

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DE MÉDECINE

Identification de nouveaux partenaires du canal potassique cardiaque KCNQ1

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale CHIMIE BIOLOGIE

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Physiologie

Présentée et soutenue publiquement par

NICOLAS Céline

Le 21 décembre 2007, devant le jury ci-dessous

Président : Mme GAUTHIER Chantal, Professeur, Université de Nantes

Rapporteurs : Mr. BOURINET Emmanuel, Directeur de recherche CNRS, Montpellier
Mr. HATEM Stéphane, Directeur de recherche Inserm, Paris

Examineur : Mr. ABRIEL Hugues, Professeur Assistant, Université de Lausanne

Directeur de thèse Mme BARO Isabelle, Directeur de Recherche CNRS, Nantes

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS.....	16
INTRODUCTION.....	19
<u>1Propriétés et régulations du courant repolarisant IKs.....</u>	<u>20</u>
1.1Le courant IKs au sein du potentiel d'action.....	20
1.1.1Les potentiels d'action cardiaques.....	20
1.1.2Les variations du courant IKs au sein du myocarde ventriculaire.....	21
1.2Caractéristiques électrophysiologiques du courant IKs.....	22
1.2.1Propriétés et cinétiques du courant.....	23
1.2.2Voltage-dépendance	26
1.3Régulations intracellulaires du courant IKs.....	28
1.3.1Voies de signalisation liées aux récepteurs membranaires	28
1.3.2Régulations par les hormones thyroïdiennes et stéroïdes.....	35
<u>2Le canal KCNQ1 fonctionne au sein d'un complexe canalaire.....</u>	<u>41</u>
2.1KCNQ1 et KCNE1 à l'origine du courant IKs.....	41
2.2Propriétés moléculaires du complexe KCNQ1-KCNE1.....	43
2.2.1Structure des protéines.....	43
2.2.2Association des deux protéines.....	44
2.2.3Zones spécifiques du complexe.....	47
2.3Les éléments interagissant avec le complexe KCNQ1-KCNE1.....	50
2.3.1Protéines régulant le trafic et le maintien du canal à la membrane.....	51
2.3.2Protéines et phospholipides modifiant les propriétés du canal à la membrane.....	53
2.3.3Protéines intervenant dans les voies de signalisation régulant le courant	60
2.3.4Protéines intervenant dans la dégradation du canal.....	64
<u>3Implication des partenaires de KCNQ1 dans les pathologies héréditaires cardiaques..</u>	<u>69</u>
3.1Perte de fonction du canal : le syndrome du QT long congénital.....	70
3.1.1Description et traitement de la pathologie.....	70
3.1.2Relation génotype-phénotype dans le cas des LQTS liés au complexe de KCNQ1.....	77
3.1.3Mutations sur les protéines du complexe de KCNQ1 aboutissant au syndrome du QT long.....	82

3.2Gain de fonction du canal.....	89
3.2.1Le syndrome du QT court.....	89
3.2.2La fibrillation auriculaire.....	91
MATERIEL ET METHODES.....	98
<u>4Les cellules COS-7 comme modèle d'expression hétérologue.....</u>	<u>99</u>
4.1Culture des cellules.....	99
4.2Transfection transitoire des cellules.....	99
4.2.1Agent transfectant et protocole de transfection.....	99
4.2.2Mélange plasmidique.....	100
4.3Analyse du courant potassique en patch-clamp.....	100
4.3.1Configurations et conditions.....	100
4.3.2Matériel et milieux utilisés.....	102
4.3.3Protocoles de stimulation utilisés et analyses.....	102
4.4Analyse biochimique des protéines.....	104
4.4.1Western-blot.....	104
4.4.2Co-immunoprécipitation.....	105
<u>5Les cardiomyocytes de cobaye comme système natif.....</u>	<u>105</u>
5.1Transfection des cardiomyocytes.....	105
5.1.1Construction des plasmides pour la transfection in vivo.....	106
5.1.2Préparation du mélange vecteur-ADN.....	106
5.1.3Technique d'injection in vivo.....	106
5.2Isolement des cardiomyocytes.....	107
5.3Analyse électrophysiologique des courants potassiques.....	109
5.3.1Choix des conditions de patch-clamp.....	109
5.3.2Milieux utilisés.....	110
5.3.3Protocoles utilisés.....	110
<u>6Statistiques.....</u>	<u>111</u>
RESULTATS ET DISCUSSION.....	114
<u>7La réponse du courant IKs à la phosphorylation PKA-dépendante de KCNQ1 dépend de l'interaction du canal avec les microtubules.....</u>	<u>115</u>

7.1 Introduction.....	115
7.2 Résultats.....	116
7.3 Discussion et perspectives.....	118
8 La dégradation de KCNQ1 est régulée par les ubiquitine-ligases de la famille Nedd4/Nedd4-like.....	124
8.1 Introduction.....	124
8.2 Résultats.....	126
8.3 Discussion et perspectives.....	130
CONCLUSION GENERALE.....	134
ANNEXES.....	137
ANNEXE 1 : L'ACTIVITÉ ÉLECTRIQUE CARDIAQUE ET L'ECG.....	138
9 Naissance et conduction du PA dans le cœur.....	138
10 Caractérisation de l'activité électrique cardiaque sur l'ECG	139
ANNEXE 2 : LES COURANTS IONIQUES À L'ORIGINE DU POTENTIEL D'ACTION.....	142
11 Le PA des cellules nodales.....	142
11.1 La dépolarisation diastolique.....	143
11.2 La dépolarisation systolique.....	146
11.3 La phase de repolarisation.....	147
12 Le PA des cardiomyocytes contractiles : variations au sein du myocarde.....	148
12.1 La phase de dépolarisation.....	153
12.2 La repolarisation transitoire.....	153
12.3 Le plateau du PA.....	154
12.4 La phase de repolarisation.....	155
12.5 Le maintien du potentiel entre deux PA.....	157
13 Le PA des cellules de conduction ventriculaires : différences avec le PA des autres cellules.....	158

<u>13.1Caractéristiques du PA.....</u>	<u>158</u>
<u>13.2Bases moléculaires des différences avec le PA des autres cellules.....</u>	<u>158</u>
ANNEXE 3 : RÉGULATION DE LA FONCTION CARDIAQUE PAR LE SYSTÈME NERVEUX AUTONOME.....	160
<u>14Régulation par le système nerveux orthosympathique.....</u>	<u>160</u>
<u>14.1Les récepteurs β.....</u>	<u>160</u>
<u>14.2Les récepteurs α.....</u>	<u>164</u>
<u>15Régulation par le système nerveux parasympathique.....</u>	<u>164</u>
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	166
ARTICLE ET REVUE EN PREPARATION.....	168
<u>16Description moléculaire des cardiopathies liées à KCNE1/KCNO1</u>	<u>169</u>
<u>17Le PIP2 est impliqué dans l'osmorégulation du complexe KCNO1-KCNE1.....</u>	<u>170</u>

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : DIAGRAMME SCHÉMATIQUE DES PA DANS LES DIFFÉRENTES RÉGIONS DU CŒUR. SAN : NŒUD SINUSAL, AV NODE : NŒUD AURICULO-VENTRICULAIRE, RA : OREILLETTE DROITE, LA : OREILLETTE GAUCHE, RV : VENTRICULE DROIT, LV : VENTRICULE GAUCHE20

FIGURE 2 : COURANTS INTERVENANT DANS LE PA DES CARDIOMYOCYTES VENTRICULAIRES. A GAUCHE SONT REPRÉSENTÉS LES COURANTS INTERVENANT DANS LE PA VENTRICULAIRE HUMAIN. LE COURANT IKS INTERVENANT DANS LA PHASE DE REPOLARISATION TARDIVE DU PA EST ENCADRÉ EN ROUGE . A DROITE SONT REPRÉSENTÉS LES PA ENREGISTRÉS SUR DES COUPES DE PAROI VENTRICULAIRE GAUCHE DE CHIEN, DE LA COUCHE ÉPIMYOCARDIQUE (EPI, EN HAUT) À LA COUCHE ENDOMYOCARDIQUE (ENDO, EN BAS). SOUS LA COUCHE ENDOMYOCARDIQUE, AU SEIN DU MIDMYOCARDE, SE TROUVENT LES CELLULES M22

FIGURE 3 : COURANTS POTASSIQUES ENREGISTRÉS DANS UN CARDIOMYOCYTE DE COBAYE. EN HAUT, PROTOCOLE D'ENREGISTREMENT DES COURANTS. AU MILIEU, COURANT MESURÉ AVANT (C) ET APRÈS (E) APPLICATION DE E-4031 (3 MM). EN BAS, DIFFÉRENCE OBTENUE PAR SOUSTRACTION DES 2 COURANTS, REPRÉSENTANT LE COURANT SENSIBLE À CET INHIBITEUR (IKR)24

FIGURE 4 : CINÉTIQUES DU COURANT IKS. CINÉTIQUES D'ACTIVATION (EN HAUT) ET DE DÉSACTIVATION (EN BAS) DU COURANT IKS DANS UN MYOCYTE VENTRICULAIRE D'HOMME, DE CHIEN, DE LAPIN ET DE COBAYE. LE PROTOCOLE DE STIMULATION EST INDIQUÉ EN HAUT À GAUCHE. LES CONSTANTES DE TEMPS, CALCULÉES SELON UNE OU DEUX FONCTIONS EXPONENTIELLES À PARTIR DES CINÉTIQUES D'ACTIVATION ET DE DÉSACTIVATION, SONT INDIQUÉES EN INDICE25

FIGURE 5 : LE COURANT IKS DANS LES CARDIOMYOCYTES. COURANTS IK ET IKS (EN PRÉSENCE D'E-4031) ENREGISTRÉS À PARTIR DE MYOCYTES VENTRICULAIRES HUMAIN (EN HAUT) ET DE COBAYE (EN BAS). LE PROTOCOLE D'ENREGISTREMENT EST INDIQUÉ À GAUCHE.26

**FIGURE 6 : VOLTAGE-DÉPENDANCE DES COURANTS POTASSIQUES IK, IKS ET IKR DANS LES CARDIOMYOCYTES. LES COURANTS IK (CONTROL), IKS (E-4031) ET IKR (E-4031 SENSITIVE) SONT ENREGISTRÉS SUR DES MYOCYTES VENTRICULAIRES D'HOMME (EN HAUT) OU DE COBAYE (EN BAS). A GAUCHE SONT REPRÉSENTÉS LES COURANTS MESURÉS À LA FIN DE LA DÉPOLARISATION EN FONCTION DU POTENTIEL, AU MILIEU, LES COURANTS DE QUEUE MESURÉS PENDANT LA REPOLARISATION (COURBE I-V) ET À DROITE, LES COURANTS NORMALISÉS (COURBE D'ACTIVATION) .
.....27**

FIGURE 7 : VOIE DE SIGNALISATION INTRACELLULAIRE LIÉE À LA PKA ABOUTISSANT À L'AUGMENTATION DU COURANT IKS. AC : ADÉNYLATE-CYCLASE, PKA : PROTÉINE KINASE AMPC-DÉPENDANTE.....28

FIGURE 8 : RÉPONSE DU COURANT IKS À L'ISOPRÉNALINE. LA RÉPONSE DU COURANT EST MESURÉE À DEUX DOSES D'ISOPRÉNALINE, 10 ET 500 NM (À GAUCHE), ET LES MODIFICATIONS DES CONSTANTES D'ACTIVATION (AU MILIEU) ET DE LA VOLTAGE-DÉPENDANCE (À DROITE) SONT REPRÉSENTÉES. LES COURANTS SONT OBTENUS À PARTIR DE CELLULES DE PURKINJE DE CHIEN30

FIGURE 9 : RÉPONSE DU COURANT IKS À LA PKC. AUGMENTATION DU COURANT IKS PAR LE PMA (4-B PHORBOL ESTER 12-MYRISTATE-13-ACETATE), UN ACTIVATEUR DES PKC DANS LES OVOCYTES DE XÉNOPE EXPRIMANT LES PROTÉINES KCNQ1 ET KCNE1 HUMAINES (XIAO, G.Q. ET AL. 2003).....32

FIGURE 10 : VOIE DE SIGNALISATION DES RÉCEPTEURS COUPLÉS AUX PROTÉINES GQ.....33

FIGURE 11 : SCHÉMA REPRÉSENTANT UNE VOIE DE SIGNALISATION THÉORIQUE ENTRE LE NO ET LE COURANT IKS	35
FIGURE 12 : VOIE DE RÉGULATION PROPOSÉE ENTRE LA TESTOSTÉRONNE ET LE NO RÉGULANT LES COURANTS ICA,L ET IKS	38
FIGURE 13 : SCHÉMA REPRÉSENTANT LES MÉCANISMES IMPLIQUÉS DANS LE RECYCLAGE DU CANAL KCNQ1. SGK1 ACTIVE LA PIKFYVE QUI STIMULE LE RECYCLAGE DU CANAL DÉPENDANT DU PI(3,5)P2 ET DE RAB11. L'ENDOCYTOSE SERAIT LIÉE À LA PROTÉINE RAB5	40
FIGURE 14 : LE COURANT IKS EST GÉNÉRÉ PAR LES PROTÉINES KCNQ1 ET KCNE1. COURANTS OBTENUS EN TRANSFECTANT DES OVOCYTES DE XÉNOPE (EN HAUT) OU DES CELLULES CHO (EN BAS) AVEC KCNQ1, KCNE1 OU LES DEUX PROTÉINES ENSEMBLE . LES OVOCYTES DE XÉNOPE EXPRIMENT KCNQ1 DE MANIÈRE ENDOGÈNE. LA TRANSFECTION DES DEUX PROTÉINES REPRODUIT LE COURANT IKS.....	43
FIGURE 15 : REPRÉSENTATIONS SCHÉMATIQUES DES PROTÉINES KCNQ1 ET KCNE1. EN HAUT : REPRÉSENTATION DE LA STRUCTURE DU CANAL KCNQ1 SEUL (GAUCHE) OU EN TÉTRAMÈRE (MILIEU). UNE VUE DE DESSUS DU TÉTRAMÈRE EST SCHÉMATISÉE SUR LA DROITE. LES BOUCLES S5-S6 DE CHAQUE MONOMÈRE FORMENT LE PORE. EN BAS : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES PROTÉINES KCNQ1 (GAUCHE) ET KCNE1 (DROITE). QUELQUES-UNS DES ACIDES AMINÉS RETROUVÉS MUTÉS DANS LE SYNDROME DU QT LONG CONGÉNITAL SONT MARQUÉS EN NOIR	44
FIGURE 16 : REPRÉSENTATION DE L'INTERACTION KCNQ1-KCNE1. KCNE1 EST LOCALISÉE DANS LA RÉGION DU PORE DE KCNQ1. KCNQ1 EST EN GRIS ET KCNE1 EN BLEU. LES TROIS ACIDES AMINÉS RESPONSABLES DE L'ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE DE KCNE1 SUR L'ACTIVATION DU CANAL SONT REPRÉSENTÉS EN VERT SUR LA PROTÉINE KCNE1. A DROITE EST REPRÉSENTÉE LA STØECHIOMÉTRIE HYPOTHÉTIQUE DU COMPLEXE : 4 SOUS-UNITÉS KCNQ1 POUR 2 SOUS-UNITÉS KCNE1	46

FIGURE 17 : LE VOLTAGE-SENSOR DU CANAL KCNQ1. VUE SCHÉMATIQUE DU SEGMENT S4 (VOLTAGE-SENSOR) AU SEIN DU CANAL (EN GRIS) LORSQUE CELUI-CI EST EN POSITION OUVERTE (DROITE) OU FERMÉE (GAUCHE). LE COMPARTIMENT EXTRACELLULAIRE (EN HAUT) EST CHARGÉ POSITIVEMENT ET L'INTRACELLULAIRE (EN BAS) NÉGATIVEMENT48

FIGURE 18 : ZONE DE TÉTRAMÉRISATION DU CANAL. LOCALISATION DU A-DOMAIN SUR LA PROTÉINE KCNQ4 ET INTERACTION DES 4 HÉLICES FORMÉES PAR LE DOMAINE DE CHAQUE SOUS-UNITÉ DU TÉTRAMÈRE, SELON 2 VUES DIFFÉRENTES50

FIGURE 19 : L'ISOFORME 2 DE KCNQ1 RETIENT L'ISOFORME 1 AU NIVEAU DES COMPARTIMENTS INTRA-CELLULAIRES. MARQUAGE EN ROUGE DE L'ISOFORME 1 TAGUÉE HA (ISO1-HA) ET EN VERT DE L'ISOFORME 2 COUPLÉE À LA GFP (ISO2-GFP), DANS DES CELLULES COS-7 NON PERMÉABILISÉES (HAUT) ET PERMÉABILISÉES (BAS). A GAUCHE SONT REPRÉSENTÉES LES CELLULES TRANSFECTÉES UNIQUEMENT AVEC L'ISOFORME 1 ET À DROITE LES CELLULES TRANSFECTÉES AVEC LES DEUX ISOFORMES. LE CO-MARQUAGE DES DEUX ISOFORMES DANS LES COMPARTIMENTS INTRA-CELLULAIRES (BAS, DROITE) EST IDENTIFIABLE EN JAUNE51

FIGURE 20 : QUANTIFICATION ABSOLUE DES ARNM CODANT POUR LES PROTÉINES DE LA FAMILLE DES KCNE DANS LE CŒUR HUMAIN. LA QUANTIFICATION DES ADNC CORRESPONDANT AUX PROTÉINES CIBLÉES A ÉTÉ RÉALISÉE AU NIVEAU DE L'OREILLETTE GAUCHE (LA), DU VENTRICULE GAUCHE TOTAL (LV) ET DE SES PARTIES ÉPICARDIQUE (LV EPI) ET ENDOCARDIQUE (LV ENDO)53

FIGURE 21 : REPRÉSENTATION HYPOTHÉTIQUE DU COMPLEXE FORMÉ PAR KCNQ1, KCNE1 ET KCNE4. AU MOINS DEUX SOUS-UNITÉS KCNE SONT ASSOCIÉES AU CANAL (EN POINTILLÉS SONT REPRÉSENTÉES LES SOUS-UNITÉS HYPOTHÉTIQUES).....58

FIGURE 22 : DÉGRADATION DES CANAUX IONIQUES ET RÔLE DE L'UBIQUITINYLATION67

FIGURE 23 : UBIQUITINYLATION DES CANAUX IONIQUES. A : LES ENZYMES ACTIVATRICES (E1), DE TRANSFERT (E2) ET LIANT (E3) L'UBIQUITINE (U) PERMETTENT L'UBIQUITINYLATION DU CANAL. B : LES CANAUX IONIQUES PEUVENT ÊTRE MONOUBIQUITINYLÉS (GAUCHE), MULTIUBIQUITINYLÉS (MILIEU) OU POLYUBIQUITINYLÉS (DROITE) SUR LES RÉSIDUS LYSINE (K)68

FIGURE 24 : TRACÉS ÉLECTROCARDIOGRAPHIQUES TYPIQUES DU SYNDROME DU QT LONG. EXEMPLES D'ECG CARACTÉRISTIQUES DU SYNDROME DU QT LONG DE TYPE 1, 2 ET 3 (EN HAUT). LA MORPHOLOGIE DU SEGMENT QT ET DE L'ONDE T SONT DES ÉLÉMENTS PERMETTANT UN DIAGNOSTIC DIFFÉRENTIEL. EN BAS SONT REPRÉSENTÉS QUATRE ECG DIFFÉRENTS CARACTÉRISTIQUES DU LQTS1. A : ASPECT INFANTILE, B : ONDE T À BASE LARGE, C : ASPECT DE L'ONDE T NORMAL ET D : ASPECT NORMAL DE L'ONDE T MAIS DÉPART RETARDÉ73

FIGURE 25 : MESURE DES PA ET DE L'ECG TRANSMURAL ET RÔLE DU COURANT I_{Ks}. LES PA DES DIFFÉRENTES SOUS-COUCHES ET L'ECG TRANSMURAL SONT ENREGISTRÉS DANS DIFFÉRENTES CONDITIONS SUR UNE PAROI VENTRICULAIRE DE CHIEN PERFUSÉE. A. CONTRÔLE, B. EN PRÉSENCE DE CHROMANOL 293B (30MM) ET C. EN PRÉSENCE DE CHROMANOL 293B (30MM) ET D'ISOPROTERENOL (100NM)80

FIGURE 26 : ASSOCIATION OU NON DES SOUS-UNITÉS MUTÉES ET NON MUTÉES EN TÉTRAMÈRE ET CONSÉQUENCES AU NIVEAU DU COURANT I_{Ks} CHEZ DES INDIVIDUS HÉTÉROZYGOTES. EN VERT SONT REPRÉSENTÉES LES SOUS-UNITÉS WT ET EN ROUGE SONT REPRÉSENTÉES LES SOUS-UNITÉS MUTÉES. RE : RÉTICULUM ENDOPLASMIQUE.....82

FIGURE 27 : MODÉLISATION INFORMATIQUE DES CONSÉQUENCES DE LA MUTATION KCNQ1-G589D SUR LE PA ET LA RÉPONSE β -ADRÉNERGIQUE DU

PA ET VISUALISATION SUR L'ECG. A GAUCHE SONT REPRÉSENTÉS LES PA OBTENUS PAR MODÉLISATION À PARTIR DES CANAUX KCNQ1 WT OU G589D (PA IDENTIQUES DE BASE) ET LES PA OBTENUS SOUS STIMULATION β -ADRÉNERGIQUE (ISO) POUR LES FORMES WT ET MUTÉES. A DROITE SONT REPRÉSENTÉS LES PA AU NIVEAU DES DIFFÉRENTES COUCHES DU MYOCARDE (DE HAUT EN BAS : ENDOMYOCARDE, CELLULES M ET ÉPIMYOCARDE) ET LA VISUALISATION SUR L'ECG POUR LES CANAUX WT (LIGNE PLEINE) OU MUTÉS (LIGNE EN TIRETS)88

FIGURE 28 : L'ACTIVITÉ ÉLECTRIQUE CARDIAQUE DURANT LA FIBRILLATION ATRIALE. PA PHYSIOLOGIQUES (A) OU EN FIBRILLATION ATRIALE (B) AU NIVEAU DU NŒUD SINUSAL (SAN), DE L'OREILLETTE (ATRIUM), DU NAV (AV NODE) ET DES VENTRICULES (VENTRICLES)92

FIGURE 29 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE LA CONFIGURATION ET DU DISPOSITIF UTILISÉ EN PATCH-CLAMP. EN HAUT EST REPRÉSENTÉE LA CONFIGURATION CELLULE ENTIÈRE EN CONDITION PERMÉABILISÉE ET EN BAS LE DISPOSITIF D'INSTALLATION POUR LA TECHNIQUE DE PATCH-CLAMP.....101

FIGURE 30 : PROTOCOLE DE STIMULATION DANS LES CARDIOMYOCYTES POUR MESURER I_{Ks}. EN BAS SONT REPRÉSENTÉS LES COURANTS ACTIVÉS PAR LE PROTOCOLE DE STIMULATION DÉCRIT AU-DESSUS, EN PRÉSENCE DE NIFÉDIPINE (INHIBITEUR DE I_{Ca,L}) ET DE E-4031 (INHIBITEUR DE I_{Kr}).....111

FIGURE 31 : AUGMENTATION DU COURANT EN RÉPONSE À UNE STIMULATION DE LA PKA EN FONCTION DU TEMPS. SUR CETTE FIGURE SONT REPRÉSENTÉS LES COURANTS DE QUEUE RELATIFS (EN FONCTION DU COURANT AVANT STIMULATION) EN FONCTION DU TEMPS, ENREGISTRÉS DANS UN CARDIOMYOCYTE DE COBAYE NON TRAITÉ (NOIR) ET DANS UN CARDIOMYOCYTE TRAITÉ À LA COLCHICINE (30 μ M). APRÈS APPLICATION D'AMPC (400 μ M), D'ACIDE OKADAÏQUE (0.2 μ M) ET DE

FORSKOLINE (10 MM, FLÈCHE), LE COURANT AUGMENTE DANS LES SECONDES QUI SUIVENT ET EST STABILISÉ EN MOINS DE 2 MINUTES.....118

FIGURE 32 : AMPLITUDE DU COURANT DANS LES CELLULES COS-7 TRANSFECTÉES AVEC KCNQ1, KCNE1 ET NEDD4-2 WT OU MUTÉE (CS). LE COURANT DES CELLULES TRANSFECTÉES AVEC LA FORME WT DE NEDD4-2 EST SIGNIFICATIVEMENT INFÉRIEUR AU COURANT DES CELLULES TRANSFECTÉES SANS NEDD4-2 ($P < 0.01$). LORSQUE LES DEUX FORMES SONT CO-TRANSFECTÉES AVEC LE CANAL ET KCNE1, LE COURANT EST SUPÉRIEUR À CELUI DES CELLULES TRANSFECTÉES AVEC LA FORME WT ($P < 0.05$) ET ÉQUIVAUT À CELUI DES CELLULES TRANSFECTÉES SANS NEDD4-2 OU AVEC NEDD4-2 CS.....128

FIGURE 33 : DISTRIBUTION DU TISSU NODAL PERMETTANT LA PROPAGATION DU POTENTIEL D'ACTION CARDIAQUE.....138

FIGURE 34 : L'ÉLECTROCARDIOGRAMME NORMAL. REPRÉSENTATION D'UN ECG (GAUCHE) ET EXEMPLE D'UN ECG NORMAL SELON LES 12 DÉRIVATIONS (GAUCHE).....140

FIGURE 35 : EXEMPLES D'ECG ANORMAUX.....141

FIGURE 36 : PA SINUSAL ET PROPORTION HYPOTHÉTIQUE DES PRINCIPAUX COURANTS IONIQUES IMPLIQUÉS DANS CE PA.....143

FIGURE 37 : POTENTIELS D'ACTION DANS LE NŒUD SINUSAL. POTENTIELS D'ACTION DE CELLULES ARAIGNÉES (A) ET DE CELLULES EN FUSEAU (B) DANS LE NŒUD SINUSAL DE LAPIN144

FIGURE 38 : LES POTENTIELS D'ACTION DES DIFFÉRENTES ZONES DU NAV. POTENTIELS D'ACTION MESURÉS DANS UNE CELLULE ATRIALE STIMULÉE OU DANS LES RÉGIONS AN, N ET NH DU NAV DE LAPIN POSSÉDANT UNE ACTIVITÉ SPONTANÉE145

FIGURE 39 : COURANTS INTERVENANT DANS LE PA DES CARDIOMYOCYTES VENTRICULAIRES CARDIAQUES	152
FIGURE 40 : PA ENREGISTRÉS SUR DES COUPES DE PAROI VENTRICULAIRE GAUCHE DE CHIEN. EN HAUT EST REPRÉSENTÉ UN PA ENREGISTRÉ SUR UNE SURFACE ÉPIMYOCARDIQUE (EPI), LES DEUX DU DESSOUS SUR UNE SURFACE MIDMYOCARDIQUE ET CELUI DU BAS SUR UNE SURFACE ENDOMYOCARDIQUE. (ENDO)	153
FIGURE 41 : COMPARAISON DES POTENTIELS D’ACTION AURICULAIRE ET VENTRICULAIRE. COMPARÉ AU PA VENTRICULAIRE (LIGNE GRISE), LE PA AURICULAIRE (LIGNE NOIRE) A UN POTENTIEL DE REPOS MOINS NÉGATIF, UNE PHASE DE PLATEAU RÉDUITE ET UNE PHASE DE REPOLARISATION TERMINALE PLUS LENTE. CES DIFFÉRENCES SONT PRINCIPALEMENT DUES À L’AUGMENTATION DES COURANTS ITO ET IKUR ET À LA DIMINUTION DU COURANT IK1	157
FIGURE 42 : MODIFICATION DU PA EN RÉPONSE À UNE STIMULATION β-ADRÉNERGIQUE. EFFETS DE L’ISOPRÉNALINE (UN AGONISTE DES RÉCEPTEURS β-ADRÉNERGIQUES) SUR LE PA DES CELLULES DE PURKINJE DE CHIEN	161
FIGURE 43 : RELATION ENTRE LES RÉCEPTEURS β_3-ADRÉNERGIQUES ET LE CANAL CALCIQUE DE TYPE L. VOIE DE SIGNALISATION PERMETTANT L’INHIBITION DU COURANT CALCIQUE DE TYPE L, SELON L’ÉQUIPE DE GAUTHIER	163

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : GÈNES IDENTIFIÉS DANS LE SYNDROME DU QT LONG CONGÉNITAL (LQTS). JLN = SYNDROME DE JERVELL ET LANGE-NIELSEN. .	
.....	72

TABLEAU 2 : PARAMÈTRES DIFFÉRENTIELS POUR LE DIAGNOSTIC DU TYPE DE SYNDROME DU QT LONG.	
.....	75

LISTE DES ABREVIATIONS

aa : acide aminé
AC : Adénylate Cyclase
AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique
ANF : Atrial Natriurétic Factor (Facteur natriurétique auriculaire)
ATP : Adénosine Triphosphate
BAV : Bloc Auriculo-Ventriculaire
bpm : battements par minute
CaM : Calmoduline
CHO : Chinese Hamster Ovary (ovaire d'hamster chinois)
DAG : DiAcylGlycerol
DTT : DiThioThréitol
ECG : ElectroCardioGramme
ENaC : Epithelial Na⁺ Channel (Canal sodique épithélial)
ERAD : Endoplasmic Reticulum Associated Degradation (Dégradation associée au réticulum endoplasmique)
FA : Fibrillation Auriculaire (ou Fibrillation Atriale)
FC : Fréquence Cardiaque
GC : Guanylate Cyclase
GMPc : Guanosine MonoPhosphate cyclique
hERG : human Ether-a-gogo Related Gene
HEK : Human Embryonic Kidney (cellules embryonnaires de rein humain)
IP₃ : Inositol triphosphate
Kir : K channel inward rectifier (Canal potassique à rectification entrante)
Kv : K channel voltage-dependant (Canal K⁺ dépendant du potentiel)
LQTS : long QT syndrome (syndrome du QT long)
MiRP : MinK Related Peptide (peptides de la famille MinK)
Nav : canal Na⁺ dépendant du potentiel
NAV : Nœud Auriculo-Ventriculaire
NO : Nitric Oxide (Monoxyde d'Azote)
NOS : Nitric Oxyde Synthase (eNOS : epithelial NOS, équivaut à la NOS3)
PA : Potentiel d'Action
PBS : Phosphate Buffer Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PEI : Polyéthylèneimine

PIKfyve : phosphoinositol 3-phosphate 5-kinase

PI3K : phosphatidylinositol 3 kinase

PIP₂ : Phosphatidylinositol diPhosphate

PIP₃ : Phosphatidylinositol triPhosphate

PKA : Protéine Kinase AMPc-dépendante

PKC : Protéine Kinase C (Calcium et phospholipide dépendante)

PMSF : Phényl Méthyl Sulfonyl Fluoride

QTc : QT corrigé

RE : Réticulum Endoplasmique

RT-PCR : RetroTranscription-Polymerase Chain Reaction

SDS : Sodium DodecylSulfate

SQTS : Short QT syndrome (Syndrome du QT court)

TBS-(T) : Tris-Buffered Saline (Tween-20)

AVANT-PROPOS

Le canal KCNQ1 est un canal potassique retrouvé dans différents types cellulaires dont les cardiomyocytes. Il génère un courant potassique intervenant dans la phase de repolarisation du potentiel d'action (PA) cardiaque. Le syndrome du QT long congénital est une pathologie héréditaire cardiaque pouvant entraîner la mort subite. Des mutations à l'origine de cette pathologie ont été mises en évidence pour la première fois sur le gène codant pour ce canal. Il a alors été dénommé KvLQT1 qui signifie canal potassique voltage-dépendant à l'origine du syndrome du QT long de type 1. D'après la nouvelle nomenclature, ce canal est aussi appelé Kv7.1. KCNQ1 est en réalité le nom du gène codant pour ce canal. Ce canal interagit avec plusieurs protéines et KCNE1 est sa principale sous-unité régulatrice dans le cœur. KCNE1 est, là encore, le nom du gène codant pour cette protéine qui peut porter plusieurs noms. Le courant généré par le canal était tout d'abord attribué à cette petite protéine qui portait alors le nom de minK pour « minimal K⁺ channel » ou de IsK pour « slowly activating K⁺ channel ». De manière à simplifier et n'utiliser qu'une seule dénomination dans ce manuscrit, les protéines seront appelées par le nom de leur gène : KCNQ1 et KCNE1.

Le courant cardiaque formé par l'association de ces deux protéines est le courant I_{Ks} (slow delayed rectifier current). Il se retrouve chez différentes espèces de mammifères et a surtout été étudié dans les cardiomyocytes de cobaye, de lapin ou de chien. Il est négligeable dans les cardiomyocytes de souris ou de rat qui expriment très peu la protéine KCNE1. La proportion des courants potassiques intervenant dans le PA cardiaque de ces deux espèces est d'ailleurs très différente de celle retrouvée chez l'homme. Pour cette raison, le rat et la souris ne représentent pas de bons modèles d'études du courant I_{Ks} et dans ce manuscrit, il sera plutôt fait référence aux espèces comme le cobaye, le lapin ou le chien.

Le fait que des mutations sur le gène *KCNE1* aient été retrouvées dans le syndrome du QT long congénital et d'autres pathologies cardiaques a révélé l'importance des protéines régulatrices d'un point de vue physiopathologique. Pour un certain nombre d'individus présentant ces pathologies cardiaques héréditaires, l'origine génétique reste inexpliquée et aucune mutation sur les gènes connus n'a été retrouvée. Nous ne connaissons pas toutes les protéines capables d'interagir avec les canaux ioniques et cette méconnaissance limite la compréhension de ces pathologies et

restreint le nombre de gènes à analyser pour détecter les porteurs de mutations. Au sein d'une famille atteinte, l'analyse génétique des individus susceptibles de développer la pathologie est pourtant le seul moyen de prendre en charge le patient suffisamment tôt pour lui éviter une éventuelle mort subite. Identifier l'ensemble des protéines pouvant interagir avec les canaux ioniques et trouver de nouveaux gènes à analyser est donc fondamental pour une meilleure appréhension de ces pathologies.

Au cours de mon travail de thèse, je me suis intéressée aux partenaires du canal ionique KCNQ1 dans le cœur. L'ensemble des partenaires déjà connus sera présenté en introduction ainsi que leurs implications dans les pathologies héréditaires cardiaques. Deux nouveaux partenaires de ce canal ont été mis en évidence au cours de ma thèse et leurs rôles physiologiques sur le courant I_{Ks} seront discutés dans les résultats.

INTRODUCTION

1 Propriétés et régulations du courant repolarisant I_{Ks}

1.1 Le courant I_{Ks} au sein du potentiel d'action

1.1.1 Les potentiels d'action cardiaques

L'influx électrique part des cellules automatiques du nœud sinusal et se propage au reste du cœur par le nœud auriculo-ventriculaire (NAV), le faisceau de His et les fibres de Purkinje (voir Annexe 1 et Figure 1). Le potentiel d'action (PA) généré par les cellules automatiques résulte de l'activation de plusieurs courants ioniques dont l'intensité varie en fonction de la localisation au sein du cœur. Le PA des différentes régions est donc variable, tant par sa durée que par sa forme (Figure 1).

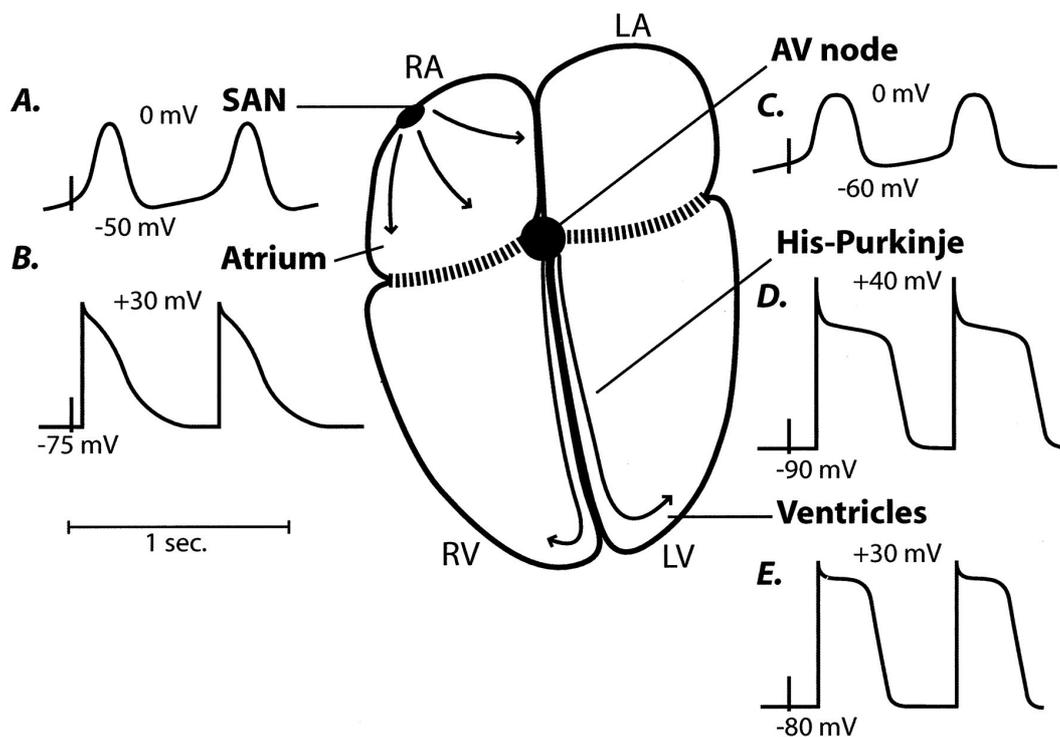


Figure 1 : Diagramme schématique des PA dans les différentes régions du cœur. SAN : nœud sinusal, AV node : nœud auriculo-ventriculaire, RA : oreillette droite, LA : oreillette gauche, RV : ventricule droit, LV : ventricule gauche .

Les différents courants intervenant dans les PA sont décrits en annexe 2. De manière schématique, la dépolarisation (pendant la systole) est liée aux courants

cationiques entrants (sodique I_{Na} et calcique $I_{Ca,L}$ et $I_{Ca,T}$) et la repolarisation (lors de la diastole) aux courants potassiques sortants (I_{to} , I_{Kr} , I_{Ks} , I_{Kur} principalement). Les échangeurs et pompes ioniques interviennent aussi dans ces différentes phases. Dans les cellules automatiques, le potentiel entre deux PA augmente jusqu'à atteindre un potentiel seuil déclenchant l'activation des canaux dépolarisants. Le principal courant à l'origine de cette activité pacemaker est le courant I_f . Dans les myocytes contractiles, le potentiel de repos entre deux PA est stable et lié à la présence du courant I_{K1} (voir annexe 2 et Figure 2).

1.1.2 Les variations du courant I_{Ks} au sein du myocarde ventriculaire

Le courant I_{Ks} intervient dans la phase tardive de la repolarisation cardiaque du fait de sa lente activation (Figure 2, gauche). Il est, avec I_{Kr} , le courant repolarisant majoritaire des cellules ventriculaires cardiaques. Plus ce courant est important, plus la phase de repolarisation et la durée du PA sont courtes. Ce courant s'active à partir de -30 mV et son activation est maximale vers +40 mV. Il a pour origine moléculaire le canal KCNQ1 (ou KvLQT1 ou Kv7.1) et sa protéine régulatrice KCNE1 (ou MinK ou IsK) .

Comme cela est visible sur la Figure 2 (à droite), il existe une hétérogénéité dans la durée et la morphologie des PA au sein de la paroi ventriculaire. La durée du PA est plus courte dans les cellules épimyocardiques que dans les autres cellules ventriculaires et la durée du PA dans les cellules M est particulièrement longue (voir annexe 12).

Cette variation s'explique, entre autres, par une différence de densité du courant I_{Ks} . Chez l'homme, la quantité d'ARNm correspondant à KCNQ1 est légèrement supérieure dans l'épimyocarde mais cette différence ne semble pas être significative . En revanche, il existe une forte hétérogénéité d'expression de l'isoforme tronquée dominante négative du canal KCNQ1 (isoforme 2) entre les couches superficielles et le midmyocarde. L'expression de l'isoforme 2 de KCNQ1 diminue le courant I_{Ks} et il est possible que la durée du PA plus longue observée au sein du midmyocarde soit liée à l'expression plus intense de cette isoforme dans les cellules midmyocardiques .

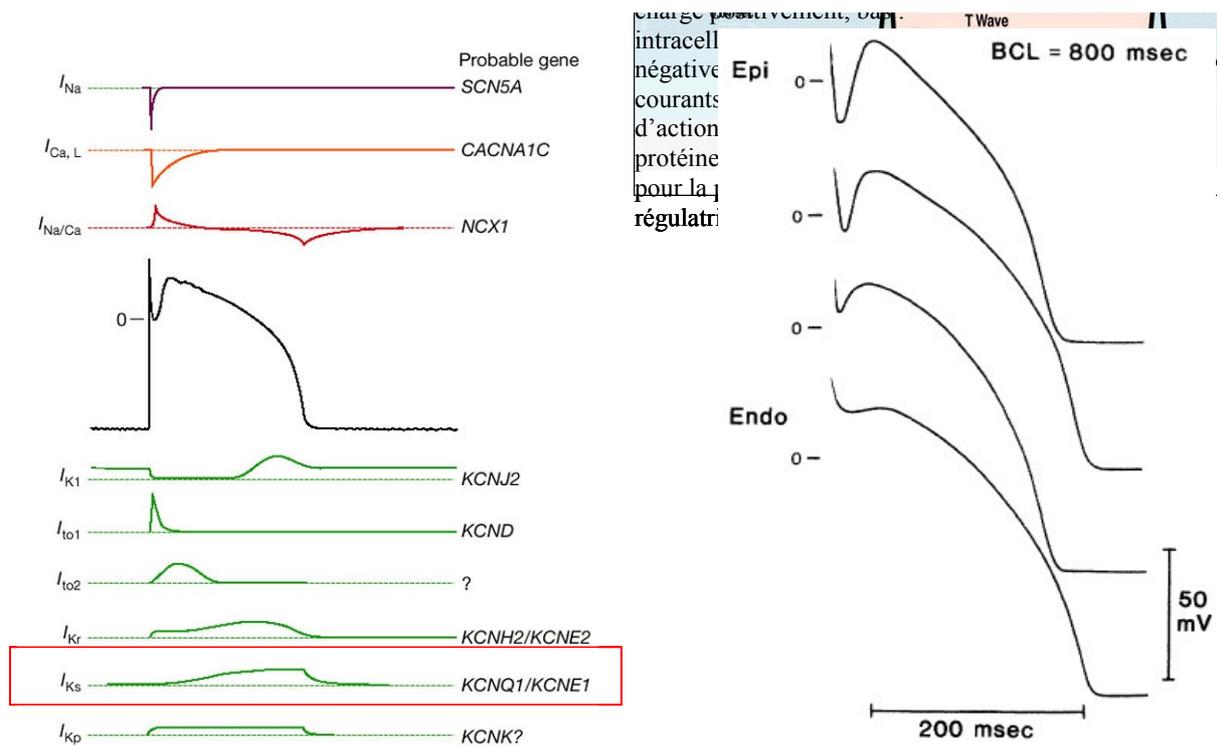


Figure 2 : Courants intervenant dans le PA des cardiomyocytes ventriculaires. A gauche sont représentés les courants intervenant dans le PA ventriculaire humain. Le courant I_{Ks} intervenant dans la phase de repolarisation tardive du PA est encadré en rouge . A droite sont représentés les PA enregistrés sur des coupes de paroi ventriculaire gauche de chien, de la couche épimyocardique (Epi, en haut) à la couche endomyocardique (Endo, en bas). Sous la couche endomyocardique, au sein du midmyocarde, se trouvent les cellules M .

Il existe aussi une hétérogénéité dans l'amplitude du courant I_{Ks} entre la base et l'apex. Cette dispersion peut expliquer la durée du PA plus courte observée dans les cellules de l'apex où le courant I_{Ks} est important. Des études sur des coupes de cœur de chien et d'homme ont montré que l'expression des protéines *KCNQ1* et *KCNE1* est plus importante dans les cellules de l'apex que dans les cellules situées en partie basale du cœur .

1.2 Caractéristiques électrophysiologiques du courant I_{Ks}

L'étude du courant I_{Ks} dans les cardiomyocytes nécessite l'inhibition des courants pouvant interférer avec lui. Le courant sodique peut être inactivé en utilisant des protocoles appropriés (potentiel supérieur à -40 mV). L'application d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques des courants calciques comme la nifédipine ou la

nisoldipine , et des courants potassiques autres que I_{Ks} comme le E-4031 pour le courant I_{Kr} , peut alors permettre d'isoler le courant I_{Ks} . Ce n'est qu'en 1990 que Sanguinetti et Jurkiewicz ont pu distinguer ce courant du courant I_{Kr} par application de l'E-4031 sur des cardiomyocytes de cobaye. Auparavant, les deux courants étaient indiscernables et englobés dans le courant rectifiant retardé I_K . Ces auteurs ont donc été parmi les premiers à pouvoir caractériser les deux composantes du courant I_K .

1.2.1 Propriétés et cinétiques du courant

Le courant I_{Ks} est un courant voltage-dépendant, c'est-à-dire qu'il s'active et se désactive en fonction du potentiel membranaire. Une dépolarisation membranaire au-delà de -30 mV permet l'ouverture des canaux (activation), le passage des ions et la création d'un courant. Lorsque la membrane plasmique se repolarise, les canaux se referment (désactivation).

La Figure 3 représente les courants enregistrés par Sanguinetti et Jurkiewicz dans un cardiomyocyte de cobaye : à -40 mV, le courant observé (entre 150 et 200 pA) résulte principalement du courant I_{K1} . A un tel potentiel le courant sodique est inactivé. A +10 mV, I_{K1} est nul (rectification entrante) et le seul courant observé, en présence d'inhibiteurs spécifiques du courant calcique (ici, la nisoldipine), est le courant I_K (environ 600 pA). Lorsque l'E-4031 est ajouté à des doses suffisantes (au moins 3 à 5 μ M), seul I_{Ks} est visible (Figure 3, courant noté E). Au début de la repolarisation à -40 mV, le courant mesuré est la résultante des courants I_{K1} , possédant des cinétiques d'activation instantanées, et des courants I_{Ks} et I_{Kr} (sauf en présence d'E-4031). Au bout d'une seconde environ, lorsque les canaux responsables des courants I_{Ks} et I_{Kr} sont totalement désactivés, seul I_{K1} persiste.

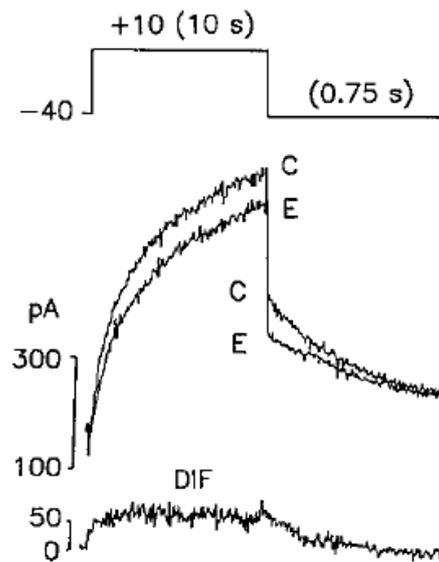


Figure 3 : Courants potassiques enregistrés dans un cardiomyocyte de cobaye. En haut, protocole d'enregistrement des courants. Au milieu, courant mesuré avant (C) et après (E) application de E-4031 (3 μ M). En bas, différence obtenue par soustraction des 2 courants, représentant le courant sensible à cet inhibiteur (I_{Kr}) .

Pour visualiser le courant I_{Ks} , il est nécessaire de dépolariser plusieurs secondes pour voir l'activation de la totalité des canaux. La probabilité d'ouverture des canaux KCNQ1 associés à KCNE1 à un potentiel donné dépend, en effet, du temps. L'ouverture de la totalité des canaux nécessite un temps très long de dépolarisation qui n'est jamais atteint au cours d'un potentiel d'action. Cela signifie que seulement une partie des canaux est activée lors d'un PA. Cette cinétique d'activation lente rend l'intervention de ce courant tardive au cours du PA.

La cinétique de désactivation aussi est lente, dans le sens où elle n'est pas instantanée, mais bien plus rapide que l'activation puisque la totalité des canaux préalablement activés peut être désactivée en 500 à 750 ms. Les canaux ont donc le temps de se fermer entre deux PA.

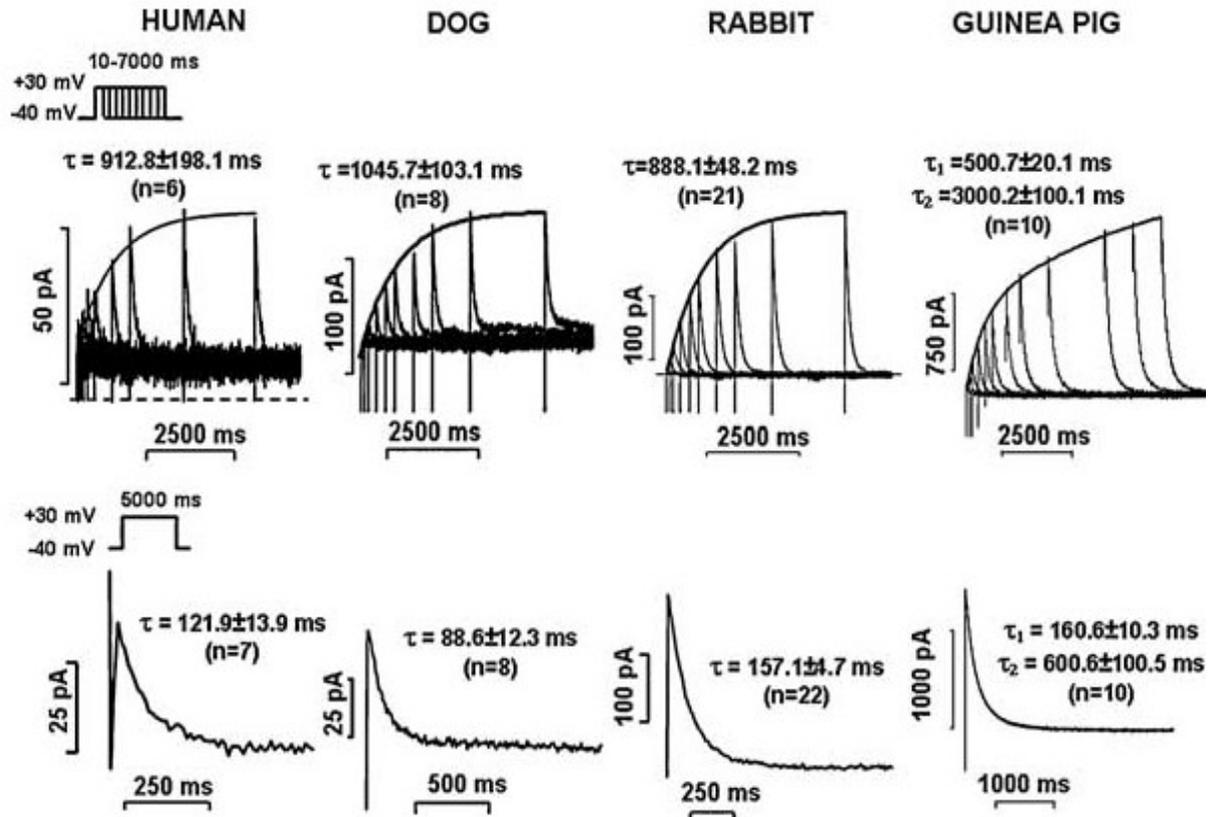


Figure 4 : Cinétiques du courant I_{Ks} . Cinétiques d'activation (en haut) et de désactivation (en bas) du courant I_{Ks} dans un myocyte ventriculaire d'homme, de chien, de lapin et de cobaye. Le protocole de stimulation est indiqué en haut à gauche. Les constantes de temps, calculées selon une ou deux fonctions exponentielles à partir des cinétiques d'activation et de désactivation, sont indiquées en indice .

Le courant s'active et se désactive en suivant une cinétique pouvant être représentée par une ou deux exponentielles (Figure 4). Les constantes de temps d'activation (T_{act}) et de désactivation ($T_{d\acute{e}act}$) sont calculées à partir de ces exponentielles. Comme le montre la Figure 4, ces constantes ainsi que la densité de courant peuvent varier d'une espèce à l'autre .

1.2.2 Voltage-dépendance

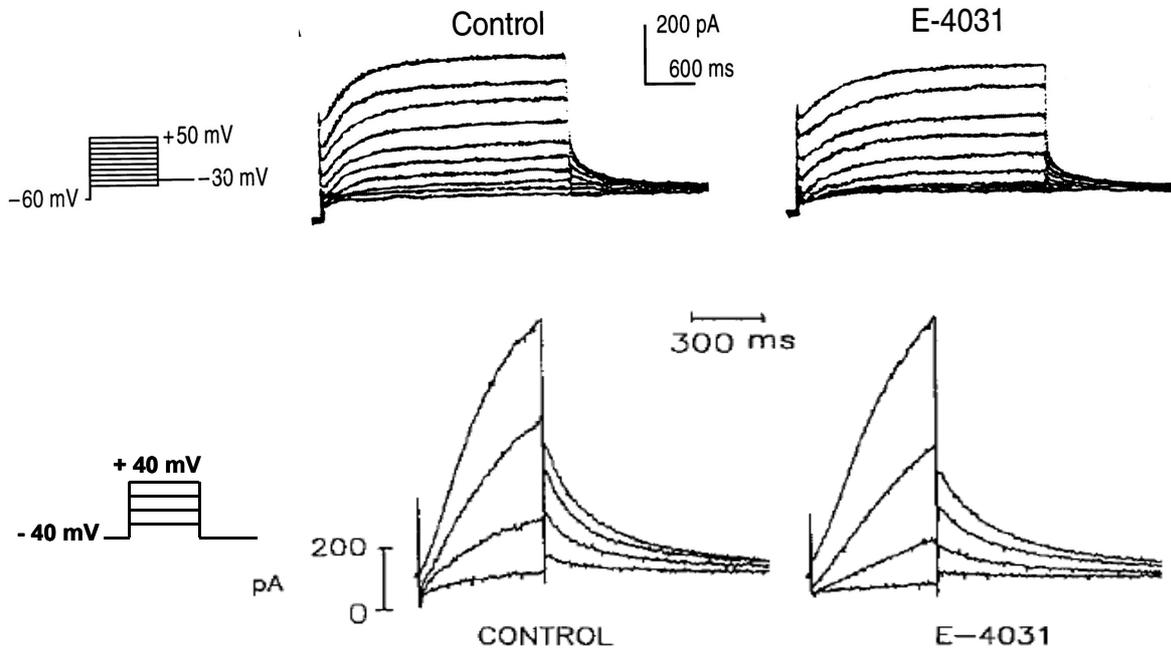


Figure 5 : Le courant I_{Ks} dans les cardiomyocytes. Courants I_K et I_{Ks} (en présence d'E-4031) enregistrés à partir de myocytes ventriculaires humain (en haut) et de cobaye (en bas). Le protocole d'enregistrement est indiqué à gauche. .

La dépendance du courant au potentiel peut être étudiée en dépolarisant la membrane à différents potentiels à partir d'un même potentiel de repos (Figure 5). Le report de l'intensité du courant obtenue en fin de dépolarisation, une fois que tous les canaux sont activés, en fonction du potentiel de dépolarisation permet d'établir la courbe courant-potentiel (courbe I-V). Plus la membrane est dépolarisée, plus le nombre de canaux ouverts augmente. Lorsque les canaux ont atteint leur maximum d'ouverture (vers 30-40 mV), seule la force électromotrice est à l'origine de l'augmentation du courant, qui se fait alors de manière linéaire (Figure 6, gauche, courant en présence d'E-4031).

