde

Les mesures des variations de fluorescence sont de même effectuées au niveau de la portion libre de la cellule. Le temps d'exposition aux longueurs d'ondes d'excitation varie entre 30 et 50 ms selon l'intensité d'émission obtenue et la fréquence d'acquisition des images est de 0.2 Hz. Les vitesses d'acidification ont été évaluées en ajustant une équation linéaire aux variations du rapport de fluorescence.

IV ANALYSES DES DONNEES

4.1 Electrophysiologie

Entre les périodes de stimulation, la cellule est maintenue à -80 mV. Chaque impulsion de potentiel ou rampe de voltage est précédée d'une impulsion hyperpolarisante de -10 mV et de 100 ms de durée permettant de mesurer la résistance de membrane et la valeur du condensateur membranaire. La valeur de ce condensateur est estimée en mesurant l'aire sous la trace du courant capacitif, correspondant à la quantité de charges accumulées sur le

condensateur membranaire. Ainsi, tous les courants mesurés sont rapportés à la valeur de condensateur de la portion de fibre étudiée et sont exprimés en densités de courant (A/F).

La courbe de voltage-dépendance du pic de courant calcique de type L est ajustée par l'équation de Boltzmann :

$$I_L = G_{\max} (E_m - E_{\text{rev}}) / ((1 + \exp ((E_{1/2} - E_m) / k)))$$

où I_L représente l'amplitude au pic du courant en réponse à une dépolarisation E_m , E_{rev} est le potentiel d'inversion apparent, G_{\max} est la conductance maximale, $E_{1/2}$ représente le potentiel de demi-activation et k est le facteur de pente.

V SOLUTIONS

5.1 Solutions section 1

5.1.A Solutions externes de TEA

| Composés | Concentration finale (mM) |
|----------------------|---------------------------|
| TEA-methanosulfonate | 140 |
| CaCl ₂ | 2.5 |
| MgCl ₂ | 1 |
| Tetrodotoxine (TTX) | 2.10 ⁻³ |
| 1,4-aminopyridine | 2 |
| HEPES / MES | 10 |

pH ajusté à 7.2, 6 ou 5 avec de l'acide méthanesulfonique

5.1.B Solutions externes de Tyrode

| Composés | Concentration finale (mM) |
|-------------------|---------------------------|
| NaCl | 140 |
| KCl | 5 |
| MgCl ₂ | 1 |
| CaCl ₂ | 2.5 |
| HEPES / MES | 10 |

pH ajusté à 7.2, 6 ou 5 de l'acide méthanesulfonique

5.1.C Solutions externes utilisées pour analyser le courant Kir

| Composés | Concentration finale (mM) |
|-------------------|---------------------------|
| NaCl | 120 |
| KCl | 20 |
| MgCl ₂ | 1 |
| BaCl ₂ | 0.5 |
| HEPES | 10 |

pH ajusté à 7.2 ou 6 avec de l'acide méthanesulfonique

5.1.D Solutions internes

| Composés | Concentration finale (mM) |
|------------------------------------|---------------------------|
| K-Glutamate | 120 |
| Na ₂ -ATP | 5 |
| Na ₂ -Phosphocreatine | 5 |
| MgCl ₂ | 5.5 |
| Glucose | 5 |
| HEPES* | 5 / 1 |
| EGTA / **Mesure du pH _i | 10 / 0 |
| ***BCECF | 0.1 |

pH ajusté à 7.2 avec du potassium hydroxyde

* Solution interne contenant 1 mM d'HEPES pour les mesures du pH_i

** Solution interne dépourvue d'EGTA pour les mesures du pH_i

*** Concentration de BCECF utilisée pour les analyses du pH_i en fluorescence

5.1.E Solutions internes utilisées pour la calibration du BCECF

| Composés | Concentration finale (mM) |
|-------------------|---------------------------|
| K-Glutamate | 140 |
| MgCl ₂ | 2 |
| Nigéricine | 0.01 |
| HEPES | 10 |

pH ajusté à 8, 7 ou 5.5 avec du potassium hydroxyde ou de l'acide méthanesulfonique

5.2 Solutions section 2

Les mêmes solutions externes de TEA-MeSO₃ ou de Tyrode et les solutions internes ont été utilisées pour la section 2. Des solutions différentes ont été employées pour la mesure du sodium intracellulaire.

5.2.A Solution externe : mesures de fluorescence en SBFI et du courant de fuite de Na⁺

| Composés | Concentration finale (mM) |
|-------------------|---------------------------|
| NMDG | 140 |
| KCl | 5 |
| MgCl ₂ | 1 |
| CaCl ₂ | 2.5 |
| HEPES | 10 |

pH ajusté à 7.2 avec de l'acide méthanesulfonique

5.2.B Solution interne utilisée pour la mesure de fluorescence en SBFI

| Composés | Concentration finale (mM) |
|----------------------------------|---------------------------|
| K-Glutamate | 120 |
| Na ₂ -ATP | 5 |
| Na ₂ -Phosphocreatine | 5 |
| MgCl ₂ | 5.5 |
| Glucose | 5 |
| HEPES | 5 |
| EGTA | 10 |
| SBFI | 0.2 |

pH ajusté à 7.2 avec de l'acide méthanesulfonique

VI ANALYSES STATISTIQUES

Les données ont été analysées avec le logiciel Origin (OriginLab Corp, Northampton, MA, USA). Les résultats sont présentés sous forme de valeurs moyennes \pm SEM (écart à la moyenne) et comparés avec l'utilisation du test de Student, en configuration bilatérale et non appariée (ou appariée lorsqu'il est mentionné). Les valeurs sont considérées significativement différentes (*) lorsque $P < 0.05$, (**) pour $P < 0.005$ et (***) pour $P < 0.0005$.

Résultats

Section 1

Caractérisation d'une conductance de fuite de protons dans des fibres musculaires squelettiques de souris exprimant la mutation R1239H responsable de la Paralysie Périodique Hypokaliémique de type I

La section 1 concerne l'étude de la mutation R1239H (HypoPP1) affectant la 2^{ième} arginine du S4 du domaine IV de la sous-unité Ca_v1.1. L'étude de cette mutation a fait l'objet d'une publication dont le résumé est donné ci-après.

Augmentation d'un courant protonique de repos dans le canal calcique muté R1239H responsable d'HypoPP1

Article 1 : Fuster, C., Perrot, J., Berthier, C., Jacquemond, V., & Allard, B., 2017. Elevated resting H^+ current in the R1239H type 1 Hypokalemic Periodic Paralysis mutated Ca^{2+} channel. *The Journal of Physiology*, 595(20), pp.6417-6428.

La présence d'un courant de fuite anormalement élevé dans des fibres musculaires exprimant une mutation HypoPP1 a été mise en évidence dans deux modèles différents. L'un à partir de fibres musculaires squelettiques provenant de biopsies de patients HypoPP1-R1239H et -R528H (*Jurkat-rott et al., 2009*) et l'autre à partir de fibres musculaires squelettiques de souris transgéniques HypoPP1-R528H (*Wu et al., 2012*). Cependant, la nature ionique de ce courant de fuite n'a pas été déterminée. De plus, dans ces deux modèles est décrit la présence de vacuoles intramusculaires, signes de perturbations ultra-structurales susceptibles d'induire des changements conséquents des propriétés électriques des cellules musculaires.

Dans ce contexte, nous nous sommes proposés d'utiliser un modèle d'expression *in vivo* des sous-unités humaines de $Ca_v1.1$ mutée R1239H et sauvage (WT) dans le muscle de souris afin (i) d'évaluer les répercussions de la mutation sur les propriétés du courant calcique de type L, (ii) de rechercher la présence d'un courant de fuite anormalement élevé dans les fibres R1239H pouvant correspondre à un *gating pore current*, (iii) de déterminer la nature ionique de ce courant de fuite.

Expression de $Ca_v1.1$ humain WT et R1239H

Les images de microscopie confocale à fluorescence révèlent pour les deux sous-unités $\alpha 1S$ WT ou mutée R1239H transfectées des patrons d'expression en striation perpendiculaire à l'axe longitudinal de la fibre. Les profils d'intensité de fluorescence indiquent des pics périodiques de forte intensité de fluorescence en doublet et espacés d'environ 2 μm témoignant de la localisation des canaux au niveau des tubules transverses.

Propriétés du courant de type L dans les fibres exprimant la $Ca_v1.1$ WT ou R1239H

La première étape de ce travail a été d'évaluer les éventuels effets de la mutation R1239H sur le courant de type L, témoin de la fonction canal du DHP. Nous avons montré que la conductance maximale est significativement diminuée dans les fibres R1239H comparée aux fibres WT. Le potentiel de demi-activation ainsi que le potentiel d'inversion du courant sont de même significativement décalés vers des potentiels de membrane négatifs dans les fibres R1239H. Cependant, ce résultat ne pouvant pas expliquer les paralysies musculaires, nous avons ensuite recherché la présence d'un courant de fuite élevé dans les fibres R1239H.

Courant de fuite et effet d'une acidification extracellulaire en condition de repos

Un des résultats majeurs de ce travail a été de démontrer tout d'abord la présence d'un courant de fuite pouvant correspondre à un *gating pore current*, puis de déterminer la nature des ions portés par ce *gating pore current*. Dans ce but, des rampes hyperpolarisantes ont été appliquées à partir d'un potentiel de membrane maintenu à 0, -20, -40 ou -60 mV pour atteindre -120 mV. Ces expériences ont montré que quel que soit le potentiel de membrane de maintien, le courant entrant mesuré entre -80 mV et -120 mV était significativement plus important dans les fibres R1239H comparé aux fibres WT démontrant ainsi la présence d'un courant de fuite élevé dans ces fibres.

Les différentes données de la littérature sur la nature ionique des *gating pore current* indiquent que les mutations conduisant à la substitution d'une histidine à l'arginine créent un pore sélectif aux protons. La mutation R1239H conduisant au même type de substitution, nous avons testé la possibilité que le courant de fuite plus élevé dans les fibres R1239H puisse être porté par des protons. A cette fin, nous avons comparé les amplitudes du courant de fuite en présence d'une solution externe tamponnée au pH physiologique et en présence d'une solution externe tamponnée à pH 6 afin d'augmenter le gradient électrochimique entrant des protons (de 70 mV tel que le prédit l'équation de Nernst) dans une gamme de potentiels de membrane négatifs que les rampes hyperpolarisantes imposent. En moyenne, le courant entrant s'est avéré significativement plus important lorsque le pH externe est abaissé à 6 en comparaison d'une condition où le pH est neutre, un effet curieusement observé non seulement dans les fibres R1239H mais aussi dans les fibres WT. Cependant, la soustraction du courant obtenu à pH 7,2 au courant obtenu à pH 6 indique que le courant généré par l'acidification est significativement plus important dans les fibres R1239H comparé aux fibres WT, suggérant que la composante de courant de fuite porté par des protons est plus intense

dans les fibres R1239H. Ce résultat a été confirmé par des mesures de pH_i à l'aide de l'indicateur BCECF qui montrent d'une part qu'il existe une voie d'entrée protonique active au repos partageant les propriétés d'un canal ionique puisque l'acidification extracellulaire induit une acidification intracellulaire en l'absence de cations monovalents (en présence d'une solution externe contenant du TEAME SO_3) excluant ainsi la participation d'un transporteur. D'autre part, la mesure de pH_i montre que la vitesse d'acidification intracellulaire provoquée par une diminution du pH externe est plus importante dans les fibres R1239H confirmant ainsi le développement d'un courant protonique de repos plus élevé dans ces fibres. Un résultat comparable est obtenu en présence d'une solution externe physiologique et après calibration de l'indicateur, démontrant ainsi que l'entrée de protons n'est pas le résultat d'un passage « forcé » de ces ions lorsque les autres cations, Na^+ ou K^+ , sont absents de la solution externe.

Effet de l'acidification extracellulaire sur le courant de fond en condition physiologique

Durant la réalisation des expérimentations précédentes en présence d'une solution externe physiologique, nous avons observé que l'acidification extracellulaire (pH5) avait eu sur le courant de repos à -80 mV un effet opposé à celui observé en l'absence de cations monovalents dans la solution externe puisque le courant devenait plus entrant avec une augmentation de conductance membranaire en l'absence de cations et plus sortant avec une diminution de conductance membranaire en leur présence. L'acidification extracellulaire pouvait avoir un effet sur une autre conductance ionique qui domine alors sur l'effet potentialisateur de l'entrée de protons en présence d'une solution physiologique. Etant donné que le canal le plus actif au repos pour maintenir la polarisation de membrane est le canal K_{ir} , nous avons testé la possibilité que l'acidification du milieu externe inhibait les canaux K_{ir} . Afin de le vérifier, une série d'expériences a été réalisée sur des fibres non transfectées exposées à une solution externe contenant 20 mM K^+ afin d'augmenter la conductance des K_{ir} , en présence ou non de Ba^{2+} , un bloqueur des canaux K_{ir} , et tamponnée à pH 6 ou 7,2. L'application de rampes hyperpolarisantes entre -40 mV et -110 mV dans ces différentes conditions a montré que l'acidification extracellulaire induisait une diminution significative de la composante de courant inhibée par le Ba^{2+} correspondant au courant K_{ir} tandis que lorsque les canaux K_{ir} sont bloqués par le Ba^{2+} , l'acidification extracellulaire induit un courant protonique de repos comme il l'a été précédemment mis en évidence.

Conclusion

Cette étude démontre d'une part la présence d'un courant de fuite au repos majoritairement porté par des ions protons et plus élevé dans les fibres R1239H. Il est fortement probable que ce courant plus intense s'écoule à travers un *gating pore* induit par la mutation. D'autre part, ce travail indique que l'acidification extracellulaire exerce une action inhibitrice sur les canaux K_{ir} . L'ensemble de ces résultats sera discuté dans la partie *Discussion Générale et Perspectives* du document.

Elevated resting H⁺ current in the R1239H type 1 Hypokalemic
Periodic Paralysis mutated Ca²⁺ channel

Clarisse Fuster, Jimmy Perrot, Christine Berthier, Vincent Jacquemond, Bruno
Allard

Institut NeuroMyoGene, Université Lyon 1, Université de Lyon, UMR CNRS 5310, Inserm U1217, 43
bd du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne, France

Running title: H⁺ current in hypokalemic periodic paralysis

Keywords: voltage-gated Ca²⁺ channel, gating pore, myopathy

Corresponding author: Bruno Allard

Institut NeuroMyoGene
Université Lyon 1, Université de Lyon
UMR CNRS 5310, Inserm U1217
43 bd du 11 Novembre 1918
69622 Villeurbanne
France
E-mail: bruno.allard@univ-lyon1.fr
Phone: (33) 472 431 032
Fax: (33) 4 72 43 26 85

Contents category: Cellular and molecular physiology

This is an Accepted Article that has been peer-reviewed and approved for publication in the The Journal of Physiology, but has yet to undergo copy-editing and proof correction. Please cite this article as an 'Accepted Article'; [doi: 10.1113/JP274638](https://doi.org/10.1113/JP274638).

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Key points summary

- Missense mutations in the gene encoding the $\alpha 1$ subunit of the skeletal muscle voltage-gated Ca^{2+} channel induce type 1 Hypokalemic Periodic Paralysis, a poorly understood neuromuscular disease characterized by episodic attacks of paralysis associated with low serum K^+ .
- Acute expression of human wild type and R1239H HypoPP1 mutant $\alpha 1$ subunits in mature mouse muscles showed that R1239H fibers displayed Ca^{2+} currents of reduced amplitude and larger resting leak inward current increased by external acidification.
- External acidification also produced intracellular acidification at a higher rate in R1239H fibers and inhibited inward rectifier K^+ currents.
- These data suggest that the R1239H mutation induces an elevated leak H^+ current at rest flowing through a gating pore and could explain why paralytic attacks preferentially occur during the recovery period following muscle exercise.

Abstract

Missense mutations in the gene encoding the $\alpha 1$ subunit of the skeletal muscle voltage-gated Ca^{2+} channel induce type 1 Hypokalemic Periodic Paralysis, a poorly understood neuromuscular disease characterized by episodic attacks of paralysis associated with low serum K^+ . The present study aimed at identifying the changes in muscle fiber electrical properties induced by acute expression of the R1239H Hypokalemic Periodic Paralysis human mutant $\alpha 1$ subunit of Ca^{2+} channels in a mature muscle environment to better understand the pathophysiological mechanisms involved in this disorder. We transferred genes encoding wild-type and R1239H mutant human Ca^{2+} channels into hind limb mouse muscle by electroporation and combined voltage-clamp and intracellular pH measurements on enzymatically dissociated single muscle fibers. As compared to fibers expressing wild-type $\alpha 1$ subunits, R1239H mutant expressing fibers displayed Ca^{2+} currents of reduced amplitude and a higher resting leak inward current that was increased by external acidification. External acidification also produced intracellular acidification at a higher rate in R1239H fibers and inhibited inward rectifier K^+ currents. These data indicate that the R1239H mutation induces an elevated leak H^+ current at rest flowing through a gating pore created by the mutation and that external acidification favors onset of muscle paralysis by potentiating H^+ depolarizing currents and inhibiting resting inward rectifier K^+ currents. Our results could thus explain why paralytic attacks preferentially occur during the recovery period following intense muscle exercise.

Introduction

Type 1 Hypokalemic Periodic Paralysis (HypoPP1) is a genetic human neuromuscular disorder characterized by transient failure of muscle excitability occurring in association with hypokalemia and triggered by rest after strenuous exercise or carbohydrate load (Lehmann-Horn, 2004; Cannon, 2015). This pathology is caused by missense mutations in the gene encoding the $\alpha 1$ subunit of the dihydropyridine receptor or Cav1.1, which fulfills the dual function of voltage-gated Ca^{2+} channel and voltage sensor of the excitation-contraction coupling in skeletal muscle (Jurkat-Rott *et al.*, 1994; Ptacek *et al.*, 1994; Rios and Pizarro, 1991; Melzer *et al.*, 1994; Schneider, 1994). The $\alpha 1$ subunit is composed of 4 homologous domains (I to IV), each of which contains 6 membrane-spanning segments (S1 to S6) (Catterall, 2011). Upon depolarization, S4 segments enriched with positively charged residues translocate through a “gating pore” pathway (Gandhi and Isacoff, 2002) conferring in this way voltage-dependence to channel opening and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release. Among the HypoPP1 mutations identified so far, except one, all HypoPP1 mutations consist in substitutions at positively charged arginine residues in S4 segments (Ke *et al.*, 2009; Cannon, 2010; Matthews and Hanna, 2010; Jurkat-Rott *et al.*, 2012, Moreau *et al.*, 2014). A clue toward deciphering the functional link existing between substitutions of arginine residues and transient loss of muscle excitability was provided by site-directed mutagenesis experiments in the closely structurally related voltage-dependent K^+ or Na^+ channels, showing that replacement of outermost arginine by histidine in S4 segments generated a gating pore inward proton current at hyperpolarized potentials (Sokolov *et al.*, 2005; Starace and Bezanilla, 2004; Tombola *et al.*, 2005). Before this gating pore was discovered, early studies revealed the existence of a pathogenic depolarizing inward current triggered by reducing extracellular K^+ in HypoPP fibers (Rüdel *et al.*, 1984; Ruff, 1999). More recently, experiments in fibers from human muscle biopsies revealed an elevated leak current at hyperpolarized potentials in low K^+ in patients carrying HypoPP1 mutations and muscle fibers from a transgenic mouse model for HypoPP1 were also shown to exhibit elevated leak currents at rest (Jurkat-Rott *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2012). However, the ion carried by this leak current was not determined. Moreover, Cav1.1-related HypoPP1 causes progressive vacuolar myopathy associated with muscle ultrastructural abnormalities in transgenic mice and edema or fatty muscle degeneration in patients that might be responsible for a change in muscle electrical properties. Adaptive compensatory mechanisms may also develop in these models and overcome the direct functional effects induced by the mutation.

In the present study, we have been able to acutely express in adult mouse muscles the human wild-type (WT) $\alpha 1$ subunit and the human HypoPP1-related R1239H mutant $\alpha 1$ subunit carrying the mutation in the second outermost arginine of the S4 segment in domain IV, which is associated with the most severe phenotype in terms of paralytic attacks frequency (Jurkat-Rott *et al.*, 2009). Our data indicate that the mutation induced mild changes in the properties of the voltage-gated Ca^{2+} current but generated an elevated leak inward current at negative voltages likely corresponding to a gating pore current. Measurements of the leak current, of the current through the inward rectifier K^+ channel and of the intracellular pH changes in response to external acidification demonstrated that the gating pore current carries protons and that external acidification could represent a precipitating factor of paralysis.

Methods

Ethical approval

All experiments were carried out according to the ethical principles of the French Ministry of Agriculture, the French Department of Veterinary Services and the French Ministry for Higher Education and Research and conform to the principles and regulations as described in the Editorial by Grundy (2015). The experimental protocol for *in vivo* transfection was approved by the Lyon University Animal Experimentation Committee.

In vivo gene transfer and isolation of muscle fibers

Experiments were performed using 4- to 8-week-old male OF1 mice (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France). Expression was achieved by *in vivo* plasmid transfer using a previously described electroporation procedure with minor modifications (DiFranco *et al.*, 2006; Weiss *et al.*, 2008). Mice were anaesthetized by isoflurane inhalation using a commercial delivery system (Univentor 400 Anaesthesia Unit, Univentor, Zejtun, Malta). Then, twenty microliters of a solution containing 2 mg/mL hyaluronidase dissolved in sterile saline was injected into the footpads of each hind paw. One hour later the mouse was re-anaesthetized by isoflurane inhalation. A 50 μl aliquot of 10 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ of the plasmid was injected within the ventral side of the posterior paws through a 29-gauge needle (Terumo, Leuven, Belgium). The paw was then placed between two flat platinum electrodes and two series of twenty pulses of 170 $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ amplitude of 20 ms duration were applied at 1 Hz (ECM 830

Electro Square Porator, BTX). Injected plasmids encoded for C-terminal turbo-GFP-tagged wild-type or R1239H human CACNA1S, the gene encoding the $\alpha 1$ subunit of the skeletal muscle Ca^{2+} channel (Origene, USA). Muscle fibers isolation was carried out 30 ± 5 days later, a latency period which led to the highest expression and tubular localization of the exogenous proteins. Mice were killed by cervical dislocation before removal of interosseal muscles. Single fibers were isolated by a 50 minutes enzymatic treatment at 37°C using a Tyrode solution containing 2 mg/mL collagenase type I (Sigma).

Electrophysiology

Fibers were voltage-clamped using the silicone clamp technique as previously described (Robin and Allard, 2015). The major part of a single fibre was electrically insulated with silicone grease and a micropipette was inserted into the fibre through the silicone layer to voltage the portion of the fibre free of grease (50 to 100 μm length) using a patch-clamp amplifier (Bio-Logic RK-400, Claix, France) in whole-cell configuration. Command voltage and data acquisition were done using the pClamp10 software (Axon Instruments Inc., USA) driving an A/D converter (Digidata 1400A, Axon Instruments Inc., USA). Analog compensation was systematically used to decrease the effective series resistance. The tip of the micropipette was then crushed into the dish bottom to allow intracellular dialysis of the fibre with the intra-pipette solution. Cell capacitance was determined by integration of a current trace obtained with a 10-mV hyperpolarizing pulse from the holding potential and was used to calculate the density of currents (A/F). For Ca^{2+} currents measurements, leak currents were subtracted from all recordings using the same pulse preceding every test pulse supposing a linear evolution of leak current with depolarization. The voltage dependence of the mean Ca^{2+} current density was fitted using the following equation: $I = G_{\text{max}} (E_m - E_{\text{rev}}) / ((1 + \exp((E_{1/2} - E_m)/k)))$, where I is the mean density of the current measured, E_m the test pulse, G_{max} the maximum conductance, E_{rev} the apparent reversal potential, $E_{1/2}$ the half-activation voltage and k a steepness factor. Voltage ramps were applied every 50 s, at a rate of 12 mV/s throughout the study, except for Fig. 8 (16 mV/s). Currents were acquired at a sampling frequency of 10 kHz.

Measurement of pHi

The pHi indicator BCECF (2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein, Molecular Probes) was added at 100 μM in the internal pipette solution. The pH-dependent signal was obtained by alternatively illuminating the cell at 490 and 440 nm through an optical fibre using a monochromator

(Cairn Research, Kent, United Kingdom) and imaging fluorescence above 510 nm using a x40 oil-immersion objective and a CoolSNAP_{EZ} charge-coupled device camera (Roper Scientific, Evry, France). For the conversion of fluorescence ratios into pHi, each fiber was exposed at the end of the experiments to solutions buffered at pH 5.5, 7 and 8 in the presence of the proton ionophore nigericin (Fig. 1). The 3 measured fluorescence ratios were converted into pH values by fitting the relationship between these ratios and pHi with the following equation: $pHi = pKa + \log [(R - R_{min}) / (R_{max} - R)]$, where pKa is $-\log$ dissociation constant, R the 490/440 ratio measured at pH 5.5, 7 and 8 and R_{min} and R_{max} the ratios of the dye in its H^+ -free and H^+ -bound state respectively. The mean pKa obtained was 6.76 ± 0.026 in WT and 6.88 ± 0.049 in R1239H, values which were both closed to the values obtained *in vitro*.

Solutions

Except for Fig. 7 and 8, the external solution contained (in mM) 140 TEA-MeSO₃, 2.5 CaCl₂, 1 MgCl₂, 0.002 tetrodotoxine, 1 4-aminopyridine and 10 HEPES or MES adjusted to pH 7.2, 6 or 5 with TEA-OH or MeSO₃ acid. For Fig. 7 and 8A, the external Tyrode solution contained (in mM) 140 NaCl, 5 KCl, 2.5 CaCl₂, 1 MgCl₂, and 10 HEPES or MES adjusted to pH 7.2, 6 or 5 with NaOH or MeSO₃ acid. In Fig. 7B, 20 mM NaCl was replaced by 20 mM KCl in the external Tyrode solution. The internal dialyzed solution contained (in mM) 120 K-glutamate, 10 EGTA, 5 Na₂-ATP, 5 Na₂-phosphocreatine, 5.5 MgCl₂, 5 glucose, 5 HEPES adjusted to pH 7.2 with K-OH, except for Fig. 7 and 8 where the internal solution was free of EGTA. For BCECF calibration, fibers were exposed at the end of the experiment to solutions containing (in mM) 140 K-glutamate, 2 MgCl₂, 10 HEPES or MES adjusted to pH 8, 7 or 5.5 with K-OH or MeSO₃ acid in the presence of the proton ionophore nigericin (10 μ M). Fibers were dialyzed with the intracellular solution through the micropipette during 20 min prior starting the experiments. Nigericin (Sigma) was dissolved in dimethyl-sulfoxide (DMSO) at 10 mM. Cells were exposed to different solutions by placing them in the mouth of a perfusion tube, from which the rapidly exchanged solutions flowed by gravity. Experiments were carried out at room temperature.

Statistics

Fits were performed with Microcal Origin (Microcal Software Inc., Northampton, MA). Data are given as means \pm S.E.M. and compared using unpaired two-tailed Student t-tests (or paired when mentioned). Differences were considered significant when $P < 0.05$. Labels *, ** and *** indicate $P < 0.05$, $P < 0.005$ and $P < 0.0005$ respectively.

Results

Expression of WT and R1239H HypoPP1 mutant Ca²⁺ channel α 1 subunits in mouse muscle fibers

Genes encoding turboGFP-tagged human WT and R1239H HypoPP1 mutant α 1 subunits of the Ca²⁺ channel were transfected by electroporation into adult hind limb mice muscles (Fig. 2). Confocal fluorescence images revealed for the two channels a regular striated pattern of expression perpendicular to the longitudinal axis of the fiber (Fig. 2C, D). The fluorescence intensity profile showed periodic peaks of high intensity fluorescence in doublets with a spacing of about 2 μ m consistent with proper localization of both WT and R1239H channels in the t-tubule membrane system (Fig. 2E, F). These GFP-positive fibers were selected for voltage clamping.

Comparison of voltage-gated Ca²⁺ currents properties in fibers expressing WT and R1239H α 1 subunits

We first investigated the changes in the properties of the L-type voltage-gated Ca²⁺ currents induced by the R1239H mutation. Fitting a Boltzmann equation in each cell indicated that the mean maximal conductance and the steepness factor of the voltage dependence of the currents were significantly reduced in R1239H fibers as compared to WT fibers. Reversal potential and half-maximal activation were also significantly shifted towards negative voltages in R1239H fibers (Fig. 3).

Comparison of background currents and resting conductance in WT and R1239H fibers

We first noticed that the background current at -80 mV was significantly more inward in R1239H fibers (-5.08 ± 0.47 A/F, $n = 51$) as compared to WT fibers (-3.55 ± 0.21 A/F, $n = 46$, $P = 0.0058$). Then, using the same internal and external solutions as those used for voltage-gated Ca²⁺ currents recordings, fibers were challenged with hyperpolarizing voltage ramps bringing the internal potential to -120 mV from starting potentials of 0, -20, -40 or -60 mV. Figure 4A shows that the currents were markedly more inward over the -30 to -120 mV voltage range in R1239H fibers when the starting holding potential was 0 mV (-6.59 ± 0.58 A/F in R1239H fibers, *versus* -4.73 ± 0.25 A/F in WT fibers at -80 mV, $P = 0.003$) and, on average, the resting slope conductance measured on the linear portion between -120 and -80 mV was found to be significantly higher in R1239H as compared to WT fibers (Fig. 4B). We hypothesized that this elevated membrane conductance at negative voltages resulted from the development of a gating pore current through the mutated Ca²⁺ channels in R1239H fibers. Because experiments performed on the voltage-gated Na⁺ channel mutant R666G indicated that the gating pore was substantially larger after maintaining the cell membrane at depolarized potentials (Sokolov *et al.*, 2010), starting potentials of 0, -20, -40 or -60 mV held during one minute before

applying the ramps were tested. Figure 4B shows that the leak conductance was not affected by the initial value of the holding potential.

