

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DE MÉDECINE ET TECHNIQUES MÉDICALES

**Dégradation du canal KCNQ1 dans le syndrome du QT long.
Nouveaux partenaires des canaux KCNQ1 et SCN5A.**

THÈSE DE DOCTORAT

École doctorale : CHIMIE-BIOLOGIE

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée et soutenue publiquement par

David PEROZ

le 17 octobre 2008, devant le jury ci-dessous

Président : **Mme Patricia LEMARCHAND**, Professeur des Universités,
INSERM U915, Université de Nantes, Nantes

Rapporteurs : **M Stéphane HATEM**, Directeur de Recherche,
INSERM U621, Faculté de Médecine de la Pitié-Salpêtrière, Paris
Mme Catherine BERRIER, Maître de conférence, IBBMC,
Université Paris Sud XI, Université de Cergy Pontoise, Orsay

Examineur : **M Alexandre MEZGHRANI**, Chargé de Recherche,
Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier

Directeur de thèse : **Jean MEROT**, Directeur de Recherche, INSERM U915, Nantes

TABLE DES MATIÈRES.

Remerciements.....	2
Index des tableaux.....	6
Index des figures.....	7
Liste des abréviations.....	8
Introduction.....	9
I.Physiologie cardiaque et troubles du rythme.....	10
A.Fonctionnement du coeur.....	10
1.Le cycle cardiaque et les voies de conduction.....	10
2.Le rythme cardiaque.....	11
B.Cardiomyocytes, canaux ioniques et potentiel d'action.....	12
1.Les cardiomyocytes.....	12
2.Les canaux ioniques et le potentiel d'action cardiaque.....	12
a.Les canaux ioniques.....	12
b.Le potentiel d'action cardiaque.....	14
3.Canaux ioniques et troubles du rythme cardiaque. Notion de canalopathies.....	14
C.Le syndrome du QT long.....	16
1.Une cause de mort subite qui nécessite un diagnostic précoce.....	16
2.Diversité génétique des LQTS.....	18
3.Une pathologie à pénétrance incomplète.....	19
4.Comment les mutations de KCNQ1 et SCN5A provoquent-elles un LQTS?.....	21
5.Prise en charge des patients atteints de LQTS.....	22
II.Les canaux KCNQ1 et SCN5A.....	23
A.Le canal ionique KCNQ1 (KVLQT1 ou KV7.1).....	23
1.De la description du syndrome du QT long à l'identification du gène KCNQ1.....	23
2.Structure et partenaires du canal KCNQ1.....	24
a.Relation structure fonction.....	24
b.Régulation par des protéines partenaires.....	25
3.Fonctions du canal KCNQ1.....	30
a.Cardiaques.....	30
b.Autres fonctions.....	33
B.Le canal ionique SCN5A.....	34
1.Structure et fonctions.....	34
2.Partenaires de SCN5A.....	35
III.Synthèse et dégradation des canaux ioniques : perspectives thérapeutiques.....	39
A.Naissance d'un canal ionique.....	39
1.Translocation et intégration dans la bicouche lipidique membranaire.....	39
a.Adressage des canaux vers le réticulum endoplasmique.....	39
b.Topogénèse.....	40
2.Tétramérisation des canaux KV.....	42
3.Contrôle qualité dans le RE : les protéines chaperonnes et la N-glycosylation.....	43
4.Le contrôle qualité après la sortie du RE.....	47
5.Association de KCNQ1 et KCNE1. Effets « chaperonne » des sous-unités β	47
B.Dégradation des canaux ioniques.....	49
1.Notions d'UPR et d'ERAD.....	49
a.L'UPR : définition et activation.....	49
b.L'ERAD ou la dégradation des protéines du réticulum endoplasmique.....	52
2.L'ERAD-1 : dégradation des protéines par le système ubiquitine protéasome.....	54
a.La retrotranslocation ou comment les protéines quittent le RE pour être dégradées.....	54
b.Le système ubiquitine protéasome.....	59

3. Les alternatives à la voie de l'ubiquitine protéasome au cours de l'ERAD.....	61
a. Dégradation cytosolique, indépendante du protéasome.....	61
b. Dégradation via le lysosome (ERAD-II).....	61
c. Dégradation dépendante d'une sérine protéase.....	62
d. Dégradation dans le RE et GTP dépendante.....	63
C. Le contrôle qualité des protéines et pathologies.....	63
1. Les maladies conformationnelles.....	63
2. La mucoviscidose : un modèle de canalopathie due à un défaut de trafic.....	64
3. Syndromes du QT long dus à des défauts de trafic.....	66
a. LQT2.....	66
b. LQT1.....	67
4. Perspectives thérapeutiques : le « trafficking rescue ».....	68
PARTIE 1 :	71
Étude de la dégradation du canal KCNQ1 dans le syndrome du QT long.....	71
Introduction.....	73
Résultats : premier article.....	75
Biosynthèse de KCNQ1 et syndrome du QT long.....	75
Résultats complémentaires.....	101
I. L'UPR n'est pas activée par le mutant Y111C.....	101
II. Le mutant Y111C s'associe avec KCNE1.....	104
III. La mutation Y111c ne provoque pas l'agrégation de KCNQ1 dans des complexes insolubles dans le Triton®X-100.....	106
Discussion - Conclusions.....	109
Matériels et méthodes.....	114
I. biologie moléculaire.....	114
A. Plasmides.....	114
B. siRNA anti-Derlin-1.....	114
II. Culture cellulaire.....	115
A. HEK293FT.....	115
B. T84.....	115
III. Transfection.....	115
A. Par vecteur chimique : Fugène6.....	115
B. Par électroporation : Système Amaxa.....	116
IV. Biochimie.....	116
A. Extractions de protéines.....	116
1. Extraction hypotonique.....	116
2. Extraction pour immunoprécipitation.....	116
B. Dosage de protéines.....	117
C. Immunoprécipitation.....	117
D. Western blot.....	118
E. Pulse-chase.....	119
1. Principe.....	119
2. Réalisation.....	119
V. analyse d'images et calcul de la demi-vie.....	120
VI. analyse statistique.....	120
PARTIE 2 :	121
Identification de nouveaux partenaires des canaux KCNQ1 et SCN5A.....	121
Introduction.....	123
I. Mettre en évidence des interactions protéine-protéine.....	126
A. Techniques de criblages.....	127
1. Techniques biochimiques : purification par affinité.....	127
a. Le pull-down.....	127
b. Autres approches biochimiques.....	132

c.Interactions faibles et « cross-linking ».....	133
2.Le double hybride « split-ubiquitin ».....	134
B.Techniques de validation.....	136
1.Validation in vivo.....	136
2.Validation in vitro.....	137
Résultats 1 : deuxième article.....	141
14-3-3 un nouveau partenaire du canal SCN5A.....	141
Discussion complémentaire - SCN5A et 14-3-3.....	151
Résultats 2 : recherche de partenaires des KCNE et KCNQ1.....	153
I.Approche « pull-down ».....	153
A.Stratégies et appâts utilisés.....	153
B.Partenaires potentiels isolés.....	157
II.Approche « split-ubiquitin ».....	161
Conclusions.....	164
Matériels et méthodes.....	165
I.biologie moléculaire.....	165
A.Clonage.....	165
1.Stratégie de clonage.....	165
2.Réalisation.....	165
II.Préparation des lysats d'organe.....	166
III.Expression des protéines de fusion.....	166
IV.Le pull-down.....	167
V.Électrophorèse 2D IEF-PAGE.....	168
A.Première dimension.....	168
B.Deuxième dimension.....	168
VI.Coloration à l'argent compatible MS.....	169
VII.Identification des partenaires par spectrométrie de masse.....	169
Annexes.....	170
A.Compléments de bibliographie.....	171
1.Autres troubles du rythme cardiaque liés à KCNQ1 et SCN5A.....	171
a.Le syndrome du QT court.....	171
b.La fibrillation auriculaire.....	171
c.Autres canalopathies liées à SCN5A.....	173
2.Causes de mortalité en France.....	174
B.Protocoles détaillés.....	175
1.Protocoles de production des appâts GST dans les bactéries BL-21.....	175
2.Protocole d'électrophorèse 2D.....	177
3.Protocole de coloration à l'argent compatible MS.....	179
4.Protocole de préparation des échantillons MS.....	181
5.Protocole de pulse-chase.....	183
C.Article revue : KV7.1 (KCNQ1) properties and channelopathies.....	187
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	194

INDEX DES TABLEAUX.

Tableau I. Classification des syndromes du QT long congénitaux et correspondance noms de gènes HUGO, autres noms utilisés et nom de syndrome.	18
Tableau II. Correspondance des noms des protéines de l'ERAD chez les mammifères et les levures (d'après (Nakatsukasa & Brodsky, 2008)).	53
Tableau III: Techniques disponibles pour mettre en évidence des interactions protéine-protéine.	139
Tableau IV. Partenaires isolés par pull-down pour KCNE3 et KCNE4.	158

INDEX DES FIGURES.

Figure 1. Représentation schématique d'une coupe de coeur faisant apparaître les voies de conceptions électriques en vert.....	10
Figure 2. Représentation schématique des ondes visibles sur la tracé d'un ECG de surface..	11
Figure 3. Cardiomyocyte isolé à partir d'un coeur de rat adulte.....	12
Figure 4. Principaux canaux présents dans un cardiomyocyte.....	13
Figure 5. Les courants ioniques responsables des phases du potentiel d'action dans un myocyte ventriculaire humain.....	15
Figure 6. ECG avec torsade de pointe chez un patient avec un LQTS.....	16
Figure 7. L'aspect de l'ECG est différent selon le sous-type de QT long.....	17
Figure 8. Arbre généalogique d'une famille LQT1 illustrant la faible pénétrance.....	20
Figure 9. Topologie de la protéine KCNQ1 et des protéines KCNE.....	24
Figure 10. Aspect du courant KCNQ1 exprimé seul ou avec les protéines KCNE1, 2, 3, 4 et 5 dans des cellules COS-7.....	26
Figure 11. KCNQ1 :structure primaire et secondaire. Ses protéines partenaires et leurs zones d'association.....	32
Figure 12. Représentation schématique du canal SCN5A et des zones d'interaction avec ses partenaires.....	38
Figure 13. Mise en place de la topologie du canal KAT1.....	41
Figure 14. La partie C-terminale de KCNQ1 : zone de tétramérisation et de fixation de la calmoduline.....	42
Figure 15. Structure de la chaine d'oligosaccharides ajoutée dans le RE sur les protéines glycosylées.....	44
Figure 16. Le cycle des lectines.....	45
Figure 17. Les trois voies de l'activation de l'UPR dans les cellules de mammifères.....	50
Figure 18. Les différentes ERAD : ERAD-M, ERAD-L, ERAD-C chez la levure.....	51
Figure 19. Les étapes de la polyubiquitination des protéines en vue de leur dégradation par le protéasome.....	56
Figure 20. Modèle d'interaction Derlin-1 VIMP et p97 lors de la rétrotranslocation de la chaine lourde du CMH-1.....	58
Figure 21. Structure du protéasome.....	60
Figure 22. L'UPR n'est pas activée par la mutation Y111C.....	103
Figure 23. Le mutant Y111C s'associe avec KCNE1.....	104
Figure 24. Protocole de fractionnement cellulaire.....	106
Figure 25. Solubilités dans le Triton®X-100 comparées pour KCNQ1 WT et Y111C.....	107
Figure 26. Les étapes du pull-down.....	128
Figure 27. La spectrométrie de masse quantitative.....	130
Figure 28. Le TAP : Tandem Affinity Purification.....	133
Figure 29. Le double hybride « split-ubiquitin ».....	135
Figure 30. Contrôle de la qualité des appâts GST.....	154
Figure 31. Contrôle du chargement des colonnes avec les appâts GST-TEV-KCNE1 et GST-TEV-KCNE4.....	155
Figure 32. Contrôle de la digestion des appâts par la TEV.....	156
Figure 33. Pull-downs GST KCNE3 et KCNE4.....	157
Figure 34. Pull-downs réalisés avec les appâts GST-TEV sur des extraits protéiques d'encéphales de souris.....	160
Figure 35. Résultats de la recherche de partenaire de KCNQ1 par double hybride « split-ubiquitin ».....	162

LISTE DES ABRÉVIATIONS.

AMPc : Adénosine Monophosphate Cyclique
ATP : Adénosine Triphosphate
BSA : Bovine serum albumin
CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
CHIP : Carboxy Terminus of Hsp70 binding Protein
CNX : Calnexine
co-IP : co-Immuno-Précipitation
CRT : Calréticuline
Derlin-1 : Der1-like protein 1
DTT : Dithiothréitol
EDEM : ER degradation enhancing α -mannosidase-like
ERAD : ER Associated Degradation
FA : Fibrillation Auriculaire
hERG : human Ether-a-gogo Related Gene
JLN : Syndrome de Jervell et Lange-Nielsen
 K_r : Canal K⁺ inward rectifier (à rectification entrante)
 K_v : Canal K⁺ dépendant du potentiel
LQTS : Long QT Syndrome, syndrome du QT long
LQT : syndrome du QT long de type 1
MiRP : MinK Related Peptide
 Na_v : canal Na⁺ dépendant du potentiel
PA : Potentiel d'Action
PBS : Phosphate Buffer Saline
PKA : Protéine Kinase A
PKC : Protéine Kinase C
PMSF : Phényl Méthyl Sulfonyl Fluoride
RE : Réticulum Endoplasmique
RW : Syndrome de Romano et Ward
TBS-(T) : Tris-Buffered Saline (Tween-20)
WB : Western Blot

INTRODUCTION.

L'unité INSERM U915 (ex U533) dans laquelle a été effectué ce travail de thèse s'intéresse, entre autre, aux troubles du rythme cardiaque liés aux canaux ioniques. Ces troubles du rythme sont responsables de morts subites chez l'adulte, ce qui représente près de 40000 décès par an.

Afin que le lecteur puisse comprendre les enjeux de ce travail, l'introduction a été construite selon trois axes :

- la [première partie](#) de l'introduction donne quelques éléments de physiologie cardiaque et présente le trouble du rythme sur lequel nous avons travaillé : le syndrome du QT long (LQTS).
- La [deuxième partie](#) présente deux canaux ioniques impliqués dans le syndrome du QT long et que nous avons étudiés plus particulièrement : le canal potassique KCNQ1 et le canal sodique SCN5A.
- La [troisième partie](#) présente les mécanismes cellulaires qui interviennent dans la synthèse et dans la dégradation des protéines membranaires.

Le premier objectif de mon travail thèse était d'étudier la biodégradation de protéines KCNQ1 mutantes identifiées chez des patients souffrant d'un LQTS. Ce travail fait l'objet de la [première partie des résultats](#).

Le second objectif était de mettre en évidence de nouveaux partenaires protéiques des canaux KCNQ1 et SCN5A¹. Ce travail fait l'objet de la [deuxième partie des résultats](#). En introduction de cette deuxième partie sont présentées les techniques permettant la recherche d'interactions protéiques.

¹ KCNQ1 code pour la protéine appelée Kv7.1 et SCN5A pour Nav1.5. Afin de simplifier les termes employés, les noms des gènes (KCNQ1 et SCN5A) de la nomenclature HUGO seront employés par la suite pour décrire aussi bien la protéine que le gène.



I. PHYSIOLOGIE CARDIAQUE ET TROUBLES DU RYTHME.

A. Fonctionnement du coeur.

1. Le cycle cardiaque et les voies de conduction.

Le coeur est la pompe de l'appareil circulatoire. Ce muscle strié est constitué de quatre chambres (oreillettes droite et gauche, ventricules droit et gauche) séparées par des valves. Le sang non oxygéné arrive au coeur par l'oreillette droite, gagne le ventricule droit qui le propulse vers les poumons où il est hématisé. Puis, il revient au coeur par les veines pulmonaires et l'oreillette gauche. Il passe dans le ventricule gauche qui le propulse vers la circulation systémique *via* l'aorte et un nouveau cycle recommence. Le coeur a donc un fonctionnement cyclique qui repose sur des structures spécialisées dans la genèse et dans la conduction d'un signal électrique (onde

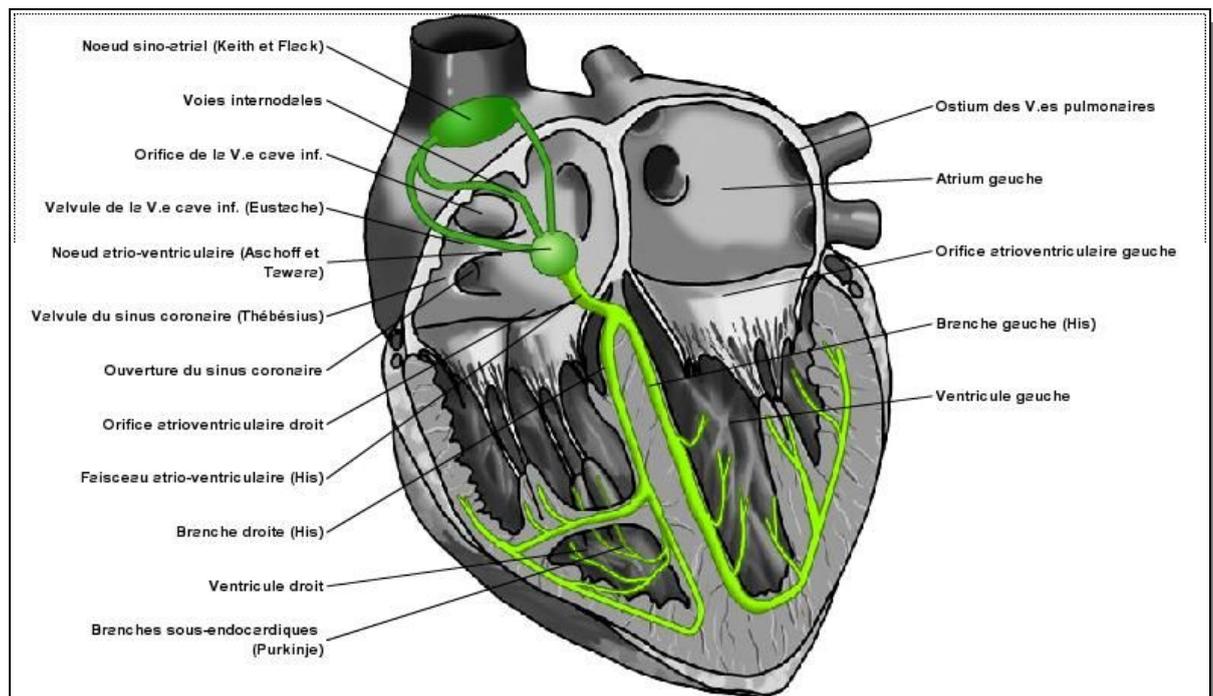


Figure 1. Représentation schématique d'une coupe de coeur faisant apparaître les voies de conduction électriques en vert.

Le noeud sino-atrial joue le rôle de pacemaker. Lorsque l'individu est au repos, il envoie 70 impulsions par minute, mais lors d'exercice physique le rythme peut monter à près de 200 battements par minute. L'impulsion balaie les oreillettes et passe aux ventricules via le noeud atrio-ventriculaire. Les branches du faisceau de His permettent une conduction rapide à tout le ventricule qui se contracte alors de façon coordonnée. D'après (E-anatomie website, 2008).

de dépolarisation) qui déclenche les contractions cardiaques : le noeud sino-atrial, le noeud atrio-ventriculaire et le faisceau de His (cf figure 1).

Sur le plan histologique, le coeur est constitué de cellules contractiles, les cardiomyocytes, et d'un tissu de soutien composé d'une matrice de collagène et de fibroblastes.

2. Le rythme cardiaque.

Le rythme cardiaque normal, encore appelé **rythme sinusal**, résulte de l'activité électrique spontanée du noeud sino-atrial. L'onde de dépolarisation qui naît dans le noeud sino-atrial, se propage aux oreillettes, au noeud atrio-ventriculaire puis à l'ensemble des ventricules *via* le faisceau de His. La dépolarisation de la membrane des cardiomyocytes déclenche leur contraction par un mécanisme appelé **couplage excitation contraction** (Bers, 2002). Le rythme cardiaque varie notamment selon l'âge et l'effort. Il est régulé par le système nerveux autonome.

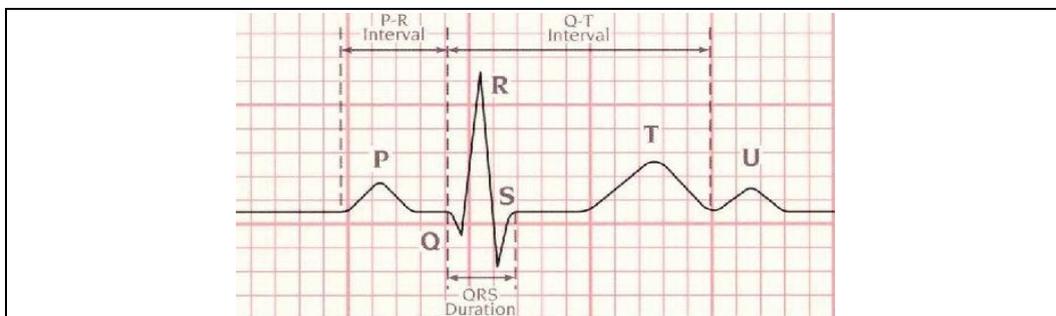


Figure 2. Représentation schématique des ondes visibles sur la tracé d'un ECG de surface.

L'onde P correspond à la dépolarisation des oreillettes, le complexe QRS à la dépolarisation des ventricules et l'onde T à la repolarisation des ventricules. L'onde U n'est pas toujours visible sur un ECG normal et son origine reste discutée (repolarisation des fibres de Purkinje ou des cellules M). L'intervalle QT est calculé entre le début de l'onde Q et la fin de l'onde T.

L'activité électrique cardiaque peut être visualisée de façon simple sur un tracé d'électrocardiogramme de surface (ECG) (cf figure 2). Les ondes visualisées sur ces tracés traduisent la direction dans laquelle se propage l'onde de dépolarisation.



L'onde P correspond à la dépolarisation des oreillettes, le complexe QRS à la dépolarisation des ventricules et l'onde T à la repolarisation des ventricules.

L'électrocardiogramme permet de repérer des anomalies du rythme cardiaque (ou troubles du rythme) et d'orienter le clinicien vers l'origine de ce trouble. Par exemple, l'allongement de l'intervalle QT évoque un trouble du rythme dénommé « **syndrome du QT long** ». Mon travail de thèse concernait cette pathologie qui sera présentée plus en détails par la suite.

B. Cardiomyocytes, canaux ioniques et potentiel d'action.

1. Les cardiomyocytes.

Les cardiomyocytes sont des cellules allongées, multinuclées (cf figure 3) qui assurent la conduction de l'onde électrique dépolarisante et la fonction contractile cardiaque. La capacité des cardiomyocytes à générer et à conduire l'onde de dépolarisation repose sur des protéines transmembranaires présentes à la surface de ces cellules : **les canaux ioniques.**

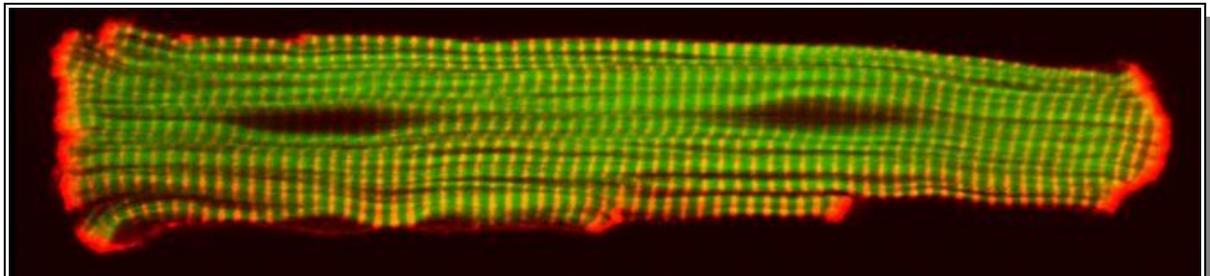


Figure 3. Cardiomyocyte isolé à partir d'un coeur de rat adulte.

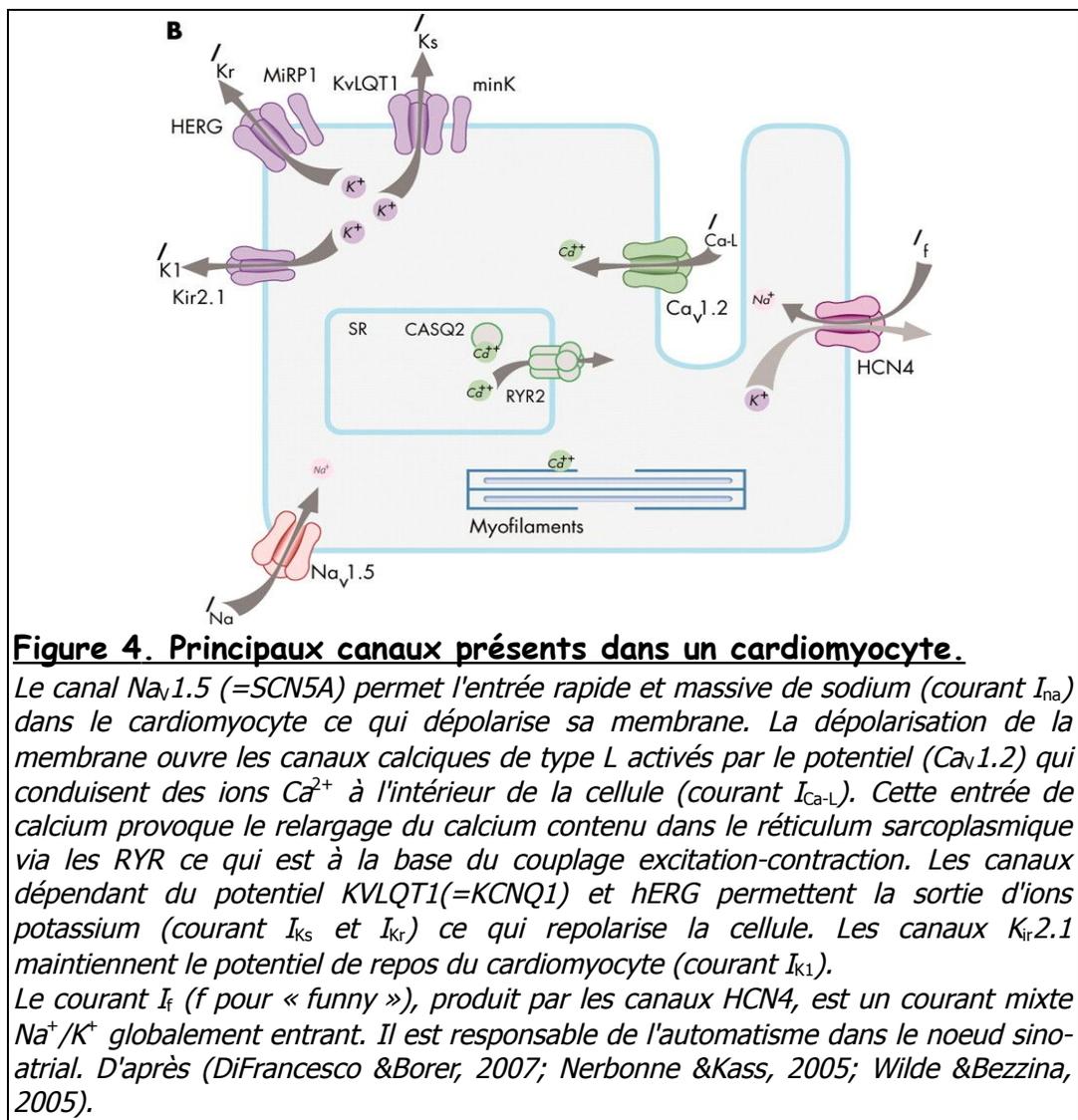
En vert, l'actine ; en rouge l' α -actinine. Les deux noyaux ne sont pas marqués et apparaissent noirs. D'après (Harvard website, 2008).

2. Les canaux ioniques et le potentiel d'action cardiaque.

a. Les canaux ioniques.

Les canaux ioniques sont des protéines transmembranaires qui contrôlent les

échanges d'ions entre les milieux extra et intra-cellulaires. Leur perméabilité est sélective pour différents ions (Cl^- , K^+ , Ca^{2+} , Na^+) (cf figure 4). Cette sélectivité dépend de la protéine qui forme le pore du canal. La protéine canal s'associe à d'autres protéines qui ont un rôle régulateur. Un canal ionique est donc un **complexe macromoléculaire** plutôt qu'une protéine isolée. Les canaux ioniques sont présents dans tous les types cellulaires. Leurs rôles sont particulièrement importants dans les cardiomyocytes mais aussi dans les neurones, les cellules épithéliales, les cellules sécrétrices et les cellules cancéreuses (Fiske et al., 2006).



L'activité électrique des canaux ioniques peut être étudiée par la technique de patch clamp soit sur des cardiomyocytes isolés, soit dans des systèmes de réexpression (lignées cellulaires ou oeufs de *Xénope*²). La réexpression permet d'étudier des mutations des canaux ou encore l'effet d'une autre protéine qui peut être sur-exprimée avec le canal d'intérêt.

b. Le potentiel d'action cardiaque.

Dans les cardiomyocytes, l'activité de ces canaux génère le **potentiel d'action cardiaque (PA)**. Ce dernier est constitué de quatre phases, chacune résultante de l'activité de différents canaux (cf figure 5) : la phase 0 ou phase de dépolarisation, la phase I ou phase de repolarisation transitoire, la phase II ou phase de plateau et la phase III ou phase de repolarisation. Dans les tissus non-automatiques, la phase IV correspond au potentiel de repos de la membrane de la cellule qui est maintenu à -80 mV par le courant I_{K1} (*Wilde & Bezzina, 2005*). Les canaux ioniques étant répartis de façon hétérogène dans les différentes parties du coeur, chacune a un potentiel d'action différent (*Nerbonne & Kass, 2005*).

Dans ce travail nous nous sommes intéressés aux canaux [KCNQ1](#) qui participent à la phase II et III et au canal [SCN5A](#) qui est responsable de la phase 0. Ils seront présentés plus en détail par la suite.

3. Canaux ioniques et troubles du rythme cardiaque. Notion de canalopathies.

Afin d'assurer la contraction du coeur, les cardiomyocytes se contractent de façon coordonnée. Si le fonctionnement des canaux ioniques est perturbé, les cardiomyocytes peuvent se contracter trop tôt, trop tard ou spontanément. L'activité cardiaque n'est alors plus régulière, on parle de **troubles du rythme**. Ils peuvent résulter d'anomalies structurelles du coeur (séquelles d'infarctus par exemple), être causés par des traitements ou être dus à des mutations sur des canaux ioniques et des protéines

2 *Xénope* : espèce de grenouille

partenaires de ces canaux. On parle dans ce cas de **canalopathie**. Le canal potassique KCNQ1 et le canal sodique SCN5A sont impliqués dans plusieurs canalopathies. Au cours de ma thèse, je me suis intéressé à ces deux canaux dans le cadre du **syndrome du QT long (LQTS)**, un trouble du rythme cardiaque responsable de **morts subites chez l'adulte**. (Pour les autres canalopathies dues à SCN5A et KCNQ1 voir [annexe](#)).

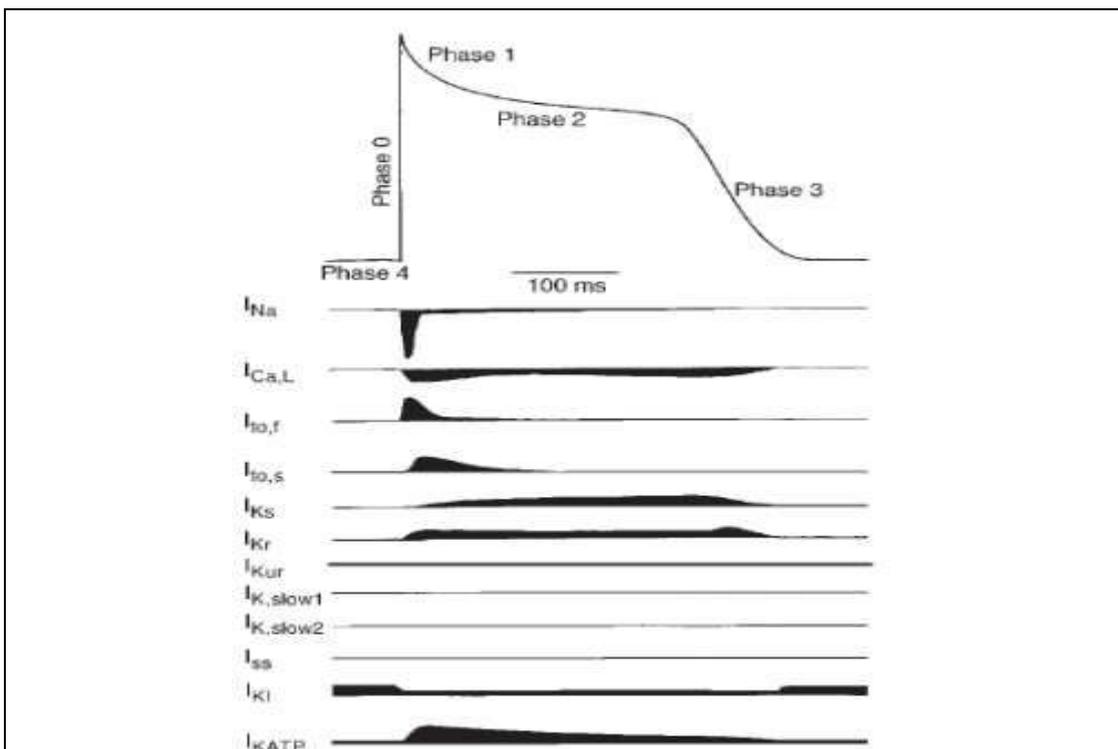


Figure 5. Les courants ioniques responsables des phases du potentiel d'action dans un myocyte ventriculaire humain.

Sur ce schéma, les courants dessinés vers le bas sont des courants entrants, ceux dessinés vers le haut sont des courants sortants. La phase 0 (dépolarisation) est due à une entrée massive de Na^+ . Le début de la phase 1 (repolarisation transitoire) est due à la fermeture des canaux SCN5A et à l'activation du courant potassique transitoire sortant I_{t0} (canaux $\text{Kv}4.2/\text{Kv}4.3$ pour $I_{t0,f}$ et $\text{Kv}1.4/\text{Kv}1.7$ pour $I_{t0,s}$). La phase 2 (plateau) est due à la compétition entre les courants potassiques sortants (dont I_{Ks} , I_{Kr}) et le courant calcique entrant $I_{Ca,L}$. En fin de phase 2, le courant $I_{Ca,L}$ s'éteint et les courants potassiques alors majoritaires repolarisent la cellule (phase 3). La phase 4 (potentiel de repos) est maintenue par le courant I_{K1} .

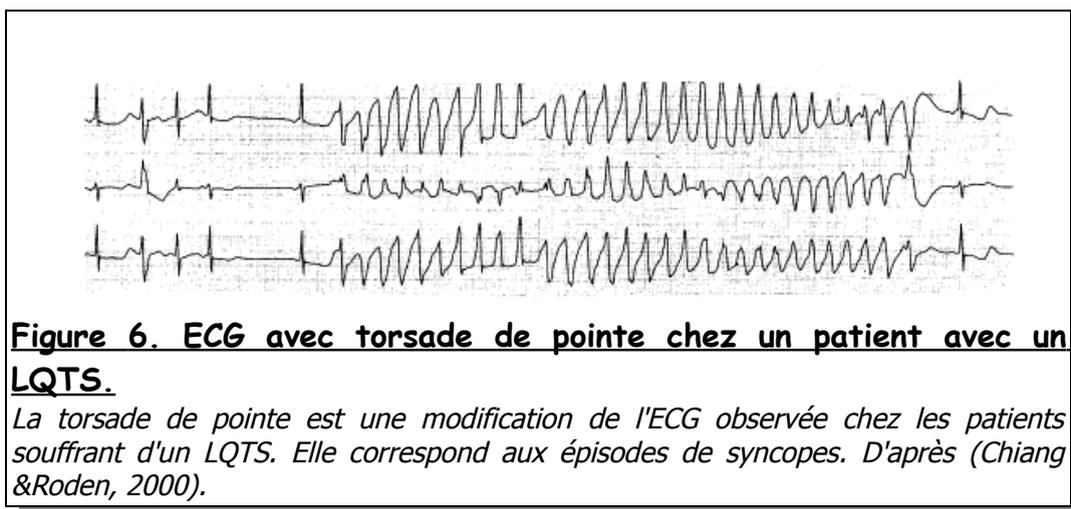
Selon la zone du ventricule à laquelle on s'intéresse, la durée du potentiel d'action ventriculaire varie de 200 ms dans l'épicarde à 450 ms dans l'endocarde (chez l'homme). Son amplitude est de l'ordre de 120 mV. D'après (Keating & Sanguinetti, 2001; Nerbonne & Kass, 2005).



C. Le syndrome du QT long.

1. Une cause de mort subite qui nécessite un diagnostic précoce.

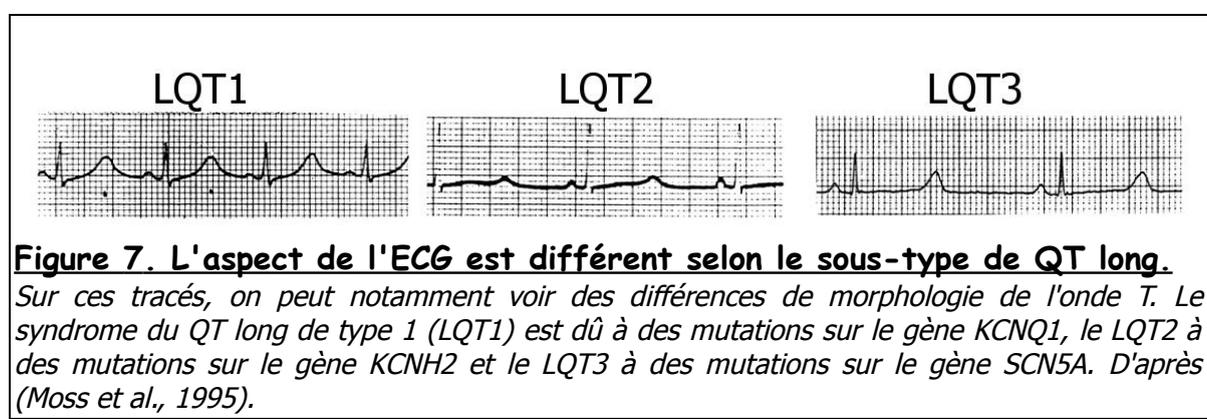
La première description du syndrome du QT long a été faite en 1957 par Jervell et Lange-Nielsen (*JERVELL & LANGE-NIELSEN, 1957*). Ils ont décrit une famille dans laquelle quatre enfants présentaient une surdité bilatérale, des syncopes et un allongement de l'intervalle QT sur l'ECG. De plus, trois membres de cette famille étaient morts subitement. Le syndrome du QT long est caractérisé par un allongement de l'intervalle QT_c³ (supérieur à 470 ms chez l'homme et 480 ms chez la femme) associé à des syncopes. L'allongement de l'intervalle QT peut évoluer vers des torsades de pointes (épisodes de syncopes) (cf figure 6) et une fibrillation ventriculaire entraînant **une mort subite** (*Roden, 2008*). Dans 30 à 40 % des cas, le premier symptôme est malheureusement la mort subite. Il est donc important de **dépister précocement** cette pathologie. En France, chaque année, près de 40000 personnes décèdent d'une mort subite ce qui représente 5 à 10 % du nombre total de décès annuels (*Cepidc website, 2008*) (voir [annexe](#) pour la répartition annuelle des décès en France).



3 QT_c: intervalle QT corrigé par la fréquence cardiaque.

Le syndrome du QT long est le plus souvent acquis, c'est à dire consécutif à une lésion cardiaque, un désordre métabolique ou à un traitement médicamenteux (Roden, 1998; Shah et al., 2005; Torsade.org website, 2008). Il existe également des formes familiales héréditaires, comme celle décrite par Jervell, c'est à dire des familles dans lesquelles plusieurs personnes sont malades indépendamment d'anomalies cardiaques ou de causes médicamenteuses. Le LQTS de type Jervell et Lange-Nielsen est transmis de façon autosomique récessive et les patients présentent toujours une surdité bilatérale. Cette forme récessive est très rare, de l'ordre de 1 pour 300000 naissances. Quelques années après Jervell et Lange-Nielsen, Romano et Ward ont tous deux décrit une autre forme familiale, transmise de façon autosomique dominante, qui porte leur nom (**syndrome de Romano et Ward (RW)**) et dans laquelle les patients n'ont pas de déficit auditif (Romano et al., 1963; Ward, 1964). La prévalence du syndrome de Romano et Ward est de 1/5000 ce qui en fait une maladie rare.

Ces formes familiales héréditaires ont permis de montrer que des mutations, sur des gènes codant pour des canaux ioniques, étaient responsables des troubles du rythme cardiaque. Les ECG enregistrés chez les patients ayant un LQTS ont des morphologies différentes ce qui traduit la diversité des canaux ioniques impliqués dans cette arythmie et peut orienter le clinicien vers le gène en cause (cf figure 7) (Kanters et al., 2004; Moss et al., 1995). En effet, comme nous allons le voir, de nombreux gènes sont impliqués dans le LQTS.



Enfin, de façon anecdotique, il a été rapporté un cas de LQTS dû à des auto anticorps dirigés contre le canal hERG (*Nakamura et al., 2007*).

2. Diversité génétique des LQTS.

On connaît aujourd'hui dix gènes dont des mutations peuvent provoquer un syndrome du QT long. Cette diversité génétique permet de classer les syndromes du QT long de LQT1 à LQT10 selon le gène muté. Le tableau I donne la liste de ces gènes avec le nom de la protéine correspondante et le syndrome dans lesquels ils sont impliqués.

Le LQT1 (gène KCNQ1) est la plus fréquente (50 % des cas) des formes familiales de syndrome de QT long (*Splawski et al., 2000; Tester et al., 2005*). Actuellement, 246 mutations ont été recensées sur le gène KCNQ1 chez des patients présentant un syndrome du QT long (*FSM website, 2008*). Viennent ensuite le LQT2 (gène KCNH2) (35 à 40 %) et LQT3 (gène SCN5A) (10 à 15%) ; les autres formes sont beaucoup plus rares (*FSM website, 2008*).

Tableau I. Classification des syndromes du QT long congénitaux et correspondance noms de gènes HUGO, autres noms utilisés et nom de syndrome.

Type	Gène (HUGO)	Autres noms	Syndrome ⁴
LQT1	KCNQ1	K _v 7.1 (KVLQT1)	RW,JLN
LQT2	KCNH2	K _v 11.1 (erg-1, hERG)	RW
LQT3	SCN5A	Na _v 1.5	RW
LQT4	ANK2	Ankyrine B	RW
LQT5	KCNE1	MinK, Isk	RW,JLN
LQT6	KCNE2	MiRP1	RW
LQT7	KCNJ2	K _{ir} 2.1	Andersen-Tawil
LQT8	CACNA1C	Ca _v 1.2	Timothy
LQT9	CAV3	Cavéoline 3	RW
LQT10	SCN4B	Na _v β4	RW

Il est intéressant de noter que tous les LQTS ne sont pas dus à des mutations

4 RW : syndrome de Romano et Ward; JLN : syndrome de Jervell et Lange-Nielsen

sur des gènes codant pour des canaux ioniques. En effet, des protéines partenaires de ces canaux (KCNE1 pour LQT5, KCNE2 pour LQT6) ou des protéines d'ancrage des canaux (ankyrine B pour LQT4) défectueuses peuvent également provoquer un syndrome du QT long. Ceci souligne **l'importance fonctionnelle des protéines partenaires** des canaux ioniques.

Les patients atteints de LQT7 (gène KCNJ2) et LQT8 (gène CACNA1c), aussi nommés syndrome d'Andersen et syndrome Timothy, présentent des désordres multi-systémiques en plus de l'allongement de l'intervalle QT.

Dans 30 à 50 % des cas, aucune mutation ne peut être trouvée chez les patients présentant un LQTS (*Shimizu, 2005; Tester et al., 2005*). Ceci peut s'expliquer par des mutations sur les gènes déjà connus mais non détectables par les techniques utilisées en routine, telles que des grands réarrangements, (*Carey-Anne Eddy et al., 2008; Koopmann et al., 2006*) ou des mutations dans les zones régulatrices non codantes (*Tester et al., 2006*). On peut aussi imaginer que d'autres gènes, encore inconnus dans le cadre du syndrome du QT long soient mutés. Ces gènes pourraient coder pour des protéines partenaires régulatrices des canaux ioniques KCNQ1 et SCN5A.

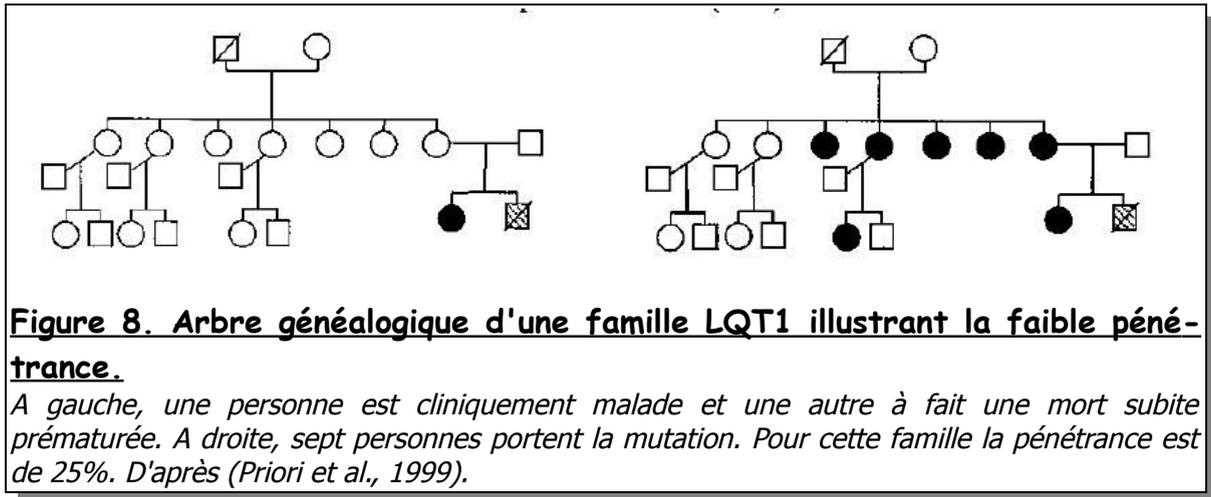
Perspectives : Mettre en évidence de nouveaux partenaires de KCNQ1 et SCN5A permettrait de pointer vers de nouveaux gènes candidats d'intérêt diagnostique. Ceci améliorerait le dépistage des personnes susceptibles de faire une mort subite.

3. Une pathologie à pénétrance incomplète.

Lorsqu'un syndrome du QT long est suspecté chez un patient, un diagnostic génétique est réalisé sur lui et parmi les membres de sa famille afin de pouvoir mettre en place un traitement préventif. On identifie alors d'autres membres de la famille porteurs de la même mutation que le patient mais qui eux ne présentent aucun symptôme ; on parle de **pénétrance incomplète** (*Priori et al., 1999*). La pénétrance varie d'une famille à l'autre et dépend des critères retenus pour le diagnostic clinique (notamment l'inclusion des morts précoces, antérieures à l'étude). Dans l'étude de



Priori et al., qui comporte neuf familles (LQT1 et LQT2), la pénétrance varie de 14 à 60 %. La figure 8 illustre la pénétrance dans une famille LQT1 tirée de cette étude. Dans cette famille, la pénétrance est de 25% c'est à dire que 25 % des porteurs de la mutation sont cliniquement malades.



Pourquoi la pénétrance n'est elle pas complète? Plusieurs hypothèses ont été proposées. La première repose sur la redondance des mécanismes de repolarisation. En effet, plusieurs canaux différents assurent la même fonction de repolarisation ; c'est ce que l'on nomme **réserve de repolarisation**. Cette réserve permettrait de pallier au déficit fonctionnel du gène muté (Roden & Yang, 2005). Une seconde hypothèse repose sur l'existence de polymorphismes protecteurs ou néfastes comme cela a été suggéré récemment par Schwartz et al. (Schwartz et al., 2008). Ces auteurs ont étudié une famille LQT1 (mutation A341V) et ont montré que le risque de devenir « cliniquement malade » était plus grand chez les porteurs de la mutation qui portaient également deux polymorphismes particuliers sur les gènes de récepteurs adrénergiques (ADRA2C et ADRB1). Cette notion de « polymorphisme protecteur » a été retrouvée dans le syndrome de Brugada⁵, une autre arythmie cardiaque (Poelzing et al., 2006). On peut donc supposer que de tels polymorphismes existent également

5 Trouble du rythme cardiaque présenté paragraphe [c page 177](#)

sur des partenaires de KCNQ1 et SCN5A, ce qui pourrait expliquer cette pénétrance incomplète (Millat et al., 2006).

Perspectives : mettre en évidence de nouveaux partenaires de KCNQ1 et SCN5A permettrait de rechercher ces polymorphismes, d'expliquer cette pénétrance incomplète et d'adapter les thérapies en fonction du risque inhérent aux différents polymorphismes.

4. Comment les mutations de KCNQ1 et SCN5A provoquent-elles un LQTS?

Les mutations des gènes KCNQ1 et KCNE1 responsables de LQTS entraînent une **perte de fonction**⁶ du canal qui conduit alors moins d'ions potassium à l'extérieur de la cellule. De ce fait, le courant I_{Ks} , qui permet la repolarisation de la cellule par la sortie de potassium, est plus faible et la phase de plateau du potentiel d'action dure plus longtemps. Les cardiomyocytes se repolarisent donc plus lentement ce qui se traduit par un retard de repolarisation des ventricules et donc par un allongement de l'intervalle QT sur l'ECG. Les mécanismes par lesquels les mutations du gène KCNQ1 provoquent une perte de fonction du canal sont multiples (Peroz et al., 2008) : défaut de trafic et d'expression du canal à la surface des cellules (Boulet et al., 2006; Dahimène et al., 2006; Kanki et al., 2004; Krumerman et al., 2004; Schmitt et al., 2007; Wilson et al., 2005; Yamashita et al., 2001), défaut de tétramérisation (Schmitt et al., 2000), défaut d'assemblage avec des protéines partenaires régulatrices (Chouabe et al., 2000; Marx et al., 2002) ou modification des propriétés biophysiques du canal (Boulet et al., 2007; Chouabe et al., 1997; Ikrar et al., 2008; Wollnik et al., 1997).

A l'inverse, les mutations sur le gène SCN5A provoquent **un gain de fonction**⁷ du canal. Ainsi, les canaux SCN5A mutés conduisent plus d'ions sodium à l'intérieur de la cellule qui est alors trop dépolarisée et mettra donc plus de temps à se repolariser.

6 **Mutation perte de fonction** : mutation qui donne une protéine avec une fonction inférieure à la protéine sauvage ou qui n'est plus fonctionnelle. Pour un canal, il peut s'agir, par exemple, d'une diminution de l'amplitude du courant ou d'une absence de courant.

7 **Mutation gain de fonction** : mutation qui donne une protéine avec une fonction supérieure à la protéine sauvage. Par exemple, pour un canal ionique, le canal mutant produira un courant dont la participation au potentiel d'action cardiaque sera plus importante que ne l'aurait été celle du canal sauvage. De façon simplifiée, le canal mutant peut produire un courant de plus grande amplitude que la protéine sauvage.



Cela se traduit par un allongement de la phase de plateau du PA et par un retard de repolarisation des ventricules (allongement de l'intervalle QT) (Bennett et al., 1995).

Objectifs : l'un des objectifs de mon travail de thèse était de caractériser le mécanisme cellulaire à l'origine de la perte de fonction de protéines mutantes KCNQ1 (Y111C, P117L et L114P) identifiées chez des patients LQT1.

5. Prise en charge des patients atteints de LQTS.

Des études épidémiologiques, faites sur des cohortes de patients souffrant de LQTS, ont mis en évidence des facteurs de risques différents selon la forme de LQTS (Herbert et al., 2002; Shimizu, 2005). Par exemple, l'événement déclencheur de « l'orage rythmique » est le plus fréquemment l'exercice (notamment la piscine) pour le LQT1 alors que pour le LQT3 la crise survient au repos. Pour le LQT2, il n'y a pas de différence repos/exercice, mais les événements surviennent fréquemment après un accouchement (Khositseth et al., 2004). Compte-tenu de cette stratification des facteurs de risque, une partie du traitement repose sur des mesures préventives. Par exemple, éviter la natation chez les patients LQT1 ou réaliser une surveillance cardiaque plus attentive lors d'accouchements chez les femmes LQT2 (Schwartz, 2006).

Le traitement médicamenteux est composé de β -bloquants ou d'inhibiteurs du canal sodique SCN5A. Dans les cas sévères, la pose d'un pacemaker ou d'un défibrillateur peut être nécessaire (Hall & Todd, 2006; Schwartz, 2006).

Perspectives : une meilleure connaissance du fonctionnement des canaux ioniques KCNQ1 et SCN5A, notamment la mise en évidence de nouveaux partenaires de ces canaux, pourrait permettre de mettre au point des nouveaux traitements agissant sur ces nouvelles cibles thérapeutiques.

II. LES CANAUX KCNQ1 ET SCN5A.

A. Le canal ionique KCNQ1 (KVLQT1 ou K_v7.1).

1. De la description du syndrome du QT long à l'identification du gène KCNQ1.

Le syndrome du QT long est connu depuis 1957 (*JERVELL & LANGE-NIELSEN, 1957*) mais il faudra attendre 1996, pour que Wang et al. identifient un gène responsable du syndrome du QT long sur le chromosome 11 (*Wang et al., 1996*). Ce gène code pour une protéine qui présente les caractéristiques d'un canal potassique voltage dépendant, il se localise dans le locus associé au LQT1 depuis les travaux de Keating et al. en 1991 (*Keating et al., 1991*) et des mutations de ce gène sont retrouvées chez des patients LQT1. K_v pour canal potassique voltage dépendant, LQT1 car associé au syndrome LQT1 : KVLQT1 tel sera son nom. La même année, il a été montré que le canal potassique KVLQT1 devait s'associer avec une autre protéine, nommée Mink, pour produire le courant I_{Ks} (*Barhanin et al., 1996; Sanguinetti et al., 1996*). Le gène KVLQT1 humain est maintenant nommé KCNQ1, il est localisé en 11p15.5 et il code pour une protéine nommée K_v7.1.

Pour la petite histoire, avant la découverte de KCNQ1, on pensait que le courant I_{Ks} était dû uniquement à MinK (Minimum K channel), une protéine à un segment transmembranaire, dont la structure était donc difficilement compatible avec la fonction de canal (*Takumi et al., 1988*). Cependant, lorsque MinK était transfecté dans des oocytes de Xénopes un courant semblable au courant I_{Ks} était enregistré. En revanche, dans les modèles de cellules eucaryotes, MinK n'était pas capable de produire un courant I_{Ks} (*Lesage et al., 1993*), sauf dans le modèle de cellules HEK (*Freeman & Kass, 1993*). Cette confusion tenait à l'expression de KCNQ1 endogène dans les oeufs de Xénopes et dans les cellules HEK. Ainsi, exprimer MinK dans ces modèles révélait le KCNQ1 endogène et non pas l'effet propre de MinK.



2. Structure et partenaires du canal KCNQ1.

a. Relation structure fonction.

La protéine KCNQ1 est composée de 676 acides aminés (75 kDa). Elle est ancrée dans la membrane plasmique par six segments transmembranaires (nommés de S1 à S6) et ses extrémités N-terminale et C-terminale sont en position intracytoplasmique (cf figure 9). Bien qu'un site de N-glycosylation soit prédit en N289⁸, cette modification post-traductionnelle n'est pas visible par western blot.

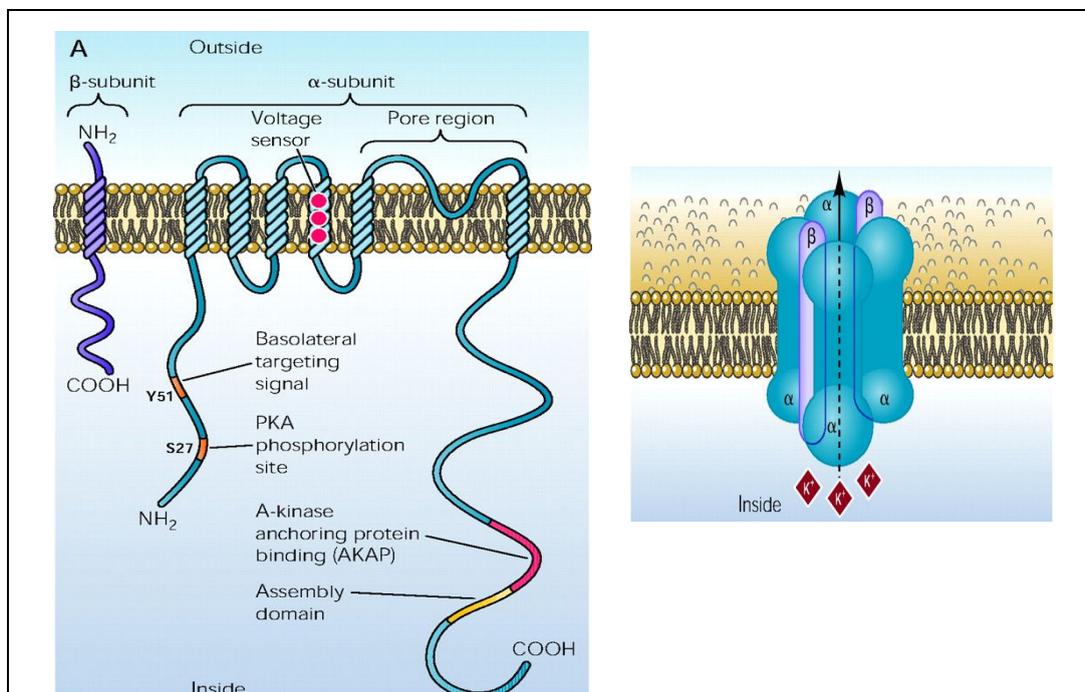


Figure 9. Topologie de la protéine KCNQ1 et des protéines KCNE.

A. A droite, la protéine KCNQ1 (sous-unité α) est composée de six segments transmembranaires. Ses extrémités N-terminale et C-terminale sont en position intracellulaire. La région du pore est située entre les cinquième et sixième segments transmembranaires. A gauche, les protéines KCNE (sous-unités β) sont des protéines à un segment transmembranaire. Leur extrémité C-terminale est en position intracellulaire. B. Pour former un canal fonctionnel, quatre protéines KCNQ1 s'associent en tétramère. Les protéines KCNE peuvent également faire partie du complexe canalaire ; elles modifient alors les propriétés du courant potassique. D'après (Jespersen et al., 2005).

Dans le coeur, en plus de la forme de 676 a.a., une isoforme issue d'épissage alternatif a été décrite (*Demolombe et al., 1998*). Cette isoforme 2, tronquée des 127 premiers a.a. N-terminaux, exerce un effet dominant négatif sur l'isoforme 1. En étudiant cette isoforme et des mutations localisées en N-terminale, notre équipe a montré que l'extrémité N-terminale contenait un motif (110-YNFLERPTG-120) nécessaire à l'adressage de la protéine KCNQ1 vers la membrane plasmique (*Dahimène et al., 2006*).

Le canal KCNQ1 est un canal potassique voltage dépendant. Ceci signifie qu'il est activé par les changements de potentiel de membrane et qu'il est spécifique des ions K⁺. La sensibilité au voltage est contrôlée par le « voltage sensor », quatre arginines chargées positivement et situées sur le segment S4 (*Jiang et al., 2003*).

Pour former un canal fonctionnel, les protéines KCNQ1 doivent s'associer en **tétramères**, c'est à dire en un bloc de 4 sous-unités KCNQ1. L'étude de mutations identifiées chez des patients JLN a permis de montrer que les a.a. 589 à 620, situés sur l'extrémité C-terminale de KCNQ1, étaient nécessaires à cette association (*Schmitt et al., 2000*). De plus, l'extrémité C-terminale (a.a. 610 à 620) est nécessaire à l'export du canal vers la membrane (*Kanki et al., 2004*).