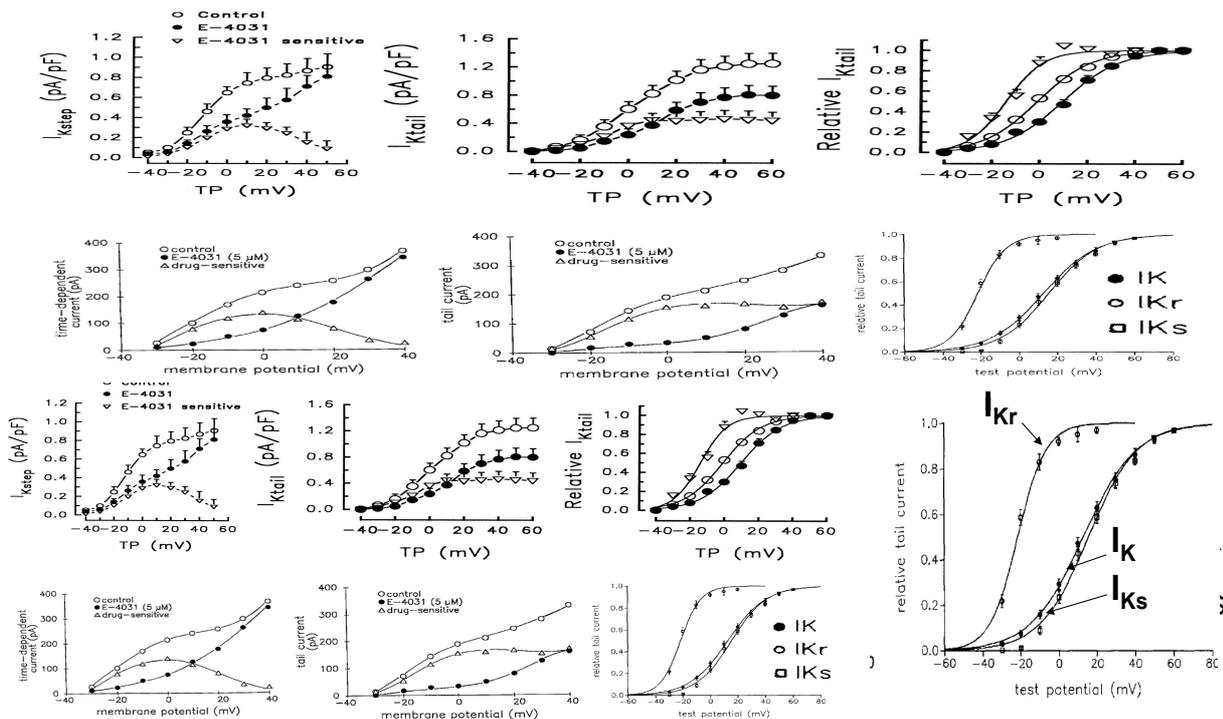


Figure 6 : Voltage-dépendance des courants potassiques I_K , I_{Ks} et I_{Kr} dans les cardiomyocytes. Les courants I_K (control), I_{Ks} (E-4031) et I_{Kr} (E-4031 sensitive) sont enregistrés sur des myocytes ventriculaires d'homme (en haut) ou de cobaye (en bas). A gauche sont représentés les courants mesurés à la fin de la dépolarisation en fonction du potentiel, au milieu, les courants de queue mesurés pendant la repolarisation (courbe I-V) et à droite, les courants normalisés (courbe d'activation) .

La densité de courant en fonction du potentiel se mesure à potentiel constant, après dépolarisation à différents potentiels, de manière à s'affranchir de la force électromotrice. L'amplitude du courant de queue (I_{tail}) au début de la repolarisation varie en fonction du nombre de canaux préalablement ouverts (Figure 6, milieu). Une fois rapportée au courant de queue maximal enregistré, on peut établir une courbe d'activation en fonction du potentiel, allant de 0 à 1 (Figure 6, droite). L'activation du courant est caractérisée par le potentiel de demi activation ($V_{1/2}$) où la moitié des canaux sont activés et par la pente de la courbe d'activation qui caractérise la sensibilité des canaux au potentiel. Cette courbe a la forme d'une sigmoïde et répond à l'équation : $I \text{ relatif} = 1/(1+e^{(V_{1/2}-V)/K})$ où V est le potentiel de dépolarisation, $V_{1/2}$, le potentiel de demi activation et K , la pente.

Le potentiel de demi activation mesuré pour I_{Ks} sur cardiomyocyte de cobaye est en moyenne de 15.7 mV pour une pente de 12.7 mV alors que celui mesuré sur cardiomyocyte humain est de 9.4 mV pour une pente de 11.8 mV .

1.3 Régulations intracellulaires du courant I_{Ks}

1.3.1 Voies de signalisation liées aux récepteurs membranaires

1.1.1.1 La voie des protéines Gs ou Gi et la PKA

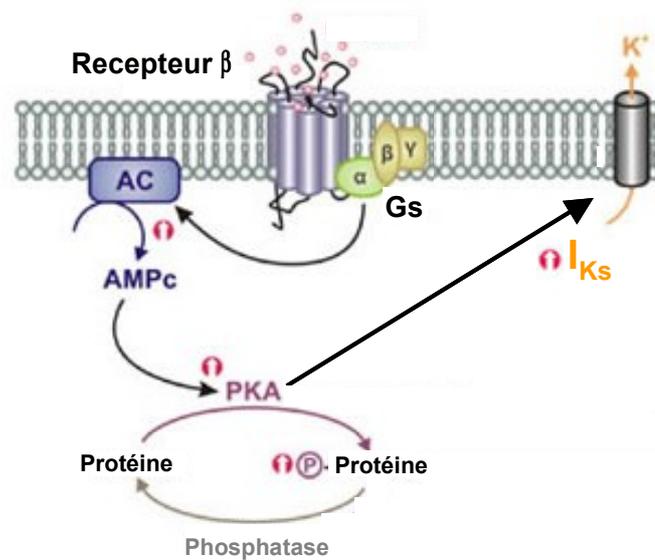


Figure 7 : Voie de signalisation intracellulaire liée à la PKA aboutissant à l'augmentation du courant I_{Ks} . AC : Adénylate-cyclase, PKA : protéine kinase AMPc-dépendante.

Le courant I_{Ks} est un des courants régulés par une stimulation sympathique (voir annexe 3). Une stimulation des récepteurs β_1 ou β_2 -adrénergiques induit une cascade de réactions qui fait intervenir les protéines Gs (protéines couplées au GTP), l'adénylate-cyclase (AC), l'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) et la protéine kinase AMPc-dépendante (PKA, Figure 7). La phosphorylation du canal KCNQ1 par cette kinase aboutit à l'augmentation du courant I_{Ks} et modifie ses propriétés .

Comme le montre la Figure 8, une stimulation des cellules de Purkinje de chien par l'isoprénaline (un agoniste β -adrénergique) aboutit à une augmentation du courant, une accélération des cinétiques d'activation et un déplacement de la voltage-dépendance vers les potentiels plus négatifs. Cela signifie qu'à un potentiel donné de +20 mV, par exemple, une quantité plus grande de canaux sera activée. L'ensemble de ces modifications va dans le sens d'une stabilisation de l'état d'ouverture des canaux.

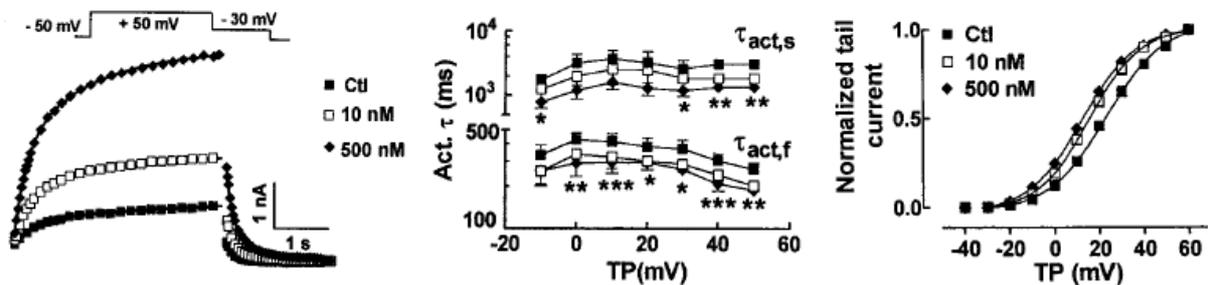


Figure 8 : Réponse du courant I_{Ks} à l'isoprénaline. La réponse du courant est mesurée à deux doses d'isoprénaline, 10 et 500 nM (à gauche), et les modifications des constantes d'activation (au milieu) et de la voltage-dépendance (à droite) sont représentées. Les courants sont obtenus à partir de cellules de Purkinje de chien.

A l'inverse, lorsque les récepteurs sont couplés aux protéines G_i , l'adénylate-cyclase est inhibée et le courant I_{Ks} est diminué. C'est le cas pour les récepteurs muscariniques M2 et les récepteurs à l'endothéline-1 (ET-A). Les récepteurs muscariniques sont des récepteurs à l'acétylcholine qui interviennent dans la stimulation par le système nerveux parasympathique aboutissant à un ralentissement de la fréquence cardiaque (voir annexe 3). L'endothéline-1 est sécrétée par les cellules endothéliales vasculaires et cardiaques. Cette sécrétion est particulièrement abondante lors d'ischémie, d'insuffisance cardiaque ou d'hypertension. Dans les cellules ventriculaires de cobaye, l'endothéline-1 serait capable d'inhiber le courant I_{Ks} préalablement activé par une stimulation β -adrénergique. Cette inhibition serait liée aux protéines G_i puisque l'application d'un inhibiteur de ces protéines (toxine pertussique) abolit cet effet.

1.1.1.2 La voie des protéines Gq et de la PKC

De nombreuses études ont été réalisées pour étudier l'activation du courant I_{Ks} par la protéine kinase C (PKC). La majorité d'entre elles ont pour modèle l'ovocyte de Xénope exprimant la protéine KCNE1 provenant du cobaye ou les cardiomyocytes de cobaye. Dans toutes les études réalisées à partir de ces deux modèles, le courant I_{Ks} est activé par les activateurs de la PKC.

En revanche, lorsque la protéine KCNE1, associée au KCNQ1 endogène de l'ovocyte de Xénope, provient d'une autre espèce que le cobaye comme le rat, le chat ou l'homme, le courant est diminué par des activateurs de la PKC. Toutefois, dans l'étude réalisée par Lo et Numann en 1998, la réponse du courant obtenu à partir de protéines KCNE1 humaines exprimées dans les ovocytes de Xénope, était biphasique. Le courant était tout d'abord augmenté par les activateurs de la PKC, atteignant un pic au bout de 20 minutes, et chutait ensuite pour atteindre un courant de moitié inférieur à la condition contrôle en 1 heure. Dans cette étude, l'augmentation du courant n'est pas associée à une modification de la voltage-dépendance, ce qui est en accord avec les données obtenues sur myocytes de cobaye.

En 2003, Xiao et al. ont étudié la régulation du courant I_{Ks} lorsque les deux sous-unités KCNE1 et KCNQ1 humaines étaient exprimées dans l'ovocyte de Xénope. Ils ont alors observé une augmentation du courant I_{Ks} (Figure 9) qui résulterait plus spécifiquement de l'action de la PKC ϵ et de la PKC β_{II} .

Il est possible que la réponse à la PKC dépende de l'espèce étudiée et il serait donc intéressant d'évaluer la réponse du courant dans des cardiomyocytes provenant d'autres espèces que le cobaye comme le chien, le lapin ou l'homme.

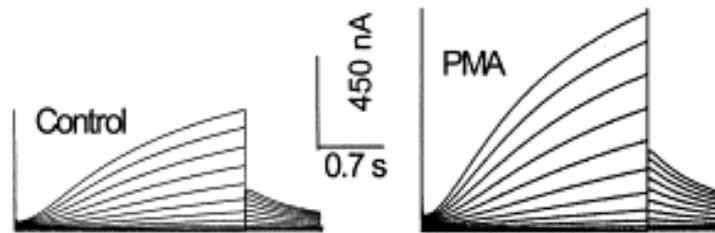


Figure 9 : Réponse du courant I_{Ks} à la PKC. Augmentation du courant I_{Ks} par le PMA (4- β phorbol ester 12-myristate-13-acetate), un activateur des PKC dans les ovocytes de Xénope exprimant les protéines KCNQ1 et KCNE1 humaines (Xiao, G.Q. et al. 2003).

La voie de la PKC est liée à différents récepteurs couplés aux protéines Gq, dont les récepteurs α -adrénergiques (voir annexe 3). Les protéines Gq activent la phospholipase C (PLC) qui hydrolyse le phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP_2) en diacylglycérol (DAG) et inositol triphosphate (IP_3). Le DAG active à son tour la PKC (Figure 10). Pour l'équipe de Kathofer, la voie de régulation couplée aux récepteurs β_3 -adrénergiques fait aussi intervenir la PKC et serait à l'origine d'une augmentation du courant I_{Ks} . Ces études ont été réalisées dans un système d'expression hétérologue (ovocytes de Xénope) surexprimant le récepteur et le canal, à température ambiante et sans agoniste spécifique des récepteurs β_3 -adrénergiques, comme le BRL 37344. Il est donc difficile d'attribuer avec certitude les effets observés à l'activation de ces récepteurs. De plus, le choix du modèle est important pour de telles études puisqu'il existe une grande variabilité de réponse aux stimuli en fonction des modèles d'étude choisis (voir annexe 3). Les éléments activés dans l'ovocyte de Xénope par une stimulation de ces récepteurs peuvent être très différents de ceux activés dans les cardiomyocytes. Il est donc difficile de tirer des conclusions de ces résultats tant que les effets observés n'ont pas été validés sur cardiomyocytes.

D'après Matsumoto, les récepteurs à l'histamine de type H1 sont aussi liés à cette voie dans les cellules atriales de cobaye. Dans ces cellules, l'inhibition de la PKC empêche l'augmentation du courant I_{Ks} induite par l'histamine. Il a été montré que l'histamine a pour effet d'allonger la durée du PA dans ces cellules, ce qui est, à priori, en contradiction avec une augmentation du courant I_{Ks} . Toutefois, pour l'équipe de Matsumoto, cet effet sur la durée du PA serait plus lié à une diminution du courant I_{Kr} qu'à l'effet observé sur I_{Ks} .

De la même manière, l'inhibition de la PKC ou de la phospholipase C (PLC, voir Figure 10) abolit l'augmentation du courant induite par l'angiotensine II via les récepteurs AT₁, dans les myocytes atriaux de cobaye . L'angiotensine II augmente, en effet, le courant I_{Ks} et diminue ainsi la durée du PA. Une augmentation de l'angiotensine II ou des récepteurs AT₁ pourrait alors favoriser la survenue d'arythmies telle qu'une fibrillation atriale (FA).

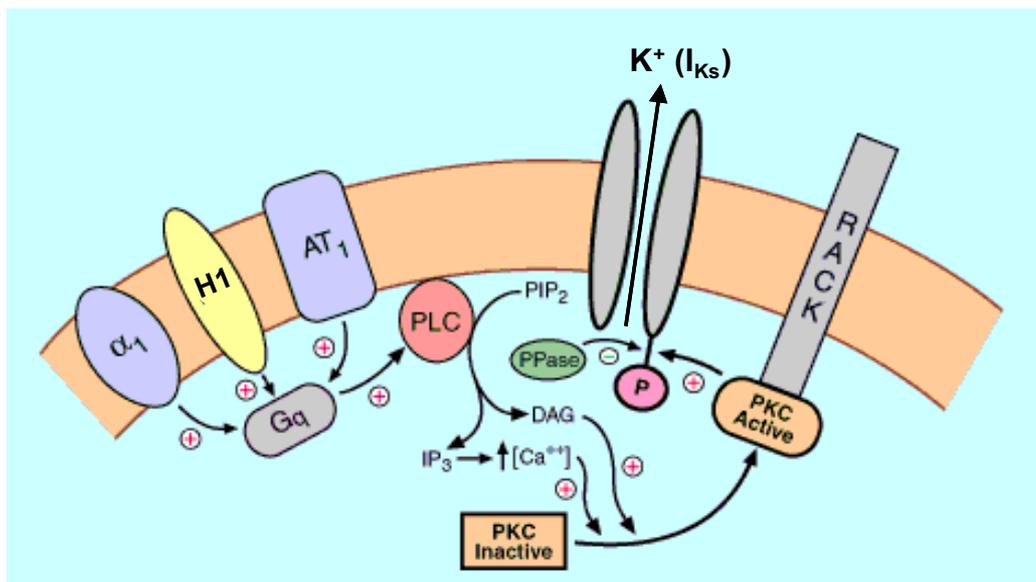


Figure 10 : Voie de signalisation des récepteurs couplés aux protéines Gq.

1.1.1.3 La voie du NO et de la PKG

Nous avons vu précédemment que, d'après l'équipe de Kathofer, les récepteurs β₃-adrénergiques pouvaient être couplés à la voie de la PKC dans l'ovocyte de Xénope. D'après l'équipe de Gauthier, ces récepteurs seraient couplés aux protéines Gi puisque l'inhibition de ces protéines dans des biopsies endomyocardiques humaines diminue partiellement l'effet inotrope négatif induit par les récepteurs β₃-adrénergiques . Toutefois, la principale action de ces protéines Gi ne serait pas, ici, d'inhiber l'adénylate-cyclase mais plutôt d'activer la voie du monoxyde d'azote (NO) par activation de la « nitric oxide synthase » (NOS, voir annexe 3). L'application d'inhibiteurs de cette voie dans le même modèle d'étude diminue considérablement l'effet inotrope négatif des agonistes β₃-adrénergiques .

Le NO peut activer la guanylate cyclase (GC) et augmenter ainsi la concentration intracellulaire de GMPc (guanosine monophosphate cyclique) activant la PKG (protéine kinase GMPc-dépendante). Le GMPc est aussi capable d'activer les phosphodiésterases de type 2 (PDE2) et d'inhiber les phosphodiésterases de type 3 (PDE3) dégradant l'AMPc. Par ces effets, le GMPc peut alors réguler l'activation de la PKA. Le facteur natriurétique auriculaire (ANF), sécrété par les cellules auriculaires, induit des effets biologiques variables, essentiellement médiés par une augmentation intracellulaire de GMPc. Ce facteur diminue la sécrétion de rénine et d'aldostérone et permet, notamment, de réduire la pré-charge et la post-charge par ses actions natriurétique, diurétique et vasorelaxante.

Si la relation entre les récepteurs β_3 -adrénergiques et le courant I_{Ks} n'est pas encore bien établie, quelques études ont mis en évidence un lien entre l'ANF, le NO ou le GMPc et le courant I_{Ks} . En 2002, Shimizu et al. ont montré que ce courant, enregistré sur des cellules sinusales de cobaye, pouvait être augmenté par le GMPc et l'ANF. Selon ces auteurs, le GMPc peut moduler le courant par deux voies différentes. La première est due à son action inhibitrice sur les PDE3 qui aboutit à l'augmentation d'AMPc intracellulaire et donc à l'activation de la PKA. La seconde voie fait intervenir la PKG qui aurait une action activatrice sur le courant, indépendamment de la PKA. L'équipe de Furakawa a montré, en 2004 et 2006, que le courant I_{Ks} était augmenté par le NO, en utilisant des activateurs et inhibiteurs du NO ou de la NOS3 (eNOS) sur des cardiomyocytes ventriculaires de cobaye. Pour ces auteurs, l'effet du NO sur le courant ne dépend pas que du GMPc puisque la présence d'un inhibiteur de la guanylate cyclase (GC) n'empêche pas l'activation du courant par un donneur de NO. Le NO aurait un effet direct sur le courant en nitrosylant le canal. L'ensemble de ces données est résumé sur le schéma représenté en Figure 11.

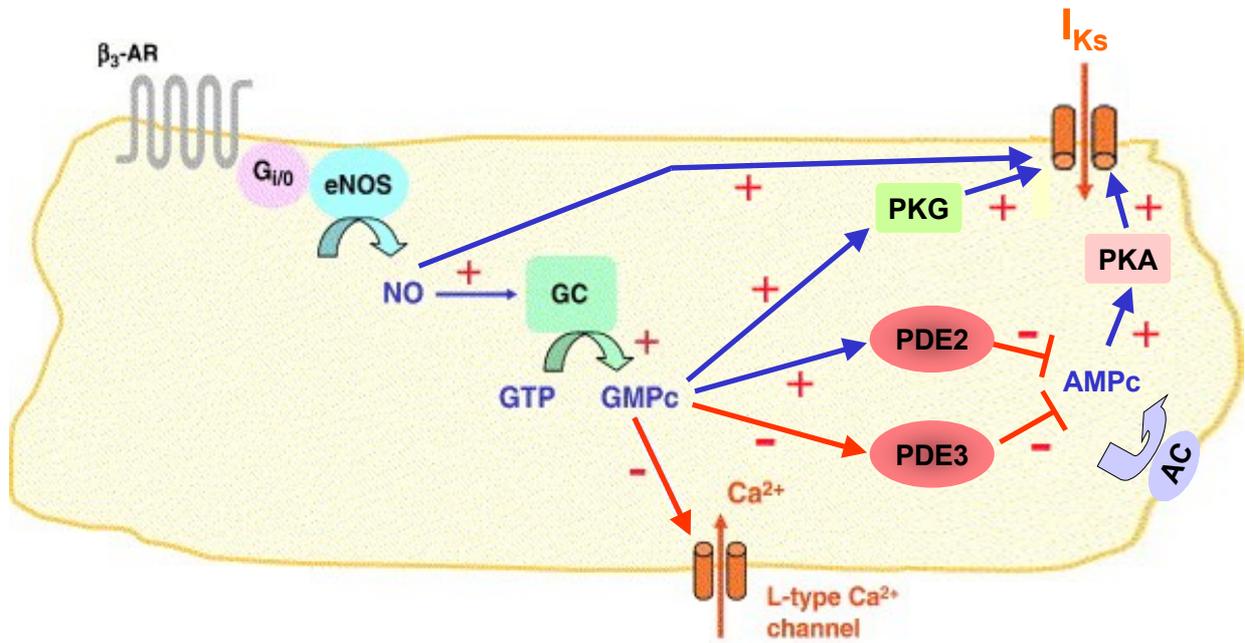


Figure 11 : Schéma représentant une voie de signalisation théorique entre le NO et le courant I_{Ks} .

1.3.2 Régulations par les hormones thyroïdiennes et stéroïdes

Les hormones thyroïdiennes et stéroïdes sont des hormones dont le récepteur est intra-cellulaire et qui peuvent moduler l'expression de certains gènes ou agir sur les canaux par des voies de régulation intra-cellulaires.

1.1.1.4 Les hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes jouent un rôle non négligeable dans la régulation des fonctions cardiaques. Un hypothyroïdisme est associé à une diminution de la fréquence cardiaque et de l'inotropisme et à un allongement de l'intervalle QT. Une augmentation de cet intervalle est due à un allongement de la phase de repolarisation qui peut résulter d'une augmentation d'un courant dépolarisant ou d'une diminution d'un courant potassique repolarisant, comme I_{Ks} (voir annexe 1). Ces hormones joueraient un rôle sur l'expression et la fonction de certains canaux. Notamment, l'expression des canaux $Kv1.5$, HCN et de la pompe Na/K-ATPase est régulée par ces hormones. Peu d'études ont été réalisées pour évaluer leur effet sur l'expression de KCNQ1 et de KCNE1. Dans deux études, réalisées à partir de cœurs de souris, l'effet des hormones thyroïdiennes sur le remodelage des canaux

ioniques, dont le canal KCNQ1/KCNE1, a été évalué. Gloss et al. ont montré, par RT-PCR à partir de ventricules de souris, que l'expression de KCNE1 était augmentée chez les souris en hypothyroïdie et chez les souris n'exprimant pas le récepteur aux hormones thyroïdiennes T3 de type α . L'inverse est observé pour les souris en hyperthyroïdie. Le Bouter et al. ont confirmé ces résultats sur les cardiomyocytes de souris en hypo- et hyperthyroïdie. D'après ces auteurs, l'expression de KCNQ1 est aussi modulée par les hormones thyroïdiennes, de la même manière que KCNE1. Ces données ne concordent pas avec l'augmentation de l'intervalle QT observée chez les patients en hypothyroïdie. Certes, l'expression des autres canaux potassiques importants pour la repolarisation chez la souris est diminuée, comme c'est le cas pour les canaux Kv1.5, Kv2.1 et Kv4.2. L'augmentation de la quantité de KCNQ1 et KCNE1 serait alors une adaptation permettant de contrebalancer la diminution des autres canaux potassiques chez la souris. Des études sur un modèle plus proche de l'homme permettraient, là encore, de fournir des informations plus intéressantes pour aborder les pathologies liées à ces hormones chez l'homme.

1.1.1.5 Les hormones stéroïdes

Les femmes ont une durée de PA plus longue et une valeur de QTc (QT corrigé en fonction de la fréquence cardiaque, voir annexe 1) plus grande que les hommes, les rendant plus susceptibles de développer des arythmies de type torsades de pointe. Les hormones sexuelles seraient, en grande partie, responsables de cette différence.

- L'œstradiol

L'effet de l'œstradiol sur l'allongement du PA serait lié à une inhibition du courant I_{Ks} . Une étude a été réalisée sur des cellules CHO transfectées de manière stable ou transitoire, dans le but de comparer l'effet de l'œstradiol sur les canaux KCNQ1/KCNE1, HERG et Nav1.5. Les auteurs ont montré que l'effet de cette hormone était nettement plus important sur le courant I_{Ks} que sur les autres courants. Auparavant, Busch et al. avaient montré que la protéine KCNE1 jouait un rôle majeur dans l'inhibition du courant par le 17-beta-oestradiol. L'inhibition induite par cette hormone était, en effet, largement plus marquée sur les ovocytes de Xénope

transfectés avec KCNQ1 et KCNE1 que sur ceux transfectés avec KCNQ1 seul. Toutefois, les voies de régulation permettant une inhibition aussi rapide du courant par l'œstradiol ne sont pas connues dans le cœur.

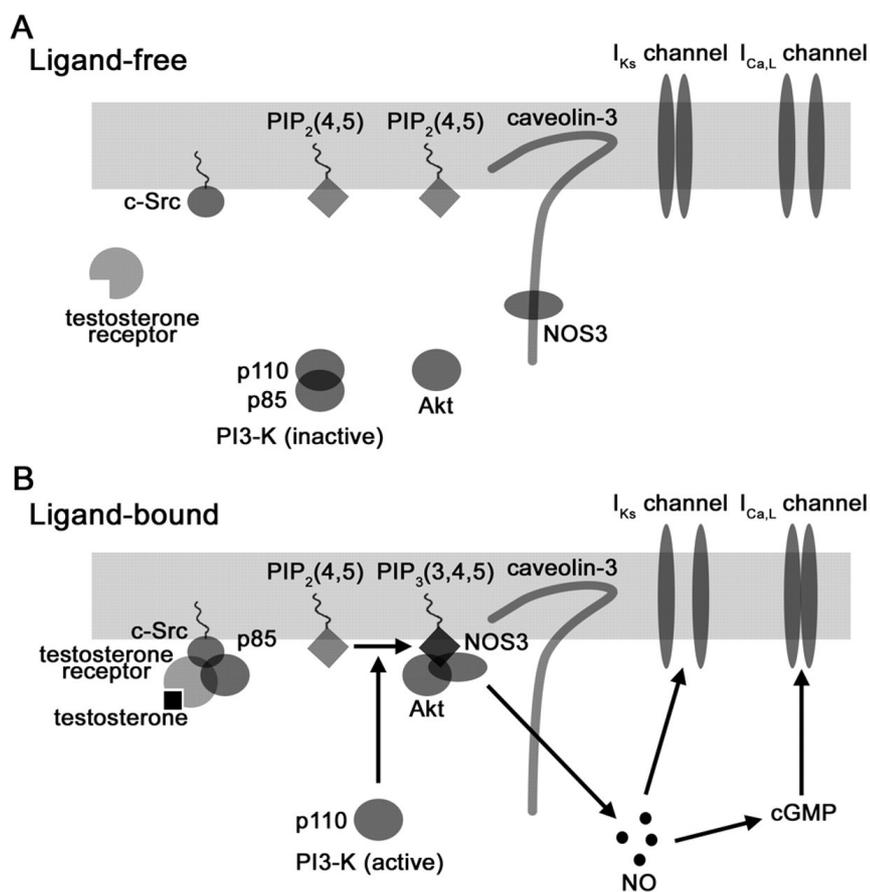
De manière troublante, il a été montré dans les cellules des cryptes du colon distal, que l'inhibition du courant KCNQ1 par l'œstradiol était liée à l'activation de la PKC δ et de la PKA. Dans ces cellules, la PKC δ activerait la PKA, aboutissant à la phosphorylation du canal et à la diminution du courant. Pourquoi, dans ces cellules, la phosphorylation du canal par la PKA aboutit à une inhibition du courant alors que l'inverse est observé dans le cœur, sous stimulation β -adrénergique, reste une question entière. L'effet de l'œstradiol sur le courant I_{Ks} dans les cardiomyocytes n'a jamais été directement démontré mais suggéré par les expériences décrites plus haut. Plusieurs questions se posent alors : les effets de l'œstradiol sur le courant I_{Ks} dans le cœur sont-ils aussi liés à l'activation de la PKA, comme dans les cellules du colon ? Si oui, pourquoi les effets de la PKA ne sont-ils pas les mêmes que ceux obtenus lors d'une stimulation β -adrénergique ? Enfin, si les mécanismes induits par une stimulation par l'œstradiol ne sont pas les mêmes dans le cœur que dans le colon, alors quels sont les mécanismes impliqués dans le cœur ? Dans les cellules du colon, KCNQ1 est associé à la protéine régulatrice KCNE3 et non KCNE1. Le courant est donc différent du courant I_{Ks} observé dans le cœur. Les autres protéines impliquées dans le complexe de KCNQ1 et capables de réguler le courant diffèrent certainement d'un type cellulaire à l'autre. Si la réponse du courant à la phosphorylation du canal par la PKA dépend des protéines régulatrices, il est alors possible que la réponse soit différente en fonction du complexe dans lequel est compris le canal. Cependant, cela n'explique toujours pas comment l'œstradiol est capable d'inhiber le courant dans les cardiomyocytes. L'étude des effets de l'œstradiol sur le courant I_{Ks} et des mécanismes impliqués dans ces cellules est indispensable pour pouvoir répondre à cette question.

L'œstradiol semble aussi diminuer l'expression de la protéine KCNE1 dans le cœur de lapin. D'après des données récentes, l'expression de cette protéine est inférieure d'environ 24% chez la femelle par rapport au mâle. Ceci pourrait expliquer la plus grande durée de l'intervalle QTc observée chez les femelles. L'expression du canal KCNQ1 semble, en revanche, être similaire dans les deux genres.

- La testostérone

En 2005, Bai et al. ont montré que la testostérone pouvait avoir un effet sur I_{Ks} , indépendamment de la régulation transcriptionnelle. D'après leurs résultats obtenus à partir de cellules ventriculaires de cobaye, la testostérone réduit la durée du PA, augmente le courant I_{Ks} et diminue le courant $I_{Ca,L}$. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques a permis de déterminer que la NOS3, la c-src (une tyrosine kinase) et la voie PI3K/Akt (protéines kinases) étaient impliquées dans cette régulation médiée par la testostérone. La voie de signalisation proposée est représentée en Figure 12.

Figure 12 : Voie de régulation proposée entre la testostérone et le NO régulant les courants



$I_{Ca,L}$ et I_{Ks} .

D'après ces auteurs, la fixation de l'hormone sur son récepteur intra-cellulaire permet la formation du complexe récepteur/c-src/p85. La protéine c-src est une tyrosine kinase et p85 une sous-unité régulatrice de la PI3K (phosphatidylinositol 3 kinase). La formation de ce complexe permet la libération de la sous-unité active p110 de la PI3K. Cette kinase va alors phosphoryler le PI(4,5)P₂ (phosphatidylinositol-4,5-

diphosphate) en PI(3,4,5)P₃ (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate) qui va former un complexe avec l'Akt et la NOS3 . Le NO, synthétisé à partir de la NOS3, active alors le canal directement et indépendamment de la voie GMPc .

- Les corticoïdes

En 2003, l'équipe de Lang a montré que les trois isoformes de la famille des kinases SGK (serum- and glucocorticoid-inducible kinase), ainsi que la PKB (protéine kinase B) pouvaient augmenter le courant induit par KCNQ1/KCNE1 dans les ovocytes de Xénope . Les kinases de la famille SGK sont activées par les corticoïdes dont la sécrétion est augmentée, notamment, lors d'un stress émotionnel . Ce type de stress peut être à l'origine d'une mort subite d'origine cardiaque . L'augmentation du courant I_{ks} par ces protéines kinases pourrait contribuer à l'accélération de la phase de repolarisation observée lors de stress émotionnels .

Dans un article publié récemment, cette même équipe propose un mécanisme pour expliquer l'augmentation du courant I_{ks} par SGK1. Les auteurs montrent que la co-expression de SGK1 constitutivement active avec KCNQ1 et KCNE1, dans les ovocytes de Xénope, augmente la quantité de canaux à la membrane plasmique par rapport aux cellules transfectées sans SGK1 . Ils ont aussi montré l'implication des protéines RAB5, RAB11 et PIKfyve (phosphoinositol 3-phosphate 5-kinase) dans les processus d'endocytose-exocytose du complexe KCNQ1/KCNE1. Les résultats suggèrent, en effet, que RAB5 serait impliquée dans l'endocytose du canal (diminution du courant) alors que RAB11 serait impliquée dans l'exocytose (augmentation du courant). Plus précisément, SGK1 serait capable d'activer la PIKfyve en la phosphorylant, augmentant ainsi la synthèse de PI(3,5)P₂. Ce phospholipide permettrait l'exocytose de vésicules contenant le complexe KCNQ1/KCNE1 en activant la protéine RAB11 (Figure 13).

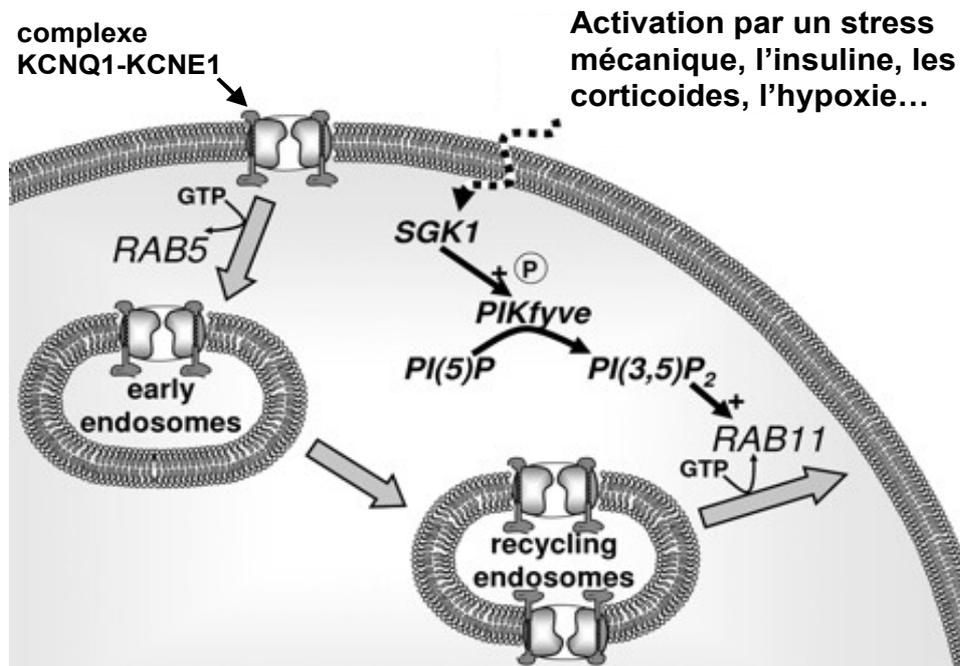


Figure 13 : Schéma représentant les mécanismes impliqués dans le recyclage du canal KCNQ1. SGK1 active la PIKfyve qui stimule le recyclage du canal dépendant du PI(3,5)P₂ et de RAB11. L'endocytose serait liée à la protéine RAB5 .

Par ailleurs, il a été montré que le facteur induit par les hormones corticostéroïdes, CHIF, pouvait augmenter l'expression du canal KCNQ1 à la membrane et le rendre voltage-indépendant . La mise en évidence de cette régulation a été réalisée dans des systèmes d'expression hétérologue (ovocytes de Xénope et CHO) en absence de KCNE1 et aucune interaction directe KCNQ1-CHIF n'a été recherchée. Le mécanisme permettant une telle régulation, les effets de cette régulation sur le complexe KCNQ1-KCNE1 et le courant I_{Ks} et enfin les implications physiopathologiques au niveau cardiaque restent à déterminer.

2 Le canal KCNQ1 fonctionne au sein d'un complexe canalaire

2.1 KCNQ1 et KCNE1 à l'origine du courant I_{Ks}

Le courant I_{Ks} résulte de l'association du canal KCNQ1 et de la protéine KCNE1 (ou minK pour « minimal K⁺ channel protein »). Ce courant était tout d'abord attribué à la seule protéine KCNE1 malgré sa configuration atypique par rapport aux autres canaux. Cette petite protéine ne comporte, en effet, qu'un seul domaine transmembranaire contrairement aux autres canaux ioniques connus. Les études étaient alors principalement effectuées sur les ovocytes de Xénope. En 1993, Attali et al. ont suggéré que cette protéine pouvait réguler des canaux potassiques (et des canaux chlores) endogènes, sans toutefois identifier KCNQ1. Ce n'est qu'en 1996 que les équipes de Sanguinetti et de Barhanin découvrirent que le courant observé résultait de l'association de la protéine KCNE1 transfectée dans ces ovocytes avec la protéine canal KCNQ1 endogène. Le courant obtenu par la transfection de ces deux sous-unités dans différents systèmes d'expression a permis de caractériser les propriétés moléculaires du courant I_{Ks} (Figure 14).

Contrairement au courant I_{Ks} , le courant obtenu à partir du canal KCNQ1 seul est de très faible amplitude et d'activation rapide. Son potentiel de demi-activation est autour de -11 mV alors qu'il est autour de +10-15 mV pour le courant I_{Ks} . De plus, l'inactivation de KCNQ1, visible à partir d'un certain potentiel, disparaît complètement lorsque le canal est associé à KCNE1. KCNE1 modifie donc à la fois l'amplitude, les cinétiques, la voltage-dépendance et l'inactivation du canal KCNQ1. L'augmentation du courant serait en partie liée à une augmentation de la conductance et/ou du nombre de canaux à l'état ouvert.

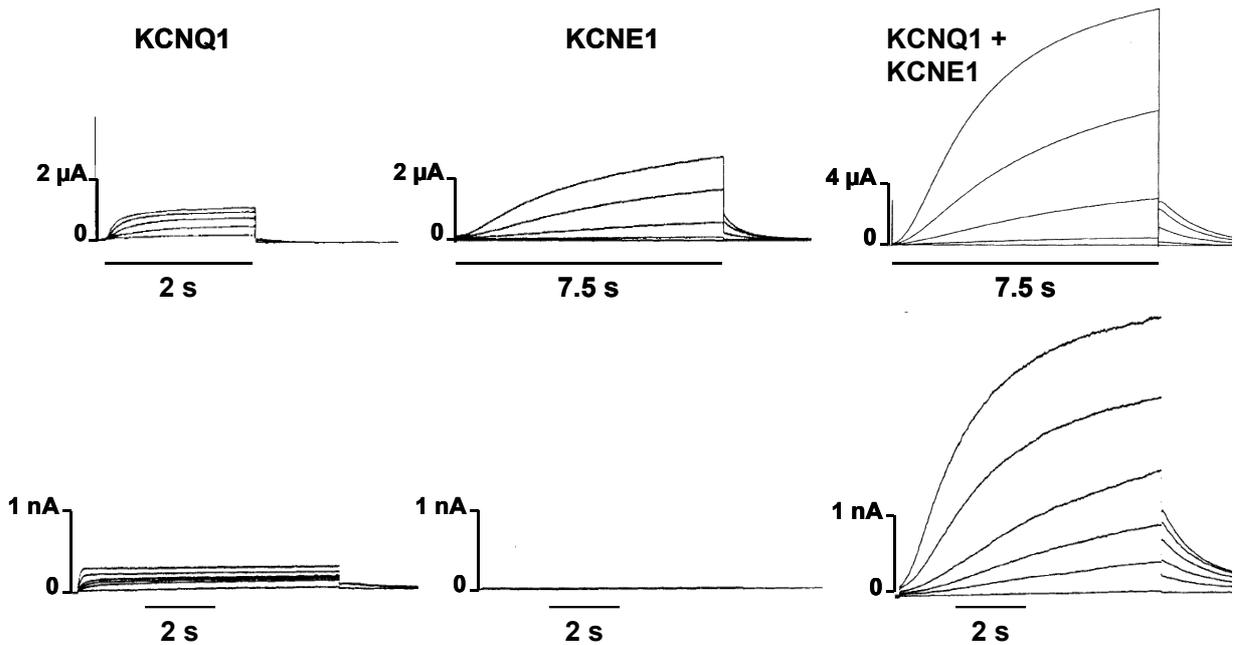


Figure 14 : Le courant I_{Ks} est généré par les protéines KCNQ1 et KCNE1. Courants obtenus en transfectant des ovocytes de Xénope (en haut) ou des cellules CHO (en bas) avec KCNQ1, KCNE1 ou les deux protéines ensemble . Les ovocytes de Xénope expriment KCNQ1 de manière endogène. La transfection des deux protéines reproduit le courant I_{Ks} .

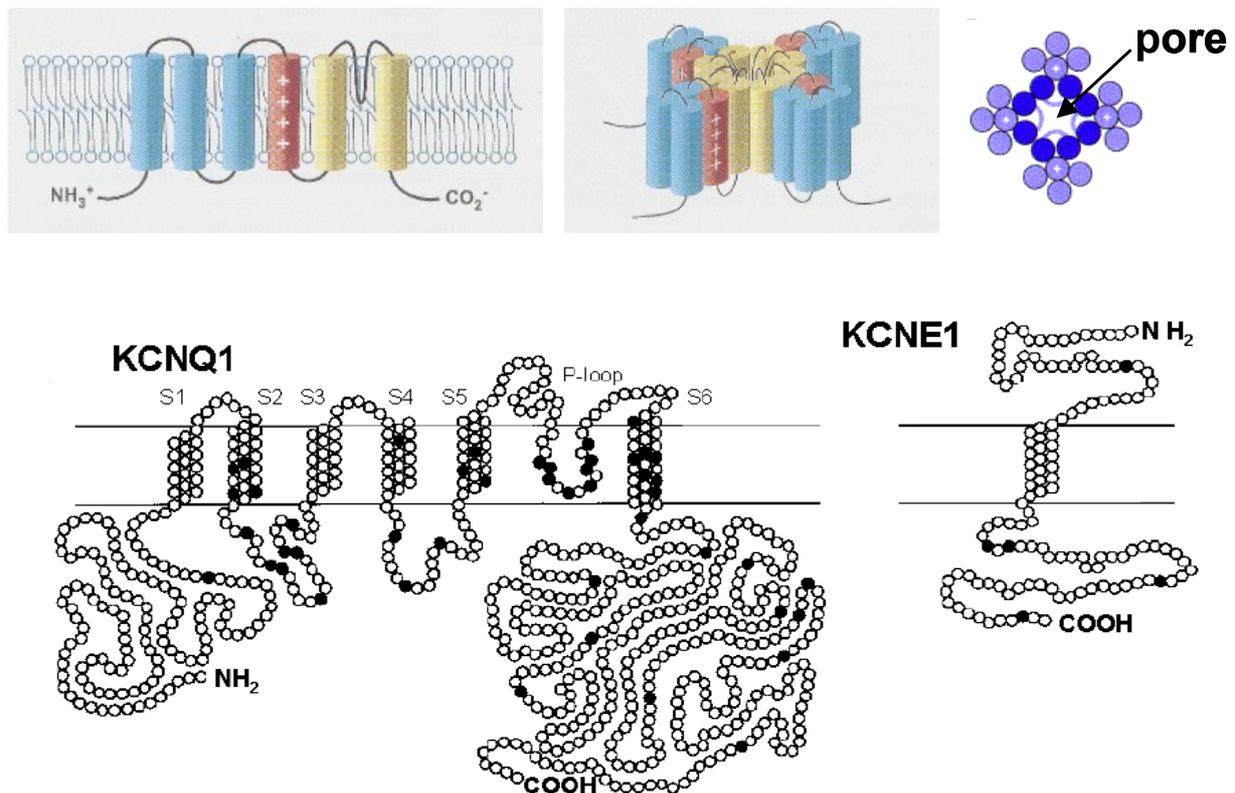
2.2 Propriétés moléculaires du complexe KCNQ1-KCNE1

2.2.1 Structure des protéines

Les premières analyses d'hydrophobicité sur le canal potassique Shaker ont permis de prédire la structure de ces canaux composés de 6 domaines transmembranaires (TM) hydrophobes . Par homologie de séquence, d'autres canaux potassiques supposés avoir la même structure ont ensuite été identifiés, dont le canal KCNQ1. Plus récemment, les canaux KcsA à 2 domaines TM et Kv1.2 de la famille Shaker, à 6 domaines TM, ont été cristallisés et leur structure a pu être déduite . D'après ces données et en extrapolant à KCNQ1, il est possible de prédire la structure de cette protéine de 676 acides aminés . Elle serait composée de 6 domaines transmembranaires hydrophobes organisés en hélices α . Une boucle P (P-loop, Figure 15, bas) entre les deux derniers segments TM, S5 et S6, contient une partie transmembranaire permettant la formation du pore. Les parties N- et C-terminales sont solubles et cytoplasmiques. La partie C-terminale est particulièrement grande et représente plus de la moitié de la protéine (Figure 15, bas). Elle contient des hélices

α qui peuvent constituer des sites de fixation à d'autres protéines. Les canaux KCNQ1 s'associent en tétramère (Figure 15, haut) et le pore est formé par les boucles P de chaque sous-unité KCNQ1 (sous-unité α). La protéine KCNE1, associée au canal KCNQ1, est une petite protéine de 129 acides aminés. Elle ne contient qu'un seul domaine TM. Sa partie N-terminale est extracellulaire et contient deux sites de glycosylation et sa partie C-terminale, intra-cellulaire (Figure 15, bas), contiendrait au moins une hélice α .

Figure 15 : Représentations schématiques des protéines KCNQ1 et KCNE1. En haut : représentation de la structure du canal KCNQ1 seul (gauche) ou en tétramère (milieu). Une vue de dessus du tétramère est schématisée sur la droite. Les boucles S5-S6 de chaque



monomère forment le pore. En bas : Représentation schématique des protéines KCNQ1 (gauche) et KCNE1 (droite). Quelques-uns des acides aminés retrouvés mutés dans le syndrome du QT long congénital sont marqués en noir.

2.2.2 Association des deux protéines

1.1.1.6 Formation du complexe dans la cellule

Une étude réalisée par Krumerman, à partir de mutants de KCNE1, semble montrer que l'association KCNQ1-KCNE1 s'effectue au niveau du réticulum endoplasmique (RE) . Le mutant KCNE1 L51H est retenu dans le RE et incapable de monter à la membrane, contrairement à la forme non mutée (WT), d'après des marquages en immunofluorescence. La co-expression de ce mutant avec le canal KCNQ1 dans des cellules HEK293 (human embryonic kidney) aboutit à une rétention du canal dans le RE. La quantité de canaux présents à la membrane plasmique est alors réduite et le courant résultant d'une telle co-transfection, dans des cellules CHO, correspond au courant obtenu dans les cellules transfectées sans KCNE1. Ces résultats suggèrent que ces deux protéines sont associées dans le RE et soulèvent l'éventualité d'un rôle de KCNE1 dans le trafic du canal . D'autres résultats montrent que la quantité de KCNQ1 biotinylés (à la surface de la cellule) est nettement augmentée par la co-expression de KCNE1 dans les cellules HEK293, confirmant alors le rôle de KCNE1 dans le trafic du canal vers la membrane plasmique .

1.1.1.7 Zones d'association du complexe KCNQ1-KCNE1

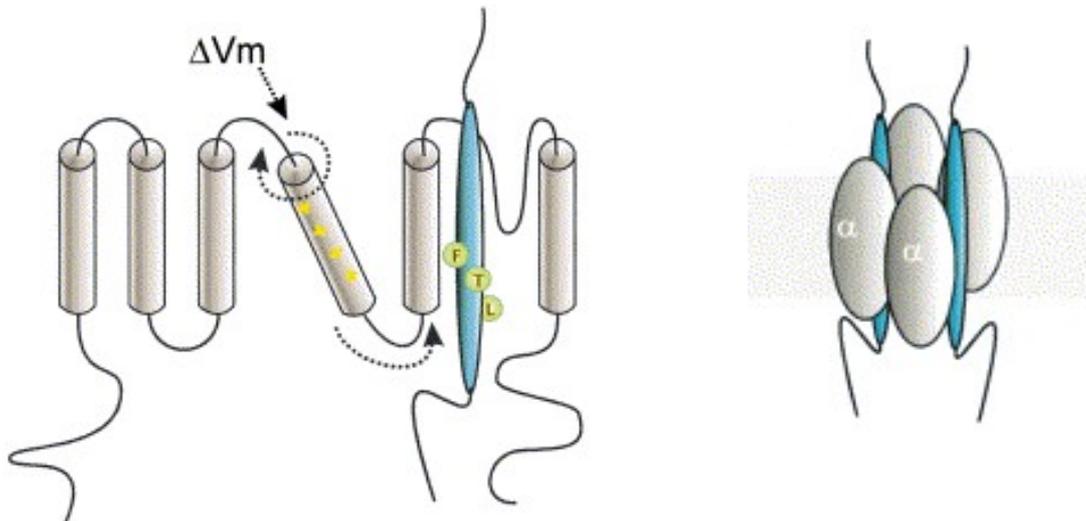
KCNE1 peut interagir avec différentes parties de la protéine canal. Des immunoprécipitations réalisées à partir de chimères de différents canaux ont permis de déterminer les zones d'interaction du canal avec KCNE1 . Cette sous-unité interagit avec la boucle P du pore, le segment S6 et la région C-terminale. Cependant, pour que KCNE1 exerce toutes ses fonctions régulatrices sur KCNQ1, l'ensemble des régions de S5 à l'extrémité C-terminale doivent être intactes. Si ces domaines sur KCNQ1 sont remplacés par ceux de KCNQ4, le courant observé sera équivalent à celui généré par KCNQ4. D'autres études réalisées à partir de mutations sur la boucle S4-S5 semblent montrer que cette zone est également nécessaire pour la régulation de KCNQ1 par KCNE1 .

Plusieurs études confirment que KCNE1 est situé près du pore de KCNQ1 . Les implications d'une telle localisation sur les capacités de KCNE1 à réguler l'activation du canal et sa sélectivité ionique seront abordées plus loin.

1.1.1.8 Stœchiométrie

La stœchiométrie du complexe KCNQ1-KCNE1 est encore un sujet débattu. Les études réalisées par Wang et al., à partir des protéines KCNQ1 et KCNE1

fusionnées dans des ratios différents, suggéraient que la stœchiométrie pouvait être soit de 1/1 soit de 1 KCNE1 pour 2 KCNQ1. Les constructions KCNE1-KCNQ1 et KCNE1-KCNQ1-KCNQ1 étaient, en effet, capables de restituer un courant de type I_{Ks} dans les cellules CHO . Dans un article plus récent, les auteurs utilisent des protéines KCNQ1 et KCNE1 modifiées rendant le courant sensible à la charybdotoxine (CTX) en fonction du nombre de KCNE1 présents dans le complexe . Ils ont alors comparé la sensibilité à la CTX du courant obtenu dans les ovocytes de Xénope transfectés avec les sous-unités libres à celle du courant obtenu à partir des protéines fusionnées KCNE1-KCNQ1 et KCNE1-KCNQ1-KCNQ1. La sensibilité du courant obtenu avec les sous-unités libres étant comparable à celle du courant obtenu avec la deuxième protéine de fusion, les auteurs en ont déduit que la stœchiométrie était de 1 KCNE1 pour 2 KCNQ1. Ce ratio a ensuite été confirmé par l'utilisation de ^3H -CTX et d'un anticorps anti-KCNE1 permettant une quantification directe des canaux et des sous-unités KCNE1, dans les cellules COS-7 transfectées avec les sous-unités libres ou les protéines de fusion . Le complexe serait donc



formé de 4 sous-unités KCNQ1 formant le canal et de 2 KCNE1 localisées près du pore (Figure 16).

Figure 16 : Représentation de l'interaction KCNQ1-KCNE1. KCNE1 est localisée dans la région du pore de KCNQ1. KCNQ1 est en gris et KCNE1 en bleu. Les trois acides aminés responsables de l'activité spécifique de KCNE1 sur l'activation du canal sont représentés en

vert sur la protéine KCNE1. A droite est représentée la stœchiométrie hypothétique du complexe : 4 sous-unités KCNQ1 pour 2 sous-unités KCNE1 .

Dans le cœur humain, il est retrouvé cinq fois plus d'ARNm correspondant à KCNQ1 que d'ARNm correspondant à KCNE1 . La relation entre quantité d'ARNm et quantité de protéines n'est pas linéaire mais il semble qu'une augmentation de l'expression d'ARNm de KCNE1 soit retrouvée chez les patients en insuffisance cardiaque chronique. L'augmentation du ratio KCNE1/KCNQ1 est corrélée avec une augmentation de l'intervalle QT chez ces patients . KCNE1 provoque, en effet, un déplacement de la courbe d'activation vers des potentiels plus positifs et ralentit l'activation dans les ovocytes de Xénope transfectés avec KCNQ1 et une quantité variable de KCNE1. Plus il y a de KCNE1 dans le complexe, plus ces modifications de paramètres sont amplifiées et le courant à un potentiel donné diminué. KCNE1 ralentissant l'activation des canaux, le courant activé au cours d'un PA (environ 300ms) sera moins intense s'il y a plus de KCNE1, même si le courant global une fois que tous les canaux sont activés (au bout de 2-3 secondes) est largement augmenté par la présence de KCNE1. L'hypothèse avancée à partir de ces résultats expérimentaux est soutenue par les simulations informatiques montrant une durée de PA plus longue et un courant I_{Ks} inférieur lorsque la quantité de KCNE1 est augmentée, pour une même quantité de KCNQ1 . Ces données soulignent l'importance du ratio protéique des complexes canaux dans le maintien des constantes électrophysiologiques des cardiomyocytes.

2.2.3 Zones spécifiques du complexe

1.1.1.9 Zone de sélectivité ionique du canal

La sélectivité aux ions potassium est déterminée par le filtre de sélectivité situé au niveau du pore. Ce filtre contient une séquence de type TxGYG, très conservée dans l'ensemble des canaux de type Shaker, qui confère sa sélectivité ionique au canal . En mesurant le potentiel d'inversion à partir d'un mélange de deux cations, Sesti et Goldstein ont pu établir, en 1998, que le canal KCNQ1 conduit préférentiellement les ions $K^+ > Rb^+ > NH_4^+ > Cs^+ \gg Li^+, Na^+$ selon cet ordre. Le courant I_{Ks} a cette même séquence de sélectivité mais la perméabilité des ions NH_4^+ et Cs^+ est légèrement

réduite en présence de KCNE1 . KCNE1 régulerait la conductance et la sélectivité du canal KCNQ1 par sa partie transmembranaire présente au sein du pore .