Effects of a change in external pH on resting conductance in WT and R1239H fibers

Substitution of arginine residues with histidine in S4 segments have been shown to create a pore selectively permeable to protons in voltage-gated K^+ and Na^+ channels (Starace and Bezanilla, 2004; Struyk and Cannon, 2007). We thus hypothesized that the elevated leak current at negative voltages in fibers expressing mutant R1239H Cav1.1 carries protons. In order to test proton permeation, we investigated the effects of external acidification to augment the inward electrochemical gradient for protons on background membrane currents elicited by descending voltage ramps. Figure 5A shows that a decrease of external pH from 7.2 to 6, which shifts the electrochemical gradient for protons by 70 mV toward positive values, made the currents more inward for potentials more negative than -40 mV in a R1239H fiber. On average, the current was very significantly increased from -6.14 ± 0.74 A/F at pH 7.2 to -7.07 ± 0.8 A/F at pH 6 at -80 mV ($P = 0.0001$, paired t-test) (Fig. 5B). Surprisingly, this effect was also observed in WT fibers but to a much lesser extent (-4.53 ± 0.33 A/F at pH 7.2 to -4.94 ± 0.37 A/F at pH 6 ($P = 0.047$, paired t-test) (Fig. 5C). Subtracting in each cell the current obtained at pH 7.2 to the current obtained at pH 6 (Fig. 5A) revealed a current displaying an inward rectification in both fiber types but of significantly larger amplitude in R1239H fibers (-0.94 ± 0.18 A/F at -80 mV) as compared to WT fibers (-0.41 ± 0.17 A/F, $P = 0.044$) at -80 mV (Fig. 5D). Given the composition of the external solution used in these experiments we thought very unlikely that the increase of the leak inward current induced by external acidification in WT and in R1239H fibers resulted from a modification of the conductance or the gating properties of Na^+ , K^+ or Ca^{2+} currents or involved a co-transporter. The external medium contained Cl^- , but, although Cl^- conductance is known to be by far the most prominent in resting muscle, the low concentration used (7 mM) should minimize its contribution. More importantly, external acidification has been reported to reduce Cl^- conductance in muscle (Hutter and Warner, 1967; Palade and Barchi, 1977), an effect opposite to the increase in conductance observed in the present study. It is thus very likely that the increase in the inward current elicited by external acidification arose from an increase of the inward electrochemical gradient that potentiates a proton selective current. Finally, it has to be noticed that this acid-induced increase in the background membrane current was also observed in fibers from non-transfected mouse muscles.

Changes in intracellular pH induced by external acidification in WT and in R1239H fibers

Our electrophysiological data indicate that a proton conductance is constitutively active at negative potentials in WT fibers and in R1239H fibers but is elevated in R1239H fibers possibly because of the presence of an additional proton flux through the gating pore induced by the mutation. In order to confirm elevated proton permeation in R1239H fibers, we measured the rate of pHi changes induced by a decrease of external pH in fibers held at -80 mV in the presence of the same external solution as the one used for the measurements of the Ca²⁺ and background currents. Figure 6 shows in a R1239H fiber that the fluorescence ratio of the pH indicator decreased as soon as the pH of the external solution was changed, indicating that a transmembrane influx of protons occurred and led to intracellular acidification. This effect was partially reversible upon return to pH 7.2. As expected, measurement of the background current at -80 mV and of the membrane conductance revealed that acidification was associated in a reversible manner with the development of an inward current (Fig. 6A) and an increase in the membrane conductance (Fig. 6B). It is worth noting that the current became more inward and stabilized as soon as the external pH was decreased, ruling out the possibility that the change in the current was secondary to a change in pHi. Linear regression analysis of the fluorescence ratio decrease over the first minute of external acidification indicated that it was significantly higher in R1239H fibers as compared to WT fibers. These data suggests that an influx of protons occurs upon external acidification in both fiber types but which is larger in R1239H fibers.

Acid-induced changes in pHi in WT and in R1239H fibers in the presence of an external physiological solution

We next considered the possibility that the gating pore current in R1239H fibers, which adds to the constitutive resting proton current, could be forced to carry protons when other monovalent cations are absent from the extracellular medium but does not carry protons in the presence of a physiological solution. In order to test this possibility, we measured the rate of intracellular acidification induced by a decrease of external pH in the presence of a Tyrode solution. In this series of experiments, the pH-sensitive indicator was also calibrated to determine the absolute pHi values. Figure 1B gives an example of the change in pHi induced by external acidification in a WT fiber after calibration of the indicator. On average, the rate of intracellular acidification produced by external acidification at -80 mV was significantly higher in R1239H as compared to WT fibers in response to external acidification (Fig. 7). There also was a trend toward a lower mean basal value of pHi in R1239H fibers (7.26 ± 0.07 , $n = 17$) as compared to WT fibers (7.50 ± 0.16 , $n = 15$) ($P = 0.085$) when pHi was measured just at the end of the dialysis period with the dye containing internal solution.

Effect of external acidification on background membrane currents in the presence of an external physiological solution

During the course of the preceding experiments performed in physiological solution, we observed that external acidification gave rise in both fiber types to changes in the background current and membrane conductance opposite to changes observed in the presence of the external TEA-MeSO₃ containing solution, *i.e.* an outward-going change in the background current at -80 mV associated with a reduction of membrane conductance (Fig. 8A). This result indicates that external acidification induces modification of another conductance that dominates over the potentiation of the inward H⁺ current produced by external acidification. We hypothesized that this conductance could correspond to the inward rectifier K⁺ (Kir) conductance which is known to be the most effective in maintaining the resting membrane potential in skeletal muscle and highly active at negative voltages. In order to investigate the effects of external acidification on Kir currents, descending voltage ramps were applied in control fibers from non-electroporated muscles from a holding potential of -40 mV to -120 mV in the presence of an external solution containing 20 mM K⁺ to magnify Kir conductance. Ramps were successively applied in the same fiber in the presence of the K⁺-rich solution buffered at pH 7.2, at pH 6 and then with the well-known Kir channel blocker Ba²⁺ added at 0.5 mM in these two K⁺-rich solutions. As expected, the Ba²⁺-sensitive current which we referred as Kir current displayed an inward rectification and tended to reverse at a value close to the theoretical K⁺ equilibrium potential of -49 mV (Fig. 8B). In accordance with the reduced conductance observed upon acidification in the preceding experiments, Kir currents were found to be significantly reduced at acidic external pH (Fig. 8B, C). Interestingly, in the presence of Ba²⁺, acidification induced the opposite effect, *i.e.* an increase of the background inward current suggesting that a proton current is potentiated when Kir channels are blocked as observed in the presence of the TEA-MeSO₃ containing external solution (Fig. 8C). Again, the fact that the change in the background current occurred and stabilized as soon as the external pH was decreased excluded the possibility that inhibition of Kir channels was secondary to a change in pHi. Finally, we noticed there was a trend toward a less pronounced reduction in membrane conductance induced by external acidification at -80 mV in R1239H fibers ($5.1 \pm 1.41\%$, $n = 9$) as compared to WT fibers ($7.8 \pm 2.16\%$, $n = 9$) suggesting that acidification promoted an additional larger increase in conductance in R1239H fibers likely corresponding to the proton gating pore.

Discussion

Our study reports the functional effects of transfecting human WT and HypoPP1 mutant $\alpha 1$ subunits of the muscle voltage-gated Ca^{2+} channel in mammalian skeletal muscle fibers. Probing human Ca^{2+} channel function in transfected fibers first revealed that the channel conductance was reduced and the voltage-dependence of activation shifted toward negative potentials in the human HypoPP1 R1239H mutant as compared to human WT Cav1.1. These changes are likely underestimated considering that endogenous murine channels are not totally replaced by transfected constructs. A reduction in current density has also been found in other model systems expressing either the same R1239H mutant Cav1.1 or the closely related HypoPP1 mutant R528H channel while the voltage dependence was shown to be either normal, shifted toward negative potentials or shifted toward positive potentials depending on the model used (Sipos *et al.*, 1995; Lapie *et al.*, 1998; Jurkat-Rott *et al.*, 1998; Morrill *et al.*, 1998; Morrill and Cannon, 1999; Wu *et al.*, 2012). Whatever the changes in voltage dependence, and although a reduction in the voltage-gated Ca^{2+} channel conductance may have detrimental effects on muscle force during prolonged activity (Robin and Allard, 2015), these alterations in the Ca^{2+} channel properties cannot readily explain the attacks of weakness reported to occur at rest in this disease.

One of the main findings of our study was that the R1239H mutation induced the development of an elevated leak inward current at negative resting potentials. It is known that the neutralization of arginine residues in the outer portion of a voltage sensor S4 segment in the closely structurally related recombinant voltage-gated K^+ or Na^+ channels induces the development of a gating pore current at hyperpolarized potentials (Starace and Bezanilla, 2004; Sokolov *et al.*, 2005). This also seems to be true for the voltage-gated Ca^{2+} channel when the second outermost arginine of the S4 segment in domain IV is replaced by histidine since we found in the present study that the leak current was augmented in average from -3.55 to -5.08 A/F at -80 mV and the resting membrane conductance measured between -120 and -80 mV increased by 19.6 S/F in fibers expressing the R1239H mutant Cav1.1 for a starting holding potential of 0 mV (Fig. 3B). The only one study reporting an elevated leak current for the R1239H mutation was performed on fibers collected from HypoPP1 patients (Jurkat-Rott *et al.*, 2009). In this work, the leak conductance amounted to 19.5 $\mu\text{S}/\text{cm}^2$, which is twice the conductance of 19.6 S/F we obtained in the present study, considering that human patients are heterozygous for the mutation. This discrepancy could arise from the fact that in our experimental conditions transfected channels stand together with endogenous channels and might indicate that about 50 % of endogenous channels are replaced by transfected mutant channels. Our value of conductance also agrees quite well with the range of values obtained for the R528H mutation in homozygous mouse fibers (28 nS/nF) and in human heterozygous fibers (12 nS/nF), and for the newly identified normokalemic periodic paralysis R1242G mutant Cav1.1

expressed in myotubes (27.5 S/F) that gives rise to a gating pore current activated by depolarization (Jurkat-Rott *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2012; Fan *et al.*, 2013).

By manipulating the pH value of the external solution, we demonstrated that the gating pore current is mainly carried by proton ions. A shift of the electrochemical gradient for protons of 70 mV toward positive values made the background current significantly more inward at negative voltages in R1239H fibers. Surprisingly, an acid-induced change in the resting background current was also observed in WT fibers. To our knowledge, our study is the first to provide evidence for the existence of a proton conductance active at rest in skeletal muscle. The molecular identity of the channel that underlies this current is not known but this channel seems to share comparable properties as pathways identified in sour taste cells and osteoclast-like cells where external acidification also induced the development of an inward proton current (Chang *et al.*, 2010; Kuno *et al.*, 2016). In particular, the proton current here described displayed an inward rectification for voltages lower than -40 mV, which also distinguishes it from the current flowing through voltage-activated proton channels (Bernheim *et al.*, 1993). More importantly, the H⁺ current was found to be larger in R1239H fibers, which likely suggested that the gating pore current responsible for the higher leak in fibers expressing HypoPP1 mutant Cav1.1 carries at least partially protons. This result agrees well with the results obtained with voltage-gated K⁺ and Na⁺ channels which also show that comparable amino acid substitution generates a proton current at hyperpolarized voltages which rectifies in the inward direction (Starace and Bezanilla, 2004; Struyk and Canon, 2007). Monitoring of changes in pHi allowed us to confirm that an elevated influx of protons occurred in R1239H fibers since the rate of intracellular acidification evoked by external acidification at -80 mV was significantly higher in these fibers in the presence of the TEA-MeSO₃ containing solution but also in the presence of Tyrode. Although we cannot exclude that cations other than protons flow through the gating pore, these data indicate that the influx of protons is enhanced in R1239H fibers and thus again demonstrate that this influx very largely contributes to the gating pore inward current. It has to be noted that the magnitude of resting proton conductance and influx here monitored should have been exacerbated as compared to *in vivo* conditions in particular because of the presence of a HEPES buffer containing external solution instead of a CO₂/HCO₃ buffer that should increase the inward driving force for protons by slightly alkalizing the intracellular solution (Westerblad and Allen, 1992). Additionally, this series of experiments revealed that external acidification had an inhibitory effect on Kir channels in parallel with promoting proton influx. Inhibition of Kir channels by extracellular and intracellular protons is well documented (Hibino *et al.*, 2010) but inhibition by a reduction in extracellular pH has never been reported in mammalian skeletal muscle. This kind of regulation is yet critical for muscle excitability because it implies that extracellular acidosis has two cumulative

detrimental effects, first by inhibiting Kir channel conductance and secondly by potentiating a depolarizing inward proton current.

In this respect, our study may point to new pathophysiological mechanisms relevant for the HypoPP1 disease. Intense muscle exercise is known to be associated with production of H^+ ions which accumulate intracellularly and which are also released in the muscle interstitium and in the blood leading to acidosis (Juel, 2008). During exercise, interstitial pH and blood pH decreases in parallel with intracellular pH, although to a lesser extent, so that the inward driving force for external protons should be slightly reduced and Kir channels inhibited but not so as to compromise excitability since attacks of paralysis do not occur during the period of exercise. However, after muscle exercise of heavy intensity, while intramuscular pH returns to resting level with a half-time recovery of about 5 minutes (Juel *et al.*, 1990), arterial blood pH was shown to remain acidic much longer and did not recover even 30 minutes after the end of the exercise (Stringer *et al.*, 1992; Juel *et al.*, 2004). Measurements of interstitial pH during and after exercise have provided contradictory data (Allsop *et al.*, 1990; Street *et al.*, 2001; Lott *et al.*, 2001), but the sustained acidification of arterial blood after cessation of exercise suggests that this is during the recovery period that the inward driving force for protons is the highest and consequently the leak proton inward current through the gating pore maximal. An inhibiting effect of acidosis on Kir channel activity should also add to this inward depolarizing current. These combined depolarizing actions should then favor the occurrence of paralytic attacks at rest after intense muscle exercise, a condition routinely reported to trigger episodes of paralysis in HypoPP. In parallel with acidosis, hypokalemia is an aggravating event mediated by the Na^+-K^+ ATPase activity that also occurs during the post-exercise periods. Na^+-K^+ -ATPase in muscle is indeed over-activated not only during exercise but also during a prolonged period following exercise (Clausen, 2003). By causing a shift of K^+ from plasma into muscle cells, this increased activity efficiently counterbalances the increase in extracellular and blood K^+ occurring during exercise but causes sustained hypokalemia in periods following exercise when muscle K^+ loss has ceased. In this way, hypokalemia and acidosis in the post-exercise period constitute two factors precipitating paralysis by inhibiting Kir channels and promoting proton gating pore current, causing depolarization and eventually inactivation of voltage-dependent Na^+ channels.

Additional information

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author contributions

CF conducted electrophysiological and fluorescence experiments and analyzed data. JP and CB prepared plasmids and electroporated muscles. VJ helped in interpreting the data. BA conducted electrophysiological experiments, analyzed data and wrote the manuscript. All authors have approved the final version of the manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work. All persons designated as authors qualify for authorship, and all those who qualify for authorship are listed.

Funding

This study was supported by the University Lyon 1, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) and the Association Française contre les Myopathies (AFM-Téléthon).

References

- Allsop P, Cheetham M, Brooks S, Hall GM & Williams C (1990). Continuous intramuscular pH measurement during the recovery from brief, maximal exercise in man. *Eur J Appl Physiol* 59, 465-470.
- Bernheim L, Krause RM, Baroffio A, Hamann M, Kaelin A & Bader CR (1993). A voltage-dependent proton current in cultured human skeletal muscle myotubes. *J Physiol* 470, 313-333.
- Cannon SC (2010). Voltage-sensor mutations in channelopathies of skeletal muscle. *J Physiol* 588, 1887-1895.
- Cannon SC (2015). Channelopathies of skeletal muscle excitability. *Compr Physiol* 5, 761-790.
- Catterall WA (2011). Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a003947.
- Chang RB, Waters H & Liman ER (2010). A proton current drives action potentials in genetically identified sour taste cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 22320-22325.
- Clausen T (2003). Na⁺-K⁺ pump regulation and skeletal muscle contractility. *Physiol Rev* 83, 1269-1324.
- DiFranco M, Neco P, Capote J, Meera P & Vergara JL (2006). Quantitative evaluation of mammalian skeletal muscle as a heterologous protein expression system. *Protein Expr Purif* 47, 281-288.
- Fan C, Lehmann-Horn F, Weber MA, Bednarz M, Groome JR, Jonsson MK & Jurkat-Rott K (2013). Transient compartment-like syndrome and normokalaemic periodic paralysis due to a Cav1.1 mutation. *Brain* 136, 3775-3786.

- Grundy D (2015). Principles and standards for reporting animal experiments in The Journal of Physiology and Experimental Physiology. *J Physiol* 593, 2547-2549.
- Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I & Kurachi Y (2010). Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev* 90, 291-366.
- Hutter OF & Warner AE (1967). The pH sensitivity of the chloride conductance of frog skeletal muscle. *J Physiol* 189, 403-425.
- Gandhi CS & Isacoff EY (2002). Molecular models of voltage sensing. *J Gen Physiol* 120, 455-463.
- Juel C, Bangsbo J, Graham T & Saltin B (1990). Lactate and potassium fluxes from human skeletal muscle during and after intense, dynamic, knee extensor exercise. *Acta Physiol Scand* 140, 147-159.
- Juel C, Klarskov C, Nielsen JJ, Krstrup P, Mohr M & Bangsbo J (2004). Effect of high-intensity intermittent training on lactate and H⁺ release from human skeletal muscle. *Am J Physiol* 286, E245-E251.
- Juel C (2008). Regulation of pH in human skeletal muscle: adaptations to physical activity. *Acta Physiol* 193, 17-24.
- Jurkat-Rott K, Lehmann-Horn F, Elbaz A, Heine R, Gregg RG, Hogan K, Powers PA, Lapie P, Vale-Santos JE, Weissenbach J, et al. (1994). A calcium channel mutation causing hypokalemic periodic paralysis. *Hum Mol Genet* 3, 1415-1409.
- Jurkat-Rott K, Uetz U, Pika-Hartlaub U, Powell J, Fontaine B, Melzer W & Lehmann-Horn F (1998). Calcium currents and transients of native and heterologously expressed mutant skeletal muscle DHP receptor $\alpha 1$ subunits (R528H). *FEBS Lett* 423, 198-204.
- Jurkat-Rott K, Weber MA, Fauler M, Guo XH, Holzherr BD, Paczulla A, Nordsborg N, Joechle W & Lehmann-Horn F (2009). K⁺-dependent paradoxical membrane depolarization and Na⁺ overload, major and reversible contributors to weakness by ion channel leaks. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 4036-4041.

Jurkat-Rott K, Groome J & Lehmann-Horn F (2012). Pathophysiological role of omega pore current in channelopathies. *Front Pharmacol* 3, 112.

Ke T, Gomez CR, Mateus HE, Castano JA & Wang QK (2009). Novel CACNA1S mutation causes autosomal dominant hypokalemic periodic paralysis in a South American family. *J Hum Genet* 54, 660-664.

Kuno M, Li G, Moriura Y, Hino Y, Kawawaki J & Sakai H (2016). Acid-inducible proton influx currents in the plasma membrane of murine osteoclast-like cells. *Pflugers Arch* 468, 837-847.

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

Lehmann-Horn F, Rüdel R & Jurkat-Rott K (2004). Nondystrophic myotonias and periodic paralyses. In *Myology* 3rd edn, pp 1257–1300. McGraw-Hill, New York.

Leniger T, Wiemann M, Bingmann D, Widman G, Hufnagel A & Bonnet U (2002). Carbonic anhydrase inhibitor sulthiame reduces intracellular pH and epileptiform activity of hippocampal CA3 neurons. *Epilepsia* 43, 469-474.

Lott ME, Hogeman CS, Vickery L, Kunselman AR, Sinoway LI & MacLean DA (2001). Effects of dynamic exercise on mean blood velocity and muscle interstitial metabolite responses in humans. *Am J Physiol* 281, H1734-1741.

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

Melzer W, Herrmann-Frank A & Lüttgau HC (1994). The role of Ca²⁺ ions in excitation-contraction coupling of skeletal muscle fibres. *Biochim Biophys Acta* 1241, 59-116.

Moreau A, Gosselin-Badaroudine P & Chahine M (2014). Biophysics, pathophysiology, and pharmacology of ion channel gating pores. *Front Pharmacol* 5, 53.

- Morrill JA, Brown RH Jr & Cannon SC (1998). Gating of the L-type Ca channel in human skeletal myotubes: an activation defect caused by the hypokalemic periodic paralysis mutation R528H. *J Neurosci* 18, 10320-10334.
- Morrill JA & Cannon SC (1999). Effects of mutations causing hypokalaemic periodic paralysis on the skeletal muscle L-type Ca^{2+} channel expressed in *xenopus laevis* oocytes. *J Physiol* 520, 321-336.
- Palade PT & Barchi RL (1977). Characteristics of the chloride conductance in muscle fibers of the rat diaphragm. *J Gen Physiol* 69, 325-342.
- Ptacek LJ, Tawil R, Griggs RC, Engel AG, Layzer RB, Kwieciński H, McManis PG, Santiago L, Moore M, Fouad G, Bradley P & Leppert MF (1994). Dihydropyridine receptor mutations cause hypokalemic periodic paralysis. *Cell* 77, 863-868.
- Rios E & Pizarro G (1991). Voltage sensor of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Physiol Rev* 71, 849-908.
- Robin G & Allard B (2015). Voltage-gated Ca^{2+} influx through L-type channels contributes to sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} loading in skeletal muscle. *J Physiol* 593, 4781-4797.
- Rüdel R, Lehmann-Horn F, Ricker K & Kuther G (1984). Hypokalemic periodic paralysis: in vitro investigation of muscle fiber membrane parameters. *Muscle Nerve* 7, 110-120.
- Ruff RL (1999). Insulin acts in hypokalemic periodic paralysis by reducing inward rectifier K^+ current. *Neurology* 53, 1556-1563.
- Schneider MF (1994). Control of calcium release in functioning skeletal muscle fibers. *Annu Rev Physiol* 56, 463-484.
- Sipos I, Jurkat-Rott K, Harasztosi C, Fontain B, Kovacs L, Melzer W & Lehmann-Horn F (1995). Skeletal muscle DHP receptor mutations alter calcium currents in human hypokalaemic periodic paralysis myotubes. *J Physiol* 483, 299-306.

- Sokolov S, Scheuer T & Catterall WA (2005). Ion permeation through a voltage- sensitive gating pore in brain sodium channels having voltage sensor mutations. *Neuron* 47, 183-189.
- Sokolov S, Scheuer T, Catterall WA (2010). Ion permeation and block of the gating pore in the voltage sensor of NaV1.4 channels with hypokalemic periodic paralysis mutations. *J Gen Physiol* 136, 225-236.
- Starace DM & Bezanilla F (2004). A proton pore in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field. *Nature* 427, 548-553.
- Street D, Bangsbo J & Juel C (2001). Interstitial pH in human skeletal muscle during and after dynamic graded exercise. *J Physiol* 537, 993-998.
- Stringer W, Casaburi R & Wasserman K (1992). Acid-base regulation during exercise and recovery in humans. *J App Physiol* 72, 954-961.
- Struyk AF & Cannon SC (2007). A Na⁺ Channel Mutation Linked to Hypokalemic Periodic Paralysis Exposes a Proton-selective Gating Pore. *J Gen Physiol* 130, 11-20.
- Tombola F, Pathak MM & Isacoff EY (2005). Voltage-sensing arginines in a potassium channel permeate and occlude cation-selective pores. *Neuron* 45, 379-388.
- Weiss N, Couchoux H, Legrand C, Berthier C, Allard B & Jacquemond V (2008) Expression of the muscular dystrophy-associated caveolin-3(P104L) mutant in adult mouse skeletal muscle specifically alters the Ca²⁺ channel function of the dihydropyridine receptor. *Pflugers Arch* 457, 361-375.
- Westerblad H & Allen D (1992). Changes of intracellular pH due to repetitive stimulation of single fibres from mouse skeletal muscle. *J Physiol* 449, 49-71.
- Wu F, Hernandez-Ochoa EO, Burns DK, Fu Y, Gray HF, Struyk AF, Schneider MF & Cannon SC (2012). A calcium channel mutant mouse model of hypokalemic periodic paralysis. *J Clin Invest* 122, 4580-4591.

Figures legends

Figure 1: Calibration of the pH-sensitive indicator BCECF. (A) Recording of the changes in BCECF fluorescence ratio in a WT fiber held at -80 mV in response to acidification of the external Tyrode solution and exposition to the calibration solutions. After challenging the cell with the pH 5 buffered external solution and returning to pH 7.2, the external solution was slowly exchanged to a 140 mM K-containing solution with 10 μ M nigericin added and buffered at pH 7, then 8 and finally 5.5. This protocol was applied in each WT and R1239H fiber tested. (B) Recording of the corresponding changes in pHi induced by acidification of the external solution in the same fiber as in A after conversion of the fluorescence ratios into pH values using the 3 fluorescence ratios measured in the presence of the 3 calibrating solutions.

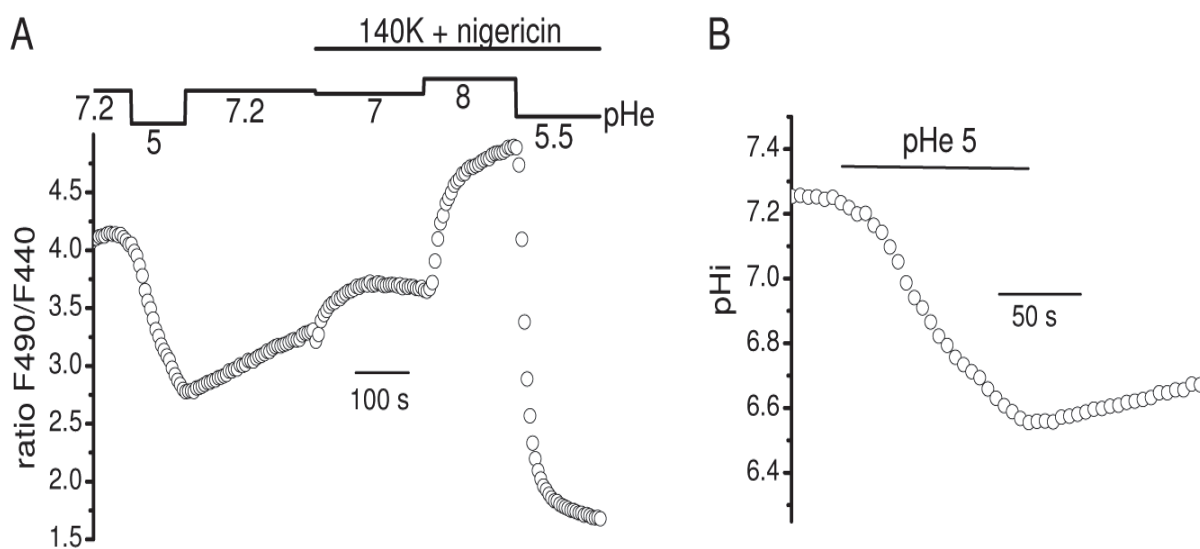


Figure 2: Distribution of GFP-tagged human WT and R1239H α 1 subunits in adult mouse skeletal muscle fibers. (A, B) Transmitted light images of fibers expressing WT and R1239H α 1 subunits. (C, D) Corresponding confocal images of GFP fluorescence in the fibers presented in A and B. (E, F) Fluorescence intensity profiles from the white box regions in the next corresponding images.