Le canal KCNQ1 s'associe à d'autres protéines partenaires qui en modifient la fonction. Nous verrons que ces partenaires s'associent le plus souvent avec la partie C-terminale. De plus, des mutations perturbant ces associations sont responsables de syndrome du QT long ce qui souligne l'importance fonctionnelle de ces partenaires.

b. Régulation par des protéines partenaires.

La figure 11 page 32 résume les informations présentées ci-dessous.

i. Les sous-unités β ou KCNE.

Les protéines KCNE sont des protéines transmembranaires de type I (partie N-terminale extra-cellulaire). Cette famille compte cinq membres (de KCNE1 à KCNE5) qui modifient de façon importante les propriétés électriques du canal KCNQ1 (cf fi-



gure 10). La protéine KCNE2 (123 a.a. 14 kDa) rend le canal KCNQ1 voltage indépendant et le courant obtenu est de faible amplitude (*Tinel et al., 2000*). De plus, elle peut s'associer avec KCNQ1 et KCNE1 (*Toyoda et al., 2006*). En présence de la sous-unité KCNE3 (103 a.a. 12 kDa), le canal KCNQ1 est ouvert à tous les potentiels (*Schroeder et al., 2000*). La sous-unité KCNE4 inhibe le canal KCNQ1 (*Grunnet et al., 2002*). Les ARNm de KCNE4 ont été décelés dans l'utérus, le rein et le coeur de souris (*Grunnet et al., 2002*) ; la protéine KCNE4 (170 a.a. 18 kDa) a été retrouvée (par WB) dans de nombreux tissus, notamment, le cerveau, le rein, l'intestin et le coeur (*Manderfield & George, 2008*). En présence de KCNE5 (102 a.a. 11 kDa), le canal KCNQ1 ne s'ouvre que pour des potentiels très élevés (*Angelo et al., 2002*).

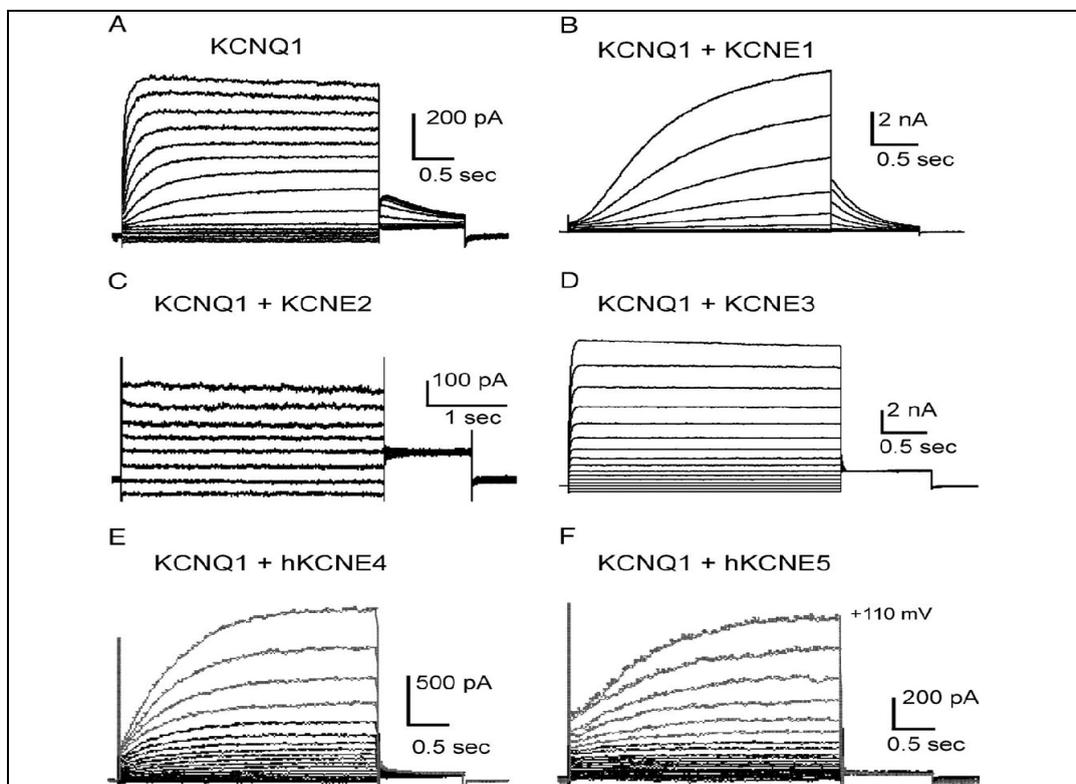


Figure 10. Aspect du courant KCNQ1 exprimé seul ou avec les protéines KCNE1, 2, 3, 4 et 5 dans des cellules COS-7.

B. En présence de KCNE1, les cinétiques d'activation sont ralenties et la densité de courant est augmentée par rapport à KCNQ1 exprimé seul (A). En présence de KCNE2 (C) et KCNE3 (D), le courant est observé à tous les potentiels, soit avec une densité faible (KCNE2), soit avec une densité élevée (KCNE3). KCNE4 (E) et KCNE5 (F) ont un effet inhibiteur sur KCNQ1 et ralentissent les cinétiques d'activation.

Protocole : potentiel de repos -80 mV, potentiels de test de -100 à +40 mV par pas de 10 mV ou de -100 à +90 mV pour KCNE4 et KCNE5. D'après (Bendahhou et al., 2005).

Dans le coeur, la sous-unité KCNE1⁹ (protéine glycosylée de 129 a.a. et 15 kDa), dont la structure tridimensionnelle RMN¹⁰ a été récemment publiée (*Kang et al., 2008*), est la plus importante sur le plan fonctionnel. En effet, c'est son association avec KCNQ1 qui est responsable du courant I_{Ks} (*Barhanin et al., 1996; Sanguinetti et al., 1996*). L'équipe de MacDonald a cherché la zone d'association entre KCNE1 et KCNQ1 (*Melman et al., 2002*). Ils ont montré que l'extrémité C-terminale de KCNE1 n'était pas nécessaire à cette association, ce qui suggère qu'elle se fait par le segment transmembranaire (*Tapper & George, 2000*). Plus récemment, il a été montré que KCNE1 interagissait avec la zone du pore de KCNQ1 (*Melman et al., 2004; Panaghi et al., 2006*). La stoechiométrie de cette association¹¹ est d'une protéine KCNE1 pour deux protéines KCNQ1 (*Morin & Kobertz, 2008*).

ii. La PKA et Yotiao.

Le système nerveux sympathique contrôle le rythme cardiaque. En réponse à une stimulation β -adrénergique, le rythme cardiaque s'accélère et la durée du potentiel d'action se raccourcit. A l'échelle cellulaire, la stimulation des récepteurs β -adrénergiques active l'adénylate cyclase qui produit un second messager : l'AMPc. Ce dernier active la protéine kinase A qui phosphoryle alors ses cibles parmi lesquelles des canaux ioniques et KCNQ1. Ainsi, le courant I_{Ks} est sensible à l'AMPc (*Walsh & Kass, 1988*) : son amplitude est augmentée, sa cinétique de désactivation est ralentie et il s'active pour des potentiels plus négatifs en présence d'AMPc ; globalement le courant I_{Ks} est activé. L'activation du courant I_{Ks} par l'AMPc nécessite la présence d'une protéine d'ancrage pour la PKA (AKAP) (*Potet et al., 2001*). Cette AKAP, appelée yotiao, se fixe sur le leucine zipper¹² de la partie C-terminale de KCNQ1. Ceci permet de rapprocher les effecteurs (la PKA et la protéine phosphatase1 (PP1)) de leur cible

9 KCNE1 est le nom du gène. La protéine est appelée MinK ou IsK.

10 RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

11 Stoechiométrie : nombre de protéines KCNE1 par protéine KCNQ1.

12 Un motif leucine zipper est un « coiled-coil », c'est à dire une répétition d'un motif de 7 a.a. dont 2 sont hydrophobes (cf figure 11). C'est un motif d'interaction.



KCNQ1 (*Marx et al., 2002*). La phosphorylation de KCNQ1 se fait sur la sérine 27. Yotiao est lui-même une cible de la PKA (*Chen et al., 2005*). La mutation G589D, identifiée chez des patients RW et qui perturbe le leucine zipper, empêche la fixation de yotiao et abolit l'activation du courant I_{Ks} par l'AMPc (*Marx et al., 2002*).

iii. La calmoduline.

La calmoduline (CaM) est une protéine capable de fixer le Ca^{2+} . Elle permet de moduler l'activité des canaux ioniques en fonction de la concentration calcique intracellulaire. L'action de la calmoduline peut être directe, par fixation sur sa cible, ou indirecte, *via* la Ca^{2+} /CaM-sensitive kinase (CaMKII) (*Pitt, 2007*). Par double hybride, il a été montré que les canaux KCNQ pouvaient fixer la calmoduline. Cette fixation a été confirmée par des expériences de pull-down. Elle se fait au niveau de la partie C-terminale des KCNQ. La calmoduline reconnaît une structure tridimensionnelle formée par deux hélices α (nommées A et B) (cf figure 11) ; l'hélice A contient un motif IQ et l'hélice B contient deux motifs 1-5-10. Ces deux hélices sont séparées de 130 a.a. mais seraient proches lorsque la protéine est repliée (*Yus-Najera et al., 2002*). Cette association a lieu en présence mais également en absence de calcium (*Shamgar et al., 2006*). De plus, des mutations identifiées chez des patients atteints d'un LQTS et localisées dans les domaines d'interaction avec la calmoduline (R366W, A371P, S373P, W392R, R518X, R539W) invalident l'interaction KCNQ1 calmoduline (*Ghosh et al., 2006; Shamgar et al., 2006*).

La sensibilité au calcium du canal KCNQ1 varie selon les études. Ainsi, dans des cellules CHO, Gamper et al. n'ont pas mis en évidence de modification de la densité de courant KCNQ1 lorsque la CaM était sur-exprimée ou lorsque la concentration en calcium était élevée. A l'inverse, des études réalisées dans des oeufs de Xénopes ont montré que le courant KCNQ1 était augmenté lorsque la concentration en calcium était élevée (*Ghosh et al., 2006; Shamgar et al., 2006*). Ce dernier résultat est en accord avec une autre étude, réalisée sur des cardiomyocytes de cobayes, qui montrait que le courant I_{Ks} était sensible à la concentration en calcium (*Bai et al., 2005*).

La calmoduline a également un rôle de chaperonne. En effet, Shamgar et al. ont

observé que la solubilité de la partie C-terminale de KCNQ1 était bien meilleure en présence de calmoduline et que des mutants RW ne s'associant pas avec la calmoduline étaient moins exprimés que la protéine sauvage (WB) (*Shamgar et al., 2006*). Ces observations suggèrent que la calmoduline favorise le repliement de la partie C-terminale de KCNQ1 et la maturation de la protéine.

iv. La tubuline.

La β -tubuline est un composant essentiel du cytosquelette. Notre équipe a récemment identifié par double hybride la tubuline comme un nouveau partenaire du canal KCNQ1. La tubuline se fixe sur le partie N-terminale de KCNQ1. Sur le plan fonctionnel, notre équipe a montré, dans des cardiomyocytes, que la stimulation du courant I_{Ks} par la voie de la PKA dépendait de la polymérisation des microtubules. Ceci suggère que l'interaction des microtubules avec KCNQ1 est indispensable à l'activation d' I_{Ks} par la voie de la PKA (*Nicolas et al., 2008*).

v. Nedd4-2 et SGK1 : régulation de l'expression de KCNQ1.

La protéine SGK-1 (Serum and Glucocorticoid-inducible Kinase-1) est une kinase ubiquitaire inductible. L'activation de SGK-1 par l'aldostérone augmente l'activité du canal ENaC (Epithelial Na⁺ Channel) rénal ce qui permet une réabsorption accrue d'ions sodium et participe à l'homéostasie sodique (*Pearce, 2001*). SGK-1 exerce son action en inhibant Nedd4-2 ce qui réduit l'endocytose du canal (*Debonneville et al., 2001*). SGK-1 stimule également le courant I_{Ks} , mais sans en modifier les propriétés cinétiques ce qui suggère que cette activation a lieu *via* une augmentation de l'expression de KCNQ1 à la surface des cellules. En effet, SGK-1 phosphoryle PIKfyve qui, *via* le 3,5-PIP₂, active la voie de l'exocytose impliquant RAB11. Il en résulte une augmentation de l'expression de KCNQ1 à la surface des cellules (*Seeböhm et al., 2007*).

L'ubiquitine ligase Nedd4-2 est impliquée dans l'endocytose de nombreux canaux *via* l'ubiquitination de ces derniers. En collaboration avec l'équipe du Dr Hugues



Abriel (Lausanne, Suisse), notre laboratoire a montré que KCNQ1 interagissait avec Nedd4-2 *via* un motif PY présent sur la partie C-terminale de KCNQ1 (*Jespersen et al., 2007*). La sur-expression de Nedd4-2 entraînait une diminution du courant I_{Ks} , une augmentation de l'ubiquitination de KCNQ1 et une diminution de la quantité de KCNQ1 dans les cellules ce qui montrait que Nedd4-2 favorisait l'internalisation et la dégradation de KCNQ1. Ce rôle de Nedd4-2 a été confirmé dans des cardiomyocytes de cobayes ; l'expression d'un dominant négatif de Nedd4-2 dans ces cellules provoquait une augmentation du courant I_{Ks} .

vi. PIP2.

Le PIP2 est un phospholipide membranaire, chargé négativement, qui interagit par des forces électrostatiques avec les charges positives des parties N-terminale et C-terminale de KCNQ1. Ces interactions stabilisent l'état d'ouverture du canal KCNQ1 ce qui augmente l'amplitude du courant I_{Ks} (*Loussouarn et al., 2003*). Notre laboratoire a également montré que des mutations identifiées chez des patients RW (R243H, R539W, et R555C) réduisaient l'affinité du canal pour le PIP2. La perte de fonction chez ces mutants pouvait être contrebalancée en augmentant la concentration en PIP2 ce qui suggère que la baisse d'affinité pour le PIP2 est un des mécanismes à l'origine de certains LQTS (*Park et al., 2005*).

3. Fonctions du canal KCNQ1.

a. Cardiaques.

Comme nous l'avons déjà évoqué à plusieurs reprises le canal KCNQ1 associé à la protéine KCNE1 est responsable du courant I_{Ks} qui participe à la repolarisation des cardiomyocytes. Ainsi, des mutations entraînant une perte de fonction de KCNQ1 sont responsables du syndrome du QT long de type 1. Les mécanismes par lesquels ces mutations conduisent à une perte de fonction sont multiples (*Boulet et al., 2006*) :

- décalage de la dépendance au potentiel vers des valeurs plus positives (par exemple avec la mutation R243H) (*Chouabe et al., 2000*),
- abolition de la régulation β -adrénergique (par exemple avec la mutation G589D) (*Marx et al., 2002*),
- perturbation de l'association avec KCNE1 par exemple avec les mutations R243H, R555C et R539W dont l'effet n'est visible qu'en présence de KCNE1 (*Chouabe et al., 2000*),
- défaut d'assemblage en tétramères et défaut de trafic (par exemple avec la mutation T587M) (*Yamashita et al., 2001*)
- défaut de trafic par des mutations situées en position N-terminale : Y111C, L114P et P117L (*Dahimène et al., 2006*).

Objectifs : l'un des objectifs de cette thèse était d'étudier les conséquences du défaut de trafic du mutant Y111C sur la synthèse du canal.



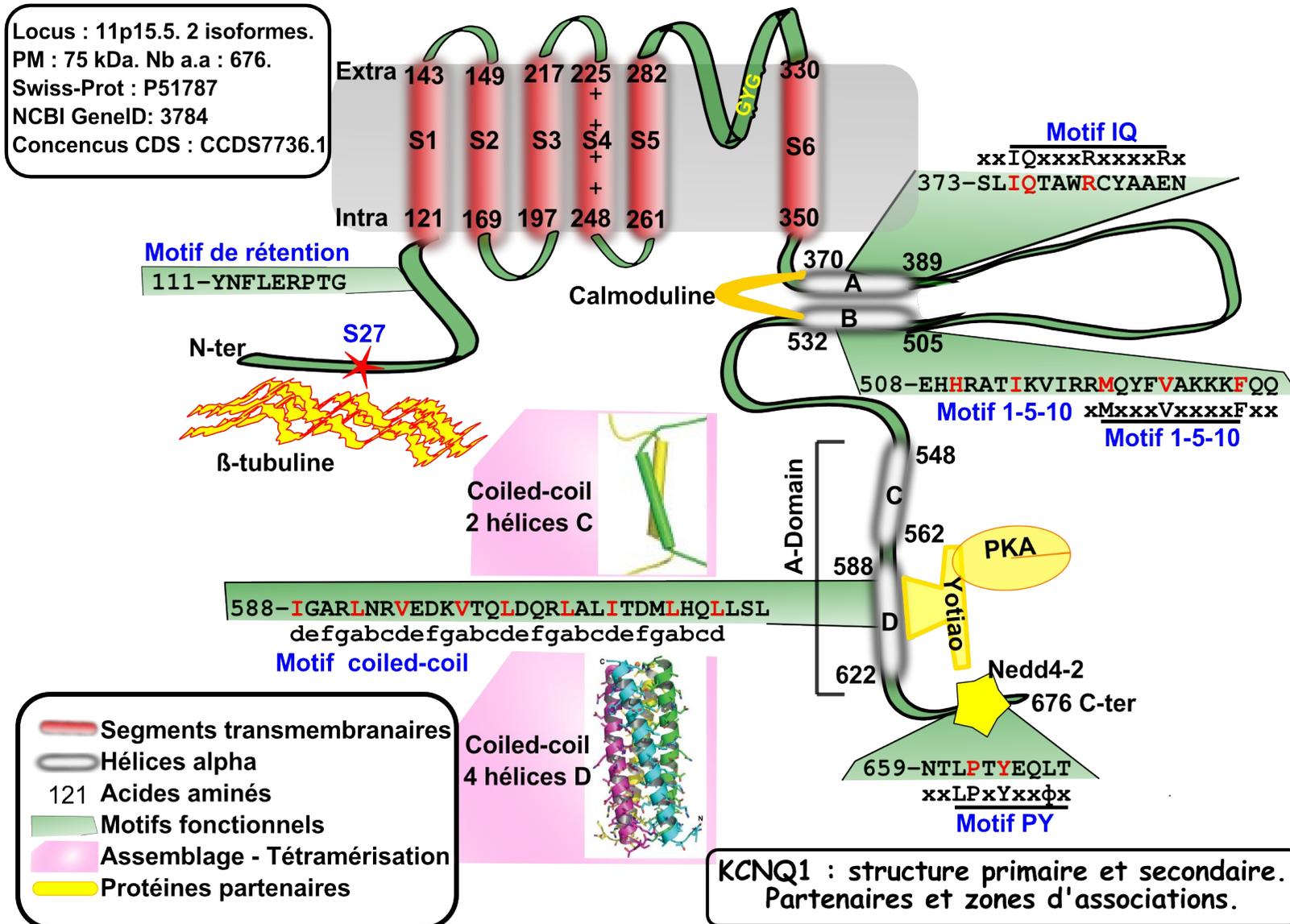


Figure 11. KCNQ1 : structure primaire et secondaire. Ses protéines partenaires et leurs zones d'association.

Les segments transmembranaires ont été prédits avec PHDHTM et MEMSAT3. Les numéros indiquent les a.a. qui bornent les structures remarquables. Selon l'algorithm utilisé, le segment S2 commence entre A149 et G154 et se termine entre T169 et W176. De même, le segment S6 est borné par les a.a. 327 à 332 et 348 à 353. Les bornes des quatre hélices α de la partie C-terminale sont tirées de l'article de Wiener et al. Les images d'assemblage des hélices α sont empruntées de Wiener et al. D'après (Jespersen et al., 2007 ; Wiener et al., 2008 ; Howard et al., 2007 ; Yus-Najera et al., 2002).

b. Autres fonctions.

Le canal KCNQ1 a des fonctions extracardiaques, principalement dans les cellules épithéliales (*Bleich & Warth, 2000; Jespersen et al., 2005*).

Dans l'oreille interne, les cellules de la *stria vascularis* sécrètent l'endolymphe qui participe à la transduction des sons en signaux électriques. Le courant I_{Ks} permet de maintenir une concentration en potassium élevée dans l'endolymphe ce qui est nécessaire à l'audition. Ainsi, lorsque la sécrétion de K^+ est défectueuse, l'audition n'est plus assurée. Chez les patients JLN, le courant I_{Ks} n'existant pas, une surdité bilatérale est associée au LQTS (*Vetter et al., 1996*).

Dans l'estomac, KCNQ1 associé à KCNE2 est indispensable aux sécrétions acides (*Grahammer et al., 2001; Roepke et al., 2006*).

La sécrétion de chlore au pôle apical des cellules épithéliales intestinales et respiratoires est dépendante du transport de potassium au pôle baso-latéral (*Jespersen et al., 2005*). Ainsi, le chlore absorbé au pôle baso-latéral de la cellule par le cotransporteur $Na^+K^+Cl^-$ est sécrété *via* le canal CFTR apical. La participation du canal KCNQ1 aux échanges baso-latéraux nécessaires à la sécrétion apicale de chlore a été soupçonnée car un inhibiteur de KCNQ1 (le chromanol 293B (*Loussouarn et al., 1997*)) inhibait la sécrétion de chlore par des cellules épithéliales coliques (*Lohrmann et al., 1995*) et par des épithélia respiratoires (*Mall et al., 2000*). De plus, le fait que la protéine KCNQ1 et la sous-unité KCNE3 soient co-localisées dans les cryptes intestinales coliques renforce l'idée que KCNQ1 participe au recyclage du potassium dans les cellules épithéliales (*Schroeder et al., 2000*). Le rôle de KCNQ1 ne serait toutefois pas essentiel et d'autres canaux pourraient intervenir (*Liao et al., 2005*).

Dans le rein, KCNE1 et KCNQ1 sont co-localisés au niveau du tube proximal du néphron (*Vallon et al., 2001*). L'étude de souris KO KCNE1 (*Vallon et al., 2001*) ou KCNQ1 (*Vallon et al., 2005*), a montré que KCNE1 et KCNQ1 participaient au maintien du potentiel de membrane au pôle baso-latéral de la cellule ; la sécrétion de K^+ permet de contrebalancer l'entrée de charges positives qui se produit lors de la réabsorption de Na^+ . Cependant, KCNQ1 ne serait pas le seul canal à participer à cet



équilibre des charges. En effet, les souris KO KCNQ1 ne présentent de signes de déficit de réabsorption du sodium ou en glucose qu'en condition de surcharge en glucose. Plus généralement, KCNQ1 est exprimé tout au long du néphron, soit au pôle apical des cellules au niveau des segments proximaux soit au pôle baso-latéral au niveau des segments distaux mais son rôle dans ces différents segments n'a pas été étudié (*Zheng et al., 2006*).

Finalement, on notera que malgré la diversité des fonctions de KCNQ1 et KCNE1, les patients LQT1 et LQT5, de type Romano et Ward, ne présentent que des troubles cardiaques. Seuls les personnes ayant leurs deux allèles mutés (JLN) ont une atteinte extra cardiaque (surdité).

B. Le canal ionique SCN5A.

1. Structure et fonctions.

Le gène SCN5A, codant pour le canal sodique cardiaque $Na_v1.5$, a été cloné en 1992 par Gellens et al. (*Gellens et al., 1992*). Il est situé sur le chromosome 3 (locus 3p21) (*George et al., 1995*). Il code pour une protéine de 2016 a.a. dont le poids moléculaire est de 240 kDa.

La protéine SCN5A est une protéine transmembranaire, glycosylée, formée de quatre domaines homologues (notés DI à DIV) composés chacun de 6 segments transmembranaires (S1 à S6) (cf figure 12). Les domaines sont reliés entre eux par des régions interdomaines ou « linkers » en position intracytoplasmique. Les extrémités N-terminale et C-terminale sont intra-cellulaires. Il s'agit d'un canal dépendant du potentiel dont la sensibilité au voltage est conférée par les charges positives situées sur les segments S4. Dans les cardiomyocytes, le canal SCN5A est localisé dans les disques intercalaires (*Maier et al., 2004*).

Comme nous l'avons déjà évoqué, le canal SCN5A est responsable du courant sodique dépolarisant qui initie le potentiel d'action dans les cardiomyocytes. De l'intensité de ce courant dépendent l'amplitude et la durée de la phase de dépolarisation, ce qui conditionne la vitesse de propagation de l'onde de dépolarisation cardiaque.

Sur le plan électrophysiologique, le canal SCN5A s'ouvre et se ferme rapidement. Il est doté d'un état inactivé, c'est à dire d'une période au cours de laquelle il est incapable de conduire le courant. Grâce à cet état inactivé, un cardiomyocyte qui vient d'être dépolarisé ne pourra être dépolarisé qu'après un certain délai. Cet intervalle de temps, appelé **période réfractaire**, est fondamental à l'échelle du coeur. Elle garantit que l'onde de dépolarisation se propage dans une seule direction et donc que les cardiomyocytes se contractent de façon coordonnée (Abriel, 2007). Ainsi, des mutations dans le gène SCN5A sont responsables de pathologies cardiaques rythmiques (dont le LQTS) et dégénératives (cf [annexe](#)).

De même que le canal KCNQ1, SCN5A fonctionne en association avec d'autres protéines partenaires qui pour la plupart se fixent sur la partie C-terminale du canal (cf figure 12).

2. Partenaires de SCN5A.

Comme le canal KCNQ1, SCN5A s'associe avec des sous-unités β ($\beta 1$ à $\beta 4$), protéines à un segment transmembranaire. L'effet de ces sous-unités sur le courant SCN5A est faible et leur rôle dans le coeur était controversé (Abriel, 2007). Mais, récemment, une mutation sur le gène SCN4B, codant pour la sous-unité $\beta 4$, a été identifiée dans une famille avec un LQTS congénital et permis de montrer que la sous-unité $\beta 4$ avait un rôle fonctionnel vis à vis de SCN5A (Medeiros-Domingo et al., 2007). Cette mutation ségrégeait avec le phénotype LQTS et était absente chez 800 contrôles. En réexprimant la sous-unité mutée avec SCN5A dans des cellules HEK293, les auteurs ont montré que les modifications du courant sodique provoquées par cette mutation (une augmentation du courant sodique) étaient compatibles avec un LQTS.

Les ankyrines sont des protéines qui lient les protéines membranaires au cytosquelette. SCN5A se lie à l'ankyrine-G par le linker II-III (Lemaitte et al., 2003). La mutation E1053K identifiée chez un patient¹³ ayant un syndrome de Brugada¹³, située dans le motif d'association, abolit cette liaison et provoque un défaut de trafic (Moh-

¹³ Le syndrome de Brugada est une arythmie cardiaque (cf [annexe](#) pour détails).



ler et al., 2004). La protéine ankyrine G participerait donc au trafic de SCN5A. L'ankyrine B pourrait également interagir avec SCN5A mais l'association directe entre l'ankyrine B et SCN5A n'a pas encore été démontrée. Cependant, des mutations sur le gène ANK2 (codant pour l'ankyrine B) sont associées au LQT4 (ou syndrome ankyrine) (*Mohler et al., 2003*) et le courant SCN5A enregistré dans des cardiomyocytes néonataux de souris KO^{-/-} ANK2 présente une cinétique retardée comparable à celle observée pour des canaux portant une mutation de type LQT3 (*Chauhan et al., 2000*) ce qui suggère un rôle fonctionnel de l'ankyrine B vis à vis de SCN5A.

En 2003, Liu et al. ont montré que la protéine FHF1B (Fibroblast Growth Factor homologous factor 1B) se fixait sur la partie proximale de l'extrémité C-terminale de SCN5A et qu'il en résultait un décalage de la courbe d'inactivation de SCN5A vers les potentiels négatifs. Une mutation identifiée chez un patient LQT3 empêche cette association (*Liu et al., 2003*).

Comme KCNQ1, SCN5A fixe la calmoduline grâce à un motif IQ situé sur sa partie C-terminale. L'effet fonctionnel de cette fixation est controversé : pour Deschênes et al. (*Deschênes et al., 2002*) les caractéristiques du courant sodique ne sont pas modifiées alors que pour Tan et al. (*Tan et al., 2002*) la calmoduline favorise l'état inactivé du canal.

L'ubiquitine ligase Nedd4-2 se fixe sur le motif PY de la partie C-terminale de SCN5A et favorise l'ubiquitination du canal à la membrane. Ceci initie l'internalisation du canal et permet son renouvellement (*van Bemmelen et al., 2004*).

Par des expériences de pull-down, réalisées à partir de coeur de souris et d'homme, il a été montré que SCN5A interagissait avec la syntrophine (α et β) et la dystrophine (*Gavillet et al., 2006*). Cette association se fait par le motif PDZ (SIV) situé en C-terminale de SCN5A. Les auteurs ont montré que, chez des souris mdx déficientes en dystrophine, l'amplitude du courant était réduite et que la protéine SCN5A était deux fois moins exprimée alors que la quantité d'ARNm était inchangée. Cette interaction est donc nécessaire à l'expression et à la fonction du canal SCN5A mais le mécanisme par lequel la dystrophine augmente l'expression de SCN5A (ou prévient sa dégradation) n'est pas déterminé.

SCN5A a été co-immunoprécipité avec la cavéoline-3, un composant des cavéoles, ces invaginations de la membrane plasmique où sont concentrées des canaux ioniques et des protéines de signalisation (*Yarbrough et al., 2002*). L'effet de la cavéoline-3 sur SCN5A n'est pas clairement établi mais une hypothèse est que lors de stimulation β -adrénergique la cavéoline-3 pourrait permettre la « libération » des canaux SCN5A contenus dans les cavéoles de façon à augmenter rapidement le courant sodique (*Abriel, 2007*). On sait par ailleurs que la cavéoline-3 est importante pour la physiologie cardiaque. En effet, quatre mutations sur le gène *CAV3*, identifiées chez des patients avec un LQTS, altèrent la fonction du canal SCN5A (*Vatta et al., 2006*). Par des études de patch-clamp, les auteurs ont montré que les protéines cavéoline-3 mutantes provoquaient un gain de fonction du canal SCN5A similaire à celui observé avec des mutations du gène SCN5A responsables de LQT3.

Plusieurs kinases sont capables de phosphoryler SCN5A (*Abriel, 2007*). Dans le coeur, SCN5A et la CaMKII (calmoduline kinase II) sont co-localisés et peuvent être co-immunoprécipités (*Wagner et al., 2006*). L'activation de la voie de la PKA joue principalement sur le trafic de SCN5A (*Hallaq et al., 2006a*). En effet, la phosphorylation de SCN5A par la CaMKII modifie peu les propriétés biophysiques du courant sodique mais augmente son amplitude. De même, des cardiomyocytes de chiens incubés avec des activateurs de la PKA présentent une augmentation de 30% du courant dû à SCN5A (*Baba et al., 2004*). Ces observations sont concordantes avec une augmentation du nombre de canaux à la surface des cellules. L'utilisation d'un canal marqué avec de la GFP a permis de vérifier cette hypothèse (*Hallaq et al., 2006a*). Il a été proposé que la PKA exercerait son action en inhibant les motifs de rétention RXR situés entre deux sites de phosphorylation pour la PKA (*Cusdin et al., 2008*) ou en favorisant la libération des canaux SCN5A retenus dans les cavéoles (*Abriel, 2007*).

Récemment, un criblage par double hybride a identifié la protéine MOG-1 comme nouveau partenaire de SCN5A (*Wu et al., 2008*). Les auteurs concluent que MOG-1 favorise l'expression de SCN5A à la surface des cellules.

Enfin, il a été montré que la téléthonine, une petite protéine jouant le rôle de senseur au stress dans le muscle, pouvait réguler SCN5A. La téléthonine co-localise



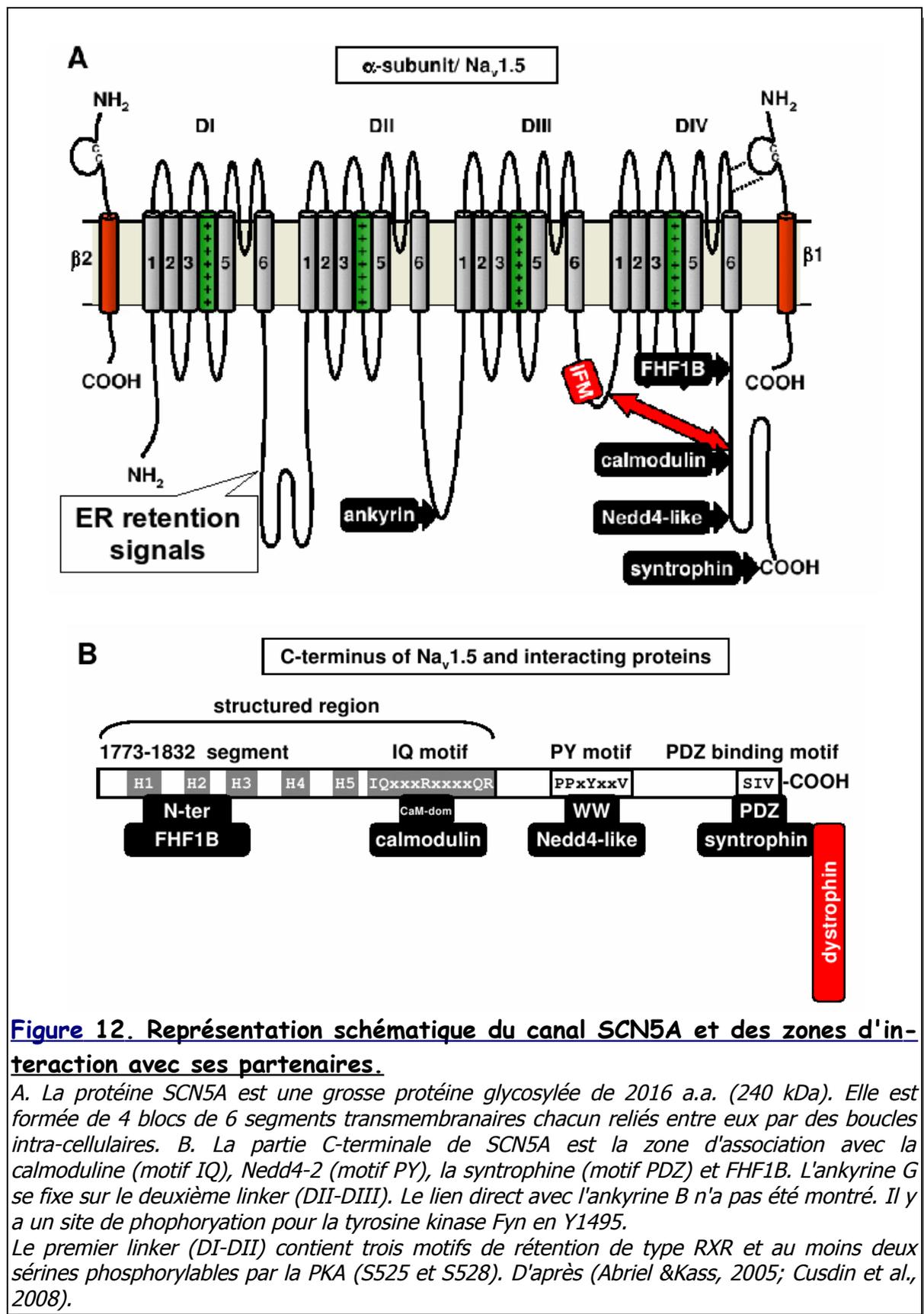


Figure 12. Représentation schématique du canal SCN5A et des zones d'interaction avec ses partenaires.

A. La protéine SCN5A est une grosse protéine glycosylée de 2016 a.a. (240 kDa). Elle est formée de 4 blocs de 6 segments transmembranaires chacun reliés entre eux par des boucles intra-cellulaires. B. La partie C-terminale de SCN5A est la zone d'association avec la calmoduline (motif IQ), Nedd4-2 (motif PY), la syntrophine (motif PDZ) et FHF1B. L'ankyrine G se fixe sur le deuxième linker (DII-DIII). Le lien direct avec l'ankyrine B n'a pas été montré. Il y a un site de phosphorylation pour la tyrosine kinase Fyn en Y1495.

Le premier linker (DI-DII) contient trois motifs de rétention de type RXR et au moins deux sérines phosphorylables par la PKA (S525 et S528). D'après (Abriel & Kass, 2005; Cusdin et al., 2008).

et co-immunoprécipite avec SCN5A. De plus, la réexpression de SCN5A avec un mutant de la téléthonine, identifiée chez un patient présentant une pseudo obstruction intestinale, modifie les propriétés du courant SCN5A ce qui aboutit à un doublement du courant de fenêtre (Mazzone et al., 2008).

Objectifs : Les partenaires de SCN5A jouent un rôle important dans la physiologie cardiaque. Mettre en évidence de nouveaux partenaires est nécessaire pour mieux comprendre la physiologie de ce canal. Notre équipe a donc entrepris d'identifier de nouveaux partenaires de SCN5A.

III. SYNTHÈSE ET DÉGRADATION DES CANAUX IONIQUES : PERSPECTIVES THÉRAPEUTIQUES.

A. Naissance d'un canal ionique.

La synthèse des canaux ioniques se fait par la « voie sécrétoire »; c'est à dire qu'ils sont produits dans le réticulum endoplasmique (RE) puis exportés vers l'appareil de Golgi avant d'atteindre finalement la membrane plasmique où ils exercent leur fonction. Comme nous allons le voir, c'est au cours de leur synthèse que les canaux ioniques sont insérés dans la membrane plasmique et qu'ils acquièrent leur structure tri-dimensionnelle avec l'aide de protéines chaperonnes. C'est également à ce moment que le canal s'associe avec certains de ses partenaires.

1. Translocation et intégration dans la bicouche lipidique membranaire.

a. Adressage des canaux vers le réticulum endoplasmique.

Les protéines membranaires sont traduites par les ribosomes et, contrairement aux protéines cytosoliques, elles sont dirigées vers le RE où elles sont insérées dans la bicouche lipidique au fur et à mesure de leur élongation. La chaîne polypeptidique naissante, et contenant une séquence signal composée d'acides aminés hydrophobes, est reconnue par le SRP (signal recognition particule), un complexe pro-



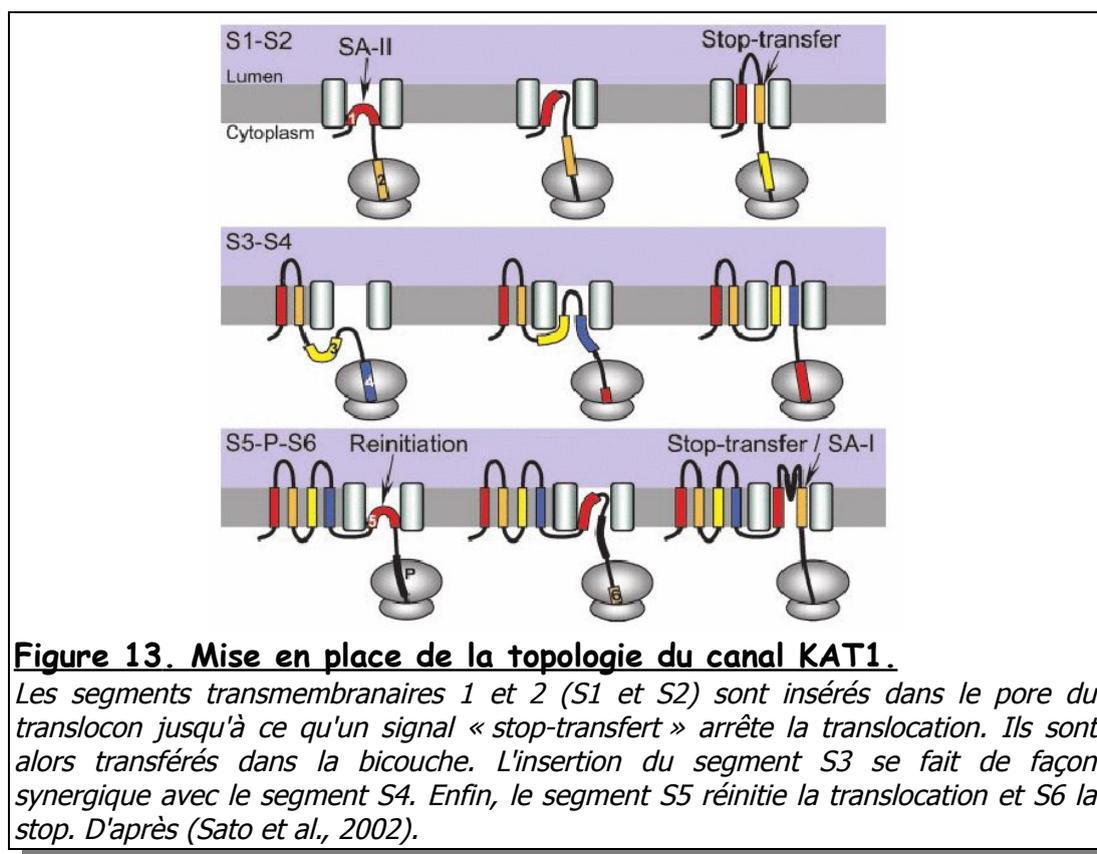
téique qui se fixe sur son récepteur (SR) ancré dans le membrane du RE. La fixation SRP SR est GTP dépendante (*Halic & Beckmann, 2005; Nagai et al., 2003*). Le ribosome est ainsi amené en contact du translocon, un pore aqueux de 20Å de diamètre qui traverse la membrane du RE (*Wilkinson et al., 1996*). Ce pore est formé par un hétérotrimère de protéines Sec61 (α , β et γ) et permet le passage de la chaîne peptidique à travers la membrane hydrophobe (*Rapoport, 2007*). Le translocon de levure a été cristallisé en 2004 (*Van den Berg et al., 2004*).

Certaines protéines peuvent néanmoins être insérées dans le membrane de RE après leur synthèse et non pas au cours de leur synthèse (*Stefanovic & Hegde, 2007*).

b. Topogénèse.

Comme nous l'avons vu, le canal KCNQ1 est formé de six segments transmembranaires orientés dans la membrane. Les segments du canal qui sont situés dans le lumière du RE seront extra-cellulaires et ceux qui sont exposés au cytosol le resteront une fois le canal à la surface de la cellule. L'orientation des segments se détermine dans la membrane du RE au fur et à mesure que la chaîne polypeptidique sort du ribosome.

Les mécanismes responsables de l'orientation des segments ont été étudiés pour les canaux $K_{ir}2.1$, KcsA, (*Umigai et al., 2003*) et pour des canaux à 6 segments transmembranaires : $K_v1.3$ (*Tu et al., 2000*), KAT1 (*Sato et al., 2002*). Ces études ont montré que plusieurs paramètres permettaient l'acquisition de la bonne conformation (cf figure 13). L'orientation du premier segment dépend d'un signal qui détermine si la partie N-terminale sera intra ou extra-cellulaire. Puis, lorsqu'un segment transmembranaire hydrophobe est complètement entré dans le pore du translocon, un signal « stop-transfert » arrête la translocation. La chaîne polypeptidique, toujours en élongation, se replie et forme une boucle jusqu'à ce qu'un signal de ré-initiation permette au segment suivant d'entrer dans le translocon. Finalement, le translocon s'ouvre pour laisser sortir les segments transmembranaires qui sont ainsi insérés dans la bicouche lipidique (*Do et al., 1996*). Ce processus se répète plusieurs fois car



le translocon ne peut contenir que deux segments transmembranaires en même temps. Comme la translocon s'ouvre et se ferme, certains disent qu'il respire (*Rapoport et al., 2004*).

Au cours de ce processus, la partie N-terminale détermine l'orientation globale de la protéine. La présence d'a.a. chargés contraint la partie N-terminale à rester dans le cytoplasme (*Alder & Johnson, 2004*). Ainsi, on peut penser que des mutations sur les canaux ioniques au niveau de cette zone sous membranaire puissent modifier de façon importante la topologie du canal. Les mutations Y111C, L114P, P117L du canal KCNQ1 sont situées dans cette zone, elles sont donc susceptibles de modifier la topologie du canal mutant.

Certaines protéines comme $K_v1.3$ (*Tu et al., 2000*) ou AQP1 acquièrent leur conformation finale en dehors du RE.



2. Tétramérisation des canaux K_v .

Les sous-unités KCNQ1 s'associent par quatre pour former un canal fonctionnel. Cette tétramérisation a lieu dans le RE, qui en concentrant les sous-unités dans un même espace, favorise cette association. La reconnaissance des sous-unités entre elles est ensuite assurée par des domaines d'association. La tétramérisation des canaux K_v1 et shaker a été étudiée par plusieurs équipes qui ont montré que pour les canaux K_v1 , la reconnaissance des sous-unités se faisait par le domaine de tétramérisation T1, situé en N-terminale (Li et al., 1992). Ce domaine T1 favorise l'association mais n'est pas indispensable à la tétramérisation (Zerangue et al., 2000). La reconnaissance a lieu précocement au cours de la synthèse, avant que la protéine ne soit complètement synthétisée (Lu et al., 2001) et l'obtention du tétramère se fait par une association de type dimère de dimères (Tu & Deutsch, 1999).

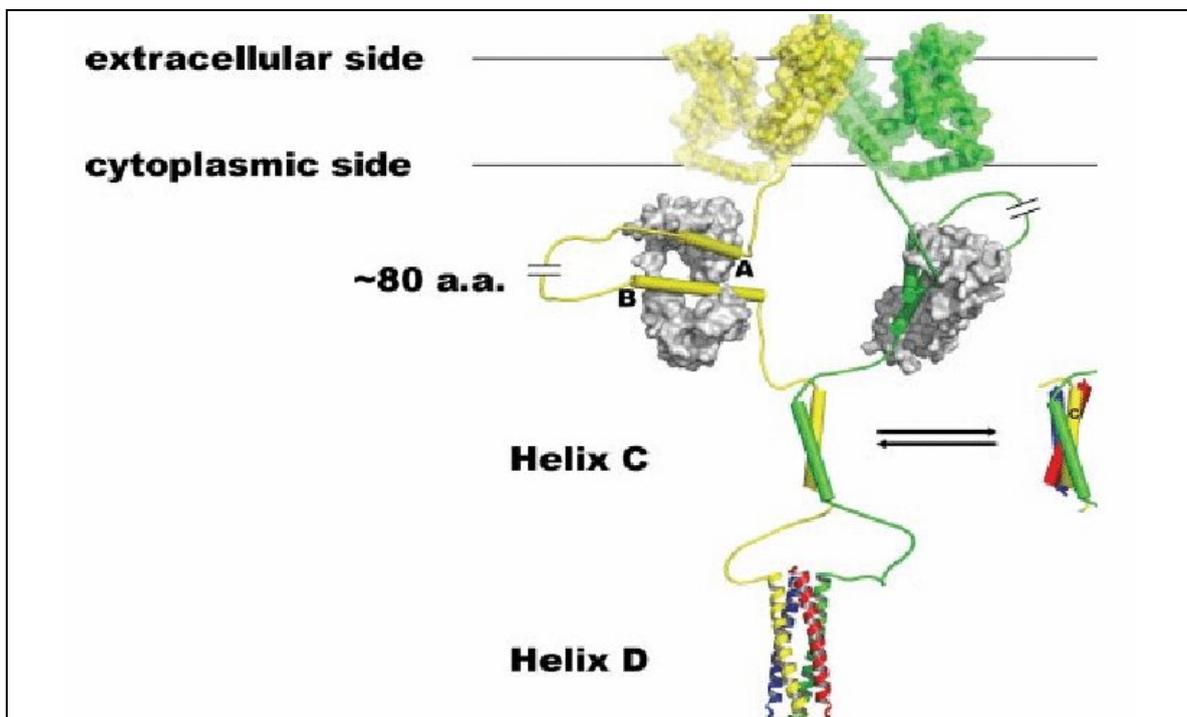


Figure 14. La partie C-terminale de KCNQ1 : zone de tétramérisation et de fixation de la calmoduline.

La partie proximale (hélices A et B) de la partie C-terminale de KCNQ1 permet la fixation de la calmoduline ce qui favorise le repliement correct de cette partie de la protéine. La partie distale (hélices C et D) contrôle la tétramérisation grâce à des coiled-coil. D'après (Wiener et al., 2008).

Pour les canaux KCNQ (K_v7), qui n'ont pas de domaine T1, le domaine de tétramérisation est le domaine A formé par deux motifs coiled-coil situés sur la partie C-terminale (cf figure 14 et 11). La mise en place de la tétramérisation ne peut donc pas être aussi précoce que pour les domaines de tétramérisation T1. L'association se fait également sur un modèle dimère de dimères (*Wiener et al., 2008*). La calmoduline, qui se fixe sur les deux premières hélices α de la partie C-terminale, ne participe pas directement à l'oligomérisation. Cependant, en son absence, la partie C-terminale est insoluble ce qui suggère que la calmoduline participe au bon repliement de cette zone (*Shamgar et al., 2006*). Il existe cinq protéines KCNQ (KCNQ1 à KCNQ5) pouvant former des homotétramères ou des hétérotétramères¹⁴. La spécificité de l'association entre KCNQ différents est contrôlée par le domaine de tétramérisation. Ainsi, les protéines KCNQ1 ne peuvent s'associer qu'entre elles alors que les autres peuvent former des hétérotétramères (KCNQ3 avec KCNQ2, KCNQ4 et KCNQ5) (*Howard et al., 2007; Nakajo & Kubo, 2008; Schwake et al., 2006*).

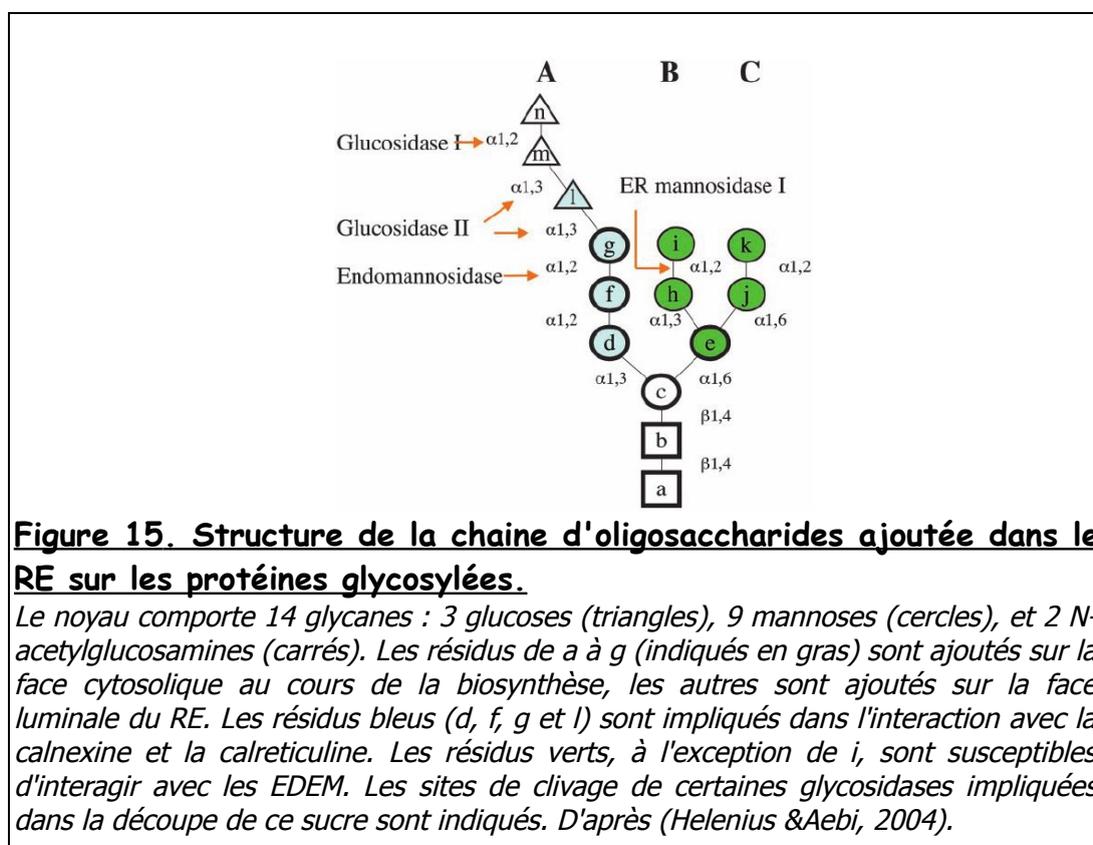
3. Contrôle qualité dans le RE : les protéines chaperonnes et la N-glycosylation.

Au fur et à mesure de leurs synthèses, les chaînes polypeptidiques naissantes interagissent avec des protéines qui favorisent leurs repliements et évitent qu'elles ne s'agrègent. Ces protéines sont appelées des **protéines chaperonnes**. Les plus connues sont celles de la famille des Hsp70. Au sein de cette famille, on trouve la Hsp70 (cytosolique et induite par le stress), la Hsc70 (la forme constitutive de la Hsp70), la Grp75 (mitochondriale) et la Grp78 ou BiP localisée dans le RE et qui est induite par le stress. La Hsp70 a un domaine NBD (Nucleotide Binding Domain) qui permet de fixer l'ATP et un domaine SBD (Substrate Binding Domain) qui permet de fixer ses cibles (*Bukau et al., 2006*). Ces chaperonnes se fixent transitoirement sur les parties hydrophobes des protéines ce qui évite leur agrégation en empêchant les interactions incorrectes au sein d'une protéine et entre protéines (*Bukau et al., 2006*). Les chaperonnes Hsp fonctionnent en association avec des co-chaperonnes.

¹⁴ Hétérotétramère : association de quatre protéines différentes. Homotétramère : association de quatre protéines identiques.



Ainsi, la maturation du canal hERG est dépendante des chaperonnes cytosoliques Hsc70, Hsp90, Hdl-2, Hop (Hsp organizing protein), Bag-2 (BCL-associated athanogene 2) et de la chaperonne membranaire FKBP38 (FK506-binding protein 38kDa) (Walker et al., 2007). La protéine FKBP38 joue un rôle important dans la synthèse du canal hERG. En effet, lorsque son expression est réprimée par siRNA le canal hERG est globalement moins exprimé et le taux de maturation du canal est plus faible. A l'inverse, la sur-expression de FKBP38 restaure partiellement la maturation du mutant F805C.



Un autre mécanisme intervenant dans le repliement correct des protéines avant leur sortie du RE est la N-glycosylation. Lorsque la chaîne peptidique émerge dans la lumière RE, un bloc d'oligosaccharide (cf figure 15) est ajouté sur le groupement -NH₂ des résidus asparagine répondant au motif -N-X-S/T par un complexe appelé oligosaccharyltransférase (OST) (Helenius & Aebi, 2004). L'oligosaccharide est ensuite

coupé par les glycosidases I et II (GI et GII). Ces sucres améliorent la solubilité du peptide naissant et permettent sa reconnaissance par les lectines (la calnexine (CNX) qui est soluble et la calréticuline (CRT) qui est membranaire), des chaperonnes dédiées aux protéines glycosylées. La protéine subit alors un cycle où alternent : déglycosylation (GII) permettant sa séparation des CNX et CRT, et glycosylation par la glucosyltransférase conduisant à sa capture par les CNX et CRT ; on parle de « cycle des

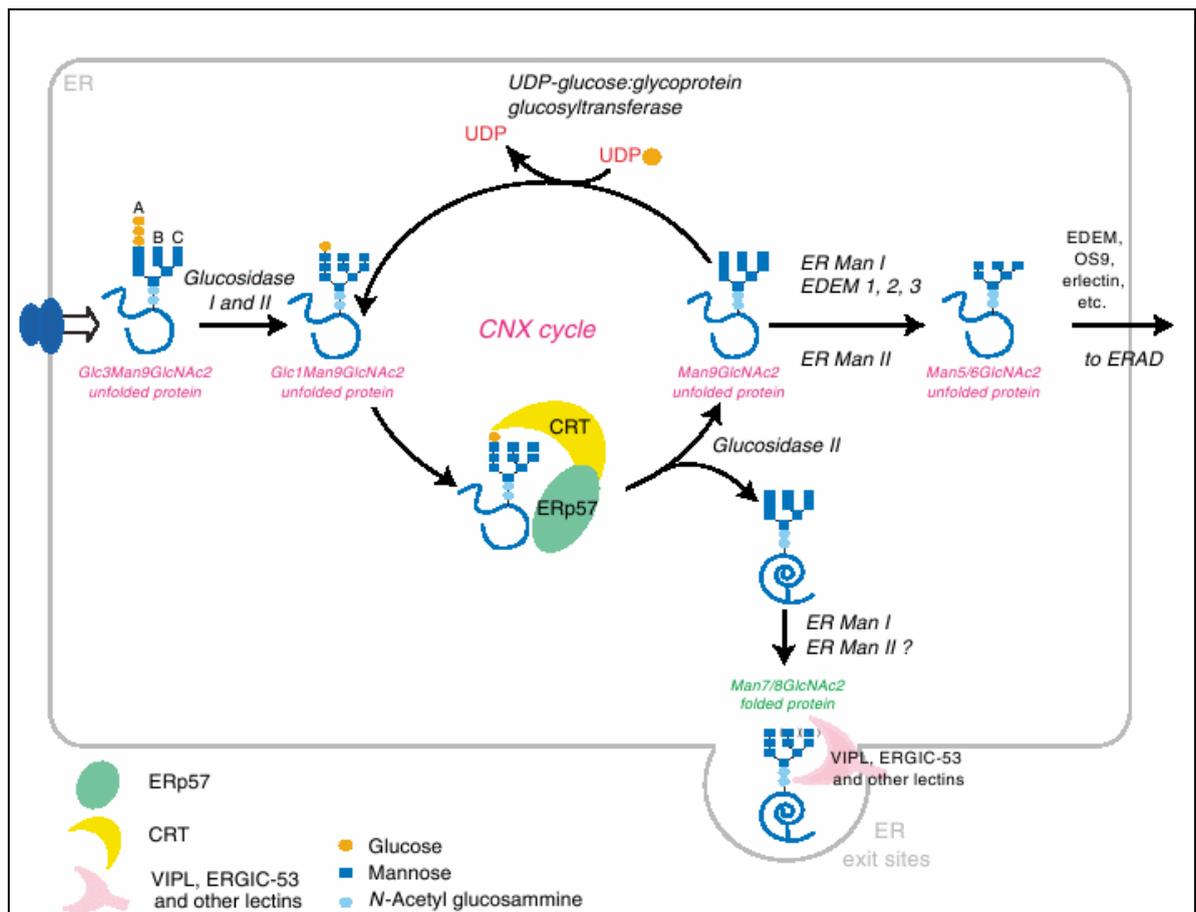


Figure 16. Le cycle des lectines.

De gauche à droite. Un noyau d'oligosaccharide (Glc3Man9GlcNAc2) est fixé sur une asparagine répondant au motif NXS/T (X : a.a. différent de la proline). Les glucosidases I et II retirent successivement les deux premiers glucoses de la branche A. La protéine monoglucosylée (Glc1Man9GlcNAc2) peut alors interagir avec la calnexine (CNX) et la calréticuline (CRT). Cette association prévient la formation d'agrégat et permet la mise en place de ponts di-sulfures grâce à l'oxydoréductase ERp57. La glucosidase II coupe le dernier glucose de la chaîne A ce qui libère la protéine. Si cette dernière est correctement repliée, elle interagit avec les lectines VIPL ou ERGIC-53 et quitte le RE. A l'inverse, si elle n'est pas correctement repliée, la glucosyltransférase ajoute un glucose sur la chaîne A ce qui permet une nouvelle interaction avec la CNX ou la CRT. Si la protéine ne parvient pas à se replier correctement, elle est capturée par d'autres lectines dont les EDEM qui la dirigent vers les voies de dégradation. D'après (Anelli & Sitia, 2008).



lectines » (cf figure 16) (*Anelli & Sitia, 2008; Lederkremer & Glickman, 2005*). Ce cycle, en ralentissant la maturation de la protéine, lui laisse le temps de se replier correctement. De plus, les lectines favorisent la mise en place des ponts di-sulfures grâce à l'oxydoreductase à laquelle elles sont associées (ERp57) (*Caramelo & Parodi, 2007*). Les protéines glycosylées sont ensuite triées par les EDEM (ER degradation enhancing α -mannosidase-like) qui discriminent les protéines mal repliées et les orientent vers la voie de dégradation (*Molinari et al., 2003*).

Il a aussi été montré pour le canal $K_v1.5$, que la S-acylation, c'est à dire l'attachement d'une chaîne d'acide gras sur une cystéine, stabilisait le canal. En effet lorsque la S-acylation est inhibée, le niveau d'expression du canal est plus faible et moins de canal est exprimé à la membrane (*Zhang et al., 2007*).