1.1.1.10 Le voltage-sensor

La sensibilité au potentiel membranaire d'un canal voltage-dépendant comme KCNQ1 dépend de la partie voltage-sensor du canal (Voltage-Sensor Domain, VSD) qui regroupe les segments TM S1 à S4. Cette partie de la protéine régule la conformation de la porte d'activation du canal localisée dans la région du pore (segments TM S5 et S6). Au sein du VSD, le segment S4, particulièrement chargé, peut se déplacer légèrement en fonction du potentiel de membrane . L'état ouvert ou fermé du canal dépendrait de l'interaction entre la boucle S4-S5 et la partie C-terminale du domaine S6 . Les mouvements du segment S4 en réponse aux dépolarisations membranaires (Figure 17) seraient à l'origine du changement de conformation de la porte du canal en modulant cette interaction .

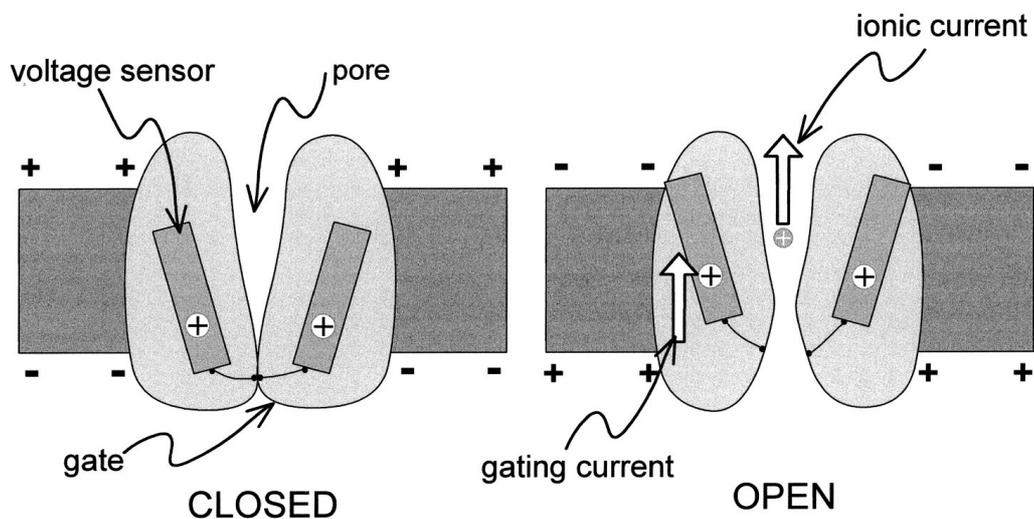


Figure 17 : Le voltage-sensor du canal KCNQ1. Vue schématique du segment S4 (voltage-sensor) au sein du canal (en gris) lorsque celui-ci est en position ouverte (droite) ou fermée (gauche). Le compartiment extracellulaire (en haut) est chargé positivement et l'intracellulaire (en bas) négativement .

KCNE1 est aussi un élément important pour la voltage-dépendance du courant I_{Ks} puisque, comme nous l'avons mentionné précédemment, c'est l'association de cette

protéine avec KCNQ1 qui confère les caractéristiques de voltage-dépendance au courant I_{Ks} . La $V_{1/2}$ de ce courant est, en effet, décalée d'environ 20-25 mV vers des potentiels plus élevés par rapport à celle du courant obtenu avec le canal KCNQ1 exprimé seul .

KCNE3 est une protéine régulatrice de KCNQ1, trouvée principalement dans les cellules épithéliales sécrétrices . Le courant obtenu par l'association de ces deux sous-unités est de grande amplitude et présente une activation presque instantanée et une dépendance au voltage très peu marquée, rendant sa courbe I-V quasi-linéaire . KCNE1 et KCNE3 régulent donc différemment l'activation et la voltage-dépendance de KCNQ1. Nakajo et al. ont réalisé un cystéine-scanning sur le segment S4 de KCNQ1 et évalué la sensibilité de ce canal muté au MTSES en fonction de la présence ou non des sous-unités KCNE1 et KCNE3. Ils ont ainsi pu mettre en évidence les effets de ces sous-unités sur les mouvements du segment S4 . D'après leurs résultats, KCNE1 stabilise le segment S4 dans une position non permissive, associée à l'état fermé du canal, et ralentit les mouvements de ce segment vers l'état permissif en réponse aux variations de potentiel. En revanche, KCNE3 stabilise ce segment dans un état permissif et le canal dans un état activé.

1.1.1.11 Domaines régulant la cinétique d'activation

En utilisant des chimères des sous-unités KCNE1 et KCNE3 et une approche de cystéine-scanning, l'équipe de Melman a pu déterminer les zones permettant la régulation de l'activation du canal par ces sous-unités. D'après leurs résultats, la cinétique d'activation liée à KCNE1 dépend de l'interaction des acides aminés (aa) F57, T58 et I59, présents dans le domaine TM de KCNE1 (Figure 16), avec les aa 338 à 340 situés dans le domaine S6 de KCNQ1 . Pour KCNE3, l'interaction se fait au même niveau sur KCNQ1 mais les conséquences sur la cinétique d'activation du canal sont très différentes et spécifiques à KCNE3. La génération de mutations dirigées sur KCNE1 leur a aussi permis de montrer l'importance de la thréonine 58 qui peut conférer à elle-seule l'activation lente et caractéristique du courant I_{Ks} . Lorsque cette seule thréonine est mutée en un acide aminé aliphatique, l'activation du courant est semblable à celle générée par KCNE3. Une autre étude, basée sur une approche de tryptophane-scanning a confirmé ces résultats .

1.1.1.12 Domaine de tétramérisation du canal

Le canal KCNQ1 est le seul canal de la famille des KCNQ à ne pouvoir s'associer qu'avec lui-même . Le motif hypothétique d'association en tétramère a été suggéré en 2000 par co-immunoprécipitation des parties C-terminales (WT ou mutées) du canal KCNQ1 . Les auteurs ont montré que la zone comprise entre les aa 589 et 620 était indispensable à la tétramérisation. Cette zone est appelée A-domain. La partie terminale de cette zone (aa 610-620) forme une hélice- α qui semble être le site permettant la tétramérisation et l'expression du canal à la membrane . Cette interaction est représentée sur la Figure 18 réalisée à partir du canal KCNQ4 qui est de la même famille que KCNQ1.

De manière intéressante, le canal muté au niveau de l'aa 178 et délété de toute la partie suivant cet aa (segment S3 à la partie C-terminale) pourrait quand même s'associer aux sous-unités WT dans les COS-7 et empêcher la montée du canal à la membrane . Il semblerait donc que les sous-unités puissent s'assembler malgré l'absence de la partie C-terminale. Ces effets ont été observés en immunofluorescence et patch-clamp mais aucune interaction directe n'a été démontrée. Il est donc possible que cette association soit indirecte et qu'une protéine intermédiaire intervienne dans cette association.

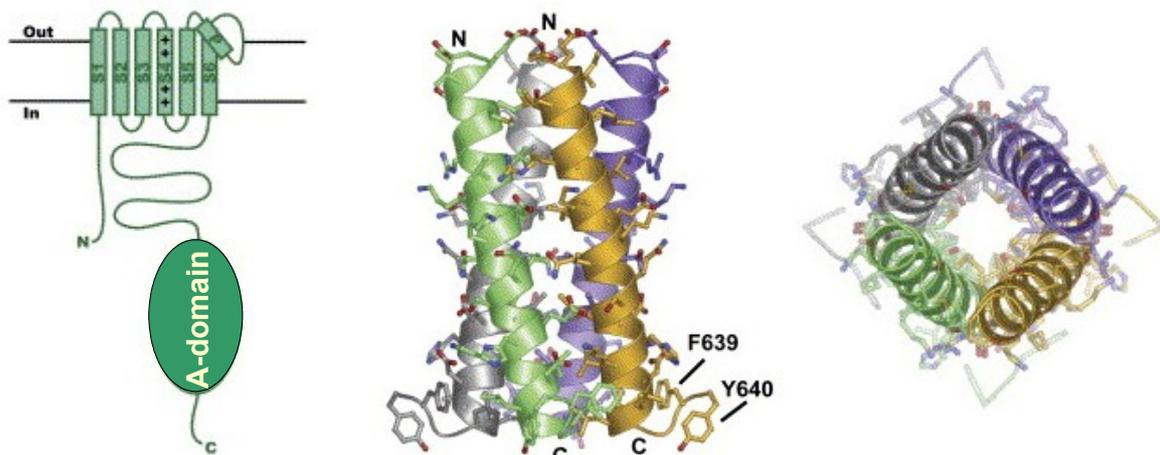


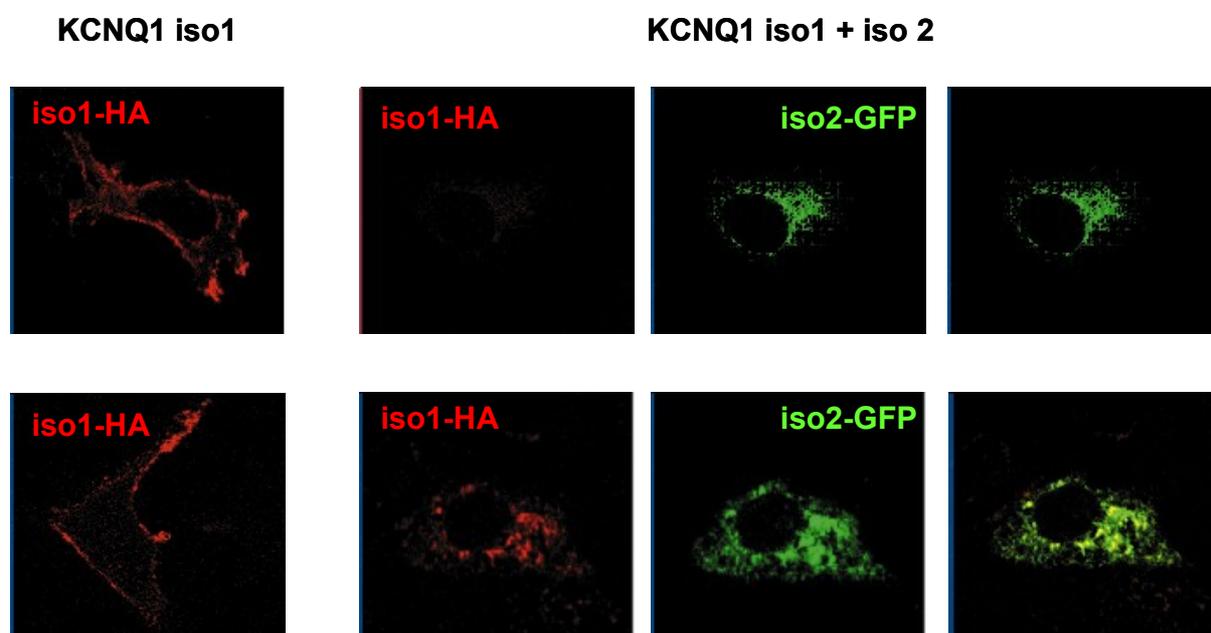
Figure 18 : Zone de tétramérisation du canal. Localisation du A-domain sur la protéine KCNQ4 et interaction des 4 hélices formées par le domaine de chaque sous-unité du tétramère, selon 2 vues différentes .

2.3 Les éléments interagissant avec le complexe KCNQ1-KCNE1

2.3.1 Protéines régulant le trafic et le maintien du canal à la membrane

1.1.1.13 L'isoforme 2 de KCNQ1

L'isoforme 2 de KCNQ1 est une isoforme du canal (isoforme 1) tronquée dans sa partie N-terminale. Cette isoforme ne forme pas de canaux fonctionnels mais elle est capable d'interagir avec l'isoforme 1. Elle agit comme un régulateur négatif du canal puisque l'expression de cette isoforme avec le complexe KCNQ1/KCNE1 dans des cellules COS-7 réduit significativement le courant formé par le complexe seul. Des images d'immunofluorescence sur ces mêmes cellules montrent que l'isoforme 2



retient l'isoforme 1 au niveau des compartiments intracellulaires (Figure 19). Ces données suggèrent d'ailleurs un rôle de la partie N-terminale, manquante dans l'isoforme 2, dans le trafic du canal vers la membrane plasmique.

Figure 19 : L'isoforme 2 de KCNQ1 retient l'isoforme 1 au niveau des compartiments intracellulaires. Marquage en rouge de l'isoforme 1 taguée HA (iso1-HA) et en vert de l'isoforme 2 couplée à la GFP (iso2-GFP), dans des cellules COS-7 non perméabilisées (haut) et perméabilisées (bas). A gauche sont représentées les cellules transfectées uniquement avec l'isoforme 1 et à droite les cellules transfectées avec les deux isoformes. Le co-marquage des deux isoformes dans les compartiments intra-cellulaires (bas, droite) est identifiable en jaune.

Chez l'homme, la variation d'expression de cette isoforme (évaluée au niveau de l'ARNm) est corrélée à l'hétérogénéité transmurale de la repolarisation ventriculaire . Elle est, en effet, plus exprimée au sein du midmyocarde et pourrait induire un courant I_{Ks} plus petit dans cette couche que dans les couches superficielles. Cette observation concorde avec la durée de PA plus longue des cellules du midmyocarde (voir paragraphe 1.1.2 et Figure 2).

1.1.1.14 La calmoduline

La technique de double hybride a permis à l'équipe de Villaroel d'identifier les sites de fixation des KCNQ à la calmoduline . La partie C-terminale contient plusieurs hélices- α dont deux contiennent des sites consensus à la fixation de la calmoduline (CaM) : l'hélice A contient un motif de type IQ (aa 375-380) et l'hélice B contient deux motifs d'interaction 1-5-10 se chevauchant (aa 509-528). D'après des données plus récentes, l'hélice D serait aussi indispensable à la fixation de la calmoduline . L'association de ces deux protéines serait indépendante du calcium et la stœchiométrie proposée est de 1 CaM pour 1 KCNQ1 .

D'après le groupe d'Attali, la calmoduline jouerait un rôle important dans la conformation de la partie C-terminale cytoplasmique en la rendant soluble . L'étude sur des mutants de la partie C-terminale a aussi permis de montrer que la calmoduline diminuait la dégradation du canal et augmentait son expression à la membrane. L'ensemble de ces données suggère que la calmoduline, en jouant sur la conformation du canal et en fonctionnant comme une chaperone, permettrait la tétramérisation du canal dans le RE et son trafic jusqu'à la membrane . Son rôle sur l'adressage serait indépendant du calcium .

La calmoduline, tout comme KCNE1, s'associerait donc très tôt avec le canal au sein de la cellule, au niveau du RE. Cette association, probablement stabilisée par la protéine KCNE1 , favoriserait le trafic du canal jusqu'à la membrane.

1.1.1.15 La protéine fhl2

Il a été montré en 2002 par l'équipe de Roden que la protéine fhl2, largement exprimée dans le cœur, jouait un rôle essentiel dans la genèse du courant. En effet, la co-expression des protéines KCNE1 et KCNQ1 dans des cellules HEK293 n'exprimant pas fhl2 aboutit à un courant très petit, sensiblement identique au courant

obtenu à partir de KCNQ1 seul. Des tests en double hybride ont permis de déterminer que la protéine fhl2 interagit avec la partie C-terminale de KCNE1 . Son rôle au sein du complexe n'est pas encore bien établi mais, puisque cette protéine co-localise avec l' α -actinine au niveau des stries Z dans les cardiomyocytes , il est possible qu'elle joue un rôle d'ancrage du complexe au cytosquelette. Cette interaction pourrait permettre de stabiliser les protéines à la membrane ou encore de déterminer leur localisation au sein de la cellule.

2.3.2 Protéines et phospholipides modifiant les propriétés du canal à la membrane

1.1.1.16 Les autres protéines de la famille des KCNE

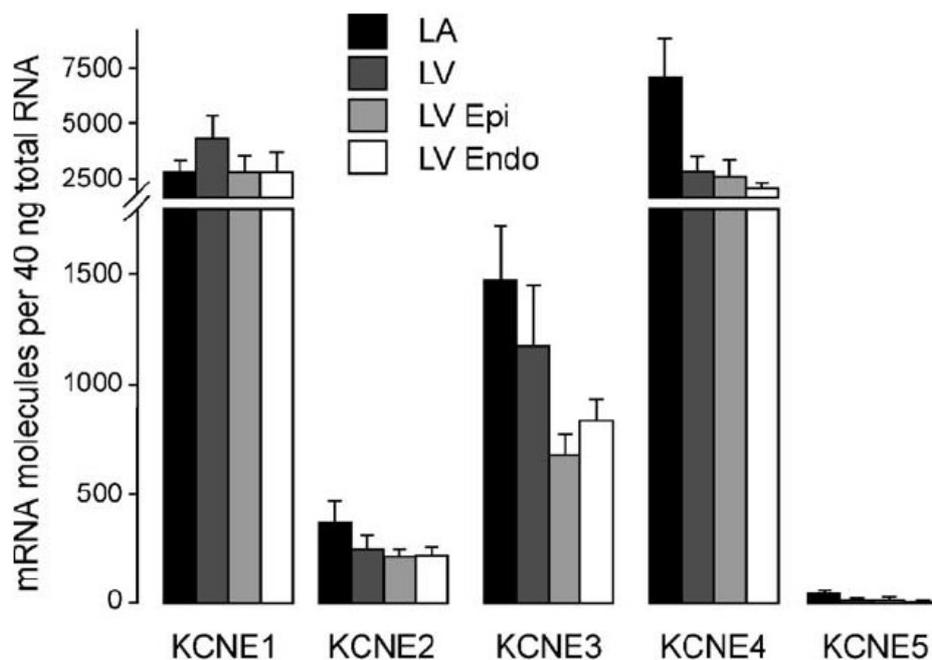


Figure 20 : Quantification absolue des ARNm codant pour les protéines de la famille des KCNE dans le cœur humain. La quantification des ADNc correspondant aux protéines ciblées a été réalisée au niveau de l'oreillette gauche (LA), du ventricule gauche total (LV) et de ses parties épicaudique (LV Epi) et endocardique (LV endo) .

Dans le cœur, l'étude quantitative des ARNm codant pour les cinq membres de la famille KCNE montre que les plus exprimés sont KCNE1, KCNE4 et KCNE3 .

KCNE2 est plus faiblement exprimé et KCNE5 est trouvé en très faible quantité (Figure 20).

L'identification des effets des différentes protéines KCNE sur le courant produit par KCNQ1 a fait l'objet de plusieurs investigations révélant des différences notables entre ces partenaires. Toutefois, elles ont quasiment toutes été réalisées dans des systèmes d'expression hétérologue et très peu d'entre elles permettent d'avoir une idée du rôle et de l'importance physiologique de ces protéines KCNE dans le cœur. De plus, ces protéines sont étudiées indépendamment et leurs effets sur le complexe KCNQ1/KCNE1 sont trop peu souvent établis. Notamment, le rôle de la protéine KCNE4, exprimée au même niveau que KCNE1, reste à déterminer bien que des données très récentes apportent des éléments de réponse.

- KCNE2 (MiRP1)

KCNE2 est une protéine reconnue pour interagir avec le canal HERG, responsable du courant I_{Kr} . Il a été montré en 2000 qu'elle pouvait aussi interagir avec le canal KCNQ1. Le courant alors obtenu est un courant instantané, de très faible amplitude et quasiment voltage-indépendant. Des mutations sur le gène de KCNE2, identifiées dans le syndrome du QT long congénital, sont capables d'induire une perte de fonction du canal KCNQ1. KCNE2 pourrait donc interagir avec le canal et son rôle sur le courant I_{Ks} est à déterminer.

D'après les expériences de Lundquist et al. sur des cellules CHO exprimant KCNQ1/KCNE1 de manière stable, la transfection transitoire de la protéine KCNE2 ne modifie pas le courant I_{Ks} . Toyoda et al. ont, en revanche, montré que KCNE2 modifiait légèrement mais significativement les propriétés du courant, en accélérant les cinétiques d'activation et en décalant la courbe d'activation vers les potentiels plus dépolarisés. Ces données, obtenues sur des cellules COS-7 transfectées transitoirement, suggèrent un rôle inhibiteur de cette sous-unité sur le complexe KCNQ1-KCNE1. Le fait que l'expression de KCNE2 aboutisse à des effets différents sur I_{Ks} en fonction du modèle d'étude et/ou de la méthode de transfection motive l'étude de cette interaction dans les cardiomyocytes. Dans les cellules COS-7, l'acide méfénamique ralentit nettement la cinétique de désactivation du courant produit par KCNQ1/KCNE1 mais ne modifie quasiment pas le courant produit par KCNQ1/KCNE2. Son action sur le complexe composé des trois partenaires ou sur le courant I_{Ks} enregistré sur cardiomyocytes de cobaye aboutit à un moindre effet que

sur le courant KCNQ1/KCNE1. Ces résultats apportent un argument de plus en faveur de l'interaction KCNQ1/KCNE2 . Toutefois, à ce stade, il est difficile de savoir si la protéine KCNE2 est capable de se fixer au complexe KCNQ1/KCNE1 ou s'il existe une compétition entre les sous-unités KCNE1 et KCNE2.

Pour Wu et al., le courant produit par les trois sous-unités exprimées ensemble dans les ovocytes de Xénope ou les COS-7 est diminué par rapport au courant KCNQ1/KCNE1 et les cinétiques ne sont pas modifiées . Un co-marquage sur cardiomyocytes de rat leur a permis de mettre en évidence que les trois protéines co-localisaient à la surface membranaire et dans les tubules-T. Une co-immunoprécipitation entre les trois sous-unités a confirmé l'hypothèse d'un complexe tripartite.

Toutefois, KCNE2 étant faiblement exprimée dans le cœur humain, l'association de cette sous-unité au complexe KCNQ1/KCNE1 reste certainement exceptionnelle. Par contre, une mutation accentuant ses effets inhibiteurs sur le courant ou une augmentation de son expression pourrait être à l'origine d'une diminution du courant pouvant aboutir à des troubles du rythme.

- KCNE3 (MiRP2)

Comme nous l'avons vu plus haut, KCNE3 peut aussi former un complexe avec KCNQ1, particulièrement dans les cellules digestives sécrétrices . Le courant est alors de grande amplitude, d'activation très rapide et quasiment voltage-indépendant . Dans les cellules CHO (chinese hamster ovary) exprimant de manière stable le complexe KCNQ1/KCNE1, l'expression transitoire de KCNE3 accélère nettement les cinétiques du courant et modifie sa voltage-dépendance . Le même effet est observé lors d'une transfection transitoire des trois sous-unités dans ces mêmes cellules . Ce type de transfection réalisée sur ovocytes de Xénope aboutit à un courant mixte ayant une composante propre à KCNE3 (canaux ouverts aux potentiels négatifs avec une activation instantanée) et une à KCNE1 (activation lente aux potentiels positifs) . KCNE1 et KCNE3 agissent sur les mêmes acides aminés de KCNQ1 pour réguler sa cinétique d'activation (voir paragraphe 2.2.3). Il est alors possible que ces deux protéines soient en compétition pour interagir avec le canal. L'étude électrophysiologique en cellule entière ne permet pas de dire si les protéines KCNE1 et KCNE3 peuvent faire partie d'un même complexe avec KCNQ1 ou si elles forment deux complexes différents avec le canal.

L'utilisation de protéines modifiées (KCNQ1, KCNE1, KCNE3) pour être plus ou moins sensibles à la charybdotoxine et pour permettre leur fixation irréversible à cette molécule a permis à Morin et Kobertz de déterminer si les trois sous-unités pouvaient faire partie d'un même complexe, dans les ovocytes de Xénope transfectés transitoirement. Cette stratégie permet de dissocier les complexes tripartites des complexes bipartites (KCNQ1-KCNE1 ou KCNQ1-KCNE3). Ces auteurs ont ainsi montré que les trois sous-unités faisaient partie d'un même complexe dans ces cellules et qu'aucun complexe KCNQ1-KCNE3 ne pouvaient se former dans ces conditions. L'analyse fonctionnelle de ces complexes tripartites a aussi révélé que KCNQ1 était plus sensible à KCNE3 qu'à KCNE1.

A priori, les cinétiques et la voltage-dépendance du courant I_{Ks} enregistré dans les cardiomyocytes sont plus proches des paramètres du courant obtenu à partir des sous-unités KCNQ1 et KCNE1 que des trois sous-unités (avec KCNE3) exprimées ensemble. Cela suggère qu'une faible quantité de sous-unités KCNE3 se lie au complexe KCNQ1/KCNE1. De fait, la quantité d'ARNm codant pour KCNE3 est 3 à 4 fois inférieure à celle des ARNm codant pour KCNE1 dans le cœur (Figure 20). Il est possible que l'effet mineur de KCNE3 sur le complexe soit lié à cette différence d'expression. Une augmentation de l'expression de cette sous-unité pourrait, en revanche, modifier les propriétés du canal et aboutir à des troubles de la repolarisation (raccourcissement du PA) ou, au contraire, constituer une base de traitement pour les pathologies du type syndrome du QT long où la repolarisation est altérée.

- KCNE4 (MiRP3)

Comme le montre la Figure 20, la quantité d'ARNm correspondant à KCNE4 est au moins aussi importante que celle correspondant à KCNE1. L'étude de son effet sur le courant semble donc aussi importante que celle concernant KCNE1. KCNE4 diminue le courant induit par KCNQ1 dans les ovocytes de Xénope ou les COS-7 en décalant la courbe d'activation vers des potentiels bien plus positifs. Les effets de cette sous-unité sur le complexe KCNQ1/KCNE1 sont, par contre, plus controversés. D'après Lundquist et al., la transfection transitoire de KCNE4 sur des cellules CHO exprimant KCNQ1/KCNE1 de manière stable inhibe complètement le courant. Pour les équipes de Bendahou et de Morin, en revanche, le courant I_{Ks} est peu modifié par la co-expression de KCNE4, que ce soit dans des cellules COS-7 ou des ovocytes

de Xénope . Il est assez difficile d'expliquer la différence observée entre les études. Il existe une différence dans le modèle d'étude et la transfection (permanente ou transitoire) mais la différence majeure réside certainement dans le ratio des protéines exprimées. Dans les études réalisées sur lignée stable de CHO, la quantité de KCNE4 transfectée transitoirement est certainement supérieure aux quantités de protéines KCNQ1 et KCNE1 présentes de manière stable dans les cellules. Bendahou et Morin ont utilisé un ratio KCNQ1/KCNE1/KCNE4 de 1:1:1 et 4:1:0.2, respectivement. Il est alors possible que l'affinité du canal pour les deux sous-unités soit différente (plus faible pour KCNE4 que pour KCNE1) et que l'affinité KCNQ1-KCNE4 soit augmentée par une surexpression de KCNE4 par rapport à KCNE1. Cette hypothèse a été confirmée par les expériences de Morin et al. à l'aide des protéines modifiées et de la sensibilité du canal à la charybdotoxine . D'après eux, KCNE4 peut s'associer au complexe KCNQ1/KCNE1 et la quantité de KCNE4 au sein du complexe dépend clairement du ratio KCNE4/KCNE1, suggérant une affinité plus faible du canal pour cette sous-unité. Cependant, l'association de cette protéine au complexe KCNQ1/KCNE1 ne modifierait pas les cinétiques ou les propriétés d'activation du courant I_{Ks} . En tenant compte de ces données et de la quantité similaire d'ARNm codant pour KCNE1 et KCNE4, on peut alors envisager que le courant I_{Ks} enregistré dans les cardiomyocytes est généré par le complexe KCNQ1/KCNE1 et/ou par le complexe formé des trois partenaires KCNQ1/KCNE1/KCNE4 (Figure 21).

En conclusion, KCNQ1 - organisé en tétramère - est capable de former un complexe hétéromérique avec au moins deux sous-unités dont KCNE1, KCNE3 et/ou KCNE4.

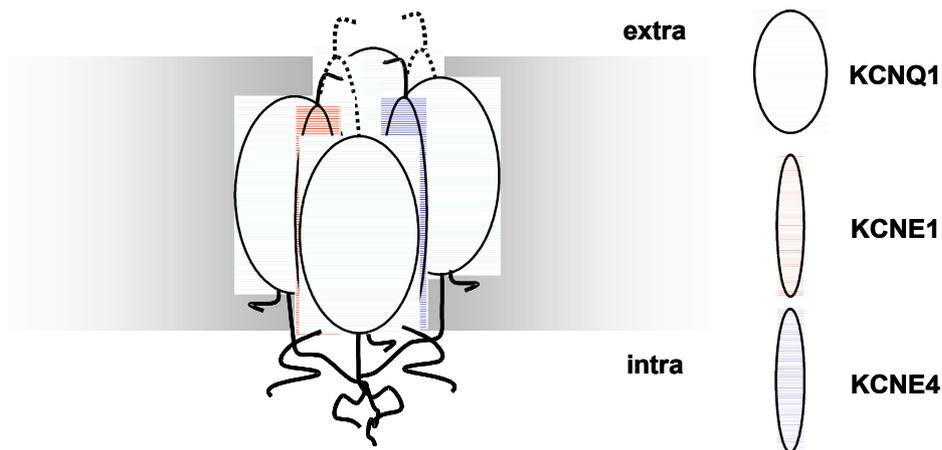


Figure 21 : Représentation hypothétique du complexe formé par KCNQ1, KCNE1 et KCNE4. Au moins deux sous-unités KCNE sont associées au canal (en pointillés sont représentées les sous-unités hypothétiques).

1.1.1.17 La calmoduline et la sensibilité au calcium

Nous avons vu précédemment que la calmoduline (CaM) jouait un rôle dans la tétramérisation et l'adressage du canal à la membrane, indépendamment du calcium. D'après certains auteurs, la calmoduline aurait aussi un rôle sur le courant lui-même et notamment sur sa sensibilité au calcium.

Différentes études réalisées sur ovocytes de Xénope ont montré que le courant généré par le complexe KCNQ1/KCNE1 était sensible au calcium. Une augmentation de sa concentration intracellulaire par la ionomycine aboutit à une augmentation du courant et à une accélération des cinétiques. Inversement, une diminution de sa concentration par le chélateur BAPTA réduit le courant. Alors que, pour la majorité des auteurs, l'effet positif du calcium sur le courant est visible même lorsque KCNQ1 est exprimé seul, pour Boucherot cet effet ne serait visible qu'en présence de KCNE1 (ou KCNE3). En accord avec ces différentes données et l'implication de la calmoduline dans cette sensibilisation au calcium, des antagonistes de la CaM sont capables d'inhiber le courant KCNQ1/KCNE1 dans ces mêmes cellules. Toutefois, comme nous l'avons vu plus haut, il est possible que cette inhibition du courant soit liée à une diminution de l'expression des canaux à la membrane plutôt qu'à une perte de l'effet de la calmoduline et du calcium sur le courant lui-même. L'utilisation d'un mutant de la calmoduline incapable de fixer le calcium (CaM₁₂₃₄) a permis à l'équipe de Pitt de mettre en évidence le rôle du calcium sur la calmoduline associée

au canal KCNQ1. La fixation de la calmoduline sur KCNQ1 est indépendante du calcium (voir paragraphe 2.3.1) mais les effets de la CaM sur le courant dépendent de sa capacité à fixer cet ion. En effet, les ovocytes transfectés avec KCNQ1 et la forme mutée de la CaM expriment un courant similaire aux cellules transfectées sans CaM. Ce courant est plus petit que celui observé dans les cellules transfectées avec la forme WT de la CaM .

En revanche, l'étude réalisée par l'équipe de Shapiro sur les CHO transfectées transitoirement avec KCNQ1, KCNE1 et la calmoduline suggère que le courant I_{Ks} n'est sensible ni à la calmoduline, ni au calcium, contrairement aux autres canaux KCNQ étudiés . En effet, le courant est le même dans les cellules transfectées avec ou sans CaM WT ou mutée et l'ajout de calcium ou d'ionomycine ne modifie pas le courant. Est-il alors possible que l'effet observé dans les ovocytes de Xénope soit lié à un régulateur qui n'existe pas dans les CHO ? D'autres études sur des cellules de mammifères ou des cardiomyocytes semblent nécessaires pour répondre à cette question et déterminer les effets du calcium et de la calmoduline sur le courant I_{Ks} natif.

1.1.1.18 Le canal HERG

Il a été montré par co-immunoprécipitation et GST-pulldown, à partir de cellules CHO transfectées et de tissu cardiaque de chien, que les sous-unités KCNQ1 et HERG pouvaient s'associer . Un immunomarquage de ces deux canaux réalisé sur cardiomyocytes de chien a montré leur colocalisation. Cette association semble augmenter la quantité de canaux HERG à la membrane et la densité du courant I_{Kr} . De plus, le courant I_{Kr} cardiaque est plus proche de celui enregistré lorsque les deux sous-unités sont exprimées dans les CHO que lorsque le canal HERG seul est exprimé, suggérant une association entre ces deux canaux dans les cardiomyocytes. Toutefois, si cette association modifie le courant attribué à HERG, aucun changement du courant I_{Ks} n'a pu être observé.

1.1.1.19 Le PIP₂

Le PIP₂ (phosphatidylinositol-4,5-diphosphate) est un phospholipide membranaire intervenant dans des voies de régulation diverses et capable de moduler des canaux ioniques et des transporteurs membranaires . En 2003, le rôle du PIP₂ sur le courant I_{Ks} a été mis en évidence par Loussouarn, au sein de notre équipe . Lorsque le courant I_{Ks} est enregistré en patch-clamp dans les conditions cellule entière percée ou giant-patch, une diminution du courant dépendante du temps (rundown) peut être observée. Cette diminution peut être ralentie par l'application de PIP₂ et supprimée par l'application de PIP₂ et MgATP. Le PIP₂ modifie les propriétés du courant : il ralentit ses cinétiques de désactivation et décale la courbe d'activation vers les potentiels plus négatifs. L'application d'un modèle Markovien, élaboré pour le canal ATP-dépendant (Kir6.2/SUR1) et prenant en compte les changements conformationnels du canal, au complexe KCNQ1/KCNE1 suggère que les effets du PIP₂ sur le courant résultent d'une stabilisation du canal à l'état ouvert.

La zone d'interaction entre le canal et le PIP₂ n'est pas encore bien établie. Ce phospholipide étant chargé négativement, il est fort probable que les zones d'interaction sur KCNQ1 contiennent des acides aminés chargés positivement, comme c'est le cas pour le canal Kir6.2 . En accord avec cette hypothèse, l'étude de trois mutants du canal KCNQ1 mutés sur des résidus arginine (chargés positivement) et impliqués dans le syndrome du QT long congénital a révélé une affinité réduite de ces mutants pour le PIP₂ . Les mutants R539W et R555C sont situés sur la partie C-terminale du canal et R246H sur la boucle S4-S5. Lorsqu'ils sont co-exprimés avec KCNE1 dans des cellules COS-7, ils induisent un courant diminué par rapport au courant généré par les sous-unités WT. Le décalage vers des potentiels positifs de la courbe d'activation, induit par ces mutants, participe à la perte de fonction du canal.

2.3.3 Protéines intervenant dans les voies de signalisation régulant le courant

1.1.1.20 Réponse du courant à une stimulation de la PKA

- Les AKAP associées à la PKA et KCNQ1

Il a été montré au laboratoire, en 2001, que la réponse du courant I_{Ks} à la PKA nécessitait une protéine d'ancrage de cette kinase, telle que l'AKAP79 ou l'AKAP15/18. Toutefois, l'effet observé même en présence de ces AKAPs restait modeste par rapport à l'augmentation du courant observée dans les cardiomyocytes. Dans une étude sur le complexe nécessaire à la phosphorylation du canal KCNQ1 par la PKA, Marx et al. ont identifié yotiao comme étant l'AKAP cardiaque indispensable à l'activation de I_{Ks} . Ils ont montré par co-immunoprécipitation que cette protéine est capable d'interagir avec la partie C-terminale du canal, sur le motif appelé Leucine Zipper (aa 588 à 616). L'expression du concatémère KCNQ1-KCNE1 et de yotiao dans des CHO induit un courant qui est augmenté de 2 à 3 fois lorsque du 8-Br-cAMP (un analogue de l'AMPc) et de l'acide okadaïque (un inhibiteur des phosphatases) sont appliqués. Dans les cellules n'exprimant pas yotiao, aucune augmentation du courant n'est visible. Une immunoprécipitation de KCNQ1 montre que yotiao permet l'ancrage de la sous-unité régulatrice RII de la PKA mais aussi l'ancrage de la phosphatase 1 (PP1).

- Les sites de phosphorylation par la PKA

Le premier site de phosphorylation par la PKA à avoir été identifié est situé au niveau de la sérine 27, sur la partie cytoplasmique N-terminale du canal. Pour Marx et al., cette sérine est l'unique site de phosphorylation puisque sa mutation en alanine empêche complètement la réponse du courant à la PKA, dans des CHO transfectées avec les protéines humaines KCNQ1, KCNE1 et yotiao. Cependant, dans des ovocytes de Xénope transfectés avec la protéine KCNQ1 de rat, la mutation de cette sérine en alanine n'empêche pas la réponse à la PKA. Il est possible qu'à la différence de la protéine KCNQ1 humaine, la protéine de rat possède un autre site de phosphorylation. Une autre explication réside dans le fait que les ovocytes de Xénope possèdent des canaux KCNQ1 endogènes qui répondent certainement à la PKA (non testé dans cette étude). Il est aussi possible qu'une protéine régulatrice du canal n'existant pas dans les CHO soit phosphorylée dans les ovocytes et modifie les propriétés du canal.

Une autre étude réalisée plus tard sur des CHO démontre la présence de deux autres acides aminés phosphorylables par la PKA . A la différence des premières études sur les CHO, les auteurs obtiennent un courant partiellement augmenté par l'activation de la PKA lorsque la sérine 27 est mutée en alanine et le courant ne répond plus du tout à la stimulation quand les trois cibles sont simultanément mutées (S27A, S468A et T470A). Les protocoles de stimulation de la PKA (doses, délai) et d'enregistrement des courants diffèrent entre les deux études réalisées sur les CHO et peuvent être à l'origine des divergences observées . Les études réalisées par Yang ont nécessité deux fois plus de temps d'incubation avec les activateurs de la PKA que celles réalisées par Marx (30 et 15 minutes, respectivement). Il est possible que les sérine 468 et thréonine 470 soient moins accessibles ou aient une moins bonne affinité à la PKA que la sérine 27. Il est aussi possible que les effets médiés par la phosphorylation de la sérine 27 soient visibles plus précocément que ceux médiés par la phosphorylation de l'autre site. Ainsi, lors d'une application courte, seule l'augmentation du courant relative à la phosphorylation du premier site aurait lieu alors qu'une application plus longue permettrait de visualiser celle relative à tous les sites de phosphorylation (voir aussi la discussion de l'article 1, dans la partie résultats).

- La phosphorylation de yotiao

L'équipe de Kass a montré que dans les cellules exprimant KCNE1, yotiao et le canal muté KCNQ1-S27D (ou KCNQ1-S27E) simulant une phosphorylation, le courant résultant est plus grand que dans les cellules n'exprimant pas yotiao ou lorsque le site d'association à yotiao est muté sur KCNQ1 . Le courant obtenu à partir de ces dernières cellules est d'ailleurs similaire au courant obtenu dans les cellules transfectées avec la forme WT du canal, KCNE1 et yotiao, avant stimulation de la PKA. Tous ces résultats suggèrent que l'augmentation du courant, lorsque le canal est phosphorylé, nécessite l'association de yotiao au canal. Cette même équipe a identifié récemment un site de phosphorylation par la PKA sur l'AKAP yotiao. La phosphorylation de la sérine 43 de yotiao serait indispensable à son action sur le courant I_{Ks} . Si cette sérine est mutée en alanine (non phosphorylable), le courant I_{Ks} dans les cellules CHO ne répond plus à une stimulation de la PKA, que la sérine 27 du canal soit pseudo-phosphorylée (S27D) ou non.

- L'implication de KCNE1

KCNE1 participe à cette régulation puisque, selon l'équipe de Kass, la réponse à une telle stimulation dépend de la quantité de KCNE1 présente dans le complexe. Cette évaluation a été réalisée sur le courant obtenu à partir de protéines fusionnées (ratio KCNQ1/KCNE1 variable) dans des cellules CHO. Il existe aussi des mutations de KCNE1 capables de supprimer la réponse du courant à la PKA, malgré la phosphorylation maintenue du canal, confirmant alors un rôle de cette sous-unité dans cette réponse. Cependant, aucun site de phosphorylation par la PKA n'a été mis en évidence sur KCNE1.

En résumé, la réponse du courant à une stimulation de la PKA (sous stimulation β -adrénergique, par exemple) nécessite 1) l'association KCNQ1-yotiao, 2) la phosphorylation du canal, 3) la phosphorylation de yotiao, 4) la présence de KCNE1 et 5) la présence des microtubules intacts, selon les résultats obtenus au cours de ma thèse (premier article présenté dans les résultats). Si l'une de ces conditions n'est pas remplie, le courant n'augmente pas malgré la stimulation de la PKA.

1.1.1.21 Réponse du courant à une stimulation de la PKC

Le canal KCNQ1 contient 9 sites de phosphorylation potentiels par la PKC mais 4 seulement semblent nécessaires pour que le courant augmente après phosphorylation par cette kinase. D'après Kathofer et al., la mutation en alanine des 4 sites phosphorylables S409, S464, T513 et S577 sur la partie C-terminale, aboutit à une diminution importante de la réponse à l'isoproterenol, dans les ovocytes transfectés avec KCNQ1, KCNE1 et le récepteur β 3-adrénergique. D'après ces auteurs, cette réponse à l'isoproterenol dans ce type de système serait liée à la PKC puisqu'un inhibiteur de cette kinase inhibe la réponse à l'isoproterenol.

Pour ce type de régulation aussi, la sous-unité KCNE1 peut modifier la réponse. Dans les ovocytes de Xénope transfectés avec cette protéine provenant du cobaye, l'application d'un activateur de la PKC aboutit à une augmentation du courant. Si ces cellules sont transfectées avec la forme mutée N102S de KCNE1, le courant diminue en réponse à la stimulation.

Les isoformes de la PKC identifiées comme étant à l'origine de la réponse du courant KCNQ1/KCNE1 dans l'ovocyte de Xénope sont les isoformes PKC β II et PKC ϵ .

Comme pour la PKA, il existe des protéines d'ancrage qui permettent à la PKC activée d'être localisée près de son substrat. Les protéines de la famille RACK (receptors for activated C-kinase) de type RACKI et RACKII sont les protéines d'ancrage spécifiques des isoformes PKC β II et PKC ϵ , respectivement. Contrairement aux AKAP, aucune protéine RACK n'a pu être associée au complexe KCNQ1/KCNE1, pour l'instant.

1.1.1.22 La PKG

L'étude réalisée par Shimizu et al. a permis de mettre en évidence un rôle de la PKG sur le courant. Dans cette étude réalisée sur des cellules sinuales de cœur de cobaye, l'application d'un analogue du GMPc, le 8-Br-GMPc, aboutit à une augmentation d'environ 48% du courant I_{Ks} . Cette augmentation n'est plus visible si un inhibiteur de la PKG (KT-5823) est appliqué en même temps. Cependant, aucune donnée n'est disponible concernant la phosphorylation du canal par la PKG.

La PKG et la PKA ont des structures similaires et il est fort probable que des protéines d'ancrage comme les AKAPs soient nécessaires à la régulation par la PKG mais là encore, aucune donnée n'est disponible pour la régulation du courant I_{Ks} .

2.3.4 Protéines intervenant dans la dégradation du canal

Les canaux ioniques, comme toute protéine, peuvent être dégradés à différents niveaux dans la cellule (Figure 22). Une mauvaise conformation, ou glycosylation, ou un défaut de polymérisation dans le RE, induite par une mutation par exemple, peut induire la dégradation du canal par la voie ERAD (endoplasmic reticulum associated degradation). Cette voie comprend deux principales étapes : 1) la rétrotranslocation de la protéine, permettant sa solubilisation et sa sortie du RE dans le cytoplasme, et 2) sa dégradation par le protéasome. Le protéasome 26S est formé de plusieurs sous-unités et agit comme une protéase ATP-dépendante.

Les protéines bien conformées et assemblées sont amenées vers l'appareil de Golgi et la membrane plasmique par des vésicules de transport et d'exocytose. Les protéines en surface peuvent être internalisées puis dégradées par les lysosomes ou protéasomes ou bien recyclées .

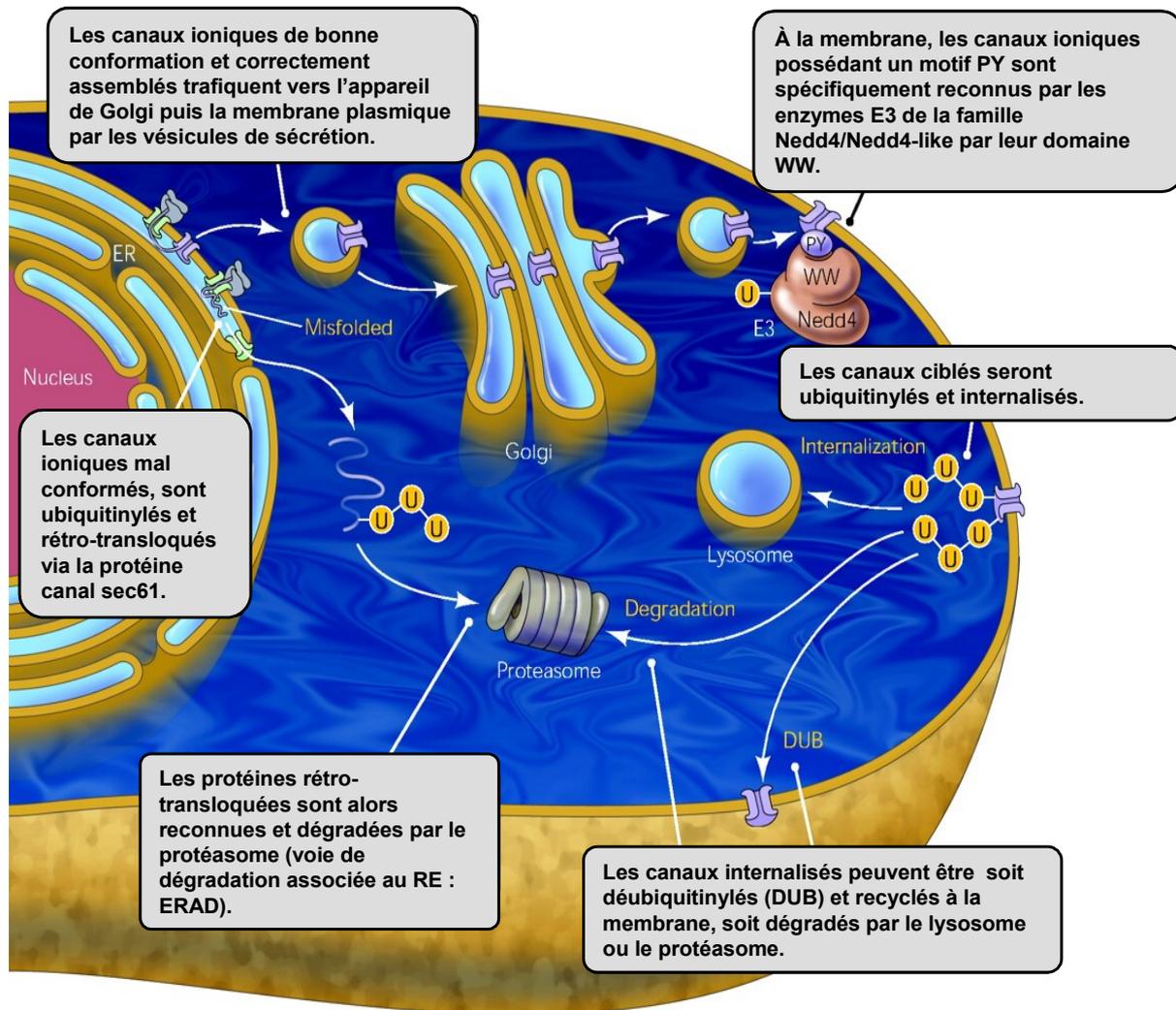
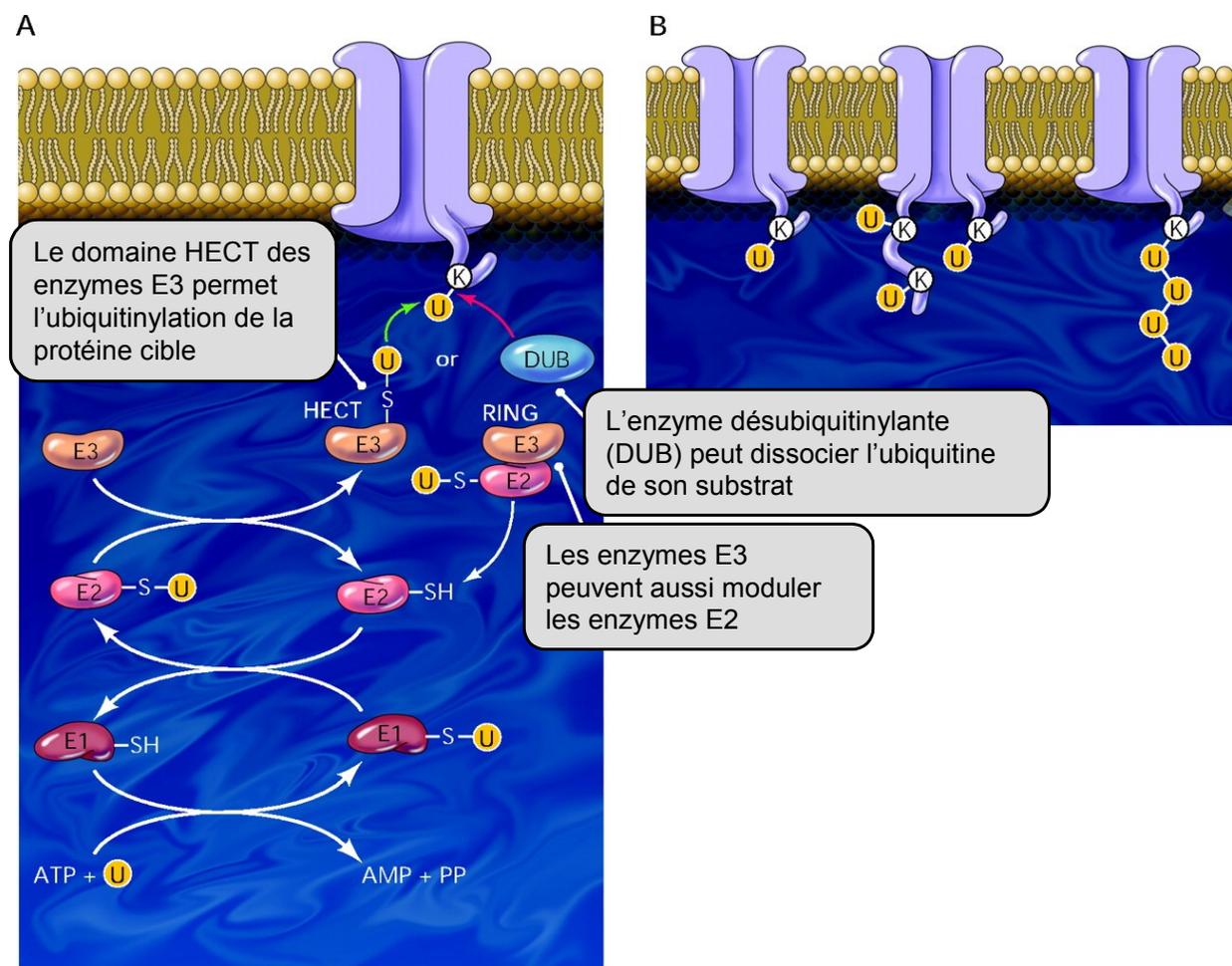


Figure 22 : Dégradation des canaux ioniques et rôle de l'ubiquitinylation .

Seules les protéines ubiquitinylées peuvent être dégradées par le protéasome. Les ubiquitine-ligases (enzymes E3) reconnaissent les protéines cibles par leur domaine de fixation spécifique et permettent aux ubiquitines reconnues par le protéasome de se fixer sur la protéine cible, grâce à leur domaine catalytique HECT . L'ubiquitinylation se fait sur un résidu lysine. Les enzymes E1 activant l'ubiquitine et E2 permettant son transfert de l'enzyme E1 à E3, interviennent en amont de cette

ubiquitinylation (Figure 23). L'enzyme E2 peut parfois elle-même ubiquitinyler la protéine lorsqu'elle est associée à une enzyme E3 contenant un domaine RING .

Figure 23 : Ubiquitinylation des canaux ioniques. A : les enzymes activatrices (E1), de transfert (E2) et liant (E3) l'ubiquitine (U) permettent l'ubiquitinylation du canal. B : les canaux ioniques peuvent être monoubiquitinylés (gauche), multiubiquitinylés (milieu) ou polyubiquitinylés (droite) sur les résidus lysine (K) .



Les protéines peuvent être ubiquitinylés de trois manières selon le nombre et l'agencement des ubiquitines sur leur substrat (Figure 23B). L'enzyme E4 jouerait un rôle dans l'élongation de certaines chaînes d'ubiquitines . Des études ont montré que l'accrochage d'au moins quatre molécules d'ubiquitine en chaîne (polyubiquitinylation) est nécessaire pour que la protéine cible soit reconnue et dégradée par le protéasome . Les ubiquitines sont reliées entre les résidus lysine 48

(K48) et glutamine 76 (G76). Ce détail a son importance puisque la manière dont sont assemblées les ubiquitines constitue un signal de reconnaissance par le protéasome . Si les protéines sont monoubiquitylées ou si les ubiquitines sont reliées par leur lysine 63 et glutamine 76, les protéines seront internalisées et orientées vers une voie ne faisant pas intervenir le protéasome .

Dans le génome humain, il existe une seule enzyme E1, environ cinquante E2 et plus de quatre cents ubiquitine-ligases potentielles . Des ubiquitine-ligases (E3) de la famille Nedd4/Nedd4-like, et particulièrement la protéine Nedd4-2, ont été identifiées comme régulant, entre autres, la dégradation du canal sodique cardiaque Nav1.5 . L'étude de leur liaison sur le canal sodique épithélial ENaC avait permis, précédemment, de mettre en évidence que ces ubiquitine-ligases se lient spécifiquement, par leur site d'interaction protéique WW, aux protéines possédant un motif PY (XPPXY), comme indiqué sur la Figure 22 .

Jusqu'à récemment, aucune donnée n'était disponible sur la régulation de la dégradation du canal KCNQ1 à la membrane. Ce canal possédant un motif PY (LPTYEQL) en partie C-terminale, il paraissait intéressant d'étudier si la dégradation de ce canal pouvait ou non être modulée par les ubiquitine-ligases de la famille Nedd4/Nedd4-like. En collaboration avec l'équipe d'Hugues Abriel j'ai pu, au cours de ma thèse, mettre en évidence l'implication de l'ubiquitine-ligase Nedd4-2 dans la régulation du courant I_{Ks} dans les cardiomyocytes de cobaye (voir l'article 2 dans les résultats).

3 Implication des partenaires de KCNQ1 dans les pathologies héréditaires cardiaques

De nombreuses mutations sur le gène *KCNQ1* ont été retrouvées dans des pathologies diverses. Les trois principales pathologies cardiaques impliquant le canal KCNQ1 muté sont le syndrome du QT long, qui résulte d'une perte de fonction du canal, et le syndrome du QT court et la fibrillation auriculaire qui résultent d'un gain de fonction du canal. Nous venons de voir que le canal fonctionne au sein d'un complexe multi-protéique et que les différents partenaires régulant la fonction du

canal agissent à différents niveaux. Dans cette partie, je compte mettre en avant le rôle des protéines régulatrices dans les pathologies cardiaques impliquant KCNQ1 ou ses partenaires.