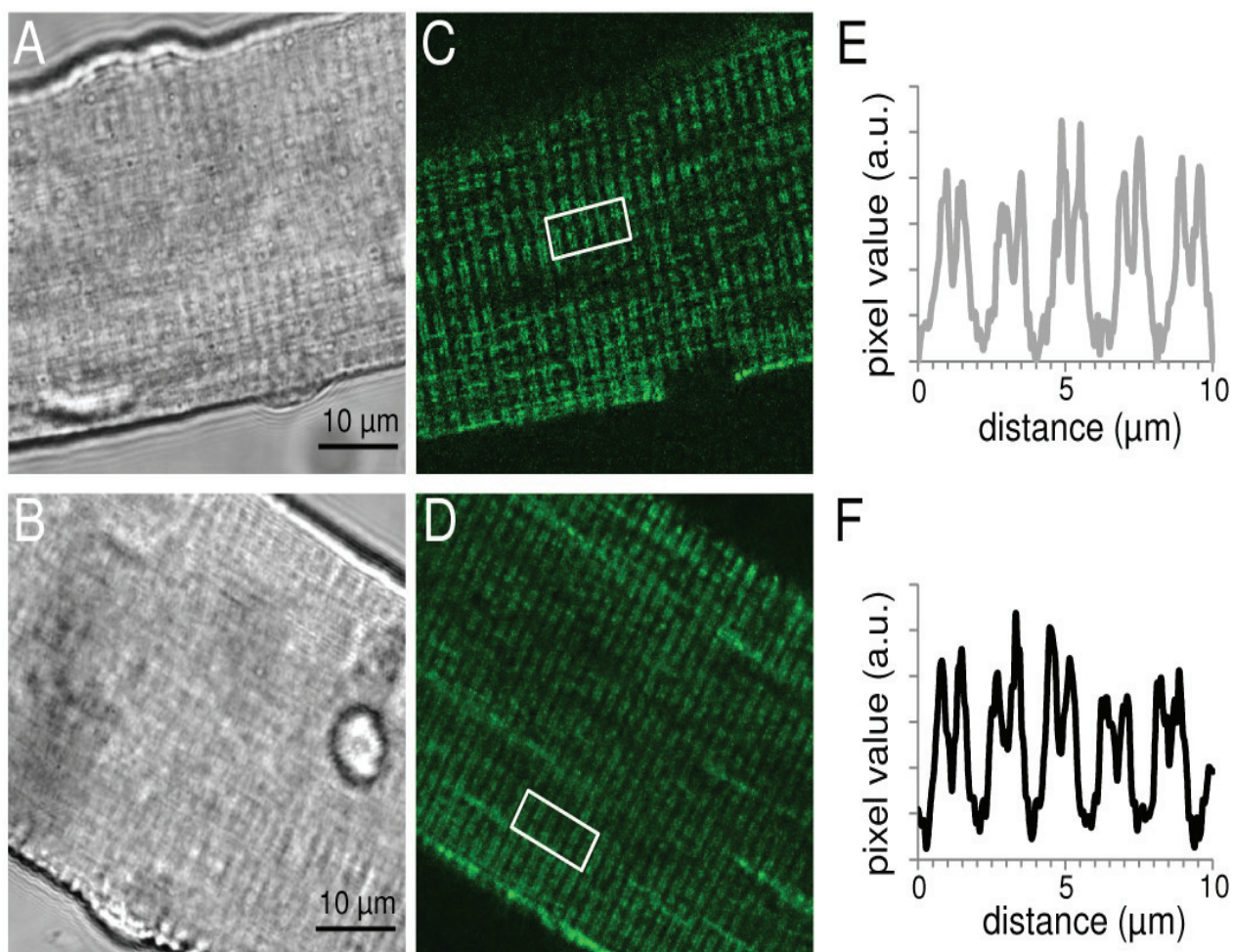


Figure 3: L-type voltage-gated Ca^{2+} currents in WT and R1239H fibers. (A) Recordings of L-type currents (upper traces) in a WT and in a R1239H fiber in response to depolarizing pulses of 1 s duration to the indicated voltages (lower traces). (B) Relationships between the mean peak values of L-type Ca^{2+} currents and membrane voltage in the two fiber types. (C) Mean of the fitting parameters of current-voltage relationships obtained in each WT and R1239H fiber.

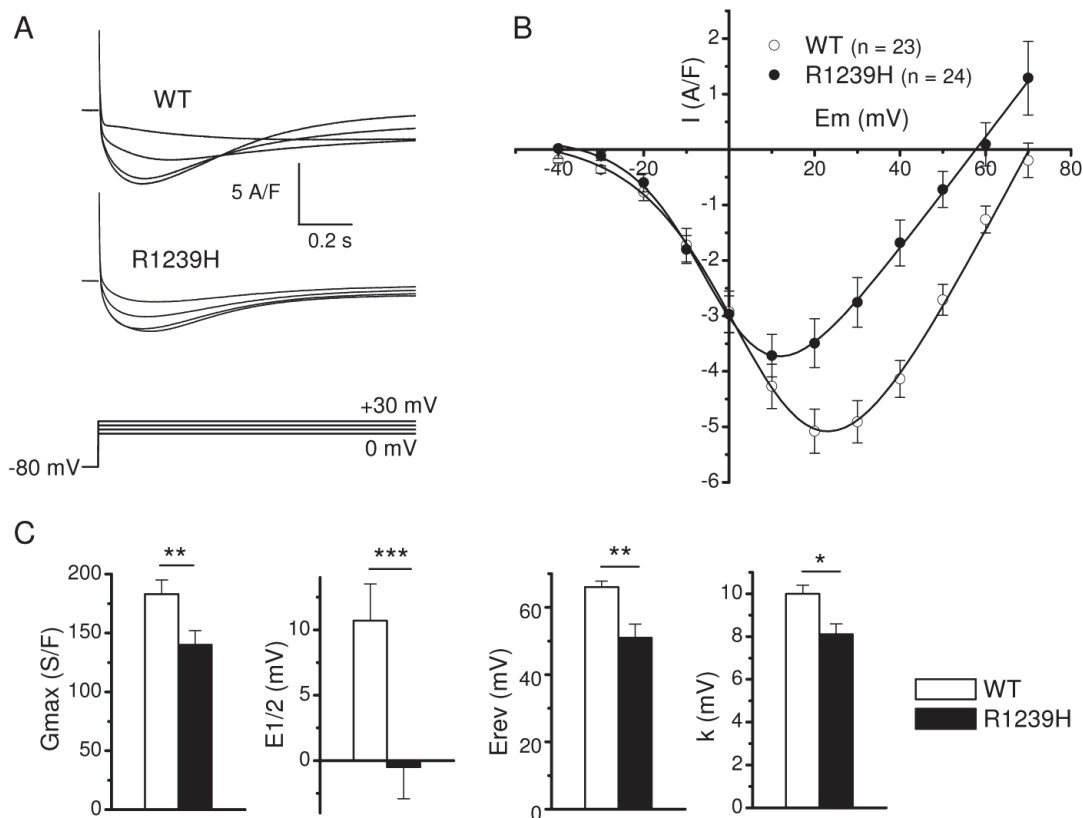


Figure 4: Leak currents and leak conductance in WT and R1239H fibers. (A) Means and S.E.M. of current densities evoked by voltage ramps applied from a holding potential of 0 mV in WT and R1239H fibers. The number of data points has been reduced for clarity. (B) Mean slope membrane conductance measured between -120 and -80 mV for voltage ramps-evoked membrane currents in the two fiber types from different holding potentials (HP). The number of fibers tested is indicated above each histogram bar.

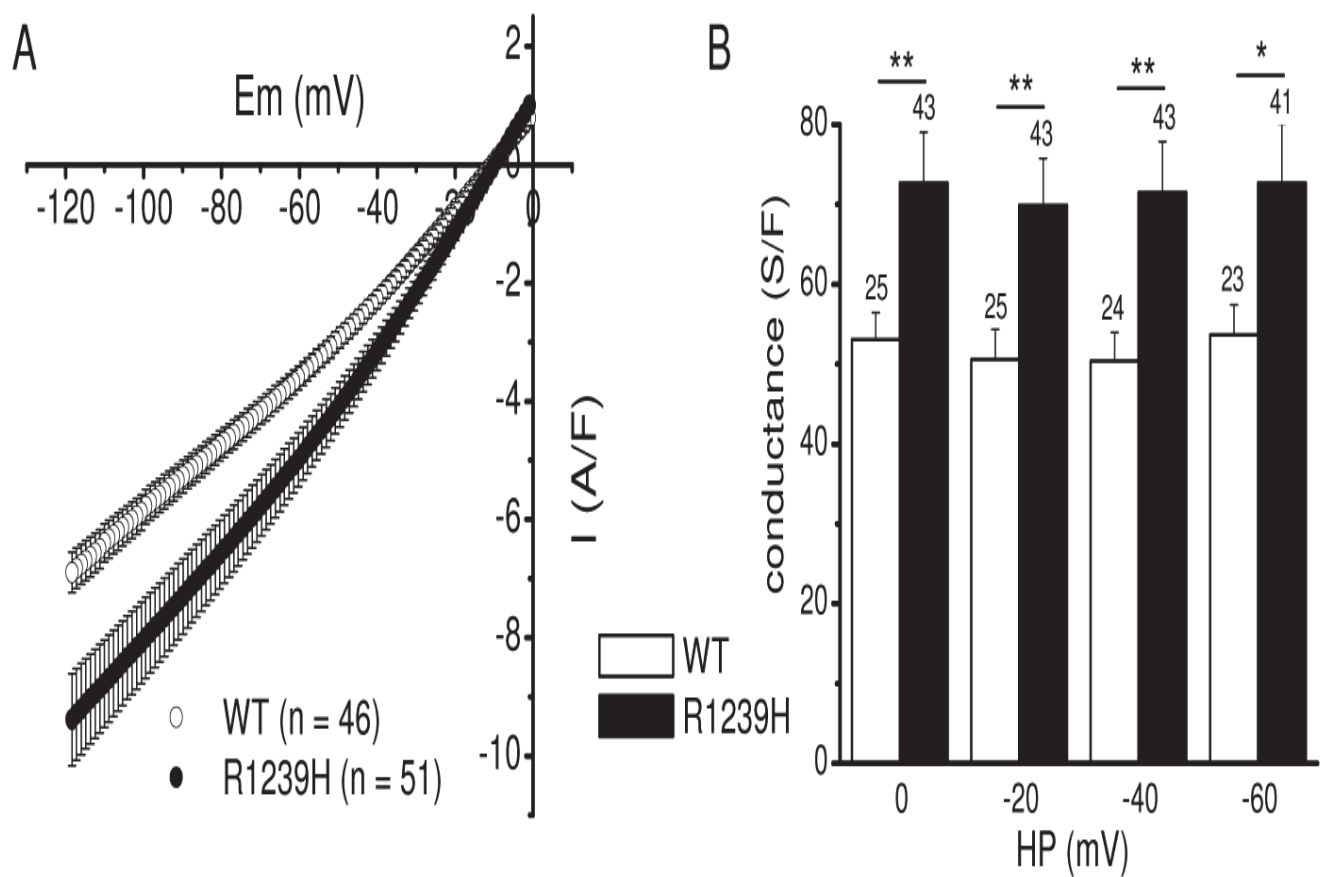


Figure 5: Effect of external acidification on leak currents in WT and R1239H fibers. (A) Currents evoked by voltage ramps applied from a holding potential of 0 mV at an external pH of 7.2 and 6 and current difference in the same R1239H fiber. (B) Means and S.E.M. of current densities evoked by voltage ramps applied from a holding potential of 0 mV at an external pH of 7.2 and 6 in R1239H fibers. (C) Means and S.E.M. of current densities evoked by voltage ramps applied from a holding potential of 0 mV at an external pH of 7.2 and 6 in WT fibers. (D) Mean differences and S.E.M. between currents evoked by voltage ramps applied from a holding potential of 0 mV at pH 6 and at pH 7.2 in WT and in R1239H fibers. The number of data points has been reduced for clarity.

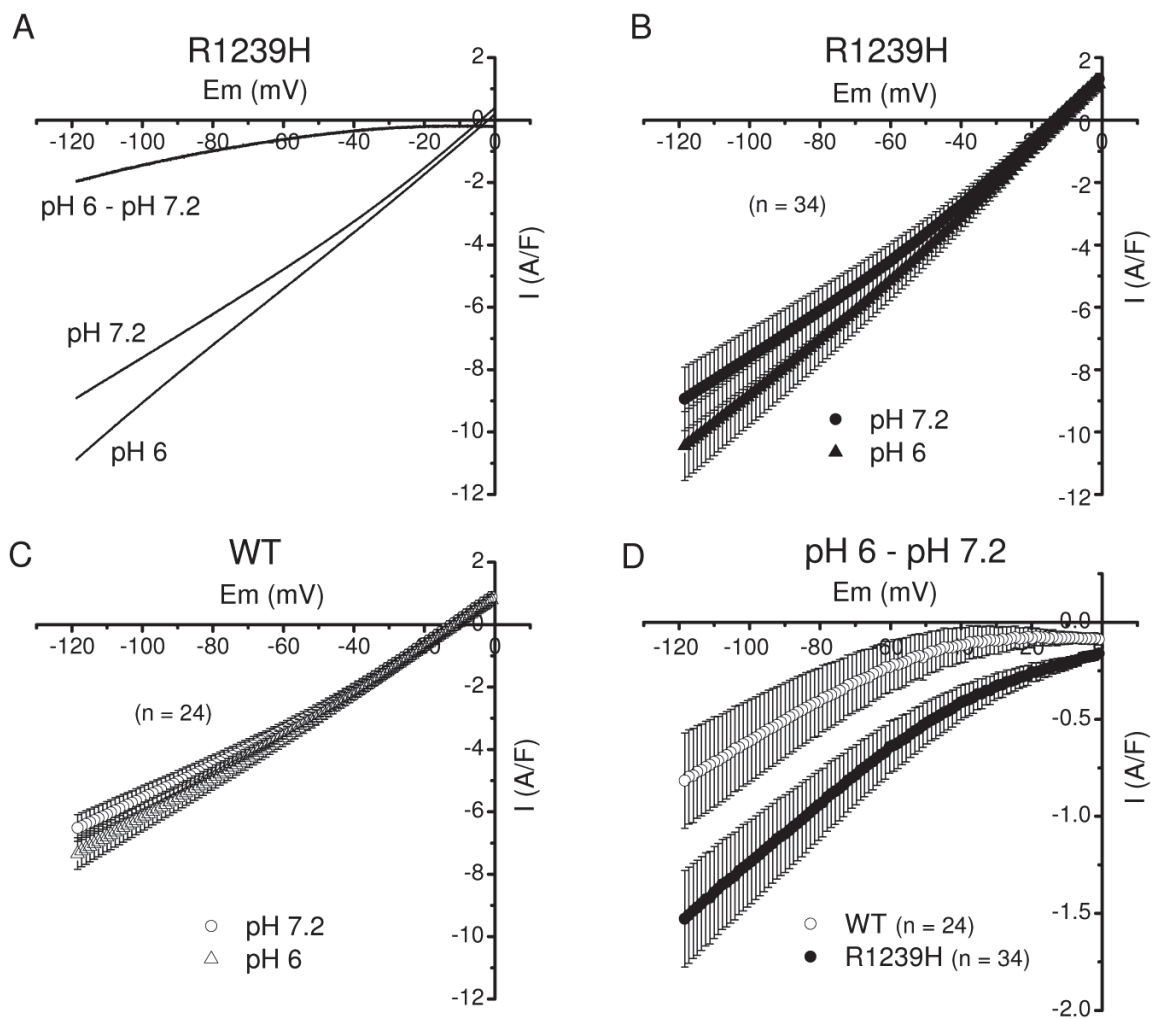


Figure 6: Effect of external acidification on BCECF fluorescence and leak currents in WT and R1239H fibers in the presence of a TEA-MeSO₃ containing external solution. (A) Simultaneous recording of BCECF fluorescence ratio (upper trace) and membrane currents (lower trace) in a R1239H muscle fiber held at -80 mV and stimulated by 50-ms duration voltage pulses given to -90 mV at a frequency of 0.5 Hz. The background current at -80 mV has been zoomed so that the downward deflections of the currents evoked by hyperpolarizing pulses are not presented in full. (B) Superimposed representative traces of membrane currents recorded in response to short pulses given to -90 mV just before and 60 s after the change of external pH. (C) Mean rate of change in BCECF fluorescence ratio during the first minute of exposition of the cell to the external solution buffered at pH 5. The number of fibers tested is indicated above each histogram bar.

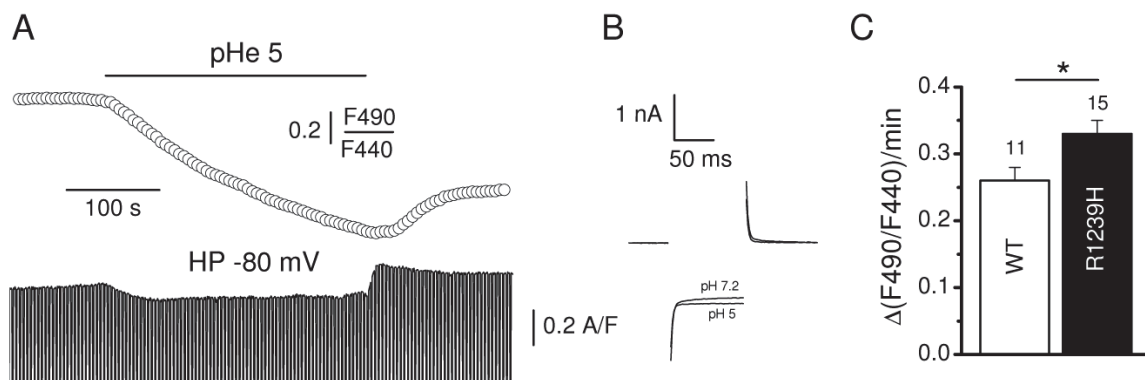


Figure 7: Effect of external acidification on pHi in WT and in R1239H fibers in the presence of an external Tyrode solution. (A) Mean and S.E.M. of change in pHi as a function of time in WT and in R1239H fibers. (B) Mean rate of change in pHi during the first minute of exposition of the cell to the external solution buffered at pH 5. The number of fibers tested is indicated above each histogram bar.

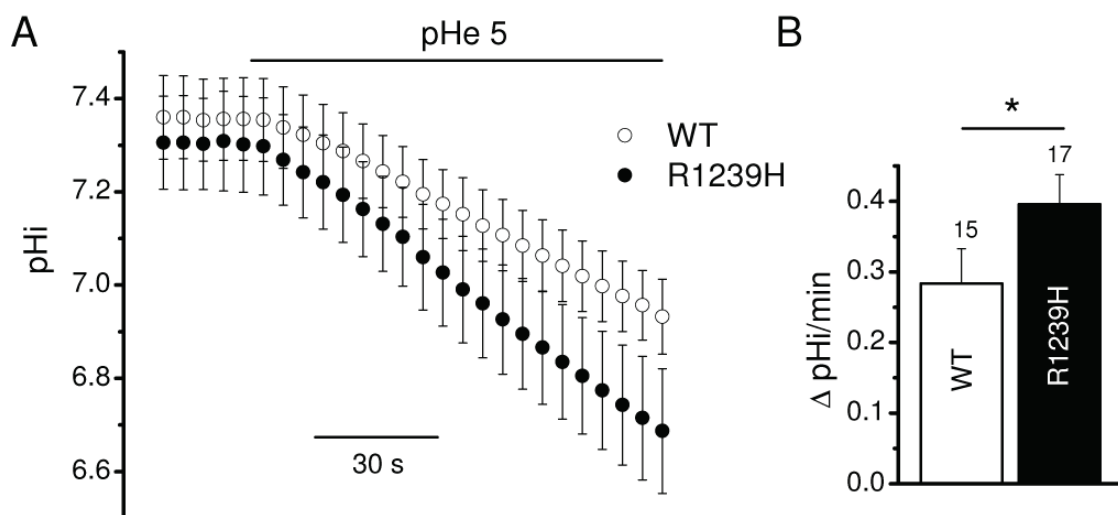
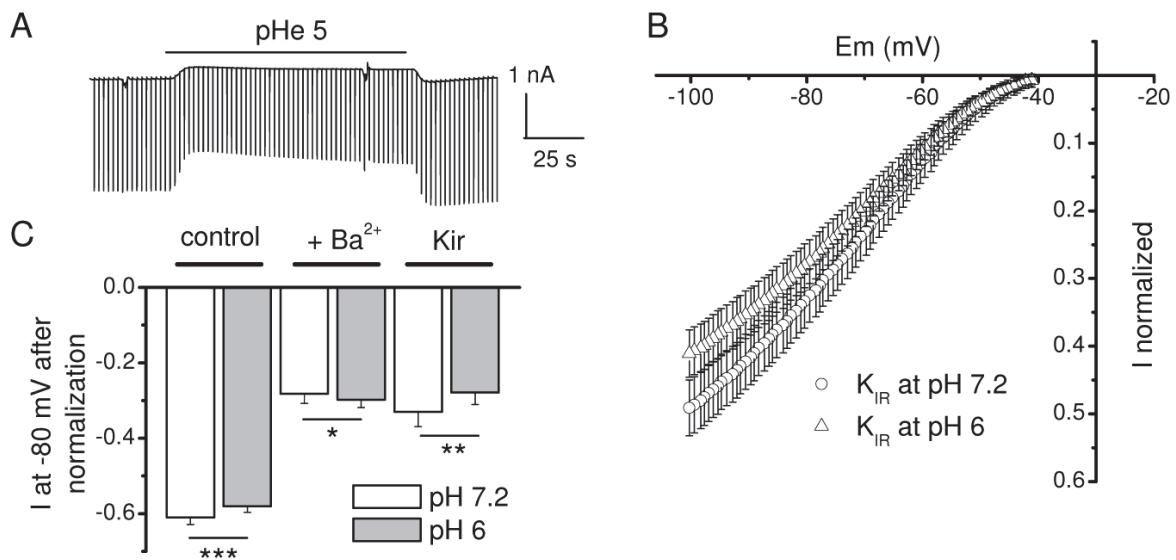


Figure 8: Effect of external acidification on Kir channels. (A) Recording of membrane currents in a control muscle fiber held at -80 mV and stimulated by 50-ms duration voltage pulses given to -90 mV at a frequency of 0.5 Hz in the presence of an external Tyrode solution. (B) Mean and S.E.M. of normalized Kir currents evoked by voltage ramps applied from a holding potential of -40 mV at an external pH of 7.2 and 6 in 6 control fibers. Each cell was exposed to 4 solutions, a Tyrode solution buffered at pH 7.2, a Tyrode solution buffered at pH 6, either with or without 0.5 mM Ba²⁺. In each cell, currents were normalized to the current obtained at -120 mV in the presence of the Tyrode solution buffered at pH 7.2. The two mean current-voltage relationships were obtained after subtraction of the currents obtained at pH 7.2 in the absence of Ba²⁺ minus the currents obtained at pH 7.2 in the presence of Ba²⁺ (○) and after subtraction of the currents obtained at pH 6 in the absence of Ba²⁺ minus the currents obtained at pH 6 in the presence of Ba²⁺ (Δ) respectively. (C) Mean currents measured at -80 mV after normalization to the current obtained at -120 mV in the 4 solutions used and after subtraction. Values were compared using paired t-tests.



Section 2

Caractérisation d'une conductance de fuite sodique dans la sous-unité alpha-1S présentant la mutation V876E responsable de la Paralysie Périodique Hypokaliémique de type I

La section 2 correspond à la première étude électrophysiologique de la mutation V876E située dans le segment S3 du domaine III de $Ca_v1.1$. Cette étude a donné lieu à la publication d'un article dont la synthèse est présentée dans la partie suivante.

Fuite sodique ayant les propriétés d'un *gating pore* dans le canal calcique voltage-dépendant muté V876E responsable d'HypoPP1

Article 2 : Fuster, C., Perrot, J., Berthier, C., Jacquemond, V., Charnet, P., & Allard, B., 2017. Na leak with gating pore properties in hypokalemic periodic paralysis V876E mutant muscle Ca channel. *The Journal of General Physiology*, doi: 10.1085/jgp.201711834.

Comme il est décrit dans le chapitre IV, les patients porteurs de la mutation V876E présentent tout le tableau clinique de l'HypoPP. Cependant, étant donné que la mutation n'affecte pas un segment S4, il est légitime de se demander si celle-ci induit aussi un courant de fuite de repos comme la mutation R1239H. En utilisant le même modèle d'expression *in vivo* que pour la mutation R1239H, les objectifs de ce travail ont tout d'abord été d'apprécier les propriétés fonctionnelles du canal muté V876E puis de rechercher si la mutation induisait une voie de passage caractéristique d'un *gating pore* et si tel était le cas, de déterminer la nature des ions qui s'écoulent à travers ce *gating pore*.

Expression de Ca_v1.1 humain WT et V876E

Les images de microscopie confocale à fluorescence révèlent pour les deux sous-unités $\alpha 1S$ WT ou mutée V876E transfectées des patrons d'expression en striation perpendiculaire à l'axe longitudinal de la fibre. Les profils d'intensité de fluorescence indiquent des pics périodiques de forte intensité de fluorescence en doublet et espacés d'environ 2 μm témoignant de la localisation des canaux au niveau des tubules transverses.

Propriétés du courant de type L dans les fibres exprimant la Ca_v1.1 WT ou V876E

Une première série d'expériences n'a montré aucune modification significative des propriétés des courants de type L dans les fibres exprimant la mutation V876E en comparaison des fibres exprimant la sous-unité WT.

Recherche d'un courant de fuite de repos dans les fibres V876E

L'utilisation d'un protocole de rampes hyperpolarisantes appliquées à partir d'un potentiel de maintien de 0, -20, -40 ou -60 mV jusqu'à -120 mV a révélé qu'un courant de

fuite entrant était plus élevé dans les fibres V876E que dans les fibres WT et qu'en parallèle la conductance de repos mesurée entre -80 mV et -120 mV était significativement plus importante dans les fibres V876E et ce, quel que soit le potentiel de maintien de départ

Effet d'une acidification extracellulaire sur le courant de fuite

Comme il l'a été observé avec la mutation R1239H, la présence d'un courant de fuite en l'absence de Na^+ et de K^+ extracellulaire dans les fibres V876E suggère que ce courant est porté par des ions protons. Afin de tester cette hypothèse, nous avons exposé les fibres à des solutions externes afin d'évaluer les effets sur le courant de fuite d'une modification du gradient électrochimique pour les protons. Les résultats montrent qu'en moyenne le courant induit par l'acidification externe est significativement plus entrant dans les fibres V876E, suggérant qu'une partie de ce courant est porté par les protons. Pour confirmer ce résultat, nous avons mesuré la vitesse de variation du pH_i en réponse à une acidification extracellulaire en présence d'une solution physiologique de Tyrode. La mesure de la vitesse d'entrée des protons au repos (-80 mV) s'est avérée équivalente dans les fibres WT et les fibres V876E suggérant que lorsque la solution externe ne contient pas d'autres cations perméants que des protons, le courant de fuite est porté par des protons, alors que dans une solution physiologique où le Na^+ et le K^+ sont présents, le courant de fuite serait porté par une autre espèce ionique.

Influx de Na^+ aux voltages négatifs dans les fibres WT et V876E

Le sodium est l'ion dont le gradient électrochimique est largement en faveur d'une entrée à -80 mV. Nous avons donc fait l'hypothèse que le courant de fuite plus élevé dans les fibres V876E pourrait être porté par ces ions.

Pour tester cette hypothèse, nous avons mesuré la vitesse d'entrée des ions Na^+ par l'utilisation de l'indicateur de sodium (SBFI) lors du remplacement d'une solution externe contenant 140 mM de NMDG (ion imperméant) et dépourvue de Na^+ par une solution contenant 140 mM de Na^+ . Ce changement de solution a conduit au développement d'un courant entrant associé à une augmentation de conductance de membrane réversible en parallèle d'une augmentation de la concentration intracellulaire de Na^+ dans les fibres V876E et WT. Ce résultat indique qu'un courant de fuite Na^+ se développe au repos dans les fibres musculaires. Cependant la mesure des vitesses de changement de concentrations Na^+ reflétant l'ampleur de l'influx Na^+ au passage d'un milieu NMDG à un milieu contenant du Na^+ s'est

révélée plus importante dans les fibres V876E. Ces données indiquent que l'influx Na^+ de repos est plus important dans les fibres V876E.

Mesure du courant de fond et du courant de fuite lors de l'application de la solution contenant 140 mM de Na^+ dans les fibres V876E et WT

Les mesures du courant de fond à -80 mV montrent que celui-ci est significativement plus entrant dans les fibres V876E que dans les fibres WT en présence d'une solution physiologique alors qu'il est d'amplitude équivalente en absence de Na^+ externe. De plus, lors de l'application de rampes hyperpolarisantes entre -40 mV et -110 mV en présence ou non de 140 mM de Na^+ , les conductances de membrane mesurées entre -80 mV et -110 mV se sont avérées être significativement plus importantes en présence de sodium externe dans les deux types de fibres mais significativement plus élevées dans les fibres V876E comparées aux fibres WT.

Conclusion

L'ensemble de ces résultats montrent que la mutation HypoPP1 V876E, bien que n'affectant pas un segment S4, conduit au développement d'un courant de fuite Na^+ qui partage les propriétés d'un *gating pore current*. Ces données seront discutées la partie *Discussion Générale et Perspectives* de ce document.

Na leak with gating pore properties in hypokalemic periodic paralysis V876E mutant muscle Ca channel

Clarisse Fuster,¹ Jimmy Perrot,¹ Christine Berthier,¹ Vincent Jacquemond,¹ Pierre Charnet,² and Bruno Allard¹

¹Institut NeuroMyoGene, Université Lyon 1, Université de Lyon, UMR Centre National de la Recherche Scientifique 5310, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1217, Villeurbanne, France

²Institut des Biomolécules Max Mousseron, Université Montpellier 1 et 2, UMR Centre National de la Recherche Scientifique 5247, Montpellier, France

Type 1 hypokalemic periodic paralysis (HypoPP1) is a poorly understood genetic neuromuscular disease characterized by episodic attacks of paralysis associated with low blood K⁺. The vast majority of HypoPP1 mutations involve the replacement of an arginine by a neutral residue in one of the S4 segments of the $\alpha 1$ subunit of the skeletal muscle voltage-gated Ca²⁺ channel, which is thought to generate a pathogenic gating pore current. The V876E HypoPP1 mutation has the peculiarity of being located in the S3 segment of domain III, rather than an S4 segment, raising the question of whether such a mutation induces a gating pore current. Here we successfully transfer cDNAs encoding GFP-tagged human wild-type (WT) and V876E HypoPP1 mutant $\alpha 1$ subunits into mouse muscles by electroporation. The expression profile of these WT and V876E channels shows a regular striated pattern, indicative of their localization in the t-tubule membrane. In addition, L-type Ca²⁺ current properties are the same in V876E and WT fibers. However, in the presence of an external solution containing low-Cl⁻ and lacking Na⁺ and K⁺, V876E fibers display an elevated leak current at negative voltages that is increased by external acidification to a higher extent in V876E fibers, suggesting that the leak current is carried by H⁺ ions. However, in the presence of Tyrode's solution, the rate of change in intracellular pH produced by external acidification was not significantly different in V876E and WT fibers. Simultaneous measurement of intracellular Na⁺ and current in response to Na⁺ readmission in the external solution reveals a rate of Na⁺ influx associated with an inward current, which are both significantly larger in V876E fibers. These data suggest that the V876E mutation generates a gating pore current that carries strong resting Na⁺ inward currents in physiological conditions that are likely responsible for the severe HypoPP1 symptoms associated with this mutation.