Finalement, les protéines qui passent le contrôle qualité sont orientées vers la voie sécrétoire et les autres vers les voies de dégradation associées au réticulum ([ERAD : ER associated degradation](#)). Les mécanismes qui interviennent pour déterminer le passage vers l'une ou l'autre de ces voies sont :

- la présence de motifs de rétentions tel que le motif RKR, identifié sur le canal KATP (*Zerangue et al., 1999*), ou, le motif PL(Y/F)(F/Y)xxN identifié sur la sous-unité α du récepteur à l'acétylcholine (*Wang et al., 2002*). Ces motifs doivent être masqués pour que la protéine puisse sortir du RE.
- les signaux d'export tels que les motifs diacides (ENE et EXD) identifiés sur les canaux $K_{ir} 1.1$ et $K_{ir} 2.1$ (*Ma et al., 2001*)
- la phosphorylation du canal qui, comme cela a été montré pour les canaux KCNK, inhibe les mécanismes de rétention et autorise l'association avec la protéine 14-3-3 *via* des motifs (-RRSSV, -RRKSV, -RSLSV, -RSRSC) ce qui permet le mouvement antérograde (*O'Kelly et al., 2002*).
- l'association avec des protéines d'ancrage ou de scaffolding¹⁵, telle que les AKAPs (A-kinase anchoring proteins), qui masquent les signaux de rétention lorsqu'elles se fixent sur le canal calcique de type L (*Altier et al., 2002*)

15 Scaffolding : échafaudage

- la composition et la stoechiométrie des sous-unités qui composent le canal (*Deutsch, 2003*). Ainsi, les sous-unités K_v6.3, K_v10.1, et K_v11.1 sont incapables de former des homo-multimères et sont retenues dans le RE lorsqu'elles sont exprimées seules (elles sont appelées sous-unités silencieuses). En revanche, lorsqu'elles sont exprimées avec la sous-unité K_v2.1 elles sont exprimées à la surface des cellules (*Ottshytsch et al., 2002*).
- l'état de repliement de la protéine, terme imprécis qui englobe l'exposition de motifs de rétention non déterminés, le déploiement d'hélices α ou tout autre défaut de repliement consécutif à une mutation (*Ficker et al., 2000*).

4. Le contrôle qualité après la sortie du RE.

Le contrôle qualité des protéines se poursuit tout au long de la voie sécrétoire. Les protéines reconnues inaptées après leur sortie du RE peuvent soit retourner vers le RE par un transport rétrograde, soit être dirigées directement vers les lysosomes. La formation d'agrégats, la localisation dans des microdomaines du Golgi, l'ubiquitination ou la reconnaissance par des récepteurs membranaires sont les principaux mécanismes permettant la discrimination entre protéines aptes ou non après la sortie du RE (*Arvan et al., 2002*). Ainsi, chez la levure il a été montré que la protéine Rer1p, logée dans la membrane du Golgi, reconnaissait les segments transmembranaires portant des charges positives et qu'elle permettait leur retour vers le RE (*Sato et al., 2001*). De même, dans les cellules de mammifères, il a été montré que le transport rétrograde de l'appareil de Golgi vers le RE du TCR α immature, était dépendant du récepteur au KDEL (*Yamamoto et al., 2001*). Enfin, bien que l'ubiquitination puisse diriger un substrat vers les endosomes, comme c'est le cas pour la protéine Pma1-7 et un mutant de l'ATPase de levure (*Pizzirusso & Chang, 2004*), de tels exemples sont rares.

5. Association de KCNQ1 et KCNE1. Effets « chaperonne » des sous-unités β .

Il a été montré que l'association entre le canal shaker et ses sous-unités β avait



lieu dans le RE (*Nagaya & Papazian, 1997*). De même, l'association du canal $K_v1.2$ avec ses sous-unités β peut être détectée par co-immunoprécipitation dès 5 minutes après le début de la synthèse ce qui suggère que l'association est précoce. De plus, les sous-unités β favorisent la maturation des canaux $K_v1.2$ par une action précoce de type chaperonne. En effet, elles favorisent la maturation de la forme glycosylée de $K_v1.2$, stabilisent la protéine et favorisent son expression à la membrane (*Campomanes et al., 2002; Shi et al., 1996*). Ce rôle chaperonne a été évoqué pour d'autres canaux. Ainsi, KChAP augmente l'expression membranaire de $K_v2.1$ (*Wible et al., 1998*); DPPX et KChIP3 un partenaire des canaux K_v4 récemment identifiés favorisent l'expression membranaire de $K_v4.2$ (*Nadal et al., 2003*). Les protéines partenaires sont également capables de restaurer le trafic de certaines protéines mutantes. Par exemple, KChIP restaure le trafic de mutants de $K_v4.2$ (H105, C111, C132, et C 133) (*Kunjilwar et al., 2004*); les sous-unités α et β restaurent le trafic du canal mutant $Na_v1.1$ -M1941T (*Rusconi et al., 2007*).

Le lieu de l'association entre KCNE1 et KCNQ1 est sujet à controverse. Certaines équipes proposent que cette association se fasse dans la membrane cytoplasmique (*Grunnet et al., 2002; Romey et al., 1997*), pour d'autres elle serait beaucoup plus précoce, dans le RE (*Krumerman et al., 2004*). Krumerman et al. montrent que la mutation L51H de KCNE1 provoque une rétention de KCNE1 et de KCNQ1 dans le RE ce qui suggère que l'association entre KCNQ1 et KCNE1 a lieu précocement. De plus, l'équipe de Kobertz a publié récemment des résultats en faveur d'un assemblage précoce. Ils montrent notamment que la forme mature glycosylée de KCNE1 apparaît en présence de KCNQ1 mais pas en présence de KCNQ4 (qui ne s'associe pas à KCNE1). De même, KCNE1 n'est présent à la surface des cellules que si KCNQ1 est également exprimé (*Chandrasekhar et al., 2006*). Ces résultats suggèrent donc que la maturation de KCNE1 ne peut pas se faire en l'absence de KCNQ1. Si l'on suppose que cette association est précoce, ce qui semble être le cas au vu des résultats de Kobertz, on peut penser que KCNE1, de même que les sous-unités β pour les canaux K_v , exerce un rôle chaperonne sur KCNQ1. Cependant, ce rôle chaperonne n'est pas évident. En effet, en système de réexpression COS et CHO, KCNQ1 peut sortir du RE en l'absence

de KCNE1, à l'inverse chez des souris KO KCNE1, le trafic de KCNQ1 ne s'effectue pas normalement (Nicolas et al., 2001).

L'un des objectifs de ce travail de thèse était d'évaluer le potentiel chaperonne de KCNE1 sur la biosynthèse de KCNQ1.

B. Dégradation des canaux ioniques.

1. Notions d'UPR et d'ERAD.

a. L'UPR : définition et activation.

Lorsque la cellule est placée en conditions de stress telles que la perturbation de l'homéostasie calcique, la privation en glucose, la surcharge de cholestérol ou lorsque ses capacités de synthèse protéique sont dépassées et que les protéines ne se replient plus correctement, les protéines s'accumulent dans le RE. Un ensemble de mécanismes visant à réduire la charge du RE se mettent alors en place ; c'est ce que l'on nomme l'« **unfolding protein response** » ou UPR. Trois senseurs au stress interviennent dans le déclenchement de l'UPR : la protéine IRE1 (sérine/thréonine protéine kinase/endoribonucléase), le facteur de transcription ATF6 (Activating Transcription Factor 6) et protéine kinase PERK (PKR-like associated kinase) (cf figure 17). En l'absence de stress du RE, ces senseurs sont réprimés par la chaperonne de RE BiP. Si les protéines mal repliées s'accumulent dans le RE, BiP¹⁶ est recrutée par ces protéines et libère les senseurs qui déclenchent l'UPR.

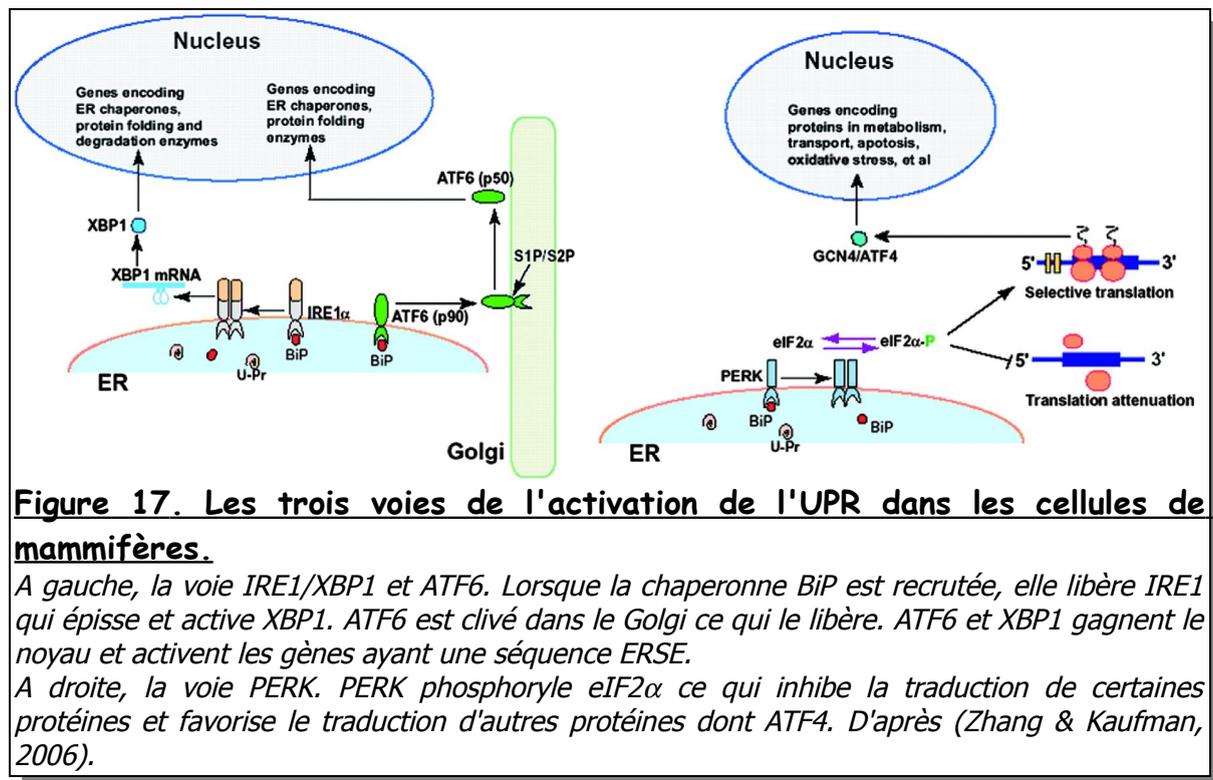
Dès lors, IRE1 épisse l'ARNm du facteur de transcription XBP1 (suppression de 26 bp) qui est alors traduit sous sa forme active. ATF6 est par ailleurs activé par une protéase de la membrane du Golgi. XBP1 et ATF6 activés gagnent le noyau et se fixent alors en amont des gènes de la réponse au stress qui sont reconnus grâce à des séquences ERSE (ER Stress Response Element). Ces gènes codent pour des chaperonnes (dont BiP) et des protéines de **ERAD** (ER Associated Degradation) dont les

¹⁶ BiP : chaperonne de la famille des GRP pour Glucose Related Protéins. Elles sont sur-exprimées lors des privation en glucose.



EDEM.

Lorsque l'UPR est activée, PERK phosphoryle le facteur d'initiation de la transcription $eIF2\alpha$ ce qui empêche la formation du complexe $eIF2/GTP/Méthionine-tRNA$ réduisant ainsi la **traduction**. $eIF2\alpha$ peut aussi favoriser la traduction du facteur de transcription ATF4 qui va activer des gènes du métabolisme des a.a., des réactions red/ox et de l'apoptose.



L'UPR agit donc par **trois mécanismes** : réduction de la transcription et de la traduction et augmentation de la dégradation des protéines (Zhang & Kaufman, 2006). Si l'UPR persiste, les voies IRE1, caspase-12 et PERK/ATF4 aboutissent à l'apoptose.

En 2006, Bernales et al. ont décrit un phénomène qu'ils ont observé chez la levure induite en UPR. Au cours de ce phénomène, qu'ils ont appelé ER-phagie, des auto-phagosomes incorporent des morceaux de la membrane du RE. Cette voie permettrait de limiter l'extension du RE observée au cours de l'UPR et de séquestrer les protéines mal repliées mais ce n'est pas un mécanisme de dégradation de ces pro-

téines (Bernales et al., 2006). Ce processus d'autophagie au cours de l'UPR a également été observé dans des cellules de mammifères (Ogata et al., 2006). Elle est dépendante de la voie IRE-1 mais indépendante des voies PERK et ATF6. Chez la levure comme chez la cellule de mammifère, l'ER-phagie joue un rôle important dans la sur-

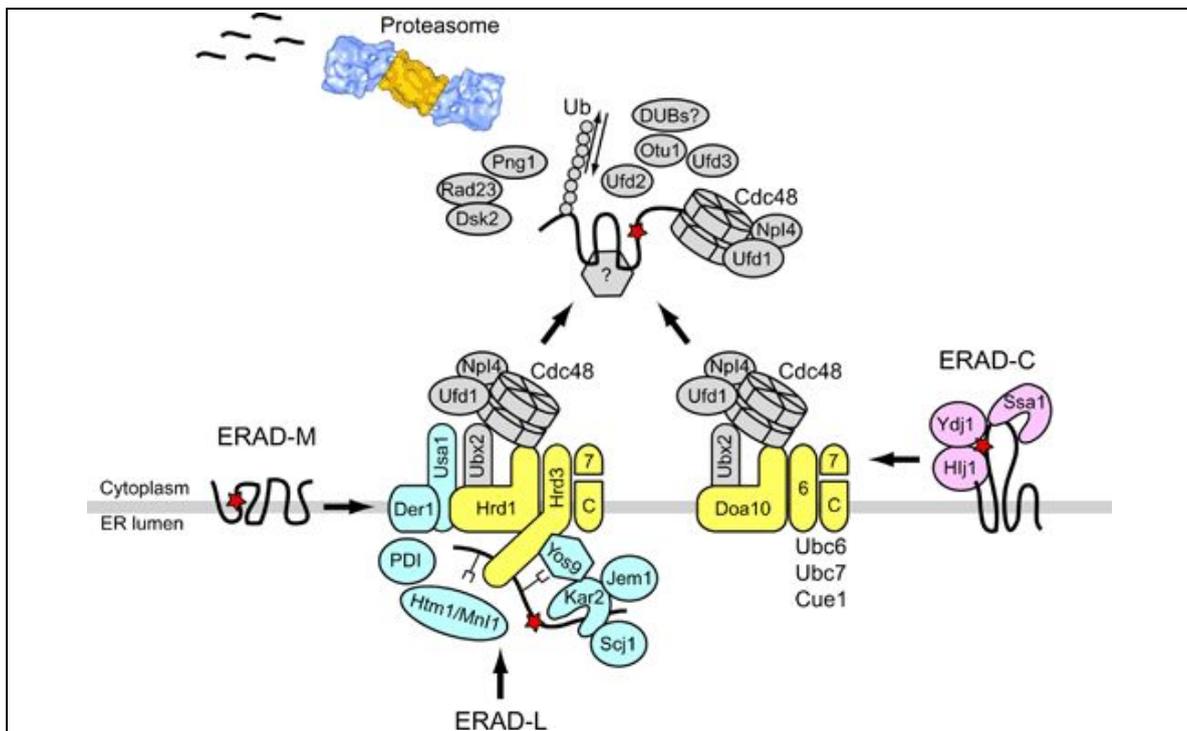


Figure 18. Les différentes ERAD : ERAD-M, ERAD-L, ERAD-C chez la levure.

Sur ce schéma, la protéine destinée à l'ERAD est représentée par un serpentin noir. L'étoile rouge représente la localisation du mauvais repliement.

Les substrats de l'ERAD-L sont reconnus par les chaperonnes de la famille des Hsp70/Hsp40 (Kar2, Jem1 et Scj1), la protéine PDI, la lectine Yos9 et le domaine luminal de Hrd3 (E3). La protéine Usa1, spécifique de l'ERAD-L, fait le lien entre Hrd1 et Der1 qui n'est nécessaire que pour l'ERAD-L (chez la levure). Les substrats de l'ERAD-M sont reconnus par l'E3 Hrd1. Les substrats de l'ERAD-C sont reconnus par les chaperonnes cytosoliques de la famille des Hsp70/Hsp40 (Ssa1, Ydj1 et Hlj1) puis par l'E3 Doa10. Les protéines Ubc6, Ubc7 et Cue1 sont des enzymes E2.

Ainsi, les chaperonnes qui reconnaissent le substrat (en bleu pour l'ERAD-L et en rose pour l'ERAD-C) et les ubiquitines ligases (en jaune) sont ce qui différencie les trois ERAD. Les trois voies ont en commun : l'AAA-ATPase Cdc48 (et ses cofacteurs Ufd1 et Npl4) qui est recrutée par la protéine Ubx2. Les protéines rétrotransloquées peuvent subir des modifications de leur chaîne d'ubiquitine par Ufd2 (enzyme E4) et les désubiquitinases (Rpn1 et Otu1). Elles sont dirigées vers le protéasome par les protéines Rad23 et Dsk2. Les N-glycanes des protéines glycosylées sont supprimés par la protéine Png1.

Les noms des protéines homologues chez les mammifères sont données dans le tableau II. D'après (Nakatsukasa & Brodsky, 2008)



vie de la cellule au cours de stress du RE.

L'UPR peut être déclenchée par des mutations comme cela a été montré pour le canal hERG et la mutation I593R associée au syndrome du QT long (*Keller et al., 2005*). Les auteurs ont observé, dans des cellules transfectées avec hERG I593R, que le canal muté était retenu dans le RE, que la voie ATF6 était activée et l'expression des chaperonnes GRP78 (BiP), GRP94 et calréticuline était augmentée.

In vitro, l'UPR peut être déclenchée par des agents réducteurs des ponts di-sulfure comme le DTT, des inhibiteurs de la glycosylation comme la tunicamycine et des agents qui vident le Ca^{2+} du RE comme la thapsigargine (*Nozaki et al., 2004*).

L'activation de l'UPR peut être détectée par une augmentation du niveau d'expression des chaperonnes dont la protéine BiP, par une augmentation du niveau d'expression du facteur ATF6 ou par l'apparition de la forme courte de l'ARNm XBP1. Un modèle animal original a d'ailleurs été développé pour mettre en évidence l'activation de l'UPR. Il s'agit d'une souris transgénique dans laquelle un gène codant pour XBP1 fusionné à la GFP a été introduit. Ainsi, lorsque l'UPR est activée dans un organe ce dernier devient vert (*Iwawaki et al., 2004*).

b. L'ERAD ou la dégradation des protéines du réticulum endoplasmique.

L'ERAD (pour ER Associated Degradation) est l'ensemble des mécanismes qui interviennent pour éliminer les protéines mal repliées du RE. Le terme ERAD a été introduit en 1996 (*McCracken & Brodsky, 1996*).

La reconnaissance des protéines mal repliées met en jeu la N-glycosylation, la calnexine, la calréticuline et les protéines EDEM pour les protéines glycosylées ; les chaperonnes BiP, PDI (Protein Disulfide Isomérase) et Eps1p qui reconnaissent les segments hydrophobes. Le domaine mal replié peut être cytoplasmique, dans ce cas la reconnaissance se fait par les chaperonnes cytosoliques de la famille de Hsp70 et par la chaperonne CHIP du RE (*Meusser et al., 2005*). Des études réalisées chez la levure, avec des substrats modèles, ont montré que les protéines intervenant dans la

reconnaissance des protéines mal repliées était fonction de la zone du « misfolding » (cf figure 18) (Carvalho et al., 2006; Taxis et al., 2003; Vashist & Ng, 2004). Ainsi, les protéines présentant un « misfolding » luminal sont prises en charges par l'ERAD-L dont les composants sont Cdc48 (p97)¹⁷, Hrd1¹⁸ (HRD1), Hrd3 (SEL1L), Der1 (Derlin-1), Usa1, Yos9 (OS9) et Htm1 (EDEM). Les « misfoldings » membranaires (ERAD-M) font intervenir Cdc48, Hrd1 et sont indépendants de Der1 et Usa1. Enfin, les « misfoldings » cytosoliques nécessitent les mêmes composants que l'ERAD-M en remplaçant Hrd1 par Dao10. Une voie indépendante des ubiquitine ligases HRD et DER a été décrite (Haynes et al., 2002). Nommée HIP (Hrd1 Independent Pathway), cette voie fait intervenir Rsp5p, une autre ubiquitine ligase. Elle intervient dans la dégradation des protéines luminales et membranaires en parallèle de la voie HRD/DER dépendante. Cette voie fait intervenir un trafic entre les RE et l'appareil de Golgi mais l'effecteur final reste le protéasome.

Tableau II. Correspondance des noms des protéines de l'ERAD chez les mammifères et les levures (d'après (Nakatsukasa & Brodsky, 2008)).

Mammifères	Levure	Mammifères	Levure
<i>Cytosoliques et associées à la membrane du RE</i>		<i>Associées à la membrane du RE</i>	
p97-UFD1-NPL4	Cdc48-Ufd1-Npl4	gp78	
Carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein (CHIP)		HRD1-SEL1L	Hrd1p-Hrd3
FBX2		RMA1	
Parkin		TEB4	Doa10
ATX3		Ubc6e	Ubc6
Rad23	Rad23	Ubc7	Ubc7
N-glycanase	Png1	HERP	Usa1
<i>Dans la lumière du RE ou associées à la membrane du RE</i>		VIMP	
OS-9 et XTP3-B	Yos9	Derlin-1 -2 -3	Der1

17 Entre parenthèse, les protéines dans les cellules de mammifères, les autres sont les protéines de levures.

18 Les Hrd sont des ubiquitine ligases.



EDEM-1 -2 -3	Htm1/Mnl1	Sec61	Sec61
BiP	BiP		
PDI	PDI		

Avant 1995, on pensait que les protéines du RE étaient dégradées dans le RE (*Fra & Sitia, 1993*). Depuis, il a été démontré que la principale voie de dégradation pour les protéines du RE est le système **ubiquitine protéasome** (ERAD-1) dont les effecteurs sont situés dans le cytoplasme. Pour pouvoir être dégradées par cette voie, les protéines doivent donc être extraites du RE : on parle de **rétrotranslocation**¹⁹. D'autres voies de dégradations ont également été évoquées dans le cadre de l'ERAD mais sont moins bien caractérisées, notamment la voie de **l'autophagie** également appelée ERAD-2 (*Fujita et al., 2007*).

2. L'ERAD-1 : dégradation des protéines par le système ubiquitine protéasome.

En 1995, deux équipes publient des résultats montrant que la dégradation du canal chlore CFTR, dont des mutations sont responsables de la mucoviscidose, est dépendante de la voie de l'ubiquitine protéasome (*Jensen et al., 1995; Ward et al., 1995*). Ce fut la première démonstration de l'existence d'une dégradation des protéines du RE en dehors du RE. On pense aujourd'hui que c'est la principale voie de dégradation des protéines du RE.

a. La retrotranslocation ou comment les protéines quittent le RE pour être dégradées.

La retrotranslocation est le processus qui permet à une protéine de passer de la membrane ou de la lumière du RE vers le cytoplasme, lieu de sa dégradation par le protéasome. Quelques protéines peuvent être extraites directement par le protéasome (*Mayer et al., 1998; Walter et al., 2001*). Cependant, le fait d'inhiber le protéasome

¹⁹ En anglais, les termes retrotranslocation ou dislocation sont employés.

some conduit à une accumulation des protéines dans le cytosol et non dans le RE, la retrotranslocation n'est donc pas inhibée (*Wiertz et al., 1996*). De plus, des mutations sur la sous-unité 19S du protéasome n'inhibent pas la rétrotranslocation (*Jarosch et al., 2002*). D'autres protéines interviennent donc dans le rétrotranslocation. Il s'agit de l'AAA-ATPase p97, qui fournit l'énergie pour la rétrotranslocation et d'un canal protéique qui permet le passage vers le cytosol.

i. La AAA-ATPase p97 et l'ubiquitination : le moteur et le signal pour la rétrotranslocation.

Il a été montré chez la levure que la protéine AAA-ATPase Cdc48 et deux de ses cofacteurs Ufd1 et Npl4 étaient nécessaires à la retrotranslocation (*Ye et al., 2001*). En effet, des mutations sur ces protéines provoquent un ralentissement de la dégradation et une accumulation des protéines dans le RE. La protéine **p97 (ou VCP)**, l'homologue de cdc48 dans les cellules de mammifères, joue un rôle similaire. En effet, en présence d'un dominant négatif de p97, incapable d'hydrolyser l'ATP, la rétrotranslocation des chaînes lourdes du CMH de classe 1 est inhibée (*Ye et al., 2001*). Le rôle de la p97 est d'extraire la protéine de la membrane. Récemment, il a été montré qu'une des AAA-ATPases du protéasome (Rpt4) participait également à la rétrotranslocation (*Lipson et al., 2008*).

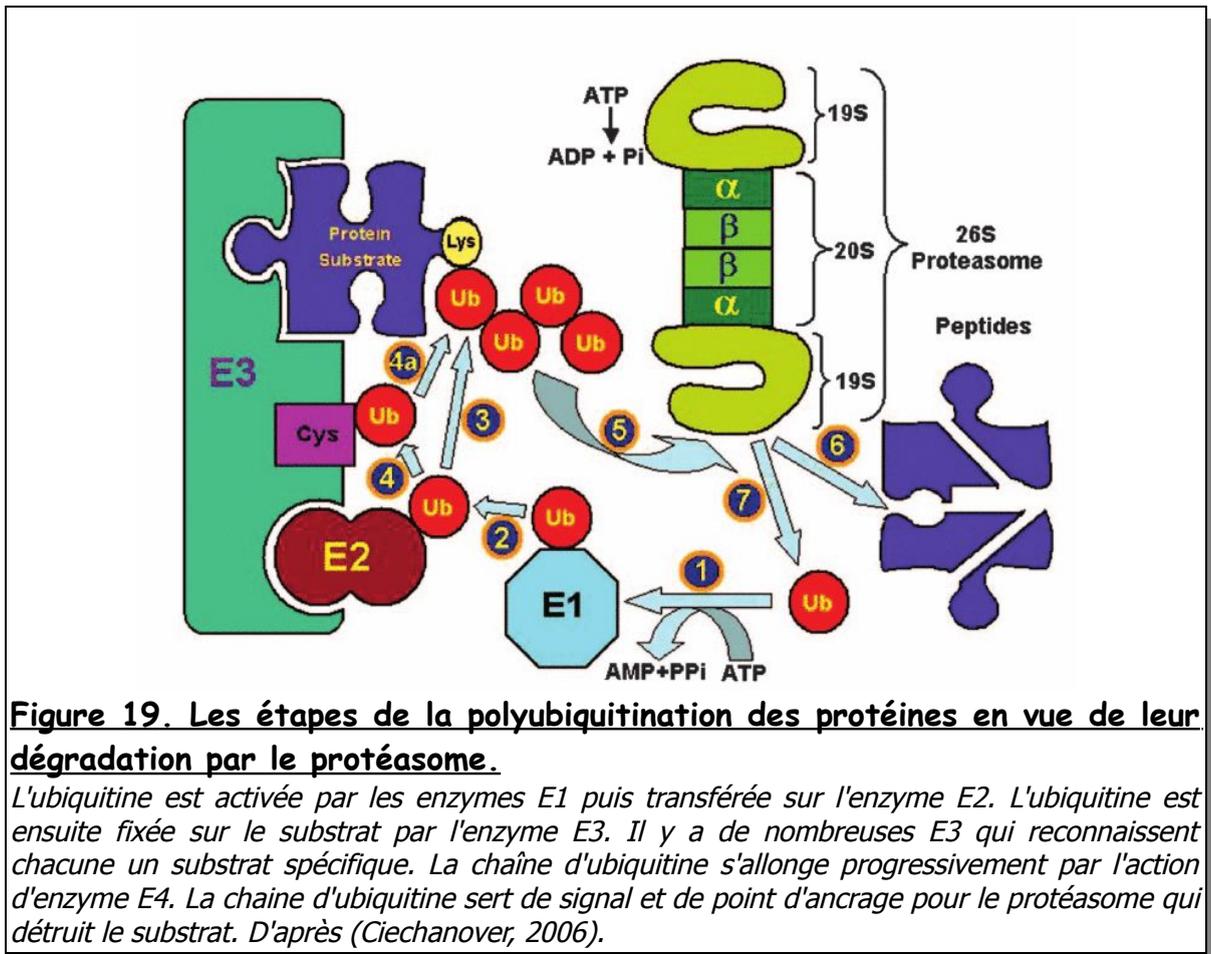
Les protéines destinées à être dégradées par le système ubiquitine protéasome sont **polyubiquitinées**, c'est à dire qu'une chaîne d'au moins quatre ubiquitines leur est greffée. L'ubiquitination est assurée par trois groupes d'enzymes qui interviennent successivement (cf figure 19) :

- les enzymes E1 (ubiquitin activating enzyme) qui sont peu nombreuses et activent l'ubiquitine
- les enzymes E2 (ubiquitin conjugating enzyme) enchassées dans la membrane de RE, telles que Ubc7, Ubc1, Cue1, Ubc6 qui récupèrent l'ubiquitine activée par les E1
- et enfin, les ubiquitines ligases E3, enchâssées dans la membrane du RE, telle que Hrd1p/Der3p qui reconnaissent leur substrat et lui transfèrent l'ubiqui-



tine (Bays et al., 2001a; Glickman & Ciechanover, 2002; Lederkremer & Glickman, 2005).

L'ubiquitination a lieu avant le retrotranslocation. En effet, lorsque la rétrotranslocation est inhibée, les protéines ubiquitinées s'accumulent dans la membrane du RE (Bays et al., 2001b). De plus, l'ubiquitination est nécessaire à la rétrotranslocation



(Jarosch et al., 2002) et la protéine p97 se fixe directement sur des substrats ubiquitinés (Meyer et al., 2002) mais elle peut également reconnaître des segments non ubiquitinés (Ye et al., 2003).

- ii. Sec61 et Derlin-1 deux candidats pour former le canal permettant le passage vers le cytosol.

Le premier et principal candidat pour former le pore de retrotranslocation est le

translocon²⁰ (**Sec61**). En effet, il a été montré que la chaîne lourde du complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1 (CMH-1) s'associait avec la protéine Sec61 et était exportée dans le cytoplasme avant d'être dégradée (*Wiertz et al., 1996*). De plus, il existe des mutations sur la protéine Sec61 qui réduisent la rétrotranslocation chez la levure (*Pilon et al., 1997; Plemper et al., 1997*). La taille du pore du translocon a été estimée à 60 Å par microscopie électronique (*Hamman et al., 1997*) mais les structures cristallographiques récemment obtenues montrent qu'elle serait plus petite et ne dépasserait pas 35 Å (*Van den Berg et al., 2004*). Pour passer par ce pore, les protéines doivent être donc être dépliées (*Fagioli et al., 2001; Tsai et al., 2001*). Il a cependant été montré que des protéines de grosse taille comme la chaîne lourde du CMH-1 fusionnée à la GFP²¹ (*Fiebiger et al., 2002*) ou à la dihydrofolate reductase (40 Å de diamètre) (*Tirosh et al., 2003*) pouvaient être rétrotransloquées sans être dépliées. Ces observations ne sont pas compatibles avec la taille du translocon de 35 Å ; soit le translocon existe sous une forme dilatée, soit il existe d'autres pores de plus grande taille. Au final, même s'il est certain que le translocon participe à la rétrotranslocation, il y a d'autres acteurs qui interviennent au cours de cette étape de l'ERAD (*Scott & Schekman, 2008*).

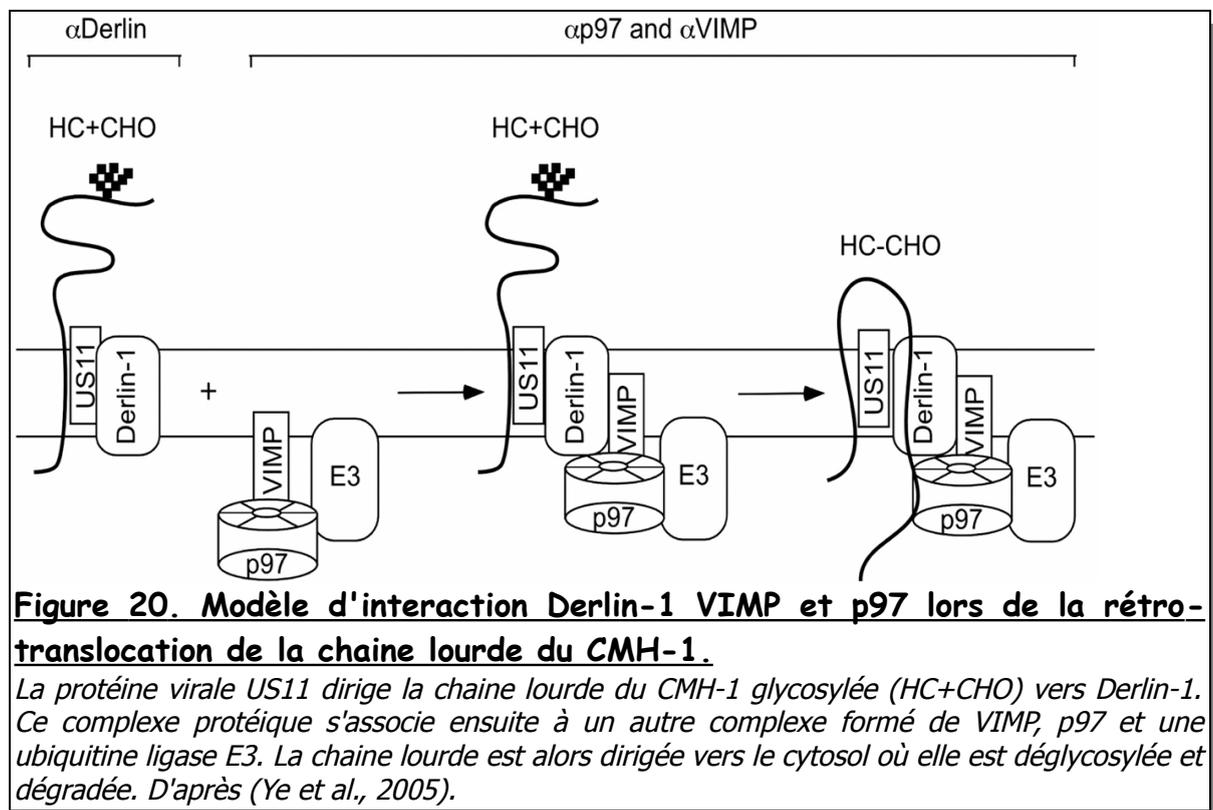
Il a été proposé que des pores de grande taille, résultant de l'association de plusieurs sous-unités puissent se former transitoirement. En 2004, Ye et al. ont mis en évidence par co-immunoprécipitation une association entre les protéines **Derlin-1**, VIMP (VCP interacting membrane protein) et p97 (cf figure 20). Ils ont de plus montré que ces protéines étaient nécessaires à la rétrotranslocation de la chaîne lourde du CMH de classe 1 initiée par la protéine virale US11 (*Ye et al., 2004*). Simultanément, une autre équipe a obtenu des résultats similaires et montré qu'un dominant négatif de la protéine Derlin-1 stabilisait la chaîne lourde du CMH-1 (*Lilley & Ploegh, 2004*). Les deux équipes ont montré que la protéine Derlin-1 n'interagissait pas directement avec son substrat (CMH-1 HC) mais par l'intermédiaire de la protéine virale US11. Ils ont proposé, d'une façon plus générale, que les protéines devant être rétro-

20 Le translocon est le canal qui permet aux protéines membranaires d'être insérées dans la membrane du RE.

21 GFP : green fluorescent protein



transloquées sont dirigées vers Derlin-1 par des protéines intermédiaires qui sont probablement les chaperonnes. Enfin, les deux équipes ont suggéré que la protéine Derlin-1, enchâssée dans la membrane du RE par quatre segments transmembranaires (Lilley & Ploegh, 2004), puisse faire partie du pore permettant la rétrotranslocation ; mais ceci n'est pas formellement démontré. Cette hypothèse est confortée par le fait que, durant la rétrotranslocation, le substrat interagit d'abord avec Derlin-1 puis avec la p97 (cf figure 20) (Ye et al., 2005). Depuis sa mise en évidence, la protéine Derlin-1 a été impliquée dans le dégradation d'autres protéines membranaires : le récepteur à la vasopressine (Schwieger et al., 2007) et les canaux ioniques $K_{Ca}2.3$, $K_{Ca}3.1$ (Gao et al., 2008) et CFTR (Sun et al., 2006a). L'effet de la protéine Derlin-1



est d'ailleurs très important sur ces canaux ; en effet, une diminution de 70% de l'expression de la protéine Derlin-1 par shRNA augmente le niveau d'expression des canaux K_{Ca} par 5 et CFTR par 10 (Gao et al., 2008; Sun et al., 2006b).

Chez les mammifères, la famille des Derlin compte trois membres : Derlin-1, Derlin-2 et Derlin-3. La protéine Derlin-2 est une protéine du RE capable de former un

complexe avec p97 et elle participe à la dégradation des protéines du RE (*Lilley & Ploegh, 2005*), en particulier des protéines glycosylées (*Oda et al., 2006*). De plus, les protéines Derlin-2 et 3 sont capables de former avec Derlin-1 des hétérotétramères, ce qui appuie l'hypothèse selon laquelle les protéines Derlin forment le canal de retrotranslocation (*Lilley & Ploegh, 2005*). L'expression de la protéine Derlin-3 est restreinte comparée à celle des Derlin-1 et 2 dont l'expression est ubiquitaire (*Oda et al., 2006*). La protéine Derlin-1 n'a pas été observée par WB ni dans le cerveau ni dans le coeur de souris (*Lilley & Ploegh, 2004*) mais les ARNm de Derlin-1 ont été isolés par northern blot à partir de coeurs d'hommes (*Oda et al., 2006*).

b. Le système ubiquitine protéasome.

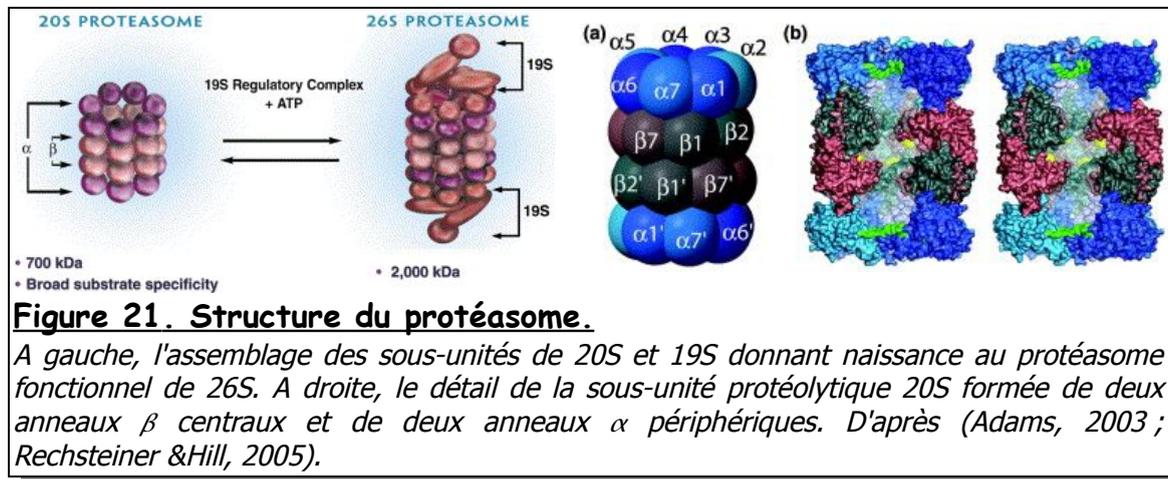
Lorsque les segments glycosylés émergent dans le cytosol une N-glycanase supprime les oligosaccharides (*Hirsch et al., 2003*). Les protéines ubiquitinées et déglycosylées sont ensuite dégradées par l'effecteur finale de l'ERAD : **le protéasome**.

L'adressage des protéines ubiquitinées vers le protéasome se fait par des récepteurs à l'ubiquitine comme les protéines Rad23 et Dsk2. Ces récepteurs ont un domaine ubiquitin-like (UBL) qui est reconnu par le protéasome et un domaine ubiquitin-associated (UBA) qui reconnaît l'ubiquitine (*Elsasser & Finley, 2005*). Le protéasome peut également se fixer sur la p97 (*Kalies et al., 2005; Ng et al., 2007*) ce qui le rapproche des protéines à extraites du RE et appuie l'idée que le protéasome participe à la rétrotranslocation.

Le protéasome a été caractérisé entre la fin des années 70 et le début des années 90, principalement grâce aux équipes de Goldberg A. et Ciechanover qui ont étudié l'activité protéolytique d'extraits de réticulocytes (*Ciechanover, 2005; Etlinger & Goldberg, 1977*). Le protéasome est un complexe protéique de 26S doté d'une activité protéolytique. Il est composé de deux sous-unités : le noyau de 20S (ou Core Particule CP) et la sous-unité régulatrice de 19S (RP) (cf figure 21). La CP de 20S a été cristallisée (*Groll et al., 1997; Unno et al., 2002*). Elle est formée de quatre anneaux, deux anneaux β centraux et un anneau α à chaque extrémité. Chaque anneau est lui-même composé de 7 sous-unités. Globalement la structure du protéasome



some est comparable à celle d'un tonneau de 150 Å de long et 115 Å de large dont le centre est obstrué par les extrémités N-terminales des sous-unités α . L'activité catalytique du protéasome est localisée sur les sous-unités β , à l'intérieur du tonneau



(Groll et al., 1999). Le substrat ne peut donc être dégradé que s'il entre dans le tonneau, ce qui suppose des réarrangements de structure pour libérer le centre du tonneau.

Les extrémités du tonneau peuvent être fermées par les RP de 19S. Le rôle de ces sous-unités 19S (pas de structure disponible) est de fixer l'ubiquitine et d'engager les protéines vers le centre du tonneau où elles seront clivées. La sous-unité RP a une activité ATP-ase et fournit l'énergie nécessaire à l'activité du protéasome.

Les protéines CSN (COP9 signalosome) sont capables de s'associer avec le protéasome (Huang et al., 2005). Elles pourraient remplacer les sous-unités 19S et moduler l'activité du protéasome mais ceci n'est pas encore établi. Ces protéines sont douées d'une activité de déconjugaison de l'ubiquitine. A titre d'exemple, la protéine CSN5 participe à la dégradation de la protéine CFTR (Tanguy et al., 2008).

Le protéasome a trois activités protéolytiques distinctes : « chymotrypsin-like », « trypsin-like » et « caspase-like » (ou PGPH pour peptidylglutamyl-peptide hydrolysing) (Orlowski, 1990). Il clive les protéines en peptides de 2 à 23 a.a, (15% de fragments de 6 à 9 a.a.) (Kisselev et al., 1999). L'activité protéolytique du protéasome

peut être inhibée de façon irréversible par la lactacystine (*Dick et al., 1996; Fenteany et al., 1995; Fenteany & Schreiber, 1998*) et le NIPL₃-VS (*Bogyo et al., 1997*) ou de façon réversible par le MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-CHO) (*Adams et al., 1998*). Le MG132 appartient à la famille des acides peptidyl boronic et il inhibe environ 80 % de l'activité du protéasome (*Zafar et al., 2007*). Le protéasome peut également être inhibé par une surcharge protéique (*Bennett et al., 2005*). Lorsque le protéasome est inhibé, il a été observé la formation d'agrégats de protéines ubiquitinées en région périnucléaire. Ces agrégats, insolubles dans les détergents non ioniques, ont été appelés agrégosomes (*Johnston et al., 1998*). Ils ne sont observables que si le protéasome est inhibé ou lors de sur-expression protéique. De plus, leur formation est dépendante du réseau de microtubules. Les auteurs proposent que le rôle physiologique de ces agrégats soit de regrouper les protéines à éliminer lorsque le protéasome est surchargé de façon à favoriser leur élimination par autophagie (*Kopito, 2000*).

Le protéasome n'est pas la seule voie de dégradation des protéines du RE. En effet, des inhibiteurs du protéasome sont incapables de prévenir complètement la dégradation de la protéine CPY (protéine modèle, utilisé comme substrat de l'ERAD) ou du canal CFTR (*Gelman et al., 2002; Mancini et al., 2003*). Ceci suggère que d'autres voies de dégradation peuvent éliminer les protéines du RE.

3. Les alternatives à la voie de l'ubiquitine protéasome au cours de l'ERAD.

De nombreuses études suggèrent que, les protéines engagées dans l'ERAD, peuvent être dégradées par d'autres voies que le protéasome. Ces voies alternatives sont encore mal caractérisées. J'en donne ci-dessous quatre exemples ; pour une revue plus large voir (*Schmitz & Herzog, 2004*).

a. Dégradation cytosolique, indépendante du protéasome.

Il a été montré que l'amiloïde β était dégradée dans le cytosol par le protéasome et par une autre protéase : l'insulin degrading enzyme (*Schmitz et al., 2004*).



b. Dégradation *via* le lysosome (ERAD-II).

En plus de la voie de l'ubiquitine protéasome, la cellule dispose de l'autophagie pour éliminer les protéines mal repliées qui s'accumulent dans le RE (*Fujita et al., 2007*). Les auteurs ont étudié la dégradation de la dysferline, une protéine transmembranaire de type II dont des mutations provoquent son accumulation dans le RE. Ils ont montré que la protéine sauvage était dégradée par la voie de l'ubiquitine protéasome mais que la dégradation de la protéine mutante était dépendante de l'autophagie. En effet, l'inhibition du protéasome ne favorisait pas l'accumulation de la protéine mutante, alors que des inhibiteurs des protéases du lysosome (E64d/pepstatine A) favorisaient cette accumulation dans le RE (mais pas celle de la protéine WT). Les auteurs proposent d'appeler cette voie de dégradation ERAD-II.

c. Dégradation dépendante d'une sérine protéase.

Certaines protéines peuvent être dégradées directement dans le RE. C'est le cas pour un mutant de la protéine BiP. La protéine BiP est une protéine soluble située dans la lumière du RE. Donoso et al. ont étudié la dégradation de la protéine BiP WT et d'un mutant BiPdeltaA (*Donoso et al., 2005*). Ils ont observé que trois inhibiteurs du protéasome (MG132, lactacystine et NLVS) stabilisaient la protéine WT mais pas la protéine mutante ce qui suggérait que la protéine mutante n'était pas dégradée par le protéasome contrairement à la protéine WT. La dégradation des protéines mutantes était de plus indépendante de l'ATP (traitement par deux inhibiteurs de la synthèse d'ATP : l'antimycine A et au 2-desoxy-D-glucose). En cellules semi-perméabilisées, dans lesquelles le transport vésiculaire est impossible car il n'y a ni GTP ni ATP, la vitesse de dégradation du mutant restait identique ; les auteurs ont donc exclu la participation d'un transport vésiculaire et une dégradation par les lysosomes. Lorsqu'ils ont traduit *in vitro* les protéines BiP mutantes et WT dans des réticulocytes, ils ont observé que seule la protéine mutante était dégradée ce qui suggérait que la protéase était située dans le RE. Pour vérifier cela, les auteurs ont mélangé des extraits de RE avec des protéines BiP obtenues par synthèse bactérienne. Dans ces

conditions, seule la protéine mutante était dégradée ce qui confirmait la présence de la protéase en question dans le RE. Cette protéase étant inhibée par le PMSF et AEBSF il s'agit d'une sérine protéase. Le mécanisme par lequel cette protéase discrimine la protéine WT de la mutante n'est pas connu.

d. Dégradation dans le RE et GTP dépendante.

Il a été montré récemment que la protéine CFTR- Δ F508, principale mutation identifiée chez les patients atteints de la mucoviscidose, était dépendante du GTP (*De Keukeleire et al., 2008*). Les auteurs montrent qu'après 6 heures de traitement inhibant le protéasome à 80 %, il ne reste que 10 % de protéine CFTR, ce qui leur fait dire qu'une autre voie intervient. De plus, lorsqu'ils épuisent l'ATP cellulaire, ils observent une dégradation accélérée ; ce résultat est surprenant mais l'activité protéolytique du protéasome étant dépendante de l'ATP, ce résultat va dans le sens d'une dégradation indépendante du protéasome. A l'inverse, l'épuisement du GTP, obtenu par un traitement au MPA (150 μ M), stabilise la protéine CFTR ce qui suggère que la dégradation de la protéine CFTR est GTP dépendante. Ce résultat a été confirmé par un traitement par l'ALF4, un inhibiteur des protéines G hétérotrimériques. Le lieu de cette dégradation ne semble pas être cytosolique car elle persiste sur des cellules perméabilisées. Il ne semble pas non plus être lysosomal car l'inhibition du trafic ER Golgi par la bréfeldine A ne ralentit pas la dégradation. Finalement, la dégradation est observée sur un enrichissement de microsomes du RE suggérant qu'elle a lieu dans le RE. Toutefois, aucune protéase n'a été identifiée. Plusieurs points sont surprenants dans cet article. D'abord la concentration de MPA est une forte dose, généralement 1 à 2 μ M sont utilisés pour réduire la contenance de la cellule en GTP (*Bolin &Cardozo-Pelaez, 2007; Cohen et al., 1981*), au delà l'ATP et la concentration des autres nucléotides est également réduite. De plus, les auteurs ne parlent d'aucun effecteur.



C. Le contrôle qualité des protéines et pathologies.

1. Les maladies conformationnelles.

De nombreuses maladies sont associées à des défauts de maturation et à l'accumulation de protéines dans les cellules ; on les appelle « maladies conformationnelles » (*Yoshida, 2007*). Parmi elles on compte la maladie d'Alzheimer due à des dépôts d'amiloïde, la maladie de Parkinson dont un des gènes responsable, Parkin, code pour une ubiquitine ligase E3 capable d'interagir avec CHIP et Hsp70 (*Imai et al., 2002*).

In vitro, les effets toxiques du prion PrP^{Sc}, l'agent de la maladie de « la vache folle », peuvent être prévenus par la sur-expression de la protéine GRP78 ce qui suggère que cette maladie est due à un défaut de biosynthèse.

Dans le champ de la cardiologie, l'UPR et le contrôle qualité ont été particulièrement étudiés dans le cadre de l'ischémie de reperfusion et dans les cardiomyopathies hypertrophiques. Ainsi, chez la souris, il a été montré que l'UPR était activée dans des cardiomyocytes ventriculaires isolés et placés en milieu hypoxique, et, *in vivo*, les cardiomyocytes proches d'une zone infarctée ont une UPR activée (*Thuerauf et al., 2006*). Les cardiomyopathies dues à la desmine sont un exemple de cardiomyopathies impliquant le système ubiquitine protéasome. Elles sont dues à des mutations de la desmine (*Dalakas et al., 2000*) qui provoquent son accumulation dans le sarcoplasme et une inhibition du protéasome (*Liu et al., 2006*). Des souris transgéniques, mutées sur le récepteur au KDEL, développent une cardiomyopathie dilatée (*Hamada et al., 2004*). Les cardiomyocytes de ces souris présentent une accumulation de protéines ainsi qu'une sensibilité accrue au stress. Ces résultats suggèrent qu'un défaut du contrôle qualité peut provoquer une CMD.

2. La mucoviscidose : un modèle de canalopathie due à un défaut de trafic.

La mucoviscidose est une maladie monogénique, récessive, causée par des mutations sur le gène CFTR (*Riordan et al., 1989*). Ce gène code pour un canal chlore

AMPC dépendant qui régule la composition des fluides épithéliaux. Actuellement, près de 1600 mutations du gène CFTR ont été identifiées chez des patients souffrant de la mucoviscidose (*GenetSickkids website, 2008*), mais près de 70 % des patients portent la mutation $\Delta F508$ (*Zielenski & Tsui, 1995*). Cette mutation provoque un mauvais repliement de la protéine et secondairement un défaut de localisation intra-cellulaire du canal CFTR (*Cheng et al., 1990; Kartner et al., 1992*). La protéine mutante est retenue dans le RE sous forme core-glycosylée²², c'est à dire sous une forme immature de 135 à 140 kDa, et devient un substrat de l'ERAD. Elle est alors dégradée par le système ubiquitine protéasome (*Gelman et al., 2002*) et, selon certains auteurs, par une voie ATP-indépendante (*Jensen et al., 1995*) ou GTP-dépendante (*De Keukeleire et al., 2008*).

La biosynthèse du canal CFTR WT et $\Delta F508$ a été largement étudiée ce qui a permis d'identifier les acteurs qui interviennent au cours de la maturation de ce canal. Au cours de sa maturation, la protéine CFTR s'associe avec la Hsp70, Hsp90, Hsp40, HspBP1 et la calnexine (*Okiyoneda et al., 2008*). Ces interactions sont transitoires car seule la forme immature de CFTR (core-glycosylée) peut être co-immunoprécipitée (*Pind et al., 1994*). La calnexine favorise la maturation du canal CFTR (*Farinha & Amaral, 2005*) mais ne semble pas participer à la rétention du mutant $\Delta F508$ dans le RE. En effet, l'extinction de la calnexine ne permet pas de restaurer la maturation de la protéine mutante (*Farinha & Amaral, 2005*). De même, dans des cellules KO calnexine^{-/-}, la localisation de la protéine $\Delta F508$ reste inchangée (*Okiyoneda et al., 2008*).

La reconnaissance du défaut de repliement de la protéine $\Delta F508$ se fait par deux systèmes qui interviennent successivement et ubiquitinent le canal ce qui l'oriente vers le protéasome. Le premier senseur est un complexe protéique de la membrane du RE constitué par les protéines Ubc6e (une E2), RAM1 (une E3), Derlin-1 (*Younger et al., 2006*). Le deuxième senseur, cytosolique, fait intervenir la chaperonne cytosolique

²² La forme core-glycosylée est sensible à l'endoH alors que la forme mature (fully glycosylée) de 150 à 160 kDa est résistante à l'endoH (*Kopito, 1999*).



lique Hsc70, sa co-chaperonne CHIP (E3) et Ubch5a (une E2) (*Meacham et al., 2001; Younger et al., 2004*). Le rôle proposé pour la protéine Derlin-1 serait de reconnaître le misfolding transmembranaire et de rapprocher la p97 et les ubiquitines ligases (*Younger et al., 2006*).

La rétrotranslocation du canal CFTR fait intervenir les protéines Derlin-1, BAP31 et le translocon (*Sun et al., 2006b; Wang et al., 2008*). Wang et al proposent un modèle dans lequel BAP31 se fixe précocement sur le canal $\Delta F508$ et le dirige vers le complexe de rétrotranslocation formé par Derlin-1 et Sec61. Le rôle de la protéine Derlin-1 dans la dégradation du canal CFTR est majeure. En effet, en cellules HEK, sur-exprimer Derlin-1 réduit de 95 % le niveau d'expression de CFTR $\Delta F508$ (et WT) et raccourcit leurs demi-vies. De plus, la maturation de la protéine WT est ralentie ce qui suggère que la protéine Derlin-1 participe en partie à la rétention de la protéine CFTR dans le RE (*Sun et al., 2006b*).

3. Syndromes du QT long dus à des défauts de trafic.

a. LQT2.

Plusieurs mutations du canal hERG, responsables de LQT2, provoquent un défaut de trafic du canal (*Anderson et al., 2006*). Elles sont localisées dans la partie N-terminale, dans les segments transmembranaires, dans la région du pore ou dans la partie C-terminale de la protéine (*Delisle et al., 2004*). Il a été montré que le canal hERG WT, ainsi que deux mutants trafics déficients (R752W et G601S), interagissaient avec les chaperonnes Hsp70 et Hsp90 et que l'inhibition de la chaperonne Hsp90 (par la geldanamycine) empêchait la maturation et augmentait la dégradation du canal sauvage par le protéasome (*Ficker et al., 2003*). De plus, les mutants et les chaperonnes restaient associées au niveau du RE. Ces résultats montrent que les Hsp70 et Hsp90 participent au contrôle qualité du canal hERG, qu'elles sont en partie responsables de la rétention des mutants et qu'elles font partie des mécanismes physiopathologiques du LQT2.

Il a également été montré, que des mutations « défaut de trafic », telle que la mutation I593R, sont capables de déclencher l'UPR (*Keller et al., 2005*). En effet, dans des cellules transfectées avec le canal mutant I593R, le facteur de transcription ATF6 était activé et cette activation était accompagnée d'un doublement du niveau d'expression des chaperonnes GRP78, GRP94, calréticuline. Dans ces cellules, la voie NF-kappaB était également activée. Les auteurs proposent que cette activation de l'UPR participe aux mécanismes physiopathologiques du LQTS, indépendamment du défaut de trafic notamment *via* l'augmentation de la transcription du gène de la SERCA, l'augmentation du relargage du calcium sarcoplasmique et par l'activation de kinases. L'étude du mutant Y611H du canal hERG, une autre mutation responsable de LQT2 a montré que les protéines EDEM faisaient partie du contrôle qualité et que la dégradation de ce mutant était en grande partie dépendante du système ubiquitine protéasome (*Gong et al., 2005*).

Un grand nombre de médicaments ont pour effets secondaires d'inhiber le canal hERG et ont donc un effet arythmogène. Ils agissent soit en bloquant le pore du canal (effet précoce) soit en réduisant l'expression de la protéine à la surface des cardiomyocytes (effet tardif) (*van der Heyden et al., 2008*). Il a ainsi été montré que les glycosides cardiaques (dont la digoxine et la digitoxine²³) réduisaient le niveau d'expression du canal hERG à la surface des cellules en l'empêchant de sortir du RE (*Wang et al., 2007a*). Leurs effets dépendent de la concentration utilisée (IC₅₀: digoxine 73,1 nM ; digitoxine 13,9 nM) et sont visibles dans la gamme de concentrations plasmatiques observées chez des patients traités avec ces molécules.

b. LQT1.

Plusieurs mutations responsables de LQT1 provoquent un défaut de trafic du ca-

23 Dans cette étude, quatorze composés ont été testés. La digitoxine et la digoxine sont les seuls utilisés en clinique.



nal KCNQ1 et sa rétention dans le RE. Elles peuvent être localisées soit dans la partie C-terminale (Q530X, R594Q, R518X) soit dans la boucle S4-S5 (E261D et E 261K) du canal (*Wilson et al., 2005*). Notre équipe a de plus montré que des mutations situées sur la partie N-terminale (Y111C, L114P et P117L) provoquaient également un défaut de trafic et une rétention de la protéine mutante dans le RE (*Dahimène et al., 2006*). Cependant, contrairement aux canaux CFTR et hERG, les éléments du contrôle qualité responsable de cette rétention, ainsi que la voie de dégradation du canal KCNQ1 n'ont pas encore été caractérisés.

L'un des objectifs de ce travail de thèse était de caractériser les mécanismes de la rétention du mutant Y111C dans le RE et de déterminer la voie de dégradation principale du canal KCNQ1.