3.1 Perte de fonction du canal : le syndrome du QT long congénital

3.1.1 Description et traitement de la pathologie

1.1.1.23 Signes cliniques du syndrome du QT long

Le syndrome du QT long (LQTS) se caractérise, sur les tracés électrocardiographiques (ECG), par un allongement de l'intervalle QTc au-delà de 440 ms et par la survenue de torsades de pointes (voir annexe 1). Cette pathologie peut aboutir à des fibrillations entraînant la mort subite. Le LQTS peut être congénital ou acquis lors, par exemple, de la prise de certaines substances pharmacologiques. La prévalence du LQTS congénital est estimée entre 1/3000 et 1/7000 en fonction de la région géographique .

Deux formes de LQTS ont été cliniquement décrites : la forme Jervell et Lange-Nielsen (JLN) et la forme Romano-Ward (RW) . La première forme est associée à une surdité et se transmet selon un mode récessif (les deux allèles sont mutés) alors que la seconde, beaucoup plus fréquente, est transmise selon un mode dominant (un seul allèle muté).

Le diagnostic se fait, entre autres, sur l'allongement de l'intervalle QTc. Toutefois, chez un même individu, la durée de cet intervalle peut varier d'un moment à l'autre et son allongement n'est pas toujours visible sur l'ECG. Il est donc nécessaire de tenir compte des signes cliniques (syncope, surdité...) et du contexte familial (membre présentant un LQTS, morts subites inexplicables...) en plus des données fournies par l'ECG (intervalle QT, torsades de pointes, forme de l'onde T...) .

1.1.1.24 Les différents types de syndrome du QT long

Actuellement, pour la forme RW, 10 types de LQTS se distinguent cliniquement et génétiquement (LQTS1 à 10). Les gènes impliqués et les courants modifiés sont résumés dans le Tableau 1. Les types 1 et 2 sont les plus fréquents (50% et 30-40% respectivement), le type 3 a une prévalence de 5 à 10% et les autres types sont très

rare. Les types 1, 2, 3, 7 et 8 ont pour origine génétique des mutations sur des canaux ioniques, les types 5, 6 et 10 des mutations sur des protéines régulatrices de canaux ioniques et les types 4 et 9 sur des protéines d'ancrage ou de structure. L'ankyrine B est une protéine d'ancrage à la membrane plasmique. La localisation de différents canaux et pompes ioniques dépendent de cette protéine qui permet de rapprocher les différents acteurs nécessaires au couplage excitation-contraction. Une mutation sur cette protéine modifie la localisation de la pompe Na/K-ATPase et de l'échangeur Na/Ca dans le sarcolemme et celle du récepteur à l'IP3 dans le RE . Les cavéolines sont, quant à elles, des protéines intervenant dans la formation des cavéoles qui sont des microdomaines membranaires. Une mutation sur la cavéoline-3 a été identifiée dans le syndrome du QT long et serait à l'origine d'une augmentation du courant sodique. Les canaux Nav1.5 sont, en effet, situés au niveau des cavéoles .

Pour les formes JLN, seuls les gènes *KCNQ1* et *KCNE1* ont été impliqués. La surdité bilatérale associée au syndrome du QT long cardiaque, observée dans cette forme, s'explique par la présence du complexe *KCNQ1/KCNE1* dans l'oreille interne. Ce complexe est localisé au niveau de la membrane apicale des cellules impliquées dans la sécrétion de l'endolymphe .

Tableau 1 : Gènes identifiés dans le syndrome du QT long congénital (LQTS). JLN = Syndrome de Jervell et Lange-Nielsen. .

Type	%	Locus	Gène	Protéine (Fonction)	Effet majeur
LQTS1	~ 50%	11p15.5	<i>KCNQ1</i>	KvLQT1, Kv7.1 (canal potassique)	↓ I _{Ks}
LQTS2	30-40%	7q35-q36	<i>KCNH2</i>	HERG (canal potassique)	↓ I _{Kr}
LQTS3	5-10%	3p21	<i>SCN5A</i>	Na _v 1.5 (canal sodique)	↑ I _{Na}
LQTS4	rare	4q25-q27	<i>ANK2</i>	ankyrine-B (protéine d'ancrage)	multiple
LQTS5	<1-5%	21q22.12	<i>KCNE1</i>	minK, Isk (protéine régulatrice de canaux potassiques)	↓ I _{Ks/Kr}
LQTS6	<1-5%	21q22.12	<i>KCNE2</i>	MiRP1 (protéine régulatrice du canal potassique HERG)	↓ I _{Kr}
LQTS7	rare	17q23.1-q24.2	<i>KCNJ2</i>	Kir2.1 (canal potassique)	↓ I _{K1}
LQTS8	rare	12p13.3	<i>CACNA1C</i>	Ca _v 1.2 (canal calcique)	↑ I _{Ca-L}
LQTS9	rare	3p25	<i>CAV3</i>	caveoline-3 (formation des cavéoles)	↑ I _{Na}
LQTS10	rare	11q23.3	<i>SCN4B</i>	Na _v β4 (protéine régulatrice du canal sodique)	↑ I _{Na}
JLN1	rare	11p15.5	<i>KCNQ1</i>	KvLQT1, Kv7.1 (canal potassique)	↓ I _{Ks}
JLN2	rare	21q22.12	<i>KCNE1</i>	minK, Isk (protéine régulatrice de canaux ioniques)	↓ I _{Ks/Kr}

L'intervention de ces différentes protéines dans le LQTS s'explique par le fait que ce syndrome se caractérise, principalement, par un allongement de l'intervalle QTc, c'est-à-dire par un retard ou un allongement de la phase de repolarisation. Ce signe peut effectivement avoir plusieurs origines. Une mutation « gain de fonction » sur un canal intervenant dans la phase de dépolarisation (sodique ou calcique) ou sur une protéine régulatrice de ce canal va entraîner une dépolarisation plus intense ou un courant retardé persistant durant la phase de plateau (voir annexe 2). La phase de repolarisation sera alors prolongée ou retardée, d'où l'allongement de l'intervalle QTc. Inversement, une diminution d'un des courants intervenant dans la phase de repolarisation va allonger cette phase. Comme les canaux potassiques sont organisés en tétramère, une sous-unité mutée sur les quatre peut suffire à altérer le courant. On parle d'effet dominant-négatif.

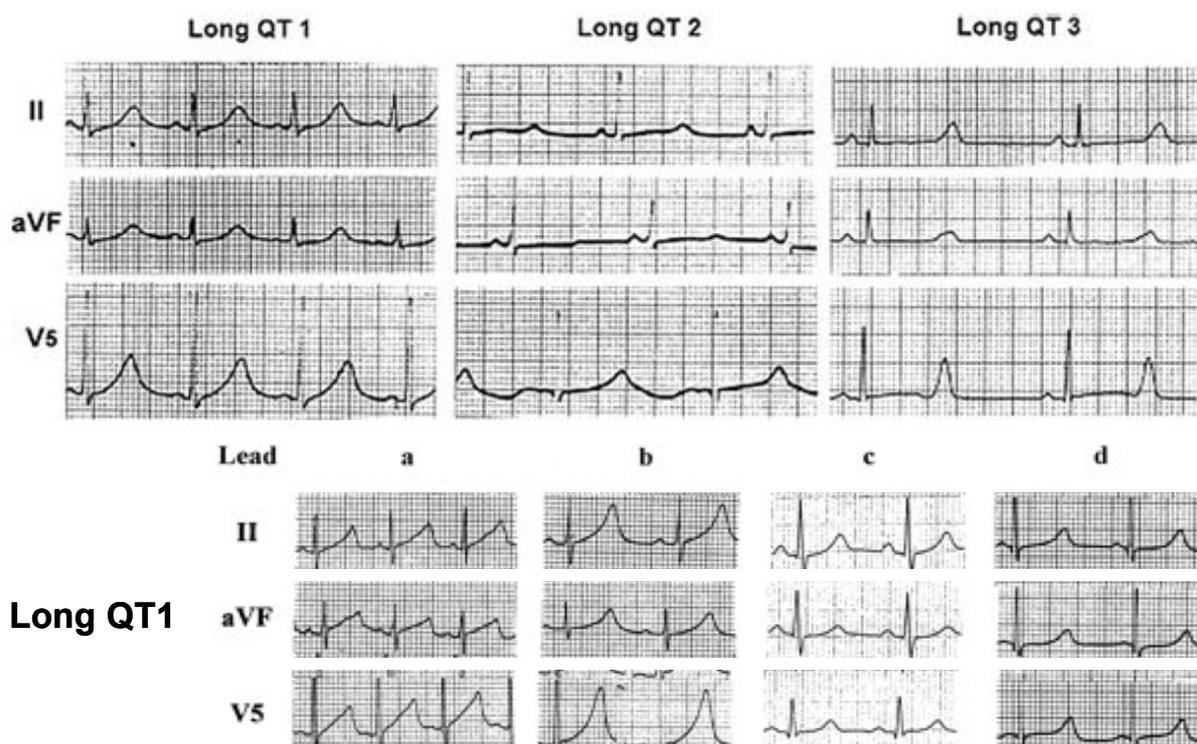


Figure 24 : tracés électrocardiographiques typiques du syndrome du QT long. Exemples d'ECG caractéristiques du syndrome du QT long de type 1, 2 et 3 (en haut). La morphologie du segment QT et de l'onde T sont des éléments permettant un diagnostic différentiel. En bas sont représentés quatre ECG différents caractéristiques du LQTS1. a : aspect infantile, b : onde T à base large, c : aspect de l'onde T normal et d : aspect normal de l'onde T mais départ retardé

Compte tenu de l'étiologie diverse des LQTS, le tracé sur l'ECG ne sera pas identique entre chaque type. L'analyse plus précise du segment ST et de l'onde T peut donner des indications sur le type de LQTS. La Figure 24 (haut) montre les ECG caractéristiques des types 1, 2 et 3.

Généralement, le LQTS1 se caractérise plutôt par une onde T large, même si, comme indiqué sur la Figure 24 (bas), différents tracés d'ECG peuvent caractériser ce type. Le LQTS2 est caractérisé par une onde T petite et/ou bifide mais, là encore, quatre ECG peuvent être caractéristiques de ce type. Le LQTS3 est caractérisé par un long segment ST et un retard du début de l'onde T qui aurait de plus un pic plus étroit que la normale .

La diversité des phénotypes observés pour un même génotype (quatre ECG différents pour la perte de fonction de KCNQ1, par exemple) peut s'expliquer par le fait que les mutations responsables du LQTS ont des degrés de sévérité variables. Il est aussi possible que des polymorphismes au niveau des protéines régulatrices du complexe modulent le phénotype pour une même mutation.

D'autres paramètres peuvent aider à différencier le type de LQTS comme l'âge, le sexe, le nombre d'événements arythmiques, le moment où ces arythmies ont lieu ou l'aspect de l'ECG avant la survenue des torsades de pointes . Certains de ces éléments sont résumés dans le Tableau 2.

Le coût et le temps requis pour identifier le gène muté justifient l'analyse précise de l'ECG et des conditions d'apparition des arythmies, de manière à cibler le ou les gènes à séquencer. De plus, un tel ciblage peut permettre une thérapeutique plus appropriée du patient atteint. Toutefois, environ 4 à 8% des hétérozygotes possèdent des mutations sur deux gènes impliqués dans le LQTS . Le séquençage d'un seul gène peut donc être limitant pour définir le risque. Les tendances actuelles visent à améliorer les techniques pour permettre un séquençage rapide et peu coûteux de tous les gènes candidats.

Tableau 2 : Paramètres différentiels pour le diagnostic du type de syndrome du QT long.

	LQTS1	LQTS2	LQTS3
Age moyen des premiers troubles cardiaques	9 ans	12 ans	16 ans
Personnes atteintes en particulier	Femmes et enfants	Femmes et enfants	
Probabilité de présenter un événement arythmique	63%	46%	18%
Probabilité de mourir lors d'un événement arythmique.	4%	4%	20%
Intervalle QTc moyen	490 +/- 43	495 +/- 43	510 +/- 48
Moment de la survenue des troubles cardiaques	Après un exercice physique (natation en particulier)	Lors de stimuli auditifs	Au repos

1.1.1.25 Le traitement du syndrome du QT long congénital

Le traitement des patients atteints d'un syndrome du QT long s'effectue sur du long terme et est actuellement uniquement symptomatique. L'hygiène de vie est un facteur à prendre en compte dans le traitement des LQTS1, 2, 5 et 6 dans la mesure où les arythmies sont déclenchées par un stimulus ou un facteur de stress.

La prise en charge à court terme d'un patient présentant des troubles cardiaques typiques d'un syndrome du QT long, comme des torsades de pointes, consiste à corriger une éventuelle hypokaliémie (administration de KCl par voie intra-veineuse), arrêter les traitements pouvant allonger l'intervalle QTc et éventuellement supplémenter en magnésium. Le mode d'action du magnésium reste encore flou mais cette thérapeutique semble très efficace chez les patients présentant un niveau de rétention en magnésium bas. L'administration de magnésium ne raccourcirait pas l'intervalle QTc mais préviendrait l'apparition des syncopes et des torsades de pointes . L'injection de potassium permettrait de diminuer cet intervalle en rétablissant un équilibre potassique, particulièrement chez les patients présentant une kaliémie basse .

Pour le traitement à long terme, la pose d'un pacemaker permanent peut se révéler nécessaire surtout si l'événement à l'origine des torsades de pointes est la

bradycardie. Le pacemaker est particulièrement indiqué pour les patients atteints d'un LQTS de type 3 chez lesquels les évènements arythmiques arrivent le plus souvent au repos, pendant le sommeil, où la fréquence cardiaque est plus faible et l'intervalle QTc plus long . Une thérapie à base de β -bloquants, antagonistes des récepteurs β -adrénergiques, comme le nadolol ou le propranolol, est souvent prescrite même si les effets dépendent beaucoup du génotype. En effet, dans le cas des LQTS de type 1 et 2, c'est en général lors d'une stimulation orthosympathique (stress, activité...) que se produisent les évènements cardiaques délétères voire la mort subite. L'administration de β -bloquants permet de limiter la récurrence de ces arythmies et la survenue de mort subite . Si l'association des β -bloquants et du pacemaker ne suffit pas à diminuer la fréquence des symptômes, l'implantation d'un défibrillateur peut donner de meilleurs résultats .

Dans des cas extrêmes où les patients ne répondent pas aux thérapies précédemment décrites et chez lesquels les évènements cardiaques sont fréquents, des traitements chirurgicaux peuvent être envisagés, notamment la dénervation sympathique cardiaque gauche .

Les thérapeutiques envisagées cibleraient particulièrement le canal responsable de la pathologie . Pour les LQTS de type 3 où le canal Nav1.5 serait à l'origine des troubles, l'inhibition de celui-ci par des molécules comme la mexiletine ou la lidocaïne est envisageable. Dans les cas de LQTS où la perte de fonction d'un canal potassique est en cause, des molécules permettant d'augmenter le courant créé par celui-ci constitueraient une thérapeutique de choix, si les effets secondaires sont supportables. Des substances telles que le nicorandil, un activateur des canaux potassiques, peuvent permettre d'accélérer la phase de repolarisation . Toutefois, les recherches quant à un ciblage direct des canaux ioniques sans effets secondaires néfastes restent encore trop préliminaires pour être applicables. De plus, dans la majorité des cas, les traitements standards présentés plus haut suffisent à améliorer le confort et l'espérance de vie du patient.

3.1.2 Relation génotype-phénotype dans le cas des LQTS liés au complexe de KCNQ1

1.1.1.26 Corrélation entre la diminution du courant et les effets visibles sur l'ECG

Dans le LQTS1, un élargissement de la base de l'onde T est le plus souvent observé sur l'ECG, en plus de l'allongement de l'intervalle QTc. L'onde T reflète la dispersion de la repolarisation au sein du ventricule que ce soit entre la base et l'apex ou au sein de la paroi ventriculaire entre les différentes couches myocardiques. La densité du courant I_{Ks} varie entre ces différentes parties, ce qui contribue à l'hétérogénéité de la repolarisation ventriculaire (voir le paragraphe 2.5 de l'annexe 12).

Shimizu et Antzelevitch ont mesuré l'ECG et les PA au niveau des différentes couches du myocarde à partir d'une paroi ventriculaire de chien perfusée en condition contrôle, en présence de chromanol 293B (un inhibiteur spécifique de I_{Ks}) et en présence de cet inhibiteur et d'isoproterenol (activateur des récepteurs β -adrénergiques). Les résultats obtenus en présence de chromanol 293B seul montrent un allongement de l'intervalle QTc et une durée plus longue du PA à tous les niveaux. En présence des deux substances pharmacologiques (chromanol 293B et isoproterenol), la durée du PA est diminuée dans les cellules épi- et endomyocardiques mais pas dans les cellules M, où le courant I_{Ks} est plus petit. Cette hétérogénéité aboutit alors à une accentuation de la dispersion de repolarisation et à l'élargissement de l'onde T, typique du LQTS1. Ces résultats, représentés en Figure 25, peuvent fournir des éléments de réponse pour expliquer l'élargissement de l'onde T observée chez certains patients.

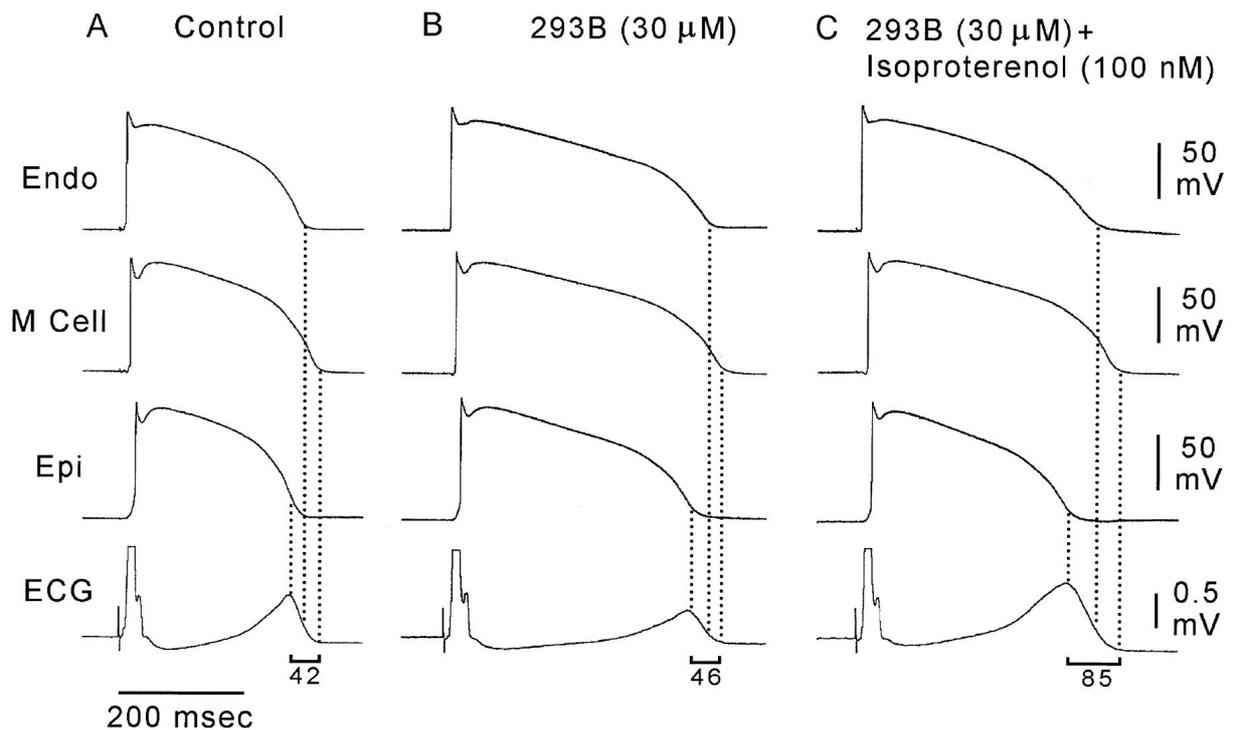


Figure 25 : Mesure des PA et de l'ECG transmurale et rôle du courant I_{Ks} . Les PA des différentes sous-couches et l'ECG transmurale sont enregistrés dans différentes conditions sur une paroi ventriculaire de chien perfusée. A. contrôle, B. en présence de chromanol 293B ($30\mu\text{M}$) et C. en présence de chromanol 293B ($30\mu\text{M}$) et d'isoproterenol (100nM).

1.1.1.27 Les différents niveaux de sévérité

La mise au point d'un modèle informatique par l'équipe de Rudy a permis de reconstituer les phénotypes observés pour les LQTS1, 2 et 3, en tenant compte du degré de sévérité (100%, 50%, 25% ou 0% de courant) et des résultats précédemment obtenus sur paroi ventriculaire perfusée. L'allongement de l'intervalle QTc est proportionnel au degré de sévérité de la mutation. Plus le courant est diminué, plus l'intervalle est long. D'après ce modèle, la dispersion de repolarisation est diminuée lorsque la sévérité augmente. Cette différence par rapport aux résultats de Shimizu, décrits plus haut, vient du fait que le modèle ne tient pas compte des stimulations adrénergiques pouvant augmenter le courant résiduel.

Le degré de sévérité varie en fonction de la mutation et de la capacité du canal muté à former un canal fonctionnel ou non. Schématiquement, plusieurs cas sont possibles :

1) Les sous-unités mutées ne s'associent pas avec les sous-unités WT. Le courant observé sera alors celui obtenu à partir des canaux WT auquel peut éventuellement s'associer le courant résiduel des canaux mutés si ceux-ci peuvent former un canal fonctionnel mais aux propriétés modifiées. Chez les hétérozygotes, exprimant 50% de canaux WT, le courant global sera donc égal ou supérieur à 50% du courant observé chez des individus sains (voir Figure 26).

2) Les sous-unités mutées s'associent aux sous-unités WT. Dans ce cas, soit l'association de ces deux types de sous-unités (mutée et WT) aboutit à un canal fonctionnel mais aux propriétés modifiées (courant réduit), soit l'association aboutit à la formation d'un canal non fonctionnel ou altère son transport vers la membrane plasmique (courant nul). Le courant observé dans ce dernier cas de figure correspondra à celui créé par les homotétramères de sous-unité WT (1 tétramère sur 16 si l'on considère que la probabilité d'association d'une sous-unité mutée avec une WT est la même que celle entre deux sous-unités WT). Si les hétérotétramères sont présents à la membrane et fonctionnels (avec un courant réduit), leur courant peut s'ajouter au courant créé par les homotétramères (courant supérieur à 1/16, voir Figure 26).

En pratique, les mutations identifiées dans les formes RW ont, généralement, un effet dominant-négatif et les hétérotétramères formés ont un courant très réduit, voire nul. Dans le cas des formes JLN, la transmission est récessive et les deux allèles sont mutés. Chacun des deux parents porte un allèle muté mais est, en général, asymptomatique. La mutation est donc peu sévère quand elle est associée à un allèle WT. En général, les sous-unités WT et mutées ne s'associent pas et au moins la moitié des canaux synthétisés sont des homotétramères de sous-unités WT. En revanche, lorsque les deux allèles sont mutés et que toutes les sous-unités synthétisées sont déficientes, le courant résultant est alors largement diminué au point d'entraîner, au niveau cardiaque, un défaut de repolarisation et un allongement de l'intervalle QTc.

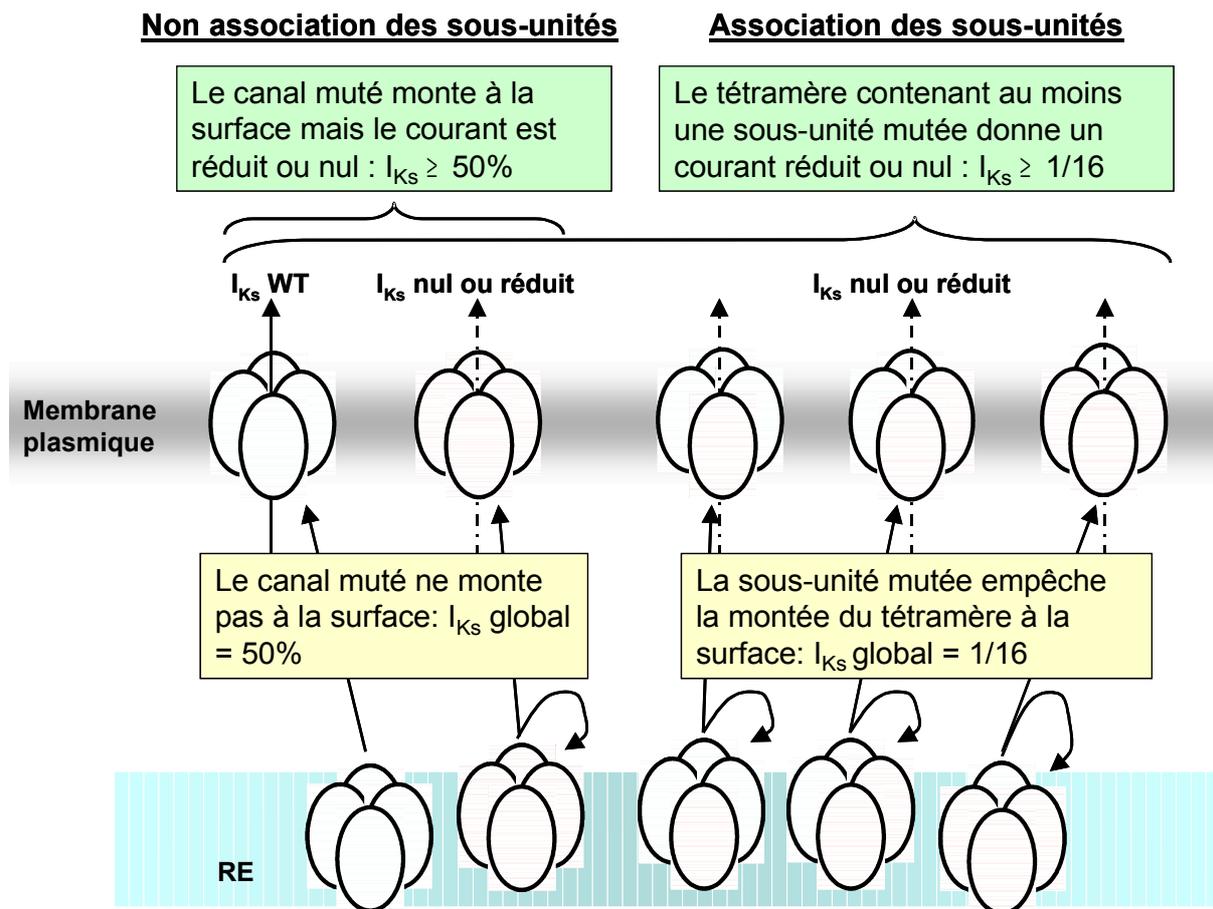


Figure 26 : Association ou non des sous-unités mutées et non mutées en tétramère et conséquences au niveau du courant I_{Ks} chez des individus hétérozygotes. En vert sont représentées les sous-unités WT et en rouge sont représentées les sous-unités mutées. RE : réticulum endoplasmique.

3.1.3 Mutations sur les protéines du complexe de KCNQ1 aboutissant au syndrome du QT long

Jusqu'à présent, près de 300 mutations sur le gène *KCNQ1* ont été rapportées comme étant à l'origine du LQTS1 et une trentaine de mutations sur *KCNE1* pour le LQTS5. Peu d'entre elles, cependant, ont été étudiées en électrophysiologie ou en immunofluorescence de manière à identifier les conséquences de la mutation et comprendre le phénotype observé.

La densité de courant dépend de plusieurs paramètres : le nombre de canaux à la membrane (N), leur probabilité d'ouverture (P_o), leur conductance (g) et la différence entre le potentiel membranaire et le potentiel d'équilibre de l'ion ou des ions passant

par le canal ($E-E_{rev}$). Ainsi le courant (I) peut être donné par l'équation $I = N \cdot P_o \cdot g \cdot (E-E_{rev})$. Une mutation diminuant l'un de ces paramètres aboutira alors à une perte de fonction du canal. Une altération de l'association du canal avec les protéines partenaires permettant de réguler ces propriétés est aussi à prendre en compte, de même que la régulation du canal par les différentes stimulations (comme la régulation β -adrénergique).

1.1.1.28 Modification de la tétramérisation et du trafic du canal vers la membrane

- Mutations sur les sites spécifiques de la tétramérisation et du trafic

Nous avons vu que le site de tétramérisation du canal KCNQ1 était situé en partie C-terminale, au niveau des aa 589 à 620. Une mutation située au niveau de l'aa 544 et impliquée dans la forme JLN, aboutit à la délétion d'une grande partie de ce site. Cette délétion empêche l'association des sous-unités entre elles. Il est, en effet, impossible de retrouver les formes mutées et WT des parties C-terminales dans le même complexe en co-immunoprécipitation. De même, les sous-unités mutées T587M, impliquées elles-aussi dans la forme JLN, ont un défaut d'assemblage avec les sous-unités WT. Pour ces deux mutations, le défaut d'assemblage avec les sous-unités WT ne leur confère pas de rôle dominant-négatif et le courant obtenu à partir des sous-unités mutées exprimées seules est nul du fait d'un défaut de trafic vers la membrane.

Plusieurs autres mutations empêchent le trafic du canal vers la membrane plasmique et notamment celles situées en partie N-terminale, comme les mutations Y111C, L114P et P117L. Ces mutations RW ont un effet dominant négatif et les sous-unités mutées retiennent les canaux dans le RE. Cet effet sur le trafic est un peu moins marqué pour le P117L. Le fait que l'isoforme 2, tronquée dans sa partie N-terminale, reste au niveau du RE (voir paragraphe 2.3.1) suggérait déjà un rôle de cette partie dans le trafic vers la membrane.

- Mutations modifiant l'association aux partenaires impliqués dans la tétramérisation et le trafic

La calmoduline joue un rôle dans la tétramérisation et le trafic du canal (voir paragraphe 2.3.1). Quatre mutations localisées près du motif IQ, nécessaire à l'association de la calmoduline au canal, ont été retrouvées chez des patients atteints de LQTS1. Il s'agit des mutations R366W, A371T, S373P et W392R qui génèrent un courant de faible amplitude. Ces mutants, incapables de fixer la calmoduline, sont moins exprimés et moins présents à la membrane plasmique. Ces données renforcent l'hypothèse d'un rôle de la calmoduline dans l'expression du canal à la membrane.

Enfin, des mutations sur KCNE1 et notamment la mutation L51H peuvent aussi altérer le trafic, comme cela a été présenté dans le chapitre 2.2.2.

- Implication de l'isoforme 2 dans la pathologie

L'isoforme 2, qui retient le canal (isoforme 1) dans le RE, a été impliquée dans la pathologie RW liée à la mutation delta-F339. D'après Thomas et al., la mutation ne peut expliquer à elle-seule l'effet dominant-négatif observé dans la pathologie. Le phénotype est reproduit dans les ovocytes de Xénope exprimant KCNE1 uniquement si l'isoforme 2 (aussi mutée) est co-exprimée avec le canal muté.

1.1.1.29 Modification des propriétés biophysiques du canal

De nombreuses mutations sur KCNQ1 ou ses partenaires ont pour conséquence de modifier les propriétés biophysiques du canal.

- La conductance du canal

Deux mutations RW, responsables du LQTS5 sur KCNE1 (S74L et D76N) semblent modifier la conductance du canal. D'après les résultats obtenus en analyse de conductance unitaire sur ovocytes de Xénope par Sesti et Goldstein, ces mutations diminueraient la conductance du canal de 40 à 70%.

- La voltage-dépendance

De manière surprenante, l'intensité du décalage de la courbe d'activation créé par certaines mutations n'est pas corrélée avec la sévérité de la pathologie. Par exemple la mutation JLN KCNQ1-R243H, exprimée avec KCNE1 dans les COS-7, aboutit à un décalage de la voltage-dépendance de +66mV et à une diminution très importante du courant par rapport au courant WT KCNQ1-KCNE1 . Pourtant, les hétérozygotes porteurs de cette mutation sont asymptomatiques. En fait, lorsque les sous-unités KCNQ1 WT et mutées sont exprimées ensemble avec KCNE1 dans les COS-7, le décalage est réduit à +20mV. Le courant est alors réduit de moitié à +30 mV, ce qui semble être suffisant pour une repolarisation quasi-normale. Le mutant RW KCNQ1-R539W exprimé avec KCNE1 dans les COS-7 aboutit à un décalage de la voltage-dépendance moins important que celui généré par le mutant JLN KCNQ1-R243H . Pourtant, le phénotype observé chez les hétérozygotes porteurs de la mutation R539W est sévère et peut aboutir à la mort subite. Les propriétés du courant obtenu à partir de la co-expression des sous-unités WT et mutée R539W avec KCNE1 sont, de plus, semblables à celles obtenues avec le mutant R243H dans les mêmes conditions. La différence clinique observée est donc difficilement explicable par ces seules observations.

Il est possible que la modification de la voltage-dépendance ne soit pas le seul phénomène à l'origine de la pathologie. La mutation pourrait aussi induire une modification de la régulation du courant par l'un des partenaires. Les deux mutations impliquant des résidus arginine, chargés positivement, un défaut d'association avec le PIP₂ pourrait expliquer les phénotypes. Il a effectivement été montré plus tard que les deux mutants étaient moins sensibles au PIP₂ . Toutefois, les deux mutants étant aussi peu sensibles à ce phospholipide, la différence phénotypique ne peut venir uniquement de là.

Les deux mutations étant situées sur des domaines différents (boucle S4-S5 pour R243H et domaine C-terminal pour R539W), une différence d'interaction avec une protéine partenaire (connue ou non) peut être envisagée. L'équipe de Barhanin a montré en 2000 que le phénotype obtenu à partir du mutant R243H pouvait être modulé par l'expression de KCNE2. Dans leurs expériences réalisées sur cellules COS-7, la coexpression du mutant avec KCNE2 modifie les cinétiques et la voltage-dépendance du courant généré par le KCNQ1 mutant et le courant résultant de l'association de ces deux sous-unités est semblable au courant I_{Ks} . Est-il possible alors que, contrairement à la mutation R539W, l'effet de la mutation R243H soit

tempéré par l'association de KCNE2 au complexe KCNQ1-KCNE1 ? Aucune donnée ne permet de répondre à cette question puisque cette mutation n'a pas été étudiée en présence des deux sous-unités KCNE1 et KCNE2.

- Rôle de KCNE1 dans le phénotype

Nous avons vu que KCNE1 jouait un rôle important dans la voltage-dépendance caractéristique de I_{Ks} . Cette sous-unité est aussi capable de moduler le phénotype lié à une mutation sur KCNQ1. Par exemple, pour les deux mutations R539W et R243H, le canal muté exprimé seul génère un courant semblable au courant généré par le canal WT. La perte de fonction ne s'observe que si KCNE1 lui est associé. D'autres mutations présentent cette même particularité comme les mutations R243C, W248R et R533W.

Pour d'autres mutations, en revanche, la présence ou non de KCNE1 ne modifie pas les propriétés du courant produit par KCNQ1, suggérant que cette protéine ne peut plus interagir avec le canal. C'est le cas pour la mutation KCNQ1-delta-F339, située au niveau du site de régulation de KCNE1 sur KCNQ1 et de la mutation KCNQ1-A300T, localisée au niveau du pore.

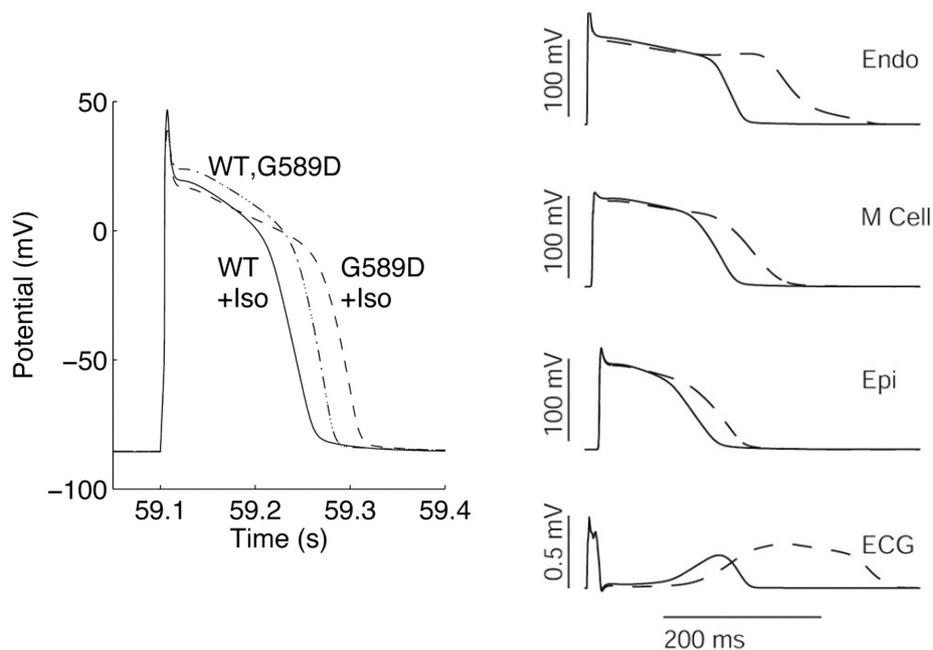
Toutes ces mutations sont situées sur des sites différents de KCNQ1, ce qui montre que plusieurs sites du canal interagissent avec KCNE1 et interviennent dans la régulation du courant par cette sous-unité.

1.1.1.30 Modification de la régulation du courant par la PKA

La mutation KCNQ1-G589D est localisée au niveau du Leucine-zipper où se fixe yotiao. Il a été montré que ce mutant ne répondait plus à une stimulation de la PKA dans les cellules CHO. Une reconstitution informatique du PA obtenu à partir des canaux KCNQ1 WT et muté montre que le mutant ne modifie pas la durée du PA par rapport au WT. En revanche, sous stimulation β -adrénergique, la durée du PA obtenu à partir des canaux WT est bien diminuée alors que la durée du PA obtenu à partir des canaux mutés est augmentée (Figure 27). Physiologiquement, une stimulation β -adrénergique augmente l'intensité du courant calcique, ce qui aurait tendance à allonger la durée du PA. Elle augmente aussi le courant I_{Ks} qui contrebalance l'effet du courant calcique et diminue alors la durée du PA. Dans le cas du mutant G589D, l'augmentation du courant calcique n'est pas compensée par

l'augmentation du courant potassique, d'où la durée de PA plus longue avec le mutant . Cette augmentation du PA sous stimulation β -adrénergique favorise la survenue d'arythmies et en particulier de post-dépolarisations précoces lors de stress ou d'effort.

Figure 27 : Modélisation informatique des conséquences de la mutation KCNQ1-G589D sur le PA et la réponse β -adrénergique du PA et visualisation sur l'ECG. A gauche sont représentés les PA obtenus par modélisation à partir des canaux KCNQ1 WT ou G589D (PA identiques de base) et les PA obtenus sous stimulation β -adrénergique (Iso) pour les formes



WT et mutées. A droite sont représentés les PA au niveau des différentes couches du myocarde (de haut en bas : endomyocarde, cellules M et épimyocarde) et la visualisation sur l'ECG pour les canaux WT (ligne pleine) ou mutés (ligne en tirets) .

1.1.1.31 Modification du courant par les protéines partenaires mutées

Des mutations sur KCNE1, à l'origine du LQTS5, peuvent modifier les propriétés du courant de différentes manières.

Les mutations situées sur la partie C-terminale peuvent diminuer le courant en favorisant l'état fermé du canal. Les mutations RW de KCNE1 S74L, D76N, Y81C et R98W modifient considérablement le courant en diminuant son intensité, en décalant sa courbe d'activation vers les potentiels positifs et en accélérant sa désactivation .

Les mutations localisées sur le domaine TM de KCNE1, telles que V47F et G52H altèrent les propriétés régulatrices de cette sous-unité. Le courant obtenu à partir de ces mutants et de KCNQ1, dans les ovocytes de Xénope, est semblable à celui exprimé par KCNQ1 seul. Pourtant, ces deux mutants sont exprimés à la membrane .

Même si l'implication physiologique des études réalisées sur des mutants KCNE2 exprimés avec KCNQ1 sans KCNE1 reste limitée, il est à noter que les mutations KCNE2-I57T et Q9E peuvent modifier l'intensité et les propriétés du courant KCNQ1 dans les cellules COS-7 . Le phénotype de QT long lié à ces mutations a d'abord été attribué à la modification du courant I_{Kr} . Toutefois, les conséquences sur le courant I_{Ks} sont peut-être aussi à prendre en compte pour la compréhension du phénotype et nécessitent d'autres investigations en présence de KCNE1.

3.2 Gain de fonction du canal

3.2.1 Le syndrome du QT court

- Description

Le syndrome du QT court (SQTS) fut décrit pour la première fois en 2000 et reste très rare (moins de 50 familles décrites dans le monde). Sa transmission se fait de manière dominante et les patients atteints sont hétérozygotes. Ce syndrome peut, comme le LQTS, aboutir à des arythmies telles que des fibrillations et induire la mort subite. Sur l'ECG, le QTc est inférieur à 300 ms et l'onde T, grande et pointue, ressemble à celle observée dans les états hyperkaliémiques .

- Les gènes impliqués et la relation génotype-phénotype pour KCNQ1

Des mutations sur les gènes codant pour les canaux HERG (I_{Kr}), KCNQ1 (I_{Ks}) et KCNJ2 (I_{K1}) ont déjà été mises en évidence . Les mutations aboutissent à un gain de fonction de ces canaux potassiques, expliquant le raccourcissement de la phase de repolarisation du PA et de l'intervalle QTc.

La première mutation identifiée sur le gène *KCNQ1* est la V307L, localisée au niveau du pore . Dans les cellules COS-7, le mutant correspondant, co-exprimé avec KCNE1, induit un courant aux propriétés modifiées : un décalage de la courbe I-V vers des potentiels plus négatifs et une accélération des cinétiques d'activation sont observés. La co-expression des sous-unités KCNQ1 WT et mutée avec KCNE1 modifie légèrement les propriétés du courant obtenu sans KCNQ1 WT mais ne restaure pas le phénotype sauvage.

La deuxième mutation identifiée, V141M, est située au niveau de la partie C-terminale du domaine transmembranaire S1, du côté extracellulaire de la cellule . Le mutant correspondant, co-exprimé avec KCNE1 dans les ovocytes de Xénope, génère un courant instantané et voltage-indépendant. La co-expression de ce mutant avec la forme WT et KCNE1 aboutit à un phénotype intermédiaire entre ce courant et le courant I_{Ks} . Le courant des porteurs hétérozygotes aurait donc une activation plus rapide que celui des individus sains et présenterait une voltage-dépendance altérée. De plus, une simulation sur un modèle de PA de nœud sinusal de lapin montre que cette absence de dépendance au potentiel abolit l'activité pacemaker des cellules sinusales. Le courant produit par KCNQ1-V141M et KCNE1 empêcherait le courant I_f de dépolariser la membrane jusqu'au potentiel seuil d'activation des courant calciques. La résultante des deux courants potassiques, activés en permanence, maintient en effet le potentiel à une valeur stable de -37 mV . Ce phénomène, associé à l'accélération de la phase de repolarisation dans les myocytes, serait à l'origine de la fibrillation atriale (voir paragraphe suivant) observée, en plus du raccourcissement de l'intervalle QTc, chez les porteurs de cette mutation.

Très récemment, deux nouveaux gènes mutés codant pour les sous-unités calciques CACNA1C (sous-unités α_1 du canal calcique) et CACNB2 (sous-unité régulatrice β_{2b} du canal), à l'origine du courant calcique de type L, ont été identifiés dans une pathologie mixte entre le SQTS et le syndrome de Brugada . L'ECG montre, en effet, un raccourcissement de l'intervalle QTc typique du SQTS mais aussi une élévation du segment ST, typique du syndrome de Brugada. Des morts subites au sein des familles porteuses de mutations s'ajoutent au tableau clinique. Pour cette pathologie, le phénotype est lié à une perte de fonction du canal calcique de type L. La phase de dépolarisation étant moins intense, la repolarisation intervient plus précocement, ce qui aboutit à un raccourcissement de l'intervalle QTc sur l'ECG. L'élévation du segment ST peut s'expliquer, comme dans le syndrome de Brugada, par la

dispersion du courant I_{to} au sein du myocarde qui n'est plus compensée par le courant calcique dépolarisant. L'hétérogénéité de la repolarisation est alors accentuée .

- Le traitement

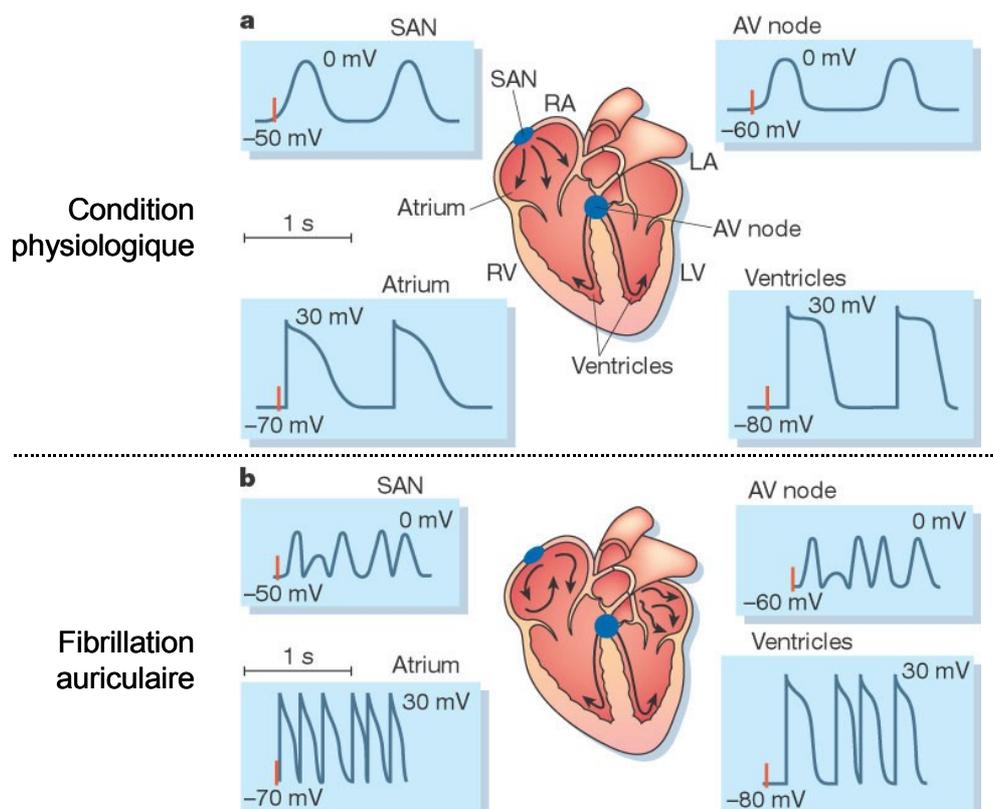
La pose d'un défibrillateur automatique cardiaque est actuellement le seul moyen de prévenir les morts subites chez les patients atteints. Il semblerait cependant que l'administration de quinidine puisse diminuer le gain de fonction lié aux canaux potassiques et allonger l'intervalle QTc . La quinidine est un anti-arythmique agissant comme inhibiteur de différents canaux ioniques et son affinité pour HERG et KCNQ1 expliquerait cet allongement du QTc observé.

3.2.2 La fibrillation auriculaire

- Description

La fibrillation auriculaire (FA) est une pathologie cardiaque potentiellement létale, fréquente chez les personnes âgées de plus de 60 ans (5 à 9%) et très rare chez les enfants. La prévalence globale est de 0,5 à 1% . Elle peut être paroxystique (épisodes de FA par crise) ou chronique (permanente).

La FA se caractérise par une activité électrique rapide et irrégulière des oreillettes qui battent alors à une fréquence de 400 à 600 bpm. Le NAV ne pouvant assurer la conduction de chaque PA à une telle fréquence, la fréquence ventriculaire est plus faible qu'au niveau des oreillettes (Figure 28) mais reste élevée (150 à 200 bpm environ) et plus irrégulière que la normale (60-90 bpm). Le filtre au niveau du NAV permet au cœur d'assurer sa fonction malgré ce trouble auriculaire . La fibrillation auriculaire n'est pas létale en elle-même mais les troubles qu'elle occasionne,



comme la réduction du remplissage ventriculaire ou la stase sanguine au niveau des oreillettes, prédisposent à l'insuffisance cardiaque et à la thrombo-embolie.

Figure 28 : L'activité électrique cardiaque durant la fibrillation atriale. PA physiologiques (a) ou en fibrillation atriale (b) au niveau du nœud sinusal (SAN), de l'oreillette (Atrium), du NAV (AV node) et des ventricules (Ventricles) .

Cette pathologie est souvent la conséquence d'une autre pathologie (hypertension, dysfonctionnement valvulaire, cardiomyopathie, etc.) et résulterait plus d'un remodelage lié à cette première pathologie qu'à une mutation génétique. Toutefois, il

semble que des facteurs génétiques prédisposent à la FA, en particulier depuis que des cas familiaux ont été identifiés. En effet, dans 2 à 31% des cas de FA, aucune autre pathologie ne lui est associée. Dans ce type de FA, plusieurs individus d'une même famille peuvent être atteints, ce qui laisse supposer une origine génétique.

- Les gènes impliqués et la relation génotype-phénotype pour KCNQ1

La conduction au sein de l'oreillette en FA n'est plus unidirectionnelle du nœud sinusal au NAV et des circuits au sein desquels les cellules se réexcitent mutuellement se forment. L'entretien de ces circuits de réentrée, typiques de la FA, est permis par la diminution de la longueur d'onde minimale d'un circuit de réentrée (longueur d'onde minimale (m) = vitesse de conduction (m/sec) x période réfractaire (sec)). Cette diminution peut être due au raccourcissement de la période réfractaire qui autorise alors la naissance de PA ectopiques, à l'origine d'une FA. En théorie, une mutation gain de fonction sur un canal potassique repolarisant ou une perte de fonction sur un canal dépolarisant pourrait aboutir à une réduction de la durée du PA et de la période réfractaire et induire une FA.

Des mutations sur les gènes *KCNQ1*, *KCNE2*, *KCNJ2* (Kir2.1) et *KCNA5* (Kv1.5) peuvent effectivement être à l'origine de FA familiales. Toutefois, dans le cas du gène *KCNA5*, la mutation identifiée (E375X) n'aboutit pas à un gain de fonction du canal Kv1.5 mais à une perte de fonction dominante-négative. Le courant I_{Kur} généré par ce canal est important dans la repolarisation auriculaire et une diminution de ce courant peut ralentir considérablement cette phase. La durée du PA est alors allongée et des post-dépolarisations précoces peuvent survenir sur les cellules qui ne sont pas totalement repolarisées à l'arrivée du PA suivant, provoquant ainsi une FA. Ces données montrent bien à quel point l'activité électrique physiologique des oreillettes est finement régulée puisque la moindre modification de la durée du PA (augmentée ou diminuée) peut aboutir à un dysfonctionnement de la conduction auriculaire.

Les gènes codant pour le canal sodique Nav1.5 (gène *SCN5A*), le canal potassique HERG (gène *KCNH2*) ou les lamines A et C (gène *LMNA*), protéines de structure du noyau, peuvent aussi aboutir à une FA lorsqu'ils sont mutés, mais le phénotype auriculaire est, en général, associé à un phénotype ventriculaire. Par exemple, la mutation N588K de HERG aboutit à un SQTS et à une FA et les mutations sur *SCN5A* et *LMNA* génèrent des troubles de conduction en plus de la FA. D'autres loci

ont été identifiés dans cette pathologie mais les gènes responsables sont encore inconnus .

La mutation KCNQ1-S140G est située, comme la mutation V141M aboutissant au SQTS, sur la partie C-terminale du domaine transmembranaire S1 . Tout comme le mutant V141M, le canal muté S140G génère un courant quasi-instantané et voltage-indépendant lorsqu'il est exprimé avec KCNE1 ou en condition « hétérozygote » avec le canal WT et KCNE1, dans les cellules COS-7 . Dans le cas de la mutation V141M, nous avons vu qu'une FA accompagnait le phénotype de QT court. Dans le cas de la mutation S140G, aucun raccourcissement de cet intervalle n'est observé et chez certains patients, un allongement de celui-ci est même remarqué.

L'étude de ces deux mutants soulève deux points. Le premier concerne l'implication du domaine S1 dans la voltage-dépendance et les cinétiques du courant et le second concerne le fait que ces deux mutations sont toutes deux à l'origine même d'un gain de fonction du courant I_{Ks} mais aboutissent à deux pathologies différentes.

Pour le premier point, il est effectivement étonnant de voir que le segment S1 peut modifier les cinétiques et la voltage-dépendance alors que les domaines connus pour être impliqués dans ces régulations étaient plutôt situés près du pore ou du segment S4 (voir paragraphes 2.2.3 et 2.2.3). Est-il alors possible que ce segment S1 soit capable de moduler les changements de conformation du segment S4 régulant l'ouverture et la fermeture du canal en fonction du potentiel ? Pour répondre à cette question, il serait nécessaire de mesurer le courant de porte généré par les mouvements du segment S4 de ces deux mutants et d'évaluer le rôle du segment S1 dans la régulation de ce courant.

KCNE2 et KCNE3 provoquent l'ouverture instantanée et voltage-indépendante du canal KCNQ1 (voir paragraphe 2.3.2). Une autre hypothèse pour expliquer l'intervention de la partie extracellulaire du segment S1 dans ces régulations serait que cette zone constitue un site d'interaction, non encore identifié, avec ces partenaires. Les mutations favoriseraient alors l'interaction du canal avec l'un de ces partenaires. De manière intéressante, une mutation sur le gène *KCNE2* a été identifiée dans un cas de FA familiale . Contrairement aux attentes, ce mutant R27C ne modifie pas le courant I_{Kr} malgré la régulation connue de cette sous-unité sur le canal HERG. En revanche, il génère un courant KCNQ1-KCNE2 supérieur au courant généré par la sous-unité WT associée à KCNQ1 dans les cellules COS-7.

Malheureusement, ce mutant n'a pas été étudié en présence de KCNE1 et il est donc difficile d'évaluer les effets d'une telle mutation au niveau cardiaque.

Enfin, comment peut-on expliquer que deux mutations aussi proches, aboutissant aux mêmes effets sur le courant, puissent mener à deux pathologies différentes touchant des compartiments différents : FA et SQTS ? A vrai dire, il n'y a pas de réponse claire à cette question mais une différence de régulation par un partenaire plus ou moins exprimé est une hypothèse envisageable. Il est aussi possible que le phénotype varie en fonction des variants des protéines régulatrices exprimés avec le canal muté. Par exemple, il a été montré qu'une corrélation existait entre la présence de certains variants des sous-unités KCNE1 et KCNE4 et la survenue de FA . Les différents polymorphismes existant sur le canal ou ses protéines régulatrices sont donc à prendre en compte pour expliquer pleinement le phénotype observé. Une telle compréhension permettrait aussi de mieux appréhender et traiter les différentes pathologies obtenues pour un même gain de fonction du canal.