INTRODUCTION

Propagation of action potentials along the muscle cell membrane induces Ca²⁺ release from the SR and subsequent contraction of the cell. In the sequence of events that occur from excitation to contraction, the Cav1.1 protein anchored in the t-tubule membrane plays the dual role of voltage sensor of SR Ca²⁺ release and of L-type voltage-gated Ca²⁺ channel (Ríos and Pizarro, 1991; Schneider, 1994; Melzer et al., 1995). Given these pivotal roles, the absence of Cav1.1 is lethal, and any mutation occurring in the gene encoding Cav1.1 and producing changes in the functional properties of the protein leads to severe neuromuscular diseases. Among them, type 1 hypokalemic periodic paralysis (HypoPP1) is one of the least understood genetic disorders, characterized by transient failure of muscle excitability occurring in association with hypokalemia and triggered by rest after strenuous exercise or carbohydrate load (Lehmann-Horn et al., 2004; Cannon, 2015). Cav1.1 is composed of 4 homologous domains (I to IV), each of which contains 6 membrane-spanning segments (S1 to S6; Catterall, 2011). S1 to S4 segments of each domain

constitute the voltage-sensing domain, within which S4 segments enriched with positively charged amino acids are able to translocate through a “gating pore” pathway formed by the S1, S2, and S3 segments upon depolarization (Gandhi and Isacoff, 2002). This concerted translocation of the S4 segments controls the gating of the L-type Ca²⁺ channel and Ca²⁺ release from the SR. The vast majority of HypoPP1 mutations identified so far were shown to consist in the replacement of the outermost arginine residues by less basic residues in S4 segments of domains II, III, or IV (Cannon, 2010; Matthews and Hanna, 2010; Jurkat-Rott et al., 2012; Moreau et al., 2014). Site-directed mutagenesis experiments in the closely structurally related voltage-dependent K⁺ or Na⁺ channels have revealed that such substitutions generated an inward gating pore current at hyperpolarized potentials, also called the ω current, through the voltage-sensing domain (Starace and Bezanilla, 2004; Sokolov et al., 2005; Tombola et al., 2005). In addition, experiments performed in fibers from muscle biopsies

Correspondence to Bruno Allard: bruno.allard@univ-lyon1.fr

Abbreviations used: HypoPP1, type 1 hypokalemic periodic paralysis; pH_i, intracellular pH; SBFI, sodium-binding benzofuran isophthalate.

© 2017 Fuster et al. This article is distributed under the terms of an Attribution–Noncommercial–Share Alike–No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms/>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution–Noncommercial–Share Alike 4.0 International license, as described at <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>).



in patients carrying HypoPP1 mutations and in muscle fibers from a transgenic mouse model for HypoPP1 indicated that the R528H or the R1239H mutation gave rise to an elevated inward current at resting membrane potentials which, in the presence of severely decreased serum K^+ concentrations, should depolarize muscle cells so as to inactivate voltage-dependent Na^+ channels and induce attacks of paralysis (Jurkat-Rott et al., 2009; Wu et al., 2012). The ion carried by this leak current was not determined, but mutagenesis experiments performed in voltage-dependent K^+ or Na^+ channels showed that the inward current flowing through the gating pore at hyperpolarized potentials was carried by protons when the outermost arginine residues in S4 segments were replaced by histidine residues (Starace and Bezanilla, 2004; Struyk and Cannon, 2007). More recently, by expressing the human WT and R1239H mutant $\alpha 1$ subunits in mouse muscle fibers, Fuster et al. (2017) demonstrated that the R1239H mutation induces an elevated leak H^+ current at rest flowing through a gating pore created by the mutation in the voltage-dependent Ca^{2+} channel. Strikingly, one more recently identified HypoPP1 mutation, V876E, which produces very severe clinical features, does not affect an arginine residue in a S4 segment but occurs in the S3 segment of domain III (Ke et al., 2009). This raises the question if in such a case the mutation induces a gating pore current and, if so, about the ion selectivity of this gating pore pathway.

In the present study, we have been able to acutely express in adult mouse muscles human WT and V876E Cav1.1 proteins. Measurements of membrane currents indicate that the mutation does not induce any significant change in properties of the voltage-gated Ca^{2+} current but generates an elevated leak inward current at negative voltages. In the absence of external permeant ions and with low chloride, the leak current was found to be carried by H^+ , but in the presence of a physiological external saline, measurement of intracellular pH and Na^+ together with membrane currents indicated that the leak current in V876E fibers is carried by Na^+ . Our data suggest that the valine residue, when replaced by the negatively charged amino acid glutamate, creates a hydrophilic pathway, possibly corresponding to a gating pore permeable to Na^+ ions.

MATERIALS AND METHODS

In vivo gene transfer and isolation of muscle fibers

All experiments were performed in accordance with the guidelines of the local animal ethics committee of University Lyon 1, of the French Ministry of Agriculture (87/848), and of the European Community (86/609/EEC). Expression was achieved by in vivo plasmid transfer using a previously described electroporation procedure with minor modifications (DiFranco et al., 2006; Fuster et al., 2017). Injected plasmids encoded

for turboGFP-tagged WT or V876E human Cav1.1 (Origene). Muscle fiber isolation was performed 30 ± 5 d later. Mice were killed by cervical dislocation before removal of interosseal muscles. Single fibers were isolated by a 50-min enzymatic treatment at $37^\circ C$ using a Tyrode's solution containing 2 mg/ml collagenase type I (Sigma-Aldrich).

Electrophysiology

Fibers were voltage-clamped using the silicone clamp technique as previously described. In brief, the major part of a single fiber was electrically insulated with silicone grease, and a micropipette was inserted into the fiber through the silicone layer to voltage clamp the portion of the fiber free of grease (50–150 μm length) using a patch-clamp amplifier (RK-400, Bio-Logic) in the whole-cell configuration (Robin and Allard, 2015). Analogue compensation was systematically used to decrease the effective series resistance. The tip of the micropipette was then crushed into the dish bottom to allow intracellular dialysis of the fiber with the intrapipette solution. Cell capacitance was determined by integration of a current trace obtained with a 10-mV hyperpolarizing pulse from the holding potential and was used to calculate the density of currents (A/F). For Ca^{2+} current measurements, leak currents were subtracted from all recordings using the same pulse preceding every test pulse supposing a linear evolution of leak current with depolarization. The voltage dependence of the mean Ca^{2+} current density was fitted using the equation

$$I = G \max (E_m - E_{rev}) / (1 + \exp((E_{1/2} - E_m) / k)),$$

where I is the mean density of the current measured, E_m is the test pulse, G_{\max} is the maximum conductance, E_{rev} is the apparent reversal potential, $E_{1/2}$ is the half-activation voltage, and k is a steepness factor. Voltage ramps were applied every 50 s at a rate of 12 mV/s throughout the study. Concerning the experiments illustrated in Fig. 4, a holding potential maintained at 0 mV during the 50-s interval between ramps avoided a possible dissipation of the H^+ gradient resulting from proton influx upon exposure of the cell to the pH 6.0 buffered solutions because inward rectification made the inward proton current close to zero at 0 mV. Currents were acquired at a sampling frequency of 10 kHz.

Measurement of intracellular pH (pHi) and intracellular Na^+

The pHi indicator 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein (BCECF; ThermoFisher Scientific) was added at 100 μM in the internal pipette solution. The pH-dependent signal was obtained by alternatively illuminating the cell at 490 and 440 nm through an optical fiber using a monochromator (Cairn Research) and imaging fluorescence > 510 nm using a 40 \times oil-immersion

sion objective and a CoolSNAP_{EZ} charge-coupled device camera (Roper Scientific). Background fluorescence at both excitation wavelengths was measured from an equivalent area next to each fiber tested and subtracted, and the ratio F490/F440 was calculated. The frequency of image capture was 0.2 Hz. For the conversion of fluorescence ratios into pHi, each fiber was exposed at the end of the experiments to solutions buffered at pH 5.5, 7, and 8 in the presence of the H⁺ ionophore nigericin. The 3 measured fluorescence ratios were converted into pH values by fitting the relationship between these ratios and pHi with the following equation:

$$\text{pHi} = \text{pKa} + \log[(R - R_{\text{min}})/(R_{\text{max}} - R)],$$

where pKa is the $-\log$ dissociation constant, R is the 490/440 ratio measured at pH 5.5, 7, and 8, and R_{min} and R_{max} are the ratios of the dye in its H⁺-free and H⁺-bound state, respectively. In Fig. 5 B, because pHi measurements have been done alternatively in WT, R1239H, and V876E fibers during the same period, the WT data points are the same as the ones reported in another study investigating the R1239H mutation (Fuster et al., 2017). For intracellular Na⁺ measurements, the Na⁺ indicator sodium-binding benzofuran isophthalate (SBFI; ThermoFisher Scientific) was added at 200 μM in the internal pipette solution, and the Na⁺-dependent signal was obtained by alternatively illuminating the cell at 340 and 380 nm and imaging fluorescence >510 nm. The rates of change of pHi and SBFI fluorescence ratio were measured by fitting a linear regression to data points. BCECF and SBFI fluorescence changes were observed to be restricted to the voltage-clamped region of the fibers.

Solutions

For Figs. 1, 2, 3, and 4, the external solution contained (in mM) 140 TEA-MeSO₃, 2.5 CaCl₂, 1 MgCl₂, 0.002 tetrodotoxine, 1 4-aminopyridine, and 10 HEPES or Mes adjusted to pH 7.2 or 6 with TEA-OH or MeSO₃ acid. For Figs. 5, 6, and 7, the external Tyrode's solution contained (in mM) 140 NaCl or 140 NMDG chloride, 5 KCl, 2.5 CaCl₂, 1 MgCl₂, and 10 HEPES or Mes adjusted to pH 7.2 or 5 with NaOH or MeSO₃ acid. The internal dialyzed solution contained (in mM) 120 K-glutamate, 10 EGTA, 5 Na₂-ATP, 5 Na₂-phosphocreatine, 5.5 MgCl₂, 5 glucose, and 10 HEPES adjusted to pH 7.2 with K-OH, except for Figs. 5, 6, and 7, where the internal solution was free of EGTA. For BCECF calibration, fibers were exposed at the end of the experiment to solutions containing (in mM) 140 K-glutamate, 2 MgCl₂, 10 HEPES, or Mes adjusted to pH 8, 7, or 5.5 with K-OH or MeSO₃ acid in the presence of the H⁺ ionophore nigericin (10 μM). Nigericin (Sigma-Aldrich) was used from a stock solution at 10 mM in DMSO. Fibers were dialyzed with the intracellular

solution through the micropipette during 20 min prior starting the experiments.

Statistics

Fits were performed with Microcal Origin (Microcal Software Inc.). Data are given as means ± SEM and compared using unpaired two-tailed Student *t* tests (or paired when mentioned). Differences were considered significant when $P < 0.05$. Labels *, **, and *** indicate $P < 0.05$, $P < 0.005$, and $P < 0.0005$, respectively. Current data exhibited quite large variability, certainly because of the variability in the amount of proteins expressed from one fiber to another, which resulted in large values of variance, but did not compromise the revealed statistical differences.

RESULTS

Expression of V876E HypoPP1 mutant Cav1.1 in mouse muscle fibers

cDNAs encoding turboGFP-tagged human WT and V876E HypoPP1 mutant Cav1.1 were transfected by electroporation into adult hind limb mice muscles. Confocal fluorescence images revealed a regular striated pattern of expression perpendicular to the longitudinal axis of the fiber for the two channel types (Fig. 1 A). The fluorescence profile showed periodic double peaks of high intensity with a spacing of ~2 μm consistent with proper localization of the human WT and V876E channel in the t-tubule membrane (Fig. 1 B). The WT and V876E GFP-positive fibers were selected for voltage clamping. The silicone clamp method allowed focus of the measurements on the highest expressing region of fibers transfected with either the WT or the R1239H Cav1.1 α1 subunit.

Comparison of voltage-gated Ca²⁺ currents properties in fibers expressing WT and V876E Cav1.1

The properties of the L-type voltage-gated Ca²⁺ currents were compared in fibers expressing WT and V876E Cav1.1 by applying depolarizing steps of 1 s duration and increasing amplitudes from a holding potential of -80 mV in the presence of 2.5 mM external Ca²⁺ (Fig. 2). Fitting a Boltzmann equation in each WT and V876E cell indicated that the fitting parameters, maximal conductance, reversal potential, half-maximal activation, and steepness factor were not significantly changed in V876E as compared with the parameters obtained for WT fibers.

Comparison of background currents and resting conductance in WT and V876E fibers

Voltage clamp studies in HypoPP1 R528H fibers from transgenic mice or from human biopsies and in mouse fibers transfected with the HypoPP1 R1239H α1 subunit detected an elevated inward current at hy-

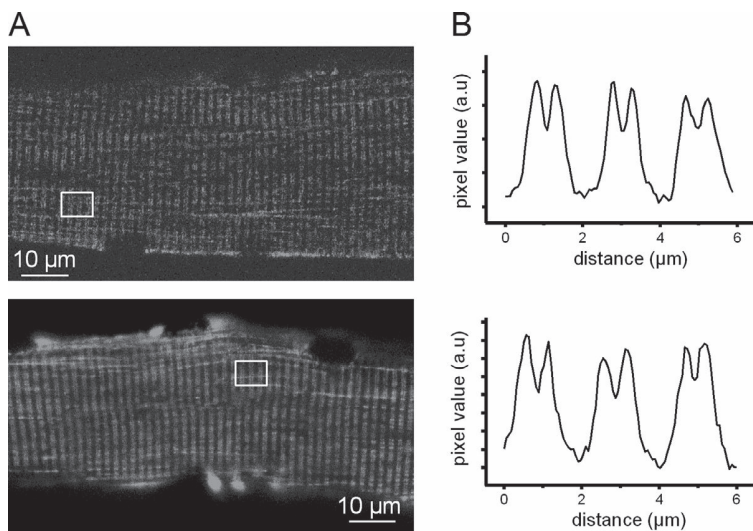


Figure 1. Distribution of GFP-tagged human WT and V876E Cav1.1 in adult mouse skeletal muscle fibers. (A) Confocal images of GFP fluorescence in a fiber expressing WT (top) and V876E (bottom) Cav1.1. (B) Fluorescence intensity profiles from the white box region in the corresponding images in A.

perpolarized potentials in mutant fibers (Jurkat-Rott et al., 2009; Wu et al., 2012; Fuster et al., 2017). Considering that the V876E HypoPP1 mutation is associated with comparable clinical features as the R528H mutation, we investigated whether V876E fibers exhibited elevated leak current and conductance by applying hyperpolarizing voltage ramps bringing the internal potential to -120 mV from a starting potential of 0 mV using the same internal and external solutions as those used for voltage-gated Ca^{2+} current recordings. Fig. 3 A shows that membrane currents were more inward in V876E fibers for voltages less negative than -40 mV as compared with WT fibers. Fitting a linear regression between currents and voltages over the -80 to -120 mV range in WT and V876E fibers indicated that the slope conductance was significantly higher in V876E fibers whatever the starting holding potential— 0 , -20 , -40 , or -60 mV (Fig. 3 B).

Effects of a change in external pH on background currents and resting conductance in V876E fibers

The preceding series of experiments was performed in the presence of an external solution devoid of Na^+ and K^+ and in low Cl^- , so that the main monovalent cation capable of entering the cell at negative voltages is H^+ . Furthermore, a recent study indicated that the HypoPP1 R1239H mutation gave rise to a resting leak current carrying protons (Fuster et al., 2017). To test whether the elevated leak current was carried by H^+ in V876E fibers, we measured the change in membrane currents elicited by hyperpolarizing voltage ramps in response to a change in external pH from 7.2 to 6, which is expected to shift the electrochemical gradient for protons by 70 mV toward positive values. As illustrated in Fig. 4 A, a decrease of external pH from 7.2 to 6 made the background current more inward for voltages lower than -40 mV in a V876E fiber. This effect was also observed in WT fibers. However, subtracting in each

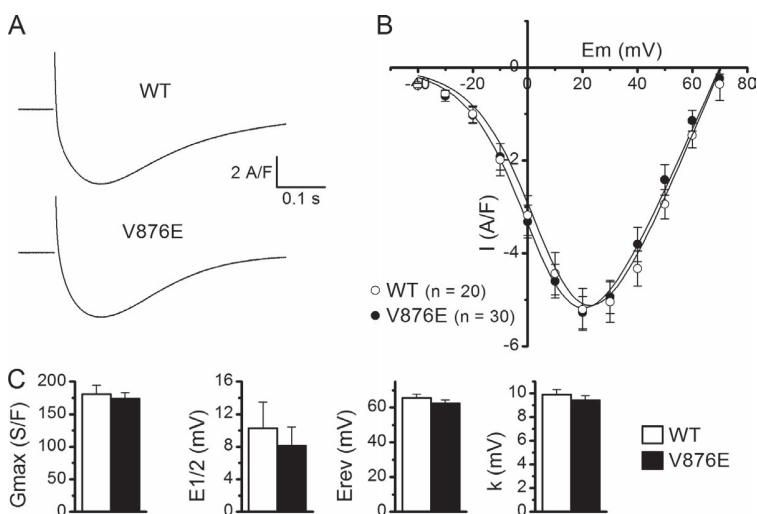


Figure 2. L-type voltage-gated Ca^{2+} currents in WT and V876E fibers. (A) Recordings of L-type currents (top) in a WT and a V876E fiber in response to depolarizing pulses of 1 s duration to the indicated voltages (bottom). (B) Relationships between the mean peak values of L-type Ca^{2+} currents and membrane voltage in the two fiber types. (C) Mean of the fitting parameters of current-voltage relationships obtained in each WT and V876E fiber. $E_{1/2}$, half-activation voltage; E_{rev} , apparent reversal potential; G_{max} , maximum conductance; k , steepness factor. Data are given as means \pm SEM.

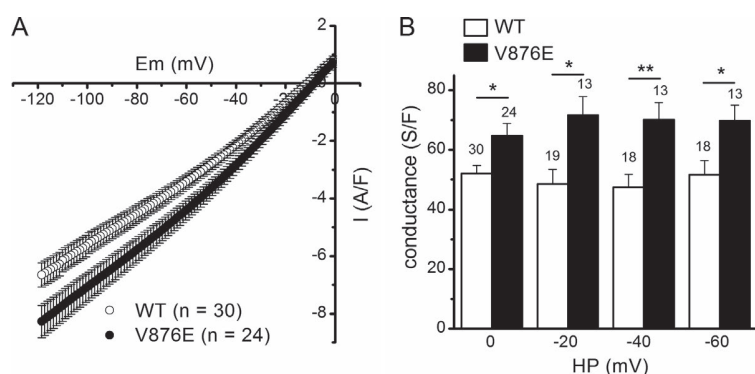


Figure 3. Leak currents and leak conductance in WT and V876E fibers. (A) Means and SEM of current densities evoked by voltage ramps applied from a holding potential of 0 mV in WT and R1239H fibers. The number of data points has been reduced for clarity. (B) Mean slope membrane conductance measured between -120 and -80 mV for voltage ramp-evoked membrane currents in the two fiber types from different holding potentials (HP). The number of fibers tested is indicated above each histogram bar. The p-values were 0.009, 0.006, 0.003, and 0.017 at 0, -20 , -40 , and -60 mV, respectively. Data are given as means \pm SEM. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$.

cell the current obtained at pH 7.2 from the current obtained at pH 6.0 revealed a current displaying an inward rectification and of significantly higher amplitude at -80 mV in V876E (-0.95 ± 0.14 A/F) as compared with WT fibers (-0.36 ± 0.19 A/F, $P = 0.015$), suggesting that the elevated leak current in V876E fibers is carried at least in part by H^+ (Fig. 4 B).

Acid-induced changes in pHi in V876E fibers in the presence of an external physiological solution

To determine whether the elevated leak current in V876E fibers is still carried by H^+ in the presence of a physiological saline, we measured the rate of intracellular acidification induced by a decrease of the external pH from 7.2 to 5 in a comparative manner in WT and V876E fibers, assuming that if the elevated leak current is actually carried by H^+ , the rate of intracellular acidification arising from H^+ influx should be higher in V876E fibers. Fig. 5 A shows that the pHi monitored by the fluorescent pH indicator BCECF decreased in a reversible manner in response to a decrease of external pH from 7.2 to 5 at -80 mV, giving evidence of an influx of H^+ into the cell. Fitting a linear regression to the rate of change in pHi in all V876E and WT fibers showed that the rate of influx of H^+ was not significantly different in the two fiber types (Fig. 5, B and C). This result suggests that in the presence of an external solution containing Na^+ and K^+ monovalent cations, the elevated leak current in V876E is not associated with an increased influx of H^+ and in this way is certainly not carried by H^+ . Interestingly, during

the course of these experiments performed in the presence of an external Tyrode's solution, we noticed that there was a tendency for the mean background current at -80 mV to be more negative in V876E (-9.9 ± 3 A/F) than in WT fibers (-4.3 ± 0.8 A/F, $P = 0.06$). Because Na^+ is the only monovalent cation the electrochemical gradient of which is in favor of an influx at -80 mV, this observation led us to hypothesize that the cation carried by the elevated inward resting current in V876E fibers is Na^+ .

Measurement of Na^+ influx at negative voltages in WT and V876E fibers

To investigate whether the elevated leak current in V876E carries Na^+ , we measured the rate of increase in intracellular Na^+ arising from the replacement of an external solution containing 140 mM of the nonpermeant ion NMDG and devoid of Na^+ with a solution containing 140 mM Na^+ using the fluorescent Na^+ indicator SBFI. Fig. 6 A shows that such a change in the Na^+ concentration produced a reversible increase in the fluorescence ratio of SBFI associated with the development of an inward current and an increase in the membrane conductance at -80 mV in a V876E fiber. This result indicates that an open ion pathway allows a Na^+ influx to occur at rest in response to substitution of Na^+ for NMDG in the external solution. This effect was also observed in WT fibers but, on average, the rate of Na^+ influx was significantly larger in V876E fibers as compared with WT fibers (Fig. 6, B and C). A significant higher rate of Na^+ influx was also measured in V876E

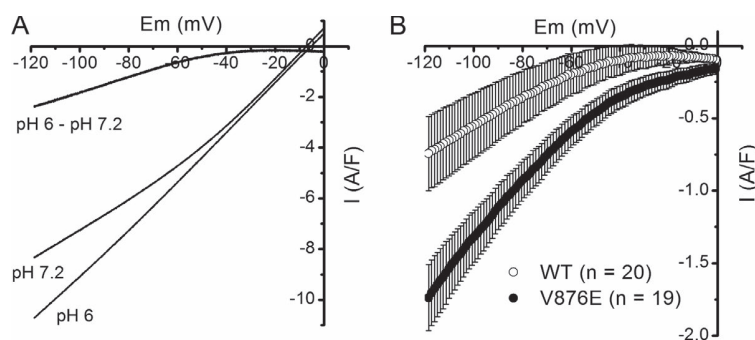


Figure 4. Effect of external acidification on leak currents in WT and V876E fibers. (A) Membrane currents evoked by a voltage ramp applied from a holding potential of 0 mV at an external pH of 7.2 and 6, and current difference between pH 6.0 and 7.2 in the same V876E fiber. (B) Means and SEM of current differences between pH 6.0 and pH 7.2 in WT and V876E fibers. The number of data points has been reduced for clarity.

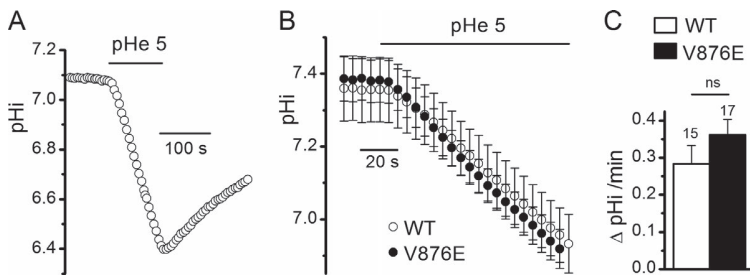


Figure 5. Effect of external acidification on pHi in WT and V876E fibers in the presence of an external Tyrode's solution. (A) Recording of the change in pHi in response to exposition of the cell to an external solution buffered at pH 5.0 in a BCECF-loaded V876E fiber held at -80 mV. (B) Means and SEM of pHi as a function of time in WT and in V876E fibers in response to external acidification (pHe). (C) Mean rate of change in pHi measured during the first minute of exposition of the cell to the external solution buffered at pH 5. The number of fibers tested is indicated above each histogram bar. Data are given as means \pm SEM.

fibers when Tris instead of NMDG was used as the Na^+ substitute (not depicted).

Changes in background current induced by substitution of external Na^+ for NMDG in WT and V876E fibers

As expected from the preceding set of experiments, measurement of the background current at -80 mV in each WT and V876E fiber indicated that the mean current in the two fiber types was very significantly more inward when Na^+ ions were present in the external solution than when they were absent (Fig. 7 A). However, whereas the amplitude of the resting current was not significantly different in V876E and in WT fibers in the absence of external Na^+ , it was significantly larger in V876E fibers when Na^+ was present in the external solution. This suggests that V876E fibers exhibit a higher leak sodium current at rest as compared with WT fibers. To confirm this higher Na^+ resting conductance in V876E fibers, fibers were challenged by hyperpolarizing voltage ramps in the presence and in the absence of external Na^+ . As expected, the background current was considerably more inward and the slope conductance larger when Na^+ was substituted for NMDG in V876E fibers (Fig. 7 B). This effect was also observed in WT fibers but, on average, the slope conductance measured

between -110 and -80 mV in the presence of external Na^+ was significantly larger in V876E (273 ± 23 S/F) than in WT fibers (205 ± 23 S/F, $P = 0.049$; Fig. 7 C).

DISCUSSION

The valine residue at position 876 in the $\alpha 1$ subunit of the voltage-dependent Ca^{2+} channel is highly conserved not only among channel proteins from various species but also among different $\alpha 1$ subunits (Ke et al., 2009). Amino acid substitution at this location is thus expected to induce critical channel dysfunctions, possibly pathogenic. Nevertheless, in transfecting the genes encoding the human WT and the HypoPP1 V876E mutant $\alpha 1$ subunits in adult mice muscles, we showed that the properties of the voltage-gated Ca^{2+} currents are not altered by the mutation. These data differ from the functional results obtained with the other R528H HypoPP1 and R1239H mutations so far investigated, for which the maximal conductance and voltage dependence of the voltage-gated Ca^{2+} currents were found to be altered (Lapie et al., 1996; Jurkat-Rott et al., 1998; Morrill et al., 1998; Wu et al., 2012; Fuster et al., 2017). Concerning these mutations, it has been recurrently claimed that the observed changes in the Ca^{2+} channel properties

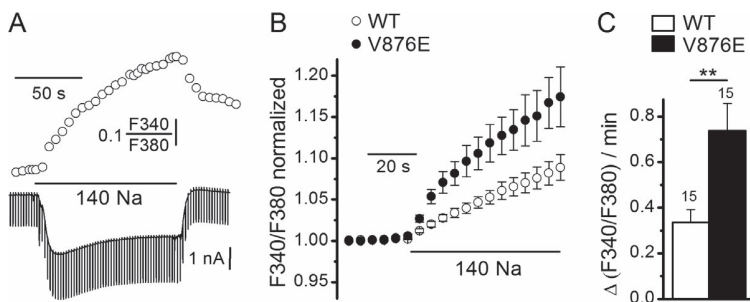


Figure 6. Effect of external Na^+ on SBFI fluorescence ratio and background currents in WT and V876E fibers. (A) Simultaneous recordings of SBFI fluorescence ratio (upper trace) and membrane currents (lower trace) in response to a change of the external solution from a Na^+ -free NMDG containing solution to a 140 mM Na^+ -containing solution in a V876E fiber held at -80 mV and stimulated by 50-ms duration voltage pulses given to -90 mV at a frequency of 0.5 Hz. (B) Mean and SEM of SBFI fluorescence ratio as a function of time in response to external Na^+ readmission in WT and in V876E fibers. In each cell, values of fluorescence ratio have been normalized to the value of the last data point measured before Na^+ readmission. (C) Mean rate of change in SBFI fluorescence ratio measured during the first 30 s of exposure of the cell to external Na^+ . The number of fibers tested is indicated above each histogram bar. Data are given as means \pm SEM. P-value was 0.0043 (**).

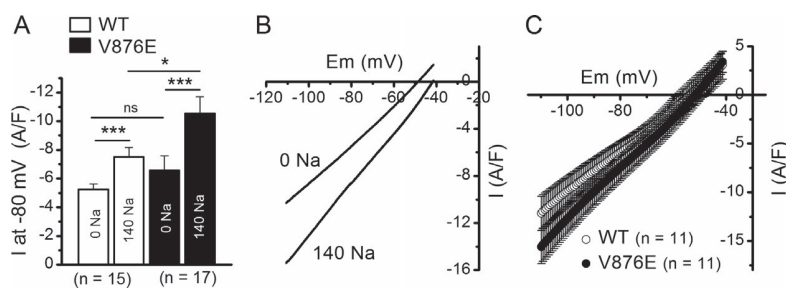


Figure 7. Effect of external Na^+ on leak currents and conductance in WT and V876E fibers. (A) Mean background current intensity measured at -80 mV in the absence and in the presence of external Na^+ in WT and V876E fibers. Values were compared with paired tests and unpaired tests for data obtained within the same fiber population and for data obtained between the two fiber populations, respectively. P-values were 0.0001 and 0.0001 for comparison of the means between the Na^+ -free and the Na^+ containing solution in WT and V876E fibers, respectively, and 0.047 for comparison of the means obtained

in the presence of the Na^+ -containing solution in WT and V876E fibers. Data are given as means \pm SEM. *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.0005$. (B) Membrane currents evoked by a voltage ramp applied from a holding potential of -40 mV in the absence and in the presence of external Na^+ in the same V876E fiber. (C) Means and SEM of current densities evoked by voltage ramps applied from a holding potential of -40 mV in the presence of external Na^+ in WT fibers and V876E fibers. The number of data points has been reduced for clarity.

could hardly explain the pathogenesis of HypoPP1. The fact that the V876E mutation induced HypoPP1 without changing the properties of the voltage-gated Ca^{2+} channel here demonstrates and confirms that the HypoPP1 pathogenesis is not related to any change in the Ca^{2+} channel function of Cav1.1 and also suggests that the global voltage sensing function of domain III, which has been shown to be directly involved in channel activation, is not altered (Pantazis et al., 2014).