4. Perspectives thérapeutiques : le « trafficking rescue ».

Une perspective thérapeutique pour les maladies causées par une rétention dans le RE est de favoriser le repliement correcte des protéines mutées de façon à leur permettre de sortir du RE. Un test simple pour savoir si le défaut de maturation d'une protéine n'est pas trop sévère et s'il peut éventuellement être corrigé, consiste à étudier la maturation de la protéine à une **température réduite** (27°C) (*Aridor, 2007*). Il a ainsi été montré que la protéine CFTR $\Delta F508$ était capable d'acquérir un conformation normale à 27°C ce qui suggérait que son défaut de repliement pouvait être corrigé (*Denning et al., 1992*). Dès lors, différentes approches ont été utilisées pour restaurer la maturation de la protéine $\Delta F508$. L'utilisation de **chaperonnes chimiques**, telles que le glycérol ou le 4-phénylbutyrate, a permis de montrer qu'il était possible de provoquer la maturation du canal $\Delta F508$ à l'aide d'agents chimiques (*Sato et al., 1996; Singh et al., 2006*). Ces chaperonnes chimiques agissent de façon non spécifique en modifiant l'environnement cellulaire (*Gekko & Timasheff, 1981*). Il a été proposé que le 4-phénylbutyrate agisse en réduisant le niveau d'expression de Hsc70 (*Rubenstein & Zeitlin, 2000*), mais cette hypothèse est en contradiction avec d'autres expériences qui montrent que la sur-expression de la Hsp70 favorise la maturation de

la protéine $\Delta F508$ (Choo-Kang & Zeitlin, 2001). Une autre approche reposant sur des **chaperonnes pharmacologiques** et visant à cibler spécifiquement la protéine d'intérêt a été développée. Selon un modèle ligand récepteur, ces chaperonnes se fixent sur la protéine d'intérêt et induisent des modifications conformationnelles suffisantes pour permettre sa maturation. Des études de criblage, portant sur des milliers de molécules, ont mis en évidence des petites molécules capables d'augmenter la sécrétion de chlore sur des lignées de cellules épithéliales exprimant la canal $\Delta F508$ (Loo et al., 2005; Pedemonte et al., 2005; Van Goor et al., 2006). Ces molécules sont dérivées de la quinazoline (VRT-325), des thiazoles (corr-2b) et des bisaminométhylbithiazoles (corr-4a). Elles se fixent sur le canal mutant (Wang et al., 2007c) et agissent en favorisant, d'une part, le repliement du canal muté dans le RE (Loo et al., 2008), et, d'autre part, en prolongeant le temps de présence du canal à la surface de la cellule (Varga et al., 2008). Ces chaperonnes pharmacologiques fonctionnent également sur des cultures primaires de cellules épithéliales respiratoires issues de patients atteints de la mucoviscidose (Van Goor et al., 2006). Elles restaurent 10 % de la sécrétion de chlore, ce qui est peu, mais supposé suffisant pour restaurer la fonction des épithélia des patients $\Delta F508$ (Johnson et al., 1992). Lorsque ces chaperonnes sont employées en combinaison, leurs effets s'additionnent ; ainsi, près de 40% des protéines mutantes $\Delta F508$ sont retrouvées sous forme mature dans des cellules traitées par une association de VRT-325 et corr-2b (Wang et al., 2007b). Une dernière stratégie thérapeutique appelée **transcomplémentation** a été proposée (Cormet-Boyaka et al., 2004). Dans cette stratégie, l'expression de fragments peptidiques du canal CFTR sauvage permet de restaurer en partie l'expression du canal mutant $\Delta F508$ à la surface des cellules et de former des canaux chlore fonctionnels. Le mécanisme par lequel ces peptides agissent n'est pas connu mais les auteurs proposent un mécanisme d'action précoce, dans le RE : masquage de motifs de rétention ou de surfaces hydrophobes par exemple. Cette approche présente cependant deux limites. La première est le faible gain fonctionnel obtenu. En effet, le courant induit par l'AMPc, dans les cellules $\Delta F508$ transcomplémentées, reste bien inférieur à celui de cellules exprimant le canal sauvage. La seconde limite est la taille des « pep-



tides » utilisés qui font au minimum 630 acides aminés, c'est à dire la moitié de la protéine CFTR sauvage (1480 a.a.).

Le « trafficking rescue » a également été exploré pour certains mutants du canal hERG. Le canal mutant G601S présente un défaut de trafic qui peut être corrigé par un abaissement de température, des chaperonnes chimiques (*Ficker et al., 2003; Furutani et al., 1999*) et par les chaperonnes pharmacologiques VRT-422 et VRT-325. Ces dernières multiplient jusqu'à cinq fois l'expression du mutant G601S à la surface des cellules (*Van Goor et al., 2006*). Le canal mutant N470D, retenu dans le RE, peut voir son expression membranaire partiellement restaurée lorsque les cellules sont cultivées en présence d'E-4031, un inhibiteur pharmacologique de hERG (*Gong et al., 2004*). L'E-4031 agit au cours des étapes précoces de la synthèse du canal hERG, probablement dans le RE en favorisant le repliement correcte de la protéine (*Gong et al., 2006*).

Contrairement à ce qu'il est possible de faire pour les canaux hERG et CFTR, la restauration du trafic des canaux mutants de KCNQ1 est difficile. En effet, ni l'abaissement de température, ni l'emploi d'agents pharmacologiques (diisothiocyanostilbene, l'acide mefenamic) pourtant capables de restaurer les mutants KCNE1 dont le trafic est déficient, ni les inhibiteurs pharmacologiques de KCNQ1 (chromanolol293B, HMR1556) n'ont permis de restaurer le trafic des protéines mutantes R243H, E261D, 261K (*Wilson et al., 2005*). De même, cultiver à 26°C des cellules exprimant les mutants Y111C, L114P et P117L n'a pas permis de restaurer le trafic de ces canaux KCNQ1 mutants (*Dahimène et al., 2006*).

PARTIE 1 :

ÉTUDE DE LA DÉGRADATION DU CANAL KCNQ1
DANS LE SYNDROME DU QT LONG.



INTRODUCTION.

Dans une étude précédente, notre laboratoire a étudié les mutations Y111C, L114P et P117L de KCNQ1 identifiées chez des patients ayant un syndrome du QT long (*Dahimène et al., 2006*). Ces mutations sont situées dans la région N-terminale, à proximité du premier segment transmembranaire. Lorsqu'elles ont été exprimées dans des cellules COS-7, la protéine KCNQ1 n'était pas présente à la surface des cellules et était co-localisée avec un marqueur du RE. De plus, aucun courant potassique n'a pu être enregistré dans les cellules exprimant ces mutants. Ces résultats montrent que ces mutations empêchent la sortie du canal KCNQ1 du RE et provoquent ainsi sa perte de fonction. Ces mutations ont été identifiées chez des patients RW, c'est à dire des porteurs d'un allèle mutant et d'un allèle sauvage ; la co-expression des canaux mutés et du canal sauvage a donc été réalisée pour mimer les conditions physiopathologiques. Dans ces conditions, pour les mutants Y111C et L114P, le courant I_{Ks} était diminué de plus de 50%, sans que ses cinétiques ne soient altérées et la protéine mutante n'était pas exprimée à la surface des cellules. Ceci confirmait que l'effet dominant négatif responsable du syndrome de RW observé était dû à une rétention du canal KCNQ1 dans le RE. Un modèle structural a été réalisé et a suggéré que ces mutations puissent provoquer des changements de conformation importants à l'origine de cette rétention. Cependant, les mécanismes moléculaires par lesquels ces mutations provoquent la rétention du canal KCNQ1 dans le RE, ainsi que **les conséquences de cette rétention sur la biosynthèse du canal KCNQ1**, n'ont pas été étudiés au cours de cette première étude. Ces questions font l'objet du travail présenté dans cette partie des résultats.

La rétention dans le RE est due au contrôle qualité de la cellule et s'accompagne souvent d'une stabilité moindre de la protéine mutante comme cela a été montré pour les canaux CFTR (*Loo et al., 1998; Rubenstein & Zeitlin, 2000*), hERG (*Ficker et al., 2003*) ou encore $Ca_v2.1$ (*Mezghrani et al., 2008*). Les protéines « reconnues inaptes » par le contrôle qualité entrent dans l'ERAD (ER-Associated Degradation) ;



processus de dégradation au cours duquel elles sont exportées vers le cytosol (rétrotranslocation) puis dégradées par le protéasome. **La rétrotranslocation** s'effectue par un canal protéique dont les composants structuraux restent débattus. Un nouvel acteur de la rétrotranslocation, **la protéine Derlin-1**, a été identifiée en 2004 (*Lilley & Ploegh, 2004; Ye et al., 2004*) et impliquée entre autres dans la dégradation des canaux CFTR (*Sun et al., 2006b; Wang et al., 2008*) et K_{Ca} (*Gao et al., 2008*). Le rôle de Derlin-1 dans la **dégradation de KCNQ1** a été évalué et les résultats obtenus sont présentés dans cette partie du document.

Par ailleurs, le courant I_{Ks} cardiaque résulte de l'association entre le canal KCNQ1 et sa sous-unité régulatrice KCNE1 (*Barhanin et al., 1996*). L'effet de la protéine KCNE1 sur l'expression membranaire de KCNQ1 n'a pas fait l'objet d'études centrées sur cette question. Cependant, on pense que KCNE1 favorise l'expression membranaire de KCNQ1. Cette hypothèse est supportée par le fait qu'en présence de KCNE1 l'amplitude du courant KCNQ1 est fortement augmentée ce qui peut s'expliquer, soit par une augmentation du nombre de canaux à la membrane des cellules, soit par une augmentation de la conductance unitaire ou de la probabilité d'ouverture de chaque canal. Les résultats de Krumer et al., qui montrent que dans des cellules HEK-293 la mutation L51H sur KCNE1 réduit l'expression membranaire de KCNQ1 (*Krumer et al., 2004*), sont un autre argument qui appuie l'idée que KCNE1 favorise l'expression membranaire de KCNQ1. Dans cette partie, sont présentés des résultats qui concernent **l'effet de KCNE1 sur la stabilité** de KCNQ1 WT et Y111C.

Les objectifs du travail présenté dans cette première partie était donc :

- d'étudier les mécanismes et les conséquences de la mutation Y111C sur la biosynthèse du canal KCNQ1,
- d'évaluer le rôle de la protéine KCNE1 au cours de la synthèse de KCNQ1,
- d'évaluer le rôle de la protéine Derlin-1 dans la dégradation de KCNQ1.

RÉSULTATS : PREMIER ARTICLE.

BIOSYNTHÈSE DE KCNQ1 ET SYNDROME DU QT
LONG.



**LQT1 associated mutations increase KCNQ1
proteasomal degradation independently of Derlin-1.**

J. Biol. Chem.; 2009, Feb. 20; 284(8):5250-6

Peroz David^{1,2,3}, Dahimène Shehrazade^{1,2,3}, Baró Isabelle^{1,2,3}, Loussouarn Gildas^{1,2,3}, Mérot Jean^{1,2,3*}

1: INSERM, U915, Nantes, F-44000 France ;

2: CNRS, ERL3147, Nantes, F-44000 France

3: Université de Nantes, Faculté de Médecine, l'institut du thorax, Nantes, F-44000 France.

Running head: Proteasomal degradation of KCNQ1 LQT1 mutants.

*Corresponding author : Jean Merot, Faculté de Médecine INSERM U915 - 1 Rue G Veil - 44035
Nantes Cedex 01 France. Tel.: +33 2 40 41 29 85. E-mail : jean.merot@univ-nantes.fr

Abstract.

Mutations in the potassium channel KCNQ1 that determine retention of the mutated proteins in the endoplasmic reticulum (ER) are associated with the autosomal dominant negative Romano-Ward (RW) LQT1 cardiac syndrome. In the present study we have analysed the consequences and the potential molecular mechanisms involved in the ER retention of three RW mutations located in KCNQ1 N-terminus (Y111C, L114P and P117L). We showed that the mutant KCNQ1 proteins exhibited reduced expression levels with respect to wild-type (WT)-KCNQ1. Radio-labelling pulse chase experiments revealed that the lower expression levels did not result from reduced rate of synthesis. Instead, using a combination of Western blot and pulse chase experiments, we showed that the mutant channel Y111C-KCNQ1, used as a model, was ubiquitinated and degraded in the proteasome more rapidly ($t_{1/2}$ = 82 min) than WT-KCNQ1 channel ($t_{1/2}$ = 113 min). On the other hand, KCNQ1 degradation did not appear to involve the GTP-dependent pathway. We also showed that KCNE1 stabilized both wild-type and Y111C proteins. To identify potential actors involved in KCNQ1 degradation, we studied the implication of the ER resident protein Derlin-1 in KCNQ1 degradation. We showed that although KCNQ1 and Derlin-1 share the same molecular complex and co-immunoprecipitate when co-expressed in HEK293FT cells, Derlin-1 did not affect KCNQ1 steady state expression and degradation. These data were confirmed in T84 cells that express endogenous KCNQ1 and Derlin-1. siRNA knock-down of Derlin-1 did not modify KCNQ1 expression level and no interaction between endogenous KCNQ1 and Derlin-1 could be detected.

Keywords: Romano-Ward syndrome, ER Associated Degradation, channel

Introduction.

The long QT syndrome (LQT) is a cardiac arrhythmia characterized by the prolongation of the QT interval on the electrocardiogram and a high risk of sudden death (24). Among the different LQT described, type 1 LQT (LQT1) is caused by mutations in *KCNQ1* gene that result in the reduction of the repolarizing potassium cardiac current I_{Ks} . About 250 KCNQ1 mutations have been found in patients suffering from the LQT1 syndrome (20, 28, 31) and previous studies showed these mutations impede KCNQ1 channel function by multiple mechanisms including : abnormal gating or permeation (12), impaired channel assembly (27) and defective protein trafficking (3, 23, 26, 34).

As a membrane protein, KCNQ1 is synthesised in the ER and is subjected to a stringent quality control to ensure that only fully functional channels reach the plasma membrane (1, 5, 37). If the folding process fails, the channel is retained in the ER and eventually degraded by the ER associated degradation system (ERAD). In this context, ER resident molecular chaperones have the dual role to sense and assist the folding status of the proteins and to dispatch misfolded proteins for destruction. This conformation sensing system also includes enzymes that tag the misfolded protein with ubiquitin to target them to the proteasome. Then, to reach the cytosolic proteasomal degradation machinery, the transmembrane protein must be retro-translocated out of the ER phospholipid bilayer (6). The retro-translocation occurs through an aqueous channel which is not yet clearly identified. Initial works suggested the Sec61 translocon could constitute the pore (33) but recent works highlighted the role of a macromolecular complex composed of VIMP, p97 and Derlin-1 in this process (17, 36).

Although many studies were dedicated to the analysis of channel protein trafficking defect and degradation, little is known on the KCNQ1 biosynthetic pathways. One important particularity of KCNQ1 is that it is part of a composite membrane protein complex formed by



the association of four alpha-subunits and at least two single transmembrane domain ancillary β -subunits KCNE1 (19). Although it is recognized that both subunits associate in the ER and that KCNE1 strongly modify channel current kinetics (2) the role of KCNE1 in KCNQ1 biosynthesis and trafficking is less well understood.

We recently identified a critical trafficking determinant of KCNQ1 in the N-terminus of the protein which is targeted by several mutations. This region delineates a critical hotspot in the juxtamenbraneous domain just preceding its first transmembrane domain. Structure prediction analysis revealed that point mutations in this region could introduce potential folding defects and impair trafficking of the channel. We showed the mutant channels remain trapped in the ER and can exert a dominant negative effect on WT channel subunits most probably by sequestering the later in the ER (3). We initiated the present study to analyze the fate of wild-type KCNQ1 protein along its biosynthetic pathway, the role of KCNE1 in this process and to elucidate the potential mechanisms involved in the ER retention and degradation of the mutant channels.

Materials and Methods

cDNA construct and siRNA.

The human WT¹ and mutant Y111C, P117L, L114P-KCNQ1 cDNAs were cloned in the pCB6 expression vector as previously described (3). KCNE1² was cloned in pRc/CMV vector. C-terminally FLAG tagged KCNE1 was a kind gift of Dr AL George (Vanderbilt University, Nashville, TN, USA). Derlin-1³ cDNA kindly provided by Dr. Hidde L. Ploegh (Whitehead Institute, Cambridge, MA, USA) was cloned in pCB6 vector. According to Hegde et al (11), the siRNA 5'-CGAUUUAAGGCCUGCUAUUtt-3' targeting nucleotides 445 to 463 of Derlin-1 mRNA was a Silencer Custom made siRNA from Ambion (Cambridgeshire, UK). siRNA control was a Silencer negative Control from Ambion.

Cell culture and transfection.

Human embryonic kidney HEK293FT (HEK) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and T84 cells (ATCC) were cultured in DMEM and Ham- F12/DMEM 1:1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) respectively, supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% L-glutamine and 1% penicillin-streptomycin, at 37° C in a humidified 5% CO₂ incubator.

HEK cells were transiently transfected with 2 µg of total cDNA using Fugene6 from Roche (Indianapolis, IN, USA) following the manufacturer's instructions. In all the experiments, KCNQ1 cDNA was kept at 660 ng and transfected with equal amounts (660 ng) of KCNE1 and/or Derlin-1. CD4 cDNA was used as a ballast to keep total cDNA at 2 µg. Cells were used 24h after transfection. T84 cells were transfected with Amaxa Cell Line Nucleofactor Kit from Amaxa Inc (Gaithersburg, MD, USA) following the manufacturer's instructions. 150 pmol of siRNA were used for 2.10⁶ cells that were harvested 48 hours after siRNA



transfection.

Antibodies (Ab) and Chemicals.

Anti-Derlin-1 Ab was obtained from MBL (PM018, Nagoya, Japan); anti-GAPDH Ab (SC-32233), anti-rabbit HRP Ab (SC-2054) and anti-mouse HRP Ab (SC-2055) were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); anti-KCNQ1 Ab was obtained from Alomone (APC-022, Jerusalem, Israel); anti-ubiquitin Ab was from Biomol International LP (SK2, Plymouth Meeting, PA, USA). All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), unless otherwise stated. MG132 proteasome inhibitor was from Biomol International (Plymouth Meeting, PA, USA) and was used at 25 μ M. Mycophenolic acid (MPA) was from Biomol and was used at 2 or 40 μ M.

Immunoprecipitation (IP) and Western blots (WB).

In IP experiments, HEK cells were lysed in 150 mM NaCl, 20 mM TRIS (pH 7.5), 5 mM EDTA, 1% Triton X-100 supplemented with Complete protease inhibitor cocktail (Roche, Indianapolis, IN, USA); T84 cells were lysed in 150 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7.5, 0.1% NP40 and Complete protease inhibitor cocktail. Cell extracts were incubated 30 minutes at 4°C under agitation. The cell lysates were centrifuged 15 min at 16 000 g and the supernatants incubated with the appropriate antibody overnight at 4°C. Immune complexes were isolated with protein G-sepharose beads (HiTrap Protein G HP from GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK), washed extensively with lysis buffer, denatured in Laemmli sample buffer for 10 min at 70°C, separated by SDS-PAGE on 10% gels and transferred to nitrocellulose membranes Hybond C-extra (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK). The blots were probed with anti-KCNQ1 (1/4000 for transfected cells or 1/500 for T84), anti-Derlin-1 (1/1000), anti-

GAPDH (1/10 000) antibodies. When anti-ubiquitin Ab (1/500) was used, 2% BSA was used to block nitrocellulose membrane instead of 5% fat free milk. HRP secondary antibodies were used at 1/10 000. Films were scanned on ImageScanner™ densitometer (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) and ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA) was used for image quantification. Signals were normalized with respect to GAPDH and are expressed as a ratio of the control condition.

To test KCNQ1 ubiquitination, HEK cells were incubated 4 hours with 25 µM MG132 prior lysis and 10 mM of N-ethyl maleimide was added to IP buffer. Protein concentrations in cell extracts were determined using D/C Assay kit from Biorad (Hercules, CA, USA).

To coimmunoprecipitate KCNQ1 and chaperones, cells were treated with 1 mM of the crosslinker dithiobis-succinimidylpropionate (DSP) for 30 minutes, then with 100 mM TRIS-HCL pH 6.8 for 20 minutes and finally washed in PBS prior to cell lysis.

Pulse-chase Assays and half-life estimation

24 hours after transfection, transiently transfected HEK cells were starved in methionine and cysteine-free DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 30 minutes and then metabolically labelled using Redivue Pro-mix ³⁵S-Met/Cys (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) 0.5 mCi/ml for 15 min at 37 °C. Cells were washed once with PBS, once with DMEM and lysed immediately or incubated in complete DMEM for 1, 2 or 4 hours at 37°C. Cells were lysed, KCNQ1 was immunoprecipitated and separated by SDS-PAGE as described above. Labelled KCNQ1 was revealed by autoradiography on Typhoon9410™ scanner (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK). ImageQuant™ software (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) was used for analysis. When used, MG132 (25 µM) and MPA (2 or 40 µM) were added just after the 15 min pulse period.



To calculate KCNQ1 half-life time, signals at times t (X_t) were normalized with respect to the signal at $t=0$ (X_0) and transformed according to $\ln(X_t/X_0)=bt$. The half-life time ($t_{1/2}$) was calculated as $t_{1/2}=\ln(0,5)/b$ where b is the slope of the regression curve.

Statistics.

All experiments were carried out at least 3 times. All data are presented as means \pm SE, n indicates the number of experiments. Means were compared with a Student's t test. Decrease curves were compared with a parallelism test. A p -value inferior to 0.05 was considered statistically significant and is reported.

Results.

N-terminal KCNQ1 mutants exhibit lower expression levels than WT KCNQ1.

In a previous study, we have shown that Romano Ward mutations located in KCNQ1 N – terminus determined ER retention of the mutant channel proteins (3). In the present study, we analysed the mechanisms and the consequences of this ER retention. First, we asked whether WT and mutant KCNQ1 exhibited different expression levels. To answer this question, we transiently expressed WT, Y111C, L114P and P117L-KCNQ1 in HEK cells and quantified channels expression by Western blotting. As illustrated on figure 1A and B, all the mutated proteins were expressed at lower levels than WT-KCNQ1. Also, P117L mutant steady state expression was higher than Y111C and L114P. To ascertain these differences did not result from undesired mutations in plasmid sequences and/or the quality of DNA preparations, they were entirely sequenced and the experiments repeated with three different plasmid preparations. No differences were observed and the data were pooled in figure 1.

N-terminal KCNQ1 mutations do not impair channel synthesis.

The steady state differences we observed could be either explained by different synthesis or degradation rates. To test these hypotheses we analysed channel synthesis in details. HEK cells transiently transfected with WT or mutants KCNQ1 cDNAs in the presence of KCNE1, were pulsed labelled 15 minutes with ³⁵S radio-labelled methionine and cysteine. The KCNQ1 proteins neo-synthesized during the pulse were then immunoprecipitated and quantified. As shown in figures 1C and D, no significant difference (ANOVA test p=0.3) was observed between WT-KCNQ1 and any of the mutant channels demonstrating equivalent neo-synthesis rates.



Taken together, reduced steady state expression levels of the mutants and their similar synthesis rates compared to WT-KCNQ1 suggested that both WT and mutant proteins followed different degradation kinetics.

KCNQ1 degradation is mediated by the proteasome.

In the following experiments, we analyzed KCNQ1 degradation by the proteasome pathway. We used Y111C-KCNQ1 as a model of KCNQ1 mutant and compared its degradation kinetics to those of WT-KCNQ1. Because ubiquitination is a prerequisite to proteasomal targeting, we first analyzed KCNQ1 ubiquitination. As illustrated in figure 2A, both immunoprecipitated WT and Y111C-KCNQ1 were labelled by anti-ubiquitin antibodies and labelling increased when the cells were treated with the proteasome inhibitor MG132 (25 μ M for 4 h). Effective proteasomal degradation of KCNQ1 was demonstrated in pulse chase experiments in the presence of MG132 (Fig. 2B and C). Indeed, in cells pulse labelled for 15 minutes only $27\% \pm 4$ (n=8) of the neo-synthesised KCNQ1 remained after a 4 hours chase period in the absence of proteasome inhibitor, whereas $84\% \pm 8$ (n=4) remained after 4 hours in the presence of MG132 (25 μ M). Y111C mutant degradation was also reduced by the proteasome inhibitor. $16\% \pm 4$ (n=8) and $54\% \pm 4$ (n=3) of Y111C remained after the chase period in the absence and the presence of MG132, respectively. Because MG132 efficiency seemed lower for Y111C, we asked whether Y111C could be degraded through alternative lysosomal or GTP dependent pathways as described recently for CFTR (4). To answer this question, HEK transfected with Y111C were pulsed and then chased for 4 hours in the presence of the lysosomal or the GTP-dependent degradation pathway inhibitors, chloroquine (100 μ M) and mycophenolic acid (2 μ M and 40 μ M), respectively. Neither inhibitors affected Y111C degradation (data not shown), indicating that lysosomal and GTP-dependent pathways do not

play an important role in the degradation of neo-synthesised mutant channel.

Taken together, these experiments led us to conclude that neo-synthesised WT and Y111C-KCNQ1 degradation was mainly achieved by the proteasome.

Mutant KCNQ1 are less stable than WT channel protein.

We then compared the degradation kinetics of mutant and WT-KCNQ1. Cells were pulse labelled 15 minutes and neo-synthesised KCNQ1 proteins remaining after 1, 2, and 4 hours of chase were immunoprecipitated and quantified. As shown on figures 3A and B, the Y111C mutant was degraded more rapidly than WT channel. Mean half-life of Y111C (82 min), was significantly shorter ($p=0.0008$, $n=5$) from that of WT-KCNQ1 (113 min).

Derlin-1 associates with KCNQ1 in HEK cells.

To characterize the mechanisms involved in KCNQ1 control quality and ERAD, we have analyzed the role of the ER resident protein Derlin-1 that has been implicated in the retrotranslocation from the ER to the cytosol of CFTR (30), KCa2.3 and KCa3.1 (8) channels. We first analyzed whether KCNQ1 and Derlin-1 are part of the same molecular complex. HEK cells were transiently transfected with WT or Y111C-KCNQ1, KCNE1 and Derlin-1, and KCNQ1 was immunoprecipitated. As shown on figure 4A, Derlin-1 was efficiently co-immunoprecipitated with both WT and Y111C-KCNQ1. We then analyzed whether this association had any functional effect on KCNQ1 expression. Contrarily to what has been described for CFTR and KCa(s), Derlin-1 over-expression did not significantly modify WT and Y111C-KCNQ1 steady state expression levels (Fig. 4B and 4C) or the degradation kinetics of the neo-synthesised proteins (Fig. 4D and 4E). To ensure that these contradictory observations did not result from the overwhelming of the biosynthetic and/or degradation



pathways in the *in vitro* expression systems used here, a new series of experiments was conducted in T84 cells that endogenously express both KCNQ1 and Derlin-1. As illustrated in figure 5, endogenous Derlin-1 did not co-immunoprecipitated with either endogenous KCNQ1 (Fig. 5A) or over-expressed WT or Y111C-KCNQ1 (Fig. 5B). Tunicamycin, used to induce ER stress and to favour Derlin-1 association with its substrates, as previously shown for CFTR and p97 (9), did not increase Derlin-1 interaction with KCNQ1 either (not shown). Moreover, decreasing Derlin-1 expression using specific siRNA did not increase KCNQ1 steady state expression either (Fig. 5C and 5D).

Together our data indicate that Derlin-1 is not functionally involved in KCNQ1 retrotranslocation.

KCNE1 acts as a chaperone on both WT and Y111C-KCNQ1.

Previous studies on WT and mutant Herg and CFTR channels pointed out the role of ER chaperones on their differential expression levels (7, 18). We thus tested the interaction of WT and mutant KCNQ1 with a panel of ER resident chaperones namely Hsp70, Hsp90, PDI, BiP, Calnexin, ERp72. As illustrated on figure 6A, only Hsp70 chaperone was co-immunoprecipitated with WT and Y111C mutant in the presence of the cross-linking agent DSP. The low Hsp 70 signal observed with Y111C mutant is most probably due to the low level of expression of the mutant channel.

Although it is recognized that KCNE1 and KCNQ1 associate in the ER and that KCNE1 strongly modifies channel current kinetics (2), the role of KCNE1 in KCNQ1 biosynthesis has, to our knowledge, never been directly analyzed. First we have ascertained that in our conditions KCNE1 interacted with both WT and Y111C-KCNQ1. As shown on figure 6B KCNE1 was readily co-immunoprecipitated with WT and Y111C-KCNQ1. We then analyzed

its functional effect on channel biosynthesis in pulse chase experiments. As illustrated on figures 6C and D, KCNE1 increased WT channel half-life from 77 min (Confidence Interval CI95: [63;99]) (without KCNE1) to 113 min (CI95: [95;140]). KCNE1 also had an effect on Y111C mutant increasing the $t_{1/2}$ from 59 min (CI95: [53;66]) to 82 (CI95: [70;99]).

Together these data show that KCNE1 is able to interact with both WT and mutant Y111C-KCNQ1 and exerts a chaperone effect to stabilize neo-synthesized channels.



Discussion

In the present study we have analyzed the biosynthesis pathways of the WT and LQT1 associated KCNQ1 channel mutants. To our knowledge our data represent the first study of KCNQ1 channel processing in the early secretory pathway. In the heart, KCNQ1 subunits associate with the ancillary subunits KCNE1 to carry the slow component of the delayed rectifier potassium current (I_{Ks}) (2). In a previous study, we showed that LQT1 associated mutations located in the N-terminus of the protein may introduce sufficient protein structure alterations to determine the ER retention of the mutant channels (3). The lower steady state expression levels of mutant KCNQ1 channels, we observed with respect to WT protein, prompted us to analyze the fate of neo-synthesized channels. As expected, in *in vitro* re-expression system, we did not detect significant differences between the synthesis rates of the different constructs. Moreover, preliminary co-immunoprecipitation, fractionation and solubilisation studies did not reveal differential aggregation properties between WT and any of the mutants (not shown) suggesting they shared the same pathways and cellular compartments. Indeed, as all the membrane proteins, KCNQ1 undergoes a strict quality control in the ER. In this compartment, molecular chaperones scrutinize the structure of nascent proteins and help them to acquire a native conformation and serve to dispose of those which have not a proper one (1). We tested a panel of cytosolic and ER chaperones including Hsp70, Hsp90, BiP, calnexin and calreticulin for their interactions with WT and Y111C-KCNQ1. Neither lectin chaperones, calnexin and calreticulin, were found to bind the channel. Although this is consistent with the absence of core glycosylation in KCNQ1, more surprisingly, interaction was not detected in the presence of glycosylated KCNE1 despite KCNE1 was efficiently co-immunoprecipitated with KCNQ1. On the other hand, Hsp70 was found to physically interact with both mutant and WT-KCNQ1. Our observation is consistent

with previous studies showing that Hsp70 interacts with a subset of proteins that are believed to have difficulties reaching their final conformation (21). Indeed, as far as ionic channel channels are concerned, Hsp70 was shown to bind Herg channel (7) and CFTR (18). However, one should note that, in contrast to Herg, Hsp70-KCNQ1 interaction was only detected in the presence of the cross-linking agent DSP suggesting the interaction was transient and weak.

Among other potential KCNQ1 molecular chaperone, we analyzed the role of the ancillary subunit KCNE1 in the fate of the channel complex. Using pulse chase experiments we showed that KCNE1 increased the stability of both WT and mutant-KCNQ1 (Fig 3). These results further sustain the idea that KCNE1 and KCNQ1 associate early in the secretory pathways during channel biogenesis and assign a new role to KCNE1 in the macromolecular KCNQ1 channel complex. Indeed previous studies clearly showed that KCNE1 increased KCNQ1 current and modified electrophysiological properties of KCNQ1 channel (half activation potential and kinetics of inactivation) (2, 29, 32, 35). In addition, although more contradictory, previous studies also reported increased trafficking of KCNQ1 when co-expressed with KCNE1 (14). Finally, the chaperone role that we propose for KCNE1 is consistent with previous publications showing that beta-subunits stabilise and enhance the trafficking of other channels (15, 25). Together our data assign a new role to KCNE1 subunit in channel stability and biogenesis. Most probably other molecular chaperones assist KCNQ1 channel folding and will be unveiled in future investigations.

We showed that WT and mutant-KCNQ1 are ubiquitinated. Furthermore, when MG132 was added during pulse chase experiments, the KCNQ1 remaining after 4 hours of chase was increased. These results are consistent with the notion that KCNQ1 degradation is mediated by the ubiquitin-proteasome pathway. In our experiments, 84% and 54 % of WT and Y111C-



KCNQ1 remain in presence of the MG132 respectively. The strong effect on WT channel is in agreement with the 80% reduction of the proteasome activity reported by Zafar et al (38). Whether part of the Y111C mutant follows an additional degradation pathway remains to be determined. In any case, lysosomal or GTP-dependent degradation pathways do not seem to be involved in this process as either chloroquine or mycophenolic acid affected Y111C degradation (4, 13).

To be degraded in the proteasome membrane proteins must be retrotranslocated toward the cytoplasm (6). Recently, the ER resident Derlin-1, in association with Vimp1 and p97 (36), was shown to promote the degradation of CFTR (30), KCa3.1, KCa2.3 (8), and the heavy chain of MHC I (17, 36). We thus questioned whether Derlin-1 was also implicated in KCNQ1 retrotranslocation. Our results show that Derlin-1 has no essential role in KCNQ1 degradation. Whatever the amount of WT and Y111C-KCNQ1 plasmid cDNA we used to limit channel expression and avoid overwhelming of degradation pathways, and despite over-expressed proteins could be co-immunoprecipitated, we could not detect any effect of Derlin-1 on channel steady state expression level or degradation. These data were confirmed in T84 cells that endogenously express both KCNQ1 and Derlin-1. In fact, siRNA knock-down of Derlin-1 had no effect on KCNQ1 expression level in T84 cells. Whether other pathways are involved in KCNQ1 retrotranslocation remain to be determined. We suspect the two additional Derlins (Derlin-2 and Derlin-3) described in mammals, are not involved in this process (16, 22). Indeed, Derlin-2 seems to be restricted to the retrotranslocation of luminal ER substrates whereas Derlin-3 facilitates disposal of misfolded glycosylated substrates (16, 22). On the other hand, the Derlin-1 independent, ubiquitin and proteasome dependent HIP pathway (for Hrd Independent Proteolysis) described in yeast by Haynes and colleagues may be a good candidate for KCNQ1 retrotranslocation and degradation (10). This alternative

pathway will have to be tested in future studies.

In conclusion, we have shown that LQT1 associated mutations determine increased degradation of the mutant proteins by the proteasome and that the ancillary subunit KCNE1 participates to the stability and the biogenesis of KCNQ1 channel complex.

Figure 1

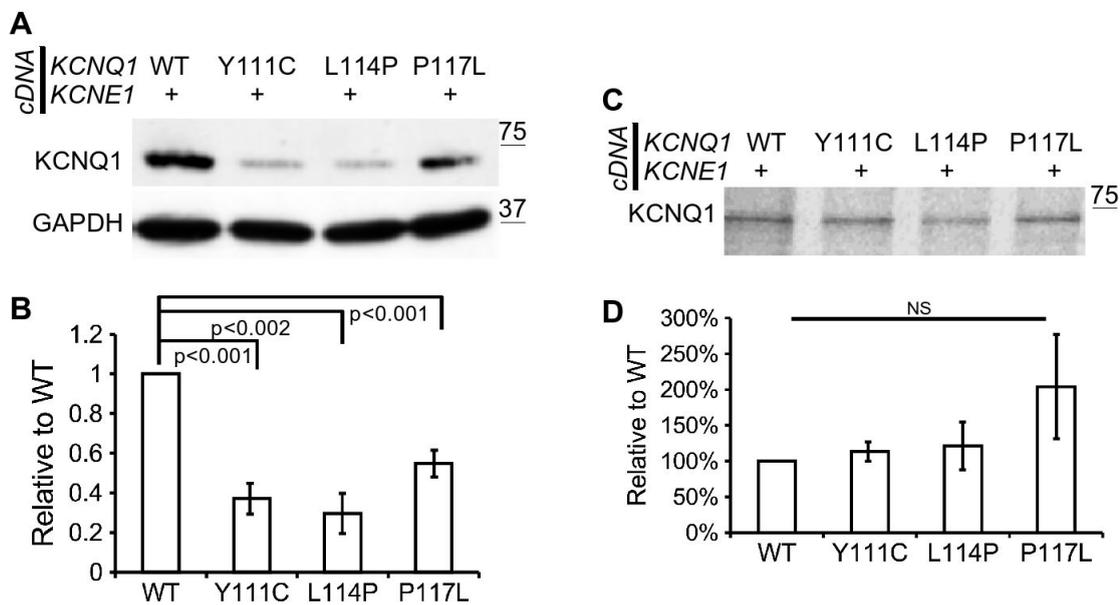
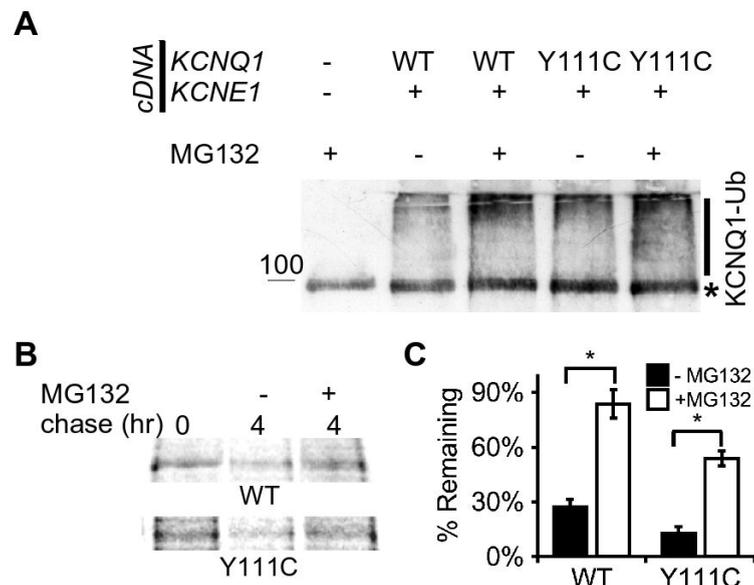


Figure 1 : Expression levels of mutant KCNQ1 are lower than that of WT-KCNQ1.

A; Western blots of lysates from HEK cells transfected with KCNE1 and WT-KCNQ1 (WT) (lane 1) or KCNQ1 mutant cDNAs (lane 2, 3 and 4). Blots were revealed using anti-KCNQ1 antibody (upper blot) and anti-GAPDH antibody (lower blot) to normalize gel loading. **B**; Mean values of three experiments +/- SE. Values are expressed as percent of WT-KCNQ1 signal after normalization. **C**; WT and mutant-KCNQ1 exhibit similar translation levels. ³⁵S radio-labelled KCNQ1 neo-synthesised in 15 min in HEK cells transfected with KCNE1 and WT-KCNQ1 (WT) or mutants cDNAs (KCNQ1-Y111C, L114P, P117L). **D**; Mean values expressed as percent of WT-KCNQ1 signal of 3 experiments +/- SE. NS indicated non significant differences between the samples.



Figure 2**Figure 2 : WT and mutant-KCNQ1 are ubiquitinated and degraded by the proteasome.**

A; KCNQ1 ubiquitination. HEK cells were transfected with WT or Y111C-KCNQ1 in the presence of KCNE1. Proteasome was inhibited with MG132 (25 μ M) for 4 hours. Cells were lysed in the presence of NEM (1 mM) to prevent deubiquitination. KCNQ1 was immunoprecipitated and the blot revealed using anti-ubiquitin antibody. * indicates IgG used in the IP. Ubiquitinated KCNQ1 (KCNQ1-ub) appear as a high molecular weight smear. **B** and **C**; the proteasome inhibitor MG132 prevents KCNQ1 degradation. HEK cells were transfected with WT or Y111C-KCNQ1 in the presence of KCNE1. Cells were pulse labelled with 35 S methionine/cysteine for 15 min and chased for 4 hours with or without MG132 (25 μ M, see methods). Labelled KCNQ1 was immunoprecipitated and quantified. **C**; Graphic represents mean values of three experiments \pm SE. Values at 4 hours are given as percent of t_0 ($t=0$). * indicates significant statistical difference.



Figure 3

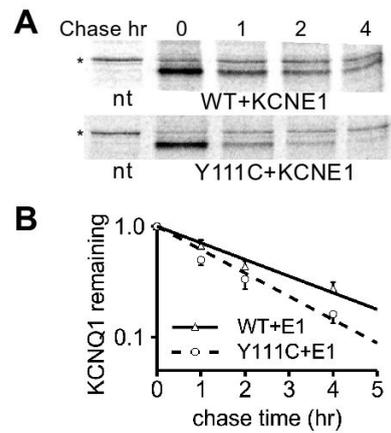


Figure 3 : Y111C-KCNQ1 mutant is less stable than WT-KCNQ1.

A; Pulse chase experiments on WT and Y111C-KCNQ1 mutant. Cells were pulse labelled 15 min with 35S methionine/cysteine and chased for 0, 1, 2 and 4 hours (nt indicates non transfected cells). **B;** Data are expressed as percent of KCNQ1 measured at t0 as a function of time and presented on a logarithmic scale. Points are mean values +/- SE of at least 4 different experiments. * indicates non specific band immunoprecipitated in non transfected cells (nt).



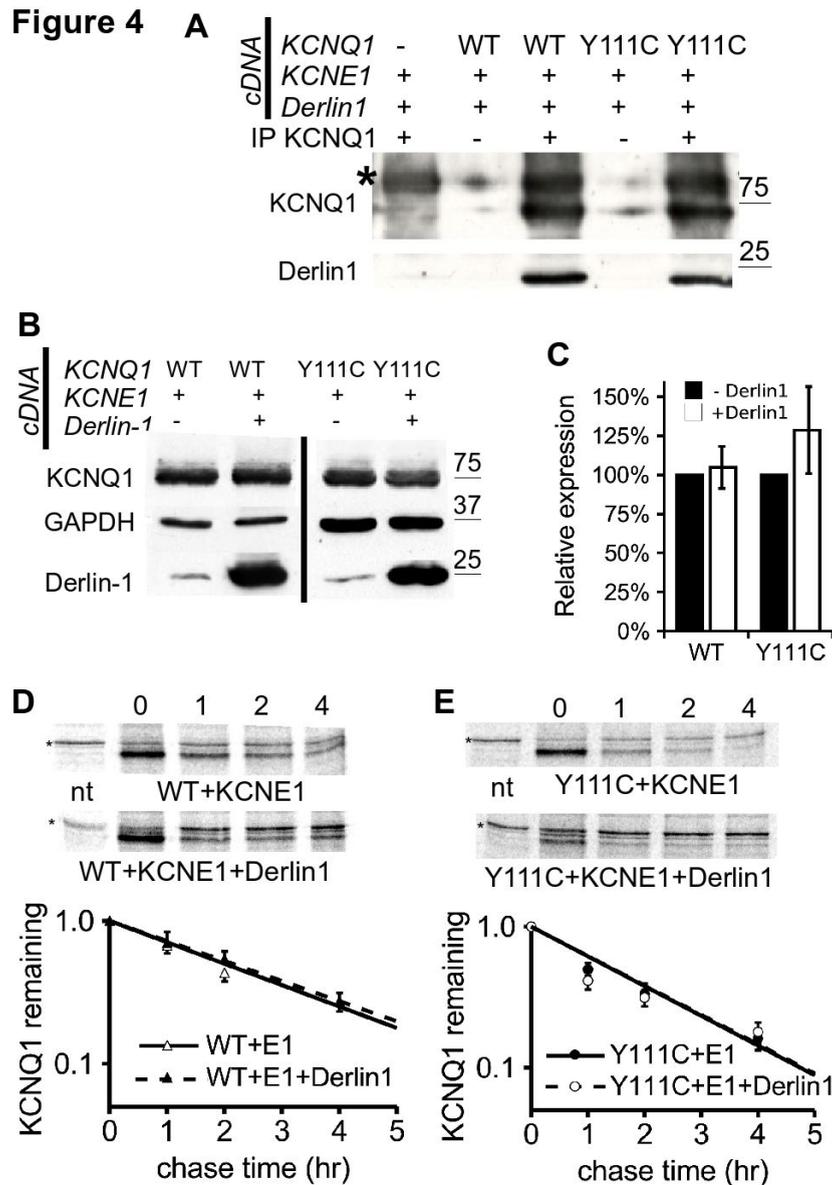
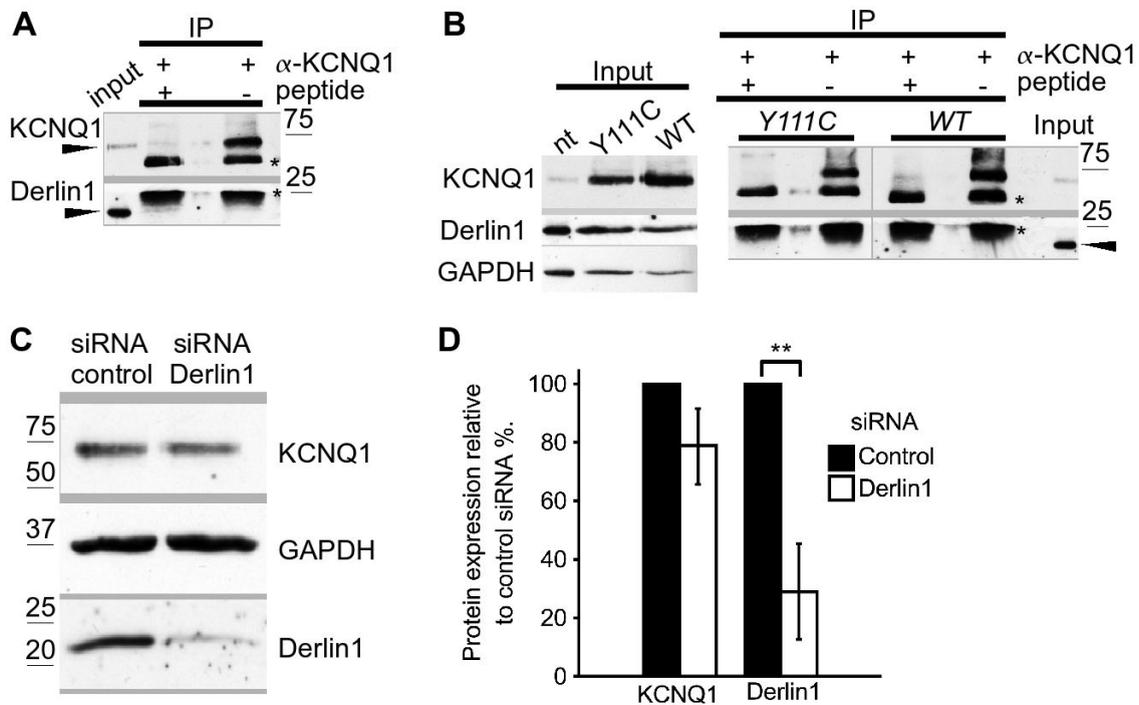


Figure 4 : Derlin-1 over-expression does not affect KCNQ1 stability.

A; Over-expressed Derlin-1 co-immunoprecipitates with WT and Y111C-KCNQ1. HEK cells were transfected with KCNE1, WT or Y111C-KCNQ1 with or without Derlin-1 cDNAs. The blots show immunoprecipitated KCNQ1 (upper) and co-immunoprecipitated Derlin-1 (lower). * in the upper blot indicates immunoglobulin. **B** and **C**; Derlin-1 over-expression does not affect WT or Y111C-KCNQ1 expression level channel. HEK cells were transfected with KCNE1, WT or Y111C-KCNQ1 with or without Derlin-1 cDNAs. The blots show cell lysates revealed using anti-KCNQ1 (upper), anti-GAPDH (middle) and anti-Derlin-1 (lower) antibodies. GAPDH was used to confirm equivalent protein loading. Derlin-1 over-expression is clearly visible in the lower blot whereas no difference was observed in WT and Y111C-KCNQ1 expression level. The mean values of 3 experiments +/- SE are presented in (C) and are expressed as percent of the signal measured without Derlin-1. **D** and **E**; Derlin-1 does not affect KCNQ1 degradation kinetics. Pulse chase were performed as in figure 3 using cells transfected with KCNE1, WT (D) or Y111C-KCNQ1 (E) with or without Derlin-1. The graphs show the mean +/- SE of at least 5 experiments. * indicates non specific band immunoprecipitated in non transfected cells (nt).

Figure 5**Figure 5 : Endogenous Derlin-1 and KCNQ1 do not co-immunoprecipitate in T84 cells.**

A; Endogenous KCNQ1 does not co-immunoprecipitate with endogenous Derlin-1 in T84 cells. Control immunoprecipitation was made with immunogen peptide. * heavy and light chains of anti-KCNQ1 immunoglobulins. **B**; Over-expressed WT and Y111C-KCNQ1 do not co-immunoprecipitate endogenous Derlin-1 in T84 cells. WT and Y111C over-expression is clearly visible in the left blot (input). Derlin-1 was not co-immunoprecipitated (IP) with either WT or mutant KCNQ1. The control co-immunoprecipitation was performed in the presence of the antigenic peptide. **C** and **D**; Decreased Derlin-1 expression does not modify endogenous KCNQ1 expression level in T84 cells. T84 cells were transfected with siRNA targeting Derlin-1 or control siRNA. 48 hours after transfection Derlin-1 and KCNQ1 expression levels were estimated by Western blot. GAPDH was used to normalise signals. **D**; Quantification of KCNQ1 and Derlin-1 expression. The values are expressed as percent of the signals measured in the presence of the control siRNA. Derlin-1 level decreases by more than 70% whereas KCNQ1 is not increased. Data represent mean +/- SE of three experiments. ** p<0.005.



Figure 6

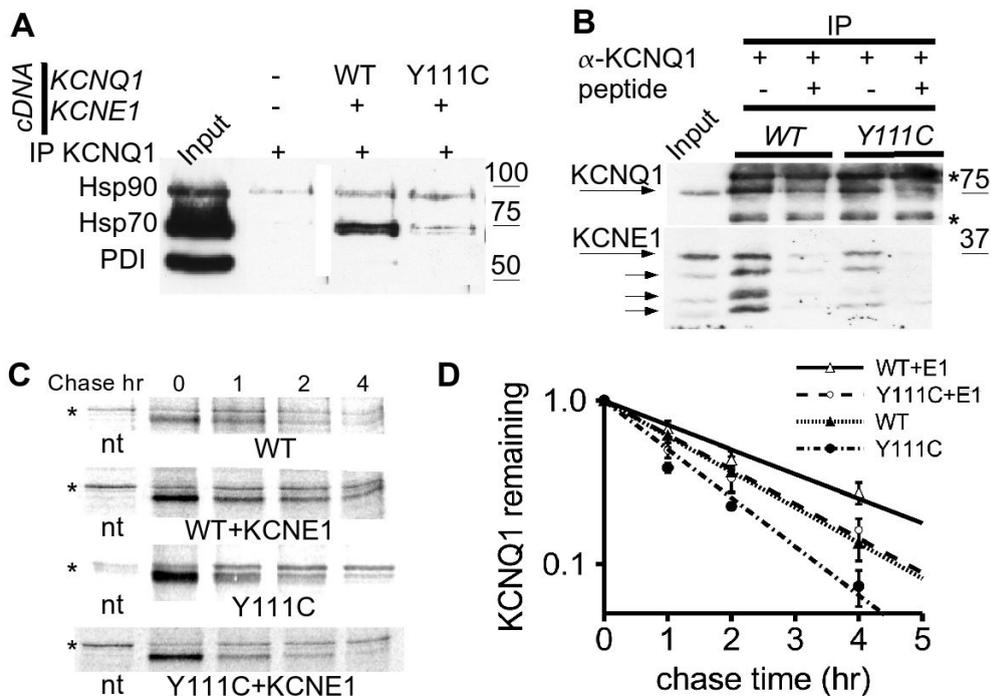


Figure 6. . Chaperone effect of KCNE1 on WT and Y111C-KCNQ1.

A; WT and Y111C-KCNQ1 interact with Hsp70 but not Hsp90 or protein disulfide isomerase (PDI). KCNQ1 was co-immunoprecipitated with Hsp70 only after treatment with the cross-linker agent DSP (1 mM). **B**; KCNE1 co-immunoprecipitates with WT and Y111C-KCNQ1. HEK cells cotransfected with FLAG tagged KCNE1 and WT or Y111C-KCNQ1 were immunoprecipitated using anti-KCNQ1 Ab. The blots were revealed with anti-KCNQ1 (upper) and anti-FLAG (lower) Abs. KCNE1 that appears as four specific bands (arrows) was co-immunoprecipitated by both channels. * indicates immunoglobulins used for IP. **C**; Pulse chase experiments on WT and Y111C-KCNQ1 mutant in the presence or absence of KCNE1. Cells were pulse labelled 15 min with ³⁵S methionine/cysteine and chased for 0, 1, 2 and 4 hours (nt indicates non transfected cells). **D**; Data are expressed as percent of KCNQ1 measured at t₀ as a function of time and presented on a logarithmic scale. Points are mean values +/- SE of at least 4 different experiments. * indicates non specific band immunoprecipitated in non transfected cells (nt).

Footnotes

1 KCNQ1 sequence available at GenBank Accession Number 32479526.

2 KCNE1 sequence available at GenBank Accession Number 60218914.

3 Derlin-1 sequence available at GenBank Accession Number 40254960.

Acknowledgements.

We thank Sylvie Le Roux for its technical assistance. SD curent address: Instituto Nacional de Saude Dr Rocardo Jorge, Centro De Genetica Humana - Av Padre Cruz - 1649-016 Lisboa Portugal.

Grants.

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR/A05045GS). DP was recipient of « Poste d'Accueil » position from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM). IB, GL and JM are recipients of tenure positions at the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).



References

1. **Anelli T, Sitia R.** Protein quality control in the early secretory pathway. *EMBO J* 27: 315-327, 2008.
2. **Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M, Romey G.** K(V)LQT1 and Isk (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature* 384: 78-80, 1996.
3. **Dahimène S, Alcoléa S, Naud P, Jourdon P, Escande D, Brasseur R, Thomas A, Baró I, Mérot J.** 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, 2006.
4. **De Keukeleire B, Micoud J, Biard J, Benharouga M.** Endoplasmic reticulum-associated degradation of mutant CFTR requires a guanine nucleotide-sensitive step. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 1729-1742, 2008.
5. **Deutsch C.** The birth of a channel. *Neuron* 40: 265-276, 2003.
6. **Ellgaard L, Helenius A.** Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 181-191, 2003.
7. **Ficker E, Dennis AT, Wang L, Brown AM.** Role of the cytosolic chaperones Hsp70 and Hsp90 in maturation of the cardiac potassium channel HERG. *Circ Res* 92: e87-100, 2003.
8. **Gao Y, Chotoo CK, Balut CM, Sun F, Bailey MA, Devor DC.** Role of S3 and S4 transmembrane domain charged amino acids in channel biogenesis and gating of KCa2.3 and KCa3.1. *J Biol Chem* 283: 9049-9059, 2008.
9. **Goldstein RF, Niraj A, Sanderson TP, Wilson LS, Rab A, Kim H, Bebok Z, Collawn JF.** VCP/p97 AAA-ATPase does not interact with the endogenous wild-type cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36: 706-714, 2007.
10. **Haynes CM, Caldwell S, Cooper AA.** An HRD/DER-independent ER quality control mechanism involves Rsp5p-dependent ubiquitination and ER-Golgi transport. *J Cell Biol* 158: 91-101, 2002.
11. **Hegde NR, Chevalier MS, Wisner TW, Denton MC, Shire K, Frappier L, Johnson DC.** The role of BiP in endoplasmic reticulum-associated degradation of major histocompatibility complex class I heavy chain induced by cytomegalovirus proteins. *J Biol Chem* 281: 20910-20919, 2006.
12. **Ikrar T, Hanawa H, Watanabe H, Okada S, Aizawa Y, Ramadan MM, Komura S, Yamashita F, Chinushi M, Aizawa Y.** A double-point mutation in the selectivity filter site of the KCNQ1 potassium channel results in a severe phenotype, LQT1, of long QT syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol* 19: 541-549, 2008.
13. **Jansen JA, de Boer TP, Wolswinkel R, van Veen TAB, Vos MA, van Rijen HVM, van der Heyden MAG.** Lysosome mediated Kir2.1 breakdown directly influences inward rectifier current density. *Biochem Biophys Res Commun* 367: 687-692, 2008.
14. **Krumerman A, Gao X, Bian J, Melman YF, Kagan A, McDonald TV.** An LQT mutant minK alters KvLQT1 trafficking *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C1453-63, 2004.
15. **Kunjilwar K, Strang C, DeRubeis D, Pfaffinger PJ.** KChIP3 rescues the functional expression of Shal channel tetramerization mutants. *J Biol Chem* 279: 54542-54551, 2004.
16. **Lilley BN, Gilbert JM, Ploegh HL, Benjamin TL.** Murine polyomavirus requires the endoplasmic reticulum protein Derlin-2 to initiate infection. *J Virol* 80: 8739-8744, 2006.
17. **Lilley BN, Ploegh HL.** A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature* 429: 834-840, 2004.
18. **Loo MA, Jensen TJ, Cui L, Hou Y, Chang XB, Riordan JR.** Perturbation of Hsp90 interaction with nascent CFTR prevents its maturation and accelerates its degradation by the proteasome. *EMBO J* 17: 6879-6887, 1998.
19. **Morin TJ, Kobertz WR.** Counting membrane-embedded KCNE beta-subunits in functioning K+ channel complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 1478-1482, 2008.
20. **Napolitano C, Priori SG, Schwartz PJ, Bloise R, Ronchetti E, Nastoli J, Bottelli G, Cerrone M, Leonardi S.** Genetic testing in the long QT syndrome: development and validation of an efficient approach to genotyping in clinical practice. *JAMA* 294: 2975-2980, 2005.
21. **Nathan DF, Vos MH, Lindquist S.** In vivo functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90



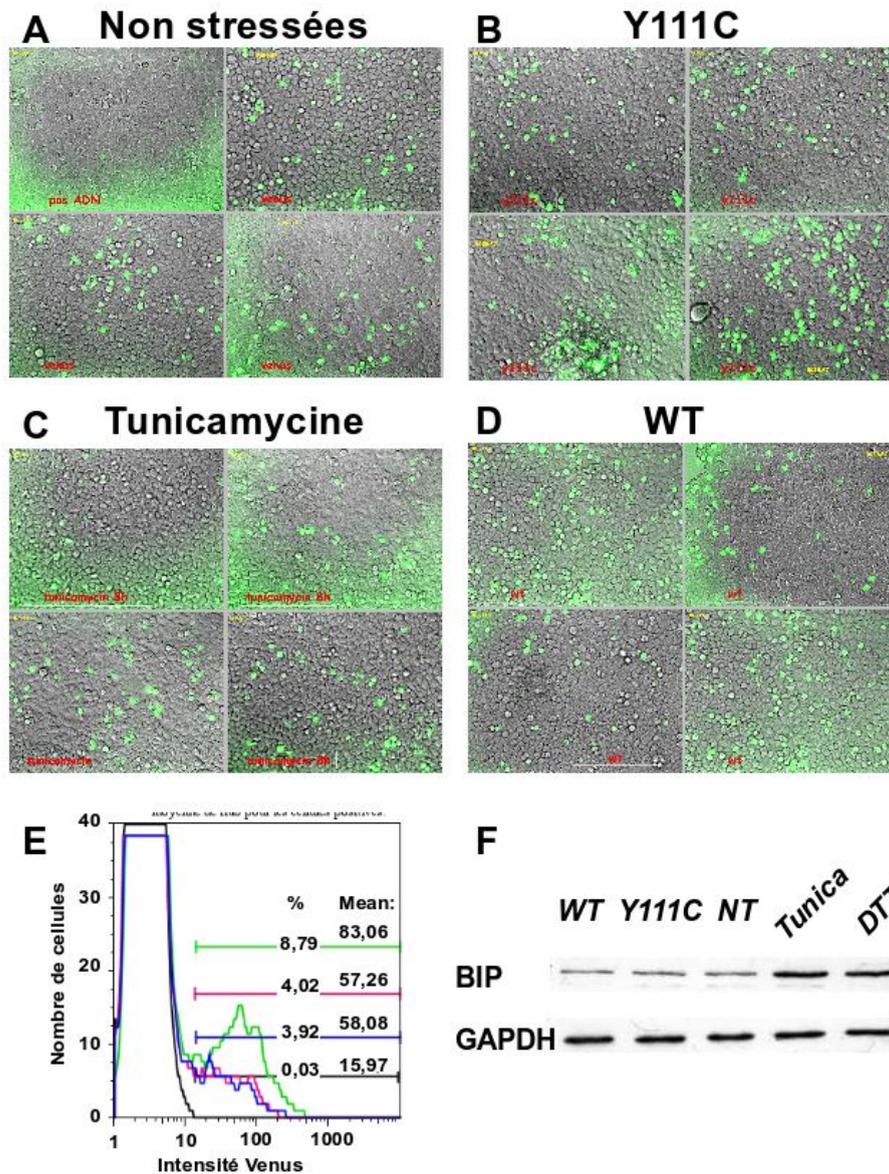


Figure 22. L'UPR n'est pas activée par la mutation Y111C.