- Le traitement de la FA

Le traitement des épisodes de FA paroxystique se fait par injections intra-veineuses de digitaliques (digoxine) et d'anti-coagulants pour éviter les thrombo-embolies. Des anti-arythmiques et des β -bloquants peuvent aussi être administrés mais leur action sur les ventricules peut modifier l'électrophysiologie de ceux-ci et provoquer des effets non souhaités. Pour éviter les récurrences, en revanche, la quinidine est indiquée ainsi que les anti-arythmiques de classe III (sotalol et amiodarone). Pour ce type de traitement, le patient doit être sous surveillance régulière de manière à éviter un éventuel allongement de l'intervalle QTc (LQTS acquis). Si les épisodes de FA surviennent lors de stress ou d'effort, les β -bloquants seront utiles alors que si ces épisodes sont provoqués lors de stimulation vagale (bradycardie, calme), le disopyramide (parasympatholytique) sera préféré.

Pour la FA permanente, l'administration d'anti-arythmiques est peu indiquée du fait de la dysfonction ventriculaire qu'ils peuvent provoquer. Le principal traitement réside dans la cardioversion (choc électrique externe) qui permet un retour au rythme sinusal mais ne permet pas forcément son maintien. Pour l'entretien du rythme sinusal, des digitaliques et de l'amiodarone peuvent être prescrits mais toujours sous surveillance régulière. Les anti-coagulants font là aussi partie du traitement de base.

Compte tenu de l'utilisation limitée des anti-arythmiques, le traitement pharmacologique tend à être réduit en faveur d'un traitement chirurgical (ablation de tissus pro-arythmiques, pose de pacemaker ou défibrillateur...) ou d'un traitement ciblant spécifiquement les oreillettes et non les ventricules . Si la FA n'a pas pour origine une mutation sur le canal Kv1.5, des inhibiteurs de ce canal peuvent être envisagés. Ils permettront alors de ralentir la repolarisation auriculaire et d'augmenter la durée du PA et de la période réfractaire, sans risque de provoquer une arythmie ventriculaire .

Nous avons donc vu dans cette introduction que l'intensité du courant I_{Ks} , intervenant dans la phase de repolarisation du PA, varie dans les différentes parties du cœur. L'expression hétérogène du canal KCNQ1 ou de ses protéines régulatrices explique, en partie, ces différences. Le courant I_{Ks} varie aussi en fonction des stimulations reçues et son intensité augmente particulièrement sous stimulation β -adrénergique. Le canal KCNQ1 fonctionne, en effet, au sein d'un complexe où différentes protéines interagissent avec lui et régulent son expression à la membrane plasmique ou sa fonction. L'étude de ces partenaires n'est pas toujours réalisable dans les cardiomyocytes et, le plus souvent, la régulation du courant est étudiée dans des systèmes d'expression hétérologue. Il semble de plus en plus évident que la régulation de ce courant dépend de nombreux facteurs pouvant varier d'un modèle cellulaire à l'autre et d'une technique à l'autre. Pour ces raisons, une protéine supposée régulatrice peut sembler indispensable au courant dans un modèle mais accessoire dans un autre. Cette variation rend les conclusions difficiles d'un point de vue physiopathologique et la validation de ces interactions dans les cardiomyocytes, où l'ensemble du complexe est présent, est essentielle. L'identification des partenaires de KCNQ1 revêt une importance particulière depuis que des mutations sur le canal ou l'une de ses protéines régulatrices, KCNE1, ont été identifiées dans différentes pathologies cardiaques héréditaires potentiellement létales. Ces mutations peuvent aboutir à une perte ou à un gain de fonction du canal. La relation entre la mutation et le phénotype observé est souvent complexe et ambiguë. Les mutations ne peuvent pas toujours expliquer à elles seules le phénotype observé et la méconnaissance du complexe de KCNQ1 dans son ensemble limite notre compréhension. La recherche de l'ensemble des protéines interagissant avec le canal et la mise en évidence de leurs effets sur le courant, dans les cardiomyocytes, permettraient de mieux aborder ces pathologies. C'est dans cette optique que nous avons entrepris la recherche des partenaires de KCNQ1.

MATERIEL ET METHODES

4 Les cellules COS-7 comme modèle d'expression hétérologue

4.1 Culture des cellules

La lignée cellulaire COS-7 est issue de fibroblastes de reins de singe vert d'Afrique, immortalisés par transformation avec un mutant du virus simien SV40. Du fait de l'absence de courants potassiques voltage-dépendants endogènes, cette lignée est utilisée comme système d'expression pour l'étude du courant I_{Ks} .

Ces cellules sont cultivées dans des flasques en plastique de 25 cm² dans un incubateur humidifié à 37°C, en présence de 5% de CO₂. Le milieu de culture est composé de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) et de 10% de sérum de veau foetal, 2 mM de L-glutamine, 100 UI/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine.

Le repiquage des cellules se fait tous les 4 jours et se déroule en 4 étapes :

- Le milieu de culture d'une flasque est remplacé par 2 mL de tampon PBS/EDTA contenant du NaCl (137 mM), KCl (2,7 mM), Na₂HPO₄ (8 mM), KH₂PO₄ (1,5 mM) et 0,1% d'EDTA.
- Afin de détacher les cellules de leur support, elles sont traitées avec 1 mL d'une solution à 0,25% de trypsine solubilisée dans le tampon PBS/EDTA, pendant 2 minutes. L'action enzymatique est arrêtée par addition de 5 mL de milieu de culture.
- Après centrifugation (190 g, 5 minutes) et récupération dans du milieu de culture, les cellules sont mécaniquement individualisées avec une pipette Pasteur jusqu'à l'obtention d'une suspension de cellules isolées.
- Les cellules sont diluées et de nouvelles flasques sontensemencées.

4.2 Transfection transitoire des cellules

4.2.1 Agent transfectant et protocole de transfection

Les cellules sont transfectées en utilisant le JetPEI (Polyplus Transfection). L'agent actif est une polyéthylèneimine qui s'associe aux molécules d'ADN et forme des particules qui sont susceptibles d'être endocytées par les cellules. Selon les recommandations du fabricant, pour une boîte de Pétri de 35 mm de diamètre contenant des cellules COS-7 à une confluence de 60%, on prépare séparément deux tubes Eppendorf contenant :

- 1) 4 ou 6 μL de JetPEI dans 50 μL de NaCl (150 mM)
- 2) 2 ou 3 μg d'ADN dans 50 μL de NaCl (150 mM)

Les deux tubes sont mélangés. Afin de permettre le compactage de l'ADN par le JetPEI, le mélange est laissé 30 minutes environ à température ambiante. Il est alors déposé sur les cellules avec 900 μL de milieu de culture et laissé pendant 8 heures au minimum dans l'incubateur.

Pour l'étude des cellules en patch-clamp, un repiquage est réalisé selon les 4 étapes présentées plus haut. Les cellules sont remises en culture dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre après dilution et utilisées 24 ou 48h après le repiquage.

4.2.2 Mélange plasmidique

Pour l'étude en patch-clamp, le plasmide codant pour la GFP est associé à ceux codant pour la protéine canal et ses régulateurs. Pour l'étude du courant I_{Ks} , le mélange plasmidique contient au moins 20% de plasmide codant pour le canal (pCI-CMV-KCNQ1), 30% de plasmide codant pour KCNE1 (pRC-CMV-KCNE1) et 20% de plasmide codant pour la GFP (pEGFP). Le mélange est complété par les plasmides codant pour les autres protéines régulatrices (yotiao ou Nedd4-2, par exemple) ou par une dose supplémentaire de GFP ou de KCNE1.

Pour les études de biochimie, la GFP n'est pas nécessaire et des proportions différentes sont utilisées. Pour les études de co-immunoprécipitation, seules les 2 protéines d'intérêt sont transfectées avec un rapport 1:1 et pour l'analyse de l'état phosphorylé des protéines KCNQ1 et yotiao, les proportions sont alors de 20% de KCNQ1, 40% de KCNE1 et 40% de yotiao.

4.3 Analyse du courant potassique en patch-clamp

4.3.1 Configurations et conditions

Toutes les études électrophysiologiques présentées dans les résultats sont réalisées en configuration cellule entière. Le courant global de toute la cellule est donc enregistré. Pour l'étude du courant I_{Ks} , la condition perméabilisée est préférée de manière à éviter la diminution du courant en fonction du temps (rundown) induite par la dilution du PIP_2 et du MgATP. Une fois la pipette en contact avec la cellule, une légère aspiration est exercée à l'intérieur de la pipette de manière à atteindre une résistance de l'ordre du gigaOhm (gigaseal). Après action de l'amphotéricine B

(ionophore sélectif pour les ions monovalents) ajoutée au milieu intrapipette, la résistance diminue du fait de la perméabilisation membranaire, ce qui permet l'accès électrique au milieu intracellulaire (Figure 29).

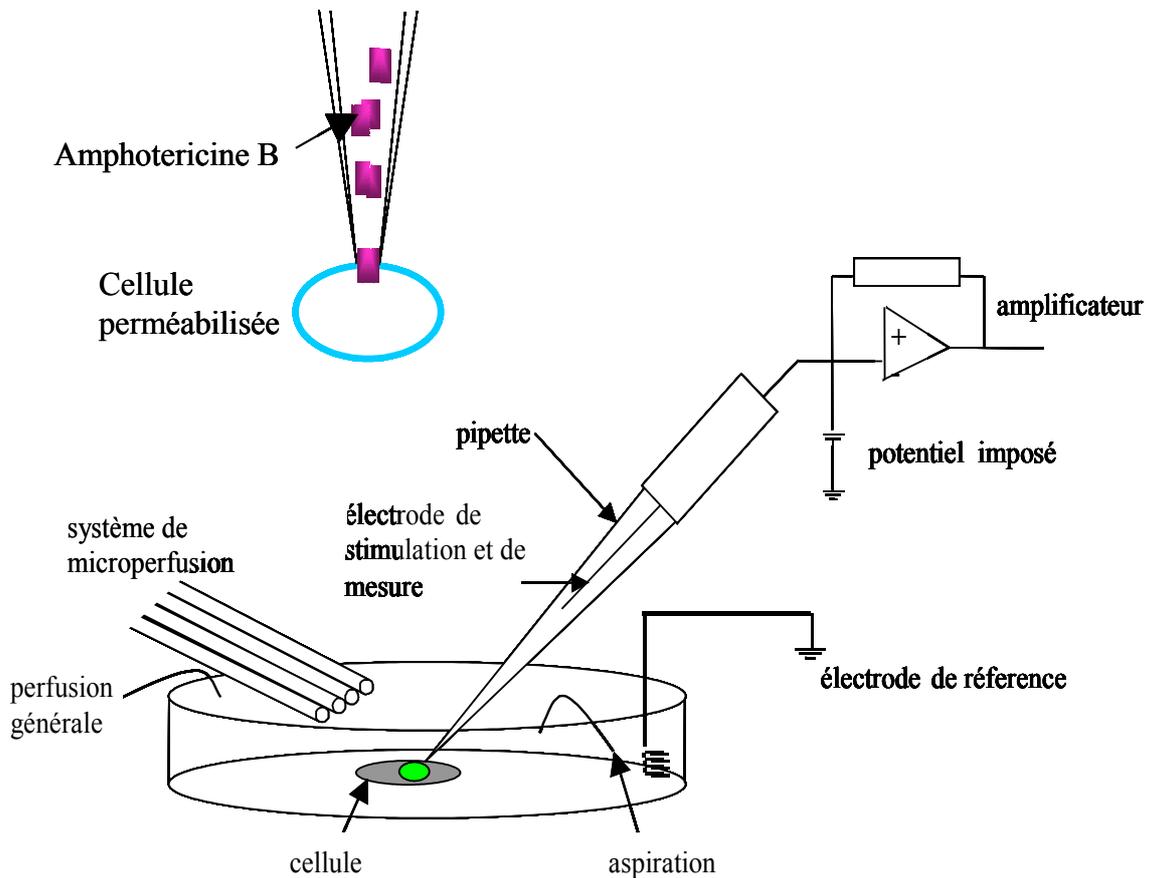


Figure 29 : Représentation schématique de la configuration et du dispositif utilisé en patch-clamp. En haut est représentée la configuration cellule entière en condition perméabilisée et en bas le dispositif d'installation pour la technique de patch-clamp.

Pour l'enregistrement des courants, le potentiel de membrane est imposé à l'aide d'un logiciel informatique (Acquis1) et les courants enregistrés sont analysés à l'aide de ce même logiciel.

4.3.2 Matériel et milieux utilisés

Les cellules sont immergées dans une solution Tyrode (NaCl 145 mM, KCl 4 mM, HEPES 5 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM, glucose 5 mM, pH 7,4) renouvelée constamment par un système de perfusion générale et d'aspiration (Figure 29). Cette solution correspond au milieu extracellulaire physiologique des cellules. La température des cellules et de la perfusion générale est maintenue à 35°C tout au long de l'expérimentation par un chauffage thermostaté. La température du bain dans la boîte de Pétri est régulièrement contrôlée au cours de l'expérimentation.

Lors de l'enregistrement des courants potassiques, un système de micro-perfusion, dirigeable à l'aide d'un micro-manipulateur, permet d'amener différentes solutions au-dessus de la cellule en cours d'étude. Ce dispositif est constitué de tubes en Tygon (diamètre interne de 0.25 mm) accolés parallèlement les uns aux autres (Figure 29). Les milieux de perfusion contenus dans des seringues reliées à ce système sont appliqués localement par gravité. La solution de base utilisée (gluconate-Na 145 mM, gluconate-K 4 mM, gluconate-1/2Ca 1 mM, gluconate-1/2Mg 1 mM, glucose 5 mM, HEPES 5 mM, mannitol 20 mM, pH 7,4) ne contient pas de chlore de manière à limiter les courants endogènes propres à cet ion.

Les pipettes de verre sont étirées à partir de tubes à hématocrite (Kimble) avec une étireuse verticale (Modèle P-30, Sutter Instrument & Co) pour que leur résistance soit comprise entre 2.5 et 3.5 Mohm lorsqu'elles sont remplies avec la solution de pipette (K-gluconate 120 mM, KCl 25 mM, HEPES 10 mM, EGTA 1 mM et amphotéricine B 0.8 µg/mL, pH 7.3). Cette solution contient, comme le milieu intracellulaire, 145 mM de potassium de manière à visualiser le courant potassique étudié. La quantité de chlore dans ce milieu est faible pour minimiser les courants endogènes. La présence de cet ion est, toutefois, indispensable au passage du courant du milieu pipette à l'électrode d'argent chlorurée.

4.3.3 Protocoles de stimulation utilisés et analyses

Le courant I_{Ks} s'active progressivement après une dépolarisation de la membrane et se désactive lors d'une repolarisation de celle-ci. A partir d'un potentiel de repos de -80 mV, la séquence de stimulation comprend une phase de dépolarisation à +40 mV (ou prépulse) pendant laquelle la majorité des canaux sont activés. Cette phase est suivie d'une repolarisation à -40 mV (ou pulse) au cours de laquelle le courant se

désactive. Le choix des potentiels d'activation et désactivation se fait en tenant compte des propriétés du courant et de la force électromotrice. D'après la courbe d'activation présentée à la page 27, le courant est complètement activé à +40 mV et désactivé à -40 mV. Il serait possible de repolariser la cellule à un potentiel plus négatif mais la force électromotrice serait alors réduite et le courant diminué malgré la complète activation des canaux au début du pulse. Entre deux séquences, le potentiel est maintenu à -80 mV (potentiel de repos). Les durées du prépulse et du pulse sont de 1000 et 500 ms respectivement et les séquences sont imposées à une fréquence de 0,2 Hz.

Les courants enregistrés par l'ordinateur sont ultérieurement analysés à l'aide du logiciel Acquis-1. L'amplitude du courant est mesurée lors du pulse, sur le courant de queue qui suit un décours de forme monoexponentiel, selon la fonction suivante :

$$I(t) = a + b \cdot \exp(-t / \tau_{\text{deac}})$$

$I(t)$ est le courant au temps t et τ la constante de temps de désactivation du courant. Au début de la repolarisation ($t = 0$), tous les canaux préalablement activés par le prépulse sont encore ouverts et le courant maximal correspond à $I(0) = a + b$. A un temps infini, la désactivation à -40 mV est terminée et le courant résiduel, s'il existe, n'est pas lié aux canaux potassiques étudiés ($I(\infty) = a$). Le courant dépendant des canaux K^+ est donc le résultat de la différence $I(0) - I(\infty) = b$. Cette méthode de mesure du courant de queue permet de s'affranchir du courant capacitif, présent à chaque saut de potentiel, et de la désactivation éventuellement incomplète du courant à la fin des 500 ms.

Pour comparer l'amplitude du courant de cellule à cellule, le courant de queue mesuré est divisé par la capacité membranaire qui donne une estimation de la surface cellulaire. Les amplitudes sont donc exprimées en pA/pF.

Le temps de demi-activation et la constante de désactivation sont aussi calculés. La constante de désactivation τ_{deac} est donnée par la formule présentée juste avant. Le temps de demi-activation se calcule en fonction du courant maximal mesuré à la fin du prépulse. Ce courant est divisé par 2 et le temps nécessaire pour atteindre cette valeur de courant, lors du prépulse, est pris comme temps de demi-activation. Cette méthode de calcul est réalisable même si le courant enregistré en tout début de prépulse est masqué par le courant capacitif.

4.4 Analyse biochimique des protéines

4.4.1 Western-blot

Pour les expériences de Western-blot, les cellules sontensemencées dans des boîtes de Pétri de 35 mm ou des plaques 6 puits. Plusieurs puits (2 à 4) sont utilisés pour chaque condition. 24 à 48 heures après la transfection, les cellules sont lysées. Dans certaines conditions les cellules peuvent avoir été traitées, avant la lyse, avec de la colchicine (10 mM) pendant 1 à 2 heures et/ou du pCPT-cAMP (400 μ M), de l'acide okadaïque (0.2 μ M) et de la forskoline (10 μ M) pendant 10 à 15 minutes.

Après l'ajout du tampon de lyse (NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Tris 20 mM, Triton X100 1%, anti-protéases (Complete, Roche Diagnostics) et 1 mM de phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, Sigma)), les cellules sont grattées et broyées à l'aide d'une seringue et d'une aiguille 25G puis incubées à 4°C pendant 40 minutes pour solubiliser les membranes. Le lysat est ensuite centrifugé à 15 000 g pendant 15 minutes pour éliminer les noyaux et les cellules mal lysées. Le surnageant est récupéré et les protéines sont dénaturées dans le tampon Laemmli (glycérol 2%, Tris pH 6.8 à 13 mM, SDS 0.46%, DTT 2 mM et du bleu de bromophénol). Pour yotiao, un tampon contenant de l'urée et plus de DTT est utilisé (SDS 2.5%, urée 37.5 mM, sucrose 150 mM, Tris-HCl 25 mM, DTT 100 mM). La dénaturation se fait à température ambiante pendant 30 minutes ou à 95°C pendant 10 minutes (pour yotiao).

Vingt-cinq à 40 μ L de chaque échantillon sont déposés sur un gel de polyacrylamide de 5% pour yotiao et 10 ou 12% pour KCNQ1 et la β -tubuline. Les protéines sont séparées par électrophorèse en présence de SDS. Après leur migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose pendant 30 minutes à 18V à l'aide d'un appareil pour transfert semi-sec. Pour yotiao, un transfert liquide à 40V sur toute la nuit est choisi de manière à transférer la totalité de cette protéine de haut poids moléculaire.

Afin de s'assurer du bon transfert des protéines, la membrane est colorée à l'aide de rouge Ponceau. Après lavage, elle est saturée avec un tampon TBS-T (Tris 10mM, NaCl 150m et du Tween 20 à 0.1%) contenant 5% de lait. Elle est ensuite incubée en présence de l'anticorps primaire dilué dans le TBS-T lait 5%, toute la nuit à 4°C ou pendant 1 heure à température ambiante. Après plusieurs rinçages au TBS-T lait, la

membrane est incubée avec l'anticorps secondaire couplé à la HRP (Santa Cruz Biotechnology) dilué au 1/10000, pendant une heure à température ambiante. Enfin, après plusieurs bains dans du TBS-T sans lait, la révélation est effectuée avec un kit de détection de chemiluminescence (GE Healthcare). La quantification des bandes de Western-blot est effectuée à l'aide du logiciel Image J.

4.4.2 Co-immunoprécipitation

Les lysats sont obtenus comme précédemment et incubés avec 1.5 µg d'anticorps anti-KCNQ1 (Alomone Labs) ou anti-β-tubuline (Santa-Cruz Biotechnology) toute la nuit, sous agitation à 4°C. Vingt µL de billes d'agarose couplées à la protéine G (GE Healthcare), préalablement rincées dans le tampon de lyse, sont ajoutés aux lysats. Après une incubation d'au moins une heure à 4°C, les billes sont rincées plusieurs fois avec du tampon de lyse complet (sans PMSF) et 2 fois avec le tampon de lyse sans Triton. Après le dernier rinçage, les billes sont centrifugées et le culot est repris dans 25 µL de tampon de dénaturation puis dénaturé comme précédemment. Les échantillons sont ensuite déposés sur gel d'acrylamide puis un Western-blot est effectué selon le protocole décrit précédemment.

5 Les cardiomyocytes de cobaye comme système natif

5.1 Transfection des cardiomyocytes

La transfection *in vivo* des cardiomyocytes de cobaye a été mise au point au sein du laboratoire, au cours de mon stage de Master 2, grâce à la présence au sein de l'unité d'une équipe développant des vecteurs de transfection synthétiques. J'ai pu montrer qu'en injectant 50 µL de solution physiologique contenant 100 µg d'ADN plasmidique complexé au vecteur, dans la paroi ventriculaire gauche de cobaye, plusieurs centaines de myocytes pouvaient être transfectés. Lorsque l'ADN plasmidique injecté code pour la molécule CD8 (marqueur membranaire) et que les cellules transfectées sont concentrées après fixation à des billes magnétiques couplées aux anticorps anti-CD8, environ 1407 ± 219 cardiomyocytes transfectés sont retrouvés après isolement enzymatique. Toutefois, la part de cardiomyocytes transfectés, vivants et non lésés par la digestion enzymatique est plus réduite puisqu'en moyenne 200 cardiomyocytes de ce type sont comptés. Les myocytes

isolés étant étudiés en patch-clamp dans l'après-midi suivant l'isolement, cette quantité est largement suffisante.

5.1.1 Construction des plasmides pour la transfection *in vivo*

Les plasmides utilisés pour la transfection des cardiomyocytes de cobaye *in vivo* sont des pIRES-CD8-Nedd4-2. Ce type de plasmide permet l'expression de la protéine CD8 et de la protéine d'intérêt Nedd4-2 au sein de la même cellule transfectée. La construction d'un tel plasmide a été réalisée à partir d'un plasmide pIRES-CD8 et d'un plasmide pCDNA3-Nedd4-2 (WT ou muté) fourni par l'équipe d'Hugues Abriel (Lausanne, Suisse). Le plasmide pIRES obtenu a été amplifié pour atteindre une concentration en solution mère supérieure à 5 µg/µL.

5.1.2 Préparation du mélange vecteur-ADN

Le vecteur synthétique Tétronique 304, à base de poloxamines, est un block copolymère tétrafonctionnel développé par l'équipe de Bruno Pitard et fourni à façon par BASF. La solution stock à 10% est préparée dans de l'eau stérile. La formulation de l'ADN avec les poloxamines est réalisée en mélangeant le même volume de solution stock et de solution d'ADN plasmidique de manière à atteindre une quantité finale de 100 µg d'ADN dans 50 µL de volume final. Les solutions sont diluées dans un milieu isotonique correspondant au milieu physiologique extracellulaire. Le mélange est effectué au dernier moment, juste avant l'injection qui est réalisée avec une seringue Hamilton (GastightR #1710) munie d'une aiguille 30G x1/2.

5.1.3 Technique d'injection *in vivo*

- Animaux

Les animaux utilisés sont des cobayes Hartley mâles (Charles Rivers) d'environ 8 semaines et pesant entre 250 g et 300 g à la livraison. Avant manipulation, les animaux sont soumis à une période d'acclimatation de 4-5 jours à 2 par cage, dans une animalerie ventilée, maintenue à 23 °C.

- Anesthésie

Avant la transfection dans les cardiomyocytes, une injection d'atropine (Atropine sulfate®, Aguettant) est réalisée à la dose de 0,1 mg/kg en sous-cutané (SC).

L'animal est alors placé dans une cage à induction. L'anesthésique utilisé est l'isoflurane (Forene®, Abbott) à 2,5% avec air comprimé (appareil d'anesthésie gazeuse et compresseur d'air AIR 50, TEM). Une fois endormi, le cobaye est placé sur un tapis chauffant et l'anesthésie est maintenue à l'aide d'un masque.

- Intubation

Une intubation par méthode rétrograde est alors réalisée : une sonde urinaire chat 3 French avec guide est introduite entre deux anneaux trachéaux et dirigée crânialement de manière à la faire ressortir par la bouche. La tubulure d'un cathéter pour cheval de 1,6 mm de diamètre externe est alors glissée dans la lumière de la trachée en se servant de la sonde urinaire comme guide. Une fois la tubulure en place et la sonde retirée, l'animal est placé en décubitus dorsal sous respirateur artificiel (Harvard Apparatus). L'orifice formé entre les deux anneaux trachéaux est refermé par ligature avec du fil et aiguille sertie Prolène 6-0 non résorbable.

- Injection et sutures

Une thoracotomie latérale gauche est pratiquée au niveau du 3ème ou 4ème espace intercostal (EIC) et un écarteur est mis en place. Le péricarde est déchiré et l'injection du mélange vecteur-ADN est réalisée dans la paroi ventriculaire gauche sous loupe binoculaire. L'espace intercostal ouvert est refermé avec du fil vicryl metric 3 après avoir reformé le vide pleural par aspiration. La peau est ensuite suturée après rapprochement des muscles.

Le protocole analgésique est réalisé avec de la nalbuphine (Nubain®, 0,2 mg/kg) ou de la buprénorphine (Temgesic®, 0.05 mg/kg) en pré- ou per-opératoire.

5.2 Isolement des cardiomyocytes

- Euthanasie

Trois à huit jours après injection, les cobayes sont anesthésiés par une injection intrapéritonéale d'étomidate (Hypnomidate®, 20 mg/kg). De l'héparine sodique (héparine Choay®, 10000 U.I/kg) est aussi injectée. Une fois anesthésié, l'animal est euthanasié par dislocation vertébrale.

- Pose sur colonne de Langendorff

Le cœur est alors prélevé et déposé dans un b cher placé dans la glace et contenant une solution physiologique froide et oxyg n e (solution 1 : NaCl 135 mM, NaH₂PO₄ 0,33 mM, KCl 5,4 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 10 mM, Glucose 10 mM, CaCl₂ 1,8 mM, ajust e au pH 7,4) pour le rincer. Son aorte est gliss e et fix e sur une canule reli e à une colonne de Langendorff maintenue à 37 C. Le cœur est alors perfusé par son réseau coronaire pendant 5 min avec la solution 1 oxyg n e. Cette étape permet au cœur de retrouver une bonne activité contractile et de chasser le sang restant dans les cavités cardiaques.

- Perfusion du cœur et digestion enzymatique

Il est ensuite perfusé avec une solution sans Ca²⁺ oxyg n e (solution 2 : solution 1 sans calcium) pendant 5 minutes. L'arrêt de l'activité contractile permet de vérifier la bonne perfusion du myocarde. L'absence de Ca²⁺ fragilise les liaisons intercellulaires et favorise la dissociation cellulaire.

La solution enzymatique (solution 2) contenant des collagénases (Worthington type 2, 350 U/mL) et protéases (Sigma, 0.6 U/mL) est perfus e pendant 7 à 15 minutes, selon la taille du cœur et l'activité des enzymes. Le cœur perd alors de sa consistance. La digestion enzymatique est arr t e par la perfusion de la solution 2 à laquelle est ajouté 0.2 mM de calcium, pendant 5 minutes.

- Récupération des myocytes isolés

L'ensemble cœur-canule est alors retiré de la colonne. La zone d'injection est pr lev e et les cellules sont mises en suspension dans un tube contenant une solution hyperpotassique (solution KB : taurine 10 mM, acide aspartique 70 mM, KCl 25 mM, KH₂PO₄ 10 mM, EGTA 0,5 mM, glucose 22 mM ajusté au pH 7,4). Les cellules sont individualis es en agitant doucement la suspension, à l'aide d'une pipette Pasteur polie, et sont réparties en plusieurs tubes après filtration sur une toile de nylon (diamètre des pores : 200  m). Elles sont alors mises au repos pendant environ 1 h   l'air libre et le milieu KB est changé régulièrement après sédimentation naturelle des cellules.

- Concentration des myocytes transfectés

Avant d'étudier les myocytes transfectés en patch-clamp, des billes magnétiques couplées aux anticorps CD8 (Dynal biotech) sont ajoutées au milieu contenant les cellules. Les cellules transfectées exprimant les molécules CD8 à leur membrane et sur lesquelles les anticorps couplés aux billes magnétiques ont pu se fixer sont concentrées à l'aide d'un aimant (MiniMACS separation unit). Celui-ci est maintenu contre le tube contenant les cellules et plusieurs rinçages sont effectués avec une solution Tyrode (NaCl 132 mM, KCl 4 mM, HEPES 10 mM, MgCl₂ 1,2 mM, CaCl₂ 1,8 mM, Glucose 5 mM, pH 7,4).

5.3 Analyse électrophysiologique des courants potassiques

5.3.1 Choix des conditions de patch-clamp

L'étude des courants potassiques (I_{Ks} et I_{K1}) dans les cardiomyocytes est réalisée en configuration cellule entière. Le rundown du courant I_{Ks} observé dans les cellules COS-7 est moins rapide dans les cardiomyocytes et il est possible d'étudier ces cellules en condition percée. Cette condition est plus rapide et pratique à utiliser puisque, une fois le gigaseal réalisé, la membrane est percée par aspiration. Cette condition est applicable aux cardiomyocytes si le temps nécessaire pour effectuer les différents protocoles d'acquisition est suffisamment court pour que le rundown n'ait pas lieu. Cette condition a été choisie pour l'étude des effets de Nedd4-2 sur le courant.

En revanche, pour l'étude concernant les effets des microtubules sur le courant, la cellule devait être maintenue intacte le temps que le courant se stabilise avant et après la stimulation de la PKA, c'est-à-dire pendant un temps assez long. En condition percée, le rundown aurait pu être trop important pour que l'analyse soit fiable. De plus, il a été montré que le traitement à la colchicine aboutissait à des effets différents sur le courant $I_{Ca,L}$ selon la condition percée ou perméabilisée choisie. L'augmentation du courant en condition percée et en présence de colchicine pourrait être liée à une perte des protéines Gi inhibant le canal calcique. Pour ces différentes raisons et pour rester dans les conditions les plus physiologiques possible, la condition perméabilisée a été préférée pour cette étude.

5.3.2 Milieux utilisés

Le milieu de perfusion générale dans lequel baignent les cellules est, comme pour les cellules COS-7, proche du milieu extracellulaire physiologique (NaCl 132 mM, KCl 4 mM, HEPES 5 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgCl₂ 1.2 mM et glucose 5 mM, pH 7.4). Le milieu perfusé localement sur la cellule en cours d'étude (NaCl 132 mM, KCl 4 mM, HEPES 5 mM, MgCl₂ 1.2 mM, glucose 5 mM et mannitol 5 mM, pH 7.4) contient des inhibiteurs du courant calcique (Nifédipine 4 μ M) et du courant I_{Kr} (E-4031 5 μ M).

La pipette est remplie d'un milieu simple contenant du potassium et un tampon HEPES (K-gluconate 120 mM, KCl 25 mM, 10 HEPES, pH 7.3) auquel peut être ajouté de l'EGTA (1 mM) pour chélater les ions calcium et éviter la contraction des myocytes. En condition perméabilisée, de l'amphotéricine B (0.8 μ g/mL) est aussi ajouté à ce milieu.

5.3.3 Protocoles utilisés

Les protocoles d'électrophysiologie à utiliser sur cardiomyocytes doivent tenir compte des courants à étudier mais aussi de ceux non souhaités pour l'étude. De manière à maintenir les canaux sodiques dans un état inactivé, le potentiel imposé ne descend jamais au-dessous de -40 mV pour l'enregistrement de I_{Ks}, y compris entre les protocoles de stimulation. A un tel potentiel, les canaux potassiques KCNQ1 et HERG sont désactivés (voir p. 27) ainsi que les canaux calciques de type L. Seul le courant I_{K1} est visible à ce potentiel. Une stimulation à +40 mV va permettre d'activer les courants I_{Ks}, I_{Kr} et I_{Ca,L}. La présence des inhibiteurs de I_{Ca,L} et de I_{Kr} permet alors de n'enregistrer que le courant I_{Ks} (Figure 30). Comme dans les cellules COS-7, le courant est mesuré lors de la repolarisation à -40 mV, selon la même équation décrite plus haut. Cette méthode nous permet de soustraire le courant I_{K1} présent à -40 mV du courant I_{Ks}.

Pour mesurer I_{K1}, des sauts de potentiel entre -110 mV et -20 mV durant 500 ms ont été réalisés à partir d'un potentiel de -60 mV.

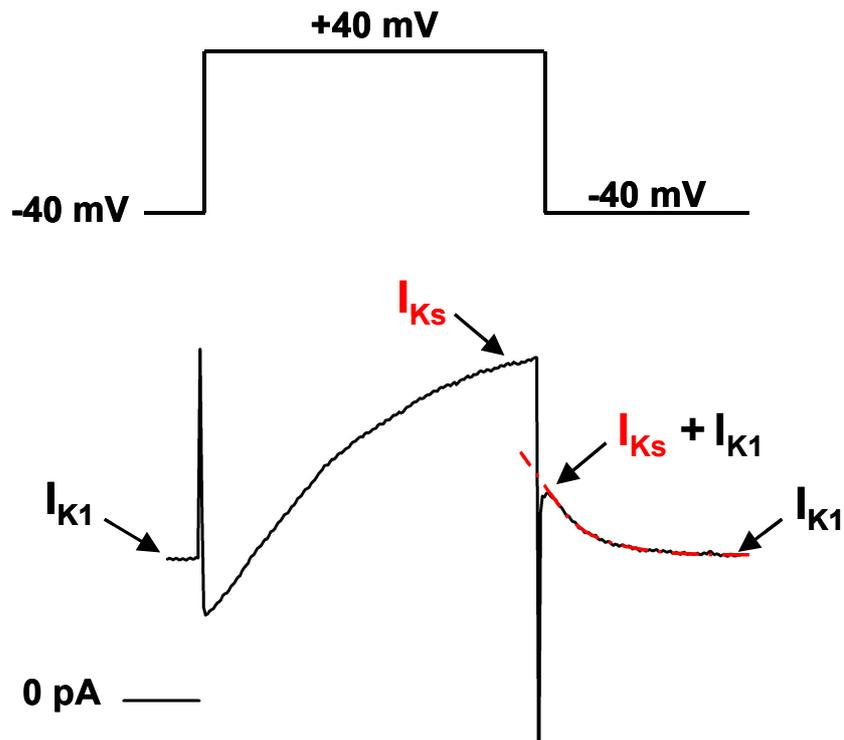


Figure 30 : Protocole de stimulation dans les cardiomyocytes pour mesurer I_{Ks} . En bas sont représentés les courants activés par le protocole de stimulation décrit au-dessus, en présence de Nifédipine (inhibiteur de $I_{Ca,L}$) et de E-4031 (inhibiteur de I_{Kr}).

6 Statistiques

Tous les tests statistiques sont réalisés à l'aide du logiciel SigmaStat. Tous les résultats sont présentés comme des moyennes \pm sem (erreur standard à la moyenne) et une différence est considérée significative si la valeur p (probabilité de conclure à une différence alors que celle-ci est due au hasard) est inférieure à 0.05.

- Comparaison de deux échantillons indépendants

Pour comparer deux échantillons indépendants (par exemple, courant de base dans les cellules traitées et non traitées), un test de Student est réalisé.

- Comparaison de plus de deux échantillons indépendants

Pour comparer plusieurs échantillons indépendants (par exemple, courants obtenus dans les cellules non traitées, traitées au taxol ou à la colchicine), une ANOVA

(Analyse of variance) à une dimension (ou voie) est effectuée. Ce test permet de comparer les échantillons entre eux et de déterminer si une différence entre au moins deux échantillons existe.

- Comparaison de deux échantillons appariés

La comparaison des paramètres du courant obtenus avant et après stimulation à la PKA sur un même lot de cellules nécessite des tests de comparaison de valeurs appariées puisque, sur chaque cellule, la valeur après stimulation fait référence à la valeur avant stimulation. Le test de référence pour ce type de comparaison est le test de Student pour valeurs appariées.

Pour de très petits échantillons ($n = 4$ ou 5 , pour les Western-blot), un test non paramétrique est choisi. Contrairement aux tests paramétriques, ce type de test n'est pas basé sur la comparaison de moyennes de valeurs réelles entre échantillons mais sur l'évaluation des rangs de ces valeurs au sein de chaque échantillon et la comparaison de ces rangs entre les échantillons. Le test choisi pour comparer deux échantillons appariés (avant et après phosphorylation d'une même protéine) est le test de Wilcoxon.

- Comparaison de plus de deux échantillons appariés

Pour comparer l'effet de l'osmolarité sur le courant, une différence des paramètres du courant obtenus en conditions iso-osmotique, hypo-osmotique et hyper-osmotique est recherchée. Ces conditions sont appariées puisque les paramètres sont mesurés sur une même cellule dans chaque condition. Le test réalisé est alors une ANOVA à une dimension pour mesures répétées (one-way RM ANOVA). Le résultat de l'ANOVA indique s'il existe une différence entre ces conditions.

- Comparaison de la réponse à une même stimulation entre deux lots de cellules

De manière à déterminer, par exemple, si la réponse à l'osmolarité obtenue dans les cellules en condition contrôle est semblable à celle obtenue dans les cellules traitées à la colchicine, une ANOVA à 2 dimensions pour mesures répétées est réalisée (two-way RM ANOVA). Ce type de test prend en compte l'évolution des valeurs entre chaque condition dans un lot de cellules pour comparer ensuite les lots entre eux. Si

la valeur p du test est supérieure à 5%, il n'existe pas de différence de réponse entre les deux lots.

Dans ce cas, chaque lot est traité indépendamment et les valeurs p obtenues à partir des tests de comparaison de moyennes appariées sont données pour chaque lot. Dans notre exemple sur l'osmolarité où 3 conditions sont testées dans chaque lot, les valeurs de l'ANOVA à une dimension pour mesures répétées sont données comme valeurs de référence. Si seulement deux conditions sont testées (avant et après stimulation de la PKA, par exemple), ce sont les valeurs du test de Student pour valeurs appariées qui sont données.

Dans le cas où l'ANOVA à 2 dimensions indique une différence de réponse à la stimulation ($p < 0.05$), les lots ne peuvent être considérés de manière complètement indépendante et la différence d'évolution doit être prise en compte. Des tests de Tukey, qui tiennent compte de cette différence entre les lots, sont alors réalisés à la suite de l'ANOVA. La valeur p obtenue à partir de ces tests de Tukey réalisés dans chaque lot est alors donnée comme valeur de référence. Par exemple, dans le cas de la réponse à la PKA dans les cellules COS-7, l'ANOVA à 2 dimensions réalisée entre les cellules traitées et non traitées à la colchicine donne une valeur $p < 0.05$ (il existe une différence de réponses entre ces deux groupes). Les tests de Tukey réalisés dans chaque lot de cellules indiquent une différence avant et après la stimulation de la PKA dans les cellules non traitées ($p < 0.001$) mais aucune différence significative n'est détectée dans les cellules traitées ($p > 0.05$).

RESULTATS ET DISCUSSION

7 La réponse du courant I_{Ks} à la phosphorylation PKA-dépendante de KCNQ1 dépend de l'interaction du canal avec les microtubules

7.1 Introduction

Dans le but d'identifier de nouveaux partenaires du canal KCNQ1, le criblage d'une banque d'ADNc de cerveau de souris a été réalisé par double-hybride chez la levure avec l'ADNc codant pour la queue N-terminale du canal utilisée comme appât. Ce type de test permet d'identifier les protéines capables d'interagir physiquement avec la partie N-terminale du canal.

Cette méthode mise au point par Fields et Song est basée sur la formation d'un complexe moléculaire activant l'expression de gènes rapporteurs. La protéine Gal4 est un facteur de transcription (FT) capable d'activer différents gènes dont *His3* et *LacZ*, codant pour l'histidine et la β -galactosidase, respectivement. Ce FT possède un site de fixation à l'ADN et un site d'activation de la transcription. Les ADNc codant pour la protéine appât sont fusionnés au site de fixation et les ADNc de la banque sont fusionnés au site d'activation de Gal4. L'interaction physique de l'appât et d'une protéine codée par l'un des ADNc de la banque permet l'assemblage des deux parties du FT et la transcription des gènes rapporteurs. La croissance des levures dans des conditions restreintes nécessitant le produit du gène rapporteur *His3* (histidine) et la coloration bleue des levures en présence de X-Gal, permise par la β -galactosidase, révèlent la formation d'un complexe. Le séquençage du plasmide transfecté dans ce type de levure permet alors d'identifier le gène codant pour la protéine interagissant avec le canal.

Cette méthode spécifique a permis de mettre en évidence que la β -tubuline interagissait avec la partie N-terminale du canal. Cette protéine forme des dimères avec l' α -tubuline et ces dimères s'assemblent entre eux pour former les microtubules, éléments du cytosquelette. Les microtubules jouent un rôle dans de nombreuses fonctions cellulaires et sont indispensables à la division cellulaire. Ils permettent aussi le trafic des vésicules de sécrétion et de transport vers les différents compartiments cellulaires et la membrane plasmique.

Quelle est l'implication physiologique de l'interaction observée entre la β -tubuline et le canal KCNQ1 ?

Iks response to PKA-dependent KCNQ1 phosphorylation requires direct interaction with microtubules

Nicolas CS, Park K-H, El Harchi A, Camonis J, Kass RS, Escande D, Mérot J, Loussouarn G, Le Bouffant F, Baro I,

voir thèse papier pour lire cet article en préparation

7.2 Résultats

La première étape a été de valider l'interaction entre ces deux partenaires. Une co-immunoprécipitation entre la β -tubuline et le canal KCNQ1 a donc été recherchée dans des cellules COS-7 exprimant le canal et dans les cardiomyocytes de cobaye. La figure 1B de l'article montre que ces deux protéines sont bien retrouvées dans le même complexe dans les deux modèles d'étude. Lorsque KCNQ1 est immunoprécipité, la β -tubuline est retrouvée dans le complexe précipité et inversement, lorsque la β -tubuline est immunoprécipitée, KCNQ1 est retrouvé dans le complexe. D'après l'immunomarquage réalisé sur cardiomyocytes de cobaye (figure 2 de l'article), ces deux protéines colocalisent en particulier au niveau des disques intercalaires où se trouve la majorité des canaux. Les microtubules, longs et fins, sont organisés en réseaux dans le cytoplasme. Au niveau des disques intercalaires, ils s'ancrent à la membrane plasmique par l'une de leurs extrémités. La colocalisation entre les canaux ioniques, dispersés dans la membrane, et la tubuline, ponctuellement ancrée à la membrane, n'est donc pas toujours visible sur des coupes de cardiomyocytes (microscopie confocale). La reconstitution 3D permet une meilleure visualisation de cette colocalisation (figure 2 de l'article).

Concernant le rôle physiologique d'une telle interaction, la première question posée a été de savoir si une altération des microtubules pouvait ou non modifier le courant I_{Ks} de base. Les microtubules peuvent être dépolymérisés par la colchicine et hyperpolymérisés par le taxol. Le tableau 1 de l'article montre que ces substances n'altèrent pas la densité ni les propriétés du courant dans les COS-7 exprimant KCNQ1 et KCNE1.

I_{Ks} est augmenté lors d'un choc hypoosmotique et réduit lors d'un choc hyperosmotique. L'équipe de Pongs a montré que le canal délété de sa partie N-terminale ne répondait plus aux chocs osmotiques. Serait-ce parce que cette réponse est médiée par les microtubules fixés à la partie N-terminale du canal ? Pour répondre à cette question, les cellules COS-7 transfectées avec le canal et KCNE1 ont été soumises à des solutions d'osmolarité variable. Comme le montre la figure 3 de l'article, les cellules traitées à la colchicine répondent à l'osmolarité de manière

similaire aux cellules non traitées. Les variations d'amplitude et de cinétique d'activation sont semblables dans les deux conditions.

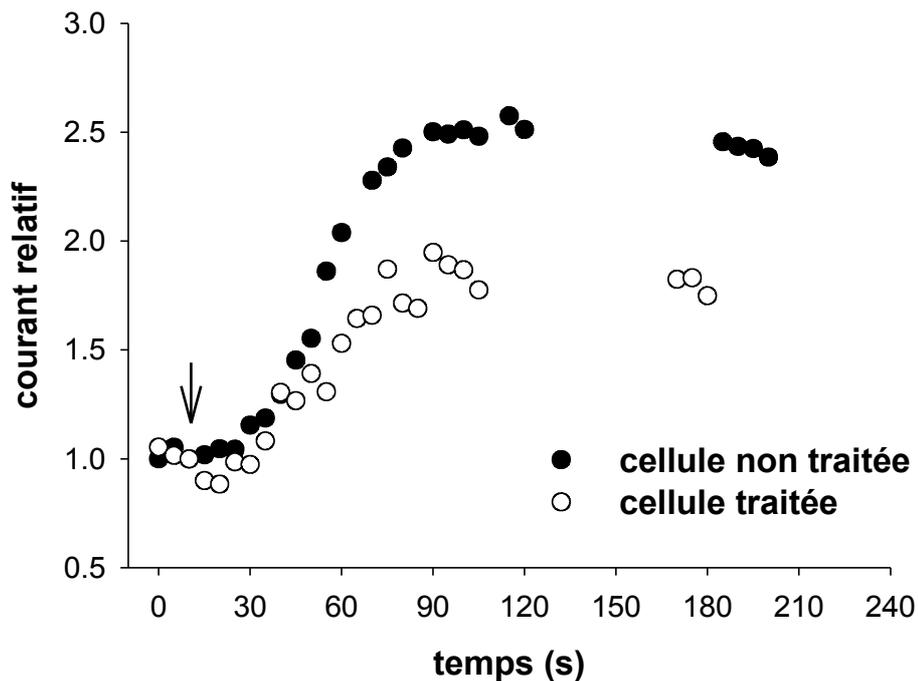
Comme nous l'avons vu dans l'introduction de cette thèse, le courant I_{Ks} augmente lors d'une stimulation β -adrénergique. L'association de l'AKAP yotiao et de KCNQ1 et la phosphorylation des deux protéines par la PKA sont des éléments indispensables à la réponse du courant I_{Ks} . Yotiao étant une AKAP susceptible d'interagir avec le cytosquelette, nous avons émis l'hypothèse que les microtubules pourraient jouer un rôle dans la régulation du courant par la PKA. La figure 4 de l'article montre effectivement que la dépolymérisation des microtubules altère la réponse du courant à une stimulation de la PKA dans les cellules COS-7 transfectées avec KCNQ1, KCNE1 et yotiao. De manière troublante, le temps de demi-activation en réponse à la PKA est diminué dans les cellules traitées à la colchicine, comme dans les cellules contrôles, alors que la variation d'amplitude est supprimée (figure 4D de l'article).

Nous avons pensé que la dépolymérisation des microtubules pouvait empêcher l'interaction de yotiao et de KCNQ1 ou la phosphorylation de ces protéines. Pour vérifier ces hypothèses, des co-immunoprécipitations et Western-blots ont été réalisés sur des cellules COS-7 transfectées et traitées ou non à la colchicine. La figure 5 montre que tous les éléments indispensables à la réponse du courant sont présents dans les cellules traitées à la colchicine : le canal KCNQ1 interagit avec yotiao (figure 5B) et ces deux protéines sont bien phosphorylées (figure 5C et D). Le fait que la β -tubuline et yotiao (même phosphorylé) ne soient pas retrouvés dans le même complexe en absence de KCNQ1 (figure 5A de l'article) infirme l'hypothèse que yotiao pourrait servir d'intermédiaire entre les microtubules et la réponse du courant. Les microtubules ont donc un rôle majeur dans la réponse du courant à une stimulation de la PKA et la dépolymérisation de ceux-ci n'altère pas l'interaction entre yotiao et le canal ni la phosphorylation de ces protéines.

La figure 6 de l'article montre que la réponse du courant à cette stimulation est aussi diminuée dans les cardiomyocytes de cobaye traités à la colchicine. Comme dans les cellules COS-7, la dépolymérisation des microtubules ne modifie que l'augmentation d'amplitude sans modifier les variations de cinétiques du courant. Le

report de l'intensité des courants mesurés en fonction du temps (Figure 31) permet de visualiser la vitesse avec laquelle le courant répond à la stimulation. L'intensité du courant augmente rapidement après l'application des activateurs de la PKA et se stabilise en quelques minutes, suggérant un effet direct de la PKA sur le canal. La cinétique de réponse est similaire dans les cellules COS-7 non traitées (non montré).

Figure 31 : Augmentation du courant en réponse à une stimulation de la PKA en fonction du



temps. Sur cette figure sont représentés les courants de queue relatifs (en fonction du courant avant stimulation) en fonction du temps, enregistrés dans un cardiomyocyte de cobaye non traité (noir) et dans un cardiomyocyte traité à la colchicine (30 μM). Après application d'AMPc (400 μM), d'acide okadaïque (0.2 μM) et de forskoline (10 μM , flèche), le courant augmente dans les secondes qui suivent et est stabilisé en moins de 2 minutes.

Le courant I_{K1} est aussi sensible à la PKA. Sous stimulation β -adrénergique, la phosphorylation du canal Kir2.1 par la PKA aboutit à la diminution du courant I_{K1} (voir annexe 3, paragraphe 1.1). La figure 6F de l'article montre que la diminution de ce courant en réponse à la stimulation est maintenue dans les cardiomyocytes traités à la colchicine. L'effet des microtubules sur la réponse du courant est donc spécifique au courant I_{Ks} .

7.3 Discussion et perspectives

Ces résultats montrent que les microtubules sont impliqués dans la réponse du courant I_{Ks} à la PKA. Différentes hypothèses peuvent être émises concernant le mécanisme par lequel ils interviennent dans cette réponse. Le courant mesuré est proportionnel à la probabilité d'ouverture des canaux (P_o), à leur conductance (γ) et au nombre de canaux présents à la membrane (N). Une augmentation du courant peut donc être due à une modification des propriétés biophysiques des canaux (P_o et γ) favorisant leur ouverture ou à une augmentation du nombre de canaux présents à la membrane (N).

Notre première hypothèse est que la phosphorylation du canal induit un changement conformationnel favorisant son activation (P_o ou γ augmentée). Les microtubules interagissant avec le canal joueraient un rôle majeur dans cette activation. Il est aussi possible que les microtubules interviennent dans la phosphorylation d'un deuxième site sur le canal (P_o ou γ augmentée) et que leur dépolymérisation limite l'activation du canal liée à ce deuxième site. Enfin, une augmentation du nombre de canaux à la membrane (N) est aussi envisageable sachant que les microtubules interviennent dans le trafic de plusieurs protéines membranaires.

- Hypothèse 1 : l'augmentation du courant est liée à une modification des propriétés biophysiques du canal impliquant les microtubules

Les phosphorylations de KCNQ1 et de yotiao modifient nettement les propriétés du courant I_{Ks} en accélérant son activation, ralentissant sa désactivation et en décalant sa courbe I-V vers des potentiels plus négatifs . Tous ces éléments participent à l'augmentation du courant observée.

Des effets similaires sont observés sur le canal Kv1.5 associé à sa sous-unité Kv β 1.3 . La phosphorylation de la sérine 24 de Kv β 1.3 augmente nettement le courant et réduit son inactivation, suggérant une stabilisation du complexe dans une conformation activée. Comme pour KCNQ1 , l'augmentation du courant est rapide (en moins de 10 minutes) et l'effet est inhibé si la sérine phosphorylable est mutée en alanine. Inversement, si le canal est associé à la sous-unité Kv β 1.3 dont la sérine est mutée en un acide aminé chargé négativement (l'acide aspartique, simulant un état phosphorylé), le courant observé est similaire à celui observé avec la sous-unité Kv β 1.3 WT phosphorylée par la PKA . Cet effet sur le courant est comparable à celui observé avec le mutant KCNQ1 S27D et yotiao .

Pour les réponses médiées par la phosphorylation des complexes de Kv1.5 et KCNQ1, l'hypothèse la plus probable est qu'un effet électrostatique créé par la phosphorylation (charge négative) serait à l'origine d'un changement de conformation du canal favorisant l'état ouvert .

D'après nos résultats, lorsque les microtubules sont dépolymérisés, la modification des paramètres cinétiques est maintenue lors d'une stimulation de la PKA malgré l'absence d'augmentation du courant. Les microtubules interviendraient donc sur l'amplitude du courant (probabilité d'ouverture maximale ou conductance plus élevée) mais pas sur les propriétés cinétiques liées à cette activation.

La relation entre le courant et les cinétiques d'activation n'étant pas linéaire , il est aussi possible que la phosphorylation du complexe aboutisse d'abord à une modification des cinétiques d'activation puis, dans un deuxième temps, à une augmentation du courant. La dépolymérisation des microtubules peut limiter ces effets de sorte que seuls les effets sur les cinétiques soient visibles. Dans les myocytes, les effets de la dépolymérisation des microtubules seraient moins marqués, aboutissant à une légère augmentation du courant en plus de la modification des cinétiques.

Une étude en patch-clamp sur canaux unitaires pourrait permettre de déterminer si les effets observés en dépolymérisant les microtubules sont liés ou non à une modification de la probabilité d'ouverture ou de la conductance. Toutefois, les états de transition du canal sont extrêmement rapides et sa conductance unitaire estimée est faible . L'analyse de ces paramètres (P_o et γ) n'est donc pas réalisable sur canal unitaire. Seule une estimation peut être donnée, à partir d'une analyse de bruits, en calculant la fluctuation du courant global mesuré à partir d'un certain nombre de canaux . Il est difficile de savoir si une estimation sera suffisante pour déterminer si la conductance unitaire et la probabilité d'ouverture sont modifiées lorsque le canal est phosphorylé ou lors d'un traitement à la colchicine.

- Hypothèse 2 : la dépolymérisation des microtubules empêche la phosphorylation d'un autre site

Nous avons montré dans cette étude que la sérine 27 du canal KCNQ1 était toujours phosphorylée malgré la dépolymérisation des microtubules. Cette sérine serait la

seule à participer à l'effet de la PKA sur KCNQ1 selon le travail de Marx et al. . Toutefois, comme cela a été mentionné dans le paragraphe 2.3.3 de l'introduction, d'autres auteurs avancent qu'un deuxième site phosphorylable peut intervenir dans cette réponse : la sérine 468 et la thréonine 470 . D'après leurs travaux, la mutation KCNQ1 S27A ne diminue que partiellement la réponse qui est complètement inhibée uniquement si les trois acides aminés phosphorylables sont mutés en alanine.

Dans notre étude, il est possible que la dépolymérisation des microtubules qui n'altère pas la phosphorylation de la sérine 27, altère celle du deuxième site. Ceci expliquerait l'inhibition partielle de la réponse du courant observée dans les cardiomyocytes traités à la colchicine. Dans ces cellules, l'augmentation persistante mais réduite du courant serait liée à la phosphorylation de la sérine 27.

Cependant, dans les cellules COS-7 traitées à la colchicine, l'inhibition du courant est totale suggérant que, même si le deuxième site n'est pas phosphorylé dans ces cellules, un autre mécanisme intervient pour inhiber la réponse liée à la phosphorylation de la sérine 27.