The main finding of our study is that fibers expressing the V876E mutation exhibited a larger leak inward current over a range of voltages negative to -40 mV as compared with fibers expressing WT Cav1.1. Such an elevated inward current at resting potentials has been detected in R528H and in R1239H muscle fibers (Jurkat-Rott et al., 2009; Wu et al., 2012; Fuster et al., 2017). Because these HypoPP1 mutations correspond to the replacement of the first or the second outermost arginine with a histidine in the S4 segment of domain II or domain IV, respectively, it has been postulated that the observed leak current flowed through a gating pore generated by the mutation as has been observed for similar mutations in voltage-gated K^+ or Na^+ channels (Starace and Bezanilla, 2004; Sokolov et al., 2005; Tombola et al., 2005). In WT channels, S4 segments are indeed thought to translocate across a "gating pore" pathway formed by the S1, S2, and S3 segments through interactions between arginine residues in S4 segments and negatively charged residues in the three other segments. The loss of interaction produced by arginine mutation to uncharged residues has been shown to make the gating pore permeable to H^+ or monovalent cations generating a gating pore current at negative voltages when the mutation affects the outermost arginine in the S4 segment (Starace and Bezanilla, 2004; Struyk and Cannon, 2007). The V876E mutation does not directly affect an arginine residue in a S4 segment, but the fact that it produced an inward current at rest likely suggests that a gating pore able to pass monovalent cations at

negative voltages has been created. Our data are thus reminiscent of histidine scanning mutagenesis studies in the Shaker K^+ channel, which showed that mutations not located in the S4 segment and consisting in the replacement of an isoleucine with a histidine in segment S2 created a gating pore by disrupting the hydrophobic barrier lined in part by isoleucine and the most extracellular arginine of the S4 segment (Campos et al., 2007). We thus hypothesize that V876 and one of the most extracellular charged residues in the S4 segment are also part of a narrow hydrophobic plug separating the water-accessible crevices on each side of the membrane that disrupts and allows bridging of the internal and external solutions through a gating pore when valine is replaced by glutamate, in the same manner as the gating pore created by arginine substitution in S4 segments. This local hydrophilic shortcut could be produced by modification in the electrostatic interactions with the positively charged residues of the S4 segment because of the presence of the negatively charged residue glutamate or alternatively by widening the gating pore entrance through structural displacement of the S3 segment. The structural perturbations created by this valine-to-glutamate mutation do not seem to affect the global structure and function of the voltage-sensing domain of domain III because the biophysical properties of the channels were found to remain unchanged. Therefore, the V876E mutation is to our knowledge the first mutation located in an S3 segment giving rise to an elevated leak current at negative voltages, possibly flowing through a gating pore, without any change in the basic voltage-dependent channel properties.

The extra leak current induced by the V876E mutation displayed an apparent inward rectification when recorded in the absence of external permeant monovalent cations (Figs. 3 A and 4 A). Such a rectification was also evident for the extra leak current recorded by Wu et al. (2012) in the Cav1.1 R528H transgenic mouse in the absence of external permeant ions and for the

leak current recorded in muscle fibers from R528H and R1239H patients by Jurkat-Rott et al. (2009) in the presence of 1 mM external K^+ , which should considerably reduce the contribution of the inward rectifier K^+ current, and in fibers expressing the R1239H channel mutant (Fuster et al., 2017). This inward rectification is reminiscent of the rectification originally observed in the *Shaker* K^+ channel for mutations affecting the outermost arginine and demonstrated to be imposed by a voltage-dependent mechanism that closes the pore at positive potentials (Starace and Bezanilla, 2004). Interestingly, inward rectification was also reported for the gating pore generated by mutation in the S2 segment, indicating that the outward movement of the S4 segment in response to depolarization also led to the closure of this S2 mutant-induced gating pore (Campos et al., 2007). Therefore, if the extra inward leak current recorded in V876E fibers does indeed represent permeation through a gating pore, its voltage dependence of activation should correlate with the voltage dependence of movement of the S4 voltage sensor. Figs. 3 A and 4 A indicate that the extra current develops for potentials lower than -50 mV and progressively abrogates at higher voltages. In skeletal muscle, the movement of S4 voltage sensors gives rise to intramembrane charge movements with a reported half activation of -37 mV in mouse skeletal muscle (Collet et al., 2003). The voltage dependence of activation of charge movements thus matches well with the voltage-dependent reduction of the extra current in mutant fibers, which again argues in favor of this current flowing through a gating pore gated by the voltage-driven movement of S4 segments. Additionally, the observed inward rectification of the extra current in V876E fibers excludes that this current may have flowed through the L-type Ca^{2+} -conducting pore of the channel because it develops at voltages much more negative than the voltage threshold of the L-type current and moreover from a holding potential of 0 mV, for which the L-type current is inactivated.

Our experiments performed in the absence of external permeant monovalent cations showed that the resting inward leak current was potentiated by external acidification in V876E, suggesting that it can be carried, at least in part, by H^+ , as demonstrated for the R1239H mutation (Fuster et al., 2017). But, in contrast to what has been found for the R1239H mutation, the fact that the rate of H^+ influx in response to external acidification in the presence of an external Tyrode's solution was not different in WT and V876E fibers led us to conclude that this V876E-induced current was not carried by H^+ when Na^+ and K^+ ions are present in the external solution and used a pathway with different ion selectivity as compared with the pathway used in R1239H fibers. Indeed, changing the external solution from a Na^+ -free to a Na^+ -containing solution at resting potentials was found to produce an influx of Na^+ associated with an in-

ward current in WT and in V876E fibers. A Na^+ influx is known to occur in resting muscle (Hodgkin and Horowitz, 1959), but our experiments indicate that this influx and the associated inward current are significantly larger in V876E fibers. These data strongly suggest that the extra current in V876E fibers mainly carries Na^+ . In agreement with these findings, site-directed mutagenesis studies of the voltage-gated Na^+ channel have shown that the gating pore is selective to H^+ when the gating pore results from the replacement of an arginine with a histidine, whereas it passes Na^+ or K^+ when residues other than histidine are substituted for arginine (Starace and Bezanilla, 2004; Tombola et al., 2005; Sokolov et al., 2007; Struyk and Cannon, 2007). Nevertheless, our experiments indicate that in the absence of Na^+ and K^+ , the V876E-induced leak current is able to carry H^+ . In the Na^+ -free Tyrode's solution, we postulate that the high resting K^+ conductance may mask the elevated H^+ current that should flow through the mutation-induced pathway, explaining in this way why the leak current is not different between WT and V876E fibers under these Na^+ -free conditions.

Challenging fibers with voltage ramps indicated that the leak conductance was, on average, 205 and 273 S/F in WT and in V876E fibers, respectively. If we assume that the difference in leak conductance is entirely a result of the presence of a Na^+ gating pore current, this indicates that the mean conductance of the gating pore is 68 S/F. As compared with the leak conductance measured in muscle fibers from HypoPP1 R528H transgenic mice, HypoPP1 patients' muscle biopsies, or R12639H mutant-expressing fibers (Jurkat-Rott et al., 2009; Wu et al., 2012; Fuster et al., 2017), the leak conductance induced by the HypoPP1 V876E mutation is at least 3 times larger and certainly even more if we consider that not all native Cav1.1 have been replaced by the transfected channels. Such a large resting leak current has to be related to the high severity of the symptoms reported for this form of HypoPP1. This mutation was indeed identified in a South American family with an uncommon early age of onset of the disease, high penetrance, and very severe prognosis (Ke et al., 2009). Attacks of paralysis are thought to be triggered by a sudden depolarization of muscle cells inducing inactivation of voltage-gated Na^+ channels. In skeletal muscle, the resting potential is setting up at a value for which depolarizing inward currents are exactly balanced by hyperpolarizing outward currents. The conditions that lead to an imbalance between inward and outward currents and the resulting depolarization in HypoPP1 are still matters of debate. It is, however, indisputable that our finding of a high Na^+ leak current in V876E has very important pathophysiological consequences because the higher the depolarizing inward current, the higher the expected depolarization of resting potential and severity of the symptoms.

In conclusion, the first functional characterization of the V876E HypoPP1 mutation demonstrates the existence of a hydrophilic pathway possibly corresponding to a gating pore in the voltage sensor domain of the voltage-gated Ca^{2+} channel that generates Na^+ current at resting membrane potentials. Our data thus may suggest that the generation of a gating pore constitutes a pathogenic mechanism common to all HypoPP1 disorders, the severity of which may be related to the intensity of the depolarizing current induced by the mutation.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the University Lyon 1, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, and the Association Française contre les Myopathies (AFM-Téléthon, grant 18241).

The authors declare no competing financial interests.

Author contributions: C. Fuster designed and performed experiments and analyzed data. J. Perrot performed experiments. C. Berthier designed and performed experiments. V. Jacquemond gave conceptual advice. P. Charnet gave conceptual advice and wrote the paper. B. Allard designed and performed experiments, analyzed data, and wrote the paper.

Eduardo Ríos served as editor.

Submitted: 16 June 2017

Revised: 18 September 2017

Accepted: 12 October 2017

REFERENCES

- Campos, F.V., B. Chanda, B. Roux, and F. Bezanilla. 2007. Two atomic constraints unambiguously position the S4 segment relative to S1 and S2 segments in the closed state of Shaker K channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104:7904–7909. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702638104>
- Cannon, S.C. 2010. Voltage-sensor mutations in channelopathies of skeletal muscle. *J. Physiol.* 588:1887–1895. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.186874>
- Cannon, S.C. 2015. Channelopathies of skeletal muscle excitability. *Compr. Physiol.* 5:761–790. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140062>
- Catterall, W.A. 2011. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3:a003947. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003947>
- Collet, C., L. Csernoch, and V. Jacquemond. 2003. Intramembrane charge movement and L-type calcium current in skeletal muscle fibers isolated from control and *mdx* mice. *Biophys. J.* 84:251–265. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74846-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74846-2)
- DiFranco, M., P. Neco, J. Capote, P. Meera, and J.L. Vergara. 2006. Quantitative evaluation of mammalian skeletal muscle as a heterologous protein expression system. *Protein Expr. Purif.* 47:281–288. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.10.018>
- Fuster, C., J. Perrot, C. Berthier, V. Jacquemond, and B. Allard. 2017. Elevated resting H(+) current in the R1239H type I hypokalaemic periodic paralysis mutated Ca^{2+} channel. *J. Physiol.* 595:6417–6428. <https://doi.org/10.1113/JP274638>
- Gandhi, C.S., and E.Y. Isacoff. 2002. Molecular models of voltage sensing. *J. Gen. Physiol.* 120:455–463. <https://doi.org/10.1085/jgp.20028678>
- Hodgkin, A.L., and P. Horowicz. 1959. Movements of Na and K in single muscle fibres. *J. Physiol.* 145:405–432. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1959.sp006150>
- Jurkat-Rott, K., U. Uetz, U. Pika-Hartlaub, J. Powell, B. Fontaine, W. Melzer, and F. Lehmann-Horn. 1998. Calcium currents and transients of native and heterologously expressed mutant skeletal muscle DHP receptor $\alpha 1$ subunits (R528H). *FEBS Lett.* 423:198–204. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00090-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00090-8)
- Jurkat-Rott, K., M.A. Weber, M. Fauler, X.H. Guo, B.D. Holzherr, A. Paczulla, N. Nordsborg, W. Joechle, and F. Lehmann-Horn. 2009. K^+ -dependent paradoxical membrane depolarization and Na^+ overload, major and reversible contributors to weakness by ion channel leaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 106:4036–4041. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811277106>
- Jurkat-Rott, K., J. Groome, and F. Lehmann-Horn. 2012. Pathophysiological role of omega pore current in channelopathies. *Front. Pharmacol.* 3:112. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00112>
- Ke, T., C.R. Gomez, H.E. Mateus, J.A. Castano, and Q.K. Wang. 2009. Novel CACNA1S mutation causes autosomal dominant hypokalaemic periodic paralysis in a South American family. *J. Hum. Genet.* 54:660–664. <https://doi.org/10.1038/jhg.2009.92>
- Lapie, P., C. Goudet, J. Nargeot, B. Fontaine, and P. Lory. 1996. Electrophysiological properties of the hypokalaemic periodic paralysis mutation (R528H) of the skeletal muscle alpha 1s subunit as expressed in mouse L cells. *FEBS Lett.* 382:244–248. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00173-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00173-1)
- Lehmann-Horn, F., R. Rüdell, and K. Jurkat-Rott. 2004. Nondystrophic myotonias and periodic paralyses. In *Myology*. Third edition. McGraw-Hill, New York. 1257–1300.
- Matthews, E., and M.G. Hanna. 2010. Muscle channelopathies: does the predicted channel gating pore offer new treatment insights for hypokalaemic periodic paralysis? *J. Physiol.* 588:1879–1886. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.186627>
- Melzer, W., A. Herrmann-Frank, and H.C. Lüttgau. 1995. The role of Ca^{2+} ions in excitation-contraction coupling of skeletal muscle fibres. *Biochim. Biophys. Acta.* 1241:59–116. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(94\)00014-5](https://doi.org/10.1016/0304-4157(94)00014-5)
- Moreau, A., P. Gosselin-Badaroudine, and M. Chahine. 2014. Biophysics, pathophysiology, and pharmacology of ion channel gating pores. *Front. Pharmacol.* 5:53. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00053>
- Morrill, J.A., R.H. Brown Jr., and S.C. Cannon. 1998. Gating of the L-type Ca channel in human skeletal myotubes: an activation defect caused by the hypokalaemic periodic paralysis mutation R528H. *J. Neurosci.* 18:10320–10334.
- Pantazis, A., N. Savalli, D. Sigg, A. Neely, and R. Olcese. 2014. Functional heterogeneity of the four voltage sensors of a human L-type calcium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 111:18381–18386. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411127112>
- Ríos, E., and G. Pizarro. 1991. Voltage sensor of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Physiol. Rev.* 71:849–908.
- Robin, G., and B. Allard. 2015. Voltage-gated Ca^{2+} influx through L-type channels contributes to sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} loading in skeletal muscle. *J. Physiol.* 593:4781–4797. <https://doi.org/10.1113/JP270252>
- Schneider, M.F. 1994. Control of calcium release in functioning skeletal muscle fibers. *Annu. Rev. Physiol.* 56:463–484. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.56.030194.002335>
- Sokolov, S., T. Scheuer, and W.A. Catterall. 2005. Ion permeation through a voltage-sensitive gating pore in brain sodium channels having voltage sensor mutations. *Neuron*. 47:183–189. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.06.012>
- Sokolov, S., T. Scheuer, and W.A. Catterall. 2007. Gating pore current in an inherited ion channelopathy. *Nature*. 446:76–78. <https://doi.org/10.1038/nature05598>

- Starace, D.M., and F. Bezanilla. 2004. A proton pore in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field. *Nature*. 427:548–553. <https://doi.org/10.1038/nature02270>
- Struyk, A.F., and S.C. Cannon. 2007. A Na⁺ channel mutation linked to hypokalemic periodic paralysis exposes a proton-selective gating pore. *J. Gen. Physiol.* 130:11–20. <https://doi.org/10.1085/jgp.200709755>
- Tombola, F., M.M. Pathak, and E.Y. Isacoff. 2005. Voltage-sensing arginines in a potassium channel permeate and occlude cation-selective pores. *Neuron*. 45:379–388. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.12.047>
- Wu, F., W. Mi, E.O. Hernández-Ochoa, D.K. Burns, Y. Fu, H.F. Gray, A.F. Struyk, M.F. Schneider, and S.C. Cannon. 2012. A calcium channel mutant mouse model of hypokalemic periodic paralysis. *J. Clin. Invest.* 122:4580–4591. <https://doi.org/10.1172/JCI66091>

Discussion Générale et Perspectives

L'ensemble de ce travail a permis d'apporter de nouvelles données concernant la Paralysie Périodique Hypokaliémique de type 1 en utilisant un modèle original d'expression musculaire aigüe de canaux humains mutés. D'une part, nous avons confirmé la présence d'un courant de fuite dans la mutation R1239H correspondant très vraisemblablement à un *gating pore current* et démontré que ce courant de fuite est de nature protonique. D'autre part, notre travail établit que la mutation V876E, dont les conséquences fonctionnelles n'avaient à ce jour jamais été étudiées, induit un courant de fuite lui aussi assimilable à un *gating pore current* mais porté par des ions Na^+ . D'un point de vue fondamental, cette étude montre que des mutations dans le canal Ca^{2+} musculaire équivalentes à celles générées dans les canaux Na^+ et K^+ voltage-dépendants induisent elles aussi un *gating pore current* dont les propriétés sont proches de celles des canaux Na^+ et K^+ . D'un point de vue physiopathologique, notre travail indique que le développement d'un *gating pore current* au potentiel de repos semble constituer un mécanisme commun à toutes les formes d'HypoPP1 et qui joue un rôle déterminant dans le déclenchement des crises de paralysie.

Analyse de la fonction de canal calcique dans les formes mutées HypoPP1

Nos études ont eu recours à la transfection *in vivo* du gène CACNA1S humain sain ou muté HypoPP1 dans les muscles des pattes arrière de souris. La première investigation s'est axée sur l'étude de la fonction canal de la sous-unité $\alpha 1S$. Dans un premier temps, pour la mutation R1239H, nous avons observé que la conductance et la densité de courant de type L étaient réduites. De plus, la courbe d'activation du canal était décalée vers des valeurs de potentiel plus négatives que dans les fibres exprimant la $\text{Ca}_v1.1$ WT. Des données similaires à celles-ci ont été observées dans des modèles d'expression hétérologues exprimant soit la même mutation R1239H ou une autre mutation HypoPP1 aux caractéristiques semblables à la mutation R1239H. Cependant, l'ensemble de ces résultats révèle soit un décalage de la courbe d'activation vers des valeurs de potentiels plus négatives, soit vers des valeurs de potentiel plus positives, soit encore ne révèlent aucune modification des paramètres électrophysiologiques de la sous-unité $\alpha 1S$ portant une mutation HypoPP1. Ces résultats variables et souvent contradictoires semblent être en lien avec le modèle d'expression utilisé (Sipos *et al.*, 1995; Lapie *et al.*, 1996; Jurkat-Rott *et al.*, 1998; Morrill *et al.*, 1998; Morrill & Cannon, 1999; Wu *et al.*, 2012). Concernant la mutation V876E, bien que la valine 876 soit un acide aminé hautement conservé dans les canaux voltage-dépendants de différentes

espèces (Ke et al., 2009) et que le domaine III fasse partie intégrante du processus d'activation du canal (Pantazis et al., 2014), nos expériences n'ont révélé aucune modification des propriétés des courants de type L. L'entrée de Ca^{2+} activée par la dépolarisation participe au maintien des réserves calciques dans le RS à l'occasion d'activités musculaires prolongées (Robin & Allard, 2015). Ainsi, une réduction de la conductance calcique à travers le DHPR dans le cas de la mutation R1239H pourrait en partie expliquer la faiblesse musculaire observée dans la pathologie. Cependant, si tel était le cas, la faiblesse musculaire devrait être permanente et non pas se manifester sous forme de crises. De plus, dans le cas de la mutation HypoPP1 V876E, la conductance calcique n'est pas affectée. Ainsi, il est peu probable qu'une modification de la conductance calcique telle qu'observée pour la mutation R1239H puisse être mise en cause dans le déclenchement des crises de paralysie.

Détection d'un gating pore current aux valeurs hyperpolarisées de la membrane

Un des buts principal de ce travail a été de rechercher la présence d'un courant de fuite dans ces deux mutations HypoPP1. Dans les canaux VD, les segments S4 se déplacent dans un « *gating pore* » formé par les segments adjacents S1, S2 et S3 via des interactions moléculaires entre les résidus d'acides aminés chargés positivement des segments S4 (arginine et lysine) et les résidus d'acides aminés chargés négativement des trois autres segments (acide glutamique et acide aspartique). D'autre part, le remplacement de la première ou seconde arginine du S4 par une histidine ou un acide aminé neutre du domaine II ou IV respectivement dans le canal potassique VD ou dans le canal sodique VD induisent un *gating pore current* aux potentiels négatifs, probablement causé par une perte d'interaction avec les résidus d'acides aminés négatifs des autres segments lorsque les segments S4 sont en position « in » attirés côté interne par la polarisation négative de la cellule (Starace & Bezanilla, 2004 ; Tombola et al., 2005 ; Sokolo et al., 2007 ; Struyk et al., 2008). Etant donné que la mutation R1239H que nous avons étudiée consiste elle aussi au remplacement d'une arginine externe dans un segment S4, nous avons fait l'hypothèse que cette mutation pourrait de même être à l'origine d'un *gating pore current* au potentiel de repos. Dans la mutation R1239H, le remplacement de la deuxième arginine la plus externe dans le segment S4 du domaine IV du canal calcique musculaire est très vraisemblablement responsable de la formation d'un *gating pore* ouvert au repos et perméable aux cations puisque, en réponse à l'application de rampes hyperpolarisantes, nous avons montré que le courant de fond était significativement plus entrant pour des potentiels inférieurs à -40 mV dans les fibres R1239H.

En parallèle, la mesure de la conductance de membrane sur la partie linéaire des courbes courant/potentiel entre -80 mV et -120 mV a indiqué que la conductance membranaire de repos dans les fibres exprimant la mutation R1239H était en moyenne significativement plus importante comparée aux fibres WT. En 2010, *Sokolov et al.* ont montré que le courant de fuite observé dans les ovocytes exprimant la mutation de type HypoPP2 R672G dans le segment 4 du domaine II du canal Na⁺ était potentialisé lorsque le potentiel de membrane était au préalable maintenu durant cinq minutes à 0 mV, suggérant que le maintien prolongé du canal dans un état inactivé augmentait la conductance du *gating pore*. Ce mécanisme ne semble pas être présent dans le canal calcique muté R1239H puisque nous avons observé que l'amplitude du courant de fond n'était pas affectée par la valeur du potentiel de maintien 0, -20, -40 ou -60 mV.

Si l'on soustrait la conductance de fuite membranaire moyenne mesurée dans les fibres WT à celle mesurée dans les fibres R1239H avec un potentiel de maintien imposé à 0 mV, une conductance de 19.6 S/F est obtenue. L'ordre de grandeur de cette valeur est équivalent à celui des valeurs de conductance de fuite mesurées dans des cellules musculaires de patients hétérozygotes pour la mutation R1239H (19.5 S/F) et la mutation R528H (12 S/F) (*Jurkat-rott et al., 2009*). Considérant cependant que la valeur de 19.5 S/F est rapportée sur des patients hétérozygotes, la valeur de 19.6 S/F que nous avons mesurée est fortement sous-estimée et pourrait indiquer que, dans nos conditions de transfert de gènes, environ 50 % des canaux calciques endogènes n'ont pas été remplacés par le canal exogène humain. Notre valeur de conductance de fuite est aussi en accord avec la valeur de conductance de fuite de 28 S/F donnée par *Wu et al.* (2012) pour la mutation HypoPP1 R528H chez les souris transgéniques homozygotes.

Bien que la mutation V876E n'affecte pas un segment S4, nous avons aussi mis en évidence un courant de fuite élevé dans les fibres V876E, suggérant que cette mutation est aussi à l'origine de la formation d'un *gating pore* perméable aux cations et ouvert au potentiel de repos. En l'absence de Na⁺ et de K⁺ externe et à partir d'un potentiel de 0 mV, la soustraction de la conductance de fuite membranaire moyenne mesurée dans les fibres WT à celle mesurée dans les fibres V876E indique une conductance de 12 S/F supérieure dans les fibres V876E, d'un ordre de grandeur donc équivalent aux valeurs décrites pour les autres mutations. Cependant cette conductance s'élève à 68 S/F lorsque les ions Na⁺ et K⁺ sont présents dans le milieu externe. Si l'on considère un rendement de transfection comparable (50%) pour cette mutation et la mutation R1239H, cette valeur de conductance s'avère plus de trois fois supérieure à celles rapportées pour les autres mutations HypoPP1. Comme nous

le verrons dans la partie de la discussion qui s'intéresse aux mécanismes physiopathologiques de la maladie, une valeur aussi élevée de conductance de fuite est probablement à mettre en relation avec le tableau clinique extrêmement sévère que présentent les patients porteurs de cette mutation.

D'après le modèle atomique du canal récemment publié par *Wu et al.* (2016), la valine en position 876 se situe à proximité du *Gating Charge Transfert Center* (GCTC) du segment S3/DIII à un niveau proche de la première et de la seconde arginine du S4 adjacent. Or, *Campos et al.* (2007) ont montré que, sans modifier les arginines du segment S4, le remplacement d'une isoleucine localisée dans la partie externe du segment S2 du canal potassique VD par une histidine permettait le développement d'un *gating pore current* probablement dû à la perturbation de la barrière hydrophobique normalement constituée par l'interaction entre l'isoleucine et les arginines les plus externes du segment S4. Ainsi, l'hypothèse la plus plausible est que, dans le cas de la mutation V876E, le remplacement de la valine, acide aminé neutre, par l'acide glutamique chargé négativement, induirait de la même façon une perturbation des interactions électrostatiques impliquant les charges positives de l'arginine causée par la présence des charges négatives de l'acide glutamique et pourrait ainsi connecter les compartiments aqueux externe et interne par un pont hydrophile permettant l'écoulement d'un courant de fuite.

Le courant de fuite observé dans chacune des deux mutations montre une rectification entrante pour des potentiels de membrane plus négatifs que -50 mV. Une telle rectification est aussi décrite pour le courant de fuite La^{3+} -sensible dans les fibres musculaires de souris transgéniques R528H (*Wu et al.*, 2012) ou dans les fibres issues de biopsies de patients R528H et R1239H, bien que dans ces dernières expériences réalisées en présence de K^+ externe la rectification entrante est probablement aussi en partie occasionnée par les K_{ir} (*Jurkat-rott et al.*, 2009). Il est intéressant de noter que cette rectification entrante est aussi systématiquement observée dans les autres canaux voltage-dépendants lorsque la mutation affecte une arginine externe dans un segment S4, voire même un résidu dans un autre segment mais qui fait face à une arginine externe du S4 dans le canal potassique VD (*Tombola et al.*, 2005 ; *Campos et al.*, 2007 ; *Sokolov et al.*, 2007). Dès la découverte du *gating pore current*, *Starace & Bezanilla* (2004) ont montré sur le canal K^+ que cette rectification entrante résultait de la transition d'un état ouvert du *gating pore* lorsque les segments S4 sont en position « in » aux potentiels négatifs à un état fermé lorsqu'en réponse à la dépolarisation les segments S4 se déplacent dans le sens sortant pour adopter une position « out ». En effet, la voltage-dépendance des mouvements de charges qui conduisent à l'ouverture du canal correspondait à

la voltage-dépendance de la rectification du *gating pore*. Il est vraisemblable que la rectification entrante du courant de fuite dans les fibres R1239H et V876E résulte aussi de la fermeture du *gating pore* induit par le déplacement des mouvements de charge des segments S4. Les mouvements de charge intramembranaire du DHPR rapportés par Collet *et al.* (2003) montrent en effet un $V_{1/2}$ d'activation de -37 mV dans les muscles squelettiques de souris, une valeur qui concorde avec les valeurs de potentiel auxquelles la rectification s'amorce. Ce résultat confirme en outre que le courant de fuite mesuré dans notre étude s'écoule à travers un pore distinct du pore α du canal calcique, puisqu'il est présent aux potentiels où le pore α est fermé tandis qu'il disparaît lorsque le pore α s'ouvre en réponse à la dépolarisation.

Nature ionique du gating pore current

Pour les deux mutations R1239H et V876E, les séries d'expériences qui ont révélé la présence d'un *gating pore current* ont été réalisées en l'absence de Na^+ et de K^+ extracellulaire. Outre les ions Ca^{2+} , seuls les ions H^+ ont donc un gradient électrochimique en faveur d'un courant entrant. En effet si l'on se réfère aux valeurs de pH_{ext} ($\sim 7,2$) et de pH_{int} ($\sim 7,00$) d'une fibre musculaire au repos, l'équation de Nernst indique que le potentiel d'équilibre des H^+ est situé autour de -10 mV. A un potentiel de repos de -80 mV et pour des valeurs plus négatives, le gradient électrochimique est donc toujours en faveur d'une entrée de protons. Surtout, nos expériences montrent que le courant de fuite entrant est potentialisé et que la conductance de membrane est augmentée de façon significative par une acidification extracellulaire (pH 6) dans les fibres exprimant la mutation R1239H ou V876E. L'équation de Nernst indique qu'une telle acidification déplace le potentiel d'équilibre des ions H^+ de 70 mV vers les valeurs positives de potentiel, augmentant ainsi de 70 mV le gradient électrochimique entrant des H^+ . Ce résultat montre donc que le courant de fuite est porté en partie par des protons dans les fibres R1239H et V876E et exclut que l'effet potentialisateur sur le courant entrant résulte de l'inhibition d'un courant sortant puisque l'acidification s'accompagne d'une augmentation de conductance et non d'une diminution. La participation des ions Cl^- , dont les concentrations interne et externe sont respectivement de 7 et 9 mM, peut aussi être exclue puisqu'une acidification extracellulaire est connue pour induire non pas une potentialisation mais une inhibition de la conductance chlorure de repos dans la cellule musculaire (Palade & Barchi, 1977).