A à D. Images de microscope à fluorescence de cellules HEK transfectées avec le plasmide codant pour l'ARNm fusion de XBP1 et la protéine fluorescente Vénus. En A, les cellules ont été soit non transfectées (en haut à gauche du panel A) soit transfectées avec le plasmide XBP1_Vénus (les trois autres photos du panel A). En B, les cellules ont été transfectées avec Y111C et XBP1_Vénus (quatre champs de microscope d'une même culture), en D avec KCNQ1 WT et XBP1_Vénus. En C, les cellules ont été traitées 8h avec de la tunicamycine pour induire l'UPR. En cas d'activation de l'UPR, l'ARN messager de XBP1 est épissé de sorte que la protéine fluorescente Vénus est exprimée. A l'inverse, en l'absence de stress du RE l'ARNm de XBP1 n'est pas épissé et Vénus n'est pas produite.

E. Analyse par cytométrie en flux de l'activation de l'UPR. Des cellules non transfectées (tracé noir), transfectées avec XBP1_Vénus seul (tracé vert), XBP1_Vénus et KCNQ1 WT (tracé bleu) ou Y111C (tracé rose), ont été analysées par FACS pour quantifier la fluorescence de Vénus et donc l'activation de l'UPR.

F. Western blot anti-BiP. Un western blot révélé avec l'anticorps anti-BiP a été réalisé sur des cellules HEK non transfectées (NT), transfectées avec KCNQ1 WT ou Y111C, ou non transfectées et traitées avec du DTT ou de la tunicamycine (contrôles positifs).



chaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 12949-12956, 1997.

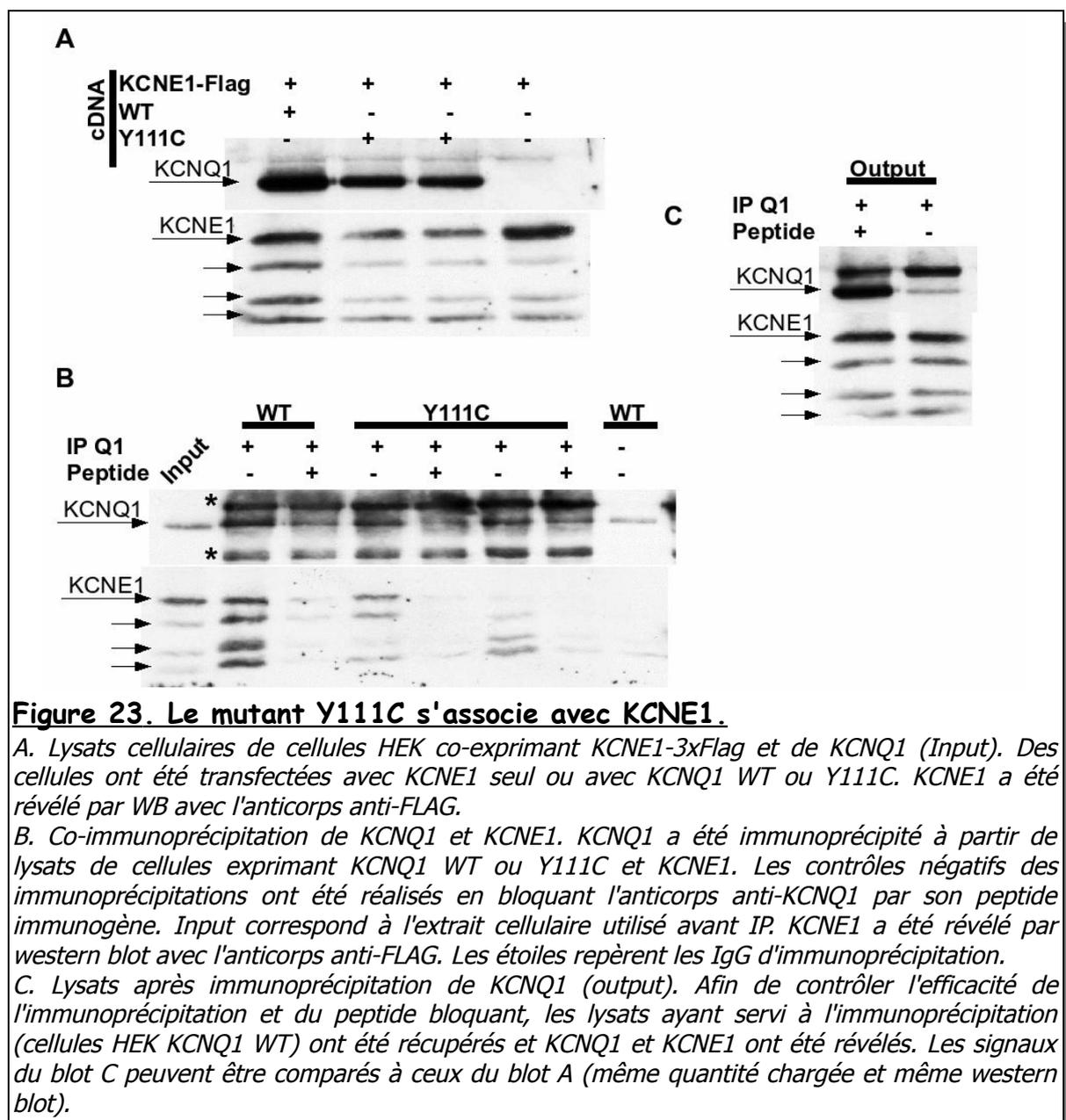
22. Oda Y, Okada T, Yoshida H, Kaufman RJ, Nagata K, Mori K. Derlin-2 and Derlin-3 are regulated by the mammalian unfolded protein response and are required for ER-associated degradation. *J Cell Biol* 172: 383-393, 2006.

23. Peroz D, Rodriguez N, Choveau F, Baró I, Mérot J, Loussouarn G. Kv7.1 (KCNQ1) properties and channelopathies. *J Physiol* 586: 1785-1789, 2008.

24. Roden DM. Clinical practice. Long-QT syndrome. *N Engl J Med* 358: 169-176, 2008.

25. Rusconi R, Scalmani P, Cassulini RR, Giunti G, Gambardella A, Franceschetti S, Annesi G, Wanke E, Mantegazza M. Modulatory proteins can rescue a trafficking defective epileptogenic Nav1.1 Na⁺ channel mutant. *J Neurosci* 27: 11037-11046, 2007.

26. Schmitt N, Calloe K, Nielsen NH, Buschmann M, Speckmann E, Schulze-Bahr E, Schwarz M.



The novel C-terminal KCNQ1 mutation M520R alters protein trafficking. *Biochem Biophys Res*

Commun 358: 304-310, 2007.

27. **Schmitt N, Schwarz M, Peretz A, Abitbol I, Attali B, Pongs O.** A recessive C-terminal Jervell and Lange-Nielsen mutation of the KCNQ1 channel impairs subunit assembly. *EMBO J* 19: 332-340, 2000.
28. **Splawski I, Shen J, Timothy KW, Lehmann MH, Priori S, Robinson JL, Moss AJ, Schwartz PJ, Towbin JA, Vincent GM, Keating MT.** Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation* 102: 1178-1185, 2000.
29. **Splawski I, Tristani-Firouzi M, Lehmann MH, Sanguinetti MC, Keating MT.** Mutations in the hminK gene cause long QT syndrome and suppress IKs function. *Nat Genet* 17: 338-340, 1997.
30. **Sun F, Zhang R, Gong X, Geng X, Drain P, Frizzell R.** Derlin-1 promotes the efficient degradation of CFTR and CFTR folding mutants. *J Biol Chem* 281: 36856-36863, 2006.
31. **Tester DJ, Will ML, Haglund CM, Ackerman MJ.** Compendium of cardiac channel mutations in 541 consecutive unrelated patients referred for long QT syndrome genetic testing. *Heart Rhythm* 2: 507-517, 2005.
32. **Toyoda F, Ueyama H, Ding W, Matsuura H.** Modulation of functional properties of KCNQ1 channel by association of KCNE1 and KCNE2. *Biochem Biophys Res Commun* 344: 814-820, 2006.
33. **Tsai B, Ye Y, Rapoport TA.** Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 246-255, 2002.
34. **Wilson AJ, Quinn KV, Graves FM, Bitner-Glindzicz M, Tinker A.** Abnormal KCNQ1 trafficking influences disease pathogenesis in hereditary long QT syndromes (LQT1) *Cardiovasc Res* 67: 476-486, 2005.
35. **Wu D, Lai L, Zhang M, Wang H, Jiang M, Liu X, Tseng G.** Characterization of an LQT5-related mutation in KCNE1, Y81C: implications for a role of KCNE1 cytoplasmic domain in IKs channel function. *Heart Rhythm* 3: 1031-1040, 2006.
36. **Ye Y, Shibata Y, Yun C, Ron D, Rapoport TA.** A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature* 429: 841-847, 2004.
37. **Younger JM, Chen L, Ren H, Rosser MFN, Turnbull EL, Fan C, Patterson C, Cyr DM.** Sequential quality-control checkpoints triage misfolded cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Cell* 126: 571-582, 2006.
38. **Zafar KS, Inayat-Hussain SH, Ross D.** A comparative study of proteasomal inhibition and apoptosis induced in N27 mesencephalic cells by dopamine and MG132. *J Neurochem* 102: 913-921, 2007.

RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES.



I. L'UPR N'EST PAS ACTIVÉE PAR LE MUTANT Y111C.

Le mutant Y111C est retenu dans le RE. Nous avons voulu vérifier si cette rétention activait l'UPR. Lorsque l'UPR est activée, l'ARNm du facteur XBP1 est épissé ce qui permet d'obtenir le facteur de transcription XBP1 sous forme active. Cette capacité de XBP1 a été exploitée pour fabriquer un outil permettant de visualiser l'UPR (Iwawaki *et al.*, 2004). Les séquences codantes de XBP1 et de la protéine fluorescente (Vénus) ont été concaténées de sorte que, lorsque l'UPR est activée, l'épissage de l'ARNm permet de mettre la séquence codante pour la protéine Vénus en phase avec le cadre de lecture de XBP1. Ainsi, lorsque l'UPR est activée, la protéine Vénus est produite et, à l'inverse, lorsque l'UPR n'est pas activée, Vénus n'est pas exprimée. Le plasmide de cette construction nous a été fourni par le Dr Iwawaki. Nous l'avons utilisé pour cotransfecter des cellules HEK avec KCNQ1 WT ou Y111C. L'activation de

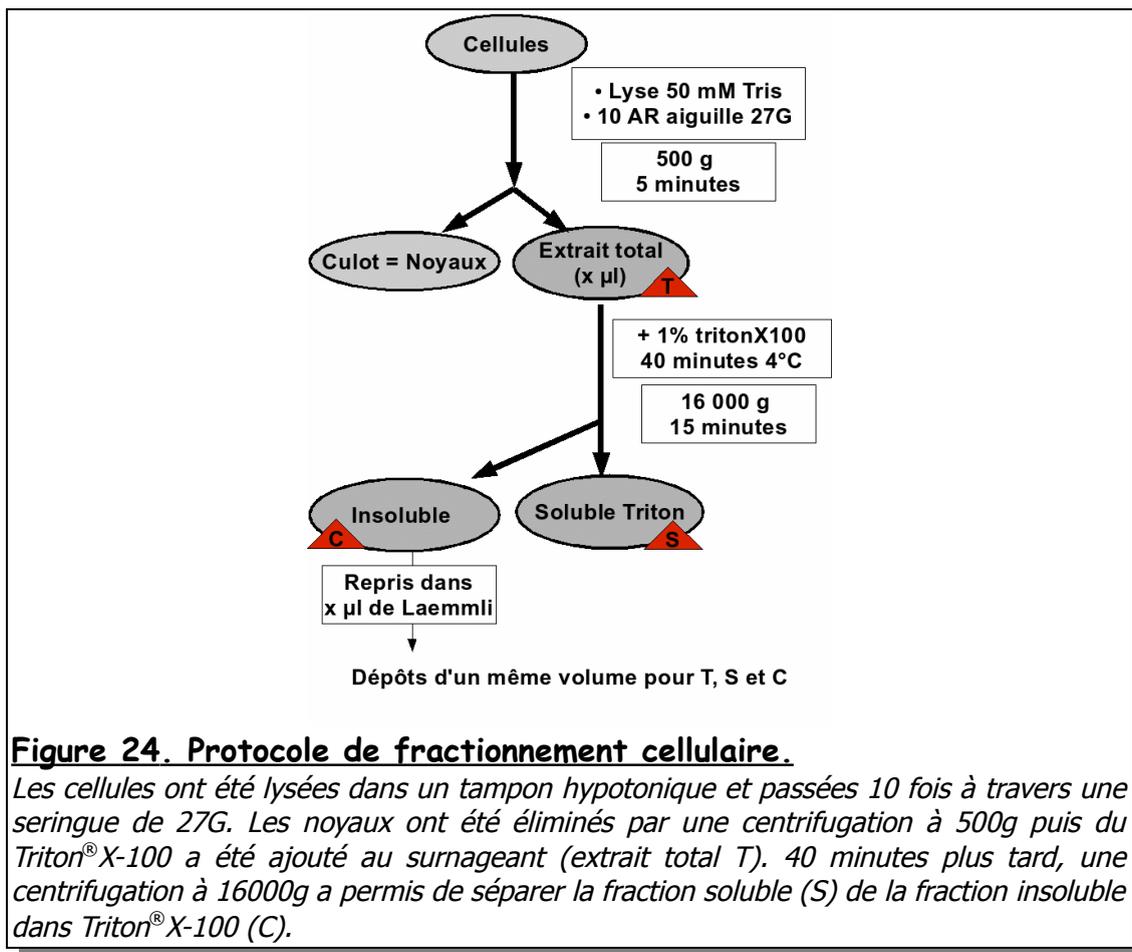
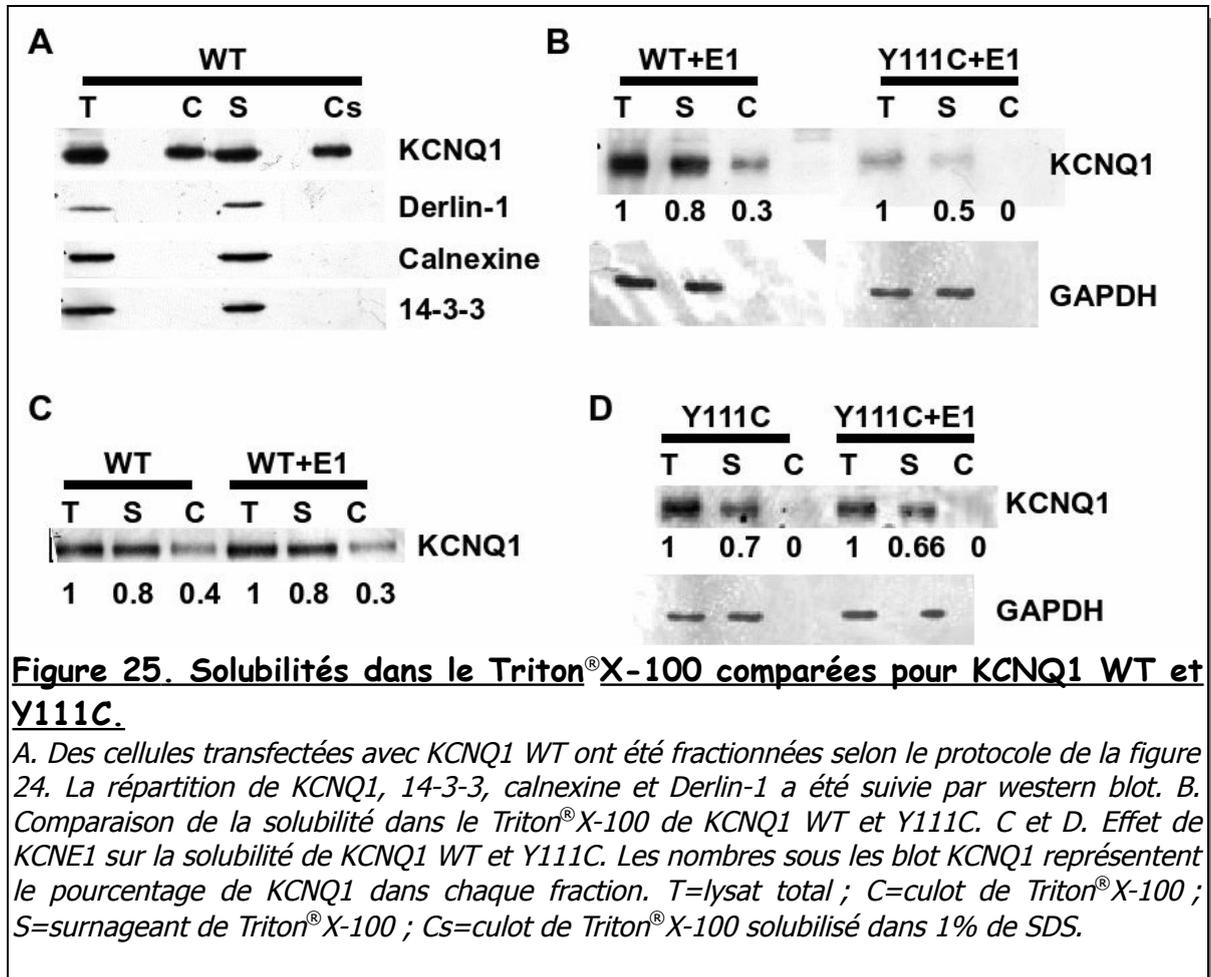


Figure 24. Protocole de fractionnement cellulaire.

Les cellules ont été lysées dans un tampon hypotonique et passées 10 fois à travers une seringue de 27G. Les noyaux ont été éliminés par une centrifugation à 500g puis du Triton® X-100 a été ajouté au surnageant (extrait total T). 40 minutes plus tard, une centrifugation à 16000g a permis de séparer la fraction soluble (S) de la fraction insoluble dans Triton® X-100 (C).

l'UPR dans ces cellules était suivie en mesurant la fluorescence Vénus par microscopie (cf figure 22 A à D) et cytométrie en flux (cf figure 22 E).



Comme on le voit sur la figure A, en absence de stress (ni transfection, ni traitement par la tunicamycine) quelques cellules étaient vertes. Le nombre de cellules vertes n'était pas augmenté lorsque les cellules étaient transfectées avec les plasmides codant pour KCNQ1 WT ou Y111C. L'analyse par cytométrie de flux a donné des résultats similaires (cf figure 22 G) : le taux de cellules Vénus positives et l'intensité de fluorescence étaient les mêmes que les cellules aient été cotransfectées avec KCNQ1 WT (tracé bleu) ou Y111C (tracé rose) (de l'ordre de 4%). Les cellules contrôles, qui ont été transfectées avec le double d'ADNc XBP1_Vénus, étaient deux fois plus nombreuses à être Vénus positives (courbe verte). Au final, dans toutes les



conditions où la construction Vénus a été employées, le nombre de cellule verte était proportionnel à la quantité d'ADN de XBP1-Vénus transfectée. Ceci suggère que la fluorescence observée était due au bruit d'expression du plasmide plus qu'à une activation de l'UPR par la mutation Y111C. Cette conclusion est renforcée par le fait qu'un traitement des cellules à la tunicamycine (activateur de l'UPR) n'augmentait pas le nombre de cellules exprimant Vénus (cf figure 22 C) alors que l'on se serait attendu à une augmentation du pourcentage de cellules Vénus positives. Pour nous assurer que l'absence d'effet de la tunicamycine ne résultait pas d'une mauvaise utilisation de cette dernière, nous avons vérifié qu'elle était capable d'activer l'UPR dans nos conditions expérimentales. Nous avons mesuré le niveau d'expression de la chaperonne BiP dont l'expression augmente quand l'UPR est déclenchée (cf figure 22 F). On voit que le niveau de protéine chaperonne BiP était augmenté dans les cellules traitées à la tunicamycine ou au DTT, un autre activateur de l'UPR, comparativement aux cellules non transfectées (NT). Ceci confirme l'efficacité de notre traitement.

L'ensemble de ces résultats montre que la protéine Vénus était exprimée dans toutes les cellules où elle était transfectée, même en l'absence de stress et que le nombre de cellules transfectées par cette construction était faible (4%). Au final, cette construction n'est pas un bon outil pour suivre l'activation de l'UPR dans les conditions où nous souhaitons l'utiliser.

Finalement, nous avons utilisé la protéine rapporteuse BiP pour détecter une activation de l'UPR par la mutation Y111C. Comme on le voit sur la figure 22 F, le niveau d'expression de BiP n'était pas plus élevé dans des cellules exprimant KCNQ1 WT ou Y111C que dans des cellules non transfectées (NT). Ces résultats suggèrent que l'UPR n'est pas activée par l'expression du mutant Y111C. Cependant, on ne peut pas exclure que le pourcentage de cellules exprimant KCNQ1 (entre 5 et 10%)²⁴ ait été trop faible pour produire une augmentation de BiP qui soit détectable.

24 Taux de transfection mesuré par FACS par un marquage extra-cellulaire grâce à un tag VSV.

II. LE MUTANT Y111C S'ASSOCIE AVEC KCNE1.

Les expériences de pulse-chase ont montré que la protéine KCNE1 prolongeait la demi-vie de KCNQ1 WT et Y111C ce qui suggère que la mutation Y111C n'empêche pas l'association KCNQ1 KCNE1. Afin de vérifier la capacité du mutant Y111C à s'associer avec KCNE1 nous avons réalisé des expériences de co-immunoprécipitation.

Des cellules HEK ont été transfectées transitoirement avec les ADNc de KCNQ1 WT ou Y111C et de KCNE1 marquée avec le tag 3xFLAG en C-terminal²⁵. La figure 23 A montre l'expression de KCNQ1 et KCNE1 dans les lysats de ces cellules. La protéine KCNE1 glycosylée apparaît par quatre bandes de poids moléculaires différents. Le mutant Y111C était moins exprimé que la protéine WT, résultat concordant avec les expériences précédentes.

En présence du mutant, la protéine KCNE1 était moins exprimée (piste 2 et 3) que lorsqu'elle était exprimée seule (piste 4) ou en présence de la protéine KCNQ1 WT (piste 1).

KCNQ1 a été immunoprécipité à partir des lysats précédemment décrits puis KCNQ1 et KCNE1 ont été révélés par western blot (cf figure 23 B). Lorsque KCNQ1 WT était immunoprécipité (piste 2) KCNE1 l'était également. Cette co-immunoprécipitation était spécifique car en présence du peptide bloquant de KCNQ1 (piste 3) ou en absence d'immunoglobuline anti-KCNQ1 (piste la plus à droite) KCNE1 n'était pas précipité. KCNE1 était également co-immunoprécipité avec le mutant Y111C (piste 4 et 6) mais le signal KCNE1 était plus faible qu'avec KCNQ1 WT. Ces résultats montrent que KCNQ1 WT et Y111C sont capables de s'associer à KCNE1. Il est cependant difficile de se prononcer à partir de ce genre d'expérience sur une affinité différentielle de KCNE1 pour KCNQ1 WT et Y111C.

²⁵ pIRES2-KCNE1-3xFLAG-eGFP fourni par A George (*Manderfield & George, 2008*).



Remarque : Pour contrôler l'efficacité du peptide bloquant utilisé comme témoin négatif d'immunoprécipitation, les lysats après immunoprécipitation ont été récupérés et la protéine KCNQ1 restante a été révélée par western blot (cf figure 23 C). Lorsque l'immunoprécipitation avait été réalisée en présence du peptide bloquant (piste 1), la quantité de KCNQ1 restante dans le lysat était très supérieure à celle restante dans le lysat où KCNQ1 avait été immunoprécipité (piste 2). Ceci confirme l'efficacité du blocage par le peptide et valide le contrôle d'immunoprécipitation.

III. LA MUTATION Y111C NE PROVOQUE PAS L'AGRÉGATION DE KCNQ1 DANS DES COMPLEXES INSOLUBLES DANS LE TRITON[®]X-100.

Au cours de leur synthèse, les protéines qui ne passent pas le contrôle qualité sont dirigées vers la voie OFF, c'est à dire vers la voie de dégradation par le protéasome, ou, si le protéasome est surchargé ou inhibé, vers la formation d'agrégats insolubles (*Johnston et al., 1998; Kopito, 2000*). Comme la mutation Y111C empêche le cheminement de KCNQ1 vers la membrane cytoplasmique, nous avons supposé que cette mutation pourrait favoriser la formation de tels agrégats. Pour vérifier cela, nous avons transfecté des cellules HEK avec KCNQ1 WT ou Y111C et séparé les lysats cellulaires en fractions solubles et insolubles au Triton[®]X-100 selon le protocole décrit sur la figure 24. La répartition de KCNQ1 dans ces différentes fractions a été suivie par western blot (cf figure 25).

Comme on le voit sur la figure 25 A, la protéine KCNQ1 WT présente dans la fraction totale T se répartissait à la fois dans le culot C et dans le surnageant S. Nous avons d'abord vérifié que la séparation « soluble insoluble » n'était pas un artéfact dû à une contamination par des cellules non lysées. En effet, la présence de cellules non lysées avant la centrifugation à 16000g donnerait un signal KCNQ1 dans la fraction C et donc l'impression d'avoir des agrégats dans le culot. A l'inverse de KCNQ1, la protéine cytosolique 14-3-3 était uniquement présente dans la fraction soluble ce

qui confirme que le culot ne contenait pas de cellules non lysées. Un défaut de solubilisation des protéines membranaires par le Triton[®]X-100 pourrait expliquer la présence de KCNQ1 dans le culot de 16000g. Nous avons donc vérifié que le Triton[®]X-100 était capable de solubiliser les protéines Derlin-1 et calnexine, deux autres protéines membranaires. Ces deux protéines se trouvaient uniquement dans la fraction soluble ce qui montre que le Triton[®]X-100 était utilisé dans des conditions permettant la solubilisation des protéines membranaires. Finalement, le culot C a été repris dans un tampon avec 1% de SDS et soumis à une nouvelle centrifugation à 16000g. On voit que KCNQ1 contenu dans le culot C était alors retrouvé en totalité dans le surnageant (Cs) de cette deuxième centrifugation. Ces résultats montrent que notre technique de fractionnement permettait de séparer KCNQ1 en une fraction soluble dans le Triton[®]X-100 (1%) et une fraction insoluble dans le Triton[®]X-100 mais soluble dans le SDS (1%).

Nous avons ensuite comparé la solubilité de KCNQ1 WT et celle de KCNQ1 Y111C (panel B). Comme on peut le voir sur cette figure, KCNQ1 WT est plus exprimé que KCNQ1 Y111C (comparer les pistes T). On retrouve le résultat précédant, à savoir qu'une partie de KCNQ1 WT est insoluble dans le Triton[®]X-100. En revanche, pour le mutant Y111C, on ne voit pas de signal dans la fraction C. Cependant, la fraction soluble (S) ne contient qu'une partie (50 %) du Y111C présent avant solubilisation (T), il est donc probable qu'une fraction de Y111C soit présente dans le culot mais en quantité trop faible pour être détectable.

Nous avons également cherché à savoir si KCNE1 pouvait favoriser la solubilisation de KCNQ1. Comme illustré sur les figures C et D, co-exprimer KCNE1 avec KCNQ1 WT (panel C) ou Y111C (panel D) ne change pas la fraction de KCNQ1 solubilisé par le Triton[®]X-100.



DISCUSSION - CONCLUSIONS.

Dans ce travail, nous avons étudié la biodégradation du canal KCNQ1, l'implication du contrôle qualité dans le syndrome du QT long dû à la mutation Y111C et le rôle de KCNE1 au cours de la synthèse de KCNQ1.

La demi-vie de la protéine KCNQ1 que nous avons calculée est de 2 heures. Ce temps de 2 heures est du même ordre de grandeur que ceux calculés pour les canaux K_v1.1 (5h) (*Deal et al., 1994*), hIK1 (3h) (*Jones et al., 2004*), KCNQ2 (2h) (*Soldovieri et al., 2006*), K_v1.3 (4h) (*Colley et al., 2007*) ou hERG (8h) (*Kagan et al., 2000*). Cependant, ce temps est à considérer avec précaution. En effet, ce calcul a été fait en ne considérant que les quatre premières heures de dégradation. Or, après 4h de dégradation il reste encore 30% de la protéine KCNQ1. Le temps au bout duquel toute la protéine KCNQ1 est dégradée n'est donc pas connu ce qui conduit à sous-estimer la demi-vie. De plus, nous avons observé qu'après 8h de dégradation (non montré) la quantité de protéine KCNQ1 restante était d'environ la moitié de celle restante à 4h. Il y a donc un ralentissement de la dégradation au delà de 4h. Ceci traduit la probable existence de deux lots de protéines KCNQ1, comme cela a été décrit pour la protéine CFTR (*Ward & Kopito, 1994*) : l'un dégradé rapidement et l'autre plus stable qui pourrait être les protéines qui sortent du RE et sont exprimées à la surface cellulaire. Pour la protéine CFTR, la distinction entre ces deux lots est aisée grâce à la glycosylation (marqueur de maturation) qui permet de distinguer sur le pulse-chase les deux formes de la protéine et de calculer la demi-vie de la forme instable (30 minutes) indépendamment de celle de la forme stable (plusieurs dizaines d'heures). La protéine KCNQ1 n'étant pas glycosylée, notre hypothèse ne peut pas être vérifiée simplement et la demi-vie que nous calculons tiens compte à la fois de la forme instable et de la forme stable.

La **dégradation rapide** de la protéine KCNQ1 traduit la faible efficacité de sa biosynthèse dans le modèle cellulaire HEK. Les cellules HEK que nous avons utilisées expriment l'antigène T du virus SV40 ce qui augmente la transcription des gènes sous



le contrôle d'un promoteur CMV. Ceci permet d'avoir une forte expression du canal KCNQ1 mais avec des biais dus à la forte expression. Le faible rendement de synthèse lors de sur-expression est bien connu pour la protéine CFTR pour laquelle on estime que seulement 25% des protéines synthétisées donnent une protéine mature (*Ward &Kopito, 1994*). Ce faible pourcentage de maturation est le fait du modèle cellulaire et de la sur-expression. En effet, il a été montré récemment que la protéine CFTR était synthétisée avec une efficacité proche de 100% dans des cellules Calu-3 et T84 qui expriment CFTR de façon endogène (*Varga et al., 2004*). Ward et al. n'avaient observé que 25% de maturation dans les cellules T84 mais ils n'avaient attendu que 2h alors que Varga et al. ont attendu 4h. Nous avons essayé de déterminer la demi-vie de la protéine KCNQ1 endogène exprimée par les cellules T84 mais son expression était trop faible et le marquage de la protéine KCNQ1 n'a pas pu être détecté.

La **mutation Y111C accélère la dégradation** de la protéine KCNQ1 (demi-vie de 82 minutes). Cet effet délétère d'une mutation sur la stabilité d'une protéine est connu pour de nombreuses protéines dont hERG (*Kagan et al., 2000*) et CFTR (*Ward &Kopito, 1994*). Elle peut s'expliquer par une interaction prolongée avec les protéines chaperonnes mais ce mécanisme ne semble pas impliqué pour KCNQ1. En effet, la mutation Y111C ne favorise pas l'association de KCNQ1 avec les protéines chaperonnes Hsp70 ou Hsp90, mécanisme responsable de la rétention et de la dégradation des mutants des canaux hERG (*Ficker et al., 2003*) et CFTR (*Rubenstein &Zeitlin, 2000*). Comme nous l'avons montré, la protéine KCNE1 stabilise KCNQ1. Une abolition de cette liaison du fait de la mutation Y111C aurait pu expliquer la stabilité moindre. Cette hypothèse est invalidée par les expériences de pulse-chase, qui montrent que KCNE1 stabilise également la protéine mutante, et par les expériences de co-immunoprécipitation qui montrent que KCNE1 et KCNQ1-Y111C s'associent. Nous avons également supposé que la mutation Y111C puisse activer l'UPR, ce qui favoriserait sa dégradation. Nos résultats ne montrent pas d'activation d'UPR mais ne permettent pas d'exclure cette hypothèse. En effet, nous avons travaillé à l'échelle

d'une population cellulaire dans laquelle toutes les cellules n'exprimaient pas la protéine mutante. Si le taux de cellules exprimant KCNQ1-Y111C était faible, une élévation minime de la protéine BiP, dans ces cellules, a pu passer inaperçue.

Le **protéasome** participe à la dégradation de KCNQ1 WT et Y111C. Cependant, la proportion de KCNQ1 dont la dégradation est bloquée par le MG132 est de 84% pour la protéine sauvage contre 54 % pour la protéine mutante. Cette différence d'efficacité peut faire penser que d'autres voies interviennent. Comme nous l'avons vérifié, il ne s'agit ni de la voie du lysosome ni de la voie GTP-dépendante. Le MG132 exerce un effet transitoire sur le protéasome et la vitesse de dégradation de la protéine Y111C est supérieure à celle de la protéine WT. Si l'on suppose que le MG132 n'est efficace que pendant le début de la période de chasse, alors, quand son effet disparaît, la dégradation reprend plus rapidement pour le mutant Y111C que pour la protéine sauvage. Ainsi, au bout de 4h, plus de protéines mutantes que de protéines sauvages seront dégradées. Il est également possible qu'en présence de l'inhibiteur du protéasome la protéine Y111C forme des agrégats insolubles au Triton[®]X-100 donc non visibles sur le pulse²⁶. Cette hypothèse a été proposée par Kopito pour expliquer l'apparente inefficacité des inhibiteurs du protéasome à bloquer complètement la dégradation de la protéine CFTR (*Kopito, 1999*).

Nous avons montré que **la protéine Derlin-1** ne participait pas à la dégradation de la protéine KCNQ1 ni lors de sur-expression ni sur la protéine endogène (T84). Notre étude a été réalisée dans des cellules HEK transfectées transitoirement. On peut penser que, du fait de la sur-expression, les systèmes de dégradation en aval de la protéine Derlin-1 soient saturés et que sur-exprimer Derlin-1 ne peut alors plus avoir d'effet. Cette hypothèse est peu probable. En effet, nous avons obtenu les mêmes résultats en travaillant avec 10 fois moins d'ADNc de KCNQ1. De plus, la protéine mutante qui est nettement moins exprimée que la protéine sauvage n'était pas plus sensible à la sur-expression de Derlin-1. Le fait que la protéine Derlin-1, impliquée dans la reconnaissance des mauvais repliements situés du côté de la lumière du

²⁶ Seules les protéines solubles sont immunoprécipitées, donc visibles sur le pulse.



RE (*Vashist & Ng, 2004*), ne participe pas à la dégradation du mutant Y111C, permet de supposer que la mutation Y111C, située dans le cytosol, ne modifie pas de façon importante le repliement de KCNQ1.

La rétrotranslocation de KCNQ1 ne se faisant pas par la voie de la Derlin-1, il y a donc une autre voie permettant cette rétrotranslocation. Une voie de dégradation indépendante de la protéine Derlin-1 et nommée HIP a été caractérisée chez la levure (*Haynes et al., 2002*). Elle a été impliquée dans la dégradation de protéines membranaires et pourrait donc l'être dans celle de KCNQ1.

L'effet chaperonne de KCNE1 lors de la synthèse de KCNQ1 est un résultat original de ce travail. Cependant, l'effet que nous avons observé est faible, aussi bien sur la protéine sauvage que sur la protéine mutante, et n'a pas été retrouvé par western blot (non montré). En effet, les niveaux d'expression de KCNQ1 24 h après transfection étaient identiques avec et sans KCNE1 aussi bien pour KCNQ1 WT que Y111C. A l'inverse, la protéine KCNE1 semble être moins exprimée lorsqu'elle est exprimée avec KCNQ1 Y111C (cf figure 23). Ceci suggère que KCNQ1 pourrait avoir un effet chaperonne sur KCNE1 comme cela a été évoqué par une autre étude (*Chandrasekhar et al., 2006*).

Conclusions.

Ce travail est le premier à déterminer la demi-vie de la protéine KCNQ1 et à s'intéresser aux conséquences des mutations de ce canal sur sa biosynthèse. Nous avons montré que la dégradation de KCNQ1 était due au protéasome et nous avons exclu la participation de la protéine Derlin-1 dans la dégradation de KCNQ1. La protéine Sec61 et la voie HIP sont d'autres voies possibles pour la rétrotranslocation de KCNQ1. Leurs rôles pourraient être étudiés dans une étude ultérieure sur des cellules exprimant KCNQ1 de façon stable. Les mécanismes moléculaires et les changements structuraux qui résultent de la mutation Y111C et provoquent sa rétention dans le RE restent à caractériser. Enfin, le rôle de KCNQ1 sur la biosynthèse de KCNE1 pourrait être étudié.

La restauration du trafic des protéines retenues dans le RE est une piste thérapeutique intéressante. Encore faut-il que la protéine mutante exprimée à la membrane soit fonctionnelle et qu'elle y reste suffisamment longtemps. Cette stratégie est étudiée depuis longtemps pour restaurer le trafic de la protéine CFTR- Δ F508 et l'on dispose maintenant de chaperonnes pharmacologiques capables de restaurer en partie le trafic de la protéine mutante. Malheureusement, une fois à la surface des cellules, la protéine mutante n'y reste que 4h, au lieu de 48h pour la protéine sauvage (*Heda et al., 2001*), car son endocytose est accélérée (*Swiatecka-Urban et al., 2005*). Cette stratégie thérapeutique est-elle envisageable pour le LQT1? Plusieurs arguments sont en défaveur de cette approche. Actuellement, les tentatives pour restaurer l'expression membranaire de mutant LQT1 ont été des échecs (*Wilson et al., 2005*). Par ailleurs, KCNQ1 fonctionne en tétramères et l'on ignore si des tétramères formés de protéines sauvages et mutantes²⁷ seront fonctionnels. Ainsi, si l'on en juge par les effets du mutant P117L, dont le défaut de trafic était faible et qui modifiait les cinétiques du courant I_{Ks} (*Dahimène et al., 2006*), ou par la mutation Q357R qui altère à la fois le trafic et l'activation de KCNQ1 (*Boulet et al., 2006*), on peut craindre que les tétramères obtenus par restauration de trafic produisent un courant I_{Ks} anormal. Enfin, l'efficacité des chaperonnes pharmacologiques dépend en partie de la mutation. Or, dans le LQT1, contrairement à la mucoviscidose où plus de la moitié des patients ont une même mutation (Δ F508), les mutations qui provoquent un défaut de trafic de KCNQ1 sont nombreuses. On peut donc craindre qu'une chaperonne pharmacologique donnée ne soit efficace que chez un nombre restreint de patients.

27 Je parle ici de protéines mutantes normalement non exprimées à la membrane et dont le trafic serait restauré. Il est évident que de nombreuses mutations n'empêchent pas l'expression membranaire et forment des tétramères non fonctionnels.



MATÉRIELS ET MÉTHODES.

I. BIOLOGIE MOLÉCULAIRE.

A. Plasmides.

Les séquences codantes de hKCNQ1²⁸ WT (#385)²⁹ et mutants Y111C (#384), L114P et P117L ont été clonées dans le plasmide pCB6 (promoteur CMV) comme décrit par Dahimene (*Dahimene, 2007*). L'ADNc de hKCNE1 (#5) a été inséré dans le plasmide pRc/CMV. L'ADNc de hDerlin-1 (#610), fournit par Dr. Hidde Ploegh (Whitehead Institute, Cambridge, MA, USA) a été cloné dans le plasmide pCB6. L'ADNc de la protéine CD4, utilisé comme balaste de transfection, a été cloné dans le plasmide pCB6 (#20). Un vecteur pCITE (promoteur T7) (#387), non transcrit dans les cellules eucaryotes, a été employé comme balaste de transfection. Le vecteur pIRES2-KCNE1-3xFLAG-eGFP, pour la construction KCNE1-FLAG, nous a été fourni par le Dr Al George (Nashville, TN, USA).

B. siRNA anti-Derlin-1.

Pour éteindre l'expression de la protéine Derlin-1, nous avons utilisé le siRNA ciblant les nucléotides 445 à 463 de l'ARNm, publié par Hegde et al (*Hegde et al., 2006*) (5'-CGAUUUAAGGCCUGCUAUUtt-3'). Le siRNA contrôle était un siRNA « scramble ». Les siRNA ont été achetés chez Ambion (Cambridgeshire, UK).

²⁸ hKCNQ1 désigne le gène KCNQ1 humain.

²⁹ (#385) référence laboratoire du plasmide.

II. CULTURE CELLULAIRE.

A. HEK293FT.

Les cellules HEK293 (human embryoniques kidney) sont des cellules non polarisées d'origine rénale. La lignée 293FT est transformée avec l'antigène T du virus SV40 ce qui permet d'avoir une forte expression des plasmides contenant un promoteur CMV. Elles ont été cultivées en milieu DMEM supplémenté en L-glutamine 1%, SVF (10%), pénicilline et streptomycine 1%. Elles étaient placées à 37°C dans un incubateur à CO₂ (5%). Les cellules ont été repiquées tous les 3 ou 4 jours par dilution au dixième.

B. T84.

Les cellules T84 sont des cellules issues d'un cancer colique. Ce sont des cellules épithéliales qui expriment KCNQ1 de façon endogène. Elles ont été cultivées dans un milieu Ham's F12:DMEM 1:1 complété comme pour les cellules HEK. Elles étaient repiquées tous les 3 ou 4 jours. Le temps de traitement à la trypsine pour décoller ces cellules est de 8 minutes.

III. TRANSFECTION.

A. Par vecteur chimique : Fugène6.

Pour réaliser les transfections, les différentes solutions plasmidiques ont été diluées pour avoir toutes la même concentration (300 ng/μl). Ceci permet d'éviter de pipeter de faibles volumes et conduit à une erreur de volume identique pour chaque transfection. Les plasmides ont été transfectés avec du Fugène6 (Roche). Pour un puits de plaque 6 puits : 100 μl de DMEM (non complété) + 3 μl de Fugène6 + 2 μg de plasmide ont été mélangés dans cette ordre et sans autre mélange (ni vortex ni pipette). 20 à 30 minutes après, le mélange de transfection était pipeté 3 fois puis



déposé sur les cellules. Aucun changement de milieu n'est nécessaire. Pour les boîtes de 10 cm de diamètre, le mélange de transfection était : 600 µl de DMEM + 18 µl de Fugène6 + 12 µg d'ADNc. KCNQ1 représentait 1/3 de l'ADNc transfecté, KCNE1 un autre tiers et Derlin-1 le dernier tiers. En l'absence de KCNE1 et/ou de Derlin-1, l'ADNc de la protéine CD4 était utilisé en remplacement pour maintenir la quantité totale d'ADNc constante entre les différentes conditions.

Les cellules étaient employées 24h après transfection.

B. Par électroporation : Système Amaxa.

Les cellules T84 ont été transfectées avec le système d'électroporation AMAXA. Le kit Amaxa Cell Line Nucleofactor kit T a été utilisé selon les recommandations du fabricant. Deux millions de cellules ont été transfectées avec 150 pmol de siRNA. L'effet du siRNA a été évalué 48h après transfection.

IV. BIOCHIMIE.

A. Extractions de protéines.

Les extractions ont été réalisées sur de la glace.

1. Extraction hypotonique.

Pour les expériences d'expression à l'état stationnaire, les cellules ont été rincées une fois au PBS puis suspendues dans un tampon hypotonique (50 mM tris pH 7.5 + cocktail d'antiprotéase Roche Complete avec 1 mM d'EDTA), passées 10 fois à travers une seringue de 27G et centrifugées 5 minutes à 500g pour précipiter les noyaux.

2. Extraction pour immunoprécipitation.

Les cellules ont été rincées 1 fois au PBS. Elles ont été reprises dans un tampon

Tris 50mM pH 7.5, NaCl 150 mM, Triton®X-100 1% et antiprotéase Roche Complete. Le Triton®X-100 est un détergent non ionique utilisé pour solubiliser les protéines membranaires. Les cellules ont été passées 5 fois à travers une seringue de 25G, incubées 30 minutes à 4°C et centrifugées 15 minutes à 16 000g pour précipiter les fragments non solubilisés.

Après chaque extraction, une première aliquote de 20 µl était prélevée pour le dosage protéique et une seconde aliquote de 50 µl pour un éventuel western blot. Les extraits pouvaient être congelés à -20°C durant un week-end, sauf pour les immunoprécipitations qui étaient toujours réalisées immédiatement après extraction. Les protéines immunoprécipitées et éluées par le Laemmli pouvaient être conservées à -20°C durant un week-end.

B. Dosage de protéines.

Les concentrations protéiques dans les extraits cellulaires ont été dosées avec le kit colorimétrique D/C de Biorad, compatible avec de nombreux détergents dont le Triton®X-100.

C. Immunoprécipitation.

Les extraits protéiques obtenus ont été incubés over-night avec les anticorps d'immunoprécipitation selon les ratios suivants :

- 0,5 µl soit 0,4 µg d'anticorps anti-KCNQ1 (Alomone APC-022) pour 400 µl (400 µg de protéine) de lysats de HEK transfectées KCNQ1.
- 3 µg d'anti-KCNQ1, pour 800µl (1700 µg de protéines) d'extrait de T84.
- 2 µg d'anti-Derlin-1 pour 400 µl de lysat (1700 µg) d'extrait de T84.

Pour les immunoprécipitations KCNQ1, le contrôle négatif a été réalisé en neutralisant l'anticorps avec son peptide immunogène à raison de 10 µg de peptide pour 1 µg d'anticorps.

Le lendemain, 20 µl de billes d'agarose protéine G (GEHealthCare), préalable-



ment rincées avec le tampon de lyse, ont été ajoutées aux tubes d'immunoprécipitation. Après 1 heure supplémentaire à 4 °C, les tubes ont été centrifugés 30 secondes à 500g pour précipiter les billes de protéine G. 50 µl de surnageant a été prélevé pour contrôler l'efficacité de l'immunoprécipitation. Les billes ont été rincées plusieurs fois avec le tampon de lyse avec 500 mM NaCl. Le dernier rinçage a été réalisé sans NaCl. Les protéines immunoprécipitées ont été éluées par le tampon de Laemmli (cf ci-dessous).

D. Western blot.

Les protéines ont été dénaturées avec un tampon de Laemmli (concentrations finales : 65 mM Tris pH 6,8, 10% de glycérol, 2,3% de SDS et 10 mM de DTT) 10 minutes à 70 °C. Pour les immunoprécipitations, le Laemmli a été employé à concentration double et la concentration de DTT a été augmentée à 100 mM.

En fin d'électrophorèse, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose par la technique de transfert semi-sec. Le transfert des protéines a été contrôlé par coloration des protéines par le rouge ponceau. Les membranes ont été incubées une heure à température ambiante dans du TBS-T lait (0,1% Tween 20 et 5% de lait écrémé). Le lait sert d'agent bloquant pour saturer les sites de fixation des protéines sur la membrane. L'anticorps primaire a été incubé 1h à température ambiante ou une nuit à 4 °C (le signal était meilleur après l'incubation sur la nuit). La membrane a été rincée 3 fois pendant 10 minutes avec le TBS-T lait puis incubée une heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire couplé à la HRP (Horse Radish Peroxidase). La membrane a été rincée 30 minutes dans le TBS-T (sans lait). La révélation a été faite avec un kit ECL, sur film.

Les anticorps primaires ont été employés aux concentrations suivantes :

- KCNQ1 (Alomone APC-022) : 1/5000 pour les cellules HEK transfectées KCNQ1.
- KCNQ1 (Alomone APC-022) : 1/500 pour les cellules T84 (20 µg de protéines déposées).
- Derlin-1 (MBL PM018) : 1/2000 pour les lysats de cellules ; 1/500 pour les

co-IP.

- GAPDH Santa Cruz (sc-32233) : 1/10000.
- FLAG-HRP (Sigma A-8592) : 1/20000.

Tous les anticorps secondaires ont été employés au 1/10000.

E. Pulse-chase.

1. Principe.

Le pulse-chase ou marquage métabolique permet de marquer un pool de protéines, grâce à l'isotope radioactif ^{35}S , et de suivre la décroissance de ce pool au court du temps. On peut ainsi calculer la demi-vie d'une protéine.

Pour ce faire, les cellules sont placées dans un milieu contenant de la cystéine et de la méthionine marquée par l'isotope ^{35}S pendant un laps de temps bref (15 minutes). Toutes les protéines synthétisées pendant ces 15 minutes incorporent ces acides aminés « traceurs » ; c'est la phase de « pulse ». Les cellules sont ensuite placées dans un milieu normal ; c'est la phase de « chase ». Au court de cette phase, du fait des mécanismes de dégradation des protéines, les protéines marquées vont progressivement disparaître. En réalisant des prélèvements réguliers et en immunoprécipitant la protéine d'intérêt, on peut suivre la décroissance de cette protéine. La révélation de cette protéine d'intérêt se fait par autoradiographie, c'est à dire grâce à un écran à phosphore sensible au rayonnement émis par le ^{35}S contenu dans les protéines immunoprécipitées.

2. Réalisation.

Les cellules HEK transfectées ont été « pulsées » pendant 15 minutes dans un milieu contenant 0,5 mCi de ^{35}S (mélange de méthionine et cystéine GEHealthcare). Elles ont été rincées, placées dans un milieu froid (sans ^{35}S) et réparties dans 4 tubes. Le premier tube a été prélevé après 5 minutes de chase (point T0), le second une heure plus tard (T1), le troisième après 2 heures (point T2) et le quatrième



après 4 heures de chase (point T4). Les protéines ont été extraites et KCNQ1 immunoprécipité comme expliqué plus haut. Les protéines immunoprécipitées ont été séparées sur un gel SDS-PAGE 10%, ce dernier a été séché et placé au contact d'un écran à phosphore. Le signal sur l'écran a été lu avec un scanner Typhoon 9410 (GE-Healthcare). Le protocole détaillé est fourni [en annexe](#).

V. ANALYSE D'IMAGES ET CALCUL DE LA DEMI-VIE.

Les films de western blot ont été scannés sur un densitomètre ImageScanner et les images analysées avec le logiciel ImageJ³⁰.

Les images générées par le Typhoon ne peuvent pas être analysées par ImageJ. En effet, les valeurs des pixels enregistrées par le Typhoon ne suivent pas une échelle linéaire et doivent être transformées avant la quantification. Ces images ont été analysées avec ImageQuantTM.

Pour chaque temps (T0 à T4) de « chase », le signal a été quantifié et un bruit de fond obtenu sur des cellules non transfectées a été retiré. Les valeurs obtenues ont été rapportées à celle du temps T0 pour exprimer les résultats en pourcentage du pool marqué à T0. Pour calculer la demi-vie de KCNQ1, les valeurs obtenues ont été transformées par la fonction ln ce qui permet de linéariser les résultats selon l'équation $\ln(\%) = bt + 0$ où t est le temps de décroissance. Ainsi, la demi-vie, définie comme le temps nécessaire pour que 50% de KCNQ1 ait disparu, est donnée par

$$t_{0,5} = \frac{\ln(0,5)}{b} = \frac{-\ln(2)}{b} . b \text{ étant la pente de la droite de régression.}$$

VI. ANALYSE STATISTIQUE.

Les moyennes ont été comparées par un test t de Student.

Comparer les demi-vies calculées à partir de droites de décroissance revient à comparer les pentes (b) de ces droites. Un test de parallélisme a donc été utilisé. Dans tous les cas, le risque α a été choisi à 5%.

³⁰ ImageJ est disponible ici <http://rsbweb.nih.gov/ij/>.

PARTIE 2 :

IDENTIFICATION DE NOUVEAUX PARTENAIRES
DES CANAUX KCNQ1 ET SCN5A.



INTRODUCTION

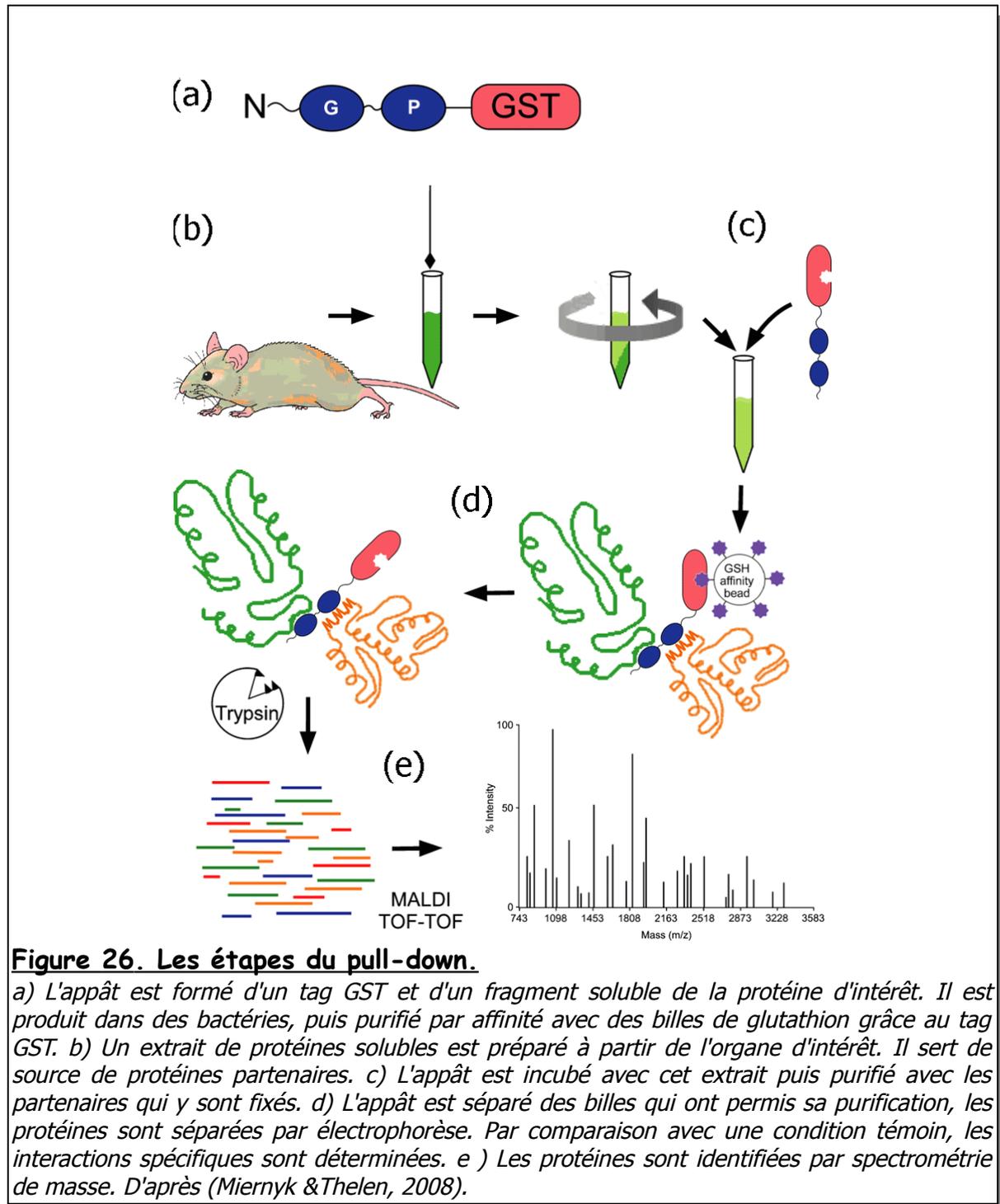
Les canaux KCNQ1 et SCN5A fonctionnent au sein de complexes macromoléculaires, c'est à dire des complexes protéiques où ils sont associés avec des **protéines partenaires**. Certaines de ces protéines partenaires ont été identifiées et il a été montré que leurs rôles dans la fonction de KCNQ1 et SCN5A étaient importants. Elles peuvent notamment :

- modifier les propriétés biophysiques des canaux ; c'est le cas des protéines KCNE (*Angelo et al., 2002; Barhanin et al., 1996; Grunnet et al., 2002; Schroeder et al., 2000; Tinel et al., 2000*), de la PKA et yotiao (*Marx et al., 2002; Potet et al., 2001*), de la tubuline (*Nicolas et al., 2008*) et de la calmoduline (*Shamgar et al., 2006*) pour KCNQ1 ; et des protéines FHF1B (*Liu et al., 2003*), de la calmoduline (*Tan et al., 2002*), de l'ankyrine B (*Mohler et al., 2003*) et de la téléthonine (*Mazzone et al., 2008*) pour SCN5A.
- modifier l'expression membranaire des canaux ; c'est la cas de la calmoduline (*Ghosh et al., 2006*) pour KCNQ1 ; de l'ankyrine G (*Mohler et al., 2004*), de la dystrophine (*Gavillet et al., 2006*), de MOG-1 (*Wu et al., 2008*) et de la CaMKII (*Hallaq et al., 2006b; Wagner et al., 2006*) pour SCN5A.
- favoriser l'endocytose du canal ; c'est la cas de Nedd4-2 pour KCNQ1 (*Jespersen et al., 2007*) et SCN5A (*van Bemmelen et al., 2004*), de SGK-1 (*Pearce, 2001*) pour KCNQ1, de la cavéoline-3 pour SCN5A (*Yarbrough et al., 2002*).
- ancrer le canal à un emplacement précis de la membrane comme c'est la cas de la protéine SAP97 qui immobilise le canal K_v1.5 aux jonctions entre myocytes (*Abi-Char et al., 2008*).

L'importance fonctionnelle de ces protéines partenaires est soulignée par le fait que des mutations sur les gènes codant pour ces protéines provoquent des troubles du rythme, dont le **syndrome du QT long**. Bien que de nombreux partenaires des canaux KCNQ1 et SCN5A soient déjà connus, plusieurs constatations cliniques laissent



penser que d'**autres sont à découvrir**. Ainsi, la pénétrance du LQTS est variable et faible (de l'ordre de 30%) (*Priori et al., 1999*) ; l'existence de polymorphismes protecteurs ou délétères sur des partenaires de SCN5A et KCNQ1 pourraient en partie expliquer cela. Inversement, chez 30 à 50 % des patients (*Tester et al., 2005*) ayant un LQTS, aucune cause n'a été trouvée ; l'origine pourrait donc être des mutations



sur des gènes codant pour des partenaires encore inconnus. Le syndrome du QT long est à l'origine de **morts subites** chez l'adulte, c'est d'ailleurs parfois la première manifestation de cette pathologie. Il est donc nécessaire de réaliser un diagnostic précoce des personnes à risque afin de mettre en place un traitement préventif. La sensibilité du diagnostic pourrait être améliorée si l'on connaissait plus de gènes responsables de LQTS. Les partenaires des canaux KCNQ1 et SCN5A étant de bons candidats pour ce diagnostic génétique, il est nécessaire de les identifier.

Identifier de nouveaux partenaires des canaux KCNQ1 et SCN5A permettrait donc de mieux comprendre la physiologie cardiaque, de pointer vers de nouveaux gènes candidats d'intérêt diagnostique et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. C'est pourquoi nous avons entrepris cette recherche de partenaires protéiques des canaux KCNQ1 et SCN5A ; travaux qui font l'objet de cette partie des résultats.

Le projet original était centré sur le canal KCNQ1 et la technique de pull-down avait été initialement choisie pour effectuer cette recherche. La technique a été mise au point pour la recherche des [partenaires des protéines KCNE](#) mais n'a pas pu être transposée à KCNQ1. Une approche par double hydride « [split-ubiquitin](#) » a donc été utilisée pour KCNQ1. Bien que la recherche de partenaires pour KCNQ1 et les KCNE n'ai pas abouti, les compétences acquises dans le domaine du pull-down ont été valorisées dans un autre projet du laboratoire dont l'objectif était d'identifier des [partenaires de SCN5A](#).

Les techniques permettant la recherche d'interactions protéiques sont présentées avant que ne soient exposés les résultats³¹. Les résultats concernant SCN5A ayant fait l'objet d'une publication sont présentés avant ceux concernant KCNQ1 et les KCNE.