Toutefois, de manière à écarter l'hypothèse d'une altération de la phosphorylation du deuxième site, une immunoprécipitation de KCNQ1 suivie d'un Western-blot révélé avec un anticorps anti-thréonine phosphorylée (ou spécifique de la S468 ou T470 phosphorylée) est envisageable dans toutes les conditions de traitement (avec ou sans colchicine et avant et après stimulation de la PKA) et pour les deux modèles d'étude (cardiomyocytes et COS-7). Cette expérience nous permettrait de déterminer si le deuxième site est phosphorylé dans les COS-7 et dans les cardiomyocytes après stimulation et si cette phosphorylation est perturbée par la dépolymérisation des microtubules. En fonction des résultats, l'étude en patch-clamp des cellules COS-7 transfectées avec les mutants S468A/T470A ou S468D/T470D et traitées ou non à la colchicine peut fournir des informations sur le rôle des microtubules dans la réponse du courant liée à ce deuxième site.

- Hypothèse 3 : la réponse du courant est liée à une augmentation du nombre de canaux à la membrane

Une autre hypothèse pour expliquer l'augmentation du courant réside dans l'augmentation du nombre de canaux à la membrane, en réponse à une stimulation β -adrénergique. Les microtubules sont, en effet, impliqués dans le trafic des vésicules intra-cellulaires vers les différents compartiments et la membrane

plasmique . Plusieurs articles décrivent une augmentation de la densité de canaux ou autres protéines membranaires en réponse à l'AMPc et montrent l'implication des microtubules dans cette réponse. La plupart des études sont réalisées dans des cellules épithéliales polarisées. Elles montrent que l'augmentation de l'exocytose en partie apicale est médiée par l'AMPc et les microtubules sans que la phosphorylation des protéines membranaires étudiées ne soit mise en évidence . En revanche, d'autres études réalisées sur des canaux ioniques ou des aquaporines mettent en rapport la phosphorylation de la protéine et sa migration vers la membrane plasmique. La phosphorylation de l'aquaporine 2 par la PKA au sein des vésicules d'exocytose permettrait son interaction avec les microtubules et son trafic vers la membrane plasmique . De manière intéressante, cet effet nécessite la présence d'AKAPs, et particulièrement l'AKA18δ, puisque leur inhibition supprime la translocation de l'aquaporine 2 vers la membrane .

De même, des études réalisées sur le canal sodique Nav1.5 montrent qu'une stimulation β-adrénergique induit une phosphorylation du canal et une augmentation de la densité de canaux à la membrane . L'application de chloroquine (substance empêchant le recyclage de la membrane plasmique) sur des ovocytes de Xénope transfectés avec le canal et sa sous-unité β1 inhibe la réponse du courant à une stimulation de la PKA, suggérant une implication du trafic dans la réponse . Si les sérines 525 et 528 de Nav1.5 sont mutées, aucune augmentation du courant n'est observée. La suppression de domaines de rétention dans le réticulum endoplasmique inhibe aussi la réponse du courant, suggérant que l'activation de la PKA permet de masquer ces sites de rétention et d'augmenter l'expression du canal à la membrane .

Tous ces résultats suggèrent fortement un rôle de la phosphorylation, des AKAPs et des microtubules dans l'expression de certaines protéines à la membrane. Dans toutes les études démontrant une augmentation du trafic en réponse à la phosphorylation des protéines, l'augmentation du courant se fait lentement et sur une longue période allant parfois jusqu'à plus d'1 heure. Dans notre cas, la réponse est extrêmement rapide et le courant est stabilisé dans les minutes suivant l'activation. Un effet de la PKA sur le trafic est donc peu envisageable dans un délai aussi court. Toutefois, nous n'avons jamais attendu une réponse au-delà de 10 minutes, le courant étant stabilisé avant ce délai, et il est possible que nous ayons manqué une augmentation plus lente ou plus tardive du courant. Une augmentation du courant en

deux paliers pourrait être envisagée. Le premier résulterait d'un effet biophysique lié à la phosphorylation du canal et un second, plus lent, résulterait d'une augmentation de trafic. Il est aussi possible d'envisager que la réponse rapide vienne d'une augmentation du trafic des vésicules sous-membranaires qui seraient recrutées quasi-instantanément. Plusieurs études montrent que le recrutement de vésicules sous-membranaires en réponse à la forskoline peut être rapide et dans le cas de CFTR, son recrutement à la membrane nécessite seulement 30 secondes de stimulation par la forskoline . Cet effet est inhibé par la dépolymérisation des microtubules et ne dépendrait pas de la phosphorylation du canal . Dans le cas de KCNQ1, la phosphorylation du canal est indispensable pour l'augmentation du courant, suggérant un mécanisme différent.

Cependant, une implication des microtubules dans l'augmentation du trafic de KCNQ1 ne peut être exclue. Des expériences complémentaires sont envisagées de manière à évaluer cette hypothèse. L'application de chloroquine sur des cellules COS-7 transfectées ou des cardiomyocytes pourraient déjà permettre de déterminer si le trafic est impliqué dans la réponse à la PKA. Des marquages en immunofluorescence des canaux à la membrane et des canaux intra-cellulaires peuvent aussi permettre de déterminer si la quantité de canaux à la membrane est augmentée sous stimulation PKA-dépendante et si les microtubules sont impliqués dans cette réponse. Une quantification des canaux KCNQ1 biotynilés avant et après les différents traitements est aussi envisageable. Nous pourrions enfin évaluer si l'interaction entre la β -tubuline et KCNQ1 est augmentée lorsque KCNQ1 est phosphorylé, en réalisant une co-immunoprécipitation des protéines avant et après traitement à l'AMPc. Un Western-blot permettrait ensuite de déterminer si la quantité de protéines présentes dans le complexe est augmentée ou non après phosphorylation du canal.

8 La dégradation de KCNQ1 est régulée par les ubiquitine-ligases de la famille Nedd4/Nedd4-like.

8.1 Introduction

Comme nous l'avons vu dans l'introduction de ce manuscrit, le nombre de canaux KCNQ1 présents à la membrane peut être modulé par l'action de protéines régulatrices telles que la calmoduline ou l'isoforme 2 ou par l'activation de voies de signalisation cellulaires intervenant dans son trafic. Cependant, aucune donnée concernant la dégradation du canal et une éventuelle modification de celle-ci dans des pathologies impliquant KCNQ1 n'est disponible.

Les protéines membranaires sont dégradées par la voie lysosomale ou par la voie du protéasome après avoir été ubiquitinylées (voir paragraphe 2.3.4 de l'introduction, p 63). L'ubiquitinylation des protéines se fait par des ubiquitine-ligases qui reconnaissent spécifiquement leurs substrats. Les canaux ioniques ENaC et Nav1.5 sont reconnus par les ubiquitine-ligases de la famille Nedd4/Nedd4-like. Cette famille contient 9 membres dont la protéine Nedd4-2, particulièrement impliquée dans l'internalisation de ces canaux. Ces ubiquitine-ligases possèdent au moins un domaine WW reconnaissant le motif PY présent sur leurs protéines cibles. Leur interaction avec la protéine à internaliser permet l'ubiquitinylation de celle-ci par leur domaine catalytique de type HECT .

Le canal KCNQ1 possède un motif PY dans son extrémité C-terminale. Il est donc possible que sa dégradation soit médiée par les ubiquitine-ligases de la famille Nedd4/Nedd4-like.

(Référence de l'article :

Jespersen T, Membrez M, Nicolas CS, Pitard B, Staub O, Olesen SP, Baró I, Abriel H. (2007). The KCNQ1 potassium channel is down-regulated by ubiquitylating enzymes of the Nedd4/Nedd4-like family.

*Cardiovasc Res.*2007, 74(1):64-74)

8,2 Résultats

Le canal KCNQ1 possède un motif PY dans son extrémité C-terminale : LPTYEQL. Ce motif est retrouvé dans différentes espèces (figure 1 de l'article), montrant sa conservation au cours de l'évolution. Les autres canaux de la famille KCNQ et la protéine KCNE1 ne possèdent pas ce motif.

Une quantification comparative des ARNm (ADNc) des neuf protéines de la famille Nedd4/Nedd4-like (figure 2 de l'article) montre que la protéine Nedd4-2 est la plus exprimée dans le cœur et le rein et qu'elle est aussi fortement exprimée dans le cerveau.

Si les protéines de cette famille sont effectivement capables de se fixer à KCNQ1 et d'entraîner sa dégradation, le courant obtenu à partir des cellules (HEK293) transfectées avec KCNQ1 ou KCNQ1+KCNE1 et ces ubiquitine-ligases devrait être inférieur à celui des cellules ne les exprimant pas. La figure 3 de l'article montre que les courants produits par KCNQ1 ou KCNQ1/KCNE1 sont fortement diminués en présence de Nedd4-2. Une diminution du courant KCNQ1/KCNE1 est aussi observée avec les protéines Nedd4-1 et WWP2. La co-transfection de ces ubiquitine-ligases avec le canal seul ou complexé à KCNE1 n'altère pas ses cinétiques d'activation et de désactivation.

Lorsque des protéines Nedd4-2 et Nedd4-1 mutées et catalytiquement inactives sont co-transfectées avec le canal, l'effet préalablement observé sur le courant en présence des ubiquitine-ligases WT est inhibé et le courant obtenu est semblable à celui des cellules n'exprimant pas ces protéines. Ces résultats montrent que l'effet obtenu en présence des protéines Nedd4-2 et Nedd4-1 (WT) est lié à leur domaine catalytique permettant l'ubiquitinylation d'une protéine cible.

Pour confirmer que Nedd4-2 diminue bien la quantité de canaux à la membrane, une quantification des canaux en fonction de la quantité de Nedd4-2 co-transfectée a été réalisée à partir de Western-blots sur KCNQ1. La figure 4 de l'article montre que la diminution de protéines KCNQ1 est corrélée à l'augmentation de protéines Nedd4-2, que le canal soit exprimé avec ou sans KCNE1. Si la zone d'interaction sur KCNQ1 est mutée (KCNQ1-YA), la diminution du courant I_{Ks} médiée par Nedd4-2 ou les autres ubiquitine-ligases n'est plus visible (figure 4E de l'article).

Tous ces résultats suggèrent fortement que Nedd4-2, Nedd4-1 et WWP2 s'associent avec KCNQ1 et permettent son ubiquitinylation. Des expériences de pull-down avec la GST fusionnée à la partie C-terminale de KCNQ1 ainsi que des co-immunoprécipitations à partir de KCNQ1 ont été réalisées et confirment cette hypothèse. Les figures 5A et 5B de l'article montrent que KCNQ1 et Nedd4-2 (ou Nedd4-1 ou WWP2) se retrouvent dans le même complexe. Les figures 5C, 5D et 5E montrent que l'ubiquitinylation du canal est effectivement augmentée en présence de Nedd4-2, que KCNE1 soit présent ou non. Cet effet n'est plus remarqué si l'association des deux protéines est perturbée (KCNQ1-YA) ou si l'enzyme est inactive (Nedd4-2CS).

Nedd4-2 est donc capable de s'associer à KCNQ1, permettant ainsi son ubiquitinylation et sa dégradation dans les cellules HEK293 et les cellules COS-7 transfectées transitoirement. Cette enzyme a-t-elle une action sur le courant I_{Ks} dans les cardiomyocytes ?

Pour vérifier ceci, des cardiomyocytes de cobaye ont été transfectés avec les plasmides codant pour les formes active (WT) ou inactive (CS) de Nedd4-2 et le courant I_{Ks} de ces cellules a été mesuré par la technique de patch-clamp. La transfection des cardiomyocytes de cobaye est réalisée *in vivo* à l'aide d'un vecteur inerte (voir matériel et méthodes). Contrairement à l'utilisation de vecteurs viraux ou de souris transgéniques, cette méthode est rapide et nous permet de transfecter quelques centaines de cellules, maintenues dans un environnement physiologique. Pour reconnaître les cellules transfectées, un gène rapporteur codant pour la molécule CD8 est inséré dans le plasmide codant pour les ubiquitine-ligases (voir matériel et méthodes). La transfection des plasmides codant pour les deux formes de Nedd4-2 dans des cellules COS-7 a permis, au préalable, de vérifier que Nedd4-2 CS avait une action antagoniste sur la forme WT. Le courant I_{Ks} obtenu dans ces cellules co-transfectées avec les deux formes enzymatiques est identique à celui obtenu sans celles-ci (Figure 32). La forme inactive, transfectée dans les cardiomyocytes de cobaye, devrait donc entrer en compétition avec la forme WT présente de manière endogène dans ces cellules. Le courant des cellules ainsi transfectées devraient alors être plus intense que celui des cellules non transfectées avec Nedd4-2.

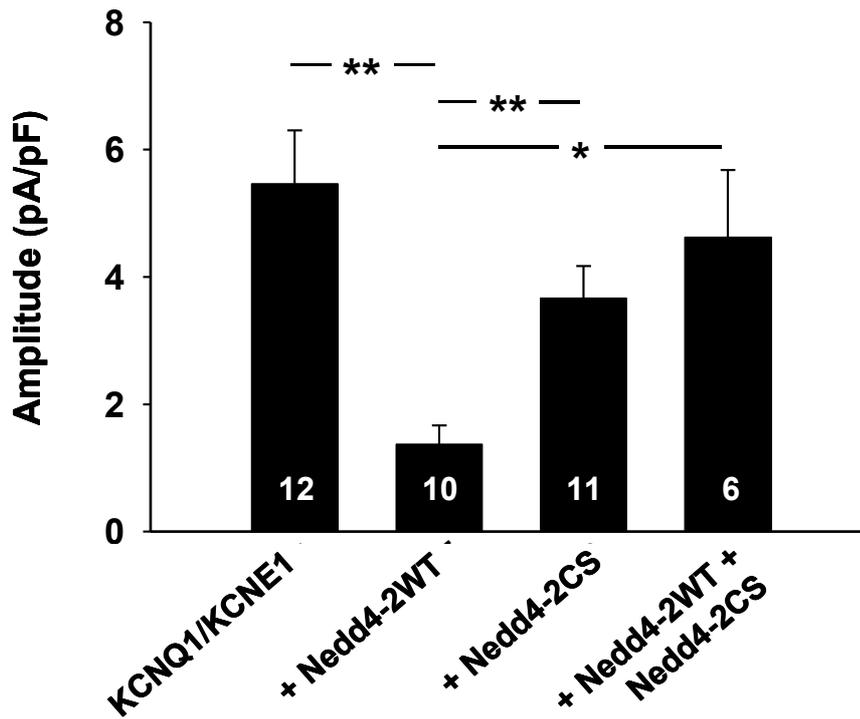


Figure 32 : Amplitude du courant dans les cellules COS-7 transfectées avec KCNQ1, KCNE1 et Nedd4-2 WT ou mutée (CS). Le courant des cellules transfectées avec la forme WT de Nedd4-2 est significativement inférieur au courant des cellules transfectées sans Nedd4-2 ($p < 0.01$). Lorsque les deux formes sont co-transfectées avec le canal et KCNE1, le courant est supérieur à celui des cellules transfectées avec la forme WT ($p < 0.05$) et équivaut à celui des cellules transfectées sans Nedd4-2 ou avec Nedd4-2 CS.

La figure 6 de l'article montre que le courant I_{Ks} n'est pas modifié lorsque la forme active de l'enzyme est transfectée alors qu'il est augmenté lorsque la forme inactive, inhibant le Nedd4-2 endogène, est exprimée. En revanche ces deux formes ne modifient pas le courant I_{K1} (figure 6C de l'article).

Nedd4-2 régule donc le courant I_{Ks} de manière spécifique dans les cardiomyocytes de cobaye.

8.2 Discussion et perspectives

D'après ces nouveaux résultats, nous pouvons affirmer que Nedd4-2 s'associe au canal KCNQ1, augmente son ubiquitinylation et sa dégradation dans les cellules HEK293 et COS-7 et diminue le courant I_{Ks} dans ces cellules transfectées transitoirement ainsi que dans les cardiomyocytes de cobaye. Toutefois, nous ne pouvons pas savoir si la dégradation observée est celle des canaux présents à la membrane ou si l'ensemble des canaux présents dans la cellule, y compris le RE, sont dégradés. La manière dont le canal est ubiquitinylé (mono-, multi- ou polyubiquitinylé) et la voie de dégradation impliquée (lysosome ou protéasome) sont aussi des éléments qui restent à déterminer. Enfin, si le rôle de Nedd4-2 dans la dégradation du canal est avéré, il est difficile de savoir si elle est la seule protéine impliquée dans la dégradation du canal et si les autres protéines partenaires jouent un rôle dans cette dégradation.

- La dégradation des protéines de surface médiée par Nedd4-2

Les données publiées sur le canal Nav1.5 suggèrent fortement que la densité de canaux à la membrane est modifiée en présence de Nedd4-2. La visualisation du canal a été réalisée dans des cellules HEK293 transfectées transitoirement avec le canal fusionné au fluorochrome YFP, avec ou sans Nedd4-2. Ces expériences montrent qu'en présence de Nedd4-2, la localisation de ce canal est plus diffuse dans le cytoplasme et moins marquée au niveau de la membrane. De plus, des données récentes sur le canal ENaC, aussi ubiquitinylé par Nedd4-2, montrent que les canaux biotynilés (marquage spécifique des protéines de surface) sont capables de fixer Nedd4-2 et que leur ubiquitinylation est augmentée en présence de cette enzyme. Cet effet serait spécifique aux protéines membranaires puisque les protéines non biotynilées (intracellulaires) ne sont pas dégradées en présence de Nedd4-2, contrairement aux protéines biotynilées. L'ensemble de ces données suggère fortement que Nedd4-2 se lie aux protéines ancrées dans la membrane plasmique et permet leur ubiquitinylation et leur dégradation. Même si ces expériences n'ont pas été réalisées avec KCNQ1, il est fort possible que le mode d'action de Nedd4-2 soit semblable avec toutes les protéines qu'elle cible, y compris

KCNQ1. La réalisation d'expériences similaires sur KCNQ1 permettrait de le confirmer.

- L'ubiquitinylation de KCNQ1 et sa dégradation

Nous avons vu en introduction que la voie de dégradation dépend de la manière dont les protéines sont ubiquitinylées et de l'agencement des ubiquitines entre elles.

D'après les figures 5C et 5D de l'article concernant l'ubiquitinylation de KCNQ1, le canal pourrait être polyubiquitinylé (ou multiubiquitinylé) de manière endogène et monoubiquitinylé (ou oligoubiquitinylé si quelques ubiquitines sont attachées à la protéine) en présence de Nedd4-2. En effet, d'après les résultats obtenus à partir des cellules HEK293 transfectées avec le canal sans Nedd4-2, la présence d'ubiquitines sur KCNQ1 immunoprécipité est révélée par la présence de bandes supérieures à 90 kDa. Sachant que la bande concernant KCNQ1 se retrouve aux alentours de 60 kDa et que les ubiquitines ont un poids moléculaires d'environ 8 kDa, il est fort probable que les bandes retrouvées à un poids moléculaire supérieur à 90 kDa correspondent au canal associé de manière covalente à plusieurs ubiquitines ou chaînes d'ubiquitines. Lorsque ces cellules sont co-transfectées avec Nedd4-2, les bandes d'ubiquitines sont plus intenses au niveau des poids moléculaires allant de 65 à 85 kDa, pouvant correspondre au canal auquel est associé 1, 2, 3 voire 4 ubiquitines. KCNQ1 ne serait donc pas polyubiquitinylé par Nedd4-2 mais mono- ou oligoubiquitinylé. Ces résultats semblent en désaccord avec des données précédentes montrant une polyubiquitinylation du canal Nav1.5 par Nedd4-2 . Toutefois, les données récentes de Zhou et al. montrent que le canal ENaC peut aussi être monoubiquitinylé (ou oligoubiquitinylé) par Nedd4-2 et que ce type d'ubiquitinylation est suffisant pour entraîner la dégradation du canal .

Le fait que le canal KCNQ1 soit mono ou oligoubiquitinylé suggère que la voie de dégradation impliquée est indépendante du protéasome . Toutefois, les voies impliquées dépendent certainement du modèle d'étude. Des expériences utilisant des inhibiteurs spécifiques du protéasome ou des lysosomes permettraient de déterminer plus précisément quelle voie est impliquée, en particulier dans les cardiomyocytes pour lesquels peu de données sont disponibles.

- Existe-t-il d'autres protéines capable d'ubiquitinyler KCNQ1 ?

De manière intéressante, Zhou et al. ont montré que les cellules HEK293 expriment la protéine Nedd4-2 de manière endogène. Ceci pourrait expliquer l'ubiquitinylation endogène du canal KCNQ1 dans notre étude et celle des autres canaux Nav1.5 et ENaC exprimés dans ces mêmes cellules. Cependant, le fait que la transfection de la forme inactive de Nedd4-2 (CS) ne diminue pas cette ubiquitinylation endogène, malgré son action antagoniste sur la forme WT, suggère que l'enzyme impliquée est indépendante de Nedd4-2. Il existerait donc d'autres ubiquitine-ligases capables d'ubiquitinyler KCNQ1 dans les cellules HEK293.

D'après les résultats montrés en figure 5C et 5D de l'article, la co-expression de KCNE1 avec le canal diminue nettement la quantité de canaux ubiquitinylés en absence de Nedd4-2. Pour visualiser le courant produit par KCNQ1 seul, une grande quantité d'ADN doit être transfectée pour ne visualiser qu'un petit courant, suggérant que très peu de canaux se retrouvent à la membrane plasmique. KCNE1 pourrait faciliter le transfert des canaux du RE vers la membrane plasmique (voir paragraphe 2.2.2 de l'introduction). La quantité de canaux KCNQ1 stagnant dans le RE serait donc supérieure lorsque le canal est exprimé seul que lorsqu'il est exprimé avec KCNE1. Il est alors envisageable que les canaux ubiquitinylés de manière endogène soient ceux stagnant dans le RE où les protéines mal organisées et ubiquitinylées sont dégradées par le système ERAD, indépendamment de Nedd4-2 (voir paragraphe 2.3.4 de l'introduction et Figure 22, page 64).

Dans les cardiomyocytes transfectés *in vivo* avec l'enzyme inactive (Nedd4-2 CS), le courant est supérieur à celui observé dans les cardiomyocytes contrôles (transfectés sans Nedd4-2), suggérant une implication de cette protéine dans la dégradation du canal *in vivo*. Il est alors étonnant de voir que le courant des cellules transfectées avec la forme WT n'est pas diminué. Le fait d'ajouter cette enzyme à celles présentes de manière endogène ne modifie pas le courant et nous pouvons envisager que dans nos conditions d'étude (cardiomyocytes transfectés), les protéines Nedd4-2 endogènes, capables d'interagir avec le canal, sont déjà actives.

Aucune donnée actuelle ne permet de savoir si d'autres ubiquitine-ligases sont capables d'ubiquitinyler le canal à la membrane dans les cellules HEK293 et les cardiomyocytes. Pourtant, il serait utile de connaître l'ensemble des protéines capables d'induire la dégradation de ce canal d'un point de vue physio-pathologique. Une diminution de sa dégradation pourrait aboutir à des pathologies telles que la FA

ou le SQTS mais pourrait aussi avoir un intérêt thérapeutique pour les pathologies comme le LQTS en augmentant la quantité de canaux fonctionnels chez les hétérozygotes .

CONCLUSION GENERALE

Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence deux nouveaux partenaires du canal KCNQ1 : la β -tubuline et Nedd4-2.

Les microtubules, composés de dimères d' α - et β -tubuline, interviennent dans la réponse du canal à une stimulation de la PKA dans les cardiomyocytes. Physiologiquement, ce type de réponse fait principalement suite à une stimulation β -adrénergique. Le courant I_{Ks} est effectivement augmenté lors d'un stress ou d'un effort faisant intervenir le système orthosympathique. Cette réponse de I_{Ks} compense en partie l'augmentation des courants dépolarisants et participe à la réduction de la durée du PA, inhérente à l'accélération de la fréquence cardiaque. Un défaut de réponse du courant I_{Ks} peut alors aboutir à une arythmie cardiaque. Les microtubules interviennent dans plusieurs fonctions cellulaires et nos données indiquent, pour la première fois, qu'ils interagissent physiquement avec KCNQ1 et interviennent dans sa régulation par la PKA. Notre hypothèse est que les microtubules favorisent l'ouverture des canaux phosphorylés par la PKA, augmentant ainsi le courant. Une autre hypothèse concernant une augmentation du nombre de canaux à la membrane est toutefois envisageable et mérite d'être testée.

La deuxième protéine identifiée est l'ubiquitine-ligase Nedd4-2. Des études de protéomique ont permis à l'équipe d'Hugues Abriel d'identifier l'interaction entre le canal et cette enzyme. Les expériences sur des cellules exprimant de manière hétérologue ces deux partenaires indiquent que le canal est ubiquitinylé par cette enzyme et que sa dégradation est augmentée. Le courant est alors diminué en présence de Nedd4-2. Mon travail dans cette étude a consisté à valider cette régulation dans les cardiomyocytes de cobaye. Ces cellules exprimant la protéine Nedd4-2 de manière endogène, elles ont été transfectés *in vivo* avec une forme inactive de cette protéine, capable d'entrer en compétition avec la forme endogène. Les cardiomyocytes ainsi transfectés ont un courant plus grand que les cardiomyocytes n'exprimant que la forme endogène, démontrant l'implication de Nedd4-2 dans la régulation du courant, *in vivo*.

Nous avons vu dans l'introduction de ce manuscrit que la réponse du courant à une stimulation dépendait nettement du modèle d'étude et que la validation de ces régulations dans les cardiomyocytes était indispensable. Au cours de ma thèse je me suis donc attachée à étudier les nouvelles protéines identifiées dans les cardiomyocytes, où tous les partenaires de KCNQ1 sont présents.

La mise au point d'une méthode de transfection des cardiomyocytes *in vivo* constitue une avancée technique considérable puisque les quelques centaines de cardiomyocytes transfectés sont maintenus dans un environnement physiologique. Cette technique peut alors permettre d'étudier les conséquences de la surexpression ou au contraire de l'extinction d'une protéine endogène en limitant le remodelage des myocytes. Dans le cas de Nedd4-2, nous disposons d'un mutant capable d'entrer en compétition avec la forme endogène de la protéine. Toutefois, de telles formes antagonistes ne sont pas toujours disponibles et la transfection des cardiomyocytes avec des siRNA ou des shRNA, inhibant la synthèse d'une protéine spécifique, est une alternative intéressante.

ANNEXES

ANNEXE 1 : L'ACTIVITÉ ÉLECTRIQUE CARDIAQUE ET L'ECG

9 Naissance et conduction du PA dans le cœur

La contraction du cœur résulte de la propagation du potentiel d'action (PA) dans les cellules contractiles du myocarde. Des zones particulières constituées de cellules automatiques permettent la genèse et la conduction du PA. Ces zones sont constituées de cellules spécialisées capables de générer des potentiels d'action de manière spontanée. Le nœud sinusal, à la base de l'oreillette droite, est à l'origine des PA cardiaques. Le nœud auriculo-ventriculaire (NAV), situé entre l'oreillette droite et le ventricule droit permet la conduction des PA vers les ventricules. La conduction au sein des ventricules se fait par le faisceau de His, composé du tronc commun et des branches droites et gauches, au niveau du septum interventriculaire, et par les fibres de Purkinje au sein de la paroi ventriculaire (Figure 33).

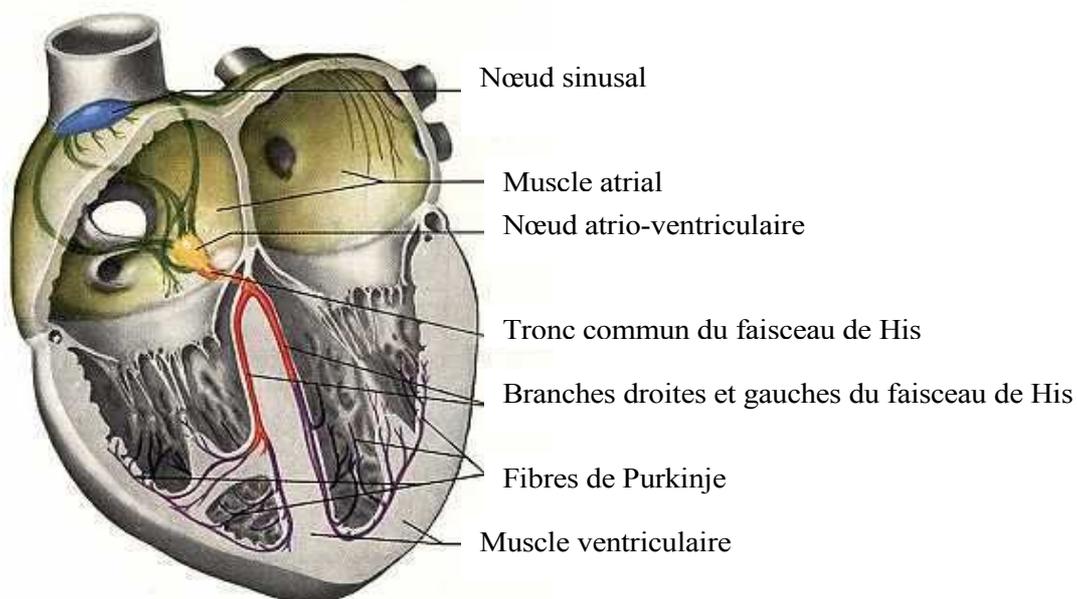


Figure 33 : Distribution du tissu nodal permettant la propagation du potentiel d'action cardiaque.

La dépolarisation du potentiel de membrane créée lors du PA dans les cellules du nœud sinusal est diffusée au sein des oreillettes jusqu'au NAV où la vitesse de conduction est alors ralentie. Cette particularité du NAV permet aux oreillettes de se contracter avant les ventricules (systole auriculaire) et d'éjecter le sang qu'elles contiennent dans les ventricules pendant la dilatation de ceux-ci (diastole ventriculaire). La propagation rapide du PA au sein des ventricules permet alors leur contraction (systole ventriculaire) aboutissant à l'éjection du sang vers l'ensemble de l'organisme.

Physiologiquement, la fréquence à laquelle se succèdent les PA (fréquence cardiaque) est imposée par la fréquence de dépolarisation des cellules du nœud sinusal et est régulée par le système nerveux autonome. Sans régulation, la fréquence intrinsèque de dépolarisation est de 100/min mais physiologiquement, le système parasympathique intervenant, la fréquence est de 60 à 90/min chez l'homme. Si les cellules du nœud sinusal sont déficientes, ce sont celles du nœud auriculo-ventriculaire qui imposeront leur rythme aux cellules ventriculaires. Les cellules du NAV se dépolarisant à une fréquence inférieure (environ 50/min) à celle des cellules du nœud sinusal, la fréquence cardiaque au niveau des ventricules sera alors diminuée (bradycardie). Enfin, lors d'un bloc de conduction auriculo-ventriculaire complet (découplage entre les oreillettes et les ventricules), la fréquence au niveau des oreillettes sera celle imposée par le nœud sinusal et la fréquence au niveau des ventricules sera celle imposée par les cellules conductrices ventriculaires (environ 30/min).

10 Caractérisation de l'activité électrique cardiaque sur l'ECG

La propagation du potentiel d'action cardiaque crée une activité électrique visualisable sur un électrocardiogramme (ECG). L'ECG est enregistré en disposant des électrodes à différents endroits du corps : 3 au niveau des membres permettant une visualisation de l'activité électrique dans un plan frontal et 6 précordiales permettant une visualisation dans un plan horizontal. Cette disposition permet d'enregistrer l'activité électrique du cœur selon ses trois axes principaux : apico-basal, gauche-droite et ventral-dorsal. Douze dérivations sont alors enregistrées entre les différentes électrodes : les dérivations I, II, III (bipolaires) et aVR, aVL et aVF (unipolaires) sont enregistrées par les trois électrodes des

membres et les dérives V1 à V6 sont enregistrées par les électrodes précordiales (Figure 34).

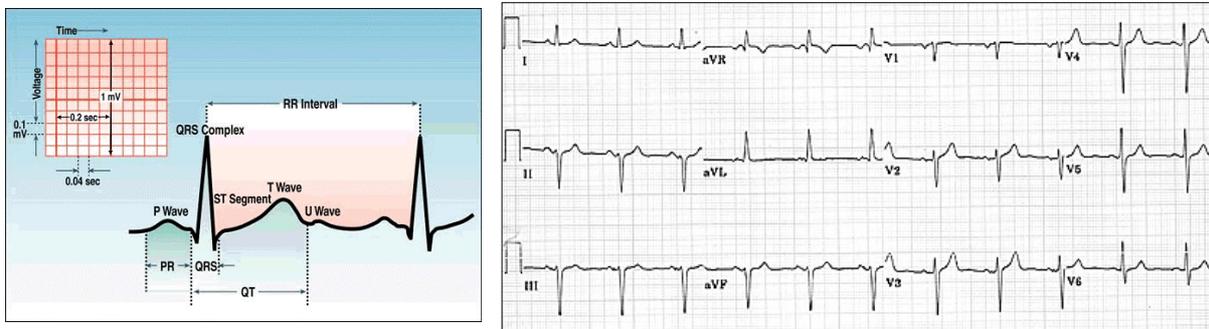


Figure 34 : L'électrocardiogramme normal. Représentation d'un ECG (gauche) et exemple d'un ECG normal selon les 12 dérives (gauche).

Les ondes caractéristiques de l'ECG reflètent l'activité électrique à chaque niveau du cœur. L'onde P correspond à la dépolarisation des oreillettes, le complexe QRS qui suit reflète la dépolarisation des ventricules associée à la repolarisation des oreillettes alors que le segment ST et l'onde T reflètent la repolarisation ventriculaire. L'analyse de l'ECG fournit des informations précieuses quant au déroulement du cycle cardiaque et peut permettre de déterminer l'origine histologique voire moléculaire d'une pathologie cardiaque.

Chez l'homme sain, la fréquence cardiaque (FC) est comprise entre 60 et 90 battements par minute (bpm) au repos. Le rythme est sinusal, c'est-à-dire que chaque complexe QRS est précédé d'une onde P positive sur les dérives I et II, caractérisant le bon fonctionnement du nœud sinusal.

L'intervalle PR est compris entre 0,12 et 0,2 seconde et la durée de l'onde P doit être inférieure à 0,12 seconde.

Le complexe QRS est normalement compris entre 0,06 et 0,1 seconde.

L'intervalle QTc donne des indications intéressantes sur la repolarisation ventriculaire. La valeur normale de cet intervalle dépend de la fréquence cardiaque, il est donc nécessaire de corriger cet intervalle en fonction de la fréquence. On parle alors de QT corrigé ($QTc = QT/\sqrt{RR}$, en secondes, d'après la formule de Bazett). Celui-ci est normalement inférieur à 0,44 seconde. Il faut toutefois tenir compte de

l'âge et du sexe du patient. L'intervalle QT est, en effet, plus long chez les individus de plus de 15 ans et chez les femmes.

Un allongement anormal de cet intervalle (supérieur à 0,44 s) traduit un trouble de la repolarisation ventriculaire favorisant la survenue d'arythmies potentiellement mortelles, comme des torsades de pointes (tachycardie ventriculaire polymorphe avec modification de la morphologie et de l'amplitude du QRS, Figure 35A) ou des fibrillations ventriculaires (Figure 35B).

L'allongement de cet intervalle peut être héréditaire ou acquis, notamment lors de l'administration de certains agents pharmacologiques, comme des anti-arythmiques par exemple, ou lors d'une variation dans la concentration en électrolytes (hypokaliémie, hypomagnésémie, hypocalcémie). Le syndrome du QT long est une pathologie dont le principal élément diagnostique réside, comme son nom l'indique, par l'allongement de cet intervalle.

Le segment ST est bien souvent indiscernable de l'onde T même chez l'individu sain. On considère ce segment comme faisant partie de l'onde T qui serait alors une onde débutant juste après le complexe QRS. Elle s'élève doucement jusqu'à atteindre son pic et chute rapidement (Figure 34).

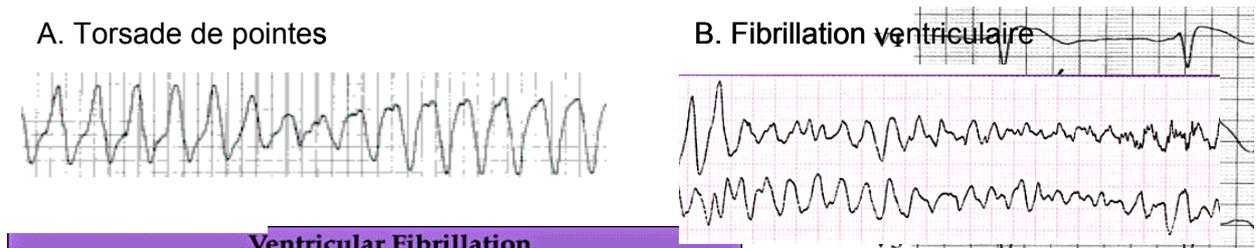


Figure 35 : Exemples d'ECG anormaux.

ANNEXE 2 : LES COURANTS IONIQUES À L'ORIGINE DU POTENTIEL D'ACTION

11 Le PA des cellules nodales

Les cellules automatiques cardiaques ne présentent pas de potentiel de repos stable entre deux PA : à partir d'un potentiel diastolique maximal (-50 mV dans le nœud sinusal et -64 mV dans le NAV), la membrane se dépolarise sous l'influence de différents courants (dépolarisation diastolique) jusqu'à atteindre le potentiel seuil déclenchant l'ouverture des canaux calciques à l'origine du PA (dépolarisation systolique). C'est cette caractéristique qui donne aux cellules sinusales leur automaticité. La repolarisation fait surtout intervenir les canaux potassiques (Figure 36).

Au sein du nœud sinusal, deux types cellulaires sont classiquement décrits : les cellules araignées, possédant de longs prolongements cytoplasmiques et plus présentes au centre du nœud sinusal, et les cellules en fuseau, plus allongées et plutôt en périphérie. La durée du PA est plus longue dans les cellules centrales (cellules araignées) que dans les cellules périphériques (cellules en fuseau), évitant ainsi un retour du PA vers les cellules centrales .

Au sein du NAV, il est possible de distinguer au moins trois zones : une zone transitionnelle entre l'oreillette et le centre du nœud (AN), une zone centrale (N) et une zone de transition entre le centre et le faisceau de His (NH). La zone AN est surtout constituée de cellules en bâtonnet alors que les autres zones sont constituées principalement de cellules ovoïdes . C'est dans la zone centrale (N) que la conduction est la plus lente .

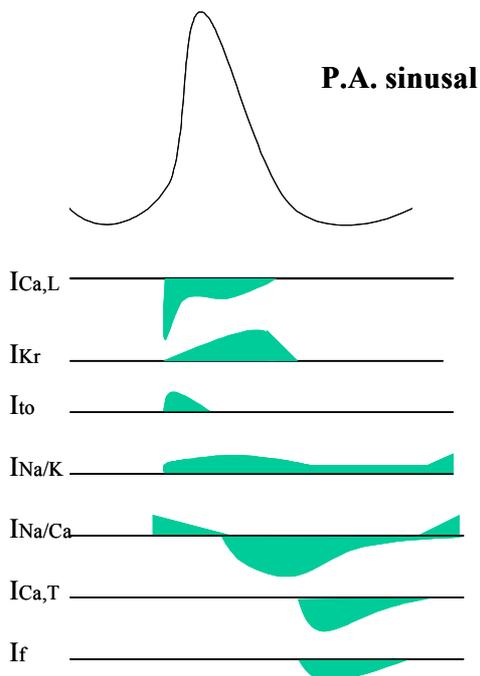


Figure 36 : PA sinusal et proportion hypothétique des principaux courants ioniques impliqués dans ce PA..

11.1 La dépolarisation diastolique

Entre deux PA, le potentiel de membrane des cellules automatiques est soumis principalement à 4 courants (Figure 36) :

- l'échangeur sodium-calcium

L'échangeur sodium-calcium (NCX) permet l'échange de trois ions sodium (Na^+) pour un ion calcium (Ca^{2+}). Le sens de passage de ces ions varie en fonction du potentiel de membrane et de leur concentration de part et d'autre de la membrane plasmique. Le sens s'inverse entre le début d'un PA et la naissance d'un suivant. Pendant la dépolarisation systolique, la concentration sodique intracellulaire augmente et le courant global est sortant (sortie de 3 ions Na^+ et entrée d'un ion Ca^{2+}) alors que pendant la dépolarisation diastolique, le courant est entrant. Ce courant intervient en grande partie dans cette dernière phase .

- le courant I_f

Le courant I_f , aussi appelé courant « pacemaker », est un courant entrant cationique non spécifique activé par les hyperpolarisations . Le courant est entrant (dépolarisant) pour des potentiels membranaires inférieurs à -40 mV. Son rôle est essentiel à la genèse du rythme.

Les canaux à l'origine de ce courant sont appelés HCN pour hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. Ils sont régulés par les nucléotides tels que l'AMPc et le GMPc . La principale sous-unité de ce canal exprimée dans le nœud sinusal de lapin est HCN4 mais on retrouve aussi les sous-unités HCN1 et en bien moindre quantité HCN2 .

Au sein du nœud sinusal, les cellules centrales (de type araignée) ont un courant I_f 70 fois plus important que les cellules périphériques (en fuseau), ce qui explique la pente de dépolarisation plus marquée dans ces cellules, comme le montre la Figure 37. Cette particularité leur confère une activité pacemaker plus marquée . L'influx électrique part donc des cellules araignées, au centre, vers les cellules en fuseau périphériques.

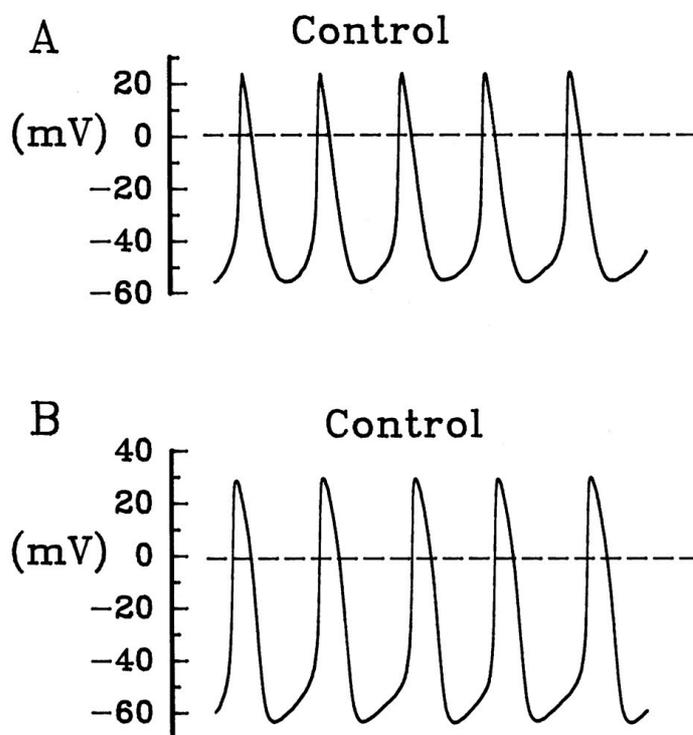


Figure 37 : Potentiels d'action dans le nœud sinusal. Potentiels d'action de cellules araignées (A) et de cellules en fuseau (B) dans le nœud sinusal de lapin .

De même, au sein du NAV, les cellules des zones N et NH, de type ovoïde, ont un courant I_f 25 fois plus important que celui des cellules en bâtonnet présentes dans la zone AN expliquant, là encore, leur pente de dépolarisation diastolique plus marquée

(Figure 38). Les cellules transitionnelles entre les cellules atriales et le NAV (zone AN) ont, en effet, un PA plus proche des cellules atriales que des cellules de conduction du NAV, soit un PA plus long et une pente de dépolarisation diastolique peu marquée (Figure 38). L'activité pacemaker du NAV est surtout attribuée aux cellules ovoïdes des zones N et NH .

Le courant I_f est moins intense dans les cellules du NAV que dans les cellules sinusales, expliquant en partie la prédominance de l'activité pacemaker des cellules sinusales sur les cellules du NAV .

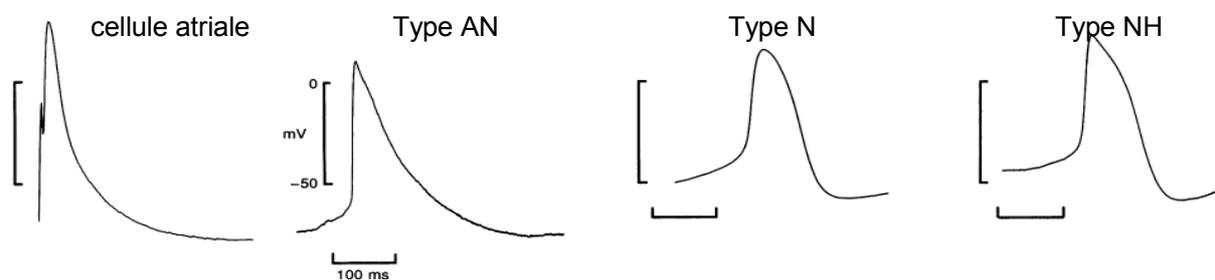


Figure 38 : Les potentiels d'action des différentes zones du NAV. Potentiels d'action mesurés dans une cellule atriale stimulée ou dans les régions AN, N et NH du NAV de lapin possédant une activité spontanée .

- les courant calciques

Le courant $I_{Ca,T}$ est un courant calcique transitoire (entrant) qui s'active pour des potentiels proches de -60 mV et qui s'inactive rapidement. L'inhibition de ce courant par des ions nickel ralentit la pente de dépolarisation diastolique .

Les canaux à l'origine de ce courant sont les canaux Cav3.1, 3.2 et 3.3. Comme pour tous les canaux calciques, ces sous-unités α s'associent à d'autres sous-unités régulatrices ($\alpha2\delta$, β , et γ) pour former un complexe canalaire fonctionnel . L'importance de ce courant et l'expression de ces différents canaux varient en fonction de l'espèce, de la région cardiaque et des conditions physiopathologiques, ce courant étant régulé par les neurotransmetteurs et les hormones . Il est, par exemple, plus important chez la souris et le cobaye que chez le porc ou le lapin. Chez la souris, les sous-unités Cav3.1 et Cav $\alpha2\delta2$ sont largement plus exprimées dans le tissu nodal que dans les cardiomyocytes qui présentent un faible courant $I_{Ca,T}$.

Le courant calcique de type lent, $I_{Ca,L}$ peut aussi intervenir dans cette phase, particulièrement dans les cellules du NAV . Ce courant s'active assez rapidement à des potentiels proches de -40 mV et est caractérisé par une inactivation plus lente que le courant $I_{Ca,T}$, plus transitoire. Les canaux Cav1.2 et, en moindre quantité Cav1.3, sont les principaux canaux (sous-unités α) à l'origine de ce courant exprimés dans le nœud sinusal.

- la pompe sodium-potassium

Le courant généré par la pompe sodium-potassium (Na/K), qui est une ATPase membranaire, résulte d'un transport actif des ions sodium et potassium contre leur gradient électrochimique. La sortie de trois ions sodium et l'entrée de deux ions potassium induisent un courant net sortant de charges positives . Ce courant hyperpolarisant n'intervient pas dans la dépolarisation diastolique observée entre deux PA mais permet de restaurer les concentrations ioniques de part et d'autre de la membrane nécessaires à la genèse d'un PA. De plus, ce courant limite les effets dépolarisants des courants cités précédemment.

11.2 La dépolarisation systolique

La phase ascendante du PA des cellules sinusales est principalement due aux canaux calciques de type lent décrits plus haut.

Selon la localisation au sein du nœud sinusal et du NAV, le courant sodique I_{Na} pourrait avoir un rôle non négligeable dans cette phase. Ce courant s'active rapidement à des potentiels proches de -80 mV et présente un courant maximal pour un potentiel de -40 mV. Il s'inactive avec une cinétique rapide puis lente et atteint un maximum d'inactivation pour un potentiel de membrane proche de -50 mV. Cette phase d'inactivation est suivie d'une période réfractaire durant laquelle le canal ne peut être activé, évitant ainsi la survenue de dépolarisations précoces et permettant de maintenir une propagation unidirectionnelle du PA. Le canal ionique cardiaque majoritaire à l'origine de ce courant est un canal voltage-dépendant nommé Nav1.5 (ou SCN5A) associé à sa sous-unité régulatrice $\beta 1$ (SCN1B). D'autres canaux sodiques tels que Nav1.3 (SCN3A), Nav2.1 (SCN6A) et la sous-unité $\beta 3$ (SCN3B) sont aussi exprimés mais à des quantités largement inférieures à celles de Nav1.5 et de la sous-unité $\beta 1$.

Compte tenu de son inactivation maximale à des potentiels proches de -50 mV, ce courant serait absent ou peu présent au centre du nœud sinusal mais plus important dans les cellules nodales périphériques où le potentiel diastolique maximal (PDM) est plus bas . Il serait aussi prédominant dans les cellules en bâtonnet de la région AN du NAV . La présence de ce courant favoriserait la conduction du PA vers les cellules en aval.

11.3 La phase de repolarisation

Les courants potassiques sortants I_{to} , I_{Kr} et I_{Ks} sont les principaux courants repolarisants (Figure 36).

- Le courant I_{to}

I_{to} est un courant transitoire sortant formé d'une composante potassique (I_{to1}), inhibée par la 4-aminopyridine, et d'une composante portée par les ions chlorures (I_{to2}) activée par le calcium . Ce courant intervient très précocement dans la phase de repolarisation et limite la durée de dépolarisation liée aux courants calciques.

I_{to1} est activé à des potentiels proches de -25 mV, présente une cinétique d'activation très rapide et est caractérisé par une inactivation à deux cinétiques. En effet, au sein de la composante I_{to1} se distinguent deux courants mis en évidence chez la souris : un courant d'inactivation rapide ($I_{to,fast}$) porté par les canaux Kv4.2, Kv4.3 et leurs sous-unités régulatrices dont KChIP2 et un courant de plus petite amplitude et d'inactivation lente ($I_{to,slow}$) révélé par l'inhibition du courant $I_{to,fast}$ et porté par le canal Kv1.4 .

Entre les différentes parties du cœur et au sein même du tissu nodal, des hétérogénéités électrophysiologiques du courant I_{to1} existent et peuvent s'expliquer par une expression différentielle des canaux à l'origine de ce courant . Ce courant, de faible intensité dans le nœud sinusal, est beaucoup plus important dans les cellules nodales périphériques et les cardiomyocytes auriculaires que dans les cellules nodales plus centrales. Ceci peut expliquer la durée plus courte des PA observée dans les cellules périphériques. Cette hétérogénéité crée alors un gradient dans la durée des PA et évite une réexcitation précoce du nœud sinusal par des influx d'origine auriculaire (Marionneau *et al.*, 2005). De même, dans le NAV, les cellules de la zone AN ont un courant I_{to} plus intense que les cellules des autres

zones . Ce courant contribue à la courte durée du plateau du PA observée dans ces premières cellules (Figure 38).

Le courant I_{to2} , contrairement à I_{to1} , n'est pas voltage-dépendant. Il est de composante chlorure et présente, comme I_{to1} , une cinétique d'activation très rapide. Il est activé par le calcium et s'inactive rapidement . Son amplitude, faible, varie en fonction de la fréquence cardiaque.

- les courants I_{Kr} et I_{Ks}

Le courant I_K est un courant rectifiant retardé composé de deux courants : I_{Ks} (slow delayed rectifier current) et I_{Kr} (rapid delayed rectifier current).

Le courant I_{Kr} s'active à partir de -50 mV et est caractérisé par une activation rapide et une inactivation apparaissant pour des potentiels supérieurs à 0 mV. Le canal à l'origine de ce courant est le canal HERG (human ether-a-gogo gene, gène *KCNH2*) . L'importance de ce courant varie, là encore, en fonction de la zone au sein du tissu nodal et le blocage de ce courant par le E-4031 aboutit à un ralentissement de l'activité rythmique plus ou moins intense en fonction de la zone . Il existerait un gradient positif de ce courant du centre vers la périphérie du nœud sinusal qui contribuerait à expliquer la durée du PA plus importante dans le centre. Il serait aussi à l'origine d'un potentiel diastolique maximal plus élevé dans les cellules périphériques que dans les cellules centrales .

Le courant I_{Ks} est un courant d'activation et de désactivation lente ayant pour origine moléculaire le canal KCNQ1 (ou KvLQT1 ou Kv7.1) et sa protéine régulatrice KCNE1 (ou MinK) . Ce courant s'active à partir de -30 mV et est maximal vers +40 mV.

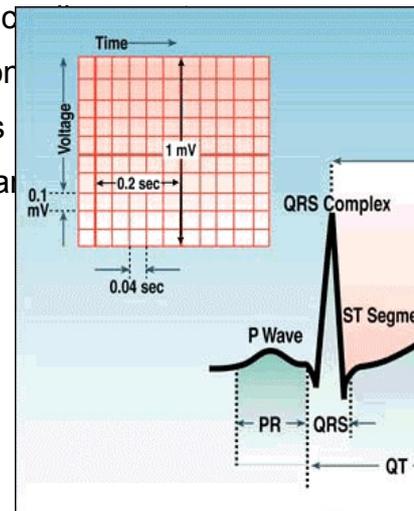
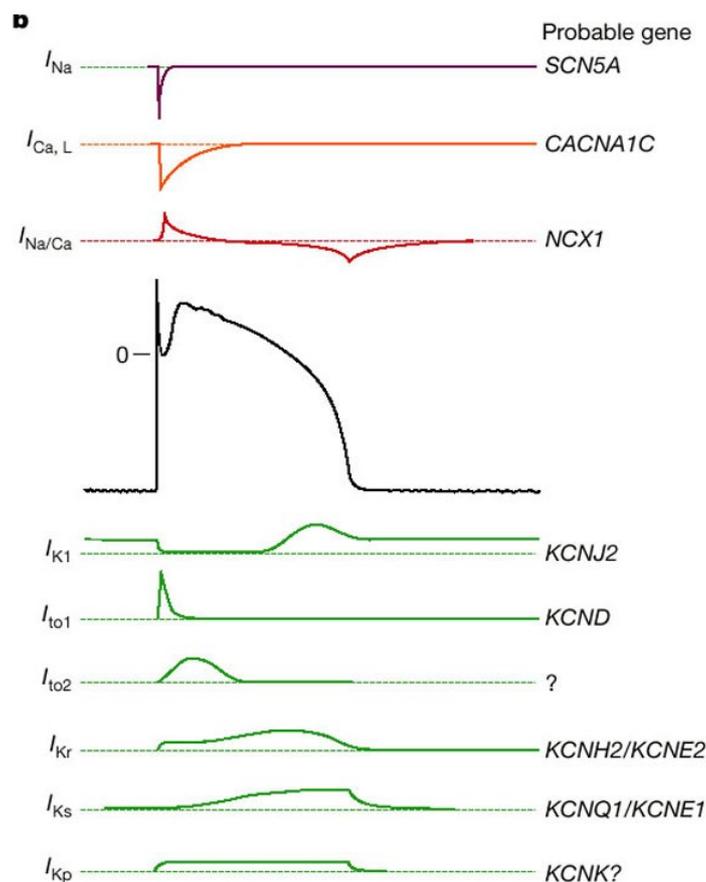
Les proportions de ce courant par rapport à I_{Kr} varient entre le nœud sinusal et le NAV. Des études effectuées sur le lapin à l'aide d'un inhibiteur spécifique de I_{Kr} indiquent que I_{Ks} est légèrement prédominant par rapport à I_{Kr} dans le nœud sinusal alors que l'inverse est observé dans le NAV . Toutefois, l'importance du courant I_{Ks} dans le tissu nodal varie en fonction des espèces. Il semble, par exemple, insignifiant dans les cellules nodales du cœur de lapin mais indispensable à l'activité rythmique des cellules nodales de porc .