La soustraction du courant de fuite obtenu à pH 7.2 à celui obtenu à pH 6 dans les fibres mutantes et dans les fibres WT indique que la composante proton du courant est significativement plus importante dans les fibres mutantes que dans les fibres WT, suggérant

ainsi que le *gating pore current* est au moins en partie porté par des protons. Ces données montrent d'autre part qu'une partie du courant de fuite est aussi porté par des protons dans les fibres WT. A notre connaissance, un courant proton de repos n'a jamais été décrit dans la cellule musculaire. L'étude de ce courant fait actuellement l'objet d'une étude au laboratoire dont les objectifs seront décrits dans les perspectives.

Les mesures de pH intracellulaire à l'aide de l'indicateur fluorescent BCECF sont venues conforter les données obtenues sur les courants pour la mutation R1239H. Aussi bien en absence qu'en présence de Na^+ et de K^+ extracellulaire dans la solution externe l'acidification extracellulaire a en effet conduit au développement d'un influx de protons dont la vitesse était plus importante dans les fibres mutées R1239H que dans les fibres WT. Ces résultats démontrent donc que, comme dans les canaux Na^+ et K^+ voltage-dépendants, le remplacement d'une arginine par une histidine dans la partie externe d'un segment S4 génère un *gating pore current* porté par des protons au potentiel de repos. En revanche, la sélectivité du *gating pore* généré par la mutation V876E semble différente de celle du *gating pore* généré par la mutation R1239H. En effet, les mesures de pH intracellulaire indiquent que l'influx de protons se développe à la même vitesse dans les fibres V876E et WT en présence d'un milieu externe physiologique. Ce résultat suggère ainsi qu'en absence de Na^+ et de K^+ extracellulaire le *gating pore* est capable de transporter des protons tandis que, lorsque ces ions sont présents, d'autres ions s'écoulent dans le pore. Nos mesures de Na^+ intracellulaire et de courants générés par des rampes hyperpolarisantes ont permis de montrer qu'en conditions physiologiques le *gating pore current* induit par la mutation était porté par des ions Na^+ puisque, d'une part, l'influx Na^+ de repos est plus rapide dans les fibres V876E et que, d'autre part, le courant de fuite de repos est plus entrant dans ces cellules en présence de Na^+ dans la solution externe alors qu'il n'est pas différent en son absence. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature qui indiquent que, dans les canaux sodiques ou potassiques VD, le *gating pore* est sélectif aux protons lorsqu'il est induit par le remplacement de la première ou seconde arginine par une histidine et qu'il passe des ions K^+ ou Na^+ lorsque d'autres résidus sont substitués à l'arginine (Tombola et al., 2005 ; Sokolov et al., 2007 ; Sokolov et al., 2008 ; Sokolov et al., 2010 ; Francis et al., 2011).

Gating pore current et physiopathologie de l'HypoPP1(Figure22)

La nature protonique du *gating pore current* pour la mutation R1239H suggère que toute situation qui conduit à un changement de pH intra- ou extra-cellulaire est susceptible de modifier l'intensité du *gating pore current*. Cette régulation du *gating pore current* est critique

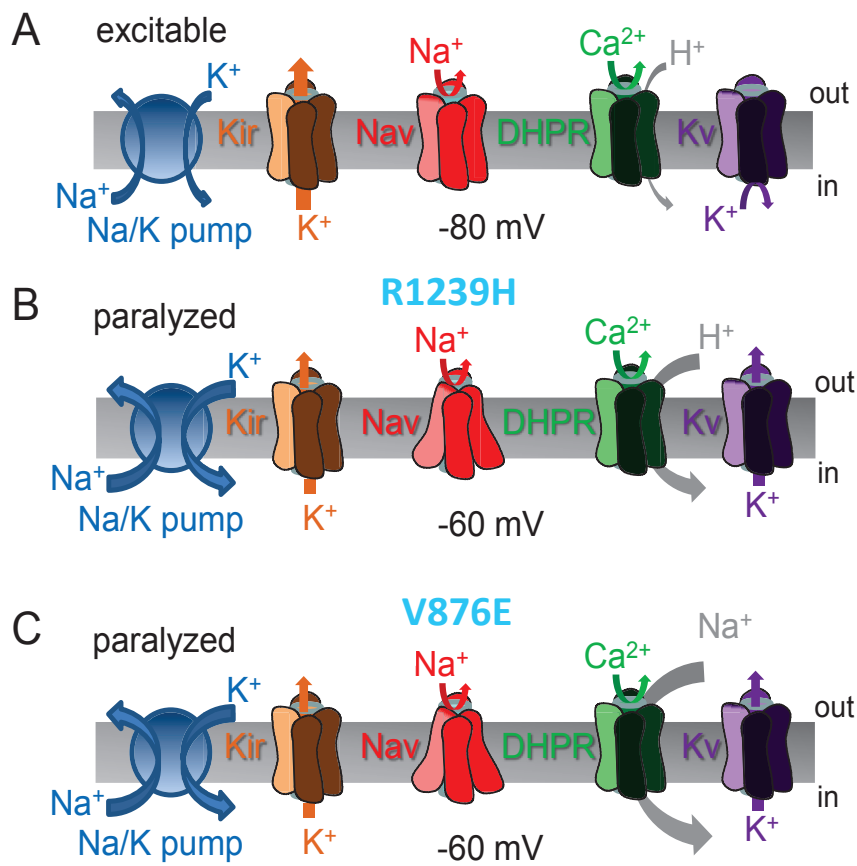


Figure 22 : Mouvements ioniques transmembranaires impliqués dans le déclenchement des crises de paralysies.

- Dans le cas de la mutation R1239H, en normokaliémie et en présence d'un pH extracellulaire neutre, le courant sortant K⁺ à travers les canaux Kir domine sur le courant entrant auquel participe le *gating pore current* H⁺ à travers le DHPR muté. Dans ces conditions, le potentiel de repos est proche de E_K et suffisamment négatif pour permettre une activation des canaux Na⁺ voltage-dépendants lors de l'excitation musculaire.
- Toujours dans le cas de la mutation R1239H, l'hypokaliémie, vraisemblablement causée par une hyper-activité de la pompe Na⁺/K⁺, induit une diminution de la conductance K_{ir} aggravée par une acidose qui renforce l'inhibition des canaux K_{ir} et potentialise le *gating pore current* H⁺. Le potentiel de membrane est ainsi porté vers des valeurs de potentiel moins négatives pour lesquelles les courants K⁺ sortants à travers les canaux K⁺ voltage-dépendants et les canaux K_{ir} s'équilibrent avec les courants entrants dépolarisants. Cette dépolarisation maintenue favorise l'inactivation des canaux Na⁺, l'inexcitabilité et la paralysie musculaire.
- Dans le cas de la mutation V876E, la dépolarisation paradoxale est induite par un fort *gating pore current* Na⁺ à travers le DHPR muté combiné à une hypokaliémie.

Allard & Fuster, 2017. Soumis

pour le muscle squelettique puisque ce dernier subit des diminutions importantes de son pH intracellulaire en fonction des phases d'activité mais est aussi régulièrement exposé à des variations de pH extracellulaire. Si le courant de fuite protonique de repos contribue significativement à l'établissement du potentiel de membrane, une acidification intracellulaire associée à un exercice physique devrait être protectrice puisque l'augmentation de la concentration de protons interne a tendance à porter E_H vers des valeurs plus négatives. En revanche une acidification externe devrait avoir des effets délétères puisque, dans ces conditions, E_H devrait au contraire être porté vers des valeurs plus positives. Cette dernière situation semble se produire durant la période post-exercice. En effet des mesures de pH sanguin et intramusculaire en continu chez l'Homme ont montré que, durant un exercice intense, le métabolisme cellulaire des fibres musculaires induit une production importante de H^+ qui tendent à acidifier le milieu intracellulaire mais qui sont ensuite libérés au niveau interstitiel puis sanguin produisant une acidose (Juel, 2008). L'acidose intracellulaire pendant l'exercice est bien entendu plus marquée que l'acidose sanguine et, dans ces conditions, E_H évolue plutôt favorablement vers des valeurs négatives. En revanche, pendant la période de repos post-exercice, alors que le pH_i retourne à des valeurs neutres proches de celles du repos avec une constante de temps de l'ordre de 5 minutes (Juel et al., 1990), l'acidose sanguine est maintenue au-delà de 30 minutes après l'exercice (Stringer et al., 1992 ; Juel et al., 2004). En portant E_H vers des valeurs positives, cette acidose post-exercice est donc susceptible de faire glisser le potentiel de membrane vers des valeurs dépolarisées.

Notre étude montre que, en parallèle de l'augmentation d'un influx de protons, une acidification extracellulaire est en mesure d'inhiber les canaux K_{ir} dont l'activité est prépondérante pour le maintien du potentiel de repos. L'inhibition de la conductance des K_{ir} par une acidification extracellulaire a déjà été montrée sur des canaux K_{ir} étudiés dans des systèmes d'expression hétérologue (Hibino et al., 2010) mais jamais décrite dans des fibres musculaires squelettiques de mammifère. Cette action inhibitrice fait qu'une acidose sanguine devrait avoir tendance à dépolariser les cellules musculaires.

Comme nous l'avons décrit précédemment, la période de repos après un exercice intense constitue un facteur déclencheur majeur des crises de paralysies dans l'HypoPP1. Les résultats que nous avons obtenus sur la mutation R1239H pourraient en partie expliquer en quoi la période post-exercice favorise la survenue des crises de paralysie. En effet, l'acidose sanguine qui s'installe pendant cette période a un double effet délétère que sont la potentialisation du *gating pore current* et l'inhibition des canaux K_{ir} qui tous deux ont tendance à dépolariser la cellule musculaire. Il est difficile d'estimer à quel point l'acidose est

susceptible de dépolariser les cellules musculaires. Il est cependant peu probable que, d'une part, seule l'acidose soit responsable du déclenchement des crises et que d'autre part, que cette acidose soit maintenue pendant des crises de paralysie pouvant durer plusieurs jours.

L'hypokaliémie, qui est systématiquement associée aux crises de paralysie, joue aussi sans aucun doute un rôle déterminant dans le déclenchement des crises. Son origine est discutée mais il est fort probable que la pompe Na^+/K^+ ATPase en soit responsable. Comme nous l'avons décrit précédemment, la pompe est activée de manière soutenue pendant un exercice musculaire et son activité de recapture de K^+ est cruciale pour contrebalancer la sortie de K^+ à travers les canaux K^+ activés durant les potentiels d'action et l'accumulation de K^+ qui s'ensuit en particulier dans les tubules transverses. Cependant, pour une raison encore méconnue, cette hyper-activité de la pompe est maintenue au repos pendant une longue période qui suit l'exercice musculaire (Clausen, 2003). Les cellules musculaires étant au repos, la sortie de K^+ est fortement réduite alors que l'hyper-activité de recapture de K^+ de la pompe est maintenue, induisant en conséquence une hypokaliémie. Ainsi, l'hypokaliémie et l'acidose constituent deux facteurs déclencheurs des crises puisque toutes deux favorisent le développement d'une dépolarisation paradoxale susceptible d'inactiver les canaux Na^+ voltage-dépendants et conduire à l'inexcitabilité des cellules musculaires.

En ce qui concerne la mutation V876E, la sélectivité Na^+ du *gating pore* exclut que l'acidose puisse contribuer au déclenchement des crises. Dans ces conditions, il est vraisemblable que l'hypokaliémie à elle-seule précipite la paralysie. Ces conditions sont à mettre en relation avec le fait que le courant de fuite sodique de repos que nous avons mis en évidence est environ trois fois plus élevé que le courant de fuite protonique révélé par la mutation R1239H. D'ailleurs, la mutation V876E a été découverte dans une famille sud-américaine dont les membres souffrant d'HypoPP1 présentent les symptômes à un âge plus précoce, une pénétrance plus importante et un pronostic plus sévère en comparaison de familles porteuses d'autres mutations HypoPP1 (Ke et al., 2009).

Perspectives

Conductance protonique de repos

Durant les expérimentations qui nous ont permis d'observer un courant H^+ élevé dans les fibres mutées, nous avons démontré par la même occasion la présence d'un courant H^+ dans les fibres WT. Nous avons vérifié que ce courant H^+ était aussi présent dans des fibres non transfectées d'animaux contrôles afin d'exclure que l'électroporation en soit responsable. A notre connaissance, une conductance protonique n'a jamais été décrite dans le muscle squelettique et il nous semble intéressant de poursuivre la caractérisation de cette voie de passage de protons étant donné les importantes variations de pH à la fois extra- et intracellulaires que subit la fibre musculaire squelettique. Comme nous l'avons décrit précédemment, l'activité d'échangeurs expulsant les protons est bien caractérisée dans le muscle squelettique alors que seuls des canaux protons voltage-dépendants fermés au potentiel de repos ont été décrits dans des myotubes humains en culture (*Bernheim et al., 1993*). Nous avons déjà recueilli des données préliminaires de mesures simultanées de courant et de pH intracellulaire qui démontrent que cette conductance protonique de repos peut être sollicitée dans le sens entrant et sortant et pourrait ainsi contribuer à expulser les protons quand ils sont produits en intracellulaire. En parallèle, nous n'avons pas pu identifier de conductance H^+ voltage-dépendante dans la fibre de souris malgré la présence d'un milieu intracellulaire tamponné à pH 5 et un milieu extracellulaire tamponné à pH 8 qui devraient largement favoriser le développement de courants protons en réponse à la dépolarisation. Afin de définitivement conclure à l'absence de cette conductance dans les fibres de souris, nous projetons de faire exprimer le canal protonique voltage-dépendant le plus ubiquitaire (H_v1) dans le muscle squelettique de souris afin de déterminer quels courants devraient être enregistrés à travers ce canal lorsque son expression est forcée dans la cellule musculaire.

Pharmacologie de l'HypoPP1

Comme nous l'avons décrit précédemment, l'acétazolamide est un inhibiteur de l'anhydrase carbonique largement utilisé dans le traitement de l'HypoPP. Son usage s'est avéré réduire la fréquence et la sévérité des crises de paralysie chez des patients HypoPP1 et aussi préserver l'excitabilité membranaire dans des muscles de souris transgéniques HypoPP1 (*Resnick et al., 1968 ; Wu et al., 2013a*). Les effets bénéfiques ne sont cependant décrits que chez 50% des patients. Au long terme l'acétazolamide induit une acidose métabolique (*Griggs et al., 1970*), qui, selon nos résultats obtenus avec la mutation R1239H, devrait avoir des effets plutôt délétères. Les mécanismes d'action de ce médicament sont surtout décrits au

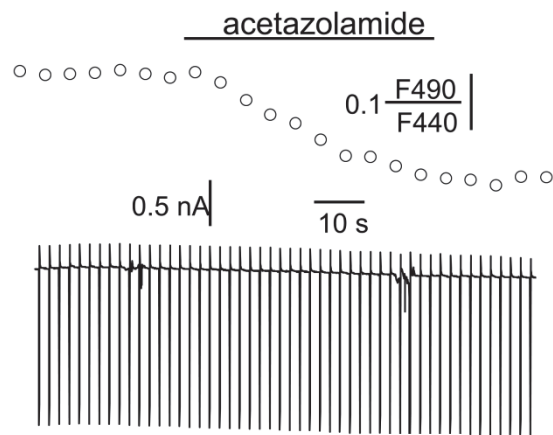


Figure 21 : Effet de l'acétazolamide sur la fluorescence du BCECF (trace du haut) et sur le courant de membrane de repos (trace du bas).

niveau rénal puisque la molécule est principalement utilisée comme diurétique. En revanche les mécanismes d'action qui conduisent à améliorer les symptômes de l'HypoPP1 sont méconnus. Dans ce contexte, il nous a semblé intéressant d'évaluer au niveau de la cellule musculaire les effets éventuellement directs de cette molécule sur les courants ioniques et le pH intracellulaire ou indirects via une réduction de l'activité de l'anhydrase carbonique dont la présence est démontrée dans la cellule musculaire (Matthews & Hanna, 2010).

Nos données préliminaires indiquent que l'acétazolamide induit une acidification intracellulaire lorsque la molécule est appliquée à 100 μM sur une fibre musculaire contrôlée maintenue à -80 mV et en présence d'un milieu externe dépourvu de Na^+ et de K^+ . Cet effet n'est associé à aucun changement significatif du courant de fond (Figure 21).

Une acidification a aussi été observée en présence d'une solution physiologique tamponnée avec du bicarbonate et bullée avec du carbogène contenant 5% de CO_2 . A notre connaissance, une action acidifiante de l'acétazolamide n'a jamais été décrite sur la cellule musculaire. Le fait que la molécule ne modifie pas le courant de fond exclut que la molécule ait un effet direct sur un canal ionique. En revanche, l'acétazolamide est un inhibiteur d'anhydrase carbonique qui passe la membrane plasmique et conduit à une réduction des produits de la réaction d'hydratation du CO_2 catalysée par l'enzyme, c'est-à-dire les ions H^+ et les ions HCO_3^- . Ainsi, l'acidification observée pourrait résulter d'une déplétion plus marquée des ions HCO_3^- par rapport aux ions H^+ comme il l'a été suggéré pour l'acidification induite par l'acétazolamide dans les neurones de l'hippocampe (Leninger et al., 2002). L'observation selon laquelle l'acidification intracellulaire se manifeste aussi bien en absence qu'en présence de CO_2 indique que le CO_2 dans l'air environnant qui est connu pour passer la membrane ou le CO_2 endogène produit par l'activité métabolique fournissent suffisamment de substrats à l'enzyme pour qu'elle fonctionne dans le muscle en condition de repos.

Les effets bénéfiques de l'acétazolamide dans l'HypoPP1 pourraient en partie résulter de son action acidifiante intracellulaire. En effet, comme nous l'avons décrit pour la mutation R1239H, toute situation qui conduit à une acidification intracellulaire devrait exercer une action protectrice contre le déclenchement des crises en réduisant le gradient électrochimique entrant pour les protons et donc le *gating pore current*. Nous avons montré que sur des fibres contrôlées, une partie du courant de fuite est portée par des ions H^+ . Dans ces conditions, l'acétazolamide aurait dû induire par son action acidifiante un courant sortant sur ces cellules. L'absence d'effet du médicament sur le courant de fond nous incite cependant à penser que l'intensité du courant H^+ est trop faible dans des fibres contrôlées pour qu'un changement de gradient électrochimique pour les protons révèle un changement de courant. Nous

envisageons ainsi de réaliser ce même type d'expériences sur des fibres musculaires exprimant la forme mutée R1239H du DHPN afin de déterminer si l'acidification intracellulaire induite par l'acétazolamide est dans ce cas capable de réduire significativement l'intensité du *gating pore current* protonique. Si un tel effet peut être révélé, nos données contribueraient à proposer un nouveau mécanisme d'action de l'acétazolamide. D'ailleurs, en accord avec cette hypothèse, une étude génétique a montré que l'acétazolamide était bénéfique en majorité chez des patients porteurs de mutations HypoPP1 qui conduisent à la substitution d'une histidine à une arginine dans un segment S4 de Ca_v1.1, tandis qu'elle était en majorité sans effet voire aggravait l'état des patients porteurs de mutations conduisant au remplacement de l'arginine par une glycine (Matthews & Hanna, 2011 ; Tricarico & Camerino, 2011). Cette étude conforte ainsi l'idée que l'acétazolamide n'a d'action bénéfique par son effet acidifiant que lorsque le *gating pore* est protonique et est inefficace lorsque le *gating pore* est porté par d'autres ions.

Références Bibliographiques

A

- Adams**, B.A., Tanabe, T., Mikami, A., Numa, S. and Beam, K.G., **1990**. Intramembrane charge movement restored in dysgenic skeletal muscle by injection of dihydropyridine receptor cDNAs. *Nature*, 346(6284), p.569.
- Afzali**, A.M., Ruck, T., Herrmann, A.M., Iking, J., Sommer, C., Kleinschnitz, C., Preuß, C., Stenzel, W., Budde, T., Wiendl, H. and Bittner, S., **2016**. The potassium channels TASK2 and TREK1 regulate functional differentiation of murine skeletal muscle cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 311(4), pp.C583-C595.
- Alagem**, N., Dvir, M. and Reuveny, E., **2001**. Mechanism of Ba²⁺ block of a mouse inwardly rectifying K⁺ channel: differential contribution by two discrete residues. *The Journal of Physiology*, 534(2), pp.381-393.
- Allard**, B. and **Lazdunski**, M., **1992**. Nucleotide diphosphates activate the ATP-sensitive potassium channel in mouse skeletal muscle. *Pflügers Archiv*, 422(2), pp.185-192.
- Allard**, B. and **Lazdunski**, M., **1993**. Pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ channels in mammalian skeletal muscle cells. *European Journal of Pharmacology*, 236(3), pp.419-426.
- Allard**, B., Bernengo, J.C., Rougier, O. and Jacquemond, V., **1996**. Intracellular Ca²⁺ changes and Ca²⁺-activated K⁺ channel activation induced by acetylcholine at the endplate of mouse skeletal muscle fibres. *The Journal of Physiology*, 494(2), pp.337-349.
- Allen**, A.S., **1943**. Pa ping, or Kiating paralysis. *Chinese Medical Journal*, 61(4), pp.296-301.
- Allen**, D.G., Gervasio, O.L., Yeung, E.W. and Whitehead, N.P., **2010**. Calcium and the damage pathways in muscular dystrophy. This article is one of a selection of papers published in this special issue on Calcium Signaling. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 88(2), pp.83-91.
- Amarouch**, M.Y. and **Abriel**, H., **2015**. Cellular hyper-excitability caused by mutations that alter the activation process of voltage-gated sodium channels. *Frontiers in Physiology*, 6, 45.
- Andronache**, Z., Ursu, D., Lehnert, S., Freichel, M., Flockerzi, V. and Melzer, W., **2007**. The auxiliary subunit $\gamma 1$ of the skeletal muscle L-type Ca²⁺ channel is an endogenous Ca²⁺ antagonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(45), pp.17885-17890.

B

- Balnave, C.D. and Allen, D.G., 1998.** Evidence for $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in intact single skeletal muscle fibers from the mouse. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 274(4), pp.C940-C946.
- Bannister, R.A., Grabner, M. and Beam, K.G., 2008.** The $\alpha 1\text{S}$ III-IV loop influences 1, 4-dihydropyridine receptor gating but is not directly involved in excitation-contraction coupling interactions with the type 1 ryanodine receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 283(34), pp.23217-23223.
- Bannister, R.A., Pessah, I.N. and Beam, K.G., 2009.** The skeletal L-type Ca^{2+} current is a major contributor to excitation-coupled Ca^{2+} entry. *The Journal of General Physiology*, 133(1), pp.79-91.
- Bannister, R.A. and Beam, K.G., 2009.** Ryanodine modification of RyR1 retrogradely affects L-type Ca^{2+} channel gating in skeletal muscle. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 30(5-6), p.217.
- Bannister, R.A. and Beam, K.G., 2013.** $\text{Ca}_v 1.1$: the atypical prototypical voltage-gated Ca^{2+} channel. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1828(7), pp.1587-1597.
- Basali, D. and Prayson, R.A., 2015.** Episodic weakness and vacuolar myopathy in hypokalemic periodic paralysis. *Journal of Clinical Neuroscience*, 22(11), pp.1846-1847.
- Beam, K.G., Knudson, C.M. and Powell, J.A., 1986.** A lethal mutation in mice eliminates the slow calcium current in skeletal muscle cells. *Nature*, 320(6058), pp.168-170.
- Becker, H.M., Hirnet, D., Fecher-Trost, C., Sültemeyer, D. and Deitmer, J.W., 2005.** Transport activity of MCT1 expressed in *Xenopus* oocytes is increased by interaction with carbonic anhydrase. *Journal of Biological Chemistry*, 280(48), pp.39882-39889.
- Bennetts, B., Rychkov, G.Y., Ng, H.L., Morton, C.J., Stapleton, D., Parker, M.W. and Cromer, B.A., 2005.** Cytoplasmic ATP-sensing domains regulate gating of skeletal muscle ClC-1 chloride channels. *Journal of Biological Chemistry*, 280(37), pp.32452-32458.
- Berbey, C., Weiss, N., Legrand, C., and Allard, B., 2009.** Transient receptor potential canonical type 1 (TRPC1) operates as a sarcoplasmic reticulum calcium leak channel in skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 284(52), pp. 36387-36394.
- Berbey, C. and Allard, B., 2009.** Electrically silent divalent cation entries in resting and active voltage-controlled muscle fibers. *Biophysical Journal*, 96(7), pp.2648-2657.
- Beurg, M., Ahern, C.A., Vallejo, P., Conklin, M.W., Powers, P.A., Gregg, R.G. and Coronado, R., 1999.** Involvement of the carboxy-terminus region of the dihydropyridine receptor $\beta 1a$ subunit in excitation-contraction coupling of skeletal muscle. *Biophysical Journal*, 77(6), pp.2953-2967.

- Blanchard**, E.M., Pan, B.S. and Solaro, R.J., **1984**. The effect of acidic pH on the ATPase activity and troponin Ca²⁺ binding of rabbit skeletal myofilaments. *Journal of Biological Chemistry*, 259(5), pp.3181-3186.
- Blaustein**, M.P. and **Lederer**, W.J., **1999**. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiological Reviews*, 79(3), pp.763-854.
- Blaustein**, R.O. and **Miller**, C., **2004**. Ion channels: Shake, rattle or roll?. *Nature*, 427(6974), pp.499-500.
- Block**, B.A., Imagawa, T., Campbell, K.P. and Franzini-Armstrong, C., **1988**. Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. *The Journal of Cell Biology*, 107(6), pp.2587-2600.
- Bradley**, W. G., **1969**. Ultrastructural changes in adynamia episodica hereditaria and normokalaemic familial periodic paralysis. *Brain*, 92(2), 379-390.
- Brini**, M. and **Carafoli**, E., **2011**. The plasma membrane Ca²⁺ ATPase and the plasma membrane sodium calcium exchanger cooperate in the regulation of cell calcium. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(2), p.a004168.
- Brini**, M., Carafoli, E. and Cali, T., **2017**. The plasma membrane calcium pumps: focus on the role in (neuro) pathology. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 483(4), pp.1116-1124.
- Brinkmeier**, H., **2011**. TRP channels in skeletal muscle: gene expression, function and implications for disease. *In Transient Receptor Potential Channels*, 704, pp.749-758
- Bröer**, S., Rahman, B., Pellegrini, G., Pellerin, L., Martin, J.L., Verleystonk, S., Hamprecht, B. and Magistretti, P.J., **1997**. Comparison of Lactate Transport in Astroglial Cells and Monocarboxylate Transporter 1 (MCT 1) Expressing *Xenopus laevis* Oocytes expression of two different monocarboxylate transporters in astroglial cells and neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 272(48), pp.30096-30102.
- Bulman**, D.E., Scoggan, K.A., Van Oene, M.D., Nicolle, M.W., Hahn, A.F., Tollar, L.L. and Ebers, G.C., **1999**. A novel sodium channel mutation in a family with hypokalemic periodic paralysis. *Neurology*, 53(9), pp.1932-1932.
- Buruma**, O. J. S., & **Schipperheyn**, J. J., **1979**. Periodic paralysis. *Handbook of Clinical Neurology*, 41, 147-174.

C

- Campos, F.V., Chanda, B., Roux, B. and Bezanilla, F., 2007.** Two atomic constraints unambiguously position the S4 segment relative to S1 and S2 segments in the closed state of Shaker K channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(19), pp.7904-7909.
- Canti, C., Nieto-Rostro, M., Foucault, I., Hebllich, F., Wratten, J., Richards, M.W., Hendrich, J., Douglas, L., Page, K.M., Davies, A. and Dolphin, A.C., 2005.** The metal-ion-dependent adhesion site in the Von Willebrand factor-A domain of $\alpha_2\delta$ subunits is key to trafficking voltage-gated Ca^{2+} channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(32), pp.11230-11235.
- Cannon, S.C., 2010.** Voltage-sensor mutations in channelopathies of skeletal muscle. *The Journal of Physiology*, 588(11), pp.1887-1895.
- Cannon, S.C., 2015.** Channelopathies of skeletal muscle excitability. *Comprehensive Physiology*, 5(2),pp.761-90
- Catterall, W.A., 1986.** Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels. *Annual Review of Biochemistry*, 55(1), pp.953-985.
- Catterall, W.A., 1995.** Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annual Review of Biochemistry*, 64(1), pp.493-531.
- Catterall, W.A., 2011.** Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(8), p.a003947.
- Catterall, W.A., 2014.** Structure and function of voltage-gated sodium channels at atomic resolution. *Experimental Physiology*, 99(1), pp.35-51.
- Chandy, K.G. and Gutman, G.A., 1993.** Nomenclature for mammalian potassium channel genes. *Trends in Pharmacological Sciences*, 14(12), p.434.
- Cheng, W., Altafaj, X., Ronjat, M. and Coronado, R., 2005.** Interaction between the dihydropyridine receptor Ca^{2+} channel β -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.19225-19230.
- Cheng, C.J., Lin, S.H., Lo, Y.F., Yang, S.S., Hsu, Y.J., Cannon, S.C. and Huang, C.L., 2011.** Identification and functional characterization of Kir2. 6 mutations associated with non-familial hypokalemic periodic paralysis. *Journal of Biological Chemistry*, 286(31), pp.27425-27435.