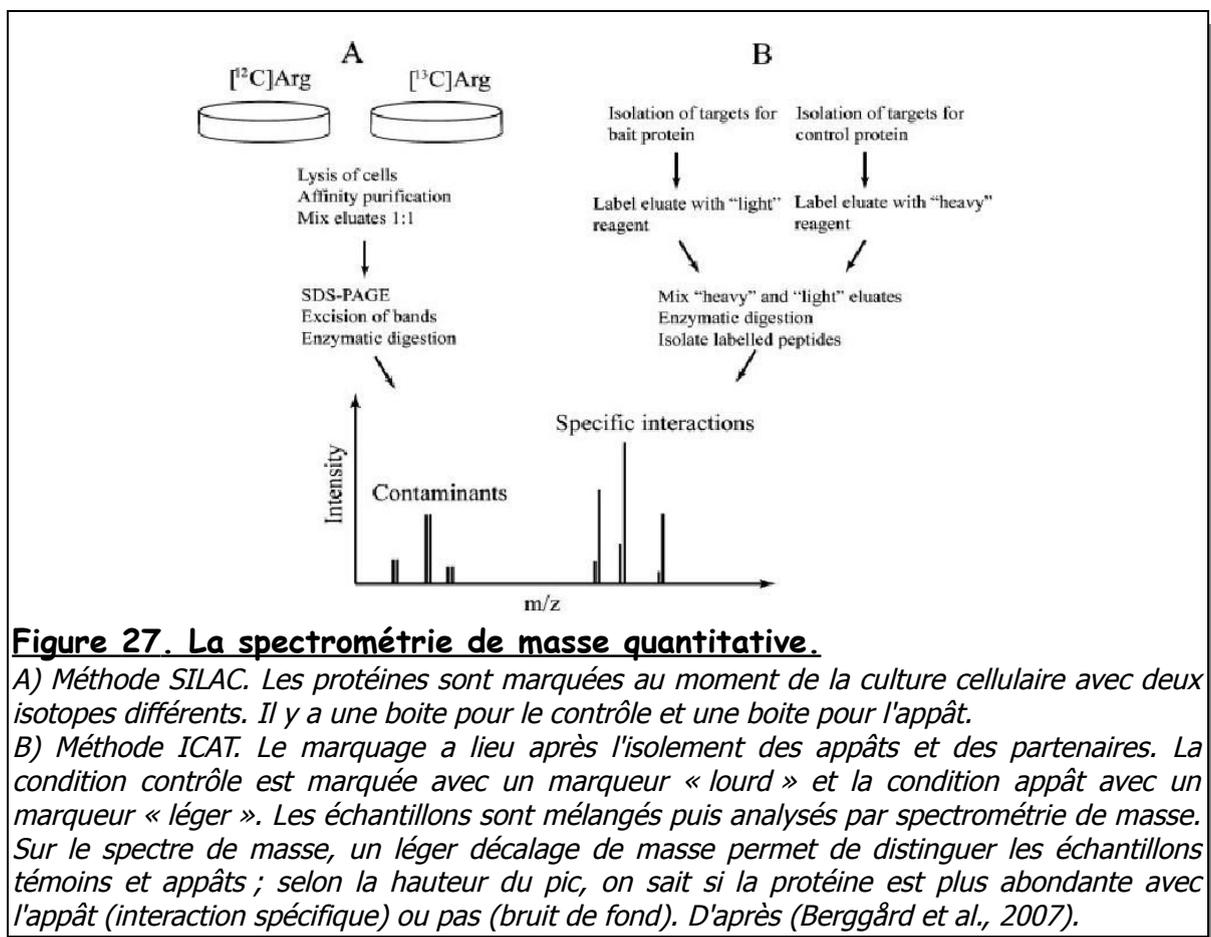
31 Le lecteur pressé peut se limiter à la lecture des techniques de [pull-down](#) et de « [split-ubiquitin](#) ».



I. METTRE EN ÉVIDENCE DES INTERACTIONS PROTÉINE-PROTÉINE.

Il existe de nombreuses approches pour mettre en évidence des interactions protéine-protéine (cf tableau 3 page 139). Les questions à se poser pour choisir les techniques à utiliser pour rechercher les partenaires de canaux ioniques sont :

- La technique est-elle utilisable pour les protéines membranaires? En effet, certaines techniques ne sont applicables que pour des protéines solubles.



- Veut-on réaliser un criblage, c'est à dire rechercher tous les partenaires possibles sans à priori, ou a-t-on déjà une hypothèse sur les protéines partenaires?
- L'interaction que l'on cherche est-elle forte ou labile? L'utilisation d'agents fixant les associations (cross-linking) sera peut être nécessaire.

- Y a-t-il des anticorps disponibles et efficaces (en immunoprécipitation et WB) dirigés contre la protéine appât et contre les partenaires potentiels?
- Peut-on utiliser une protéine de fusion? Est il possible de produire *in vitro* la protéine de fusion? A-t-elle les mêmes propriétés fonctionnelles que la protéine sauvage? La présence d'un tag modifie-t-elle l'expression et la localisation cellulaire de la protéine?
- Veut-on montrer l'interaction *in vivo*?
- L'interaction est-elle directe entre deux protéines, ou veut-on isoler un complexe protéique?
- Veut-on déterminer les paramètres thermodynamiques de l'interaction.
- Veut-on une méthode quantitative?

Dans ce travail de thèse, nous souhaitons mettre en évidence des nouveaux partenaires, sans à priori sur leurs identités. Dans ce type de projet, la première étape est une **étape de criblage** dont le but est d'identifier les partenaires potentiels. Ce criblage peut se faire par des techniques biochimiques (co-immunoprécipitation, purification par affinité, électrophorèse non dénaturante « blue-native »), des techniques génomiques (double hybride) ou par puces à protéines (*Miernyk & Thelen, 2008*) (*Berggård et al., 2007*). Il est ensuite nécessaire de **valider les interactions** potentielles car ces techniques de criblages, en particulier la purification par affinité et le double hybride, conduisent à de nombreux faux positifs. Le pourcentage de faux positifs est ainsi estimé entre 30 et 60 % pour des études par double hybride (*Berggård et al., 2007*). La validation s'effectue par co-immunoprécipitation, co-localisation par fluorescence, FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) ou BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer), Far western blot, essai de migration retard et résonance plasmique de surface (SPR). **Nous avons travaillé par pull-down et double hybride.**



A. Techniques de criblages.

1. Techniques biochimiques : purification par affinité.

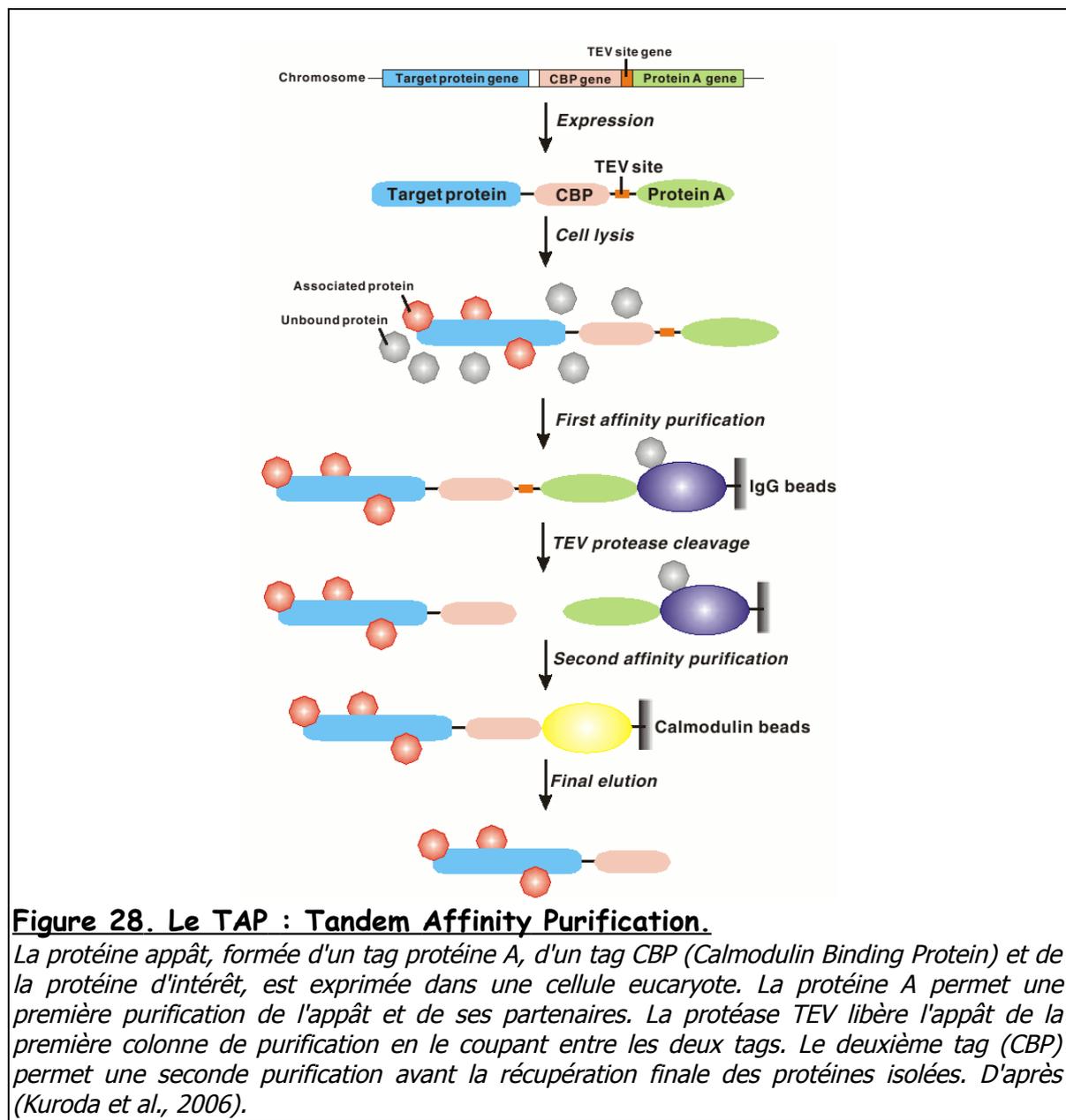
a. Le pull-down.

Le pull-down consiste à incuber une protéine appât formée d'un tag et de la protéine d'intérêt dans un extrait protéique (cf figure 26) (*Vikis & Guan, 2004*). Le tag permet de purifier l'appât et les protéines partenaires qui s'y sont fixées. Ces partenaires sont ensuite identifiés par spectrométrie de masse. Il faut toujours réaliser une condition contrôle (appât formé du tag uniquement) en raison des nombreuses interactions non spécifiques. En comparant les protéines isolées avec l'un ou l'autre des appâts, il est possible de repérer les interactions non spécifiques dues au tag et à la résine utilisée pour isoler la protéine appât. Cette technique a été utilisée avec succès pour mettre en évidence les partenaires de protéines membranaires comme le récepteur à la sérotonine (*Becamel et al., 2002*), le canal sodique SCN5A (*Gavillet et al., 2006*) ou le canal $K_{ir}2.2$ (*Leonoudakis et al., 2001; Leonoudakis et al., 2004*).

i. Les appâts.

Plusieurs tag peuvent être employés pour constituer la protéine appât. Nous avons travaillé avec un tag GST (Glutathion-S-Transférase) qui est donné pour améliorer la solubilité de la protéine appât. Le tag GST est purifié par affinité avec des billes d'agarose glutathion. D'autres couples tag/résine peuvent être employés comme Histidine/Nickel (*Kuroda et al., 2006*). La protéine appât est produite dans des bactéries BL-21. L'efficacité de cette production dépend du plasmide utilisé, de la taille, de la solubilité et de la toxicité de la protéine appât pour les bactéries. De nombreuses stratégies sont possibles pour améliorer cette production (*Makrides, 1996*). Il est souvent nécessaire de travailler avec un fragment de la protéine d'intérêt afin de conserver la solubilité de la protéine appât. La structure de la protéine appât peut donc être modifiée ce qui peut empêcher des interactions avec les parte-

naires. Pour les protéines membranaires, seuls les fragments solubles non membra-



naires peuvent être employés. Ainsi, nous avons utilisé les parties cytoplasmiques des canaux KCNQ1 et KCNE (parties C-terminales cf [matériels et méthodes](#)).

ii. L'extrait protéique.

Lors de pull-down, les interactions non spécifiques sont nombreuses et peuvent être réduites lors de la préparation des extraits. Elles sont le fait des protéines majo-

ritaires du cytosquelette, du métabolisme et des protéines chaperonnes qui, du fait de leur abondance, apparaissent plus fortement. Les adaptations de protocoles telles que : travailler à partir d'une fraction cellulaire, pré-incuber le lysat avec les billes d'agarose, éliminer les immunoglobulines avec une protéine G ou fragmenter l'ADN avec une nucléase, permettent de réduire ces contaminations (*Nguyen & Goodrich, 2006*). L'extrait protéique utilisé comme source de partenaires ne doit contenir que des protéines solubles afin de minimiser le bruit de fond dû à des interactions avec l'agarose ou à des sédimentations.

Lors de la préparation de ces extraits, la compartimentation cellulaire est rompue, des protéines qui normalement ne sont pas en relation avec la protéine d'intérêt peuvent alors être associées à cette dernière de façon artificielle. Par ailleurs, du fait de la dilution protéique et des rinçages nombreux, **les interactions faibles** peuvent être manquées.

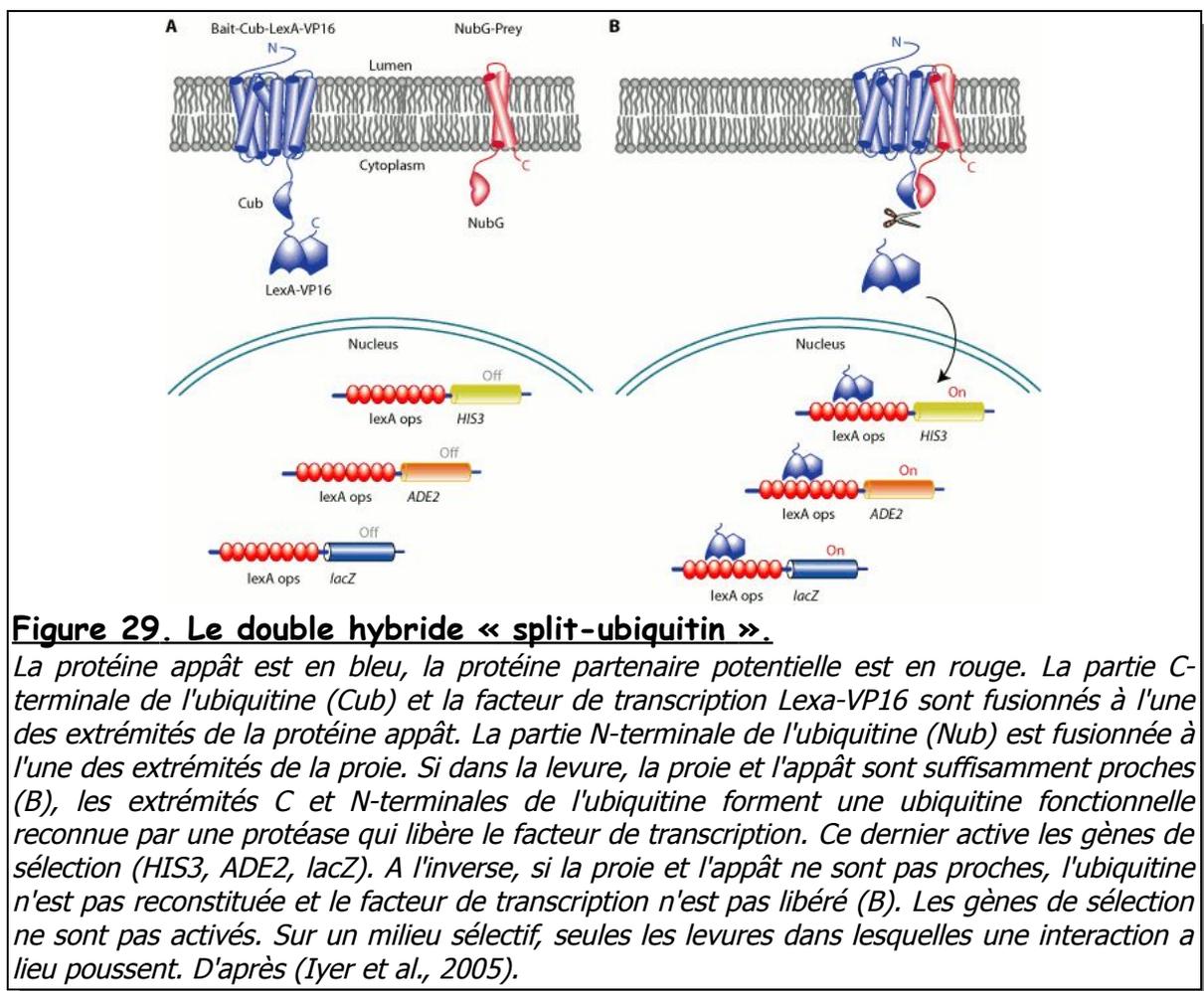
iii. Les spots spécifiques.

Les protéines isolées avec l'appât sont séparées par électrophorèse et visualisées par une coloration compatible avec la spectrométrie de masse. Nous avons travaillé par coloration au bleu colloïdal et à l'argent qui est plus sensible. La comparaison des gels obtenus avec l'appât et dans les conditions contrôles permet de définir les interactions spécifiques.

Il est également possible de travailler en DiGE (Difference Gel Electrophoresis) pour identifier les interactions spécifiques (*Westermeier & Scheibe, 2008*). Dans cette technique, les protéines isolées grâce aux appâts sont marquées par des cyanines (une cyanine pour la condition contrôle et une cyanine pour l'appât), mélangées puis séparées sur gel 2D. Sur un même gel, les interactions dues à l'appât sont visibles par une fluorescence et les non spécifiques par une autre fluorescence. Le repérage des spots spécifiques en est facilité. Ce type d'approche peut être automatisé ce qui limite la manipulation des gels 2D et donc les contaminations par la kératine.

Une dernière solution, pour distinguer les protéines spécifiquement liées à l'ap-

pât, est l'utilisation de techniques de spectrométrie quantitatives (ICAT : Isotope-Coded Affinity Tags et SILAC : Stable Isotope Labeling with Amino Acids in culture) (cf figure 27) (Gygi *et al.*, 1999). Les protéines de la condition contrôle et de la condition appât sont marquées avec un marqueur « lourd » et un marqueur « léger ». Les protéines isolées dans chacune des conditions sont mélangées et analysées par spectrométrie de masse sans étape d'électrophorèse ou de coloration. La présence des marqueurs « lourd » et « léger » permet de distinguer les protéines de la condition contrôle et de la condition appât sur le spectre de masse. Cette technique est quanti-



tative ; si le signal est plus intense dans la condition appât, cela signifie que l'interaction est spécifique. A l'inverse, si les signaux sont de même intensité, l'interaction est non spécifique.



iv. L'identification.

L'identification des partenaires est réalisée par spectrométrie de masse (*Wysocki et al., 2005*). Lorsque les protéines sont séparées par électrophorèse 1D, le nombre important de protéines contenues dans une bande de gel conduit à utiliser la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) (*Delahunty & Yates, 2005*). Lorsque une technique d'électrophorèse 2D est utilisée, chaque spot correspond à une ou deux protéines. La technique MALDI-TOF, qui est très sensible, peut alors être utilisée. Cette technique identifie les protéines par empreinte massique, c'est à dire à partir de la taille des peptides qui constituent la protéine (*Thiede et al., 2005*). Les séquences des peptides ne sont pas connues ; c'est la combinaison des tailles des différents peptides qui permet d'identifier la protéine. Si plus de trois protéines sont mélangées l'identification devient difficile.

Conclusions sur la technique de pull-down :

Limites : les protéines appâts et cibles doivent être solubles, faux positifs nombreux (chaperonnes et protéines abondantes, protéines bactériennes), pas de modifications post-traductionnelles de l'appât, inadaptée pour les interactions faibles.

Avantages : isolement de complexes protéiques

b. Autres approches biochimiques.

Les complexes protéiques membranaires peuvent être **immunoprécipités** directement à partir de tissu auquel on s'intéresse. Les composants des complexes isolés sont ensuite identifiés selon une stratégie similaire à celle du pull-down. Cette approche d'immunoprécipitation a par exemple été utilisée avec succès pour mettre en évidence les composants du complexe $K_v1.1$ (*Schulte et al., 2006*). La disponibilité d'un anticorps efficace pour réaliser l'immunoprécipitation et la capacité à solubiliser le complexe protéique sans dissocier les partenaires sont les principales limites de cette technique.

Dans le **TAP (Tandem Affinity Purification)**, la protéine appât est exprimée dans des cellules eucaryotes puis purifiée avec les partenaires qu'elle aura récupérés (cf figure 28) (*Berggård et al., 2007*). La purification se fait en deux étapes grâce aux deux tags de l'appât. Les appâts sont d'abord isolés par un premier tag (protéine A ou protéine G), puis rincés et décrochés de la première colonne grâce à un site de clivage pour une protéase (TEV). Le deuxième tag de l'appât (protéine liant la calmoduline ou la streptavidine) permet une seconde purification. Cette purification en deux étapes permet de limiter les interactions non spécifiques. L'avantage de cette technique est que les protéines appâts subissent les modifications post-traductionnelles, telles que les phosphorylations, qui peuvent être nécessaires à certaines interactions. Cependant, du fait de la sur-expression, des protéines chaperonnes sont souvent isolées. De plus, comme pour toute technique qui utilise un tag, la présence du tag peut modifier la structure et/ou la localisation cellulaire de la protéine.

La technique **d'électrophorèse non dénaturante** (Blue-Native PAGE) permet, à partir d'une fraction cellulaire (mitochondrie, membrane plasmique...), de séparer les complexes protéiques les uns des autres. Les protéines composant ces complexes peuvent ensuite être séparées par une électrophorèse classique et identifiées par spectrométrie (*Krause, 2006*). Aucun tag n'est nécessaire et l'on travaille sur du tissu natif ce qui limite les artéfacts. En contrepartie, le fractionnement cellulaire et la solubilisation des complexes sont les étapes clefs.



c. Interactions faibles et « cross-linking ».

Les interactions faibles sont difficiles à mettre en évidence par ce type d'approche. Cette limitation peut être en partie contournée par l'utilisation d'agents chimiques dont le rôle est de fixer les associations avant de réaliser l'extraction des protéines (cross-linking) (*Kluger & Alagic, 2004*). Plus la molécule servant à faire le « cross-linking » est longue, plus le risque de créer des interactions fausses est grand. Le di-succinimidyl suberate (DSS) est capable de traverser les membranes cellulaires ; il est fréquemment utilisé pour réaliser des « cross-linking » sur cellules. Le formaldéhyde est également utilisé avec précaution du fait de sa toxicité. Il réagit avec les lysines et est considéré comme le cross-linker le plus petit qui soit (2Å) (*Miernyk & Thelen, 2008*). Récemment, deux acides aminés (photo-leucine et photo-méthionine) permettant de réaliser un « photo-cross-linking » ont été développés (*Suchanek et al., 2005*). Utilisés de façon analogue aux acides aminés leucine et méthionine par la cellule, ils sont utilisés sur des cellules vivantes et le « cross-linking », obtenu par une exposition aux rayons ultraviolets, est aussi efficace qu'avec du DSS tout en étant plus spécifique.

Conclusion : L'une des principales limites des techniques biochimiques lorsque l'on s'intéresse aux canaux ioniques vient du caractère hydrophobe de ces protéines. En effet, pour toutes ces techniques, il est nécessaire de solubiliser soit la protéine appât, soit les complexes membranaires auxquels appartient le canal. Tout en rendant le complexe soluble, les tampons d'extraction (notamment les détergents utilisés) ne doivent pas dissocier ou empêcher la formation des complexes. La société LOGPHARM commercialise des tampons d'extractions pour ce genre d'applications (*Logopharm website, 2008*). Le principale avantage de ces techniques est la possibilité d'isoler des complexes protéiques.

2. Le double hybride « split-ubiquitin ».

La technique de double hybride est une technique *ex vivo* qui détecte les interactions directes entre deux protéines (*Fields & Song, 1989*). Des levures exprimant la protéine d'intérêt (ou protéine appât) sont transformées avec les plasmides d'une banque d'ADNc qui codent pour les partenaires potentiels (ou protéines proies). Dans ces levures, si une interaction entre la protéine «appât » et une protéine « proie » intervient, un facteur de transcription active des gènes rapporteurs ce qui permet d'isoler ces levures. Le séquençage des plasmides codant pour les proies permet d'identifier les partenaires potentiels. Dans la technique originelle de Fields, l'interaction doit avoir lieu dans le noyau ce qui rend cette technique inutilisable pour les protéines membranaires. La technique « split-ubiquitin » est une adaptation qui permet de contourner cette limite ; les interactions se font au niveau de la membrane plasmique mais l'activation des gènes rapporteurs est toujours nucléaire (cf figure 29) (*Johnson & Varshavsky, 1994; Stagljar et al., 1998*).

Dans le « split-ubiquitin », la protéine appât est fusionnée avec le fragment C-terminal de l'ubiquitine et le facteur de transcription Lexa-VP16. Les proies sont fusionnées avec le fragment N-terminal de l'ubiquitine. Lorsque la proie et l'appât sont proches, l'ubiquitine est reconstituée et reconnue par une protéase qui libère le facteur de transcription. Ce dernier gagne le noyau où il active les gènes rapporteurs (HIS3, AD2 et lacZ). La technique du double hybride a été utilisée pour mettre en évidence des interactions entre les canaux potassiques KAT1, AKT1 et AKT2 (*Obrdlik et al., 2004*), la protéine du réticulum endoplasmique BAP31 et la tyrosine phosphatase-like B (*Wang et al., 2004*), ou encore BAP31 et les protéines TRAM et Sec61b (*Wang et al., 2008*).

Avantages : interactions directes, haut débit.

Limites : auto-activation de certaines proies (faux positifs), dépendance vis-à-vis des banques disponibles.



Remarque : Une variante du « split-ubiquitin » a été développée chez *E.coli* (Wilson et al., 2004). Les fragments de l'ubiquitine sont remplacés par deux fragments de la GFP. Lorsqu'une interaction se produit, les bactéries émettent une fluorescence verte.

B. Techniques de validation.

1. Validation *in vivo*.

La co-localisation : les protéines partenaires sont marquées par des anticorps fluorescents puis visualisées par microscopie confocale. La superposition des images, obtenues pour chacun des fluorophores, permet de vérifier que les deux protéines sont dans le même compartiment cellulaire et très proches. Observer une co-localisation ne garantit pas l'association physique. A l'inverse, ne pas observer de co-localisation est difficilement compatible avec une interaction physique.

Le FRET : la protéine appât et la protéine partenaire sont marquées avec des fluorophores (ou des anticorps eux-mêmes marqués), l'un est dit donneur et l'autre accepteur. Lorsque les deux protéines sont proches (moins de 10 nm) le donneur excite le récepteur qui en réponse émet une fluorescence (Kuroda et al., 2006). Le **BRET** est similaire au FRET mais un substrat est nécessaire (Pfleger & Eidne, 2006).

2. Validation *in vitro*.

Les techniques présentées en A peuvent être utilisées dans une optique de validation d'une interaction obtenue par une autre approche. Ainsi, le **pull-down** ou la **co-immunoprécipitation** peuvent être utilisés pour valider une interaction potentielle obtenue par double-hybride. Dans ce cas, le partenaire sera révélé par western blot et des tag pourront être utilisés s'il n'y a pas d'anticorps disponible dirigé contre le partenaire ou l'appât. L'emploi de tag n'est pas possible sur du tissu natif et oblige à réaliser une sur-expression ce qui peut forcer l'association.

Le « Far western blotting ». Les protéines proies sont séparées par électrophorèse et transférées sur une membrane. La membrane est incubée avec la protéine appât qui va se fixer sur ses éventuels partenaires. Un anticorps dirigé contre la protéine appât permet de révéler cette dernière et de localiser les partenaires. En utilisant plusieurs protéines appâts, il est possible de déterminer les relations directes entre les protéines d'un même complexe et donc de savoir dans quel ordre elles s'associent (*Wu et al., 2007*). Par exemple, si P est la protéine partenaire et si l'on voit que la protéine appât A se fixe à la membrane (là où P est visible par WB) et si une protéine appât B se fixe au même endroit mais seulement en présence de A, on peut conclure que P fixe B par l'intermédiaire de A.

L'essai de migration retard fluorescent. La protéine appât est fusionnée à la GFP et produite *in vitro*. Une quantité fixe de cette protéine appât est incubée avec une quantité variable de protéine proie. Une électrophorèse non dénaturante permet de séparer les protéines appâts associées des protéines appâts isolées grâce à leurs différences de poids moléculaires. La fluorescence de la GFP permet la détection. Cette technique permet de déterminer les Kd (*Park & Raines, 2004*).

La SPR (Surface Plasmon Resonance) ou Biacore™. Dans la technique de SPR, le protéine d'intérêt est fixée sur un biocapteur optique. Ce biocapteur est installé dans une chambre microfluidique où sont injectés les partenaires potentiels puis la chambre est rincée (*Biacore website, 2008; Lee et al., 2005*). L'appareil enregistre un signal de résonance qui varie avec la quantité de protéines fixées sur le biocapteur. Cette technique permet ainsi d'étudier la cinétique d'une association, de déterminer ses constantes d'équilibre, d'étudier l'effet de la température et d'autres paramètres sur l'interaction. L'appât et les partenaires doivent être solubles pour que cette technique soit utilisable.



Tableau III: Techniques disponibles pour mettre en évidence des interactions protéine-protéine.

Techniques	<i>In vitro</i> / <i>In vivo</i>	Tag	Interactions	Isolement de Complexes	Intérêts particuliers	Limites
Immunoprécipitation		Possible	Directes et indirectes	oui	Isolement des complexes natifs	Dépendance vis-à-vis des anticorps (utilisation de tag)
TAP		Obligatoire	Directes et indirectes	oui	Appâts produits en cellules eucaryotes	Interactions forcées du fait de la sur-expression
Pull-down		Obligatoire	Directes et indirectes	oui		Solubilité de l'appât Taille de l'appât limité Modifications post-traductionnelles de l'appât absentes
Co-localisation	<i>In vivo</i>	Possible	Proximité		Visualisation du lieu de l'interaction	Confirme juste la proximité des deux protéines
FRET / BRET	<i>In vivo</i>	Possible/ obligatoire	Proximité		Visualisation du lieu de l'interaction	
Far western blot	<i>In vitro</i>	Obligatoire	Directes	non	Déterminer les intermédiaires d'une interaction	
Migration retard	<i>In vitro</i>	Obligatoire	Directes	non	Déterminer les Kd	
BN-PAGE		non	Directes et indirectes	oui	Isolement des complexes natifs	Capacité à isoler les complexes
SPR	<i>In vitro</i>	Obligatoire	Directes	non	Déterminer les paramètres cinétiques	Solubilité des appâts et des proies
Double hybride « split-ubiquitin »	<i>In vitro</i>	Obligatoire	Directes	non	Appât complet	Nombreux faux positifs

RÉSULTATS 1 : DEUXIÈME ARTICLE.

14-3-3 UN NOUVEAU PARTENAIRE DU CANAL SCN5A.



14-3-3 Is a Regulator of the Cardiac Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.5

Marie Allouis,* Françoise Le Bouffant,* Ronald Wilders, David Péroz, Jean-Jacques Schott, Jacques Noireaud, Hervé Le Marec, Jean Mérot, Denis Escande, Isabelle Baró

Abstract—The voltage-sensitive Na⁺ channel Na_v1.5 plays a crucial role in generating and propagating the cardiac action potential and its dysfunction promotes cardiac arrhythmias. The channel takes part into a large molecular complex containing regulatory proteins. Thus, factors that modulate its biosynthesis, localization, activity, and/or degradation are of great interest from both a physiological and pathological standpoint. Using a yeast 2-hybrid screen, we unveiled a novel partner, 14-3-3 η , interacting with the Na_v1.5 cytoplasmic I interdomain. The interaction was confirmed by coimmunoprecipitation of 14-3-3 and full-length Na_v1.5 both in COS-7 cells expressing recombinant Na_v1.5 and in mouse cardiac myocytes. Using immunocytochemistry, we also found that 14-3-3 and Na_v1.5 colocalized at the intercalated discs. We tested the functional link between Na_v1.5 and 14-3-3 η using the whole-cell patch-clamp configuration. Coexpressing Na_v1.5, the β 1 subunit and 14-3-3 η induced a negative shift in the inactivation curve of the Na⁺ current, a delayed recovery from inactivation, but no changes in the activation curve or in the current density. The negative shift was reversed, and the recovery from inactivation was normalized by overexpressing the Na_v1.5 cytoplasmic I interdomain interacting with 14-3-3 η . Reversal was also obtained with the dominant negative R56,60A 14-3-3 η mutant, suggesting that dimerization of 14-3-3 is needed for current regulation. Computer simulations suggest that the absence of 14-3-3 could exert proarrhythmic effects on cardiac electrical restitution properties. Based on these findings, we propose that the 14-3-3 protein is a novel component of the cardiac Na⁺ channel acting as a cofactor for the regulation of the cardiac Na⁺ current. (*Circ Res.* 2006;98:1538-1546.)

Key Words: Na⁺ channel ■ auxiliary subunit ■ congenital heart disease

Voltage-gated Na⁺ channels are responsible for initiation and propagation of the action potential in most electrically excitable cells. They are transmembrane glycoprotein complexes consisting of a pore-forming α subunit and accessory subunits.¹ The α subunit has 4 homologous domains, each containing 6 transmembrane segments and an outer pore-forming loop. The 3 interdomain linkers (ID I to III), and the N- and C-terminal ends of the protein are cytosolic. Ten α -subunit isoforms have been cloned from different mammalian tissues.² Among accessory subunits regulating voltage-gated Na⁺ channels, 4 β -subunit isoforms have been identified³ and shown to modulate the channel-gating properties.⁴ In the human heart, *SCN5A* and *SCN1B* encode the major voltage-sensitive Na⁺ channel α subunit Na_v1.5 (also called hH1) and the β 1 subunit (h β 1), respectively. Recent studies have shown that Na_v1.5 associates with other proteins that regulate its biosynthesis, localization, activity, and/or degradation.¹ Given the major role of Na_v1.5 in the cardiac action potential, the expression and activity of these auxiliary proteins are likely important determinants for the electrical excitability of the cardiomyocytes and cardiac conduction.

In the present study, we report and characterize the association of Na_v1.5 with 14-3-3 proteins. 14-3-3 family members form a group of highly conserved 30-kDa cytosolic acidic proteins expressed in a wide range of organisms and tissues.⁵ In mammals, this family consists of 7 members encoded by separate and differentially expressed genes.⁶ 14-3-3 proteins can interact with numerous cellular proteins and are crucial for signaling, cell growth, division, adhesion, differentiation, apoptosis, and ion-channel regulation.⁷ We show that 14-3-3 and Na_v1.5 colocalize at the intercalated discs in cardiomyocytes. We found that the interaction of the 2 proteins altered the cardiac Na⁺ channel function. Considering that 14-3-3 proteins are expressed in cardiac myocytes, we also show that the Na⁺ current alterations attributable to 14-3-3 absence are expected to result in the alteration of the restitution of action potential duration and conduction velocity facilitating arrhythmia occurrence.

Based on these findings, we propose that the 14-3-3 protein is a novel member of the cardiac Na⁺ channel acting as a cofactor for the regulation of the cardiac Na⁺ current.

Original received January 5, 2006; revision received April 24, 2006; accepted May 17, 2006.

From Inserm UMR 533 (M.A., F.L.B., D.P., J.-J.S., J.N., H.L.M., J.M., D.E., I.B.), Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, l'institut du thorax, Faculté de Médecine, France; and the Department of Physiology (R.W.), Academic Medical Center, University of Amsterdam, the Netherlands.

*Both authors contributed equally to this study.

Correspondence to Isabelle Baró, Inserm UMR533, l'institut du thorax, Faculté de Médecine, 1, rue G. Veil, 44035 Nantes Cedex, France. E-mail isabelle.baro@nantes.inserm.fr

© 2006 American Heart Association, Inc.

Circulation Research is available at <http://circres.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/01.RES.0000229244.97497.2c

Downloaded from circres.ahajournals.org by ISABELLE BARO on July 2, 2008



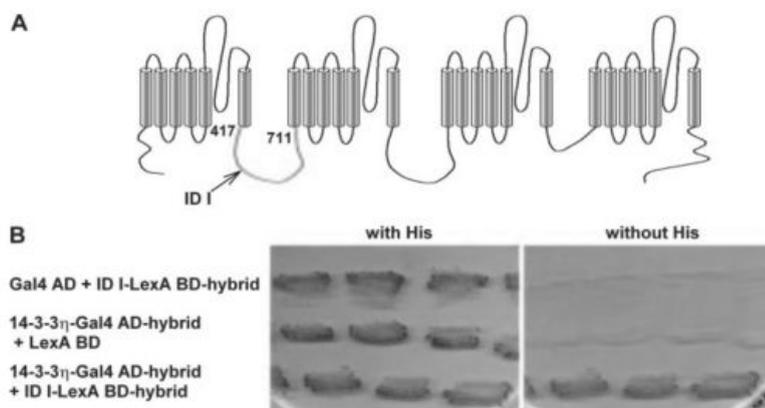


Figure 1. 14-3-3 η associates with Na_v1.5 first interdomain. A, Schematic diagram of Na_v1.5 showing the region used as bait in yeast 2-hybrid screen (ID I). The numbers correspond to amino acid position. B, Na_v1.5 ID I and 14-3-3 η binding in yeast. Yeast cells were cotransformed with plasmid pairs coding for the indicated proteins fused to LexA BD or Gal4 AD. Transformants were plated on synthetic medium with or without histidine (His). Each patch represents an independent transformant.

Materials and Methods

An expanded Materials and Methods section containing details for plasmids, yeast 2-hybrid screening, coimmunoprecipitation, pull-down assays, Western blotting, immunocytochemistry, electrophysiology, and computer simulations is available in the online data supplement at <http://circres.ahajournals.org>.

Yeast Two-Hybrid Screening

The first interdomain fragment of human Na_v1.5 (hNa_v1.5 ID I) was used as bait. The yeast reporter strain L40, which contains the reporter gene HIS3 downstream of the binding sequence for LexA, was sequentially transformed with the pVJL10-ID I plasmid and with a mouse cDNA library, using the lithium acetate method⁸ and subsequently treated as previously described.⁹

Coimmunoprecipitation, Pulldown, and Western Blotting

African green monkey kidney-derived COS-7 cells (ATCC), mouse heart, anti-14-3-3 mouse monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology) and anti-Na_v1.5 rabbit polyclonal antibody (ASC-005, Alomone Labs) were used. GST-F11 fusion protein (F11 corresponding to residue 417 to 467 of human Na_v1.5) has been used during pulldown experiments on mouse heart lysate.

Immunocytochemistry

Immunostaining was performed as described by Mohler et al¹⁰ on COS-7 cells expressing the human tagged Na_v1.5-GFP and HA-14-3-3 η and on freshly isolated rabbit cardiomyocytes¹¹ using also anti-HA rabbit polyclonal antibody (Clontech) and Alexa Fluor 488- or 568-conjugated secondary antibodies (Molecular Probes).

Electrophysiology

Patch-clamp studies were performed on COS-7 cells transiently expressing hNa_v1.5 and h β 1 subunits, with or without human wild-type and/or double mutant R56,60A 14-3-3 η , using the whole-cell configuration at room temperature.

Computer Simulations

The functional role of the 14-3-3 protein in shaping the cardiac action potential was assessed by computer simulations using the human ventricular cell model by ten Tusscher et al.¹²

Statistics

Data are presented as mean \pm SEM. Statistical significance of the observed effects was assessed by means of the *t* test or 2-way ANOVA followed by a Tukey test for multiple comparisons when needed. A value of $P < 0.05$ was considered significant.

Results

The Intracellular Interdomain ID I of Na_v1.5 Interacts With 14-3-3 η

The yeast 2-hybrid was used to screen a mouse cDNA library with hNa_v1.5 cytoplasmic I interdomain (ID I) as bait (amino acids 417 to 711; Figure 1A). Among the 22 clones able to grow in the absence of histidine, we identified full-length 14-3-3 η cDNA by sequencing and database searching. The specificity of the interaction was confirmed by cotransformation of the bait and 14-3-3 η or GAL4 AD into the yeast L40 (Figure 1B). To refine the site responsible for the interaction site, we created LexA-fusion protein baits containing various fragments of Na_v1.5 ID I (Figure 2A) and tested their ability to interact with 14-3-3 η (Figure 2B). 14-3-3 η interacted with Na_v1.5 ID I fragment 1 (F1) and more precisely with its N terminus, ie, the 417 to 467 amino acid sequence of Na_v1.5 (F11). A 99% identity between mouse and human 14-3-3 η protein sequences and a 100% identity between residues 417 to 467 of mouse and human Na_v1.5 were observed. We challenged the specificity of the interaction with other 14-3-3 isoforms. Using mouse τ and ζ isoforms of 14-3-3, we observed that these isoforms were able to induce yeast growth (Figure 3). Indeed there are 82% and 86% homology between mouse protein sequences of η and τ isoforms and η and ζ isoforms, respectively.

14-3-3 Interacts With Na_v1.5 in Transfected COS-7 Cells and in the Heart

To provide biochemical evidence for the interaction between full-length Na_v1.5 and 14-3-3, we immunoprecipitated the complex from IGEPAL extracts of Na_v1.5-GFP-transfected COS-7 cells or mouse heart (Figure 4A and 4B) using antibodies against GFP, 14-3-3, or Na_v1.5 proteins. When 14-3-3 immunoprecipitates were blotted and probed with the anti-GFP (COS-7 cells) or anti-Na_v1.5 antibody (mouse heart), coprecipitation of the full-length channel was revealed. Inversely, 14-3-3 was detected in the immunoprecipitated Na_v1.5 complex from mouse heart extract. The interaction of 14-3-3 and F11 of Na_v1.5 was confirmed by pulldown experiments on mouse heart lysate showing the presence of 14-3-3 among the proteins specifically bound to GST-F11 (Figure 4C and 4D).



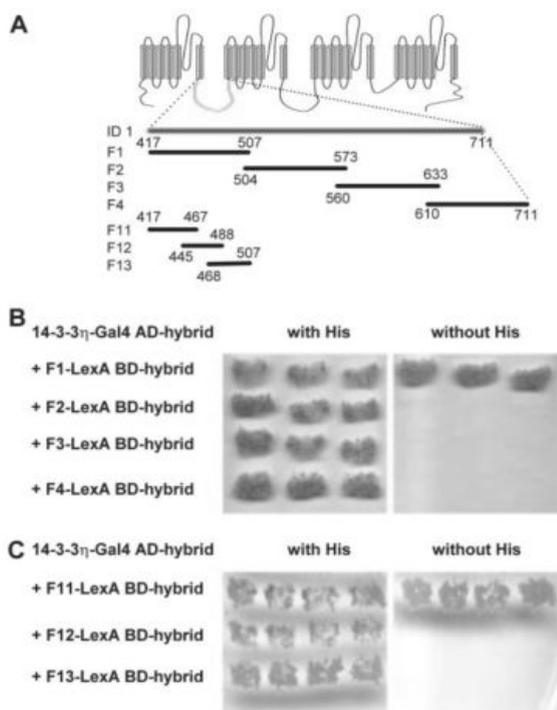


Figure 2. 14-3-3 η associates with the 417 to 467 amino acid sequence of Na_v1.5. **A**, Fragments of Na_v1.5 used as bait. Numbers as in Figure 1A. **B** and **C**, Two-hybrid results. Yeast cells were cotransformed with plasmid pairs coding for the indicated proteins fused to LexA BD or Gal4 AD. Plating as in Figure 1B.

We determined the subcellular distribution of Na_v1.5 and 14-3-3 using confocal microscopy. Immunostaining revealed colocalization of Na_v1.5 and 14-3-3 in the plasma membrane of transfected COS-7 cells (supplemental Figure I). In rabbit cardiomyocytes, 14-3-3 localization was assessed by using a monoclonal antibody that detects members of the 14-3-3 protein family. Fluorescent labeling of polymerized actin with phalloidin–Texas Red stained the actin thin filaments inserting at the intercalated discs (Figure 5, top). A diffuse immunolabeling of 14-3-3 protein was observed in the cytoplasm. Clusters were seen at the intercalated discs, where 14-3-3 colocalized with Na_v1.5 (Figure 5, bottom). Colocal-

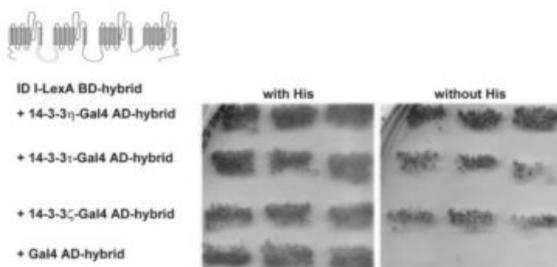


Figure 3. Na_v1.5 ID I can interact with η and ζ isoforms of 14-3-3. Two-hybrid experiments: yeast cells were cotransformed with plasmid pairs coding for the indicated proteins fused to LexA BD or Gal4 AD. Plating as in Figure 1B.

ization of 14-3-3 protein and Na_v1.5 at the intercalated discs is consistent with a physiological interaction between these proteins in situ.

14-3-3 Modulates the Na⁺ Current by Direct Protein–Protein Interaction

To investigate the functional consequence of 14-3-3 η on the channel activity, we used the whole-cell configuration of the patch-clamp technique. The presence of overexpressed human 14-3-3 η (h14-3-3 η) in COS-7 cells expressing hNa_v1.5 and h β 1 subunits, did not modify the Na⁺ current density (-96.1 ± 6.6 pA/pF; $n=29$ versus -99.3 ± 5.2 pA/pF; $n=32$; in the absence and in the presence of exogenous 14-3-3 η , respectively; current measured at -20 mV; Figure 6A). The voltage dependence of the Na⁺ current activation and inactivation were also investigated. No changes were observed in the activation parameters ($V_{1/2act}$: -35.7 ± 0.9 mV, $n=10$, versus -34.6 ± 1.1 mV, $n=16$; slope: 5.1 ± 0.2 mV versus 5.4 ± 0.3 mV; Figure 6B). On the other hand, the presence of exogenous 14-3-3 η shifted the inactivation curve toward more negative values ($V_{1/2inact}$: -79.2 ± 1.2 mV, $n=13$, to -84.5 ± 0.9 mV, $n=21$; $P<0.001$; Figure 6B) without change in the slope (-6.0 ± 0.2 mV versus -6.1 ± 0.1 mV). Inactivation was not significantly accelerated nor decelerated at any potential in the presence of exogenous 14-3-3 η (not shown). Finally, recovery from inactivation was decelerated in the presence of exogenous 14-3-3 η (2-way ANOVA: $P<0.001$; Figure 6C). The time course of recovery from steady-state inactivation was quantified by the time to reach 50% and 75% recovery ($t_{1/2}$ and $t_{3/4}$, respectively). Recovery from inactivation in the presence of 14-3-3 was slower ($t_{1/2}$: 18.0 ± 2.0 ms; $t_{3/4}$: 52.3 ± 6.3 ms) than in its absence ($t_{1/2}$: 9.5 ± 1.2 ms; $t_{3/4}$: 22.5 ± 5.6 ms; $P<0.01$). Coexpression of 14-3-3 and F1 prevented this deceleration as demonstrated by $t_{1/2}$ and $t_{3/4}$ values of 9.3 ± 1.4 and 20.1 ± 2.9 ms, respectively ($P<0.01$ versus +14-3-3; non-significantly different (NS) versus absence of 14-3-3).

To further evaluate the implication of protein-protein interaction in these changes, we used the F1 peptide (ie, amino acids 417 to 507 of Na_v1.5) to compete with full-length Na_v1.5 for association with exogenous 14-3-3 η . We first tested the effects of coexpressing Na_v1.5 and F1 (pIRES-F1-Na_v1.5). We observed no change in the current density (-121.8 ± 21.2 pA/pF, $n=19$, in the presence of F1) nor in the inactivation curve ($V_{1/2inact}$: -80.2 ± 2.6 mV; slope: -6.2 ± 0.3 mV; $n=6$; in the presence of F1; not illustrated). This suggests that endogenous 14-3-3 does not regulate overexpressed Na_v1.5.

In cells expressing 14-3-3 η and Na_v1.5 (pIRES-14-3-3 η -Na_v1.5), F1 (pcDNA3-F1) reversed the inactivation shift ($V_{1/2inact}$: -79.8 ± 1.2 mV; slope: -6.2 ± 0.5 mV; $n=8$; NS in comparison with cells expressing Na_v1.5 alone; Figure 6D), produced no change in current density (-97.7 ± 22.3 pA/pF; $n=16$; NS in comparison with cells expressing Na_v1.5 alone), and prevented the recovery from inactivation deceleration (2-way ANOVA: NS in comparison with cells expressing Na_v1.5 alone; Figure 6C).

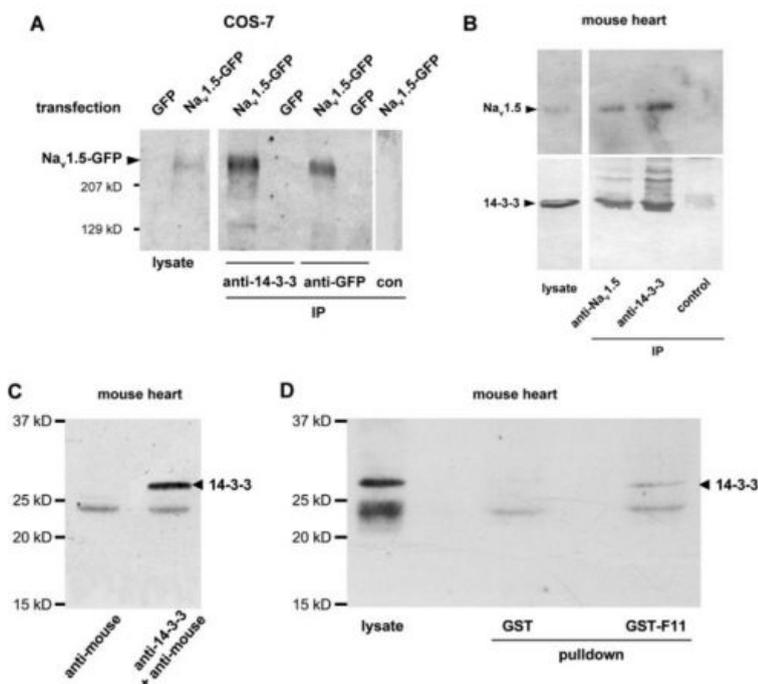


Figure 4. Direct interaction of Na_v1.5 and 14-3-3. **A** and **B**, Coimmunoprecipitation of full-length Na_v1.5 with 14-3-3. **A**, COS-7 cells were cotransfected with h14-3-3 η and either hNa_v1.5-GFP or GFP coding vectors. Cell extracts were incubated with anti-GFP or anti-14-3-3 antibodies (IP). The lysate and immunoprecipitated protein complex were examined by immunoblotting with anti-GFP antibody. The immunoprecipitation conducted in the absence of antibody (con) shows the absence of nonspecific interactions with protein-G sepharose beads. **B**, Mouse heart cell extract was incubated with anti-Na_v1.5 or anti-14-3-3 antibodies (IP). The lysate and immunoprecipitated protein complex were examined by immunoblotting with anti-Na_v1.5 (top) or anti-14-3-3 (bottom) antibody. Control lane. The immunoprecipitation was effected with the corresponding antibody exhausted with the appropriate blocking peptide. **C** and **D**, Pull-down assay of 14-3-3 from mouse heart with GST-F11 baits. **C**, Immunoblotting of mouse heart lysate. A specific \approx 27-kDa band corresponding to 14-3-3 was detected with anti-14-3-3 and anti-mouse secondary antibodies (right) together with a nonspecific \approx 24-kDa band detected with anti-mouse secondary antibody alone (left). **D**, 14-3-3 was specifically pulled down from mouse heart lysate incubated with glutathione beads coupled to GST-F11 but not GST alone.

14-3-3 Forms Dimers for Functional Regulation of Na_v1.5

14-3-3 proteins have a dimeric structure and monomeric proteins may not regulate their target. Double mutant R56,60A 14-3-3 η has been shown to associate with wild-type 14-3-3 η but to impair binding with ligands,¹³ resulting in a dominant negative activity (DN-14-3-3 η). Here, DN-14-3-3 η prevented the inactivation shift induced by wild-type 14-3-3 η ($V_{1/2inact}$: -79.5 ± 1.5 mV; slope: -6.2 ± 0.3 mV; $n=8$; both

NS in comparison with cells expressing Na_v1.5 alone; Figure 6D). This suggests the requirement of 2 intact binding sites on 14-3-3 dimer to regulate the Na⁺ current.

14-3-3 Affects the Cardiac Action Potential

We performed computer simulations to assess the functional role of the 14-3-3 protein in shaping the cardiac action potential. The effects of the absence of 14-3-3 on I_{Na} were implemented into a human ventricular cell model¹² by a

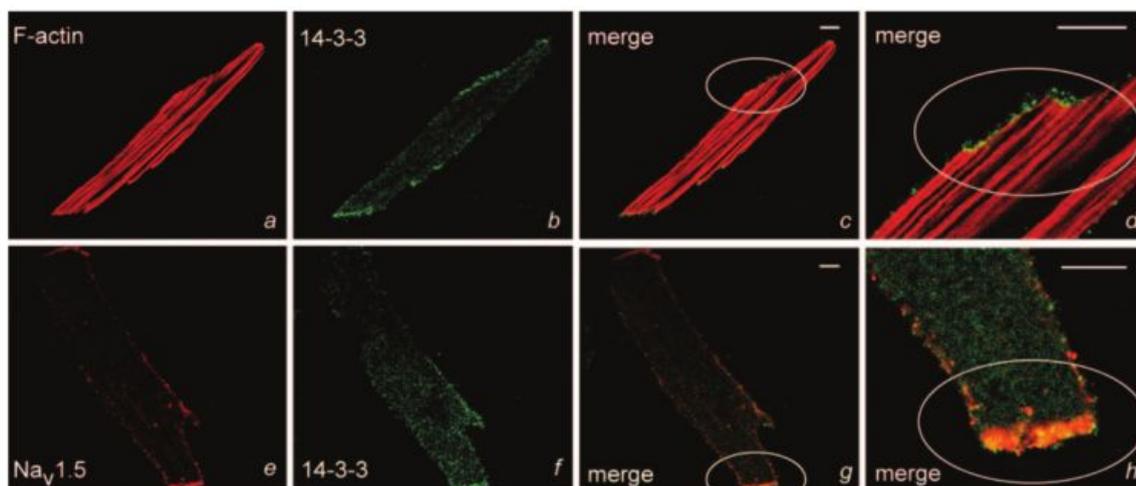


Figure 5. Colocalization of Na_v1.5 and 14-3-3 in rabbit adult cardiomyocytes. **A**, Actin filament labeling with phalloidin-Texas Red. **B** and **F**, 14-3-3 localization (green). **C** and **D**, Merge of F-actin and 14-3-3 labeling. **E**, Na_v1.5 localization (red). **G** and **H**, Merge of Na_v1.5 and 14-3-3 indicating their colocalization at intercalated discs (yellow). Scale bars=10 μ m. No signal was observed in the absence of primary antibody (not shown).



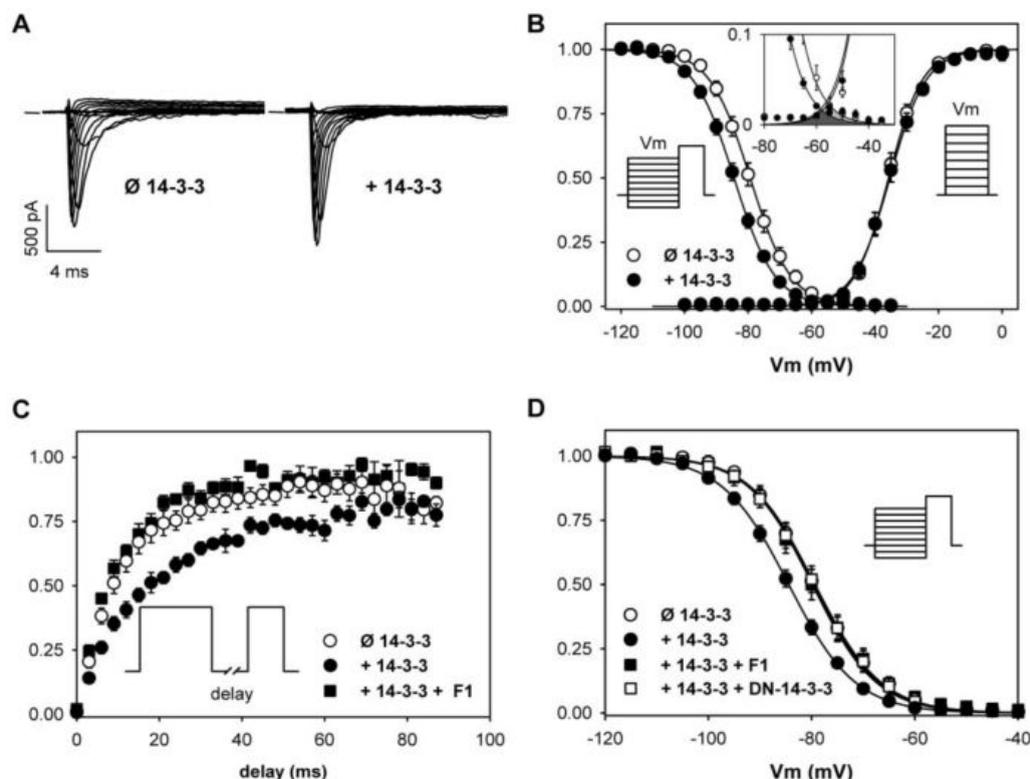


Figure 6. Functional effects of h14-3-3 η on hNa_v1.5 channel in COS-7 cells. **A**, Superimposed current recordings during depolarization to various potentials from -100 to +50 mV (10-mV increment; holding potential: -100 mV; frequency: 0.5 Hz) in Na_v1.5-transfected COS-7 cells, without (Ø 14-3-3; left) and with exogenous 14-3-3 η (+ 14-3-3; right). **B**, Conductance-voltage relationships and steady-state channel availability curves for Na_v1.5 channels. The data are mean normalized peak conductance at membrane potential (Vm, same voltage protocol as in A) and mean normalized peak current measured during a -20-mV depolarizing pulse following a 100-ms prepulse to various potentials from -120 to 0 mV (Vm, frequency: 0.25 Hz), respectively. Solid curves: fits of the data to Boltzmann relationships showing the 14-3-3-dependent inactivation shift. Top inset, Decreased window current in the presence of 14-3-3 (dark gray). Lateral insets, Voltage protocols. **C**, Fractional recovery from inactivation in various conditions (+ 14-3-3 + F1; pIRES-14-3-3-Na_v1.5 + pcDNA3-F1) measured using a twin protocol (inset). The data are the mean fractional current measured during a second -20-mV depolarizing pulse following a repolarization to -100 mV for various durations (delay) after a first 100-ms depolarization to -20 mV. **D**, Reversion of 14-3-3 η effects on Na_v1.5 channel inactivation in COS-7 cells in various conditions (+ 14-3-3 + DN-14-3-3: pIRES-14-3-3-Na_v1.5 + pcDNA3-DN-14-3-3 η). Same voltage protocol (inset) as in B.