12 Le PA des cardiomyocytes contractiles : variations au sein du myocarde

Les cardiomyocytes sont caractérisés par leurs myofibrilles organisées de manière très structurée, conférant à ces cellules leur aspect strié et surtout leur propriété contractile. La conduction du signal électrique au sein de ces cellules permet à celles-ci de se contracter.

Le potentiel de repos des cellules ventriculaires est d'environ -85 mV. Lors d'un potentiel d'action ventriculaire, la première phase correspond à la phase de dépolarisation et résulte de l'ouverture des canaux sodiques.

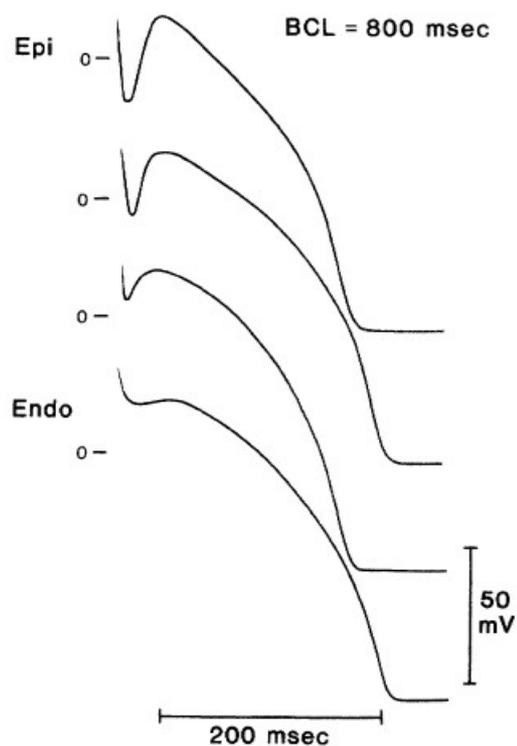
La dépolarisation créée (jusqu'à +30 mV) permet l'ouverture des canaux calciques (plateau du PA) et l'entrée de calcium contribue à la contraction des cellules par interaction des myofilaments entre eux. Selon la localisation des cellules ventriculaires, une phase de repolarisation transitoire plus ou moins brève intervient avant le plateau généré par les canaux calciques.



calciques. La phase de repolarisation dépend en grande partie des canaux potassiques (Figure 39).

Figure 39 : Courants intervenant dans le PA des cardiomyocytes ventriculaires cardiaques .

Il existe une hétérogénéité de la forme des PA en fonction de la localisation au sein du myocarde ventriculaire (Figure 40). Dans les cellules épimyocardiques (en périphérie), le potentiel maximal atteint lors de la dépolarisation est inférieur à celui des cellules endomyocardiques (proches de la cavité), leur phase de repolarisation transitoire est importante et la durée du PA est plus courte. Sous la couche épimyocardique se distinguent les cellules M, aux caractéristiques électrophysiologiques et pharmacologiques distinctes des autres cardiomyocytes ventriculaires. Ces cellules ont, en effet, une durée de PA plus longue. Leur potentiel maximal atteint est supérieur à celui des autres types cellulaires et la vitesse de conduction dans ces cellules est particulièrement grande. Cette hétérogénéité au sein du myocarde pourrait être à l'origine de l'onde T observée sur l'ECG. Une autre



hypothèse résidant dans l'hétérogénéité entre la base et l'apex du cœur peut aussi expliquer cette onde T.

Figure 40 : PA enregistrés sur des coupes de paroi ventriculaire gauche de chien. En haut est représenté un PA enregistré sur une surface épimyocardique (Epi), les deux du dessous sur une surface midmyocardique et celui du bas sur une surface endomyocardique. (Endo).

12.1 La phase de dépolarisation

Le courant sodique I_{Na} décrit plus haut est à l'origine de la phase de dépolarisation. Les sous-unités Nav1.5 et $\beta 1$ sont plus exprimées dans les cellules atriales que dans les ventricules, ce qui est cohérent avec le large courant sodique observé dans les cellules atriales. De même, l'expression de ces sous-unités est plus élevée dans les cellules de l'endomyocarde que dans celles de l'épimyocarde . Un dysfonctionnement de ce canal peut aboutir à des troubles du rythme ou de la conduction.

12.2 La repolarisation transitoire

La dépolarisation créée par l'entrée des ions sodium provoque l'ouverture des canaux responsables du courant I_{to} décrit plus haut, d'activation et d'inactivation très rapide. Ce courant sortant potassique crée alors une repolarisation qui n'est que transitoire du fait de l'ouverture simultanée des canaux calciques qui s'inactivent, eux, plus lentement. Le courant I_{to1} retrouvé dans les cellules atriales et ventriculaires possède des caractéristiques électrophysiologiques et pharmacologiques similaires à celles observées dans les cellules nodales .

La phase de repolarisation transitoire, donnant cet aspect en encoche à la fin de la dépolarisation (Figure 40), est plus importante dans les PA épimyocardiques et diminue graduellement de l'épimyocarde vers l'endomyocarde . Ceci résulte d'une différence en densité de courant I_{to} qui est plus importante dans les cellules épimyocardiques . Cette hétérogénéité provient du fait que les cellules épimyocardiques expriment de manière plus intense la sous-unité régulatrice de I_{to} , KChIP2, alors que l'expression de la protéine canal majoritaire, Kv4.3, est exprimée uniformément dans le ventricule . KChIP2 permet, en effet, d'augmenter la densité de courant I_{to} en modifiant les propriétés du canal .

La protéine canal Kv4.3 est davantage exprimée dans les cellules atriales que dans les cellules ventriculaires, ce qui peut expliquer les différences fonctionnelles et pharmacologiques observées entre ces deux types de cellules .

12.3 Le plateau du PA

Le plateau du PA des cardiomyocytes résulte principalement du courant calcique de type L et dans une moindre mesure du courant sodique retardé et de l'échangeur sodium-calcium, décrit plus haut .

- Le courant calcique

Le courant calcique intervient dans la phase de plateau et particulièrement le courant de type L, décrit plus haut. La sous-unité Cav1.2, à l'origine de ce courant, est plus exprimée dans les cellules épimyocardiques que dans les cellules endomyocardiques. Cette différence d'expression peut expliquer le potentiel élevé auquel débute la phase de plateau dans les cellules épimyocardiques .

La sous-unité canal Cav3.1, à l'origine du courant calcique de type T, est présente dans les cellules auriculaires alors qu'elle ne l'est pas dans les cellules ventriculaires, ce qui est cohérent avec la présence d'un courant $I_{Ca,T}$ uniquement dans les cellules auriculaires. De plus, Cav α 2 δ 2, une des sous-unités régulatrices de ce canal et du canal Cav1.2 est aussi fortement exprimée dans les cellules atriales .

- Le courant sodique retardé

Le courant sodique retardé provient du fait que les canaux sodiques ont une faible composante d'inactivation très lente, induisant un courant persistant au potentiel de plateau. Une autre composante sodique, résultant de canaux ouverts plus longtemps mais avec une probabilité d'ouverture bien plus faible, intervient aussi dans cette phase .

Le courant sodique retardé étant plus petit dans les cellules du midmyocarde que dans les autres types cellulaires du ventricule, il contribue à l'hétérogénéité des PA ventriculaires et à la différence d'excitabilité des cellules . Ce courant retardé est plus sensible à la tetrodotoxine (TTX, inhibiteur des canaux sodiques) que le courant sodique majoritaire responsable de la dépolarisation. Ceci explique qu'une dose faible de TTX peut allonger la durée du PA sans modifier la phase de dépolarisation. La TTX administrée à faible dose permet de diminuer les dépolarisations précoces liées à ce courant sodique retardé, non inactivé, dans des situations où ce courant est augmenté, comme c'est le cas pour les cœurs en insuffisance .

- L'échangeur sodium/calcium

Au début du plateau, la forte concentration de sodium intracellulaire induit un courant net sortant via l'échangeur sodium/calcium (NCX), favorisant alors l'entrée de calcium dans la cellule. En revanche, au cours du plateau, une inversion de ce courant va se produire du fait de l'augmentation progressive du calcium intracellulaire .

12.4 La phase de repolarisation

Comme pour les autres types de cellules cardiaques, la phase de repolarisation fait surtout intervenir les courants potassiques I_{Kr} et I_{Ks} .

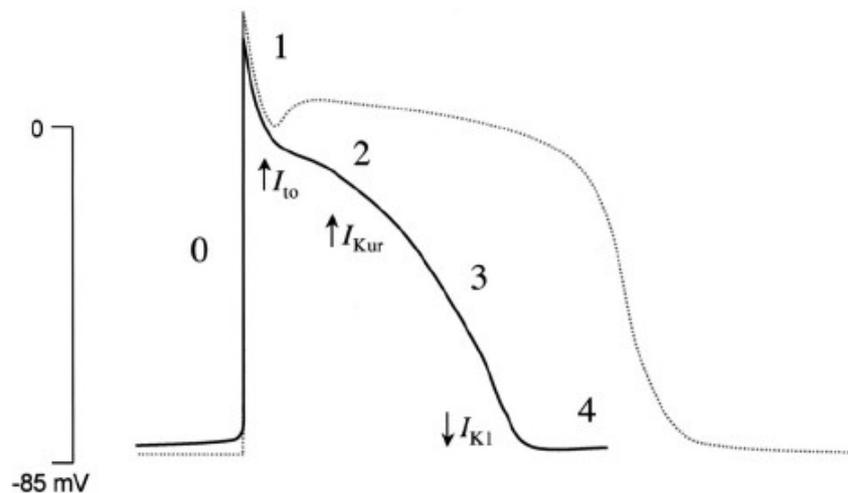
L'hétérogénéité des PA au sein du myocarde ventriculaire réside surtout dans la dispersion de ces courants repolarisants. Le courant I_K (somme de ces deux courants) est plus important dans les cellules épimyocardiques chez le cobaye et le chat, expliquant la durée du PA plus courte dans ces cellules . En accord avec ces données, une étude chez le furet a montré que la sous-unité canal ERG (à l'origine du courant I_{Kr}) est plus exprimée dans l'épimyocarde que l'endomyocarde .

Chez l'homme, la quantité d'ARNm du canal KCNQ1, à l'origine du courant I_{Ks} , est légèrement supérieure dans l'épimyocarde mais cette différence ne semble pas être significative . En revanche, il existe une forte hétérogénéité d'expression de l'isoforme tronquée dominante négative du canal KCNQ1 (isoforme 2) entre les couches superficielles et le midmyocarde. L'expression de l'isoforme 2 de KCNQ1 diminue le courant I_{Ks} et il est possible que la durée du PA plus longue observée au sein du midmyocarde soit liée à l'expression plus intense de cette isoforme dans les cellules midmyocardiques . De même, dans les cellules M, chez le chien, le courant I_{Ks} est de faible amplitude alors que le courant sodique est important. Ces deux phénomènes contribuent à la durée de PA très longue observée dans ces cellules .

Il existe aussi une hétérogénéité dans l'amplitude du courant I_{Ks} entre la base et l'apex. Cette dispersion peut expliquer la durée du PA plus courte observée dans les cellules de l'apex où le courant I_{Ks} est important. Des études sur des coupes de cœur de chien et d'homme ont montré que l'expression des protéines KCNQ1 et KCNE1 est plus importante dans les cellules de l'apex que dans les cellules situées en partie basale du cœur .

Le courant I_{Kur} (ultra-rapide delayed rectifier current), porté par les canaux $Kv1.5$, est un courant potassique repolarisant, présent dans les cellules atriales. Il se caractérise par une activation rapide aux alentours de -50 mV et une inactivation lente et partielle.

I_{Kur} est le principal courant repolarisant dans les cellules atriales puisque sa sous-unité canal $Kv1.5$ est 8 fois plus exprimée que $KCNQ1$ et presque 2 fois plus que le



canal $HERG$ dans ces cellules. Ce courant est, comme le courant I_{to} , plus important dans les cellules atriales que dans les cellules ventriculaires. Ce sont, entre autres, ces courants qui permettent une repolarisation plus rapide au sein des oreillettes que des ventricules et qui sont à l'origine du PA plus court des cellules auriculaires (Figure 41).

Figure 41 : Comparaison des potentiels d'action auriculaire et ventriculaire. Comparé au PA ventriculaire (ligne grise), le PA auriculaire (ligne noire) a un potentiel de repos moins négatif, une phase de plateau réduite et une phase de repolarisation terminale plus lente. Ces différences sont principalement dues à l'augmentation des courants I_{to} et I_{Kur} et à la diminution du courant I_{K1} .

12.5 Le maintien du potentiel entre deux PA

Le courant I_{K1} est un courant potassique à rectification entrante. Cela signifie que l'intensité du courant dans le sens entrant (lors d'une hyperpolarisation) est supérieure à celle dans le sens sortant (lors d'une dépolarisation) pour une même

variation de potentiel. Ce canal possède une conductance élevée qui permet de maintenir le potentiel de membrane proche du potentiel d'équilibre de l'ion K^+ (environ -95 mV). Une faible variation de potentiel va induire un courant potassique suffisamment important pour ramener le potentiel membranaire au potentiel d'équilibre de l'ion potassium. Lors d'une dépolarisation importante, pendant la phase de plateau, ce courant est complètement inhibé par les polyamines intracellulaires, le calcium et le magnésium, conférant au courant sa propriété rectifiante entrante .

Le principal canal à l'origine de ce courant est Kir2.1. Il est absent ou très peu exprimé dans les cellules automatiques où sa présence s'opposerait à la dépolarisation diastolique.

L'amplitude de I_{K1} est plus faible dans les cellules auriculaires que ventriculaires et il en résulte un potentiel de repos plus élevé dans ces premières cellules et une phase de repolarisation ralentie (voir Figure 41). La faible amplitude du courant I_{K1} dans les cellules auriculaires peut s'expliquer par la plus faible expression du canal Kir2.1 dans ces cellules par rapport aux cellules ventriculaires .

13 Le PA des cellules de conduction ventriculaires : différences avec le PA des autres cellules

13.1 Caractéristiques du PA

La conduction du PA vers les ventricules passe par les cellules du faisceau de His et des fibres de Purkinje. Le potentiel d'action de ces cellules présente des caractéristiques particulières. Elles possèdent le potentiel diastolique maximal le plus bas et la durée du potentiel d'action est particulièrement longue (voir Figure 1, p 20). De plus, la phase de plateau se trouve à un potentiel plus bas que pour les cellules ventriculaires. Comme pour les cellules M, la durée du PA est plus longue que celle des cellules ventriculaires pour des fréquences cardiaques basses.

13.2 Bases moléculaires des différences avec le PA des autres cellules

La dépolarisation diastolique spontanée à l'origine d'une activité pacemaker est présente dans ces cellules et permet le rythme d'échappement ventriculaire lors d'une dissociation atrio-ventriculaire . Le courant I_f serait le principal courant

pacemaker bien qu'un autre courant potassique, I_{Kdd} , semble aussi intervenir dans cette phase .

Les deux types de courant calcique $I_{Ca,T}$ et $I_{Ca,L}$ sont présents dans ces cellules . Le courant calcique transitoire jouerait un rôle majeur dans la naissance du PA et interviendrait peu dans l'activité pacemaker puisque son inhibition n'affecte pas l'automaticité des cellules de Purkinje . Les canaux à l'origine du courant calcique transitoire (Cav3.1, 3.2, 3.3) sont plus exprimés dans ces cellules que dans les myocytes ventriculaires alors que les canaux à l'origine du courant $I_{Ca,L}$, et particulièrement Cav1.2, le sont moins. Cette différence pourrait expliquer que dans les fibres de Purkinje et le faisceau de His, la phase de plateau se trouve à un potentiel plus bas que dans les cardiomyocytes ventriculaires .

La longue durée du PA de ces cellules pourrait être attribuée à la contribution d'un courant sodique d'inactivation lente dans la genèse et le maintien du PA . La forte expression du canal Nav1.7 dans ces cellules (5 à 10 fois plus que dans les myocytes auriculaires et ventriculaires) pourrait être à l'origine de ce courant sodique . Il a été montré que le courant sodique des cellules de Purkinje était plus sensible à la TTX que celui des myocytes ventriculaires et, en accord avec ces données, le canal Nav1.7 est plus sensible à cette toxine que le canal Nav1.5 .

Malgré l'importance que peut prendre le courant I_{Ks} sous stimulation β -adrénergique, la faible densité du courant repolarisant I_K et particulièrement I_{Ks} peut aussi expliquer la longueur du PA .

Le courant I_{to} est aussi présent dans les cellules de Purkinje mais ses propriétés pharmacologiques diffèrent des autres types cellulaires et sa réactivation est plus lente que dans les cellules ventriculaires . La sous-unité Kv4.3 est fortement exprimée dans les cellules de Purkinje alors que KChIP2 l'est peu. La sous-unité KChAP est, par contre, plus exprimée dans les cellules de Purkinje que dans les ventricules . Cette sous-unité augmente l'expression de certains canaux Kv dont Kv4.3 et augmente le courant I_{to} sans modifier ses propriétés biophysiques . Ces différences d'expression de sous-unités peuvent être à l'origine des propriétés modifiées du courant par rapport aux ventricules.

ANNEXE 3 : RÉGULATION DE LA FONCTION CARDIAQUE PAR LE SYSTÈME NERVEUX AUTONOME

De manière générale, une activation du système nerveux orthosympathique (SNO), lors d'un effort ou d'un stress par exemple, augmente la fréquence et la contraction cardiaque. A l'inverse, le système parasympathique (SNP) les diminue.

14 Régulation par le système nerveux orthosympathique

Le SNO agit sur les cellules sinu-saies via les récepteurs adrénergiques qui sont principalement les récepteurs β_1 . Les récepteurs β_2 et β_3 sont aussi présents mais en moindre quantité. Ces récepteurs sont couplés à des protéines G qui permettent la transmission du signal par un second messager.

14.1 Les récepteurs β

- Les récepteurs β_1 et β_2 couplés aux protéines Gs

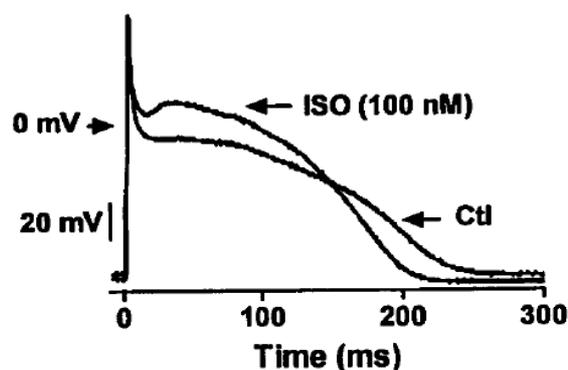
Pour les récepteurs β_1 et β_2 , la fixation de l'adrénaline ou de la noradrénaline permet l'activation de l'adénylate-cyclase par les protéines Gs, aboutissant à la synthèse d'AMPc (adénosine monophosphate cyclique). Ce second messager peut soit agir directement sur les canaux sensibles à ce nucléotide, comme les canaux HCN, soit activer la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA). Cette dernière protéine est le médiateur de la phosphorylation de certaines protéines comme, par exemple, les canaux calciques de type L et les canaux potassiques KCNQ1.

L'activation des canaux HCN par l'AMPc se produit pour des faibles doses de catécholamines et aboutit à une augmentation du courant I_h . Il en résulte une accélération de la dépolarisation diastolique, ce qui augmente la fréquence cardiaque.

La phosphorylation des canaux ioniques sensibles à la PKA aboutit à une augmentation des courants $I_{Ca,L}$ et I_{Ks} . L'augmentation de la concentration calcique

intracellulaire induite favorise la contraction des cardiomyocytes. Le courant sodique est aussi augmenté sous stimulation β -adrénergique par une augmentation PKA-dépendante du nombre de canaux à la membrane . Cette augmentation a pour conséquence d'accélérer la vitesse de conduction des PA. L'augmentation PKA-dépendante du courant potassique compense l'augmentation des courants dépolarisants et conduit à une diminution de la durée du PA, inhérente à l'augmentation de la fréquence cardiaque (Figure 42). Le courant I_{K1} est également sensible à la PKA. La phosphorylation du canal Kir2.1 aboutit à une diminution de ce courant .

Figure 42 : Modification du PA en réponse à une stimulation β -adrénergique. Effets de



l'isoprénaline (un agoniste des récepteurs β -adrénergiques) sur le PA des cellules de Purkinje de chien .

- Les récepteurs β_2 couplés aux protéines G_i

Les récepteurs β_2 présents dans le cœur sont couplés aux protéines G_s et G_i . Ces dernières inhibent l'adénylate-cyclase, à l'opposé des protéines G_s . Ainsi, l'activation des récepteurs β_2 par un agoniste spécifique aboutit à une contraction plus intense lorsque la voie des protéines G_i est inhibée . Le fait que ce type de récepteur soit couplé à des voies de signalisation opposées a pour conséquence de limiter les effets obtenus par l'activation des récepteurs β_1 et β_2 . Notamment, une trop grande augmentation du courant calcique (qui est doublé lorsque la voie des protéines G_i est inhibée) pourrait être à l'origine d'arythmies.

- Les récepteurs β_3

Les conséquences d'une stimulation des récepteurs β_3 -adrénergiques sont différentes de celles obtenues pour les deux autres récepteurs β -adrénergiques présents dans le cœur. Sa stimulation réduit la contractilité cardiaque. Une diminution de l'amplitude du PA et une accélération de la phase de repolarisation sont observées lorsqu'un agoniste des récepteurs β_3 -adrénergiques est appliqué sur des biopsies endomyocardiques de cœur humain .

Une activation de ces récepteurs aboutit, en effet, à une réduction du courant calcique de type L pouvant expliquer l'amplitude plus basse du PA sous stimulation . L'accélération de la phase de repolarisation pourrait être attribuée à un courant I_{Ks} augmenté, comme cela a pu être observé dans les ovocytes de Xénope exprimant les protéines KCNQ1, KCNE1 et le récepteur β_3 -adrénergique . Cependant, dans cette étude, il est difficile d'attribuer avec certitude les effets observés à l'activation des récepteurs β_3 -adrénergiques puisque aucun agoniste spécifique, comme le BRL37344, n'a été utilisé. Il est d'ailleurs à noter que dans une autre étude effectuée sur des cardiomyocytes de cobaye, l'utilisation d'un agoniste spécifique de ces récepteurs aboutit à l'effet inverse sur le courant I_{Ks} qui est alors inhibé . Contrairement au PA des cellules humaines, la durée du PA dans les cardiomyocytes de cobaye est augmentée lorsque du BRL37344 est appliqué, suggérant une voie de signalisation différente .

La voie de signalisation associée à l'activation des récepteurs β_3 -adrénergiques reste encore à déterminer et semble différer d'un type cellulaire à l'autre. On sait que ces récepteurs sont couplés, en partie au moins, aux protéines G_i puisque l'inhibition de ces protéines dans des biopsies endomyocardiques humaines diminue partiellement l'effet inotrope négatif induit par les récepteurs β_3 -adrénergiques . Toutefois, la principale action de ces protéines G_i ne serait pas, ici, d'inhiber l'adénylate-cyclase mais plutôt d'activer la voie du monoxyde d'azote (NO) par activation de la nitric oxide synthase (NOS). En effet, l'application d'inhibiteurs de cette voie diminue considérablement l'effet inotrope négatif des agonistes β_3 -adrénergiques . Le NO active la guanylate cyclase (GC) et la concentration en GMPc (guanosine monophosphate cyclique) intracellulaire est alors augmentée. Le GMPc peut, comme l'AMPc, avoir plusieurs rôles. Ce nucléotide peut activer la PKG (protéine kinase dépendante du GMPc) qui va phosphoryler des protéines cibles comme le canal calcique responsable du courant de type L, qui est alors inhibé

(Figure 43) . Une autre action du GMPc est de réguler les phosphodiésterases cGMP-dépendantes, soit en les activant (famille des PDE2), soit en les inhibant (famille des PDE3), modulant ainsi la quantité d'AMPc intracellulaire .

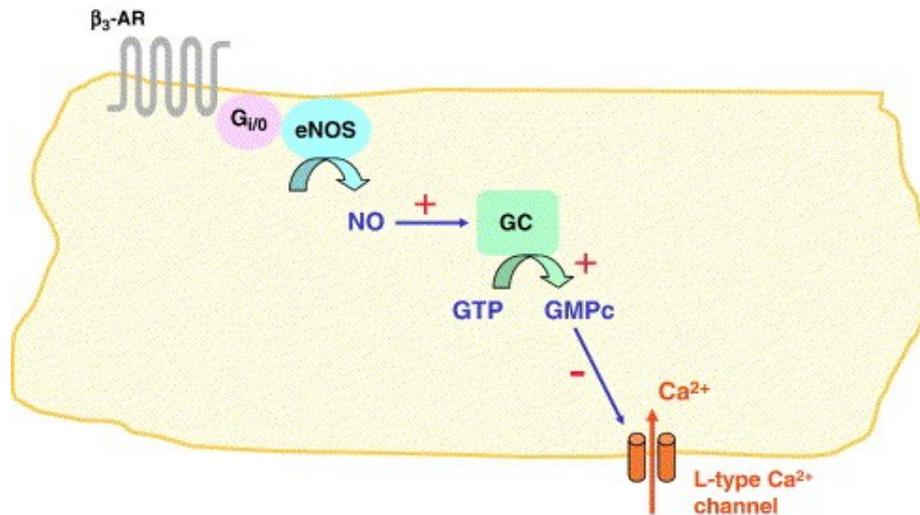


Figure 43 : Relation entre les récepteurs β_3 -adrénergiques et le canal calcique de type L. Voie de signalisation permettant l'inhibition du courant calcique de type L, selon l'équipe de Gauthier .

Pour l'équipe de Kathofer, cependant, la voie de régulation de ces récepteurs β_3 -adrénergiques fait intervenir la protéine kinase C (PKC) et serait à l'origine d'une augmentation du courant I_{Ks} . Mais ici encore, les études ont été réalisées dans un système d'expression hétérologue (ovocytes de Xénope) surexprimant le récepteur et le canal, à température ambiante et sans agoniste spécifique du récepteur β_3 -adrénergique. Or, visiblement, le choix du modèle d'étude et les méthodes utilisées semblent fondamentales pour déterminer les voies de régulation avec précision.

Il est, en effet, intéressant de voir qu'un même récepteur (β_2 ou β_3) peut être couplé à différentes protéines G et activer différentes voies de régulation, parfois au sein d'un même tissu. La quantité et la localisation des protéines intervenant dans ces voies sont certainement des paramètres discriminants pour favoriser une voie plutôt qu'une autre et diffèrent nettement d'un type cellulaire à l'autre. Il semble donc nécessaire d'étudier ces voies de régulation dans les tissus natifs plutôt que dans

des systèmes d'expression hétérologue afin d'avoir une approche plus physiologique et de mieux comprendre les mécanismes de régulation.

14.2 Les récepteurs α

Les récepteurs α -adrénergiques et particulièrement ceux du type 1 jouent aussi un rôle dans l'augmentation de la contractilité cardiaque mais leur contribution reste minoritaire par rapport aux récepteurs β -adrénergiques.

L'activation de ces récepteurs α au niveau cardiaque augmente la durée du PA . Cette augmentation de durée est corrélée avec une diminution des courants potassiques I_{to} , I_{K1} et I_K et une augmentation de l'entrée du calcium extracellulaire via les canaux calciques de type T ou l'échangeur sodium-calcium .

Les récepteurs α_1 -adrénergiques sont couplés aux protéines Gq. Ces protéines G activent la phospholipase C qui hydrolyse le PIP_2 (phosphatidylinositol-4,5-diphosphate) en IP_3 (inositol triphosphate) et DAG (diacylglycerol). Le DAG va alors activer la PKC alors que l' IP_3 va activer le récepteur à l' IP_3 au niveau du réticulum sarcoplasmique et permettre la sortie du calcium du réticulum vers le cytoplasme.

Les canaux à l'origine des courants I_{to} et I_{Ks} sont phosphorylés par la PKC alors que ceux à l'origine du courant I_{K1} le sont par la Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII), une kinase régulée par le calcium intracellulaire . La phosphorylation de ces canaux aboutirait à l'inhibition des courants générés par ceux-ci, mais les effets de la PKC sur le courant I_{Ks} restent discutables.

15 Régulation par le système nerveux parasympathique

Le système nerveux parasympathique module la fréquence cardiaque par les récepteurs muscariniques M2 présents au niveau des oreillettes et du NAV. Ces récepteurs sont couplés à des protéines G_i qui inhibent l'adénylate-cyclase par leur sous-unité α et activent les canaux potassiques dépendants de l'acétylcholine ($I_{K,Ach}$) par leurs sous-unités $\beta\gamma$.

L'inhibition de l'adénylate-cyclase va aboutir à des effets opposés à ceux obtenus lors d'une stimulation β -adrénergique. En particulier, le courant I_f est diminué suite à la réduction du taux d'AMPc intracellulaire .

Le courant $I_{K,Ach}$ est un courant rectifiant entrant au même titre que le courant I_{K1} , présent dans les cellules auriculaires et le nœud sinusal, principalement. Il est activé par l'acétylcholine et, plus précisément, par les sous-unités $\beta\gamma$ des protéines G associées aux récepteurs muscariniques. Ce courant est porté par les sous-unités Kir3.1 (ou GIRK1) et/ou Kir3.4 (ou GIRK4) associées à une sous-unité de la famille CIR. L'activation de ce courant lors d'une stimulation parasympathique permet une repolarisation plus rapide et une stabilisation du potentiel de repos à des potentiels proches de -80 mV. Ces actions diminuent l'excitabilité des cellules nodales, diminuant ainsi la fréquence cardiaque.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abbott, G. W., Sesti, F., Splawski, I., Buck, M. E., Lehmann, M. H., Timothy, K. W., Keating, M. T., & Goldstein, S. A. (1999). MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell*. 97:175-187.

Abriel, H. & Staub, O. (2005). Ubiquitylation of ion channels. *Physiology.(Bethesda)*. 20:398-407.

Ai X. and Pogwizd SM. (2007) Gender differences in expression of KCNE1 and KCNQ1 contribute to alterations in repolarization in control rabbits and an arrhythmogenic rabbit model of heart failure. *51st annual meeting of the biophysical society, Baltimore*. poster 504.

Aizawa, Y., Ueda, K., Wu, L. M., Inagaki, N., Hayashi, T., Takahashi, M., Ohta, M., Kawano, S., Hirano, Y., Yasunami, M., Aizawa, Y., Kimura, A., & Hiraoka, M. (2004). Truncated KCNQ1 mutant, A178fs/105, forms hetero-multimer channel with wild-type causing a dominant-negative suppression due to trafficking defect. *FEBS Lett*. 574:145-150.

Ameen, N. A., Marino, C., & Salas, P. J. (2003). cAMP-dependent exocytosis and vesicle traffic regulate CFTR and fluid transport in rat jejunum in vivo. *Am.J.Physiol Cell Physiol*. 284:C429-C438.

An, W. F., Bowlby, M. R., Betty, M., Cao, J., Ling, H. P., Mendoza, G., Hinson, J. W., Mattsson, K. I., Strassle, B. W., Trimmer, J. S., & Rhodes, K. J. (2000). Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature*. 403:553-556.

Antman, E. M., Stone, P. H., Muller, J. E., & Braunwald, E. (1980). Calcium channel blocking agents in the treatment of cardiovascular disorders. Part I: Basic and clinical electrophysiologic effects. *Ann.Intern.Med*. 93:875-885.

Antzelevitch, C., Shimizu, W., Yan, G. X., Sicouri, S., Weissenburger, J., Nesterenko, V. V., Burashnikov, A., Di Diego, J., Saffitz, J., & Thomas, G. P. (1999). The M cell: its contribution to the ECG and to normal and abnormal electrical function of the heart. *J.Cardiovasc.Electrophysiol*. 10:1124-1152.

Antzelevitch, C. (2001). The Brugada syndrome: ionic basis and arrhythmia mechanisms. *J.Cardiovasc.Electrophysiol*. 12:268-272.

Antzelevitch, C., Pollevick, G. D., Cordeiro, J. M., Casis, O., Sanguinetti, M. C., Aizawa, Y., Guerchicoff, A., Pfeiffer, R., Oliva, A., Wollnik, B., Gelber, P., Bonaros, E. P., Jr., Burashnikov, E., Wu, Y., Sargent, J. D., Schickel, S., Oberheiden, R., Bhatia, A., Hsu, L. F., Haissaguerre, M., Schimpf, R., Borggrefe, M., & Wolpert, C. (2007). Loss-of-function mutations in the cardiac calcium channel underlie a new clinical entity characterized by ST-segment elevation, short QT intervals, and sudden cardiac death. *Circulation*. 115:442-449.

Attali, B., Guillemare, E., Lesage, F., Honore, E., Romey, G., Lazdunski, M., & Barhanin, J. (1993). The protein IsK is a dual activator of K⁺ and Cl⁻ channels. *Nature*. 365:850-852.

Attali, B., Latter, H., Rachamim, N., & Garty, H. (1995). A corticosteroid-induced gene expressing an "IsK-like" K⁺ channel activity in *Xenopus* oocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92:6092-6096.

Bai, C. X., Takahashi, K., Masumiya, H., Sawanobori, T., & Furukawa, T. (2004). Nitric oxide-dependent modulation of the delayed rectifier K⁺ current and the L-type Ca²⁺ current by ginsenoside Re, an ingredient of *Panax ginseng*, in guinea-pig cardiomyocytes. *Br.J.Pharmacol.* 142:567-575.

Bai, C. X., Kurokawa, J., Tamagawa, M., Nakaya, H., & Furukawa, T. (2005). Nontranscriptional regulation of cardiac repolarization currents by testosterone. *Circulation.* 112:1701-1710.

Barhanin, J., Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Lazdunski, M., & Romey, G. (1996). K(V)LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature.* 384:78-80.

Baron, S., Manin, M., Beaudoin, C., Leotoing, L., Communal, Y., Veyssiere, G., & Morel, L. (2004). Androgen receptor mediates non-genomic activation of phosphatidylinositol 3-OH kinase in androgen-sensitive epithelial cells. *J.Biol.Chem.* 279:14579-14586.

Beavo, J. A. (1995). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev.* 75:725-748.

Bellocq, C., van Ginneken, A. C., Bezzina, C. R., Alders, M., Escande, D., Mannens, M. M., Baro, I., & Wilde, A. A. (2004). Mutation in the KCNQ1 gene leading to the short QT-interval syndrome. *Circulation.* 109:2394-2397.

Bendahhou, S., Marionneau, C., Haurogne, K., Larroque, M. M., Derand, R., Szuts, V., Escande, D., Demolombe, S., & Barhanin, J. (2005). In vitro molecular interactions and distribution of KCNE family with KCNQ1 in the human heart. *Cardiovasc.Res.* 67:529-538.

Bezaniilla, F. (2000). The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev.* 80:555-592.

Bianchi, L., Shen, Z., Dennis, A. T., Priori, S. G., Napolitano, C., Ronchetti, E., Bryskin, R., Schwartz, P. J., & Brown, A. M. (1999). Cellular dysfunction of LQT5-minK mutants: abnormalities of IKs, IKr and trafficking in long QT syndrome. *Hum.Mol.Genet.* 8:1499-1507.

Billette, J. (1987). Atrioventricular nodal activation during periodic premature stimulation of the atrium. *Am.J.Physiol.* 252:H163-H177.

Blaustein, M. P. & Lederer, W. J. (1999). Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev.* 79:763-854.

Bosch, R. F., Schneck, A. C., Kiehn, J., Zhang, W., Hambrook, A., Eigenberger, B. W., Rub, N., Gogel, J., Mewis, C., Seipel, L., & Kuhlkamp, V. (2002). beta3-Adrenergic regulation of an ion channel in the heart-inhibition of the slow delayed rectifier potassium current I(Ks) in guinea pig ventricular myocytes. *Cardiovasc.Res.* 56:393-403.

Boucherot, A., Schreiber, R., & Kunzelmann, K. (2001). Regulation and properties of KCNQ1 (K(V)LQT1) and impact of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J.Membr.Biol.* 182:39-47.

Boyett, M. R., Honjo, H., Yamamoto, M., Nikmaram, M. R., Niwa, R., & Kodama, I. (1999). Downward gradient in action potential duration along conduction path in and around the sinoatrial node. *Am.J.Physiol.* 276:H686-H698.

Brahmajothi, M. V., Morales, M. J., Reimer, K. A., & Strauss, H. C. (1997). Regional localization of ERG, the channel protein responsible for the rapid component of the delayed rectifier, K⁺ current in the ferret heart. *Circ.Res.* 81:128-135.

Brown, D., Katsura, T., & Gustafson, C. E. (1998). Cellular mechanisms of aquaporin trafficking. *Am.J.Physiol.* 275:F328-F331.

Brugada, R., Hong, K., Dumaine, R., Cordeiro, J., Gaita, F., Borggrefe, M., Menendez, T. M., Brugada, J., Pollevick, G. D., Wolpert, C., Burashnikov, E., Matsuo, K., Wu, Y. S., Guerchicoff, A., Bianchi, F., Giustetto, C., Schimpf, R., Brugada, P., & Antzelevitch, C. (2004). Sudden death associated with short-QT syndrome linked to mutations in HERG. *Circulation.* 109:30-35.

Bryant, S. M., Wan, X., Shipsey, S. J., & Hart, G. (1998). Regional differences in the delayed rectifier current (IKr and IKs) contribute to the differences in action potential duration in basal left ventricular myocytes in guinea-pig. *Cardiovasc.Res.* 40:322-331.

Busch, A. E., Kavanaugh, M. P., Varnum, M. D., Adelman, J. P., & North, R. A. (1992). Regulation by second messengers of the slowly activating, voltage-dependent potassium current expressed in *Xenopus* oocytes. *J.Physiol.* 450:491-502.

Busch, A. E., Busch, G. L., Ford, E., Suessbrich, H., Lang, H. J., Greger, R., Kunzelmann, K., Attali, B., & Stuhmer, W. (1997). The role of the IsK protein in the specific pharmacological properties of the IKs channel complex. *Br.J.Pharmacol.* 122:187-189.

Cachelin, A. B., de Peyer, J. E., Kokubun, S., & Reuter, H. (1983). Ca²⁺ channel modulation by 8-bromocyclic AMP in cultured heart cells. *Nature.* 304:462-464.

Calaghan, S. C., Le Guennec, J. Y., & White, E. (2001). Modulation of Ca(2+) signaling by microtubule disruption in rat ventricular myocytes and its dependence on the ruptured patch-clamp configuration. *Circ.Res.* 88:E32-E37.

Callewaert, G., Carmeliet, E., & Vereecke, J. (1984). Single cardiac Purkinje cells: general electrophysiology and voltage-clamp analysis of the pace-maker current. *J.Physiol.* 349:643-661.

- Carmeliet, E. (1987). Slow inactivation of the sodium current in rabbit cardiac Purkinje fibres. *Pflugers Arch.* 408:18-26.
- Chang, S. Y., Di, A., Naren, A. P., Palfrey, H. C., Kirk, K. L., & Nelson, D. J. (2002). Mechanisms of CFTR regulation by syntaxin 1A and PKA. *J.Cell Sci.* 115:783-791.
- Chau, V., Tobias, J. W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D. J., Gonda, D. K., & Varshavsky, A. (1989). A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science.* 243:1576-1583.
- Chen, H., Kim, L. A., Rajan, S., Xu, S., & Goldstein, S. A. (2003). Charybdotoxin binding in the I(Ks) pore demonstrates two MinK subunits in each channel complex. *Neuron.* 40:15-23.
- Chen, L., Kurokawa, J., & Kass, R. S. (2005). Phosphorylation of the A-kinase-anchoring protein Yotiao contributes to protein kinase A regulation of a heart potassium channel. *J.Biol.Chem.* 280:31347-31352.
- Chen, Y. H., Xu, S. J., Bendahhou, S., Wang, X. L., Wang, Y., Xu, W. Y., Jin, H. W., Sun, H., Su, X. Y., Zhuang, Q. N., Yang, Y. Q., Li, Y. B., Liu, Y., Xu, H. J., Li, X. F., Ma, N., Mou, C. P., Chen, Z., Barhanin, J., & Huang, W. (2003). KCNQ1 gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation. *Science.* 299:251-254.
- Chouabe, C., Neyroud, N., Richard, P., Denjoy, I., Hainque, B., Romey, G., Drici, M. D., Guicheney, P., & Barhanin, J. (2000). Novel mutations in KvLQT1 that affect Iks activation through interactions with Isk. *Cardiovasc.Res.* 45:971-980.
- Chugh, S. S., Blackshear, J. L., Shen, W. K., Hammill, S. C., & Gersh, B. J. (2001). Epidemiology and natural history of atrial fibrillation: clinical implications. *J.Am.Coll.Cardiol.* 37:371-378.
- Compton, S. J., Lux, R. L., Ramsey, M. R., Strellich, K. R., Sanguinetti, M. C., Green, L. S., Keating, M. T., & Mason, J. W. (1996). Genetically defined therapy of inherited long-QT syndrome. Correction of abnormal repolarization by potassium. *Circulation.* 94:1018-1022.
- Coraboeuf, E. & Carmeliet, E. (1982). Existence of two transient outward currents in sheep cardiac Purkinje fibers. *Pflugers Arch.* 392:352-359.
- Corey, S., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., & Clapham, D. E. (1998). Number and stoichiometry of subunits in the native atrial G-protein-gated K⁺ channel, IKACH. *J.Biol.Chem.* 273:5271-5278.
- Dahimene, S., Alcolea, S., Naud, P., Jourdon, P., Escande, D., Brasseur, R., Thomas, A., Baro, I., & Merot, J. (2006). The N-terminal juxtamembranous domain of KCNQ1 is critical for channel surface expression: implications in the Romano-Ward LQT1 syndrome. *Circ.Res.* 99:1076-1083.
- Darbar, D., Herron, K. J., Ballew, J. D., Jahangir, A., Gersh, B. J., Shen, W. K., Hammill, S. C., Packer, D. L., & Olson, T. M. (2003). Familial atrial fibrillation is a genetically heterogeneous disorder. *J.Am.Coll.Cardiol.* 41:2185-2192.

Demolombe, S., Baro, I., Pereon, Y., Blied, J., Mohammad-Panah, R., Pollard, H., Morid, S., Mannens, M., Wilde, A., Barhanin, J., Charpentier, F., & Escande, D. (1998). A dominant negative isoform of the long QT syndrome 1 gene product. *J.Biol.Chem.* 273:6837-6843.

Deveraux, Q., Ustrell, V., Pickart, C., & Rechsteiner, M. (1994). A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J.Biol.Chem.* 269:7059-7061.

DiFrancesco, D. & Tromba, C. (1988). Muscarinic control of the hyperpolarization-activated current (if) in rabbit sino-atrial node myocytes. *J.Physiol.* 405:493-510.

DiFrancesco, D., Ducouret, P., & Robinson, R. B. (1989). Muscarinic modulation of cardiac rate at low acetylcholine concentrations. *Science.* 243:669-671.

DiFrancesco, D. & Tortora, P. (1991). Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature.* 351:145-147.

DiFrancesco, D. (1993). Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu.Rev.Physiol.* 55:455-472.

Dilly, K. W., Kurokawa, J., Terrenoire, C., Reiken, S., Lederer, W. J., Marks, A. R., & Kass, R. S. (2004). Overexpression of beta2-adrenergic receptors cAMP-dependent protein kinase phosphorylates and modulates slow delayed rectifier potassium channels expressed in murine heart: evidence for receptor/channel co-localization. *J.Biol.Chem.* 279:40778-40787.

Diviani, D. & Scott, J. D. (2001). AKAP signaling complexes at the cytoskeleton. *J.Cell Sci.* 114:1431-1437.

Dodge-Kafka, K. L., Langeberg, L., & Scott, J. D. (2006). Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of A-kinase anchoring proteins. *Circ.Res.* 98:993-1001.

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

Drici, M. D., Burklow, T. R., Haridasse, V., Glazer, R. I., & Woosley, R. L. (1996). Sex hormones prolong the QT interval and downregulate potassium channel expression in the rabbit heart. *Circulation.* 94:1471-1474.

Drouin, E., Charpentier, F., Gauthier, C., Laurent, K., & Le Marec, H. (1995). Electrophysiologic characteristics of cells spanning the left ventricular wall of human heart: evidence for presence of M cells. *J.Am.Coll.Cardiol.* 26:185-192.

Ehrlich, J. R., Pourrier, M., Weerapura, M., Ethier, N., Marmabachi, A. M., Hebert, T. E., & Nattel, S. (2004). KvLQT1 modulates the distribution and biophysical properties of HERG. A novel alpha-subunit interaction between delayed rectifier currents. *J.Biol.Chem.* 279:1233-1241.

Ehrlich, J. R. (2007). Taking ion channel degradation to heart. *Cardiovasc.Res.* 74:6-7.

- Eliot, R. S. & Buell, J. C. (1985). Role of emotions and stress in the genesis of sudden death. *J.Am.Coll.Cardiol.* 5:95B-98B.
- Ellinghaus, P., Scheubel, R. J., Dobrev, D., Ravens, U., Holtz, J., Huetter, J., Nielsch, U., & Morawietz, H. (2005). Comparing the global mRNA expression profile of human atrial and ventricular myocardium with high-density oligonucleotide arrays. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 129:1383-1390.
- Embark, H. M., Bohmer, C., Vallon, V., Luft, F., & Lang, F. (2003). Regulation of KCNE1-dependent K(+) current by the serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) isoforms. *Pflugers Arch.* 445:601-606.
- Escande, D., Coulombe, A., Faivre, J. F., Deroubaix, E., & Coraboeuf, E. (1987). Two types of transient outward currents in adult human atrial cells. *Am.J.Physiol.* 252:H142-H148.
- Fatkin, D., Otway, R., & Vandenberg, J. I. (2007). Genes and atrial fibrillation: a new look at an old problem. *Circulation.* 116:782-792.
- Fedida, D., Shimoni, Y., & Giles, W. R. (1990). Alpha-adrenergic modulation of the transient outward current in rabbit atrial myocytes. *J.Physiol.* 423:257-277.
- Fedida, D., Braun, A. P., & Giles, W. R. (1991). Alpha 1-adrenoceptors reduce background K+ current in rabbit ventricular myocytes. *J.Physiol.* 441:673-684.
- Fields, S. & Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature.* 340:245-246.
- Franqueza, L., Lin, M., Shen, J., Splawski, I., Keating, M. T., & Sanguinetti, M. C. (1999). Long QT syndrome-associated mutations in the S4-S5 linker of KvLQT1 potassium channels modify gating and interaction with minK subunits. *J.Biol.Chem.* 274:21063-21070.
- Furukawa, T., Kimura, S., Furukawa, N., Bassett, A. L., & Myerburg, R. J. (1992). Potassium rectifier currents differ in myocytes of endocardial and epicardial origin. *Circ.Res.* 70:91-103.
- Furukawa, T., Bai, C. X., Kaihara, A., Ozaki, E., Kawano, T., Nakaya, Y., Awais, M., Sato, M., Umezawa, Y., & Kurokawa, J. (2006). Ginsenoside Re, a main phytosterol of *Panax ginseng*, activates cardiac potassium channels via a nongenomic pathway of sex hormones. *Mol.Pharmacol.* 70:1916-1924.
- Gaborit, N., Le Bouter, S., Szuts, V., Varro, A., Escande, D., Nattel, S., & Demolombe, S. (2007). Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart. *J.Physiol.* 582:675-693.
- Gaita, F., Giustetto, C., Bianchi, F., Wolpert, C., Schimpf, R., Riccardi, R., Grossi, S., Richiardi, E., & Borggrefe, M. (2003). Short QT Syndrome: a familial cause of sudden death. *Circulation.* 108:965-970.

Gaita, F., Giustetto, C., Bianchi, F., Schimpf, R., Haissaguerre, M., Calo, L., Brugada, R., Antzelevitch, C., Borggrefe, M., & Wolpert, C. (2004). Short QT syndrome: pharmacological treatment. *J.Am.Coll.Cardiol.* 43:1494-1499.

Galan, J. M. & Haguenaer-Tsapis, R. (1997). Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *EMBO J.* 16:5847-5854.

Gamper, N., Li, Y., & Shapiro, M. S. (2005). Structural requirements for differential sensitivity of KCNQ K⁺ channels to modulation by Ca²⁺/calmodulin. *Mol.Biol.Cell.* 16:3538-3551.

Garcia, F., Kierbel, A., Larocca, M. C., Gradilone, S. A., Splinter, P., LaRusso, N. F., & Marinelli, R. A. (2001). The water channel aquaporin-8 is mainly intracellular in rat hepatocytes, and its plasma membrane insertion is stimulated by cyclic AMP. *J.Biol.Chem.* 276:12147-12152.

Gauthier, C., Tavernier, G., Charpentier, F., Langin, D., & Le Marec, H. (1996). Functional beta3-adrenoceptor in the human heart. *J.Clin.Invest.* 98:556-562.

Gauthier, C., Leblais, V., Kobzik, L., Trochu, J. N., Khandoudi, N., Bril, A., Balligand, J. L., & Le Marec, H. (1998). The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J.Clin.Invest.* 102:1377-1384.

Gellens, M. E., George, A. L., Jr., Chen, L. Q., Chahine, M., Horn, R., Barchi, R. L., & Kallen, R. G. (1992). Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89:554-558.

George, A. L., Jr., Knittle, T. J., & Tamkun, M. M. (1992). Molecular cloning of an atypical voltage-gated sodium channel expressed in human heart and uterus: evidence for a distinct gene family. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89:4893-4897.

Ghosh, S., Nunziato, D. A., & Pitt, G. S. (2006). KCNQ1 assembly and function is blocked by long-QT syndrome mutations that disrupt interaction with calmodulin. *Circ.Res.* 98:1048-1054.

Gima, K. & Rudy, Y. (2002). Ionic current basis of electrocardiographic waveforms: a model study. *Circ.Res.* 90:889-896.

Glantz, S. B., Li, Y., & Rubin, C. S. (1993). Characterization of distinct tethering and intracellular targeting domains in AKAP75, a protein that links cAMP-dependent protein kinase II beta to the cytoskeleton. *J.Biol.Chem.* 268:12796-12804.

Gloss, B., Trost, S., Bluhm, W., Swanson, E., Clark, R., Winkfein, R., Janzen, K., Giles, W., Chassande, O., Samarut, J., & Dillmann, W. (2001). Cardiac ion channel expression and contractile function in mice with deletion of thyroid hormone receptor alpha or beta. *Endocrinology.* 142:544-550.

Grunnet, M., Jespersen, T., Rasmussen, H. B., Ljungstrom, T., Jorgensen, N. K., Olesen, S. P., & Klaerke, D. A. (2002). KCNE4 is an inhibitory subunit to the KCNQ1 channel. *J.Physiol.* 542:119-130.

Grunnet, M., Jespersen, T., MacAulay, N., Jorgensen, N. K., Schmitt, N., Pongs, O., Olesen, S. P., & Klaerke, D. A. (2003). KCNQ1 channels sense small changes in cell volume. *J.Physiol.* 549:419-427.

Guo, W., Xu, H., London, B., & Nerbonne, J. M. (1999). Molecular basis of transient outward K⁺ current diversity in mouse ventricular myocytes. *J.Physiol.* 521 Pt 3:587-599.

Guo, W., Li, H., Aimond, F., Johns, D. C., Rhodes, K. J., Trimmer, J. S., & Nerbonne, J. M. (2002). Role of heteromultimers in the generation of myocardial transient outward K⁺ currents. *Circ.Res.* 90:586-593.

Gussak, I., Brugada, P., Brugada, J., Wright, R. S., Kopecky, S. L., Chaitman, B. R., & Bjerregaard, P. (2000). Idiopathic short QT interval: a new clinical syndrome? *Cardiology.* 94:99-102.

Hagiwara, N., Irisawa, H., & Kameyama, M. (1988). Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J.Physiol.* 395:233-253.

Hallaq, H., Yang, Z., Viswanathan, P. C., Fukuda, K., Shen, W., Wang, D. W., Wells, K. S., Zhou, J., Yi, J., & Murray, K. T. (2006). Quantitation of protein kinase A-mediated trafficking of cardiac sodium channels in living cells. *Cardiovasc.Res.* 72:250-261.

Han, W., Wang, Z., & Nattel, S. (2000). A comparison of transient outward currents in canine cardiac Purkinje cells and ventricular myocytes. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol.* 279:H466-H474.

Han, W., Wang, Z., & Nattel, S. (2001). Slow delayed rectifier current and repolarization in canine cardiac Purkinje cells. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol.* 280:H1075-H1080.

Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T., & MacKinnon, R. (1994). Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys.J.* 66:1061-1067.

Herzer, T., Busch, A. E., Waldegger, S., & Lang, F. (1994). Inhibition of human IsK channels expressed in *Xenopus* oocytes by calmodulin antagonists. *Eur.J.Pharmacol.* 259:335-338.

Hicke, L. (1999). Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels. *Trends Cell Biol.* 9:107-112.

Hilgemann, D. W., Feng, S., & Nasuhoglu, C. (2001). The complex and intriguing lives of PIP₂ with ion channels and transporters. *Sci.STKE.* 2001:RE19-

Hirano, Y., Fozzard, H. A., & January, C. T. (1989). Characteristics of L- and T-type Ca²⁺ currents in canine cardiac Purkinje cells. *Am.J.Physiol.* 256:H1478-H1492.

Hong, K., Piper, D. R., Diaz-Valdecantos, A., Brugada, J., Oliva, A., Burashnikov, E., Santos-de-Soto, J., Grueso-Montero, J., Diaz-Enfante, E., Brugada, P., Sachse, F., Sanguinetti, M. C., & Brugada, R. (2005). De novo KCNQ1 mutation responsible for atrial fibrillation and short QT syndrome in utero. *Cardiovasc.Res.* 68:433-440.

Honjo, H., Lei, M., Boyett, M. R., & Kodama, I. (1999). Heterogeneity of 4-aminopyridine-sensitive current in rabbit sinoatrial node cells. *Am.J.Physiol.* 276:H1295-H1304.

Hoshino, K., Ogawa, K., Hishitani, T., & Kitazawa, R. (2002). Studies of magnesium in congenital long QT syndrome. *Pediatr.Cardiol.* 23:41-48.

Howard, R. J., Clark, K. A., Holton, J. M., & Minor, D. L., Jr. (2007). Structural insight into KCNQ (Kv7) channel assembly and channelopathy. *Neuron.* 53:663-675.

Huibregtse, J. M., Scheffner, M., Beaudenon, S., & Howley, P. M. (1995). A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92:2563-2567.

Hullin, R., Khan, I. F., Wirtz, S., Mohacsi, P., Varadi, G., Schwartz, A., & Herzig, S. (2003). Cardiac L-type calcium channel beta-subunits expressed in human heart have differential effects on single channel characteristics. *J.Biol.Chem.* 278:21623-21630.

Ingham, R. J., Gish, G., & Pawson, T. (2004). The Nedd4 family of E3 ubiquitin ligases: functional diversity within a common modular architecture. *Oncogene.* 23:1972-1984.

Iwakura, K., Hori, M., Watanabe, Y., Kitabatake, A., Cragoe, E. J., Jr., Yoshida, H., & Kamada, T. (1990). Alpha 1-adrenoceptor stimulation increases intracellular pH and Ca²⁺ in cardiomyocytes through Na⁺/H⁺ and Na⁺/Ca²⁺ exchange. *Eur.J.Pharmacol.* 186:29-40.

Jervell, A. & Lange-Nielsen, F. (1957). Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval and sudden death. *Am.Heart J.* 54:59-68.