- Cheng, C.J., Kuo, E. and Huang, C.L., 2013**, May. Extracellular potassium homeostasis: insights from hypokalemic periodic paralysis. In *Seminars in Nephrology* (Vol. 33, No. 3, pp. 237-247). WB Saunders.
- Clarke, O.B. and Hendrickson, W.A., 2016**. Structures of the colossal RyR1 calcium release channel. *Current Opinion in Structural Biology*, 39, pp.144-152.
- Clausen, T. and Flatman, J.A., 1980**. β 2-Adrenoceptors mediate the stimulating effect of adrenaline on active electrogenic Na^+/K^+ transport in rat soleus muscle. *British Journal of Pharmacology*, 68(4), pp.749-755.
- Clausen, T., Wang, P., Ørskov, H. and Kristensen, O., 1980**. Hyperkalemic periodic paralysis. Relationships between changes in plasma water, electrolytes, insulin and catecholamines during attacks. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 40(3), pp.211-220.
- Clausen, T., 1998**. Clinical and therapeutic significance of the Na^+ , K^+ pump. *Clinical Science*, 95(1), pp.3-17.
- Clausen, T., 2003**. The sodium pump keeps us going. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 986(1), pp.595-602.
- Clausen, T., 2008**. Clearance of extracellular K^+ during muscle contraction-roles of membrane transport and diffusion. *The Journal of General Physiology*, 131(5), pp.473-481.
- Clausen, M.V., Hilbers, F. and Poulsen, H., 2017**. The structure and function of the Na, K-ATPase isoforms in health and disease. *Frontiers in Physiology*, 8, p.371.
- Clausen, T. and Kohn, P.G., 1977**. The effect of insulin on the transport of sodium and potassium in rat soleus muscle. *The Journal of Physiology*, 265(1), pp.19-42.
- Collet, C. and Jacquemond, V., 2002**. Sustained release of calcium elicited by membrane depolarization in ryanodine-injected mouse skeletal muscle fibers. *Biophysical Journal*, 82(3), pp.1509-1523.
- Collet, C., Csernoch, L. and Jacquemond, V., 2003**. Intramembrane charge movement and L-type calcium current in skeletal muscle fibers isolated from control and mdx mice. *Biophysical Journal*, 84(1), pp.251-265.
- Collet, C., Pouvreau, S., Csernoch, L., Allard, B. and Jacquemond, V., 2004**. Calcium signaling in isolated skeletal muscle fibers investigated under "Silicone Voltage-Clamp" conditions. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 40(2), p.225.

Creutzfeldt, O. D., Abbott, B. C., Fowler, W. M., & Pearson, C. M., **1963**. Muscle membrane potentials in episodic adynamia. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 15(3), 508-519.

D

Dayal, A., Schrötter, K., Pan, Y., Föhr, K., Melzer, W. and Grabner, M., **2017**. The Ca²⁺ influx through the mammalian skeletal muscle dihydropyridine receptor is irrelevant for muscle performance. *Nature Communications*, 8. doi: 10.1038/s41467-017-00629-x.

De Jongh, K.S., Warner, C. and Catterall, W.A., **1990**. Subunits of purified calcium channels. Alpha 2 and delta are encoded by the same gene. *Journal of Biological Chemistry*, 265(25), pp.14738-14741.

Delbono, O. and Stefani, E., **1993**. Calcium transients in single mammalian skeletal muscle fibres. *The Journal of Physiology*, 463(1), pp.689-707.

Delemotte, L., Tarek, M., Klein, M.L., Amaral, C. and Treptow, W., **2011**. Intermediate states of the Kv1. 2 voltage sensor from atomistic molecular dynamics simulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(15), pp.6109-6114.

Ding, W.G., He, L.P., Omatsu-Kanbe, M. and Kitasato, H., **1996**. A possible role of the ATP-sensitive potassium ion channel in determining the duration of spike-bursts in mouse pancreatic β -cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1279(2), pp.219-226.

Dirksen, R.T., **2009**. Checking your SOCCs and feet: the molecular mechanisms of Ca²⁺ entry in skeletal muscle. *The Journal of Physiology*, 587(13), pp.3139-3147.

Doyle, D.A., Cabral, J.M., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T. and MacKinnon, R., **1998**. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*, 280(5360), pp.69-77.

Dulhunty, A.F., **2006**. Excitation–contraction coupling from the 1950s into the new millennium. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 33(9), pp.763-772.

Dulhunty, A. F., Wei-LaPierre, L., Casarotto, M. G., and Beard, N. A., **2017**. Core skeletal muscle ryanodine receptor calcium release complex. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 44(1), pp. 3-12.

Duty, S. and **Allen**, D.G., **1995**. The effects of glibenclamide on tetanic force and intracellular calcium in normal and fatigued mouse skeletal muscle. *Experimental Physiology*, 80(4), pp.529-541.

E

- Eguchi, H.**, Tsujino, A., Kaibara, M., Hayashi, H., Shirabe, S., Taniyama, K. and Eguchi, K., **2006**. Acetazolamide acts directly on the human skeletal muscle chloride channel. *Muscle & Nerve*, 34(3), pp.292-297.
- Elbaz, A.**, Vale-Santos, J., Jurkat-Rott, K., Lapie, P., Ophoff, R.A., Bady, B., Links, T.P., Piussan, C., Vila, A., Monnier, N. and Padberg, G.W., **1995**. Hypokalemic periodic paralysis and the dihydropyridine receptor (CACNLIA3): genotype/phenotype correlations for two predominant mutations and evidence for the absence of a founder effect in 16 Caucasian families. *American Journal of Human Genetics*, 56(2), p.374.
- El-Hayek, R.**, Antoniu, B., Wang, J., Hamilton, S.L. and Ikemoto, N., **1995**. Identification of calcium release-triggering and blocking regions of the II-III loop of the skeletal muscle dihydropyridine receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 270(38), pp.22116-22118.
- Elinder, F.**, Nilsson, J. and Århem, P., **2007**. On the opening of voltage-gated ion channels. *Physiology & Behavior*, 92(1), pp.1-7.
- Ellinor, P.T.**, Yang, J., Sather, W.A., Zhang, J.F. and Tsien, R.W., **1995**. Ca²⁺ channel selectivity at a single locus for high-affinity Ca²⁺ interactions. *Neuron*, 15(5), pp.1121-1132.
- Eltit, J.M.**, Franzini-Armstrong, C. and Perez, C.F., **2014**. Amino acid residues 489–503 of dihydropyridine receptor (DHPR) β 1a subunit are critical for structural communication between the skeletal muscle DHPR complex and type 1 ryanodine receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 289(52), pp.36116-36124.
- Endo, M.**, **2009**. Calcium-induced calcium release in skeletal muscle. *Physiological Reviews*, 89(4), pp.1153-1176.
- Engel, A.G.**, Lambert, E.H., Rosevear, J.W. and Tauxe, W.N., **1965**. Clinical and electromyographic studies in a patient with primary hypokalemic periodic paralysis. *The American Journal of Medicine*, 38(4), pp.626-640.
- Engel, W.K.**, **1998**. The essentiality of histo- and cytochemical studies of skeletal muscle in the investigation of neuromuscular disease. *Neurology*, 51(3), pp.778-794.
- Engel, A. G.**, & Lambert, E. H., **1969**. Calcium activation of electrically inexcitable muscle fibers in primary hypokalemic periodic paralysis. *Neurology*, 19(9), 851-851.
- Ertel, E.A.**, Campbell, K.P., Harpold, M.M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., Schwartz, A., Snutch, T.P., Tanabe, T., Birnbaumer, L. and Tsien, R.W., **2000**. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*, 25(3), pp.533-535.

F

- Fabiato, A. and Fabiato, F., 1978.** Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscles. *The Journal of physiology*, 276(1), pp.233-255.
- Fan, C., Lehmann-Horn, F., Weber, M.A., Bednarz, M., Groome, J.R., Jonsson, M.K. and Jurkat-Rott, K., 2013.** Transient compartment-like syndrome and normokalaemic periodic paralysis due to a Cav1.1 mutation. *Brain*, 136(12), pp.3775-3786.
- Feldman, C.H., Grotegut, C.A. and Rosenberg, P.B., 2017.** The role of STIM1 and SOCE in smooth muscle contractility. *Cell Calcium*, 63, pp.60-65.
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S.H., Tanasa, B., Hogan, P.G., Lewis, R.S., Daly, M. and Rao, A., 2006.** A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*, 441(7090), p.179
- Fitts, R.H., 1994.** Cellular mechanisms of muscle fatigue. *Physiological reviews*, 74(1), pp.49-94.
- Fontaine, B., Vale-Santos, J., Jurkat-Rott, K., Reboul, J., Plassart, E., Rime, C.S., Elbaz, A., Heine, R., Guimaraes, J., Weissenbach, J. and Baumann, N., 1994.** Mapping of the hypokalaemic periodic paralysis (HypoPP) locus to chromosome 1q31–32 in three European families. *Nature Genetics*, 6(3), pp.267-272.
- Fouad, G., Dalakas, M., Servidei, S., Mendell, J.R., Van den Bergh, P., Angelini, C., Alderson, K., Griggs, R.C., Tawil, R., Gregg, R. and Hogan, K., 1997.** Genotype-phenotype correlations of DHP receptor α 1-subunit gene mutations causing hypokalemic periodic paralysis. *Neuromuscular Disorders*, 7(1), pp.33-38.
- Fosset, M., Jaimovich, E., Delpont, E. and Lazdunski, M., 1983.** [3H] nitrendipine receptors in skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 258(10), pp.6086-6092.
- Francis, D.G., Rybalchenko, V., Struyk, A. and Cannon, S.C., 2011.** Leaky sodium channels from voltage sensor mutations in periodic paralysis, but not paramyotonia. *Neurology*, 76(19), pp.1635-1641.
- Franzini-Armstrong, C. and Porter, K.R., 1964.** Sarcolemmal invaginations constituting the T system in fish muscle fibers. *The Journal of cell biology*, 22(3), pp.675-696.
- Franzini-Armstrong, C. and Peachey, L.D., 1981.** Striated muscle-contraction and control mechanisms. *The Journal of Cell Biology*, 91(3), p.166.

Franzini-Armstrong, C. and Jorgensen, A.O., 1994. Structure and development of EC coupling units in skeletal muscle. *Annual Review of Physiology*, 56(1), pp.509-534.

Freichel, M., Suh, S.H., Pfeifer, A., Schweig, U., Trost, C., Weißgerber, P., Biel, M., Philipp, S., Freise, D., Droogmans, G. and Hofmann, F., 2001. Lack of an endothelial store-operated Ca²⁺ current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4^{-/-} mice. *Nature Cell Biology*, 3(2), pp.121-127.

Freise, D., Held, B., Wissenbach, U., Pfeifer, A., Trost, C., Himmerkus, N., Schweig, U., Freichel, M., Biel, M., Hofmann, F. and Hoth, M., 2000. Absence of the γ subunit of the skeletal muscle dihydropyridine receptor increases L-type Ca²⁺ currents and alters channel inactivation properties. *Journal of Biological Chemistry*, 275(19), pp.14476-14481.

Frontera, W.R. and Ochala, J., 2015. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcified Tissue International*, 96(3), pp.183-195.

Fryer, M.W. and Stephenson, D.G., 1996. Total and sarcoplasmic reticulum calcium contents of skinned fibres from rat skeletal muscle. *The Journal of Physiology*, 493(2), pp.357-370.

G

Gach, M.P., Cherednichenko, G., Haarmann, C., Lopez, J.R., Beam, K.G., Pessah, I.N., Franzini-Armstrong, C. and Allen, P.D., 2008. $\alpha 2 \delta 1$ dihydropyridine receptor subunit is a critical element for excitation-coupled calcium entry but not for formation of tetrads in skeletal myotubes. *Biophysical Journal*, 94(8), pp.3023-3034.

Gage, P.W. and Eisenberg, R.S., 1969. Action potentials, afterpotentials, and excitation-contraction coupling in frog sartorius fibers without transverse tubules. *The Journal of General Physiology*, 53(3), pp.298-310.

Geukes-Foppen, R.J., Mil, H.V. and Heukelom, J.S., 2002. Effects of chloride transport on bistable behaviour of the membrane potential in mouse skeletal muscle. *The Journal of Physiology*, 542(1), pp.181-191.

Glover, W.E., 1982. The aminopyridines. *General Pharmacology: The Vascular System*, 13(4), pp.259-285.

Gosmanov, A.R., Schneider, E.G. and Thomason, D.B., 2003. NKCC activity restores muscle water during hyperosmotic challenge independent of insulin, ERK, and p38 MAPK. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 284(3), pp.R655-R665.

- Gosselin-Badaroudine**, P., Delemotte, L., Moreau, A., Klein, M.L. and Chahine, M., **2012**. Gating pore currents and the resting state of Nav1. 4 voltage sensor domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(47), pp.19250-19255.
- Grabner**, M., Dirksen, R.T., Suda, N. and Beam, K.G., **1999**. The II-III loop of the skeletal muscle dihydropyridine receptor is responsible for the bi-directional coupling with the ryanodine receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 274(31), pp.21913-21919.
- Gregg**, R.G., Messing, A., Strube, C., Beurg, M., Moss, R., Behan, M., Sukhareva, M., Haynes, S., Powell, J.A., Coronado, R. and Powers, P.A., **1996**. Absence of the β subunit (cchb1) of the skeletal muscle dihydropyridine receptor alters expression of the $\alpha 1$ subunit and eliminates excitation-contraction coupling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(24), pp.13961-13966.
- Gutman**, G.A., Chandy, K.G., Grissmer, S., Lazdunski, M., Mckinnon, D., Pardo, L.A., Robertson, G.A., Rudy, B., Sanguinetti, M.C., Stühmer, W. and Wang, X., **2005**. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacological Reviews*, 57(4), pp.473-508.
- Guy**, H.R. and **Seetharamulu**, P., **1986**. Molecular model of the action potential sodium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(2), pp.508-512.
- Hainaut**, K. and **Desmedt**, J.E., **1974**. Effect of dantrolene sodium on calcium movements in single muscle fibres. *Nature*, 252(5485), pp.728-730.

H

- Head**, S.I., **1993**. Membrane potential, resting calcium and calcium transients in isolated muscle fibres from normal and dystrophic mice. *The Journal of Physiology*, 469(1), pp.11-19.
- Held**, B., Freise, D., Freichel, M., Hoth, M. and Flockerzi, V., **2002**. Skeletal muscle L-type Ca^{2+} current modulation in $\gamma 1$ -deficient and wildtype murine myotubes by the $\gamma 1$ subunit and cAMP. *The Journal of Physiology*, 539(2), pp.459-468.
- Hilber**, K., Sandtner, W., Kudlacek, O., Schreiner, B., Glaaser, I., Schütz, W., Fozzard, H.A., Dudley, S.C. and Todt, H., **2002**. Interaction between fast and ultra-slow inactivation in the voltage-gated sodium channel does the inactivation gate stabilize the channel structure?. *Journal of Biological Chemistry*, 277(40), pp.37105-37115.
- Hodgkin**, A.L. and **Horowicz**, P., **1959**. The influence of potassium and chloride ions on the membrane potential of single muscle fibres. *The Journal of Physiology*, 148(1), pp.127-160.

Hurst, A.M., Beck, J.S., Laprade, R. and Lapointe, J.Y., **1993**. Na⁺ pump inhibition downregulates an ATP-sensitive K⁺ channel in rabbit proximal convoluted tubule. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 264(4), pp.F760-F764.

I/J

Inagaki, N., Gonoï, T., Iv, J.P.C., Wang, C.Z., Aguilar-Bryan, L., Bryan, J. and Seino, S., **1996**. A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ channels. *Neuron*, 16(5), pp.1011-1017.

Jacquemond, V., **1997**. Indo-1 fluorescence signals elicited by membrane depolarization in enzymatically isolated mouse skeletal muscle fibers. *Biophysical Journal*, 73(2), pp.920-928.

Jacquemond, V. and **Allard**, B., **1998**. Activation of Ca²⁺-activated K⁺ channels by an increase in intracellular Ca²⁺ induced by depolarization of mouse skeletal muscle fibres. *The Journal of Physiology*, 509(1), pp.93-102.

Jay, S.D., Sharp, A.H., Kahl, S., Vedvick, T.S., Harpold, M.M. and Campbell, K.P., **1991**. Structural characterization of the dihydropyridine-sensitive calcium channel alpha 2-subunit and the associated delta peptides. *Journal of Biological Chemistry*, 266(5), pp.3287-3293.

Jiang, Y., Pico, A., Cadene, M., Chait, B.T. and MacKinnon, R., **2001**. Structure of the RCK domain from the E. coli K⁺ channel and demonstration of its presence in the human BK channel. *Neuron*, 29(3), pp.593-601.

Jiang, Y., Ruta, V., Chen, J., Lee, A. and MacKinnon, R., **2003**. The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature*, 423(6935), p.42.

Jones, S.W., **1998**. Overview of voltage-dependent calcium channels. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 30(4), pp.299-312.

Jorgensen, A.O., Shen, A.C., Arnold, W., Leung, A.T. and Campbell, K.P., **1989**. Subcellular distribution of the 1, 4-dihydropyridine receptor in rabbit skeletal muscle in situ: an immunofluorescence and immunocolloidal gold-labeling study. *The Journal of Cell Biology*, 109(1), pp.135-147.

Jorgensen, P.L., Håkansson, K.O. and Karlsh, S.J., **2003**. Structure and mechanism of Na, K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annual Review of Physiology*, 65(1), pp.817-849.

Juel, C., Bangsbo, J., Graham, T. and Saltin, B., **1990**. Lactate and potassium fluxes from human skeletal muscle during and after intense, dynamic, knee extensor exercise. *Acta Physiologica*, 140(2), pp.147-159.

- Juel, C., 1998.** Skeletal muscle Na^+/H^+ exchange in rats: pH dependency and the effect of training. *Acta Physiol Scand*, 164(2), pp.135-140.
- Juel, C., 2000.** Expression of the Na^+/H^+ exchanger isoform NHE1 in rat skeletal muscle and effect of training. *Acta Physiologica Scandinavica*, 170(1), pp.59-64.
- Juel, C., Lundby, C., Sander, M., Calbet, J.A. and Hall, G.V., 2003.** Human skeletal muscle and erythrocyte proteins involved in acid-base homeostasis: adaptations to chronic hypoxia. *The Journal of Physiology*, 548(2), pp.639-648.
- Juel, C., Klarskov, C., Nielsen, J.J., Krstrup, P., Mohr, M. and Bangsbo, J., 2004.** Effect of high-intensity intermittent training on lactate and H^+ release from human skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 286(2), pp.E245-E251.
- Juel, C., 2008.** Regulation of pH in human skeletal muscle: adaptations to physical activity. *Acta Physiologica*, 193(1), pp.17-24.
- Jurkat-Rott, K., Lehmann-Horn, F., Elbaz, A., Heine, R., Gregg, R.G., Hogan, K., Powers, P.A., Laple, P., Vale-Santos, J.E., Weissenbach, J. and Fontaine, B., 1994.** A calcium channel mutation causing hypokalemic periodic paralysis. *Human Molecular Genetics*, 3(8), pp.1415-1419.
- Jurkat-Rott, K., Uetz, U., Pika-Hartlaub, U., Powell, J., Fontaine, B., Melzer, W. and Lehmann-Horn, F., 1998.** Calcium currents and transients of native and heterologously expressed mutant skeletal muscle DHP receptor $\alpha 1$ subunits (R528H). *FEBS letters*, 423(2), pp.198-204.
- Jurkat-Rott, K., Mitrovic, N., Hang, C., Kuzmenkin, A., Iaizzo, P., Herzog, J., Lerche, H., Nicole, S., Vale-Santos, J., Chauveau, D. and Fontaine, B., 2000.** Voltage-sensor sodium channel mutations cause hypokalemic periodic paralysis type 2 by enhanced inactivation and reduced current. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(17), pp.9549-9554.
- Jurkat-Rott, K. and Lehmann-Horn, F., 2007.** Do hyperpolarization-induced proton currents contribute to the pathogenesis of hypokalemic periodic paralysis, a voltage sensor channelopathy?. *The Journal of General Physiology*, 130(1), pp.1-5.
- Jurkat-Rott, K., Weber, M.A., Fauler, M., Guo, X.H., Holzherr, B.D., Paczulla, A., Nordsborg, N., Joechle, W. and Lehmann-Horn, F., 2009.** K^+ -dependent paradoxical membrane depolarization and Na^+ overload, major and reversible contributors to weakness by ion channel leaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(10), pp.4036-4041.

K

- Ke, T., Gomez, C.R., Mateus, H.E., Castano, J.A. and Wang, Q.K., 2009.** Novel CACNA1S mutation causes autosomal dominant hypokalemic periodic paralysis in a South American family. *Journal of Human Genetics*, 54(11), pp.660-664.
- Kil, T.H. and Kim, J.B., 2010.** Severe respiratory phenotype caused by a de novo Arg528Gly mutation in the CACNA1S gene in a patient with hypokalemic periodic paralysis. *European Journal of Paediatric Neurology*, 14(3), pp.278-281.
- Kitasato, H., Sato, S., Marunaka, Y., Murayama, K. and Nishio, K., 1980.** Apparent Affinity Changes Induced by Insulin of Na, K Transport System in Frog Skeletal Muscle. *The Japanese Journal of Physiology*, 30(4), pp.603-616.
- Kjeldsen, K., Gotzsche, C.O., Clausen, T., Notgaard, A. and Thomassen, A., 1984.** Effect of thyroid function on number of Na, K pumps in human skeletal muscle. *The Lancet*, 324(8393), pp.8-10.
- Klier, M., Andes, F.T., Deitmer, J.W. and Becker, H.M., 2014.** Intracellular and extracellular carbonic anhydrases cooperate non-enzymatically to enhance activity of monocarboxylate transporters. *Journal of Biological Chemistry*, 289(5), pp.2765-2775.
- Kolb, M.E., Horne, M.L. and Martz, R., 1982.** Dantrolene in human malignant hyperthermia. *Anesthesiology*, 56(4), pp.254-262.
- Kovacs, L., Rios, E. and Schneider, M.F., 1979.** Calcium transients and intramembrane charge movement in skeletal muscle fibres. *Nature*, 279(5712), pp.391-396.
- Kugler, G., Weiss, R.G., Flucher, B.E. and Grabner, M., 2004.** Structural requirements of the dihydropyridine receptor α 1S II-III loop for skeletal-type excitation-contraction coupling. *Journal of Biological Chemistry*, 279(6), pp.4721-4728.
- Kurata, H.T. and Fedida, D., 2006.** A structural interpretation of voltage-gated potassium channel inactivation. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 92(2), pp.185-208.
- Kurebayashi, N. and Ogawa, Y., 2001.** Depletion of Ca^{2+} in the sarcoplasmic reticulum stimulates Ca^{2+} entry into mouse skeletal muscle fibres. *The Journal of Physiology*, 533(1), pp.185-199.
- Kuzmenkin, A., Muncan, V., Jurkat-Rott, K., Hang, C., Lerche, H., Lehmann-Horn, F. and Mitrovic, N., 2002.** Enhanced inactivation and pH sensitivity of Na^+ channel mutations causing hypokalaemic periodic paralysis type II. *Brain*, 125(4), pp.835-843.

L

- Lacerda**, A.E. and Ruth, P., **1991**. Normalization of Current Kinetics by Interaction Between the (Alpha) 1 and (Beta) Subunits of the Skeletal Muscle Dihydropyridine-Sensitive Ca^{2+} Channel. *Nature*, 352(6335), p.527.
- Lannaccone**, S.T., Li, K.X., Sperelakis, N., and Lathrop, D.A., **1989**. Insulin-induced hyperpolarization in mammalian skeletal muscle. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 256(2), pp.C368-C374.
- Lapie**, P., Goudet, C., Nargeot, J., Fontaine, B. and Lory, P., **1996**. Electrophysiological properties of the hypokalaemic periodic paralysis mutation (R528H) of the skeletal muscle $\alpha 1\text{S}$ subunit as expressed in mouse L cells. *FEBS letters*, 382(3), pp.244-248.
- Latorre**, R. and **Brauchi**, S., **2006**. Large conductance Ca^{2+} -activated K^+ (BK) channel: activation by Ca^{2+} and voltage. *Biological Research*, 39(3), pp.385-401.
- Laver**, D.R., Eager, K.R., Taoube, L. and Lamb, G.D., **2000**. Effects of cytoplasmic and luminal pH on Ca^{2+} release channels from rabbit skeletal muscle. *Biophysical Journal*, 78(4), pp.1835-1851.
- Laver**, D.R., O'Neill, E.R. and Lamb, G.D., **2004**. Luminal Ca^{2+} regulated Mg^{2+} Inhibition of Skeletal RyRs Reconstituted as Isolated Channels or Coupled Clusters. *The Journal of General Physiology*, 124(6), pp.741-758.
- Lee**, C.H. and **Ruben**, P.C., **2008**. Interaction between voltage-gated sodium channels and the neurotoxin, tetrodotoxin. *Channels*, 2(6), pp.407-412.
- Lee**, C.S., Dagnino-Acosta, A., Yarotsky, V., Hanna, A., Lyfenko, A., Knoblauch, M., Georgiou, D.K., Poché, R.A., Swank, M.W., Long, C. and Ismailov, I.I., **2015**. Ca^{2+} permeation and/or binding to Ca V 1.1 fine-tunes skeletal muscle Ca^{2+} signaling to sustain muscle function. *Skeletal Muscle*, 5(1), p.4.
- Lehmann-Horn**, F., Rüdél, R. and Jurkat-Rott, K., **2004**. Nondystrophic myotonias and periodic paralyses. *Myology*, 3, pp.1257-1300.
- Leivseth**, G. and **Reikerås**, O., **1994**. Changes in muscle fiber cross-sectional area and concentrations of Na, K-ATPase in deltoid muscle in patients with impingement syndrome of the shoulder. *Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy*, 19(3), pp.146-149.
- Li**, X., Alvarez, B., Casey, J.R., Reithmeier, R.A. and Fliegel, L., **2002**. Carbonic anhydrase II binds to and enhances activity of the Na^+/H^+ exchanger. *Journal of Biological Chemistry*, 277(39), pp.36085-36091.

- Li, F.F., Li, Q.Q., Tan, Z.X., Zhang, S.Y., Liu, J., Zhao, E.Y., Yu, G.C., Zhou, J., Zhang, L.M. and Liu, S.L., 2012.** A novel mutation in CACNA1S gene associated with hypokalemic periodic paralysis which has a gender difference in the penetrance. *Journal of Molecular Neuroscience*, 46(2), pp.378-383.
- Li, X.T., Li, X.Q., Hu, X.M. and Qiu, X.Y., 2015.** The inhibitory effects of Ca²⁺ channel blocker nifedipine on rat Kv2.1 potassium channels. *PloS One*, 10(4), p.e0124602.
- Light, P.E., Comtois, A.S. and Renaud, J.M., 1994.** The effect of glibenclamide on frog skeletal muscle: evidence for K⁺ ATP channel activation during fatigue. *The Journal of Physiology*, 475(3), pp.495-507.
- Lin, S.H. and Huang, C.L., 2012.** Mechanism of thyrotoxic periodic paralysis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 23(6), pp.985-988.
- Lindinger, M.I., 1995.** Potassium regulation during exercise and recovery in humans: implications for skeletal and cardiac muscle. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 27(4), pp.1011-1022.
- Litwin, S.E., Li, J. and Bridge, J.H., 1998.** Na-Ca exchange and the trigger for sarcoplasmic reticulum Ca release: studies in adult rabbit ventricular myocytes. *Biophysical Journal*, 75(1), pp.359-371.
- Long, S.B., Campbell, E.B. and MacKinnon, R., 2005.** Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science*, 309(5736), pp.897-903.
- Lopatin, A.N., Makhina, E.N. and Nichols, C.G., 1994.** Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature*, 372(6504), p.366.
- Lossin, C. and George, A.L., 2008.** Myotonia congenita. *Advances in Genetics*, 63, pp.25-55.
- Lyfenko, A.D. and Dirksen, R.T., 2008.** Differential dependence of store-operated and excitation-coupled Ca²⁺ entry in skeletal muscle on STIM1 and Orai1. *The Journal of Physiology*, 586(20), pp.4815-4824.

M

- Ma, J., Fill, M., Knudson, C.M., Campbell, K.P. and Coronado, R., 1988.** Ryanodine receptor of skeletal muscle is a gap junction-type channel. *Science*, 242(4875), pp.99-102.
- Mallouk, N., Jacquemond, V. and Allard, B., 2000.** Elevated subsarcolemmal Ca²⁺ in mdx mouse skeletal muscle fibers detected with Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(9), pp.4950-4955.