+5.3-mV shift of the I_{Na} steady-state inactivation curve and a 70% increase in the rate constants governing fast and slow recovery from I_{Na} inactivation (see online data supplement). To validate this approach, we performed in silico voltage clamp experiments using the same protocols as in our experiments (Figure 7A through 7C). As illustrated in Figure 7A, these alterations did not result in significant changes in current density (for example, Figure 6A). When fitting Boltzmann curves to the in silico data (Figure 7B), no differences were observed in activation parameters ($V_{1/2act}$: -42.1 mV; slope: 5.0 mV). In contrast, the inactivation curve was shifted toward more positive values in the absence of 14-3-3 ($V_{1/2inact}$: -75.4 versus -79.9 mV; +4.5-mV shift) without change in slope (-7.1 mV). Figure 7B (inset) shows that this shift resulted in increased window current in the absence of 14-3-3, as also seen experimentally (Figure 6B). Finally, the rate of inactivation was not changed, whereas

recovery from inactivation was accelerated in the absence of 14-3-3 (Figure 7A and 7C). As in the experiments shown in Figure 6, the time course of recovery from steady-state inactivation was quantified by the time to reach 50% and 75% recovery: $t_{1/2}$ was 19.9 ms in the presence of 14-3-3 and 11.7 ms in its absence. Similarly, $t_{3/4}$ was 39.8 ms in the presence of 14-3-3 and 23.4 ms in its absence. Thus, recovery in the model, which was designed for physiological temperature, was not significantly faster than in the experiments performed at room temperature. This model feature is based on the experimental observation that the relative amplitude of the slow components of recovery increases at close to physiological temperature.¹⁴

Figure 7D shows the effects of the absence of 14-3-3 through its action on I_{Na} at a pacing interval (basic cycle length [BCL]) of 800 ms (75 bpm). Changes to the shape of the action potential were mild. The 4- to 5-mV increase in

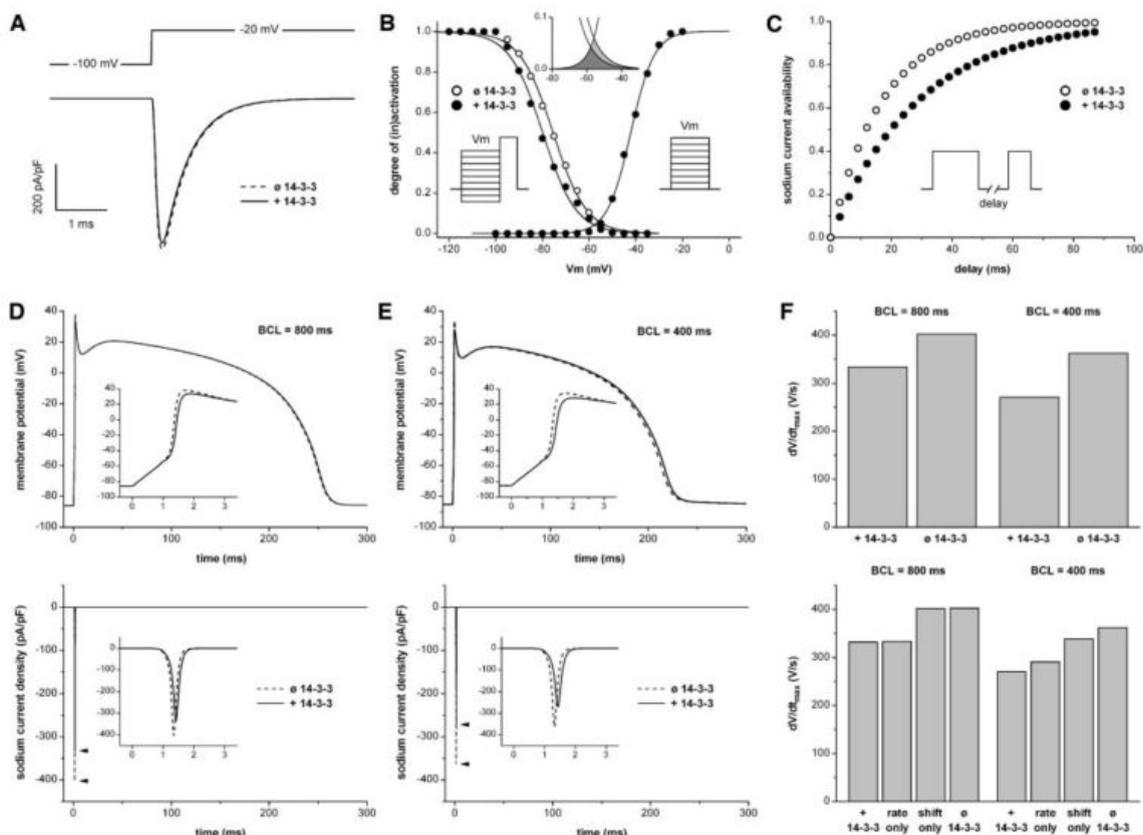


Figure 7. A through C, Effects of the absence of the 14-3-3 protein on I_{Na} in simulated voltage clamp experiments. A, Current traces elicited using the indicated voltage clamp protocol. B, I_{Na} activation and inactivation curves as determined using the voltage protocols of Figure 6B (lateral insets). Solid curves are Boltzmann fits to the simulated data. The top inset illustrates the increased window current in the absence of 14-3-3 (light gray). C, Fractional recovery from inactivation as determined using the voltage protocol of Figure 6C (inset). D and E, Simulated effects of the absence of the 14-3-3 protein on the human ventricular action potential (top) and associated I_{Na} (bottom) at pacing intervals of 800 ms (D) and 400 ms (E). Arrowheads indicate peak I_{Na} . The insets show the data on an expanded time scale. F, Maximum upstroke velocity of the action potential (dV/dt_{max}) in the presence and in the absence of 14-3-3 (top) and its dependence on each of the changes in I_{Na} associated with the absence of 14-3-3 (bottom), ie, the positive shift in steady-state inactivation ("shift only") and the increase in the rate of recovery from inactivation ("rate only").

action potential overshoot in the absence of 14-3-3 reflected the increase in peak Na⁺ current (Figure 7D, bottom) attributable to the higher availability of Na⁺ channels. This also resulted in a steeper upstroke (higher maximum upstroke velocity) in the absence of 14-3-3 (402 versus 334 V/sec in its presence; 21% increase; Figure 7F, top). At BCL=800 ms, the higher availability of Na⁺ channels was caused by the positive shift in steady-state inactivation rather than the accelerated recovery from inactivation (Figure 7F, bottom).

Because we expected the effects of faster recovery from inactivation to be augmented at higher pacing rate, we repeated our simulations with a pacing interval of 400 ms (150 bpm; Figure 7E). At this pacing interval, the control action potential (+14-3-3, solid line) had shorter action potential duration (APD) (222 versus 255 ms at a pacing interval of 800 ms) and lower maximum upstroke velocity (271 versus 334 V/sec). The combined effects of increased Na⁺ channel availability and accelerated recovery from inac-

tivation in the absence of 14-3-3 resulted in an enhanced Na⁺ current (Figure 7E, bottom) associated with a 6-mV increase in action potential overshoot and a 34% increase in maximum upstroke velocity (Figure 7F, top). At BCL=400 ms, the higher availability of Na⁺ channels in the absence of 14-3-3 was not only attributable to the positive shift in steady-state inactivation but also to the accelerated recovery from inactivation (Figure 7F, bottom).

14-3-3 Changes Cardiac Electrical Restitution Properties

Changes in APD and conduction velocity (CV) restitution curves, relating APD and CV to the preceding diastolic interval, have been implicated in the susceptibility to cardiac arrhythmias.¹⁵⁻¹⁹ The significant increase in Na⁺ current in the absence of 14-3-3, preferentially at high pacing rate, facilitates action potential formation and conduction, and may thus affect APD and CV restitution. Therefore, we deter-



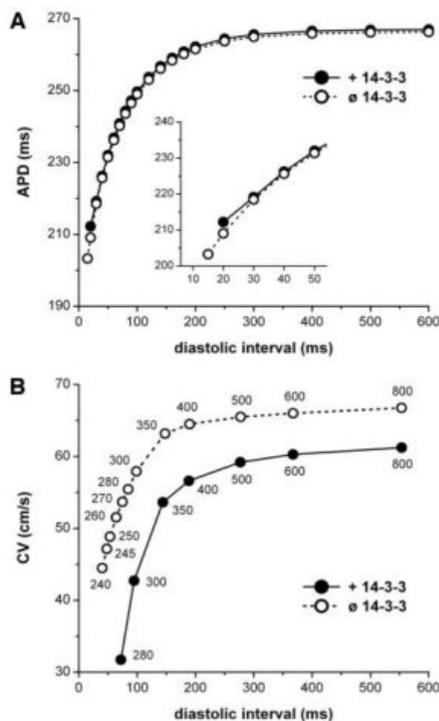


Figure 8. Simulated effects of the absence of the 14-3-3 protein on cardiac electrical restitution properties. A, Restitution of APD in the presence (+14-3-3, solid lines with closed symbols) and absence of 14-3-3 (○ 14-3-3, dashed lines with open symbols). The inset illustrates the increased slope in the absence of 14-3-3 at short diastolic intervals. B, Restitution of conduction velocity (CV) in the presence and absence of 14-3-3. Numbers near symbols indicate the associated pacing interval in milliseconds.

mined APD and CV restitution curves in the absence and presence of 14-3-3 using standard protocols (see online data supplement). Figure 8A shows that the APD restitution curve in the absence of 14-3-3 was steeper than under control conditions (+14-3-3). Notably, its slope exceeded 1 at short diastolic interval, whereas the slope of the control curve was <0.7. The CV restitution curve is shown in Figure 8B. In the absence of 14-3-3, conduction velocity was higher, especially at short pacing intervals. As a result, the CV restitution curve was flattened. Also, the absence of 14-3-3 allowed successful conduction at higher pacing rates and shorter diastolic intervals. The shortest pacing interval (5-ms resolution steps) resulting in successful action potential conduction was 240 ms in the absence of 14-3-3 (diastolic interval of 40 ms) and 280 ms (diastolic interval of 72 ms) in its presence.

Kagan et al¹³ have previously reported that the 14-3-3 protein also affects the rapid delayed rectifier current (I_{Kr}), ie, the current carried by the HERG channel. We have performed additional computer simulations to assess the effects of the 14-3-3 protein through its action on I_{Kr} . These effects appeared to be relatively modest (supplemental Figures II and III).

Discussion

In the present study, a direct interaction between the cardiac voltage-dependent Na^+ channel $\text{Na}_v1.5$ and 14-3-3 η protein was identified using a 2-hybrid screen. The 14-3-3-binding region was determined in the first interdomain of $\text{Na}_v1.5$ between amino acids 417 and 467. We also showed colocalization of 14-3-3 and $\text{Na}_v1.5$ at intercalated discs of cardiomyocytes and both coimmunoprecipitation and pulldown experiments confirmed their physical association. Functional studies using the whole-cell patch-clamp configuration brought further light to the regulation of Na^+ channel activity by 14-3-3 η .

14-3-3-interacting consensus sequences have been extensively analyzed in mammalian systems (for review, see Bridges and Moorhead²⁰). Two consensus phosphopeptide motifs (ie, RSPXpSXP and RXXXpSXP, where X is any amino acid and pS is phosphoserine) have been uncovered. 14-3-3 binding to its target has been shown to depend on phosphorylation of a serine or threonine. None of these motifs is present in the $\text{Na}_v1.5$ 417 to 467 sequence interacting with 14-3-3 η . However, many target proteins do not contain sequences conforming precisely to these motifs or do not need phosphorylation to bind.²⁰ Noteworthy, the protein kinase A (PKA)-dependent mechanism of β -adrenergic stimulation regulating functional expression of I_{Na} by phosphorylation of S525 and S528 is located in I to II linker, ie, close to the site interacting with 14-3-3.²¹ These residues could be protected by 14-3-3 from dephosphorylation, as proposed for HERG.¹³ In addition, I_{Na} of native cardiomyocytes^{22,23} or recombinant I_{Na} show a shift in channel inactivation and slower recovery from inactivation on adrenergic stimulation,²¹ as we observed with 14-3-3. However, unlike adrenergic stimulation, 14-3-3 induced neither an increase in current density nor a shift in voltage dependence of channel activation. Therefore, 14-3-3 effects on $\text{Na}_v1.5$ differ from those expected of a protection of PKA sites from phosphatase, as shown for HERG.¹³

Our results suggest that 14-3-3 dimers regulate $\text{Na}_v1.5$ channels. If so, 14-3-3 may contribute to the Na^+ channel clustering at the membrane as for the H^+ -ATPase at the plant plasma membrane.²⁴

The number of 14-3-3 targets and its effects are plethoric.²⁰ Various interactions with ion transporters or channels have been reported in animals²⁵⁻²⁷ and plants.^{24,28} Among cardiac channels, the α subunit of the ATP-dependent K^+ channel, Kir6.2, and the voltage-dependent K^+ channel HERG are regulated by 14-3-3.^{13,29} Dimeric 14-3-3 binding on the Kir6.2 C terminus containing the RKR motif, known as an endoplasmic reticulum localization signal, prevented channel retention. On the other hand, Kagan et al¹³ observed that 2 interaction sites exist on the HERG channel and that the association requires phosphorylation of the channel by PKA. In heterologous systems, PKA-dependent phosphorylation of HERG leads to a decrease in current amplitude,³⁰ whereas coexpression and dimerization of 14-3-3 increases and accelerates the current activation.¹³ According to our results, no RKR retention signal is detected in the 14-3-3-binding site in $\text{Na}_v1.5$ ID I. In addition, the Na^+ channel trafficking to the cell membrane was not impacted by 14-3-3 expression

because the current amplitude was not affected by the presence of 14-3-3.

Na_v1.5 Na⁺ channel is crucial for coordinating cardiac muscle contraction and critical for the vulnerability of the heart to abnormal rhythm. Alterations in Na⁺ channel expression and function are known to have severe effects on cardiac excitability and conduction. The *SCN5A* gene encoding Na_v1.5 is mutated in 4 different forms of congenital disorders: long QT3 syndrome, Brugada syndrome, progressive cardiac conduction disorder (Lenègre-Lev disease), and sick sinus syndrome.^{31–34} Our computer simulations demonstrate that APD restitution is steepened in the absence of 14-3-3, with a slope >1 at short diastolic interval. Such steeply sloped APD restitution curve may have strong proarrhythmic effects.^{15–19} We also observed that propagating action potentials could be elicited at shorter pacing intervals and diastolic intervals in the absence of 14-3-3, thus further enhancing the susceptibility to arrhythmias. The effects of increased conduction velocity and flattening of the CV restitution curve in the absence of 14-3-3 are less clear cut. Some studies suggest that these effects are proarrhythmic,^{15,18} whereas others suggest that they are antiarrhythmic.^{16,17} Cherry and Fenton have recently shown that CV restitution can have both proarrhythmic and antiarrhythmic effects.¹⁹ One can suspect that mutations of a Na_v1.5 cofactor may induce cardiac disorders. In the same line, mutations in KCNE1, a regulator of KCNQ1, a voltage-dependent K⁺ channel, or mutations of ankyrin B, which interferes with Ca²⁺ homeostasis proteins, have been implicated in inherited cardiac arrhythmias.^{35,36} Using in silico models, we have shown that the absence of 14-3-3 could result in proarrhythmic changes in cardiac electrical restitution properties. Our computation data suggest that loss-of-function mutations in 14-3-3 could result in cardiac arrhythmias. Mice expressing 14-3-3 η dominant negative double mutant under the control of the α -myosin heavy chain promoter have been generated.³⁷ As in NIH 3T3 cells transfected with DN-14-3-3, the activity of JNK1 and p38 mitogen-activated protein kinase is enhanced in cardiomyocytes of transgenic mice revealing the loss of activity of cardiac 14-3-3. Under basal conditions, transgenic mice had normal cardiac morphology, basal ventricular systolic function, and cardiomyocyte appearance.³⁷ All 14-3-3 isoforms, except 14-3-3 σ , are expressed in heart.⁵ Our results show that at least 3 highly homologous isoforms of 14-3-3 may interact with the cardiac Na⁺ channel. However, further studies in cardiac myocytes are needed to assess whether the different 14-3-3 isoforms could functionally replace each other to regulate Na_v1.5.

Acknowledgments

We are grateful to Dr Andrey Shaw (Washington University, St Louis, Mo) for the generous gift of 14-3-3 η cDNAs. We thank the expert technical assistance of Béatrice Leray, Marie-Jo Louérat, and Agnes Carcouët.

Sources of Funding

Supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), Agence Nationale de Recherche (ANR COD/A05045GS to I.B.), and Vaincre la Mucopolysaccharidose (to J.M.). M.A. is financially supported by the Association Thorax and

the Centre Nantais de Recherche Cardio-Vasculaire; D.P., by Inserm. F.L.B., J.M., and I.B. are recipients of tenure positions supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

Disclosures

None.

References

- Abriel H, Kass RS. Regulation of the voltage-gated cardiac sodium channel Na_v1.5 by interacting proteins. *Trends Cardiovasc Med*. 2005; 15:35–40.
- Goldin AL. Resurgence of sodium channel research. *Annu Rev Physiol*. 2001;63:871–894.
- Hanon MR, Wallace BA. Structure and function of voltage-dependent ion channel regulatory β subunits. *Biochemistry*. 2002;41:2886–2894.
- Isom LL. Sodium channel β subunits: anything but auxiliary. *Neuroscientist*. 2001;7:42–54.
- Aitken A, Collinge DB, van Heusden BP, Isobe T, Roseboom PH, Rosenfeld G, Soll J. 14-3-3 proteins: a highly conserved, widespread family of eukaryotic proteins. *Trends Biochem Sci*. 1992;17:498–501.
- Aitken A. Functional specificity in 14-3-3 isoform interactions through dimer formation and phosphorylation. Chromosome location of mammalian isoforms and variants. *Plant Mol Biol*. 2002;50:993–1010.
- Fu H, Subramanian RR, Masters SC. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2000;40:617–647.
- Rose MD, Winston F, Hieter P. *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory; 1990.
- Vojtek AB, Hollenberg SM, Cooper JA. Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell*. 1993;74:205–214.
- Mohler PJ, Rivolta I, Napolitano C, LeMaillet G, Lambert S, Priori SG, Bennett V. Na_v1.5 E1053K mutation causing Brugada syndrome blocks binding to ankyrin-G and expression of Na_v1.5 on the surface of cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:17533–17538.
- Baudet S, Weisser J, Janssen AP, Beulich K, Bielick U, Pieske B, Noireaud J, Janssen PM, Hasenfuss G, Prestle J. Increased basal contractility of cardiomyocytes overexpressing protein kinase C ϵ and blunted positive inotropic response to endothelin-1. *Cardiovasc Res*. 2001;50: 486–494.
- ten Tusscher KH, Noble D, Noble PJ, Panfilov AV. A model for human ventricular tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286: H1573–H1589.
- Kagan A, Melman YF, Krumerman A, McDonald TV. 14-3-3 amplifies and prolongs adrenergic stimulation of HERG K⁺ channel activity. *EMBO J*. 2002;21:1889–1898.
- Nagatomo T, Fan Z, Ye B, Tonkovich GS, January CT, Kyle JW, Makielski JC. Temperature dependence of early and late currents in human cardiac wild-type and long Q-T Δ KPQ Na⁺ channels. *Am J Physiol*. 1998;275:H2016–H2024.
- Qu Z, Weiss JN, Garfinkel A. Cardiac electrical restitution properties and stability of reentrant spiral waves: a simulation study. *Am J Physiol*. 1999;276:H269–H283.
- Cao JM, Qu Z, Kim YH, Wu TJ, Garfinkel A, Weiss JN, Karagueuzian HS, Chen PS. Spatiotemporal heterogeneity in the induction of ventricular fibrillation by rapid pacing: importance of cardiac restitution properties. *Circ Res*. 1999;84:1318–1331.
- Watanabe MA, Fenton FH, Evans SJ, Hastings HM, Karma A. Mechanisms for discordant alternans. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2001;12: 196–206.
- Banville I, Gray RA. Effect of action potential duration and conduction velocity restitution and their spatial dispersion on alternans and the stability of arrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2002;13: 1141–1149.
- Cherry EM, Fenton FH. Suppression of alternans and conduction blocks despite steep APD restitution: electrotonic, memory, and conduction velocity restitution effects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286: H2332–H2341.
- Bridges D, Moorhead GB. 14-3-3 proteins: a number of functions for a numbered protein. *Sci STKE*. 2005;2005:re10.
- Zhou J, Shin HG, Yi J, Shen W, Williams CP, Murray KT. Phosphorylation and putative ER retention signals are required for protein kinase A-mediated potentiation of cardiac sodium current. *Circ Res*. 2002;91: 540–546.



22. Ono K, Fozzard HA, Hanck DA. Mechanism of cAMP-dependent modulation of cardiac sodium channel current kinetics. *Circ Res.* 1993;72:807–815.
23. Baba S, Dun W, Boyden PA. Can PKA activators rescue Na⁺ channel function in epicardial border zone cells that survive in the infarcted canine heart? *Cardiovasc Res.* 2004;64:260–267.
24. Kanczewska J, Marco S, Vandermeeren C, Maudoux O, Rigaud JL, Boutry M. Activation of the plant plasma membrane H⁺-ATPase by phosphorylation and binding of 14-3-3 proteins converts a dimer into a hexamer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:11675–11680.
25. O'Kelly I, Butler MH, Zilberberg N, Goldstein SA. Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals. *Cell.* 2002;111:577–588.
26. Rajan S, Preisig-Müller R, Wischmeyer E, Nehring R, Hanley PJ, Renigunta V, Musset B, Schlichthörl G, Derst C, Karschin A, Daut J. Interaction with 14-3-3 proteins promotes functional expression of the potassium channels TASK-1 and TASK-3. *J Physiol.* 2002;545:13–26.
27. Zhou Y, Reddy S, Murrey H, Fei H, Levitan IB. Monomeric 14-3-3 protein is sufficient to modulate the activity of the *Drosophila* slowpoke calcium-dependent potassium channel. *J Biol Chem.* 2003;278:10073–10080.
28. Fuglsang AT, Borch J, Bych K, Jahn TP, Roepstorff P, Palmgren MG. The binding site for regulatory 14-3-3 protein in plant plasma membrane H⁺-ATPase: involvement of a region promoting phosphorylation-independent interaction in addition to the phosphorylation-dependent C-terminal end. *J Biol Chem.* 2003;278:42266–42272.
29. Yuan H, Michelsen K, Schwappach B. 14-3-3 dimers probe the assembly status of multimeric membrane proteins. *Curr Biol.* 2003;13:638–646.
30. Thomas D, Zhang W, Karle CA, Kathofer S, Schols W, Kubler W, Kiehn J. Deletion of protein kinase A phosphorylation sites in the HERG potassium channel inhibits activation shift by protein kinase A. *J Biol Chem.* 1999;274:27457–27462.
31. Ackerman MJ. The long QT syndrome: ion channel diseases of the heart. *Mayo Clin Proc.* 1998;73:250–269.
32. Chen Q, Kirsch GE, Zhang D, Brugada R, Brugada P, Potenza D, Moya A, Borggrefe M, Breithardt G, Ortiz-Lopez R, Wang Z, Antzelevitch C, O'Brien RE, Schulze-Bahr E, Keating MT, Towbin JA, Wang Q. Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature.* 1998;392:293–296.
33. Schott JJ, Alshinawi C, Kyndt F, Probst V, Hoorntje TM, Hulsbeek M, Wilde AA, Escande D, Mannens MM, Le Marec H. Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A. *Nat Genet.* 1999;23:20–21.
34. Smits JP, Koopmann TT, Wilders R, Veldkamp MW, Opthof T, Bhuiyan ZA, Mannens MM, Balse JR, Tan HL, Bezzina CR, Wilde AA. A mutation in the human cardiac sodium channel (E161K) contributes to sick sinus syndrome, conduction disease and Brugada syndrome in two families. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;38:969–981.
35. Splawski I, Shen J, Timothy KW, Lehmann MH, Priori S, Robinson JL, Moss AJ, Schwartz PJ, Towbin JA, Vincent GM, Keating MT. Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation.* 2000;102:1178–1185.
36. Mohler PJ, Schott JJ, Gramolini AO, Dilly KW, Guatimosim S, duBell WH, Song LS, Haurogue K, Kyndt F, Ali ME, Rogers TB, Lederer WJ, Escande D, Le Marec H, Bennett V. Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature.* 2003;421:634–639.
37. King H, Zhang S, Weinheimer C, Kovacs A, Muslin AJ. 14-3-3 proteins block apoptosis and differentially regulate MAPK cascades. *EMBO J.* 2000;19:349–358.



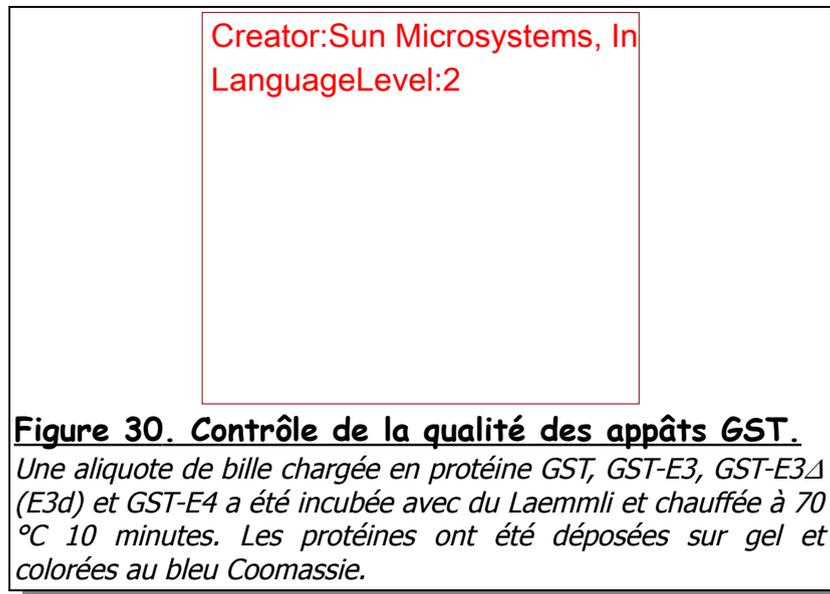
DISCUSSION COMPLÉMENTAIRE - SCN5A ET 14-3-3.

3.

Dans ce travail, nous avons montré que 14-3-3 s'associait avec SCN5A, modifiait les propriétés biophysiques du canal SCN5A, sans modifier la densité de courant maximale. Ceci montre que la protéine 14-3-3 ne modifie pas **l'expression membranaire** de SCN5A, mécanisme par lequel 14-3-3 modifie l'activité d'autres canaux (*Mrowiec et al., 2006; O'Kelly et al., 2008*). Nous n'avons pas élucidé les mécanismes par lesquels 14-3-3 agit sur SCN5A. Cependant, d'autres études, portant sur les canaux KAT1 (*Sottocornola et al., 2008; Sottocornola et al., 2006*), Ca_v2.2 (*Li et al., 2006*), hERG (*Tutor et al., 2006*) ou TRESK (*Czirjak et al., 2008*), ont obtenu des résultats similaires aux nôtres, à savoir un effet de 14-3-3 indépendant du trafic. En nous basant sur ces études, nous pouvons formuler différentes hypothèses pour expliquer l'effet de 14-3-3 sur SCN5A. Il a été montré que la protéine 14-3-3 module les propriétés d'inactivation du canal Ca_v2.2 en se fixant en deux endroits sur la partie C-terminale du canal (*Li et al., 2006*). L'action de 14-3-3 sur Ca_v2.2 ne dépend pas de la sous-unité β 1b ce qui suggère que 14-3-3 agit directement sur le canal. Par ailleurs, l'un des sites de fixation de 14-3-3 sur Ca_v2.2 est proche du site de **fixation de la calmoduline** ce qui laisse supposer que 14-3-3 pourrait agir en modulant la régulation par la calmoduline. Comme SCN5A est capable de lier la calmoduline un mécanisme similaire pourrait intervenir entre 14-3-3 et SCN5A. Un autre mécanisme intéressant a été proposé pour le canal TRESK (*Czirjak et al., 2008*). Dans cette étude, les auteurs montrent que 14-3-3 s'associe avec TRESK dans une zone proche de celle pour la fixation de la calcineurine (PQIVID) et d'un site de phosphorylation nécessaire à la régulation du canal. Les auteurs proposent un modèle de régulation reposant sur un **encombrement stérique** dans lequel la protéine 14-3-3 perturberait la fixation de la kinase ou modulerait la régulation par la calcineurine. Il n'y a pas de partenaire connu de SCN5A qui se fixe à proximité de la zone que nous avons identifiée pour 14-3-3. Un dernier mécanisme, également de type **compétition**, a été proposé pour expliquer l'effet du récepteur adrénergique β 1 sur le canal hERG (*Tutor et*



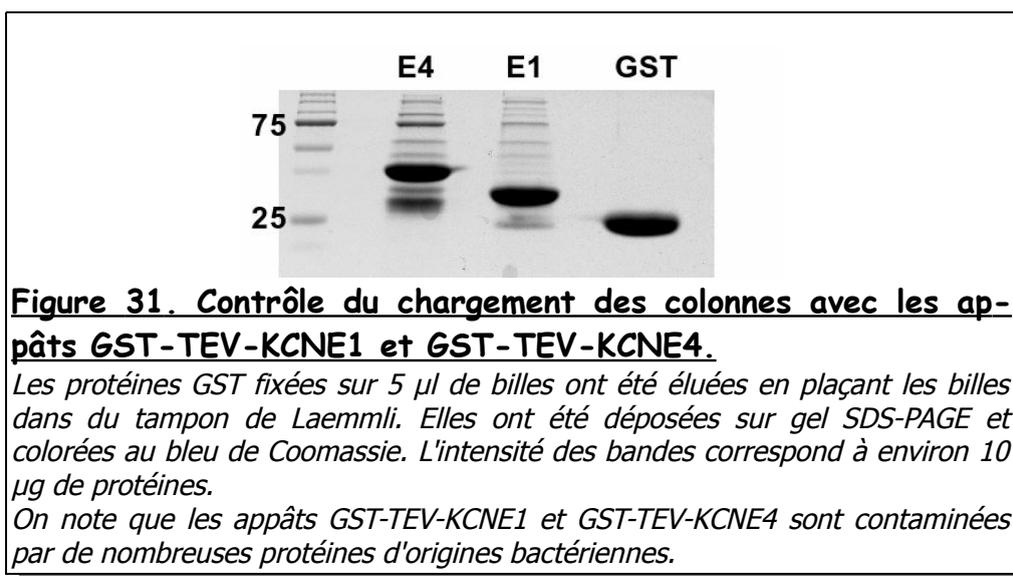
al., 2006). Les auteurs proposent qu'il y ait un pool de protéine 14-3-3 partagé entre hERG et le récepteur adrénergique $\beta 1$. Lors d'une stimulation adrénergique, la phosphorylation du $\beta 1$ par la PKA permet le déplacement de 14-3-3 du canal hERG vers le



$\beta 1$. Si la phosphorylation de $\beta 1$ est inhibée ou si 14-3-3 est inhibée, l'effet de la stimulation adrénergique sur hERG n'est plus observé confirmant l'implication de 14-3-3 dans ce mécanisme.

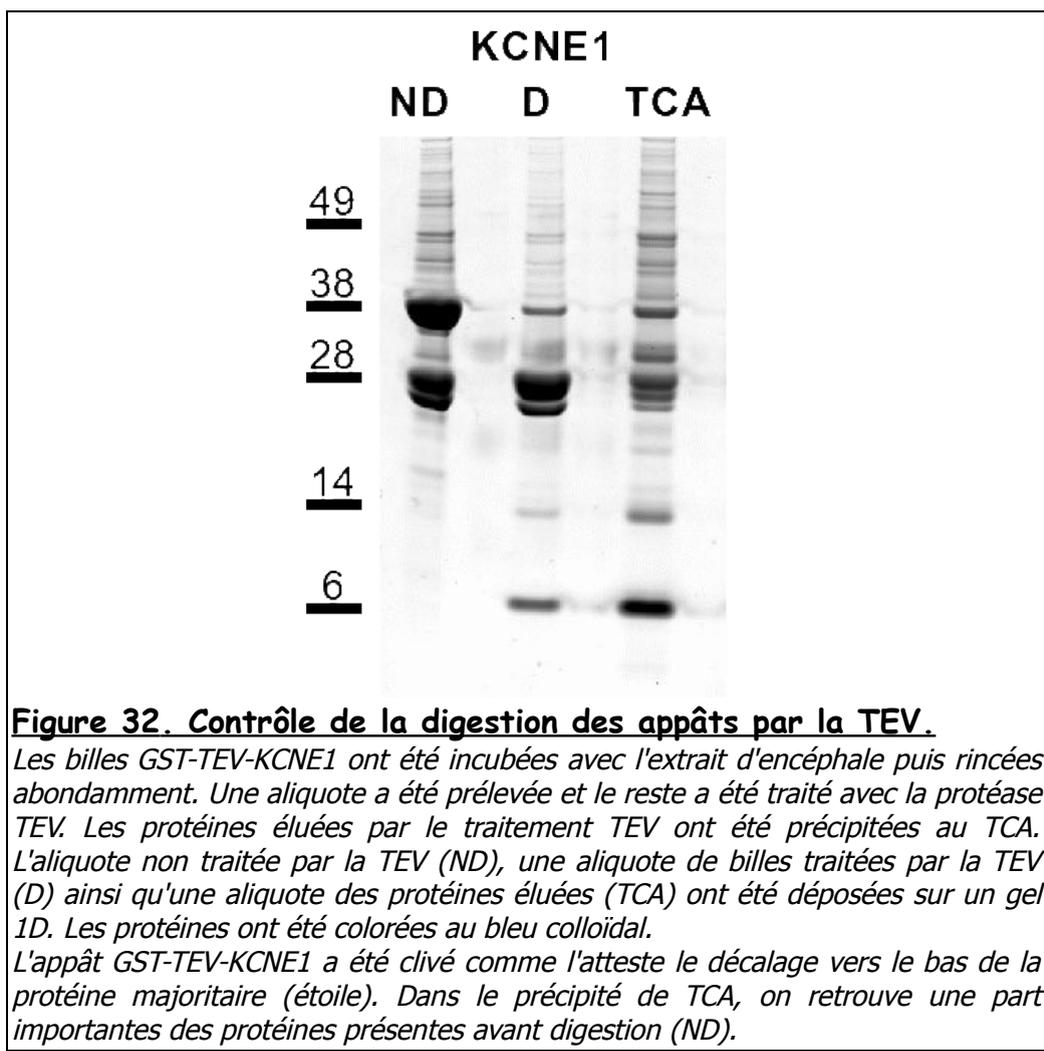
On peut aussi supposer que si 14-3-3 s'accroche en deux endroits différents du canal, des **contraintes structurales** résultantes modifient les propriétés biophysiques du canal (*Shikano et al., 2006*). La protéine 14-3-3 pourrait aussi **rapprocher** SCN5A d'autres partenaires, comme elle le fait pour de nombreuses protéines (*Shikano et al., 2006*).

Pour conclure, nous avons identifié un nouveau régulateur du canal SCN5A. A ce jour, le déficit d'association entre SCN5A et 14-3-3 n'a pas été observé chez des patient LQT3 mais il a été montré qu'un déficit d'association entre 14-3-3 et hERG est à l'origine de LQT2 (mutations G965X, R1014PfsX39 et V1038AfsX21) (*Choe et al., 2006*). La participation de 14-3-3 dans le LQT3 pourrait être vérifiée. En effet, il existe une mutation identifiée chez un patient avec LQT3 (E462K) qui se trouve dans le zone d'association avec 14-3-3 (*Tester et al., 2005*).



RÉSULTATS 2 : RECHERCHE DE PARTENAIRES DES KCNE ET KCNQ1.

Pour mettre en évidence de nouveaux partenaires du canal KCNQ1, nous avons commencé par une approche GST pull-down. Nous avons d'abord développé la technique de pull-down sur les protéines KCNE et ceci pour deux raisons. La première est que KCNQ1 s'associe avec les KCNE, c'est donc un moyen indirect de trouver des partenaires de KCNQ1. La deuxième est que les parties C-terminales de ces protéines sont plus courtes et ne présentent pas de domaines de tétramérisation par rapport à



celle de KCNQ1, leur production devrait donc être plus simple.

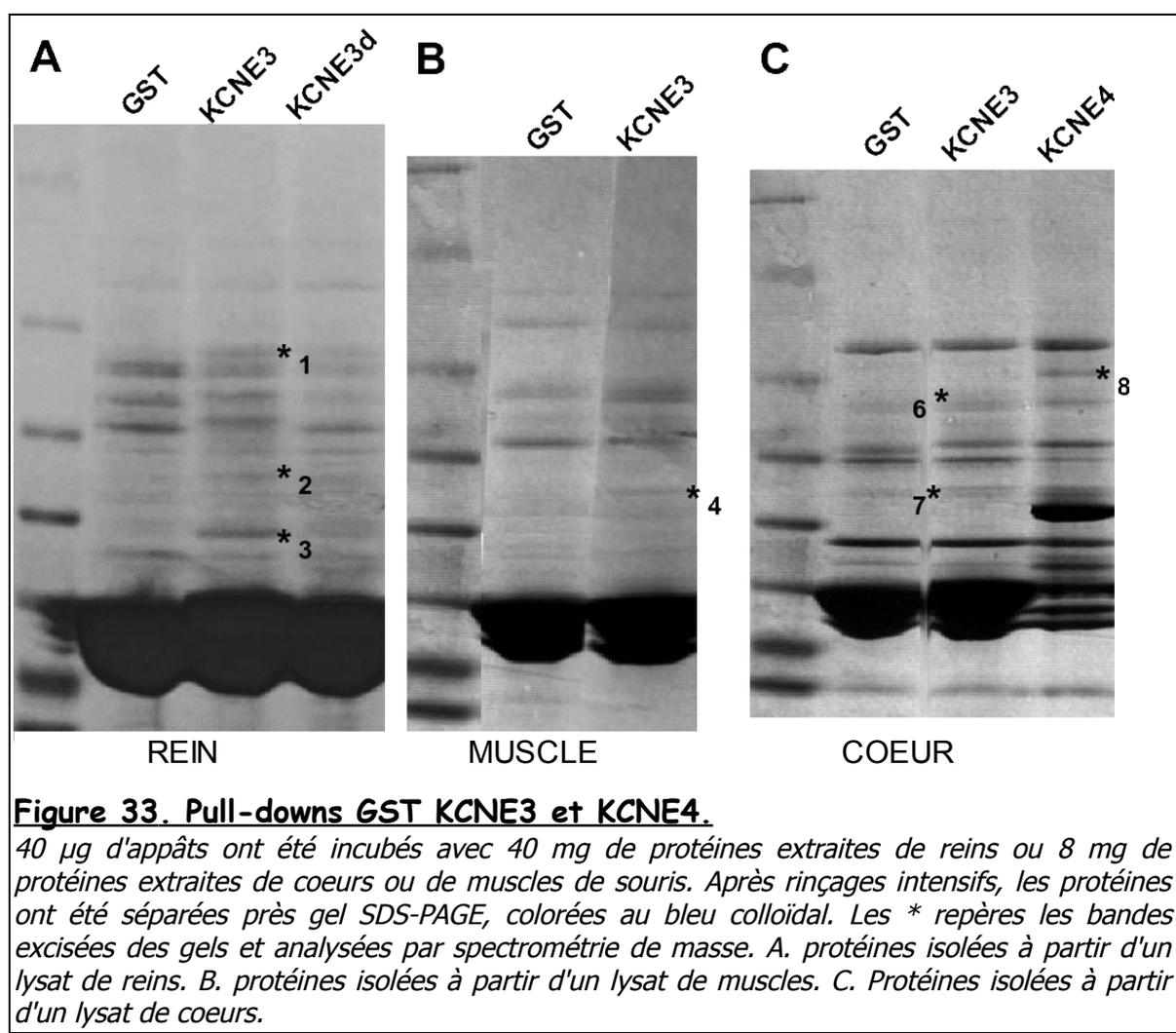
L'approche pull-down étant restée infructueuse, nous avons essayé une approche de double hybride adaptée aux protéines membranaires : le « split-ubiquitin ».

I. APPROCHE « PULL-DOWN ».

A. Stratégies et appâts utilisés.

Trois approches différentes ont été employées pour les pull-downs. Dans un premier temps nous avons utilisé des appâts formés du tag GST concaténé avec les parties C-terminales des protéines KCNE3, KCNE3 Δ et KCNE4 (appâts GST-KCNE3, GST-KCNE3 Δ , GST-KCNE4) (cf figure 30). L'appât KCNE3 Δ est identique à l'appât KCNE3

sauf que le motif d'interaction potentielle avec les protéines PDZ a été supprimé. Les appâts GST- ont été produits dans des bactéries BL21, extraits puis purifiés par affinité sur des billes de glutathion. Ces appâts ont été incubés avec des extraits protéiques de reins, muscles, encéphales et coeurs de souris. Les colonnes de pull-down ont été rincées abondamment. Les protéines ont été éluées avec le tampon de Laemmli et séparées sur gel SDS-PAGE. Les protéines ainsi isolées ont été révélées au bleu colloïdal, compatible avec la spectrométrie de masse. Les partenaires potentiels, c'est à dire les protéines isolées avec les appâts contenant la partie C-terminale d'intérêt et pas avec le contrôle GST, ont été identifiées par spectrométrie de masse



de type MALDI-TOF et LC-MSMS. Par cette approche, le bruit de fond était important et les partenaires potentiels difficilement repérables sur les gels 1D (cf figure 33).

Pour diminuer le bruit de fond et améliorer la séparation des protéines, une deuxième approche a été utilisée. Nous avons introduit un site de clivage pour la protéase TEV (Tobacco Etch Virus) entre le tag GST et les séquences codantes C-terminales (appâts GST-TEV-KCNE1, GST-TEV-KCNE4) (cf figure 31) Erreur : source de la référence non trouvée. Le site de clivage permet de couper l'appât de façon à ne récupérer que les protéines liées à la partie C-terminale d'intérêt. Les protéines responsables du bruit de fond, fixées à la colonne ailleurs que sur les parties C-terminales d'intérêts, sont ainsi moins représentées qu'avec une élution totale. Les protéines éluées ont été précipitées au TCA. L'efficacité de la digestion par la TEV, ainsi que la précipitation par le TCA, ont été contrôlés sur gel 1D comme illustré sur la figure 32. Les protéines isolées ont été séparées sur gels bidimensionnels IEF/SDS-PAGE. Après coloration à l'argent, les partenaires potentiels ont été identifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Les partenaires potentiels étaient définis comme les spots absents sur les gels contrôles et présents sur les gels obtenus avec l'appât complet.

Enfin, dans une troisième et dernière approche, nous avons utilisé des appâts de type peptides synthétiques. La partie C-terminale de KCNE3 a été obtenue par synthèse chimique et greffée sur des billes d'agarose par un pont di-sulfure. Cette approche permet de s'affranchir complètement de l'étape de production des appâts dans des bactéries. Ainsi, toutes les contaminations par les protéines bactériennes sont éliminées. Les pull-downs réalisés avec les appâts peptidiques l'ont été dans les mêmes conditions qu'avec les appâts GST-TEV. La longueur du peptide synthétique est limitée à une trentaine d'acides aminés, cette approche n'a donc pas pu être utilisée pour KCNE1, KCNE4 ou KCNQ1 dont les parties C-terminales font au minimum 60 acides aminés (cf [matériels et méthodes](#) pour détails).

Conclusions :

- Les appâts GST pour les protéines KCNE1, KCNE3 et KCNE4 ont été produites en quantités suffisantes pour réaliser les pull-downs pour ces protéines. On notera cependant, que pour les appâts GST-TEV-KCNE1 et KCNE4, il n'était pas possible d'éliminer toutes les protéines bactériennes contaminantes.
- L'approche GST n'a pas pu être employée pour KCNQ1 car l'appât GST-KCNQ1 n'a pas pu être produit dans les bactéries BL21. Elle était faiblement exprimée et était insoluble.

B. Partenaires potentiels isolés.

Par l'approche GST et gel 1D (cf figure 33), 6 bandes différentielles ont été obtenues pour KCNE3 et une pour KCNE4. Lors de l'identification par spectrométrie de masse, les contaminations étaient nombreuses : protéines bactériennes, kératine, enzymes du métabolisme énergétique et appâts GST. Au final, la protéine la plus « intéressante » est une protéine de 38 kDa, isolée avec KCNE3, au rôle inconnue et dont l'identifiant dans la base RIKKEN est 4931406C07. Le tableau IV ci-dessous résume les résultats obtenus.

Tableau IV. Partenaires isolés par pull-down pour KCNE3 et KCNE4.

Appâts	Lysats	Partenaires potentiels	Identification
GST-KCNE3	Rein	3	1. GST, kératine , KCNE3 2. GST, KCNE3, facteur d'élongation E. coli



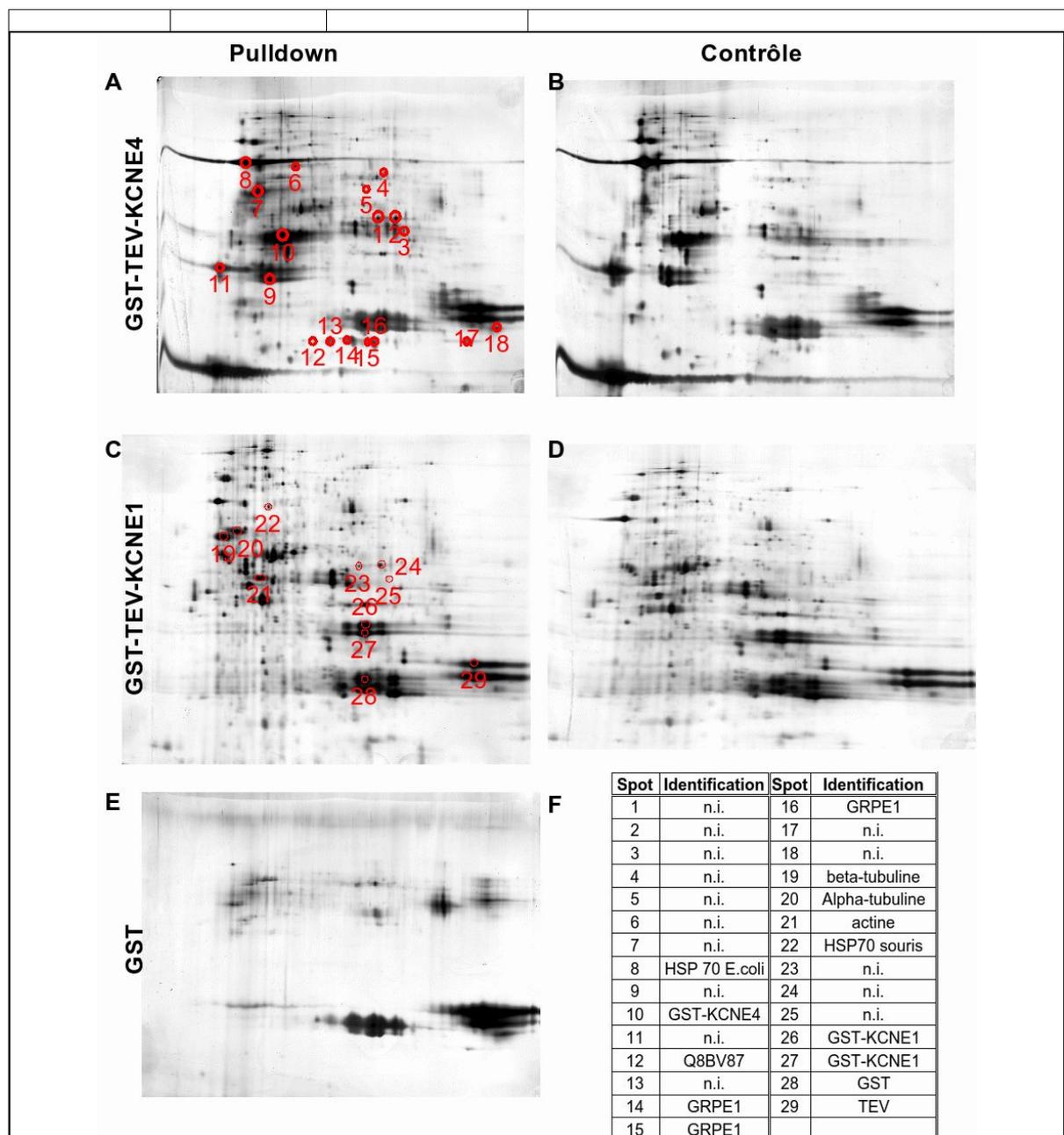


Figure 34. Pull-downs réalisés avec les appâts GST-TEV sur des extraits protéiques d'encéphales de souris.

75 µl de billes d'agarose chargées avec 150 µg de protéines appâts GST-TEV-KCNE4 (A et B) ou 150 µg de GST-TEV-KCNE1 (C et D) ou 150 µg de contrôle GST (E) ont été incubées avec 100 mg de protéines extraites d'encéphales de souris (A et C). Après rinçage des billes, les protéines fixées sur les appâts ont été éluées par clivage de l'appât par le protéase TEV et précipitées au TCA. Les protéines ont été séparées sur gel 2D et colorées à l'argent. Les spots numérotés ont été extraits du gel, traités à la trypsine et les protéines correspondantes identifiées par MALDI-TOF (F). Les gels B et D sont des contrôles de contaminations bactériennes, les appâts n'ont pas été incubés avec l'extrait d'encéphale ; les protéines visibles sur ces gels sont d'origines bactériennes.

Appâts	Lysats	Partenaires potentiels	Identification
--------	--------	------------------------	----------------



Appâts	Lysats	Partenaires potentiels	Identification
GST-KCNE3	Muscle	1	GST, kératine, facteur d'élongation E.coli
GST-KCNE3	Coeur	2	6. kératine, KCNE3, succinate deshydrogénase 7. GST, acétyl CoA, facteur d'élongation E. coli
GST-KCNE4	Coeur	1	8. Pas d'identification

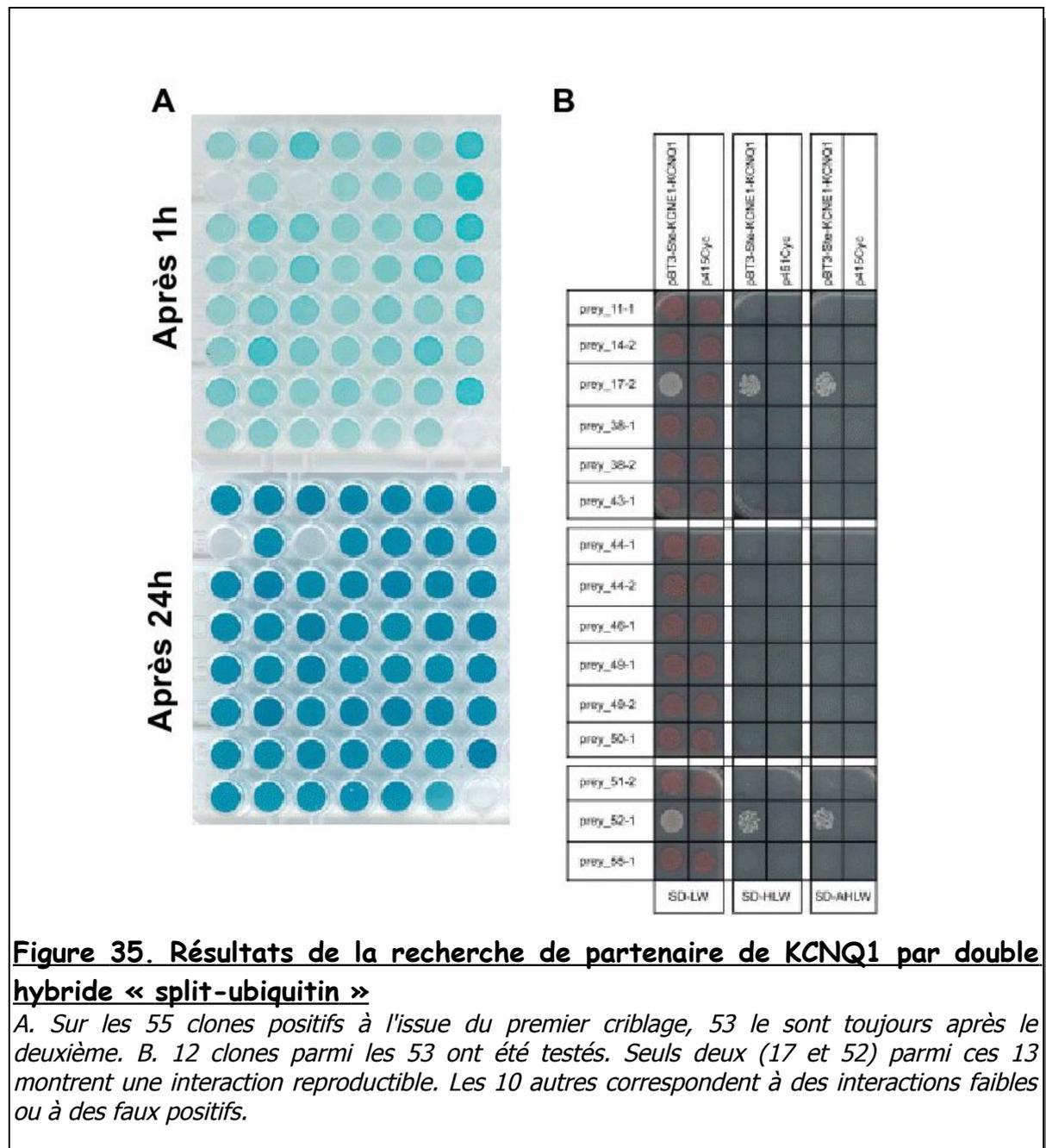
Afin de minimiser le bruit de fond, nous avons travaillé par l'approche TEV pour la recherche des partenaires de KCNE1 et KCNE4 et par l'approche peptide pour les partenaires de KCNE3. Les protéines obtenues par pull-downs réalisés avec ces appâts ont été séparées sur gels 2D pour améliorer la résolution et colorées à l'argent pour améliorer la sensibilité.

L'approche peptide n'a pas permis d'isoler de partenaires ; aucune protéine n'était visible sur le gel 2D. Nous avons d'abord pensé que les peptides ne s'étaient pas fixés sur les billes d'agarose. Nous avons donc vérifié que le couplage agarose peptide en dosant la solution de peptide avant et après crosslink. Il n'y avait plus de peptide dans la solution après crosslink ce qui confirme que le crosslink a été efficace. Une autre explication possible pour expliquer l'absence de protéine sur le gel 2D est que les peptides se seraient agrégés à la surface des billes, empêchant toute interaction. Nous n'avons pas pu vérifier cette hypothèse et l'utilisation d'appâts peptidiques a été abandonnée.

Les résultats des pull-downs réalisés avec les appâts GST-TEV-KCNE1 et GST-TEV-KCNE4 sont représentés sur la figure 34. Les expériences de pull-downs génèrent beaucoup de bruit de fond sur les gels 2D. Ce bruit est constitué par la protéine appât, la protéase TEV, les protéines qui se fixent au tag GST et à l'agarose, et par les protéines bactériennes qui restent fixées aux appâts lors de leur production. Il est donc important de repérer ces protéines contaminantes pour ne pas les considérer à tort comme des partenaires potentiels. Pour repérer ces protéines contaminantes, nous avons réalisé deux gels contrôles. Le premier, un pull-down avec la pro-



téine GST permet de repérer les interactions non spécifiques dues au tag GST et à l'agarose (cf figure 34 E). Pour le second, où les protéines éluées d'appâts non incubés avec l'extrait d'encéphale ont été déposées, permet de repérer les protéines bac-



tériennes, la TEV et la protéine appât (figures 34 B et D). Comme on peut le voir sur les figures 34 B et D, les contaminations bactériennes représentent la majorité des spots visibles sur les gels. Les protéines appâts : GST (spot 28), GST-KCNE1 (spot 26

et 27), GST-KCNE4 (spot 10) et la TEV (spot 29) sont également représentées de façon importante. Par différence entre les gels contrôles (figures 34 B, D et E) et les gels de pull-downs (A et C) ont trouvé 7 spots différentiels (partenaires potentiels) pour KCNE1 (de 19 à 25) et 14 pour KCNE4 (1 à 7 et 12 à 18).

Les protéines présentes dans ces spots ont été identifiées par MALDI-TOF (cf figure 34 F). Les tubulines α et β , l'actine et la Hsp 70 ont été identifiées comme partenaires potentiels de KCNE1. Les protéines chaperonnes GRPE1 et Hsp47 ont été identifiées comme partenaires potentiels de KCNE4. Par ailleurs, la moitié des spots n'ont pas été identifiés (n.i.).

Conclusions : les protéines partenaires identifiées sont des protéines du cytosquelette et des protéines chaperonnes, c'est à dire des protéines fréquemment isolées dans des expériences de pull-down. Ces premiers résultats, peu prometteurs, nous ont conduit à arrêter l'approche pull-down. Nous nous sommes tournés vers l'approche double hybride « split-ubiquitin » présentée ci-dessous.

II. APPROCHE « SPLIT-UBIQUITIN ».

La recherche de partenaires de KCNQ1 par double hybride « split-ubiquitin » a été réalisée par la société Dualsystems Biotech (Schlieren, Suisse).

La protéine KCNE1 n'est pas exprimée chez la levure. Or, dans les cardiomyocytes, la protéine KCNQ1 fonctionne avec KCNE1. Afin de se rapprocher des conditions physiologiques cardiaques, les partenaires de KCNQ1 ont donc été recherchés avec un appât constitué de KCNE1 fusionnée à KCNQ1 (KCNE1-KCNQ1). La partie C-terminale de l'ubiquitine (Cub) couplé au facteur LexA-VP16 était en C-terminale de



KCNQ1. Les levures appâts ont été transformées avec une banque d'ADNc de coeur de souris. La partie N-terminale de l'ubiquitine (Nub) était en partie N-terminale des protéines de la banque. Par conséquent, seules les protéines dont la partie N-terminale est cytosolique pouvaient être détectées. Plusieurs contrôles ont été réalisés pour valider les levures appâts. Tout d'abord, l'expression de l'appât KCNE1-KCNQ1-Cub-LexA dans les levures NMY32 a été vérifiée par western blot anti-LexA. Puis, l'absence d'auto-activation des levures appâts a été vérifiée sur milieu de sélection dépourvu de tryptophane, leucine, histidine et adénine (SD-WLHA).

Les levures appâts ont ensuite été transformées avec la banque d'ADNc de coeur et placées sur milieu sélectif SD-WLHA. A l'issue de ce premier criblage, 55 interactants primaires ont été identifiés. Ces 55 clones ont subi une deuxième sélection par un test semi-quantitatif à la β -galactosidase. A l'issue de ce deuxième test, il restait 53 clones positifs (cf figure 35 A). Parmi ces 53 clones, nous en avons choisi 12 pour identifier les partenaires qu'ils renfermaient.

Les plasmides des 12 clones retenus ont été extraits et amplifiés. L'interaction a été testée une deuxième fois ; des levures ont été transformées avec le plasmide appât et les plasmides extraits des clones puis elles ont été placées sur milieu sélectif (cf figure 35 B). Seuls les clones 17 et 52 ont poussés dans ces conditions ce qui signifie que les interactions observées dans ces deux clones sont reproductibles et fortes. A l'inverse, les interactions observées dans les 10 autres clones sont faibles ou négatives.

Les plasmides des 12 clones ont été séquencés et l'algorithme BLAST a été utilisé pour identifier les partenaires potentiels. Parmi les protéines identifiées, certaines ne

présentent à priori que peu d'intérêt par rapport à KCNQ1 ; ce sont la NADPH déshydrogénase, le cytochrome oxydase, l'ATPase, le cytochrome B, et la sous-unité α du protéasome. Par ailleurs, quatre autres protéines pourraient être plus intéressantes. Il s'agit de : SNF8 (clone 51) une protéine composante du complexe ESCRT II qui intervient d'une part dans la formation des endosomes et d'autre part dans la régulation de la transcription, Slc44a2 (clone 11) un transporteur à choline impliqué dans des pertes d'auditions, Laptm4b (lysosomal associated transmembrane protein) (clone 17) et Bcas2 (Breast carcinoma amplified sequence) (clone 52). Ces interactions n'ont pour l'instant pas été confirmées par d'autres méthodes.



CONCLUSIONS.

L'approche pull-down que nous avons utilisée pour mettre en évidence les partenaires de KCNQ1 et des protéines KCNE a été infructueuse. Si l'on décidait de poursuivre dans cette voie pour les protéines KCNE, des modifications de protocoles seraient à apporter. Travailler à partir de fractions cellulaires, éliminer les protéines du cytosquelette et les immunoglobulines des extraits protéiques et fragmenter l'ADN permettrait de réduire le bruit de fond. En fin de pull-down, laver les billes appâts avec des conditions plus douces (en retirant le Triton[®]X-100 du tampon de rinçage) permettrait peut être de préserver des interactions faibles.

Pour la recherche des partenaires de KCNQ1, les premiers résultats du double hybride seraient à valider. Par ailleurs, il reste 41 clones qui n'ont pas fait l'objet d'un séquençage en raison du cout élevé de cette prestation (100€/clone). La recherche par pull-down n'a pas été possible car l'appât GST-KCNQ1-C-ter n'a pas pu être produit. Des modifications du protocole de production pourraient être apportées. Ainsi, la co-expression de la calmoduline, qui semble agir comme chaperonne, pourrait permettre de produire cet appât dans des bactéries (*Marx et al., 2002; Yus-Najera et al., 2002*).

Enfin, l'approche qui me semble la plus intéressante serait une approche d'immunoprécipitation à partir de tissu cardiaque. En effet, nous disposons maintenant d'un anticorps efficace pour immunoprécipiter KCNQ1 (Alomone). Le facteur limitant est la possibilité d'isoler les complexes membranaires sans rompre les interactions protéiques. La formulation du tampon d'extraction nécessaire et notamment le choix du (des) détergent(s) utilisé(s) sera un des points critiques à résoudre (*Logopharm website, 2008; Schulte et al., 2006*).

MATÉRIELS ET MÉTHODES.