Jespersen, T., Grunnet, M., Rasmussen, H. B., Jorgensen, N. B., Jensen, H. S., Angelo, K., Olesen, S. P., & Klaerke, D. A. (2006). The corticosteroid hormone induced factor: a new modulator of KCNQ1 channels? *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 341:979-988.

Jiang, Y., Ruta, V., Chen, J., Lee, A., & MacKinnon, R. (2003). The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature.* 423:42-48.

Jost, N., Papp, J. G., & Varro, A. (2007). Slow delayed rectifier potassium current (IKs) and the repolarization reserve. *Ann.Noninvasive.Electrocardiol.* 12:64-78.

Kanelis, V., Rotin, D., & Forman-Kay, J. D. (2001). Solution structure of a Nedd4 WW domain-ENaC peptide complex. *Nat.Struct.Biol.* 8:407-412.

Kanki, H., Kupersmidt, S., Yang, T., Wells, S., & Roden, D. M. (2004). A structural requirement for processing the cardiac K⁺ channel KCNQ1. *J.Biol.Chem.* 279:33976-33983.

Kathofer, S., Zhang, W., Karle, C., Thomas, D., Schoels, W., & Kiehn, J. (2000). Functional coupling of human beta 3-adrenoreceptors to the KvLQT1/MinK potassium channel. *J.Biol.Chem.* 275:26743-26747.

Kathofer, S., Rockl, K., Zhang, W., Thomas, D., Katus, H., Kiehn, J., Kreye, V., Schoels, W., & Karle, C. (2003). Human beta(3)-adrenoreceptors couple to KvLQT1/MinK potassium channels in *Xenopus* oocytes via protein kinase C phosphorylation of the KvLQT1 protein. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 368:119-126.

Katsura, T., Gustafson, C. E., Ausiello, D. A., & Brown, D. (1997). Protein kinase A phosphorylation is involved in regulated exocytosis of aquaporin-2 in transfected LLC-PK1 cells. *Am.J.Physiol.* 272:F817-F822.

Khan, I. A. (2002). Long QT syndrome: diagnosis and management. *Am.Heart J.* 143:7-14.

Kimura, J., Noma, A., & Irisawa, H. (1986). Na-Ca exchange current in mammalian heart cells. *Nature.* 319:596-597.

Kitamura, T., Onishi, K., Dohi, K., Okinaka, T., Isaka, N., & Nakano, T. (2000). The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation in the beating guinea pig heart. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 35:786-790.

Kiyosue, T. & Arita, M. (1989). Late sodium current and its contribution to action potential configuration in guinea pig ventricular myocytes. *Circ.Res.* 64:389-397.

Klein, I. & Ojamaa, K. (2001). Thyroid hormone and the cardiovascular system. *N.Engl.J.Med.* 344:501-509.

Klugbauer, N., Lacinova, L., Flockerzi, V., & Hofmann, F. (1995). Structure and functional expression of a new member of the tetrodotoxin-sensitive voltage-activated sodium channel family from human neuroendocrine cells. *EMBO J.* 14:1084-1090.

Klussmann, E., Maric, K., Wiesner, B., Beyermann, M., & Rosenthal, W. (1999). Protein kinase A anchoring proteins are required for vasopressin-mediated translocation of aquaporin-2 into cell membranes of renal principal cells. *J.Biol.Chem.* 274:4934-4938.

Kodama, I., Nikmaram, M. R., Boyett, M. R., Suzuki, R., Honjo, H., & Owen, J. M. (1997). Regional differences in the role of the Ca²⁺ and Na⁺ currents in pacemaker activity in the sinoatrial node. *Am.J.Physiol.* 272:H2793-H2806.

Kodama, I., Boyett, M. R., Nikmaram, M. R., Yamamoto, M., Honjo, H., & Niwa, R. (1999). Regional differences in effects of E-4031 within the sinoatrial node. *Am.J.Physiol.* 276:H793-H802.

Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H. D., Mayer, T. U., & Jentsch, S. (1999). A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell*. 96:635-644.

Koumi, S., Backer, C. L., Arentzen, C. E., & Sato, R. (1995). beta-Adrenergic modulation of the inwardly rectifying potassium channel in isolated human ventricular myocytes. Alteration in channel response to beta-adrenergic stimulation in failing human hearts. *J.Clin.Invest.* 96:2870-2881.

Krapivinsky, G., Gordon, E. A., Wickman, K., Velimirovic, B., Krapivinsky, L., & Clapham, D. E. (1995). The G-protein-gated atrial K⁺ channel IKACH is a heteromultimer of two inwardly rectifying K⁽⁺⁾-channel proteins. *Nature*. 374:135-141.

Kron, J., Oliver, R. P., Norsted, S., & Silka, M. J. (1990). The automatic implantable cardioverter-defibrillator in young patients. *J.Am.Coll.Cardiol.* 16:896-902.

Krumerman, A., Gao, X., Bian, J. S., Melman, Y. F., Kagan, A., & McDonald, T. V. (2004). An LQT mutant minK alters KvLQT1 trafficking. *Am.J.Physiol Cell Physiol.* 286:C1453-C1463.

Kupersmidt, S., Yang, I. C., Sutherland, M., Wells, K. S., Yang, T., Yang, P., Balsler, J. R., & Roden, D. M. (2002). Cardiac-enriched LIM domain protein fhl2 is required to generate I(Ks) in a heterologous system. *Cardiovasc.Res.* 56:93-103.

Kurokawa, J., Chen, L., & Kass, R. S. (2003). Requirement of subunit expression for cAMP-mediated regulation of a heart potassium channel. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 100:2122-2127.

Kurokawa, J., Motoike, H. K., Rao, J., & Kass, R. S. (2004). Regulatory actions of the A-kinase anchoring protein Yotiao on a heart potassium channel downstream of PKA phosphorylation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 101:16374-16378.

Kuryshv, Y. A., Gudz, T. I., Brown, A. M., & Wible, B. A. (2000). KChAP as a chaperone for specific K⁽⁺⁾ channels. *Am.J.Physiol Cell Physiol.* 278:C931-C941.

Kwak, Y. G., Hu, N., Wei, J., George, A. L., Jr., Grobaski, T. D., Tamkun, M. M., & Murray, K. T. (1999). Protein kinase A phosphorylation alters Kvbeta1.3 subunit-mediated inactivation of the Kv1.5 potassium channel. *J.Biol.Chem.* 274:13928-13932.

Landzberg, J. S., Parker, J. D., Gauthier, D. F., & Colucci, W. S. (1991). Effects of myocardial alpha 1-adrenergic receptor stimulation and blockade on contractility in humans. *Circulation.* 84:1608-1614.

Lang, F., Bohmer, C., Palmada, M., Seebohm, G., Strutz-Seebohm, N., & Vallon, V. (2006). (Patho)physiological significance of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase isoforms. *Physiol Rev.* 86:1151-1178.

- Le Bouter, S., Demolombe, S., Chambellan, A., Bellocq, C., Aimond, F., Toumaniantz, G., Lande, G., Siavoshian, S., Baro, I., Pond, A. L., Nerbonne, J. M., Leger, J. J., Escande, D., & Charpentier, F. (2003). Microarray analysis reveals complex remodeling of cardiac ion channel expression with altered thyroid status: relation to cellular and integrated electrophysiology. *Circ.Res.* 92:234-242.
- Lee, J. H. & Rosen, M. R. (1994). Alpha 1-adrenergic receptor modulation of repolarization in canine Purkinje fibers. *J.Cardiovasc.Electrophysiol.* 5:232-240.
- Lei, M., Honjo, H., Kodama, I., & Boyett, M. R. (2000). Characterisation of the transient outward K⁺ current in rabbit sinoatrial node cells. *Cardiovasc.Res.* 46:433-441.
- Lei, M., Honjo, H., Kodama, I., & Boyett, M. R. (2001). Heterogeneous expression of the delayed-rectifier K⁺ currents i(K_r) and i(K_s) in rabbit sinoatrial node cells. *J.Physiol.* 535:703-714.
- Lei, M., Jones, S. A., Liu, J., Lancaster, M. K., Fung, S. S., Dobrzynski, H., Camelliti, P., Maier, S. K., Noble, D., & Boyett, M. R. (2004). Requirement of neuronal- and cardiac-type sodium channels for murine sinoatrial node pacemaking. *J.Physiol.* 559:835-848.
- LeMasurier, M., Heginbotham, L., & Miller, C. (2001). KcsA: it's a potassium channel. *J.Gen.Physiol.* 118:303-314.
- Li, G. R., Feng, J., Yue, L., Carrier, M., & Nattel, S. (1996). Evidence for two components of delayed rectifier K⁺ current in human ventricular myocytes. *Circ.Res.* 78:689-696.
- Li, H. Y., Kotaka, M., Kostin, S., Lee, S. M., Kok, L. D., Chan, K. K., Tsui, S. K., Schaper, J., Zimmermann, R., Lee, C. Y., Fung, K. P., & Waye, M. M. (2001). Translocation of a human focal adhesion LIM-only protein, FHL2, during myofibrillogenesis and identification of LIM2 as the principal determinants of FHL2 focal adhesion localization. *Cell Motil.Cytoskeleton.* 48:11-23.
- Li, W., Chanda, S. K., Micik, I., & Joazeiro, C. A. (2005). Methods for the functional genomic analysis of ubiquitin ligases. *Methods Enzymol.* 398:280-291.
- Liman, E. R., Hess, P., Weaver, F., & Koren, G. (1991). Voltage-sensing residues in the S4 region of a mammalian K⁺ channel. *Nature.* 353:752-756.
- Lin, J. W., Wyszynski, M., Madhavan, R., Sealock, R., Kim, J. U., & Sheng, M. (1998). Yotiao, a novel protein of neuromuscular junction and brain that interacts with specific splice variants of NMDA receptor subunit NR1. *J.Neurosci.* 18:2017-2027.
- Lip, G. Y. & Tse, H. F. (2007). Management of atrial fibrillation. *Lancet.* 370:604-618.
- Liu, D. W. & Antzelevitch, C. (1995). Characteristics of the delayed rectifier current (I_{Kr} and I_{Ks}) in canine ventricular epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes. A weaker I_{Ks} contributes to the longer action potential of the M cell. *Circ.Res.* 76:351-365.

- Lo, C. F. & Numann, R. (1998). Independent and exclusive modulation of cardiac delayed rectifying K⁺ current by protein kinase C and protein kinase A. *Circ.Res.* 83:995-1002.
- Long, S. B., Campbell, E. B., & MacKinnon, R. (2005). Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science.* 309:897-903.
- Lopatin, A. N., Makhina, E. N., & Nichols, C. G. (1995). The mechanism of inward rectification of potassium channels: "long-pore plugging" by cytoplasmic polyamines. *J.Gen.Physiol.* 106:923-955.
- Loussouarn, G., Park, K. H., Bellocq, C., Baro, I., Charpentier, F., & Escande, D. (2003). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PIP₂, controls KCNQ1/KCNE1 voltage-gated potassium channels: a functional homology between voltage-gated and inward rectifier K⁺ channels. *EMBO J.* 22:5412-5421.
- Loussouarn, G., Baro, I., & Escande, D. (2006). KCNQ1 K⁺ channel-mediated cardiac channelopathies. *Methods Mol.Biol.* 337:167-183.
- Lu, Z., Klem, A. M., & Ramu, Y. (2002). Coupling between voltage sensors and activation gate in voltage-gated K⁺ channels. *J.Gen.Physiol.* 120:663-676.
- Ludwig, A., Zong, X., Stieber, J., Hullin, R., Hofmann, F., & Biel, M. (1999). Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *EMBO J.* 18:2323-2329.
- Lundquist, A. L., Manderfield, L. J., Vanoye, C. G., Rogers, C. S., Donahue, B. S., Chang, P. A., Drinkwater, D. C., Murray, K. T., & George, A. L., Jr. (2005). Expression of multiple KCNE genes in human heart may enable variable modulation of I(Ks). *J.Mol.Cell Cardiol.* 38:277-287.
- Ma, L., Lin, C., Teng, S., Chai, Y., Bahring, R., Vardanyan, V., Li, L., Pongs, O., & Hui, R. (2003). Characterization of a novel Long QT syndrome mutation G52R-KCNE1 in a Chinese family. *Cardiovasc.Res.* 59:612-619.
- Main, M. C., Bryant, S. M., & Hart, G. (1998). Regional differences in action potential characteristics and membrane currents of guinea-pig left ventricular myocytes. *Exp.Physiol.* 83:747-761.
- Makita, N., Bennett, P. B., Jr., & George, A. L., Jr. (1994). Voltage-gated Na⁺ channel beta 1 subunit mRNA expressed in adult human skeletal muscle, heart, and brain is encoded by a single gene. *J.Biol.Chem.* 269:7571-7578.
- Makkar, R. R., Fromm, B. S., Steinman, R. T., Meissner, M. D., & Lehmann, M. H. (1993). Female gender as a risk factor for torsades de pointes associated with cardiovascular drugs. *JAMA.* 270:2590-2597.
- Maltsev, V. A., Sabbah, H. N., Higgins, R. S., Silverman, N., Lesch, M., & Undrovinas, A. I. (1998). Novel, ultraslow inactivating sodium current in human ventricular cardiomyocytes. *Circulation.* 98:2545-2552.
- Marban, E. (2002). Cardiac channelopathies. *Nature.* 415:213-218.

- Marionneau, C., Couette, B., Liu, J., Li, H., Mangoni, M. E., Nargeot, J., Lei, M., Escande, D., & Demolombe, S. (2005). Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart. *J. Physiol.* 562:223-234.
- Marx, S. O., Kurokawa, J., Reiken, S., Motoike, H., D'Armiento, J., Marks, A. R., & Kass, R. S. (2002). Requirement of a macromolecular signaling complex for beta adrenergic receptor modulation of the KCNQ1-KCNE1 potassium channel. *Science.* 295:496-499.
- Matsumoto, Y., Ogura, T., Uemura, H., Saito, T., Masuda, Y., & Nakaya, H. (1999). Histamine H1-receptor-mediated modulation of the delayed rectifier K⁺ current in guinea-pig atrial cells: opposite effects on IKs and IKr. *Br.J.Pharmacol.* 128:1545-1553.
- Mazhari, R., Nuss, H. B., Aroundas, A. A., Winslow, R. L., & Marban, E. (2002). Ectopic expression of KCNE3 accelerates cardiac repolarization and abbreviates the QT interval. *J.Clin.Invest.* 109:1083-1090.
- Medeiros-Domingo, A., Kaku, T., Tester, D. J., Iturralde-Torres, P., Itty, A., Ye, B., Valdivia, C., Ueda, K., Canizales-Quinteros, S., Tusie-Luna, M. T., Makielski, J. C., & Ackerman, M. J. (2007). SCN4B-encoded sodium channel beta4 subunit in congenital long-QT syndrome. *Circulation.* 116:134-142.
- Melman, Y. F., Domenech, A., de la, L. S., & McDonald, T. V. (2001). Structural determinants of KvLQT1 control by the KCNE family of proteins. *J.Biol.Chem.* 276:6439-6444.
- Melman, Y. F., Krumerman, A., & McDonald, T. V. (2002a). A single transmembrane site in the KCNE-encoded proteins controls the specificity of KvLQT1 channel gating. *J.Biol.Chem.* 277:25187-25194.
- Melman, Y. F., Krummerman, A., & McDonald, T. V. (2002b). KCNE regulation of KvLQT1 channels: structure-function correlates. *Trends Cardiovasc.Med.* 12:182-187.
- Melman, Y. F., Um, S. Y., Krumerman, A., Kagan, A., & McDonald, T. V. (2004). KCNE1 binds to the KCNQ1 pore to regulate potassium channel activity. *Neuron.* 42:927-937.
- Mery, P. F., Lohmann, S. M., Walter, U., & Fischmeister, R. (1991). Ca²⁺ current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88:1197-1201.
- Migliaccio, A., Castoria, G., Di Domenico, M., de Falco, A., Bilancio, A., Lombardi, M., Barone, M. V., Ametrano, D., Zannini, M. S., Abbondanza, C., & Auricchio, F. (2000). Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-*Src* complex triggers prostate cancer cell proliferation. *EMBO J.* 19:5406-5417.
- Mitcheson, J. S. & Hancox, J. C. (1999). An investigation of the role played by the E-4031-sensitive (rapid delayed rectifier) potassium current in isolated rabbit atrioventricular nodal and ventricular myocytes. *Pflugers Arch.* 438:843-850.

- Miura, Y. & Inui, J. (1984). Multiple effects of alpha-adrenoceptor stimulation on the action potential of the rabbit atrium. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 325:47-53.
- Mohler, P. J., Schott, J. J., Gramolini, A. O., Dilly, K. W., Guatimosim, S., duBell, W. H., Song, L. S., Haurogne, K., Kyndt, F., Ali, M. E., Rogers, T. B., Lederer, W. J., Escande, D., Le Marec, H., & Bennett, V. (2003). Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature.* 421:634-639.
- Moller, C. & Netzer, R. (2006). Effects of estradiol on cardiac ion channel currents. *Eur.J.Pharmacol.* 532:44-49.
- Morin, T. J. & Kobertz, W. R. (2007). A derivatized scorpion toxin reveals the functional output of heteromeric KCNQ1-KCNE K⁺ channel complexes. *ACS Chem.Biol.* 2:469-473.
- Moroni, A., Gorza, L., Beltrame, M., Gravante, B., Vaccari, T., Bianchi, M. E., Altomare, C., Longhi, R., Heurteaux, C., Vitadello, M., Malgaroli, A., & DiFrancesco, D. (2001). Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 1 is a molecular determinant of the cardiac pacemaker current I_f. *J.Biol.Chem.* 276:29233-29241.
- Moss, A. J., Schwartz, P. J., Crampton, R. S., Tzivoni, D., Locati, E. H., MacCluer, J., Hall, W. J., Weitkamp, L., Vincent, G. M., Garson, A., Jr., & . (1991). The long QT syndrome. Prospective longitudinal study of 328 families. *Circulation.* 84:1136-1144.
- Moss, A. J., Zareba, W., Benhorin, J., Locati, E. H., Hall, W. J., Robinson, J. L., Schwartz, P. J., Towbin, J. A., Vincent, G. M., & Lehmann, M. H. (1995). ECG T-wave patterns in genetically distinct forms of the hereditary long QT syndrome. *Circulation.* 92:2929-2934.
- Moss, A. J., Zareba, W., Hall, W. J., Schwartz, P. J., Crampton, R. S., Benhorin, J., Vincent, G. M., Locati, E. H., Priori, S. G., Napolitano, C., Medina, A., Zhang, L., Robinson, J. L., Timothy, K., Towbin, J. A., & Andrews, M. L. (2000). Effectiveness and limitations of beta-blocker therapy in congenital long-QT syndrome. *Circulation.* 101:616-623.
- Munk, A. A., Adjemian, R. A., Zhao, J., Ogbaghebriel, A., & Shrier, A. (1996). Electrophysiological properties of morphologically distinct cells isolated from the rabbit atrioventricular node. *J.Physiol.* 493 (Pt 3):801-818.
- Murai, T., Kakizuka, A., Takumi, T., Ohkubo, H., & Nakanishi, S. (1989). Molecular cloning and sequence analysis of human genomic DNA encoding a novel membrane protein which exhibits a slowly activating potassium channel activity. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 161:176-181.
- Nabauer, M., Beuckelmann, D. J., Uberfuhr, P., & Steinbeck, G. (1996). Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle. *Circulation.* 93:168-177.

Nair, L. A., Inglese, J., Stoffel, R., Koch, W. J., Lefkowitz, R. J., Kwatra, M. M., & Grant, A. O. (1995). Cardiac muscarinic potassium channel activity is attenuated by inhibitors of G beta gamma. *Circ.Res.* 76:832-838.

Nakajo, K. & Kubo, Y. (2007). KCNE1 and KCNE3 Stabilize and/or Slow Voltage Sensing S4 Segment of KCNQ1 Channel. *J.Gen.Physiol.* 130:269-281.

Napolitano, C., Priori, S. G., Schwartz, P. J., Bloise, R., Ronchetti, E., Nastoli, J., Bottelli, G., Cerrone, M., & Leonardi, S. (2005). Genetic testing in the long QT syndrome: development and validation of an efficient approach to genotyping in clinical practice. *JAMA.* 294:2975-2980.

Nattel, S. (1995). Newer developments in the management of atrial fibrillation. *Am.Heart J.* 130:1094-1106.

Nattel, S., Matthews, C., De Blasio, E., Han, W., Li, D., & Yue, L. (2000). Dose-dependence of 4-aminopyridine plasma concentrations and electrophysiological effects in dogs : potential relevance to ionic mechanisms in vivo. *Circulation.* 101:1179-1184.

Nattel, S. (2002). New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature.* 415:219-226.

Nelson, W. J. (1991). Cytoskeleton functions in membrane traffic in polarized epithelial cells. *Semin.Cell Biol.* 2:375-385.

Neyroud, N., Tesson, F., Denjoy, I., Leibovici, M., Donger, C., Barhanin, J., Faure, S., Gary, F., Coumel, P., Petit, C., Schwartz, K., & Guicheney, P. (1997). A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nat.Genet.* 15:186-189.

Nicolas, M., Dememes, D., Martin, A., Kupersmidt, S., & Barhanin, J. (2001). KCNQ1/KCNE1 potassium channels in mammalian vestibular dark cells. *Hear.Res.* 153:132-145.

O'Mahony, F., Alzamora, R., Betts, V., LaPaix, F., Carter, D., Irnaten, M., & Harvey, B. J. (2007). Female gender-specific inhibition of KCNQ1 channels and chloride secretion by 17beta-estradiol in rat distal colonic crypts. *J.Biol.Chem.* 282:24563-24573.

Ohno, S., Zankov, D. P., Yoshida, H., Tsuji, K., Makiyama, T., Itoh, H., Akao, M., Hancox, J. C., Kita, T., & Horie, M. (2007). N- and C-terminal KCNE1 mutations cause distinct phenotypes of long QT syndrome. *Heart Rhythm.* 4:332-340.

Olson, T. M., Alekseev, A. E., Liu, X. K., Park, S., Zingman, L. V., Bienengraeber, M., Sattiraju, S., Ballew, J. D., Jahangir, A., & Terzic, A. (2006). Kv1.5 channelopathy due to KCNA5 loss-of-function mutation causes human atrial fibrillation. *Hum.Mol.Genet.* 15:2185-2191.

Ono, K., Shibata, S., & Iijima, T. (2000). Properties of the delayed rectifier potassium current in porcine sino-atrial node cells. *J.Physiol (Lond).* 524:51-62.

Ono, K. & Iijima, T. (2005). Pathophysiological significance of T-type Ca²⁺ channels: properties and functional roles of T-type Ca²⁺ channels in cardiac pacemaking. *J.Pharmacol.Sci.* 99:197-204.

Panaghie, G. & Abbott, G. W. (2007). The role of S4 charges in voltage-dependent and voltage-independent KCNQ1 potassium channel complexes. *J.Gen.Physiol.* 129:121-133.

Panaghie, G., Tai, K. K., & Abbott, G. W. (2006). Interaction of KCNE subunits with the KCNQ1 K⁺ channel pore. *J.Physiol.* 570:455-467.

Park, K. H., Piron, J., Dahimene, S., Merot, J., Baro, I., Escande, D., & Lousouarn, G. (2005). Impaired KCNQ1-KCNE1 and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate interaction underlies the long QT syndrome. *Circ.Res.* 96:730-739.

Pathak, M. M., Yarov-Yarovoy, V., Agarwal, G., Roux, B., Barth, P., Kohout, S., Tombola, F., & Isacoff, E. Y. (2007). Closing in on the resting state of the Shaker K(+) channel. *Neuron.* 56:124-140.

Pereon, Y., Demolombe, S., Baro, I., Drouin, E., Charpentier, F., & Escande, D. (2000). Differential expression of KvLQT1 isoforms across the human ventricular wall. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol.* 278:H1908-H1915.

Piippo, K., Swan, H., Pasternack, M., Chapman, H., Paavonen, K., Viitasalo, M., Toivonen, L., & Kontula, K. (2001). A founder mutation of the potassium channel KCNQ1 in long QT syndrome: implications for estimation of disease prevalence and molecular diagnostics. *J.Am.Coll.Cardiol.* 37:562-568.

Pinto, J. M., Sosunov, E. A., Gainullin, R. Z., Rosen, M. R., & Boyden, P. A. (1999). Effects of mibefradil, a T-type calcium current antagonist, on electrophysiology of Purkinje fibers that survived in the infarcted canine heart. *J.Cardiovasc.Electrophysiol.* 10:1224-1235.

Pongs, O., Kecskemethy, N., Muller, R., Krah-Jentgens, I., Baumann, A., Kiltz, H. H., Canal, I., Llamazares, S., & Ferrus, A. (1988). Shaker encodes a family of putative potassium channel proteins in the nervous system of *Drosophila*. *EMBO J.* 7:1087-1096.

Potet, F., Scott, J. D., Mohammad-Panah, R., Escande, D., & Baro, I. (2001). AKAP proteins anchor cAMP-dependent protein kinase to KvLQT1/IsK channel complex. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol.* 280:H2038-H2045.

Priori, S. G., Schwartz, P. J., Napolitano, C., Bianchi, L., Dennis, A., De Fusco, M., Brown, A. M., & Casari, G. (1998). A recessive variant of the Romano-Ward long-QT syndrome? *Circulation.* 97:2420-2425.

Priori, S. G., Pandit, S. V., Rivolta, I., Berenfeld, O., Ronchetti, E., Dhamoon, A., Napolitano, C., Anumonwo, J., di Barletta, M. R., Gudapakkam, S., Bosi, G., Stramba-Badiale, M., & Jalife, J. (2005). A novel form of short QT syndrome (SQT3) is caused by a mutation in the KCNJ2 gene. *Circ.Res.* 96:800-807.

Pusch, M., Bertorello, L., & Conti, F. (2000). Gating and flickery block differentially affected by rubidium in homomeric KCNQ1 and heteromeric KCNQ1/KCNE1 potassium channels. *Biophys.J.* 78:211-226.

Rees, S. A., Vandenberg, J. I., Wright, A. R., Yoshida, A., & Powell, T. (1995). Cell swelling has differential effects on the rapid and slow components of delayed rectifier potassium current in guinea pig cardiac myocytes. *J.Gen.Physiol.* 106:1151-1170.

Reeves, J. P. (1998). Na⁺/Ca²⁺ exchange and cellular Ca²⁺ homeostasis. *J.Bioenerg.Biomembr.* 30:151-160.

Rocheleau, J. M., Gage, S. D., & Kobertz, W. R. (2006). Secondary structure of a KCNE cytoplasmic domain. *J.Gen.Physiol.* 128:721-729.

Romey, G., Attali, B., Chouabe, C., Abitbol, I., Guillemare, E., Barhanin, J., & Lazdunski, M. (1997). Molecular mechanism and functional significance of the Mink control of the KvLQT1 channel activity. *J.Biol.Chem.* 272:16713-16716.

Rosati, B., Pan, Z., Lypen, S., Wang, H. S., Cohen, I., Dixon, J. E., & McKinnon, D. (2001). Regulation of KChIP2 potassium channel beta subunit gene expression underlies the gradient of transient outward current in canine and human ventricle. *J.Physiol.* 533:119-125.

Rougier, J. S., van Bemmelen, M. X., Bruce, M. C., Jespersen, T., Gavillet, B., Apotheloz, F., Cordonier, S., Staub, O., Rotin, D., & Abriel, H. (2005). Molecular determinants of voltage-gated sodium channel regulation by the Nedd4/Nedd4-like proteins. *Am.J.Physiol Cell Physiol.* 288:C692-C701.

Rozec, B. & Gauthier, C. (2006). beta3-adrenoceptors in the cardiovascular system: putative roles in human pathologies. *Pharmacol.Ther.* 111:652-673.

Sakai, R., Hagiwara, N., Matsuda, N., Kassanuki, H., & Hosoda, S. (1996). Sodium--potassium pump current in rabbit sino-atrial node cells. *J.Physiol.* 490 (Pt 1):51-62.

Sakmann, B. F., Spindler, A. J., Bryant, S. M., Linz, K. W., & Noble, D. (2000). Distribution of a persistent sodium current across the ventricular wall in guinea pigs. *Circ.Res.* 87:910-914.

Salata, J. J., Jurkiewicz, N. K., Jow, B., Folander, K., Guinasso, P. J., Jr., Raynor, B., Swanson, R., & Fermini, B. (1996). IK of rabbit ventricle is composed of two currents: evidence for IKs. *Am.J.Physiol.* 271:H2477-H2489.

Sanguinetti, M. C. & Jurkiewicz, N. K. (1990). Two components of cardiac delayed rectifier K⁺ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J.Gen.Physiol.* 96:195-215.

Sanguinetti, M. C., Jiang, C., Curran, M. E., & Keating, M. T. (1995). A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. *Cell.* 81:299-307.

Sanguinetti, M. C., Curran, M. E., Zou, A., Shen, J., Spector, P. S., Atkinson, D. L., & Keating, M. T. (1996). Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature*. 384:80-83.

Sato, N., Tanaka, H., Habuchi, Y., & Giles, W. R. (2000). Electrophysiological effects of ibutilide on the delayed rectifier K(+) current in rabbit sinoatrial and atrioventricular node cells. *Eur.J.Pharmacol.* 404:281-288.

Saucerman, J. J., Healy, S. N., Belik, M. E., Puglisi, J. L., & McCulloch, A. D. (2004). Proarrhythmic consequences of a KCNQ1 AKAP-binding domain mutation: computational models of whole cells and heterogeneous tissue. *Circ.Res.* 95:1216-1224.

Schechtman, D. & Mochly-Rosen, D. (2001). Adaptor proteins in protein kinase C-mediated signal transduction. *Oncogene*. 20:6339-6347.

Schimpf, R., Wolpert, C., Gaita, F., Giustetto, C., & Borggrefe, M. (2005). Short QT syndrome. *Cardiovasc.Res.* 67:357-366.

Schmitt, N., Schwarz, M., Peretz, A., Abitbol, I., Attali, B., & Pongs, O. (2000). A recessive C-terminal Jervell and Lange-Nielsen mutation of the KCNQ1 channel impairs subunit assembly. *EMBO J.* 19:332-340.

Schram, G., Pourrier, M., Melnyk, P., & Nattel, S. (2002). Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. *Circ.Res.* 90:939-950.

Schroeder, B. C., Waldegger, S., Fehr, S., Bleich, M., Warth, R., Greger, R., & Jentsch, T. J. (2000). A constitutively open potassium channel formed by KCNQ1 and KCNE3. *Nature*. 403:196-199.

Schwake, M., Jentsch, T. J., & Friedrich, T. (2003). A carboxy-terminal domain determines the subunit specificity of KCNQ K⁺ channel assembly. *EMBO Rep.* 4:76-81.

Schwartz, P. J., Locati, E. H., Moss, A. J., Crampton, R. S., Trazzi, R., & Ruberti, U. (1991). Left cardiac sympathetic denervation in the therapy of congenital long QT syndrome. A worldwide report. *Circulation*. 84:503-511.

Schwartz, P. J., Moss, A. J., Vincent, G. M., & Crampton, R. S. (1993). Diagnostic criteria for the long QT syndrome. An update. *Circulation*. 88:782-784.

Seebohm, G., Strutz-Seebohm, N., Birkin, R., Dell, G., Bucci, C., Spinosa, M. R., Baltaev, R., Mack, A. F., Korniyuchuk, G., Choudhury, A., Marks, D., Pagano, R. E., Attali, B., Pfeufer, A., Kass, R. S., Sanguinetti, M. C., Tavare, J. M., & Lang, F. (2007). Regulation of endocytic recycling of KCNQ1/KCNE1 potassium channels. *Circ.Res.* 100:686-692.

Sesti, F. & Goldstein, S. A. (1998). Single-channel characteristics of wild-type IKs channels and channels formed with two minK mutants that cause long QT syndrome. *J.Gen.Physiol.* 112:651-663.

Shamgar, L., Ma, L., Schmitt, N., Haitin, Y., Peretz, A., Wiener, R., Hirsch, J., Pongs, O., & Attali, B. (2006). Calmodulin is essential for cardiac IKs channel gating and assembly: impaired function in long-QT mutations. *Circ.Res.* 98:1055-1063.

Shi, W., Wymore, R., Yu, H., Wu, J., Wymore, R. T., Pan, Z., Robinson, R. B., Dixon, J. E., McKinnon, D., & Cohen, I. S. (1999). Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues. *Circ.Res.* 85:e1-e6.

Shimizu, K., Shintani, Y., Ding, W. G., Matsuura, H., & Bamba, T. (2002). Potentiation of slow component of delayed rectifier K(+) current by cGMP via two distinct mechanisms: inhibition of phosphodiesterase 3 and activation of protein kinase G. *Br.J.Pharmacol.* 137:127-137.

Shimizu, W. & Antzelevitch, C. (1998a). Cellular basis for the ECG features of the LQT1 form of the long-QT syndrome: effects of beta-adrenergic agonists and antagonists and sodium channel blockers on transmural dispersion of repolarization and torsade de pointes. *Circulation.* 98:2314-2322.

Shimizu, W., Kurita, T., Matsuo, K., Suyama, K., Aihara, N., Kamakura, S., Towbin, J. A., & Shimomura, K. (1998b). Improvement of repolarization abnormalities by a K+ channel opener in the LQT1 form of congenital long-QT syndrome. *Circulation.* 97:1581-1588.

Shyng, S. L., Cukras, C. A., Harwood, J., & Nichols, C. G. (2000). Structural determinants of PIP(2) regulation of inward rectifier K(ATP) channels. *J.Gen.Physiol.* 116:599-608.

Sicouri, S. & Antzelevitch, C. (1991). A subpopulation of cells with unique electrophysiological properties in the deep subepicardium of the canine ventricle. The M cell. *Circ.Res.* 68:1729-1741.

Snyders, D. J., Tamkun, M. M., & Bennett, P. B. (1993). A rapidly activating and slowly inactivating potassium channel cloned from human heart. Functional analysis after stable mammalian cell culture expression. *J.Gen.Physiol.* 101:513-543.

Splawski, I., Tristani-Firouzi, M., Lehmann, M. H., Sanguinetti, M. C., & Keating, M. T. (1997). Mutations in the hminK gene cause long QT syndrome and suppress IKs function. *Nat.Genet.* 17:338-340.

Splawski, I., Shen, J., Timothy, K. W., Lehmann, M. H., Priori, S., Robinson, J. L., Moss, A. J., Schwartz, P. J., Towbin, J. A., Vincent, G. M., & Keating, M. T. (2000). Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation.* 102:1178-1185.

Staub, O., Dho, S., Henry, P., Correa, J., Ishikawa, T., McGlade, J., & Rotin, D. (1996). WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na+ channel deleted in Liddle's syndrome. *EMBO J.* 15:2371-2380.

Stefan, E., Wiesner, B., Baillie, G. S., Mollajew, R., Henn, V., Lorenz, D., Furkert, J., Santamaria, K., Nedvetsky, P., Hundsrucker, C., Beyermann, M., Krause, E., Pohl, P., Gall, I., MacIntyre, A. N., Bachmann, S., Houslay, M. D., Rosenthal, W., & Klussmann, E. (2007). Compartmentalization of cAMP-dependent signaling by phosphodiesterase-4D is involved in the regulation of vasopressin-mediated water reabsorption in renal principal cells. *J.Am.Soc.Nephrol.* 18:199-212.

Stevens, E. B., Cox, P. J., Shah, B. S., Dixon, A. K., Richardson, P. J., Pinnock, R. D., & Lee, K. (2001). Tissue distribution and functional expression of the human voltage-gated sodium channel beta3 subunit. *Pflugers Arch.* 441:481-488.

Suzuki, A., Bosnjak, Z. J., & Kwok, W. M. (2003). The effects of isoflurane on the cardiac slowly activating delayed-rectifier potassium channel in Guinea pig ventricular myocytes. *Anesth.Analg.* 96:1308-15, table.

Szentadrassy, N., Banyasz, T., Biro, T., Szabo, G., Toth, B. I., Magyar, J., Lazar, J., Varro, A., Kovacs, L., & Nanasi, P. P. (2005). Apico-basal inhomogeneity in distribution of ion channels in canine and human ventricular myocardium. *Cardiovasc.Res.* 65:851-860.

Taggart, N. W., Haglund, C. M., Tester, D. J., & Ackerman, M. J. (2007). Diagnostic miscues in congenital long-QT syndrome. *Circulation.* 115:2613-2620.

Tai, K. K. & Goldstein, S. A. (1998). The conduction pore of a cardiac potassium channel. *Nature.* 391:605-608.

Takumi, T., Moriyoshi, K., Aramori, I., Ishii, T., Oiki, S., Okada, Y., Ohkubo, H., & Nakanishi, S. (1991). Alteration of channel activities and gating by mutations of slow ISK potassium channel. *J.Biol.Chem.* 266:22192-22198.

Tapper, A. R. & George, A. L., Jr. (2001). Location and orientation of minK within the I(Ks) potassium channel complex. *J.Biol.Chem.* 276:38249-38254.

Tempel, B. L., Papazian, D. M., Schwarz, T. L., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (1987). Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of *Drosophila*. *Science.* 237:770-775.

Terrell, J., Shih, S., Dunn, R., & Hicke, L. (1998). A function for monoubiquitination in the internalization of a G protein-coupled receptor. *Mol.Cell.* 1:193-202.

Terzic, A., Puceat, M., Vassort, G., & Vogel, S. M. (1993). Cardiac alpha 1-adrenoceptors: an overview. *Pharmacol.Rev.* 45:147-175.

Thimmapaya, R., Neelands, T., Niforatos, W., Davis-Taber, R. A., Choi, W., Putman, C. B., Kroeger, P. E., Packer, J., Gopalakrishnan, M., Faltynek, C. R., Surowy, C. S., & Scott, V. E. (2005). Distribution and functional characterization of human Nav1.3 splice variants. *Eur.J.Neurosci.* 22:1-9.

Thomas, D., Wimmer, A. B., Karle, C. A., Licka, M., Alter, M., Khalil, M., Ulmer, H. E., Kathofer, S., Kiehn, J., Katus, H. A., Schoels, W., Koenen, M., & Zehelein, J. (2005). Dominant-negative I(Ks) suppression by KCNQ1-deltaF339 potassium channels linked to Romano-Ward syndrome. *Cardiovasc.Res.* 67:487-497.

- Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., & Pickart, C. M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* 19:94-102.
- Tinel, N., Diochot, S., Borsotto, M., Lazdunski, M., & Barhanin, J. (2000). KCNE2 confers background current characteristics to the cardiac KCNQ1 potassium channel. *EMBO J.* 19:6326-6330.
- Tohse, N., Kameyama, M., & Irisawa, H. (1987). Intracellular Ca²⁺ and protein kinase C modulate K⁺ current in guinea pig heart cells. *Am.J.Physiol.* 253:H1321-H1324.
- Tousson, A., Fuller, C. M., & Benos, D. J. (1996). Apical recruitment of CFTR in T-84 cells is dependent on cAMP and microtubules but not Ca²⁺ or microfilaments. *J.Cell Sci.* 109 (Pt 6):1325-1334.
- Toyoda, F., Ueyama, H., Ding, W. G., & Matsuura, H. (2006). Modulation of functional properties of KCNQ1 channel by association of KCNE1 and KCNE2. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 344:814-820.
- Tristani-Firouzi, M. & Sanguinetti, M. C. (1998). Voltage-dependent inactivation of the human K⁺ channel KvLQT1 is eliminated by association with minimal K⁺ channel (minK) subunits. *J.Physiol.* 510 (Pt 1):37-45.
- Tseng, G. N. & Boyden, P. A. (1989a). Multiple types of Ca²⁺ currents in single canine Purkinje cells. *Circ.Res.* 65:1735-1750.
- Tseng, G. N. & Hoffman, B. F. (1989b). Two components of transient outward current in canine ventricular myocytes. *Circ.Res.* 64:633-647.
- Tyers, M. & Jorgensen, P. (2000). Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 10:54-64.
- Uese, K., Hagiwara, N., Miyawaki, T., & Kasanuki, H. (1999). Properties of the transient outward current in rabbit sino-atrial node cells. *J.Mol.Cell Cardiol.* 31:1975-1984.
- van Bemmelen, M. X., Rougier, J. S., Gavillet, B., Apotheloz, F., Daidie, D., Tateyama, M., Rivolta, I., Thomas, M. A., Kass, R. S., Staub, O., & Abriel, H. (2004). Cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5 is regulated by Nedd4-2 mediated ubiquitination. *Circ.Res.* 95:284-291.
- Vandenberg, C. A. (1987). Inward rectification of a potassium channel in cardiac ventricular cells depends on internal magnesium ions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 84:2560-2564.
- Varnum, M. D., Busch, A. E., Bond, C. T., Maylie, J., & Adelman, J. P. (1993). The min K channel underlies the cardiac potassium current I_{Ks} and mediates species-specific responses to protein kinase C. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90:11528-11532.
- Varro, A., Nanasi, P. P., & Lathrop, D. A. (1993). Potassium currents in isolated human atrial and ventricular cardiocytes. *Acta Physiol Scand.* 149:133-142.

- Vassalle, M., Yu, H., & Cohen, I. S. (1995). The pacemaker current in cardiac Purkinje myocytes. *J.Gen.Physiol.* 106:559-578.
- Vassort, G., Talavera, K., & Alvarez, J. L. (2006). Role of T-type Ca²⁺ channels in the heart. *Cell Calcium.* 40:205-220.
- Vatta, M., Ackerman, M. J., Ye, B., Makielski, J. C., Ughanze, E. E., Taylor, E. W., Tester, D. J., Balijepalli, R. C., Foell, J. D., Li, Z., Kamp, T. J., & Towbin, J. A. (2006). Mutant caveolin-3 induces persistent late sodium current and is associated with long-QT syndrome. *Circulation.* 114:2104-2112.
- Vincent, G. M., Timothy, K., & Zhang, L. (2002). Congenital Long QT syndrome. *Card Electrophysiol.Rev.* 6:57-60.
- Viskin, S. (2000). Cardiac pacing in the long QT syndrome: review of available data and practical recommendations. *J.Cardiovasc.Electrophysiol.* 11:593-600.
- Walsh, K. B. & Kass, R. S. (1988). Regulation of a heart potassium channel by protein kinase A and C. *Science.* 242:67-69.
- Wang, H., Yang, B., Zhang, Y., Han, H., Wang, J., Shi, H., & Wang, Z. (2001). Different subtypes of alpha1-adrenoceptor modulate different K⁺ currents via different signaling pathways in canine ventricular myocytes. *J.Biol.Chem.* 276:40811-40816.
- Wang, K. W., Tai, K. K., & Goldstein, S. A. (1996). MinK residues line a potassium channel pore. *Neuron.* 16:571-577.
- Wang, W., Xia, J., & Kass, R. S. (1998). MinK-KvLQT1 fusion proteins, evidence for multiple stoichiometries of the assembled IsK channel. *J.Biol.Chem.* 273:34069-34074.
- Wang, Z., Fermini, B., & Nattel, S. (1993). Sustained depolarization-induced outward current in human atrial myocytes. Evidence for a novel delayed rectifier K⁺ current similar to Kv1.5 cloned channel currents. *Circ.Res.* 73:1061-1076.
- Wang, Z., Mitsuiye, T., & Noma, A. (1996). Cell distension-induced increase of the delayed rectifier K⁺ current in guinea pig ventricular myocytes. *Circ.Res.* 78:466-474.
- Ward, O. C. (1964). A new familial cardiac syndrome in children. *J.Ir.Med.Assoc.* 54:103-106.
- Washizuka, T., Horie, M., Watanuki, M., & Sasayama, S. (1997). Endothelin-1 inhibits the slow component of cardiac delayed rectifier K⁺ currents via a pertussis toxin-sensitive mechanism. *Circ.Res.* 81:211-218.
- Watanabe, E., Yasui, K., Kamiya, K., Yamaguchi, T., Sakuma, I., Honjo, H., Ozaki, Y., Morimoto, S., Hishida, H., & Kodama, I. (2007). Upregulation of KCNE1 induces QT interval prolongation in patients with chronic heart failure. *Circ.J.* 71:471-478.

Weber, W. M., Cuppens, H., Cassiman, J. J., Clauss, W., & Van Driessche, W. (1999). Capacitance measurements reveal different pathways for the activation of CFTR. *Pflugers Arch.* 438:561-569.

Wehrens, X. H., Vos, M. A., Doevendans, P. A., & Wellens, H. J. (2002). Novel insights in the congenital long QT syndrome. *Ann.Intern.Med.* 137:981-992.

Westenskow, P., Splawski, I., Timothy, K. W., Keating, M. T., & Sanguinetti, M. C. (2004). Compound mutations: a common cause of severe long-QT syndrome. *Circulation.* 109:1834-1841.

Wettwer, E., Amos, G. J., Posival, H., & Ravens, U. (1994). Transient outward current in human ventricular myocytes of subepicardial and subendocardial origin. *Circ.Res.* 75:473-482.

Wickman, K. D., Iniguez-Lluhl, J. A., Davenport, P. A., Taussig, R., Krapivinsky, G. B., Linder, M. E., Gilman, A. G., & Clapham, D. E. (1994). Recombinant G-protein beta gamma-subunits activate the muscarinic-gated atrial potassium channel. *Nature.* 368:255-257.

Wu, D. M., Jiang, M., Zhang, M., Liu, X. S., Korolkova, Y. V., & Tseng, G. N. (2006). KCNE2 is colocalized with KCNQ1 and KCNE1 in cardiac myocytes and may function as a negative modulator of I(Ks) current amplitude in the heart. *Heart Rhythm.* 3:1469-1480.

Wu, J., Schuessler, R. B., Rodefeld, M. D., Saffitz, J. E., & Boineau, J. P. (2001). Morphological and membrane characteristics of spider and spindle cells isolated from rabbit sinus node. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol.* 280:H1232-H1240.

Xia, M., Jin, Q., Bendahhou, S., He, Y., Larroque, M. M., Chen, Y., Zhou, Q., Yang, Y., Liu, Y., Liu, B., Zhu, Q., Zhou, Y., Lin, J., Liang, B., Li, L., Dong, X., Pan, Z., Wang, R., Wan, H., Qiu, W., Xu, W., Eurlings, P., Barhanin, J., & Chen, Y. (2005). A Kir2.1 gain-of-function mutation underlies familial atrial fibrillation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 332:1012-1019.

Xiao, G. Q., Mochly-Rosen, D., & Boutjdir, M. (2003). PKC isozyme selective regulation of cloned human cardiac delayed slow rectifier K current. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 306:1019-1025.

Xiao, R. P., Ji, X., & Lakatta, E. G. (1995). Functional coupling of the beta 2-adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes. *Mol.Pharmacol.* 47:322-329.

Xu, H., Guo, W., & Nerbonne, J. M. (1999). Four kinetically distinct depolarization-activated K⁺ currents in adult mouse ventricular myocytes. *J.Gen.Physiol.* 113:661-678.

Yamashita, F., Horie, M., Kubota, T., Yoshida, H., Yumoto, Y., Kobori, A., Ninomiya, T., Kono, Y., Haruna, T., Tsuji, K., Washizuka, T., Takano, M., Otani, H., Sasayama, S., & Aizawa, Y. (2001). Characterization and subcellular localization of KCNQ1 with a heterozygous mutation in the C terminus. *J.Mol.Cell Cardiol.* 33:197-207.

Yang, T., Kanki, H., & Roden, D. M. (2003). Phosphorylation of the IKs channel complex inhibits drug block: novel mechanism underlying variable antiarrhythmic drug actions. *Circulation*. 108:132-134.

Yang, W. P., Levesque, P. C., Little, W. A., Conder, M. L., Shalaby, F. Y., & Blannar, M. A. (1997). KvLQT1, a voltage-gated potassium channel responsible for human cardiac arrhythmias. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94:4017-4021.

Yang, Y. & Sigworth, F. J. (1998). Single-channel properties of IKs potassium channels. *J.Gen.Physiol.* 112:665-678.

Yang, Y., Xia, M., Jin, Q., Bendahhou, S., Shi, J., Chen, Y., Liang, B., Lin, J., Liu, Y., Liu, B., Zhou, Q., Zhang, D., Wang, R., Ma, N., Su, X., Niu, K., Pei, Y., Xu, W., Chen, Z., Wan, H., Cui, J., Barhanin, J., & Chen, Y. (2004). Identification of a KCNE2 gain-of-function mutation in patients with familial atrial fibrillation. *Am.J.Hum.Genet.* 75:899-905.

Yen, P. M. (2001). Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev.* 81:1097-1142.

Yoshimoto, K., Hattori, Y., Houzen, H., Kanno, M., & Yasuda, K. (1998). Histamine H1-receptor-mediated increase in the Ca²⁺ transient without a change in the Ca²⁺ current in electrically stimulated guinea-pig atrial myocytes. *Br.J.Pharmacol.* 124:1744-1750.

Yue, L., Feng, J., Gaspo, R., Li, G. R., Wang, Z., & Nattel, S. (1997). Ionic remodeling underlying action potential changes in a canine model of atrial fibrillation. *Circ.Res.* 81:512-525.

Yus-Najera, E., Santana-Castro, I., & Villarroel, A. (2002). The identification and characterization of a noncontinuous calmodulin-binding site in noninactivating voltage-dependent KCNQ potassium channels. *J.Biol.Chem.* 277:28545-28553.

Zankov, D. P., Omatsu-Kanbe, M., Isono, T., Toyoda, F., Ding, W. G., Matsuura, H., & Horie, M. (2006). Angiotensin II potentiates the slow component of delayed rectifier K⁺ current via the AT1 receptor in guinea pig atrial myocytes. *Circulation*. 113:1278-1286.

Zareba, W. (2006). Genotype-specific ECG patterns in long QT syndrome. *J.Electrocardiol.* 39:S101-S106.

Zeng, Z., Tan, C., Teng, S., Chen, J., Su, S., Zhou, X., Wang, F., Zhang, S., Gu, D., Makielski, J. C., & Pu, J. (2007). The single nucleotide polymorphisms of I(Ks) potassium channel genes and their association with atrial fibrillation in a Chinese population. *Cardiology*. 108:97-103.

Zhang, L., Timothy, K. W., Vincent, G. M., Lehmann, M. H., Fox, J., Giuli, L. C., Shen, J., Splawski, I., Priori, S. G., Compton, S. J., Yanowitz, F., Benhorin, J., Moss, A. J., Schwartz, P. J., Robinson, J. L., Wang, Q., Zareba, W., Keating, M. T., Towbin, J. A., Napolitano, C., & Medina, A. (2000). Spectrum of ST-T-wave patterns and repolarization parameters in congenital long-QT syndrome: ECG findings identify genotypes. *Circulation*. 102:2849-2855.

Zhang, Z. J., Jurkiewicz, N. K., Folander, K., Lazarides, E., Salata, J. J., & Swanson, R. (1994). K⁺ currents expressed from the guinea pig cardiac IsK protein are enhanced by activators of protein kinase C. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91:1766-1770.

Zhou, J., Yi, J., Hu, N., George, A. L., Jr., & Murray, K. T. (2000). Activation of protein kinase A modulates trafficking of the human cardiac sodium channel in *Xenopus* oocytes. *Circ.Res.* 87:33-38.

Zhou, J., Shin, H. G., Yi, J., Shen, W., Williams, C. P., & Murray, K. T. (2002). Phosphorylation and putative ER retention signals are required for protein kinase A-mediated potentiation of cardiac sodium current. *Circ.Res.* 91:540-546.

Zhou, R., Patel, S. V., & Snyder, P. M. (2007). Nedd4-2 catalyzes ubiquitination and degradation of cell surface ENaC. *J.Biol.Chem.* 282:20207-20212.

Zygmunt, A. C., Eddlestone, G. T., Thomas, G. P., Nesterenko, V. V., & Antzelevitch, C. (2001). Larger late sodium conductance in M cells contributes to electrical heterogeneity in canine ventricle. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol.* 281:H689-H697.

ARTICLE ET REVUE EN PREPARATION

16 Description moléculaire des cardiopathies liées à KCNE1/KCNQ1

Chapitre pour le livre intitulé « Ion Channels Biophysics and Diseases », publié par Research Signpost. Sortie prévue en 2008.

17 Le PIP₂ est impliqué dans l'osmorégulation du complexe KCNQ1-KCNE1

Article en préparation

Identification de nouveaux partenaire du canal potassique cardiaque KCNQ1

Le courant potassique I_{Ks} généré par le canal KCNQ1 intervient dans la repolarisation tardive du potentiel d'action cardiaque. KCNQ1 fonctionne au sein d'un complexe canalaire et des mutations sur le canal ou sa protéine régulatrice KCNE1 peut aboutir à des pathologies cardiaques potentiellement létales. La relation génotype-phénotype liée aux mutations de ce canal reste complexe puisqu'un gain de fonction de celui-ci peut aboutir à différentes pathologies. Cette différence peut s'expliquer par une interaction modifiée avec l'un des partenaires, motivant l'identification de l'ensemble des protéines appartenant au complexe canalaire de KCNQ1. Dans cette thèse, deux nouveaux partenaires de ce canal ont pu être caractérisés : la β -tubuline, monomère des microtubules, et l'ubiquitine-ligase Nedd4-2. Les effets induits par ces nouvelles protéines sur le courant I_{Ks} ont été évalués dans des systèmes de ré-expression et des cardiomyocytes de cobayes. Le courant I_{Ks} est augmenté sous stimulation β -adrénergique par activation de la PKA. Nous montrons que les microtubules interagissent avec le canal et jouent un rôle crucial dans la réponse du courant à une stimulation de la PKA. La protéine Nedd4-2 intervient dans la dégradation des protéines par le protéasome. Nous montrons que cette protéine interagit avec KCNQ1 et conduit à sa dégradation et à la diminution du courant I_{Ks} . La transfection de cardiomyocytes de cobayes, *in vivo*, avec les plasmides codant pour les formes active ou inactive de Nedd4-2 nous a permis de valider ces effets sur le courant dans un système natif. Ces données illustrent la multiplicité des protéines régulant le canal dans divers compartiments cellulaires.

Mots Clés : KCNQ1, Régulation, tubuline, Nedd4-2, cardiomyocytes, pathologies cardiaques, pathologies héréditaires.

IDENTIFICATION OF NEW PARTNERS OF THE CARDIAC POTASSIUM CHANNEL KCNQ1

The I_{Ks} potassium current, induced by KCNQ1 channel, is involved in the late repolarisation phase of the cardiac action potential. KCNQ1 is part of a channel complex and mutations in this channel or its regulatory protein KCNE1 can lead to cardiac pathologies and sudden death. The genotype-phenotype relationship linked to KCNQ1 mutations is complicated to understand since, for example, a gain-of-function mutation can lead to different pathologies. This difference could be explained by a modified interaction with one of the KCNQ1 partners, motivating the identification of all the proteins involved in KCNQ1 channel complex. In this work, two new KCNQ1 partners have been identified: β -tubuline, a monomer of microtubules, and the ubiquitin-protein ligase Nedd4-2. The effects of these proteins on I_{Ks} current have been evaluated in heterologous expression systems and guinea pig cardiac myocytes. The I_{Ks} current is up-regulated by β -adrenergic stimulation, through PKA activation. We show that microtubules interact with the channel and play a role in the current response to PKA stimulation. Nedd4-2 is involved in protein degradation by the proteasome. We show that this protein interacts with KCNQ1 and leads to its degradation and current decrease. By transfecting guinea pig cardiac myocytes, in vivo, with plasmids coding for the active or inactive forms of the Nedd4-2 protein, we could validate these effects on I_{Ks} current in a native model. These data illustrate the diversity of proteins able to regulate the channel in various cell compartments.

Keywords : KCNQ1, Regulation, tubuline, Nedd4-2, cardiac myocytes, cardiac pathologies, hereditary diseases.