- Mathes**, C., Bezanilla, F. and Weiss, R.E., **1991**. Sodium current and membrane potential in EDL muscle fibers from normal and dystrophic (mdx) mice. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 261(4), pp.C718-C725.
- Matsuda**, H., Saigusa, A. and Irisawa, H., **1987**. Ohmic conductance through the inwardly rectifying K channel and blocking by internal Mg^{2+} , *Nature*, 325(6100), pp.156-159.
- Matthews**, E., Labrum, R., Sweeney, M.G., Sud, R., Haworth, A., Chinnery, P.F., Meola, G., Schorge, S., Kullmann, D.M., Davis, M.B. and Hanna, M.G., **2009**. Voltage sensor charge loss accounts for most cases of hypokalemic periodic paralysis. *Neurology*, 72(18), pp.1544-1547.
- Matthews**, E. and **Hanna**, M.G., **2010**. Muscle channelopathies: does the predicted channel gating pore offer new treatment insights for hypokalaemic periodic paralysis?. *The Journal of Physiology*, 588(11), pp.1879-1886.
- Matthews**, E., Portaro, S., Ke, Q., Sud, R., Haworth, A., Davis, M.B., Griggs, R.C. and Hanna, M.G., **2011**. Acetazolamide efficacy in hypokalemic periodic paralysis and the predictive role of genotype. *Neurology*, 77(22), pp.1960-1964.
- McArdle**, B., **1962**. Adynamia episodica hereditaria and its treatment. *Brain*, 85(1), pp.121-148.
- McManus**, O.B., Helms, L.M., Pallanck, L., Ganetzky, B., Swanson, R. and Leonard, R.J., **1995**. Functional role of the β subunit of high conductance calcium-activated potassium channels. *Neuron*, 14(3), pp.645-650.
- Meissner**, G., **1986**. Ryanodine activation and inhibition of the Ca^{2+} release channel of sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 261(14), pp.6300-6306.
- Meissner**, G., Rios, E., Tripathy, A. and Pasek, D.A., **1997**. Regulation of skeletal muscle Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) by Ca^{2+} and monovalent cations and anions. *Journal of Biological Chemistry*, 272(3), pp.1628-1638.
- Melzer**, W., Schneider, M.F., Simon, B.J. and Szucs, G., **1986**. Intramembrane charge movement and calcium release in frog skeletal muscle. *The Journal of Physiology*, 373(1), pp.481-511.
- Melzer**, W., Herrmann-Frank, A. and Lüttgau, H.C., **1995**. The role of Ca^{2+} ions in excitation-contraction coupling of skeletal muscle fibres. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 1241(1), pp.59-116.
- Mi**, W., Rybalchenko, V. and Cannon, S.C., **2014**. Disrupted coupling of gating charge displacement to Na^+ current activation for DIIS4 mutations in hypokalemic periodic paralysis. *The Journal of General Physiology*, 144(2), pp.137-145.

- Michelangeli, F. and East, J.M., 2011.** A diversity of SERCA Ca²⁺ pump inhibitors. *Biochemical Society Transactions*, 39(3), pp.789-797.
- Miledi, R., Parker, I. and Zhu, P.H., 1983.** Calcium transients studied under voltage-clamp control in frog twitch muscle fibres. *The Journal of Physiology*, 340(1), pp.649-680.
- Miller, T.M., Da Silva, M.D., Miller, H.A., Kwiecinski, H., Mendell, J.R., Tawil, R., McManis, P., Griggs, R.C., Angelini, C., Servidei, S. and Petajan, J., 2004.** Correlating phenotype and genotype in the periodic paralyses. *Neurology*, 63(9), pp.1647-1655.
- Montell, C., 2005.** The TRP superfamily of cation channels. *Science Signaling*, 272, pp.re3
- Moreau, A., Gosselin-Badaroudine, P., Delemotte, L., Klein, M.L. and Chahine, M., 2015.** Gating pore currents are defects in common with two Nav1.5 mutations in patients with mixed arrhythmias and dilated cardiomyopathy. *The Journal of General Physiology*, 145(2), pp.93-106.
- Morrill, J.A., Brown, R.H. and Cannon, S.C., 1998.** Gating of the L-type Ca channel in human skeletal myotubes: an activation defect caused by the hypokalemic periodic paralysis mutation R528H. *Journal of Neuroscience*, 18(24), pp.10320-10334.
- Morrill, J.A. and Cannon, S.C., 1999.** Effects of mutations causing hypokalaemic periodic paralysis on the skeletal muscle L type Ca²⁺ channel expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *The Journal of Physiology*, 520(2), pp.321-336.

N

- Nagasaki, K. and Fleischer, S., 1988.** Ryanodine sensitivity of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum. *Cell Calcium*, 9(1), pp.1-7.
- Nakai, J., Dirksen, R.T., Nguyen, H.T., Pessah, I.N., Beam, K.G. and Allen, P.D., 1996.** Enhanced dihydropyridine receptor channel activity in the presence of ryanodine receptor. *Nature*, 380(6569), pp.72-75.
- Nakai, J., Tanabe, T., Konno, T., Adams, B. and Beam, K.G., 1998.** Localization in the II-III loop of the dihydropyridine receptor of a sequence critical for excitation-contraction coupling. *Journal of Biological Chemistry*, 273(39), pp.24983-24986.
- Natali, A., Galvan, A.Q., Santoro, D., Pecori, N., Taddei, S., Salvetti, A. and Ferrannini, E., 1993.** Relationship between insulin release, antinatriuresis and hypokalaemia after glucose ingestion in normal and hypertensive man. *Clinical Science*, 85(3), pp.327-335.

Nicoll, D.A., Longoni, S. and Philipson, K.D., 1990. Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Science*, 250(4980), pp.562-566.

O / P

Obermair, G.J., Kugler, G., Baumgartner, S., Tuluc, P., Grabner, M. and Flucher, B.E., 2005. The Ca²⁺ channel $\alpha 2\delta$ -1 subunit determines Ca²⁺ current kinetics in skeletal muscle but not targeting of $\alpha 1S$ or excitation-contraction coupling. *Journal of Biological Chemistry*, 280(3), pp.2229-2237.

Otsu, K., Fujii, J., Periasamy, M., Difilippantonio, M., Uppender, M., Ward, D.C. and MacLennan, D.H., 1993. Chromosome mapping of five human cardiac and skeletal muscle sarcoplasmic reticulum protein genes. *Genomics*, 17(2), pp.507-509.

Palade, P. and Barchi, R.L., 1977. Characteristics of the chloride conductance in muscle fibers of the rat diaphragm. *The Journal of General Physiology*, 69(3), pp.325-342.

Pande, J., Szewczyk, M.M. and Grover, A.K., 2011. Allosteric inhibitors of plasma membrane Ca²⁺ pumps: Invention and applications of caloxins. *World Journal of Biological Chemistry*, 2(3), p.39.

Peachey, L.D. and Franzini-Armstrong, C., 1983. Structure and function of membrane systems of skeletal muscle cells. *Comprehensive Physiology*.

Pedersen, T.H., Riisager, A., de Paoli, F.V., Chen, T.Y. and Nielsen, O.B., 2016. Role of physiological ClC-1 Cl⁻ ion channel regulation for the excitability and function of working skeletal muscle. *The Journal of General Physiology*, 147(4), pp.291-308.

Phakdeekitcharoen, B., Phudhichareonrat, S., Pookarnjanamorakot, C., Kijkunasathian, C., Tubtong, N., Kittikanokrat, W. and Radinahamed, P., 2007. Thyroid Hormone Increases mRNA and Protein Expression of Na⁺/K⁺-ATPase $\alpha 2$ and $\beta 1$ Subunits in Human Skeletal Muscles. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(1), pp.353-358.

Pilegaard, H., Terzis, G., Halestrap, A. and Juel, C., 1999. Distribution of the lactate/H⁺ transporter isoforms MCT1 and MCT4 in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 276(5), pp.E843-E848.

Pizarro, G., Fitts, R., Uribe, I. and Rios, E., 1989. The voltage sensor of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. Ion dependence and selectivity. *The Journal of General Physiology*, 94(3), pp.405-428.

Plassart, E., Elbaz, A., Santos, J.V., Reboul, J., Lapie, P., Chauveau, D., Jurkat-Rott, K., Guimaraes, J., Saudubray, J.M., Weissenbach, J. and Lehmann-Horn, F., 1994. Genetic heterogeneity in hypokalemic periodic paralysis (hypoPP). *Human Genetics*, 94(5), pp.551-556.

- Pongs, O., Leicher, T., Berger, M., Roeper, J., Bähring, R., Wray, D., Giese, K.P., Silva, A.J. and Storm, J.F., 1999.** Functional and Molecular Aspects of Voltage-Gated K⁺ Channel β Subunits. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 868(1), pp.344-355.
- Polster, A., Perni, S., Bichraoui, H., and Beam, K. G., 2015.** Stac adaptor proteins regulate trafficking and function of muscle and neuronal L-type Ca²⁺ channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(2), pp. 602-606.
- Polster, A., Nelson, B. R., Olson, E. N., and Beam, K. G., 2016.** Stac3 has a direct role in skeletal muscle-type excitation–contraction coupling that is disrupted by a myopathy-causing mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(39), pp. 10986-91.
- Pragnell, M., De Waard, M., Mori, Y., Tanabe, T., Snutch, T.P. and Campbell, K.P., 1994.** Calcium channel β -subunit binds to a conserved motif in the I–II cytoplasmic linker of the α 1-subunit. *Nature*, 368(6466), pp.67-70.
- Protasi, F., Paolini, C., Nakai, J., Beam, K.G., Franzini-Armstrong, C. and Allen, P.D., 2002.** Multiple regions of RyR1 mediate functional and structural interactions with α 1S-dihydropyridine receptors in skeletal muscle. *Biophysical Journal*, 83(6), pp.3230-3244.
- Ptáček, L.J., Tawil, R., Griggs, R.C., Engel, A.G., Layzer, R.B., Kwieceński, H., McManis, P.G., Santiago, L., Moore, M., Fouad, G. and Bradley, P., 1994.** Dihydropyridine receptor mutations cause hypokalemic periodic paralysis. *Cell*, 77(6), pp.863-868.

R

- Rebbeck, R.T., Karunasekara, Y., Gallant, E.M., Board, P.G., Beard, N.A., Casarotto, M.G. and Dulhunty, A.F., 2011.** The β 1a subunit of the skeletal DHPR binds to skeletal RyR1 and activates the channel via its 35-residue C-terminal tail. *Biophysical journal*, 100(4), pp.922-930.
- Renigunta, V., Schlichthörl, G. and Daut, J., 2015.** Much more than a leak: structure and function of K2P-channels. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 467(5), pp.867-894.
- Resnick, J.S., Engel, W.K., Griggs, R.C. and Stam, A.C., 1968.** Acetazolamide prophylaxis in hypokalemic periodic paralysis. *New England Journal of Medicine*, 278(11), pp.582-586.
- Rios, E. and Brum, G., 1987.** Involvement of dihydropyridine receptors in excitation–contraction coupling in skeletal muscle. *Nature*, 325(6106), pp.717-720.
- Rios, E. and Pizarro, G., 1991.** Voltage sensor of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Physiological Reviews*, 71(3), pp.849-908.

- Roberts, R.A., Ghasvand, F. and Parker, D., 2004.** Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 287(3), pp.R502-R516.
- Robin, G. and Allard, B., 2012.** Dihydropyridine receptors actively control gating of ryanodine receptors in resting mouse skeletal muscle fibres. *The Journal of Physiology*, 590(23), pp.6027-6036.
- Robin, G. and Allard, B., 2013.** Major contribution of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} depletion during long-lasting activation of skeletal muscle. *The Journal of General Physiology*, 141(5), pp.557-565.
- Roos, J., DiGregorio, P.J., Yeromin, A.V., Ohlsen, K., Lioudyno, M., Zhang, S., Safrina, O., Kozak, J.A., Wagner, S.L., Cahalan, M.D. and Veliçelebi, G., 2005.** STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca^{2+} channel function. *Journal of Cell Biology*, 169(3), pp.435-445.
- Rousseau, E., Ladine, J., Liu, Q.Y. and Meissner, G., 1988.** Activation of the Ca^{2+} release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by caffeine and related compounds. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 267(1), pp.75-86.
- Rousseau, E. and Pinkos, J., 1990.** pH modulates conducting and gating behaviour of single calcium release channels. *Pflügers Archiv*, 415(5), pp.645-647.
- Rüdel, R., Lehmann-Horn, F., Ricker, K. and Küther, G., 1984.** Hypokalemic periodic paralysis: in vitro investigation of muscle fiber membrane parameters. *Muscle & Nerve*, 7(2), pp.110-120.
- Ruff, R.L., 1999.** Insulin acts in hypokalemic periodic paralysis by reducing inward rectifier K^+ current. *Neurology*, 53(7), pp.1556-1556.
- Russell, J.M., 2000.** Sodium-potassium-chloride cotransport. *Physiological Reviews*, 80(1), pp.211-276.
- Rychkov, G.Y., Pusch, M., Astill, D.S., Roberts, M.L., Jentsch, T.J. and Bretag, A.H., 1996.** Concentration and pH dependence of skeletal muscle chloride channel ClC-1. *The Journal of Physiology*, 497(2), pp.423-435.
- Rychkov, G.Y., Astill, D., Bennetts, B., Hughes, B.P., Bretag, A.H. and Roberts, M.L., 1997.** pH-Dependent Interactions of Cd^{2+} and a Carboxylate Blocker with the Rat ClC-1 Chloride Channel and Its R304E Mutant in the Sf9 Insect Cell Line. *The Journal of Physiology*, 501(2), pp.355-362.

S

- Samsó, M., 2017.** A guide to the 3D structure of the ryanodine receptor type 1 by cryoEM. *Protein Science*, 26(1), pp.52-68.

- Sansone**, V.A., Burge, J., McDermott, M.P., Smith, P.C., Herr, B., Tawil, R., Pandya, S., Kissel, J., Ciafaloni, E., Shieh, P. and Ralph, J.W., **2016**. Randomized, placebo-controlled trials of dichlorphenamide in periodic paralysis. *Neurology*, 86(15), pp.1408-1416.
- Sather**, W.A. and **McCleskey**, E.W., **2003**. Permeation and selectivity in calcium channels. *Annual Review of Physiology*, 65(1), pp.133-159.
- Schneider**, M.F. and **Chandler**, W.K., **1973**. Voltage dependent charge movement in skeletal muscle: a possible step in excitation–contraction coupling. *Nature*, 242(5395), pp.244-246.
- Schneider**, M.F., **1994**. Control of calcium release in functioning skeletal muscle fibers. *Annual Review of Physiology*, 56(1), pp.463-484.
- Schredelseker**, J., Di Biase, V., Obermair, G.J., Felder, E.T., Flucher, B.E., Franzini-Armstrong, C. and Grabner, M., **2005**. The β 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.17219-17224.
- Serysheva**, I.I., **2004**. Structural insights into excitation—contraction coupling by electron cryomicroscopy. *Biochemistry (Moscow)*, 69(11), pp.1226-1232.
- Sipos**, I., Jurkat-Rott, K., Harasztosi, C.S., Fontaine, B., Kovacs, L., Melzer, W. and Lehmann-Horn, F., **1995**. Skeletal muscle DHP receptor mutations alter calcium currents in human hypokalaemic periodic paralysis myotubes. *The Journal of Physiology*, 483(2), pp.299-306.
- Skou**, J.C., **1998**. The identification of the sodium pump. *Bioscience Reports*, 18(4), pp.155-169.
- Smith**, J.S., Coronado, R. and Meissner, G., **1986**. Single-channel calcium and barium currents of large and small conductance from sarcoplasmic reticulum. *Biophysical Journal*, 50(5), pp.921-928.
- Smith**, J.S., Coronado, R. and Meissner, G., **1988**. Techniques for observing calcium channels from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum in planar lipid bilayers. *Methods in Enzymology*, 157, pp.480-489.
- Sokolov**, S., Scheuer, T. and Catterall, W.A., **2005**. Ion permeation through a voltage-sensitive gating pore in brain sodium channels having voltage sensor mutations. *Neuron*, 47(2), pp.183-189.
- Sokolov**, S., Scheuer, T. and Catterall, W.A., **2007**. Gating pore current in an inherited ion channelopathy. *Nature*, 446(7131), p.76.
- Sokolov**, S., Scheuer, T. and Catterall, W.A., **2010**. Ion permeation and block of the gating pore in the voltage sensor of Na V 1.4 channels with hypokalemic periodic paralysis mutations. *The Journal of General Physiology*, 136(2), pp.225-236.

- Sokolow**, S., Manto, M., Gailly, P., Molgó, J., Vandebrouck, C., Vanderwinden, J.M., Herchuelz, A. and Schurmans, S., **2004**. Impaired neuromuscular transmission and skeletal muscle fiber necrosis in mice lacking Na/Ca exchanger 3. *Journal of Clinical Investigation*, 113(2), p.265.
- Somlyo**, A.V., **1979**. Bridging structures spanning the junctioning gap at the triad of skeletal muscle. *The Journal of Cell Biology*, 80(3), pp.743-750.
- Starace**, D.M., Stefani, E. and Bezanilla, F., **1997**. Voltage-Dependent Proton Transport by the Voltage Sensor of the ShakerK⁺ Channel. *Neuron*, 19(6), pp.1319-1327.
- Starace**, D.M. and **Bezanilla**, F., **2001**. Histidine scanning mutagenesis of basic residues of the S4 segment of the Shaker K⁺ channel. *The Journal of General Physiology*, 117(5), pp.469-490.
- Starace**, D.M. and **Bezanilla**, F., **2004**. A proton pore in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field. *Nature*, 427(6974), p.548.
- Street**, D., Bangsbo, J. and Juel, C., **2001**. Interstitial pH in human skeletal muscle during and after dynamic graded exercise. *The Journal of Physiology*, 537(3), pp.993-998.
- Strube**, C., Beurg, M., Powers, P.A., Gregg, R.G. and Coronado, R., **1996**. Reduced Ca²⁺ current, charge movement, and absence of Ca²⁺ transients in skeletal muscle deficient in dihydropyridine receptor beta 1 subunit. *Biophysical journal*, 71(5), pp.2531-2543.
- Struthers**, A.D., Reid, J.L., Whitesmith, R. and Rodger, J.C., **1983**. Effect of intravenous adrenaline on electrocardiogram, blood pressure, and serum potassium. *Heart*, 49(1), pp.90-93.
- Struyk**, A.F., Scoggan, K.A., Bulman, D.E. and Cannon, S.C., **2000**. The human skeletal muscle Na channel mutation R669H associated with hypokalemic periodic paralysis enhances slow inactivation. *Journal of Neuroscience*, 20(23), pp.8610-8617.
- Struyk**, A.F. and **Cannon**, S.C., **2007**. A Na⁺ channel mutation linked to hypokalemic periodic paralysis exposes a proton-selective gating pore. *The Journal of General Physiology*, 130(1), pp.11-20.
- Struyk**, A.F. and **Cannon**, S.C., **2008**. Paradoxical depolarization of Ba²⁺-treated muscle exposed to low extracellular K⁺: Insights into resting potential abnormalities in hypokalemic paralysis. *Muscle & Nerve*, 37(3), pp.326-337.
- Struyk**, A.F., Markin, V.S., Francis, D. and Cannon, S.C., **2008**. Gating pore currents in DIIS4 mutations of NaV1.4 associated with periodic paralysis: saturation of ion flux and implications for disease pathogenesis. *The Journal of General Physiology*, 132(4), pp.447-464.
- Supuran**, C.T., Scozzafava, A. and Casini, A., **2003**. Carbonic anhydrase inhibitors. *Medicinal Research Reviews*, 23(2), pp.146-189.

Szentesi, P., Collet, C., Sárközi, S., Szegedi, C., Jona, I., Jacquemond, V., Kovács, L. and Csernoch, L., **2001**. Effects of dantrolene on steps of excitation-contraction coupling in mammalian skeletal muscle fibers. *The Journal of General Physiology*, 118(4), pp.355-376.

Sztretye, M., Yi, J., Figueroa, L., Zhou, J., Royer, L., Allen, P., Brum, G. and Ríos, E., **2011**. Measurement of RyR permeability reveals a role of calsequestrin in termination of SR Ca²⁺ release in skeletal muscle. *The Journal of General Physiology*, 138(2), pp.231-247.

T

Takeshima, H., Nishimura, S., Matsumoto, T., Ishida, H., Kangawa, K., Minamino, N., Matsuo, H., Ueda, M., Hanaoka, M., Hirose, T. and Numa, S., **1989**. Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature*, 339(6224), pp.439-445.

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(6128), pp.313-318.

Tanabe, T., Mikami, A., Numa, S. and Beam, K.G., **1990**. Cardiac-type excitation-contraction coupling in dysgenic skeletal muscle injected with cardiac dihydropyridine receptor cDNA. *Nature*, 344(6265), pp.451-453.

Tao, X., Lee, A., Limapichat, W., Dougherty, D.A. and MacKinnon, R., **2010**. A gating charge transfer center in voltage sensors. *Science*, 328(5974), pp.67-73.

Tawil, R., McDermott, M.P., Brown, R., Shapiro, B.C., Ptacek, L.J., McManis, P.G., Dalakas, M.C., Spector, S.A., Mendell, J.R., Hahn, A.F. and Griggs, R.C., **2000**. Randomized trials of dichlorphenamide in the periodic paralyses. *Annals of Neurology*, 47(1), pp.46-53.

Tombola, F., Pathak, M.M. and Isacoff, E.Y., **2005**. Voltage-sensing arginines in a potassium channel permeate and occlude cation-selective pores. *Neuron*, 45(3), pp.379-388.

Tricarico, D., Mallamaci, R., Barbieri, M. and Camerino, D.C., **1997**. Modulation of ATP-sensitive K⁺ channel by insulin in rat skeletal muscle fibers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 232(2), pp.536-539.

Tricarico, D., Pierno, S., Mallamaci, R., Brigiani, G.S., Capriulo, R., Santoro, G. and Camerino, D.C., **1998**. The biophysical and pharmacological characteristics of skeletal muscle ATP-sensitive K⁺ channels are modified in K⁺-depleted rat, an animal model of hypokalemic periodic paralysis. *Molecular Pharmacology*, 54(1), pp.197-206.

Tricarico, D., Servidei, S., Tonali, P., Jurkat-Rott, K. and Camerino, D.C., 1999. Impairment of skeletal muscle adenosine triphosphate-sensitive K⁺ channels in patients with hypokalemic periodic paralysis. *Journal of Clinical Investigation*, 103(5), p.675.

Tricarico, D., Barbieri, M. and Conte Camerino, D., 2000. Acetazolamide opens the muscular K-Ca²⁺ channel: a novel mechanism of action that may explain the therapeutic effect of the drug in hypokalemic periodic paralysis. *Annals of Neurology*, 48(3), pp.304-312.

Tricarico, D., Mele, A. and Camerino, D.C., 2006. Carbonic anhydrase inhibitors ameliorate the symptoms of hypokalaemic periodic paralysis in rats by opening the muscular Ca²⁺-activated-K⁺ channels. *Neuromuscular Disorders*, 16(1), pp.39-45.

Tricarico, D., Mele, A., Liss, B., Ashcroft, F.M., Lundquist, A.L., Desai, R.R., George, A.L. and Camerino, D.C., 2008. Reduced expression of Kir6. 2/SUR2A subunits explains K-ATP deficiency in K⁺-depleted rats. *Neuromuscular Disorders*, 18(1), pp.74-80.

Tricarico, D., Mele, A., Camerino, G.M., Bottinelli, R., Brocca, L., Frigeri, A., Svelto, M., George Jr, A.L. and Camerino, D.C., 2010. The K-ATP channel is a molecular sensor of atrophy in skeletal muscle. *The Journal of Physiology*, 588(5), pp.773-784.

Tricarico, D. and Camerino, D.C., 2011. Recent advances in the pathogenesis and drug action in periodic paralyses and related channelopathies. *Frontiers in Pharmacology*, 2, 8

V

Vandebrouck, C., Martin, D., Colson-Van Schoor, M., Debaix, H. and Gailly, P., 2002. Involvement of TRPC in the abnormal calcium influx observed in dystrophic (mdx) mouse skeletal muscle fibers. *The Journal of Cell Biology*, 158(6), pp.1089-1096.

Van Petegem, F., Clark, K.A., Chatelain, F.C. and Minor Jr, D.L., 2004. Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel β -subunit and an α -subunit domain. *Nature*, 429(6992), p.671.

Varadi, G. and Lory, P., 1991. Acceleration of Activation and Inactivation by the β -Subunit of the Skeletal Muscle Calcium Channel. *Nature*, 352(6331), p.159.

Varadi, G., Strobeck, M., Koch, S., Caglioti, L., Zucchi, C. and Palyi, G., 1999. Molecular elements of ion permeation and selectivity within calcium channels. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 34(3), pp.181-214.

Vicart, S., Sternberg, D., Arzel-Hézode, M., Franques, J., Bendahhou, S., Lory, P., Hainque, B., Fournier, E., Nicole, S., Fontaine, B., 2002. Hypokalemic Periodic Paralysis. *Gene Review*® NCBI Bookshelf.[internet]. ISSN: 2372-0697.

W / Y / Z

- Wasserstrom, J.A. and Vites, A.M., 1996.** The role of Na^+ - Ca^{2+} exchange in activation of excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *The Journal of Physiology*, 493(2), pp.529-542.
- Wagenknecht, T. and Samsó, M., 2002.** Three-dimensional reconstruction of ryanodine receptors. *Frontiers in Bioscience*, 7(1464-74).
- Westerblad, H. and Allen, D.G., 1992.** Changes of intracellular pH due to repetitive stimulation of single fibres from mouse skeletal muscle. *The Journal of Physiology*, 449(1), pp.49-71.
- Wilkens, C.M., Kasielke, N., Flucher, B.E., Beam, K.G. and Grabner, M., 2001.** Excitation-contraction coupling is unaffected by drastic alteration of the sequence surrounding residues L720-L764 of the α 1S II-III loop. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(10), pp.5892-5897.
- Wolf, M., Eberhart, A., Glossmann, H., Striessnig, J. and Grigorieff, N., 2003.** Visualization of the domain structure of an L-type Ca^{2+} channel using electron cryo-microscopy. *Journal of molecular Biology*, 332(1), pp.171-182.
- Wu, F., Mi, W., Burns, D.K., Fu, Y., Gray, H.F., Struyk, A.F. and Cannon, S.C., 2011.** A sodium channel knockin mutant (NaV1.4-R669H) mouse model of hypokalemic periodic paralysis. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(10), p.408
- Wu, F., Mi, W., Hernández-Ochoa, E.O., Burns, D.K., Fu, Y., Gray, H.F., Struyk, A.F., Schneider, M.F. and Cannon, S.C., 2012.** A calcium channel mutant mouse model of hypokalemic periodic paralysis. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(12), p.4580.
- Wu, F., Mi, W. and Cannon, S.C., 2013a.** Beneficial effects of bumetanide in a CaV1.1-R528H mouse model of hypokalaemic periodic paralysis. *Brain*, 136(12), pp.3766-3774.
- Wu, F., Mi, W. and Cannon, S.C., 2013b.** Bumetanide prevents transient decreases in muscle force in murine hypokalemic periodic paralysis. *Neurology*, 80(12), pp.1110-1116.
- 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(6267), p.aad2395.
- Wu, J., Yan, Z., Li, Z., Qian, X., Lu, S., Dong, M., Zhou, Q. and Yan, N., 2016.** Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 at 3.6 Å resolution. *Nature*, 537(7619), pp.191-196.
- Yan, Z., Bai, X., Yan, C., Wu, J., Li, Z., Xie, T., Peng, W., Yin, C., Li, X., Scheres, S.H. and Shi, Y., 2015.** Structure of the rabbit ryanodine receptor RyR1 at near-atomic resolution. *Nature*, 517(7532), p.50.

- Yang, J., Ellinor, P.T., Sather, W.A., Zhang, J.F. and Tsien, R.W., 1993.** Molecular determinants of Ca^{2+} selectivity and ion permeation in L-type Ca^{2+} channels. *Nature*, 366(6451), p.158.
- Yang, N. and Horn, R., 1995.** Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channels. *Neuron*, 15(1), pp.213-218.
- Yang, N., George, A.L. and Horn, R., 1996.** Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 16(1), pp.113-122.
- Yang, H., Zhang, H. and Xing, X., 2015.** V876E mutation in CACNA1S gene associated with severe hypokalemic periodic paralysis in a Chinese woman. *Journal of the Formosan Medical Association*, 114(4), pp.377-378.
- Zachar, J., Zacharova, D. and Adrian, R.H., 1972.** Observations on “detubulated” muscle fibres. *Nature*, 239(92), pp.153-155.
- Zalk, R., Clarke, O.B., Des Georges, A., Grassucci, R.A., Reiken, S., Mancina, F., Hendrickson, W.A., Frank, J. and Marks, A.R., 2015.** Structure of a mammalian ryanodine receptor. *Nature*, 517(7532), p.44
- 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. *Pharmacological Reviews*, 67(4), pp.821-870.
- Zhang, Z., Lewis, D., Strock, C., Inesi, G., Nakasako, M., Nomura, H. and Toyoshima, C., 2000.** Detailed characterization of the cooperative mechanism of Ca^{2+} binding and catalytic activation in the Ca^{2+} transport (SERCA) ATPase. *Biochemistry*, 39(30), pp.8758-8767.
- Zhou, Y., Srinivasan, P., Razavi, S., Seymour, S., Meraner, P., Gudlur, A., Stathopoulos, P.B., Ikura, M., Rao, A. and Hogan, P.G., 2013.** Initial activation of STIM1, the regulator of store-operated calcium entry. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(8), pp.973-981.
- Ziman, A.P., Ward, C.W., Rodney, G.G., Lederer, W.J. and Bloch, R.J., 2010.** Quantitative measurement of Ca^{2+} in the sarcoplasmic reticulum lumen of mammalian skeletal muscle. *Biophysical Journal*, 99(8), pp.2705-2714.
- Zorzato, F., Fujii, J., Otsu, K., Phillips, M., Green, N.M., Lai, F.A., Meissner, G. and MacLennan, D.H., 1990.** Molecular cloning of cDNA encoding human and rabbit forms of the Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 265(4), pp.2244-2256.
- Zorzato, F., Scutari, E., Tegazzin, V., Clementi, E. and Treves, S., 1993.** Chlorocresol: an activator of ryanodine receptor-mediated Ca^{2+} release. *Molecular Pharmacology*, 44(6), pp.1192-1201.