I. BIOLOGIE MOLÉCULAIRE.

A. Clonage.

1. Stratégie de clonage.

Afin de pouvoir être exprimées en système procaryote, les séquences codantes des extrémités C-terminales des protéines KCNQ1 (F339-S661), KCNE1 (I66-P129), KCNE3 (R81-I103), KCNE3 Δ (R81-K97) et KCNE4 (K59-S170) humaines ont été amplifiées par Polymerase Chain Reaction (PCR) puis introduites dans le vecteur pGEX (Amersham). L'insertion a été faite en 3' de la séquence codante de la Gluthation-S-Transférase (GST). Les séquences de KCNQ1, KCNE3 et KCNE3 Δ ont été insérées entre les sites de restriction BamH1(3') et EcoR1(5'). La queue C-terminale de KCNE4 a été clonée BamH1/BamH1 (3' et 5'). Nous avons également travaillé avec un vecteur pGEX modifié qui permet d'avoir un site de clivage pour la protéase TEV entre la GST et la séquence d'intérêt (fourni par Philippe Marin, Montpellier).



2. Réalisation.

Les séquences à cloner ont été amplifiées par PCR. Le mélange de PCR était composé de : 10 pmol de primers up et down, 10 ng de matrice, 0,5 µl dNTP (à [10mM]), 1 Unité de Taq Biolabs, 5 µl de Buffer, complété à 50 µl par de l'eau. Pour l'amplification de KCNE3 et de KCNE3Δ, le thermocycleur a été réglé ainsi : dénatura-tion à 94 °C pendant 5min, 25 cycles de 30s de dénatura-tion à 94 °C + 30s d'hybrida-tion à 55°C + 30s d'élongation à 72°C, terminaison 7 min à 72 °C et attente à 4°C. Pour l'amplification de KCNE4, le nombre de cycles a été porté à 40. Les résultats des PCR ont été contrôlés en faisant migrer 5 µl des produits de PCR en gel d'agarose 1% marqué au bromure d'éthidium (BET). Les produits de PCR ont été purifiés avec le kit QIAquick PCR Purification Kit Qiagen (élution dans 30 µl).

Le vecteur pGEX et les produits de PCR ont été digérés avec les enzymes BamH1 et EcoR1. Après traitement du vecteur à la phosphatase alcaline intestinale de veau (CIP), la ligation a été faite overnight (ON) à 16°C en présence de T4 DNA Ligase (Biolabs). Un témoin de ligation (vecteur sans produit de PCR) a été réalisé.

Des bactéries XL1-MF1 (Stratagène) électro-compétentes ont été transformées par électroporation (200 à 600 Ω, 1,8 kV, 25 µF, pulse 3,5 ms) avec 2 µl de produit de ligation. Elles ont ensuite été étalées sur des boîtes d'agarose Luria-Bertani (LB) avec ampicilline (100 µg/ml) puis placées à 37 °C pendant 1 nuit. Pour chacune des constructions GST-KCNE1, GST-KCNE3, GST-KCNE3Δ et GST-KCNE4, des minipreps ont été réalisées à partir d'un clone. La présence de l'insert dans le vecteur pGEX a été vérifiée par PCR. Finalement, les séquences clonées ainsi que la phase de lecture ont été vérifiées par séquençage.

II. PRÉPARATION DES LYSATS D'ORGANE.

Les organes ont été lysés dans le tampon de lyse (Tris 10 mM, NaCl 20 mM, Triton®X-100 1%, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, antiprotéases Roche Complete) à raison de 200 mg de coeur ou muscle / ml de tampon, 100 mg de rein ou d'encéphale / ml de tampon. Un broyage mécanique des organes a été obtenu en utilisant un Turrax

(22000 rpm, 2 min) puis un potter. Après 1 h d'incubation à 4°C sous agitation, les lysats d'organes ont été centrifugés 10 min à 1 000g. Les surnageants ont été centrifugés une seconde fois à 20 000g (rein uniquement) ou à 40 000g pendant 45 min (Bekman Rotor JA-17). Après quantification de la quantité de protéines dans les lysats (Kit D/C Biorad, compatible avec le Triton®X-100), les surnageants ont été conservés à -20 °C. La concentration protéique était de l'ordre de 10 mg/ml.

III. EXPRESSION DES PROTÉINES DE FUSION.

Des bactéries de la souche BL-21 ont été transformées avec les vecteurs pGEX décrits ci-dessus. Après isolement sur gélose LB ampicilline, un clone transformé a été mis en culture ON, à 37 °C sous agitation dans 5 ml de milieu LB avec ampicilline. Le lendemain, 100 ml de milieu LB avec ampicilline ont étéensemencés avec 2 ml de préculture et placés en erlenmeyer, à 37°C, sous agitation. La croissance bactérienne a été suivie par mesure de l'absorption optique à la longueur d'onde de 600nm (DO600). Lorsque la DO avait atteint 0,8, la production des protéines de fusion a été induite pendant une heure en ajoutant de l'IPTG (1mM finale).

Les bactéries ont été lysées dans un tampon A : PBS, 1% Triton®X-100, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, additionné d'antiprotéases Roche Complete. Les culots de bactéries obtenus après induction ont été repris dans le tampon A à raison de 1 ml de tampon A pour un culot issu de 10 ml de culture. Le sonicateur a été réglé de manière à minimiser la formation d'une émulsion potentiellement délétère pour la protéine de fusion. Les bactéries lysées ont été incubées 1 h à 4°C sous agitation. Les lysats ont été centrifugés 15 minutes à 3800g, les surnageants ont été récupérés et centrifugés à 5000g 15 minutes.

Les billes de glutathion ont été rincées avec le tampon A et incubées avec les surnageants de lyses bactériennes. Le rapport volume de billes / volume de surnageant était de 100 µl pour 1 ml. Après 1 h d'incubation à 4 °C sous agitation, les billes ont été rincées 5 fois avec le tampon A + 500 mM NaCl et 1 fois avec le tampon A (rapport volume de billes / volume de tampon par lavage : 1/50). Les billes chargées en protéines de fusion ont été conservées à 4°C avec 0,025% d'azide de



sodium. Le protocole détaillé est fourni en [annexe](#).

IV. LE PULL-DOWN.

50 µl de billes de glutathion chargées de GST, GST-KCNE3, GST-KCNE4 ou GST-KCNE3Δ (50 µg de protéines de fusion) ont été incubées avec 40 mg de protéines de lysats de reins, de muscles ou de coeurs de souris pendant 1h à 4 °C. Pour les pull-downs réalisés avec les appâts TEV, 70 µg de protéines appâts on été incubées avec 100 mg de protéines de lysats d'encéphales de souris.

Les billes ont été lavées 1 fois avec 10 ml de TL, puis 4 fois avec 10 ml TL + 500 mM NaCl et 1 fois avec 10 ml TL afin d'éliminer l'excédant de NaCl incompatible avec l'électrophorèse ultérieure. Les lavages ont été réalisés en tubes Falcon 15 ml. Les centrifugations ont été faites avec un rotor à angle variable (Centrifugeuse Sigma 3K10, Rotor Nr 11133) pendant 1 min à 1 000 rpm, sans frein pour éviter que les billes ne se remettent en suspension pendant la décélération.

Pour les pull-down réalisés avec les appâts sans site de clivage TEV, les protéines fixées sur ces billes de glutathion ont été récupérées en plaçant les billes 10 min à 70°C dans 30 µl de tampon de dénaturation de Laemmli. La totalité de l'éluat a ensuite été chargé sur des gels BisTris 4-12% (gels précoulés NuPAGE (migration 1D) de Invitrogen), 1,5 mm. Le tampon MOPS a été employé. Après migration, les gels ont été colorés au Bleu Colloïdal (Invitrogen) selon les recommandations du fabricant, pendant 3h.

Pour les pull-downs réalisés avec les appâts ayant un site de clivage TEV, les billes ont été incubées ON à 4°C dans un tampon contenant 60 unités de TEV Invitrogen. Les protéines ont été précipitées au TCA (12,5% final). Le culot de TCA a été rincé deux fois à l'acétone glaciale et le pH du dernier rinçage contrôlé.

V. ÉLECTROPHORÈSE 2D IEF-PAGE.

A. Première dimension.

Au cours de cette première étape, les protéines sont séparées selon leur point isoélectrique (IEF pour IsoElectroFocussing). Les précipités de TCA ont été dissous dans le tampon de réhydratation (IGBuffer/DeStreak Amersham). Les protéines ont été séparées sur des Strip de 18 cm pH3-10 NL (Amersham) jusqu'à atteindre un total 50000 Vh. Le protocole est fourni en [annexe](#).

B. Deuxième dimension.

La seconde dimension est une électrophorèse SDS-PAGE qui sépare les protéines selon leurs poids moléculaires. Des gels à gradient de 5 à 12 % ont été utilisés. À la fin de la première dimension, les Strip ont été incubées 10 minutes dans un tampon contenant 65 mM de DTT pour réduire les ponts di-sulfure, puis 20 minutes dans un tampon contenant 80 mM d'iodoacétamide pour bloquer les groupements SH. Les Strip ont été placées en haut des gels d'acrylamides, scellées par l'agarose et la migration a été réalisée. A l'issue de cette migration les gels ont été colorés à l'argent avec une méthode compatible avec la spectrométrie de masse.

VI. COLORATION À L'ARGENT COMPATIBLE MS.

Le protocole est fourni en [annexe](#).

VII. IDENTIFICATION DES PARTENAIRES PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE.

Les spots d'intérêt ont été excisés du gel, rincés deux fois 10 minutes à l'eau milliQ, déshydratés 10 minutes à l'acétonitrile (100%) puis réhydratés 10 minutes avec du NH_4HCO_3 100 mM. Les fragments de gels ont été déshydratés 3 à 5 minutes au



SpeedVac puis incubés avec un tampon contenant de la trypsine (15 ng/μl) sur glace pendant 45 minutes. La digestion par la trypsine s'est poursuivie ON à 25°C.

Le surnageant de digestion a été récupéré. Les morceaux de gel ont été rincés deux fois par l'acétonitrile et le NH_4HCO_3 pour en extraire les peptides. Enfin, les morceaux de gel ont été traités à l'acide formique 5%. Les peptides ont été déshydratés au SpeedVac.

Le « culot » de peptide a été repris dans de l'acide formique 2% et les sels ont été éliminés sur des cônes ZIP-TIP C18 (Millipore). Les échantillons ont été déposés sur une cible MALDI et analysés sur un spectromètre Bruker Ultra-Flex. L'analyse des spectres a été réalisée avec le logiciel MASCOTT. (cf annexe pour [protocole détaillé](#))

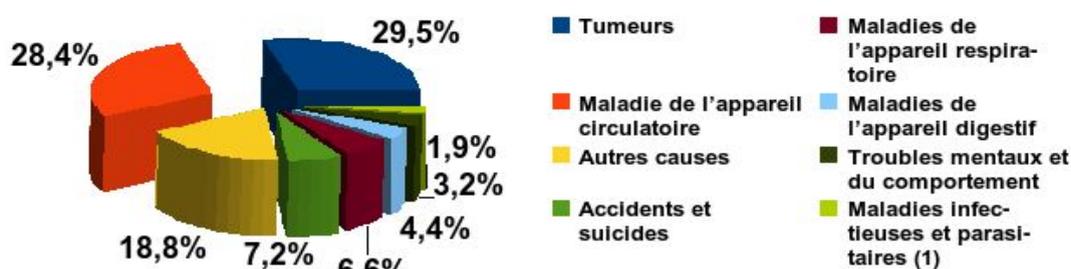
ANNEXES.



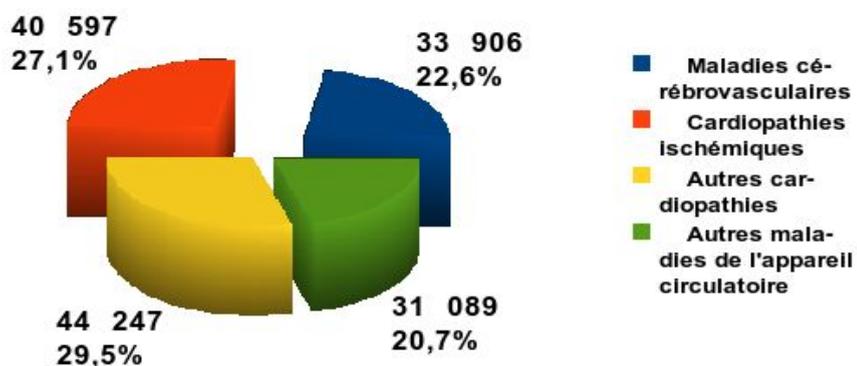
A. Compléments de bibliographie.

	Hommes		Femmes		Total	
	Effectif	%	Effectif	%	Effectif	%
Tumeurs	92 106	34	63 301	24,6	155 407	29,5
Maladie de l'appareil circulatoire	70 037	25,9	79 802	31,1	149 839	28,4
dont :						
<i>Maladies cérébrovasculaires</i>	14 328	5,3	19 578	7,6	33 906	6,4
<i>Cardiopathies ischémiques</i>	22 985	8,5	17 612	6,9	40 597	7,7
<i>Autres cardiopathies</i>	18 973	7	25 274	9,8	44 247	8,4
<i>Autres maladies de l'appareil circulatoire</i>	13 751	5,1	17 338	6,7	31 089	5,9
Autres causes	43 116	15,9	56 155	21,9	99 271	18,8
Accidents et suicides	22 682	8,4	15 123	5,9	37 805	7,2
Maladies de l'appareil respiratoire	18 039	6,7	17 017	6,6	35 056	6,6
Maladies de l'appareil digestif	12 456	4,6	10 720	4,2	23 176	4,4
Troubles mentaux et du comportement	7 195	2,7	9 864	3,8	17 059	3,2
Maladies infectieuses et parasitaires	4 999	1,8	4 904	1,9	9 903	1,9

Répartition des décès.
Année 2005



Répartition des maladies de l'appareil circulatoire.
Année 2005



Sources : Insee et CépiDc- Inserm.



1. Autres troubles du rythme cardiaque liés à KCNQ1 et SCN5A.

Les gènes KCNQ1 et SCN5A sont impliqués dans d'autres troubles du rythme. Bien que mon travail n'ait pas porté sur ces arythmies, je les présente brièvement afin d'illustrer la diversité des canalopathies et le fait qu'un même gène peut être impliqué dans différentes pathologies. Des mutations du gène KCNQ1 peuvent causer un syndrome du QT court ou une fibrillation auriculaire (FA) ; celles du gène SCN5A ont également été associées à la FA, au syndrome de Brugada, à la maladie de Le-nègre et à la maladie du noeud sinusal.

a. Le syndrome du QT court.

Le syndrome du QT court (SQT) est une pathologie congénitale, rare et caractérisée récemment (*Gussak et al., 2000*). Elle se caractérise par un intervalle QT court (inférieur à 300 milliseconde), un défaut d'adaptation à l'effort, des syncopes et peut entraîner une mort subite (*Borggreffe et al., 2005*). En 2000, Gussak et al. décrivent le syndrome du QT court. Et en 2004, une mutation sur le gène KCNH2 sera identifiée (*Brugada et al., 2004*). Elle provoque un gain de fonction du canal. En 2004, Bellocq et al. trouvent une mutation gain de fonction sur le gène KCNQ1 (V307L) chez un patient présentant un intervalle QT court (*Bellocq et al., 2004*). Enfin, en 2005 Piori et al. trouve une mutation gain de fonction sur le gène KCNJ2 (*Piori et al., 2005*).

b. La fibrillation auriculaire.

La fibrillation auriculaire (FA) est une arythmie caractérisée par une activation rapide et irrégulière des oreillettes. C'est une pathologie fréquente dont la prévalence augmente avec l'âge ; près de 6,5 % des hommes de plus de 80 ans sont affectés, contre 0,05% des hommes de moins de 50 ans (*Guize et al., 2007*).

Des études familiales ont permis de mettre en évidence des formes héréditaires de FA. En 2003, Chen et al. ont identifié une mutation (S140G) sur le canal KCNQ1

(Chen et al., 2003). Il s'agit d'une mutation gain de fonction ; on s'attendrait donc à ce qu'ils présentent également un SQT mais ce n'est pas le cas. Une deuxième mutation du gène KCNQ1 (Q147R) a été identifiée chez des patients présentant une FA et un allongement de l'intervalle QT mais le mécanisme moléculaire conduisant à la FA n'est pas déterminé (Lundby et al., 2007). En effet, la mutation provoque une perte de fonction du canal alors que l'on s'attend à un gain de fonction.

Une étude récente portant sur 357 sujets FA, dont certains avec une autre pathologie cardiaque, a identifié huit nouveaux variants rares du gène SCN5A. Six d'entre eux (M138I, E428K, H445D, N470K, E655K, V1951M) ségrégeaient parfaitement avec la FA et seraient donc des facteurs de prédisposition à la FA (Darbar et al., 2008). Les conséquences de ces mutations sur le courant sodique n'ont pas été étudiées.

Un polymorphisme de type SNP³², sur le gène KCNE1, a été associé à une fréquence de FA plus importante (Lai et al., 2002). En système de réexpression, cette mutation (S38G) provoque une perte de fonction du canal KCNQ1 (Ehrlich et al., 2005). Le lien entre ce polymorphisme et la FA n'a cependant pas été retrouvé dans une étude portant sur 142 patients souffrant de FA et 120 contrôles (Zeng et al., 2006).

Une étude portant sur 158 patients FA a permis d'identifier la mutation L65F sur le gène KCNE5 chez l'un de ces patients. Cette mutation provoque un gain de fonction du canal KCNQ1 ce qui pourrait conduire à la FA (Ravn et al., 2008).

Des mutations sur le gène KCNE3 pourraient également prédisposer à la FA. Une mutation sur le gène KCNE3 (V17M) a été trouvée chez un patient FA (Lundby et al., 2008). Des études de réexpression en oocytes de Xénope ont montré que cette mutation provoque un gain de fonction pour différents canaux potassiques.

Des études familiales ont permis de mettre en évidence deux autres loci associés avec la fibrillation auriculaire : 10p11-q21 (Volders et al., 2007) et 6q14-16 (Ellinor et al., 2003), mais les gènes responsables n'ont pas été identifiés.

32 SNP : single nucleotide polymorphism



c. Autres canalopathies liées à SCN5A.

Des mutations dans le gène SCN5A sont responsables de 20 % des cas de syndrome de Brugada. Cette pathologie décrite en 1992 (*Brugada & Brugada, 1992*), se caractérise par une élévation du segment ST et un risque élevé de mort subite. Les mutations sur le gène SCN5A provoquent une perte de fonction du canal sodique. Les gènes GPD1L, CACNA1C et CACNB2 sont également impliqués dans le syndrome de Brugada (*Antzelevitch et al., 2007; London et al., 2007*).

La maladie de Lenègre (décrite en 1964) est une maladie dégénérative qui provoque une altération de la conduction électrique par le faisceau de His pouvant aller jusqu'au bloc auriculo-ventriculaire. Cliniquement, elle se manifeste par des syncopes et peut provoquer une mort subite. Le lien avec le gène SCN5A a été fait en 1999 (*Schott et al., 1999*). Un autre locus (19q13) a été identifié chez des patients atteints de la maladie mais le gène en cause n'a pas été identifié (*Brink et al., 1995*). Un des candidat possible sur le locus 19q13, KCNA7, a été exclu (*Bardien-Kruger et al., 2002*).

Le gène SCN5A est également impliqué dans le maladie du noeud sinusal, terme qui regroupe un ensemble de dysfonctions du noeud sinusal sans pathologie sous-jacente.

2. Causes de mortalité en France.

B. Protocoles détaillés

1. Protocoles de production des appâts GST dans les bactéries BL-21.

Pré-culture

1. Piquer un clone de GST-Ex et le mettre en culture overnight dans 10 ml LB + 10 µl ampicilline (100 µg/ml).
2. Faire pousser ON, 37°C sous agitation orbital.

Culture

1. Préparer 50 ml LB + 50 µL ampicilline dans un erlen de 500 mL (erlen de volume 10 fois plus grand que le volume mis en culture). Faire une mesure de DO 600 blanc.
 2. Ensemencer avec 1 ml de la pré-culture (1/50). Agiter brièvement et prélever 1 ml pour mesurer la DO 600. (environ 0,100).
 3. Faire pousser à 37°C sous agitation. (La DO à 1h est environ 0,3 pour BL 21).
 4. Quand la DO dépasse 0,8 (après environ 2h15 de culture) induire la production en ajoutant 500 µl IPTG à 100 mM (soit 1mM finale).
 5. Remettre en culture à 37 ° c sous agitation pendant 1 heure. Mesurer la DO en fin d'induction.
 6. Placer les 50 ml de la culture dans un Falcon 50 et centrifuger à 3800 rpm, 10 min. Eliminer le surnageant
 7. Rincer la culot avec 10 ml de PBS 1X et centrifuger. Eliminer le surnageant.
- Le culot peut être congelé à -20 °C avant les étapes suivantes.

Sonication

La sonication se fait dans le tampon A (TA): PBS 1X, 1% Triton X100, 1mM DTT, 1 mM EDTA, 1mM PMSF, anti-protéase Roche. Manipuler dans la glace.

1. Re-suspendre la culot de bactéries dans 5 ml de TA sans Triton. Attention à ne pas faire mousser. Et transférer dans un F15 (très important pour la sonication).
2. Régler le sonicateur sur 2, pulse 20 et 6 minutes. Placer la sonde environ 1.5 cm sous la surface et la descendre de 0.5 cm après 2 min et encore de 0.5 cm après 2 min. Ne jamais amener la sonde dans le cône du F15, cela fait mousser. La sonication est bonne quand la solution s'éclaircit. Une sonication trop longue peut altérer la protéine de fusion ou la dégrader.
1. Ajouter le Triton.
2. Optionnelle : laisser 1h à 4 °C (ou moins)
3. Centrifuger 3800 rpm 15 min 4 °C.
4. Récupérer le surnageant et le centrifuger à 5500 rpm 15 min à 4 °C. Prélever un aliquote 50 µl (SS)

Purification sur billes de glutathion Sepharose

Préparation des billes

Les billes sédimentent rapidement, faire attention à bien les re-suspendre. Capacité de binding max : 10 mg protéines GST / ml de billes. Ne pas centrifuger les billes au delà de 800 rpm.

1. 300 µl solution Amersham (100 µl billes) dans un Eppendorf 1.5.
2. Rincer 4 fois avec TA. Et transférer les 100 µl de billes dans un tube de 5 ml.

Binding

1. 100 µl de billes / 5 ml de surnageant de sonication.
2. Incuber 1h min à 4 °C.



3. Rincer 5 fois avec TA 500 mM NaCl. (15 ml / lavage)
4. Rincer 1 fois TA. Eliminer le surnageant. La réaction de binding se fait pour un pH compris entre 6.5 et 8.0.
5. Conserver les billes dans PBS 1X, PMSF et azide 0.025%. A partir de maintenant, cette solution de bille/tampon est appelée solution stock.

Gel SDS-PAGE

Pour la GST seule, faire un gel 15 %.

1. Reprendre 5 μ l de billes dans 25 μ l de Laemmli 2X. Déposer 25 μ l revient à 5 μ l de billes.
2. 50 μ l SS + 50 μ l Laemmli 2 X : déposer 10 μ l (5 μ l SS)

2. Protocole d'électrophorèse 2D.

Matériel

Gamme PlusOne GEHealthcare.

IPG Buffer (se conserve à 4 °C)

DeStreak (se conserve à 4°C)

Strip, Sarcophage

Tampon de réhydratation TR : IPG Buffer + DeStreak. 18 µl IPG Buffer pour 3 ml DeStreak pour strip 3-11. Se référer à la notice de IPG Buffer. Une fois préparé le TR peut être congelé en aliquotes de 200 µl.

Tampon d'équilibration TE : Urée 72.07 g (6M), glycérol 87% 69 ml, TRIS 1.5M pH 8.8 6.7 ml, SDS 6g (3%) 50 ml eau. Compléter à 200 ml. Aliquoter en 20 ml à -20 °C.

Gants, éthanol 95%, papier.

Règles générales :

Attention à la poussière. Manipuler avec des gants.

Les strips non utilisées ne doivent pas décongeler, sortir les strips du congélateur -20°C au dernier moment.

Première dimension : IEF

Préparation de l'échantillon

1. Décongeler une aliquote de TR. Ne pas chauffer (urée), attendre que la solution soit bien translucide pour l'utiliser (30 min sur paillasse).

2. L'échantillon est repris dans le tampon de réhydratation TR. Le volume dépend de la taille de la strip. (200 µl pour une strip 11 cm). S'il s'agit d'un culot de TCA, soniquer brièvement l'échantillon (2 fois 10s). Laisser l'échantillon 30 min sur paillasse pour obtenir une bonne solubilisation. Mise en place de la strip dans le sarcophage

Travailler sur du papier humidifié.

1. Noter le numéro du sarcophage associé à l'échantillon, de même pour la strip.

2. Placer le sarcophage avec l'anode (+) à gauche.

3. Déposer, sur le fond du sarcophage, la moitié de l'échantillon en commençant par le + et déposer ensuite l'autre moitié. ! NE PAS FAIRE DE BULLES (tenir la pipette verticalement et faire toucher le cône au fond du sarcophage). Mettre les bulles (s'il y en a) à l'extrémité (-).

4. MANIPULER LA STRIP AVEC DES PINCES. NE PAS LA FAIRE TOMBER SUR UNE SURFACE SECHE.

5. Saisir la strip de manière à pouvoir lire les écritures par son extrémité droite (-).

6. Enlever le plastique protecteur situé au dos de la strip (il n'y a rien d'écrit dessus).

7. Poser la strip sur l'échantillon en commençant par l'anode (+) et en l'appliquant progressivement vers la cathode. Chasser les bulles et s'assurer que le + est bien complètement à gauche. Eviter de tremper la pince dans l'échantillon pour ne pas le contaminer.

8. Couvrir la strip de Cover Fluid. Commencer au +, aller jusqu'au milieu. Reprendre au - et faire la jonction au milieu.

9. Placer le couvercle.

Mise en place du sarcophage sur l'IPGfor.

Il est souhaitable que l'appareil soit relié à un onduleur pour prévenir les coupures électriques.

1. Allumer l'appareil.

2. Poser le sarcophage en respectant les signes + et - ainsi que les repères de sarcophages dessinés sur l'appareil.

3. Choisir le programme correspondant à la strip (se référer à la notice de la strip pour connaître les paramètres des différentes étapes de focalisation). En cours d'IEF le bleu migre vers le + et le - devient jaune. L'ampérage au départ doit être proche de 0 µA, 8 µA signe la présence de sel dans l'échantillon ce qui peut perturber la



focalisation.

La focalisation dure au moins une nuit. Pour une strip de 11 cm 3-11 lancer le run vers 16h30 17h00 pour reprendre le lendemain vers 8h00.

Les strips focalisées peuvent être conservées à -80 °C une nuit.

Deuxième dimension : SDS-PAGE.

La veille mettre 20 ml de tampon d'équilibration (par strip) à +4°C.

Le matin le sortir sur paillasse pour avoir une bonne solubilisation : la solution doit être transparente avant d'être utilisée.

1. Préparer les tampons de réduction et d'alkylation.

(a) réduction : 100 mg DTT + 10 ml TE.

(b) alkylation : 250 mg Iodoacétamide + 10 ml TE + pointe bleu de bromophénol. Protéger de la lumière avec du papier aluminium.

2. Les mettre à agiter 10 à 20 minutes pour avoir une bonne solubilisation.

3. En fin d'IEF, rincer brièvement la strip à l'eau (pissette d'eau, coté plastique).

4. Placer la strip 10 min dans le tampon de réduction à TA puis 10 min dans le tampon d'alkylation à TA.

5. Placer la strip sur le gel SDS-PAGE.

6. Pour sceller la strip en haut du gel SDS-PAGE:

(a) solution d'agarose : 1 g d'agarose Low Melting, 2 ml de SDS 10%, 15 ml de TRIS 1M pH 6.8, qsp 100 ml d'eau miliQ.

(b) chauffer la solution d'agarose à 60°C.

(c) Rincer la strip dans le tampon de migration.

(d) Mettre la strip en haut du gel SDS-PAGE en faisant adhérer la partie plastique contre la grande plaque de verre.

(e) Faire descendre la strip au contact du gel, faire attention à éliminer les bulles.

(f) Couler de l'agarose refroidi à 40 °C de manière à recouvrir la strip.

3. Protocole de coloration à l'argent compatible MS.

Objectif

Coloration argent d'après Philippe Marin, compatible spectrométrie de masse.

De l'eau froide, plusieurs litres.
Durée : 1h45 à 2 h.

Matériel

Biorad : cellophane support ref 1651779
Glycérol 87% PlusOne
Ethanol et acide acétique Rectapur et Normapur Prolabo pour spectrométrie de masse.
Thiosulfate, Formaldéhyde 37%, Nitrate d'argent.

Solution stock

1. Solution F1 fixation éthanol 50%, ac acétique 5%:

	eau ml	éthanol ml	ac acétique ml	volume total
:	225	250	25	500
	450	500	50	1000

2. Solution F2 fixation éthanol 50%:

	eau ml	éthanol ml	total
:	250	250	500
	500	500	1000

3. Thiosulfate de sodium 10% :

	eau ml	thiosulfate de Na mg	total
	2	200	2
	1	100	1

4. Solution TS mordantage thiosulfate sodium 0,02% :

	eau ml	thiosulfate de Na 10% ml	total
:	1000	2	1000
	500	1	500
	250	0.5	250

5. Solution Ag 0.1% :



eau ml	nitrate argent g	total ml
1000	1	1000
500	0.5	500
250	0.25	250

6. Solution CNA carbonate de Na 2% - formaldéhyde 0,04%:

eau ml	CNa g	Formaldéhyde 37 % ml	volume total
2000	40	2.16	2000
1000	20	1.08	1000
500	10	0.54	500

7. Solution arrêt acide acétique 5%:

eau ml	acide acétique ml	total ml
950	50	1000
475	25	500

8. Solution conservation acide acétique 1%:

eau ml	acide acétique ml	total ml
990	10	1000
495	5	500

9. Solution séchage éthanol 30% - glycérol 2%:

eau ml	glycérol 87% ml	éthanol ml	total ml
680	20	300	1000
340	10	150	500

Étapes

1. Fixer 20 min dans F1
2. Laver 10 min avec F2 - Préparer la solution TS. Peser l'argent et le Carbonate de Na (CNA).
3. Laver 10 min à l'eau (ON possible) - Préparer la solution d'argent et la laisser au noir à 4°C.
4. Mordancer 1 min avec TS
5. 2 lavages 1 min à l'eau
6. Colorer 20 min à l'argent à 4°C. Préparer la solution CNA : verser lentement le CNA dans l'eau pour ne pas faire d'amas. La formaldéhyde sera ajouté au dernier moment.
7. 2 lavages rapides à l'eau (max 1min).
8. Révéler rapidement avec CNA (ne pas oublier le formaldéhyde), quand le bain devient jaune verser la solution.
9. Révéler à nouveau avec CNA et suivre la révélation en protégeant de la lumière avec un sac noir.
10. Arrêter la révélation avec Ac Acétique 5 %. Laisser 30 min minimum en contact avec la solution d'acide acétique pour bien fixer, en laissant au noir.
11. Le gel peut être conservé à 4 °C dans l'acide acétique 1% pendant plusieurs jours.
12. Séchage : baigner le gel dans la solution de séchage 10 minutes minimum (jusqu'à ON) et faire sécher entre deux films de celophane.

4. Protocole de préparation des échantillons MS.

D'après plateforme protéome IFR3 Montpellier.

Matériel.

ACN acétonitrile 100%.
NH₄HCO₃ 100 mM (315 mg qsp 40 ml d'eau).
Tampon de digestion 100 mM NH₄HCO₃, 5 mM CaCl₂.
AcF Acide formique 5% (v/v) préparé extemporanément.
ACN-TFA Acétonitrile/ Eau milliQ/TFA 50/50/0.1%
Acide formique 2%
TFA 0.1%
Zip-TIP C18 (Millipore)
Acide formique 100% (Merck)
Acétonitrile qualité HPLC (Merck)
TFA Uvasol (Merck)

Étapes.

Lavages des spots.

1. Laver les spots deux fois 10 minutes avec 100 µl l'eau milliQ.
2. Déshydrater 10 minutes avec 50 µl d'ACN, éliminer le surnageant.
3. Réhydrater 10 minutes avec 50 µl d'NH₄.
4. Ajouter un volume identique de ACN. Attendre 10 minutes et éliminer le surnageant.
5. Placer 3 minutes au SpeedVac.

Digestion à la trypsine.

1. Préparer extemporanément le tampon de digestion avec la trypsine. 400 µl de tampon de digestion + 6 µl de trypsine GOLD (1 µg/µl, 50 mM acide acétique. aliquotée à -80 °C).
2. Réhydrater chaque spot de gel avec 10 µl de tampon de digestion, 45 minutes sur glace.
3. Ajouter 10 µl de tampon de digestion sans trypsine et placer les spots ON au bain-marie à 25 °C.

Récupérer des peptides.

Utiliser toujours le même cône pour récupérer les peptides d'un même spot. Tous les surnageants d'un spot sont récupérés dans le même tube en polypropylène opaque à 4°C.

1. Récupérer le surnageant de digestion.
2. Ajouter 12 µl d'ACN et attendre 10 minutes. Récupérer le surnageant.
3. Ajouter 12 µl de NH₄, attendre 10 minutes, ajouter 12 µl de ACN. Récupérer le surnageant.
4. Refaire les étapes 2 et 3.
5. Ajouter 12 µl d'AcF. Attendre 10 minutes. Ajouter 12 µl d'ACN et attendre 10 minutes. Récupérer le surnageant.
6. Refaire l'étape 5.
7. Sécher les peptides au SpeedVac 1 à 2h.

Dessalage au ZIP-TIP C18 (Millipore)

Ne pas aller en buté de pipette et toujours garder le cône plein pour ne pas assécher la colonne.

1. Reprendre le culot de peptides dans 10 µl d'acide formique 2%. Vortexer 10 minutes.



Annexes.

2. Hydratation du cône : faire 3 passages de 10 μ l dans ACN-TFA. Eliminer le liquide.
3. Equilibration du cône : faire 3 passages dans 10 μ l de TFA 0.1%. Eliminer le liquide et la dernière goutte sur papier absorbant.
4. Fixation des peptides : faire 10 passages sur l'échantillon. Laisser le liquide dans le tube.
5. Lavage : faire 4 passages de 10 μ l de TFA 0.1%. Conserver les lavages dans le tube de l'échantillon.
6. Elution : faire 10 aller-retour dans 10 μ l ACN-TFA. Ejecter les 10 μ l dans un tube 0,5 ml.
7. Evaporer jusqu'à 3 μ l. C'est prêt pour le MALDI-TOF.

5. Protocole de pulse-chase.

Objectif

Marquage des protéines néosynthétisées à l'aide de Cystéine et Méthionine marquées par ^{35}S

Matériel

Redivue Pro-mix - ^{35}S in vitro cell labeling mix : 92.5 MBq, 2.5 mCi ref AGQ0080-2.5MCI (GEhealthcare) > 37 TBq/mmol, > 1000 Ci/mmol. # 530 MBq/ml, 14.3 mCi/ml.
Anti KCNQ1 APC-022 Alomone 0.75 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ aliquotes 10 μl .
Milieu DMEM sans Methionine et sans cystéine GIBCO ref 21013.
Milieu DMEM avec SVF 10% L-Glu peni/strepto
PBS sans Ca^{++} ni Mg^{++}
MG132 : Biomol ref PI-102 Stock 10 mM EthOH à -80°C stable 2 mois. Utilisation à 25 μM (1/400). MW 475.6
HiTrap Prot G HP : GEHealthcare réf 17-0405-01

Tampons

TPL : Tris 20 mM, NaCL 150 mM, triton X100 1%, AP roche
Tampon rinçage : Tris 20 mM, NaCL 500 mM, triton X100 1%
Tampon sans triton : Tris 20 mM, NaCL 150 mM.

Règles générales :

Commande S35 nécessite un numéro IRSN. S35 à manipuler en salle de radioactivité.

Étapes

Cellules et transfections - Timing.

1. J0 : repiquer les cellules (dilution 1/5 pour HEK).
Prévoir une boîte de 10 cm pour 4 points de pulse.
2. J1 : transfection
3. J2 : pulse, lyse et IP
4. J3 : fin IP, électrophorèse, exposition écran
5. J5 : révélation écran.

Pulse-chase

1. Enlever le milieu
2. Rincer les cellules au PBS : 4 ml / boîte de 10 cm
3. Décoller les cellules avec du PBS : 10 ml et les mettre dans un F50
4. Centrifuger 1000 rpm, 5 min. Aspirer le PBS.
5. Préparer des tubes Greiner de 12 ml, un par point de pulse (T0, T1, T2, T4), y mettre 1 ml de milieu DMEM complet et les placer à l'incubateur.
6. Reprendre le culot de cellules dans 1 ml de milieu sans méthionine ni cystéine et replacer dans l'incubateur.
Aller en salle de radioactivité. Placer les tubes à l'incubateur.
1. Derrière l'écran : mettre 40 μl de Méthionine Cystéine S35 (soit 0.5 mCi ou 21 MBq) sur le 1 ml de cellules



(n).

2. Placer à 37 °C 15 min (pulse).
3. 2 min avant la fin du pulse, prendre le deuxième F50 contenant les cellules (n+1) devant être pulsées. Transférer ces cellules dans un ep 1.5 (garder le F50 n+1). Centrifuger 45s sur centrifugeuse boule de paille. Eliminer le surnageant (froid).
4. Récupérer le ml de cellules (n) qui viennent de subir le pulse, les transférer dans un ep 1.5 et centrifuger 45s. Récupérer le milieu chaud et le mettre sur les cellules (n+1) dont le milieu vient d'être enlevé.
5. Ressuspendre les cellules n+1 et les transférer dans le F50 (n+1). Placer ce tube à 37 °C 15 min (pulse).
6. Sur les cellules qui viennent de subir le pulse (n):
 - (a) mettre 1 ml de PBS, ne pas ressuspendre (pour ne pas perdre de cellules)
 - (b) centrifuger 15 secondes et jeter le surnageant dans poubelle chaude
 - (c) mettre 1 ml de milieu DMEM complet (non marqué) sur les cellules, ne pas ressuspendre
 - (d) centrifuger 15 secondes et jeter le surnageant dans poubelle chaude
 - (e) ressuspendre les cellules dans 1 ml de DMEM complet et répartir dans les tubes Greiner préparés contenant 1 ml de milieu DMEM complet. (230 µl dans les tubes T0 à T4).
 - (f) placer les 4 tubes à 37 °C et prélever le tube T0 après 5 min puis T1 1h après T0 etc. Placer ces tubes dans la glace. (Chase)
7. Faire de même pour chaque condition.
8. Quand tous les temps T0 ont été réalisés :
 - (a) Transférer les cellules des Greiner dans des ep 1.5 et centrifuger 45 secondes.
 - (b) Aspirer le surnageant et jeter dans la poubelle chaude.
 - (c) Mettre 1 ml de PBS, ne pas ressuspendre (pour ne pas perdre de cellules)
 - (d) Centrifuger 15 secondes et jeter le surnageant dans poubelle chaude
 - (e) Placer l'ependoff dans la glace (les cellules sont en culots secs) jusqu'à la fin de la manipulation.
9. Faire de même quand tous les temps T1 ont été faits, puis T2 etc.
10. Quand l'avant dernier tube (T4) vient d'être sorti de l'incubateur, préparer le tampon de lyse et commencer à le répartir sur les eppendorf 1.5 déjà rincés. Mettre 500 µl de TPL par point.

Lyse des cellules

(TPL = Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Triton X100 1%, AP roche)

1. Ressuspendre les culots dans les 500 µl de TPL.
2. Faire 6 aller retour à la seringue de 1 ml et aiguille de 27 G
3. Placer sur la roue 30 min à 4°C
4. Centrifuger 16 000 xg 15 min.

Immunoprécipitation

1. Prévoir 0.5 µl Ac KNCQ1 Alomone par point de pulse
2. Diluer le volume d'Ac nécessaire dans 19 volumes de TPL sans TX100 (ex : 9 µl dans 171 µl pour 16 points (1 point de marge pipetage). 10 µl = 0.5 µl Ac
3. Répartir 10 µl dans x tube ep 1.5 et ajouter 420 µl de lysat cellulaire.
4. Placer à 4°C ON
5. Préparer les billes de protéine G pour le lendemain.
 - (a) Prévoir 20 µl de billes protéine G par point de pulse
 - (b) Rincer les billes avec TPL : ressuspendre les billes dans 1 ml de TPL (environ), centrifuger. Estimer le volume de bille. Aspirer le surnageant.
 - (c) Reprendre les billes dans 2 volumes de TPL (1v billes dans 3v total). Laisser à 4°C.
6. Couler les gels 10 % et stack 6% pour le lendemain et les laisser à 4°C.

le lendemain

1. Ajouter 60 µl de "billes repressent" dans chaque tube de pulse (soit 20 µl de billes)
2. Mettre 1 h à 4°C. Centrifuger et aspirer le surnageant.
3. Rincer 1 fois avec 500 µl TP rinçage, 1 fois avec 500 µl TP de lyse, 1 fois avec 1 ml TP lyse sans Triton. (centrifugation entre rinçage à 500g, vortexer brièvement les billes après ajout des tampons. Dernier rinçage centrifugation à 4000 rpm)

4. Reprendre les billes dans 25 μ l Laemmli 3X.

Electrophorèse

1. Dénaturer 10 min 70 °C. Vortexer, centrifuger brièvement.
2. Déposer tout le surnageant.
3. Migration : 20 mA/gel (dure 15 min) au court du stacking. 40 mA/gel après (dure 20 min).
4. Fixation / séchage :
 - (a) 5 minues dans le tampon de fixation
 - (b) Rinçage à l'eau 10 min
 - (c) Tampon de séchage 10 min, au four 1h30.

Révélation

1. Effacer l'écran à phosphore avant de mettre un nouveau film.
2. Placer un gel dans C-G 3-6 et un autre dans C-G 7-10
3. Exposer au minimum 24h. (du vendredi soir au lundi matin).
4. Lecture sur Typhoon 9410 : lecture pour écran à phosphore, résolution 100 pixel/cm, sensibilité normale.



C. Article revue : K_v7.1 (KCNQ1) properties and channelopathies.



SYMPOSIUM REPORT

Kv7.1 (KCNQ1) properties and channelopathies

David Peroz^{1,2,3}, Nicolas Rodriguez^{1,2,3}, Frank Choveau^{1,2,3}, Isabelle Baró^{1,2,3}, Jean Mérot^{1,2,3} and Gildas Loussouarn^{1,2,3}

¹INSERM, U915, Nantes, F-44000, France

²Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F-44000, France

³CNRS, ERL-3147, F-44000, France

KCNQ1 is the pore-forming subunit of a channel complex whose expression and function have been rather well characterized in the heart. Almost 300 mutations of KCNQ1 have been identified in patients and a vast majority of the described mutations are linked to the long QT syndrome. Only a few mutations are linked to other pathologies such as atrial fibrillation and the short QT syndrome. However, a considerable amount of work remains to be done to get a clear picture of the molecular mechanisms responsible for the pathogenesis related to each mutation. The present review gives three examples of recent studies towards this goal and illustrates the diversity of the molecular mechanisms involved.

(Received 15 November 2007; accepted after revision 14 December 2007; first published online 20 December 2007)

Corresponding author G. Loussouarn: INSERM, U533, Nantes, F-44000, France.

Email: gildas.loussouarn@nantes.inserm.fr

KCNQ1 is the α -subunit of a voltage-dependent potassium channel expressed in various cell types including cardiac myocytes and epithelial cells. In the heart, KCNQ1 assembles with KCNE1 to form a channel complex constituting the slow component of the delayed rectifier current I_{Ks} (Barhanin *et al.* 1996; Sanguinetti *et al.* 1996). Other KCNE subunits (such as KCNE4) may be present in the complex and play a significant role (Bendahhou *et al.* 2005). To date, nearly three hundred mutations in KCNQ1 have been identified. The majority of these mutations cause a loss of function of KCNQ1, resulting in the long QT syndrome (LQTS), an inherited disorder characterized by a delayed ventricular repolarization, syncope and sudden death (Vohra, 2007). Only a few gain-of-function mutations have been identified and are linked to atrial fibrillation (Chen *et al.* 2003) or the short QT syndrome (Bellocq *et al.* 2004).

For most of these three hundred KCNQ1 mutations, the molecular mechanisms leading to the pathologies were poorly understood and frequently limited to one of the following categories: impaired trafficking, impaired voltage dependency, impaired selectivity and impaired

tetramerization. Impaired tetramerization was observed in one deletion–insertion mutation at residue 544 (Schmitt *et al.* 2000), causing the autosomal-recessive form of the LQTS (Jervell and Lange-Nielsen, JLN), as opposed to the more frequent autosomal-dominant form (Romano-Ward, RW). The impaired tetramerization provides a molecular basis for the autosomal-recessive form of the syndrome. Indeed, a KCNQ1 mutant may not have a dominant negative effect if it does not interact with a wild-type (WT) monomer, that is if it does not make a tetramer.

This review describes how recent studies gave further insights into some molecular mechanisms involved in the pathogenesis of LQTS. This is illustrated by three examples: the first example shows that classical methods (microscopy, patch clamp) are useful to investigate new hypotheses. However, these methods are limited to shedding light on the mechanisms at the amino-acid level, and require other methods such as structure prediction; the second and third examples show how structural and biochemical, but also patch-clamp data, can give further insights into the molecular mechanisms leading to the pathology.

Example 1: A hypothetical mechanism for different effects of mutations located in the same region of KCNQ1

We have recently studied three RW mutations (Y111C, L114P and P117L) located in the KCNQ1 N-terminus,

This report was presented at a symposium on Kv7 (KCNQ) potassium channels that are mutated in human diseases, held at a joint meeting of The Slovak Physiological Society, The Physiological Society and The Federation of European Physiological Societies in Bratislava, Slovakia on 14 September 2007. It was commissioned by the Editorial Board and reflects the views of the authors.



just before the first transmembrane domain (Dahimene *et al.* 2006). Combining classical methodologies and structural model prediction, we characterized a new structural motif and described how these mutations within this motif lead to loss of function of the channel. Using immunofluorescence microscopy and patch-clamp experiments we observed that these three mutants did not reach the plasma membrane but remained trapped in the endoplasmic reticulum (ER) when expressed as homotetramers. Surprisingly, when mutated proteins were co-expressed with WT subunits, they exerted different effects on the KCNQ1 current. Y111C and L114P mutants produced a strong decrease of current density whereas the P117L mutant did not. Fluorescence microscopy analysis provided a clue to the mechanism. Indeed, in the presence of WT-KCNQ1, Y111C and L114P remained trapped in the ER whereas the P117L mutant was expressed at the cell surface. This indicated that the WT subunit could somehow rescue P117L trafficking but not that of Y111C and L114P. This raised an intriguing question: how can spatially close mutations have such different effects? Structure prediction analysis, performed in collaboration with Annick Thomas and Robert Brasseur (University of Gembloux, Belgium) unveiled potential molecular mechanisms. Indeed, structure prediction showed that this region consists of a short helix and a loop connected to the first transmembrane domain. This structural motif is stabilized by hydrophobic interactions between Y111 in the short helix and an aromatic cluster of amino acids in the first transmembrane domain including H126 (Fig. 1). The model predicted that both Y111C and L114P substitutions

ultimately hinder the interaction of Y111 with the aromatic cluster and thus destabilize the structure. P117L increases the length of the helix and hinders the formation of the loop, but glycine at position 119 may still confer sufficient flexibility to the helix to bend on the membrane and allow Y111 to participate in the native interactions. Therefore, one can speculate that WT subunits could help the P117L mutant, but not Y111C and L114P, to adopt the native conformation and to pass through the ER control quality.

As a conclusion, thanks to classical methods, we were able to identify a new trafficking motif in the N-terminal juxtamembranous domain and envisage molecular mechanisms backed up by structural prediction analysis.

Example 2: Mutations in the assembly domain prevent channel membrane targeting, but without impeding tetramerization

While, in the preceding example, we began our study with biological and pathophysiological observations to develop a potential structural model, in this second example structural studies have led to new insights into the molecular mechanisms of LQTS (Howard *et al.* 2007). In previous studies, it has been proposed that many LQTS-related mutations in the KCNQ1 C-terminus hindered channel subunit association. Howard and coworkers have revisited those mechanisms based on the crystallographic structure analysis of a KCNQ C-terminal assembly domain called the A-domain. In fact, the KCNQ channel family includes five members that can form homo and heterotetramers, with distinct assembly preferences controlled by the A-domain. Using X-ray diffraction analysis, circular dichroism, size exclusion chromatography, analytical ultracentrifugation, sedimentation equilibrium and gel filtration, they have proposed a common mechanism for KCNQ1 mutations located in this domain. In a first set of experiments, the authors have determined the crystallographic structure of the A-domain tail (a.a. 610–640) of KCNQ4: this is a tightly twisted left-handed four-stranded coiled coil with a predominantly polar surface. Interestingly, the KCNQ3 A-domain tail, contrary to all other KCNQs, was not able to form homotetramers in gel filtration chromatography experiments. Structure comparisons pointed to F622, D631 and G633 as the key residues that hampered this homo association in KCNQ3. This explained why KCNQ3 only forms heterotetramers with other KCNQ subtypes. Interestingly, and in contrast to what was previously thought, none of the LQTS mutations (T587M, R589D, A590T, R591H, R594H) disrupted the KCNQ1 A-domain assembly, ruling out the previous hypothesis that these mutations affected tetramerization and, as a consequence, channel trafficking. Thus, and thanks to crystallographic structure of the

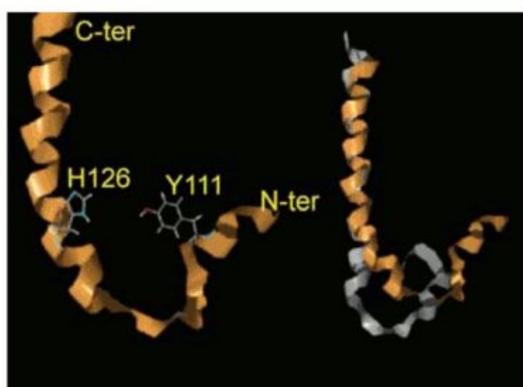
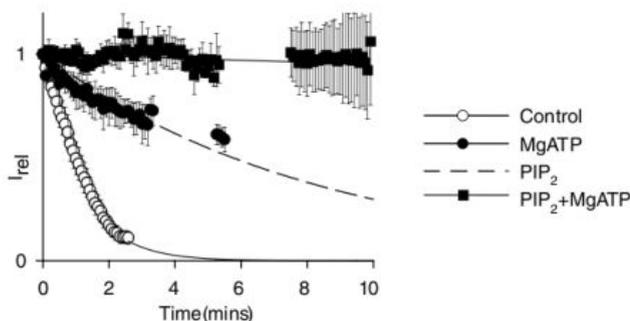


Figure 1. Ribbon structure diagram of the KCNQ1 structure in the N-terminal juxtamembranous domain, illustrating the potential effects of the L114P mutation on the structure of the trafficking determinant

The L114P mutation pulls apart Y111C from H126 located in the first transmembrane domain. The effect is highlighted in the cartoon on the right where WT KCNQ1 is shown in grey and L114P mutant in gold (see Material and Methods in Dahimene *et al.* 2006).

Figure 2. The effects of PIP₂ on KCNQ1–KCNE1 currents

Average time-dependent currents (I_{rel}) measured at the end of a 1 s depolarizing step to +40 mV relative to their maximum value measured after patch excision. Patches were excised in control solution (○, $n = 9$), control solution plus 1.4 mM MgATP (0.6 mM free Mg²⁺; ●, $n = 3$), control solution plus 5 mg ml⁻¹ PIP₂ (dashed line, $n = 5$), control solution plus 1.4 mM MgATP plus 5 mg ml⁻¹ PIP₂ (■, $n = 9$). (Figure adapted from Loussouarn *et al.* 2003; with permission.)



KCNQ4 A-domain tail, the authors proposed a new explanation. They were able to map these LQTS mutations onto equivalent positions in the KCNQ4 A-domain tail and observed that they formed a 'hotspot' at the surface of the A-domain tail, opposite to the association surface. As the G589D mutation was located in the middle of this 'hotspot' and was known to impair association with the regulatory protein kinase yotiao, the authors proposed that all these mutations act by a similar mechanism: they impair regulatory proteins to bind to the channel, suggesting that binding of accessory proteins in this region may be a mechanism of quality control for correctly assembled subunits.

In conclusion, these new data lead us to redefine the role of the A-domain in KCNQ1: its presence is necessary for tetramerization and for the channel to reach the plasma membrane; missense LQTS mutations in this domain do not prevent tetramerization but impair regulatory proteins in binding to the channel.

Example 3: Some mutations alter the channel voltage dependency through a reduced interaction with membrane PIP₂

Numerous mutations of KCNQ1 affecting cytosol facing arginine residues are involved in the LQTS. To date five of them have been functionally studied: R190Q, R243H, R533W, R539W and R555C (Chouabe *et al.* 1997, 2000) but the molecular mechanism was missing. We attempted to determine the molecular mechanism behind the alteration of the gating properties of KCNQ1 by mutated cytosolic arginines.

Previous studies have shown that several cytosolic basic residues are crucial for the regulation by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) of many Kir channels (Lopes *et al.* 2002; Logothetis *et al.* 2007) and several Kv channels such as HERG (Bian & McDonald, 2007) and KCNQ2–3 (Zhang *et al.* 2003). PIP₂ is a phospholipid present at the inner leaflet of the plasma membrane that is notably the precursor of the second messengers DAG and IP₃. Its effects on inwardly rectifying

potassium channels (Kir) are now well documented (Logothetis *et al.* 2007). Our hypothesis was thus that the loss of function of R243H, R539W and R555C can be explained by a modification of their regulation by PIP₂.

First, we characterized the PIP₂ regulation of KCNQ1–KCNE1 channel complexes contained in excised patches of COS-7 cells (Loussouarn *et al.* 2003). In that configuration, the PIP₂ concentration in the membrane decreases with time presumably because of an enhanced activity of phosphatases or phospholipases. This decrease is accompanied by a rundown of the maximal current that can be markedly slowed by cytosolic application of PIP₂ (and completely prevented by concomitant MgATP application, Fig. 2). These results emphasize the up-regulation of KCNQ1–KCNE1 by PIP₂. Minute analysis of the biophysical modifications induced by PIP₂ on KCNQ1–KCNE1 reveals a slowing of the deactivation kinetics and a shift toward negative potentials of the activation curve besides the increase in the maximal current. It is noteworthy that a decrease in the PIP₂ level has the same consequences on the channel biophysical properties as R243H, R539W and R555C mutations.

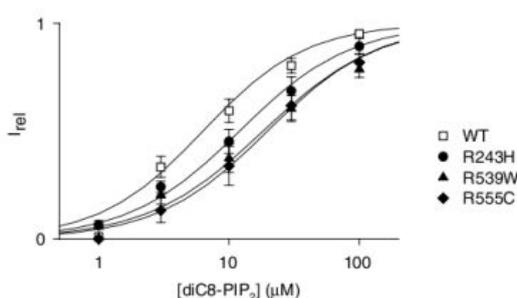


Figure 3. Dose–response relationship of the PIP₂ effects on WT and mutant KCNQ1–KCNE1 concatemer channels

Currents measured at the end of a 1 s depolarizing step to +80 mV relative to their maximum values extrapolated from a Hill fit. R243H, R539W and R555C mutants present a lower diC8-PIP₂ affinity than WT channels. (Figure adapted from Park *et al.* 2005; with permission.)



To establish that regulation by PIP₂ of the three KCNQ1 mutants is modified, we have compared the affinities for PIP₂ of WT and mutants (Park *et al.* 2005). It is impossible to control the membrane concentration of externally applied non-soluble PIP₂ and thus measure the dose-response of the channel but this can be overcome with the use of a short-chain soluble analogue: diC8-PIP₂ (Fig. 3). The measured response is the current amplitude after a 1 s depolarizing step to +80 mV in the presence of various concentrations of diC8-PIP₂ on an excised patch of transfected COS-7. The EC₅₀ value of diC8-PIP₂ for WT KCNQ1-KCNE1 is 10 μM. Mutant channels have a reduced affinity for diC8-PIP₂: 14 μM (R243H), 22 μM (R539W) and 23 μM (R555C). Hill coefficients are 1.3 for WT and close to 1 for mutant channels. Analysis of KCNQ2-KCNQ4 in the cell-attached mode indicates that the physiological membrane PIP₂ concentration would have equivalent effects as 23 μM diC8-PIP₂ intracellular solution in the inside-out configuration (Li *et al.* 2005), i.e. in the range of WT KCNQ1-KCNE1 sensitivity. KCNQ1-KCNE1 affinity is thus such that the channel seems likely to respond significantly to moderate physiological PIP₂ variations and that the activity of the mutants *in vivo* may be notably reduced compared with WT. However, firmly establishing these assumptions requires overcoming the difficulty of a dynamic quantification of the PIP₂ concentration in living cells (with fluorescent probes), and possibly to deal with the question of compartmentalization of both PIP₂ and channels in the plasma membrane (Gamper & Shapiro, 2007).

Arginine mutations were suspected to modify regulation by PIP₂ because cytosolic positive charges can bind PIP₂. Nevertheless, our experiments cannot distinguish allosteric effects from direct alterations of the PIP₂ binding site. In the case of R555C, a cytosolic application of methanethiosulphonate ethylammonium brings a positive charge on the residue and restores the channel activity as expected from a disrupted electrostatic interaction.

Insights into molecular mechanisms are also obtained by kinetic models. In the case of WT KCNQ1-KCNE1, the biophysical modifications due to PIP₂ loss and recovery can be fully taken into account by a kinetic model of the channel in which voltage-dependent transitions precede a final transition to the open state that is facilitated by PIP₂ (Loussouarn *et al.* 2003). Similarly to Kir channels (Enkvetchakul *et al.* 2000), PIP₂ would act on KCNQ1-KCNE1 by stabilizing the open state. Based on this model, the effects of mutations R539W and R555C can also be fully explained by a weaker stabilization of the open state (Park *et al.* 2005). In the case of R243H, the kinetic model suggests an additional change of its voltage-dependent transitions. This mutation may alter both the voltage sensing and the stabilization of the channel open state. R243 belongs to the linker between the 4th and

5th transmembrane domains whose interaction with the pore lining 6th transmembrane domain is supposed to be crucial for the voltage transduction (Long *et al.* 2005).

Weakening of the PIP₂ up-regulation of KCNQ1-KCNE1 seems likely to explain the modifications of the voltage-dependent gating of some LQT mutants. Already identified for Kir channels (Lopes *et al.* 2002), the regulation of channels by PIP₂ is thus revealed by our experiments as a relevant molecular explanation for KCNQ1 channelopathies.

References

- Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M & Romey G (1996). KvLQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I_{Ks} cardiac potassium current. *Nature* **384**, 78–80.
- Belloq C, van Ginneken AC, Bezzina CR, Alders M, Escande D, Mannens MM, Baro I & Wilde AA (2004). Mutation in the KCNQ1 gene leading to the short QT-interval syndrome. *Circulation* **109**, 2394–2397.
- Bendahhou S, Marionneau C, Haurogne K, Larroque MM, 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.
- Bian JS & McDonald TV (2007). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate interactions with the HERG K⁺ channel. *Pflugers Arch* **455**, 105–113.
- Chen YH, Xu SJ, Bendahhou S, Wang XL, Wang Y, Xu WY *et al.* (2003). KCNQ1 gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation. *Science* **299**, 251–254.
- Chouabe C, Neyroud N, Guicheney P, Lazdunski M, Romey G & Barhanin J (1997). Properties of KvLQT1 K⁺ channel mutations in Romano-Ward and Jervell and Lange-Nielsen inherited cardiac arrhythmias. *EMBO J* **16**, 5472–5479.
- Chouabe C, Neyroud N, Richard P, Denjoy I, Hainque B, Romey G, Drici MD, Guicheney P & Barhanin J (2000). Novel mutations in KvLQT1 that affect I_{Ks} activation through interactions with Isk. *Cardiovasc Res* **45**, 971–980.
- 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.
- Enkvetchakul D, Loussouarn G, Makhina E, Shyng SL & Nichols CG (2000). The kinetic and physical basis of K_{ATP} channel gating: toward a unified molecular understanding. *Biophys J* **78**, 2334–2348.
- Gamper N & Shapiro MS (2007). Target-specific PIP₂ signalling: how might it work? *J Physiol* **582**, 967–975.
- Howard RJ, Clark KA, Holton JM & Minor DL Jr (2007). Structural insight into KCNQ (Kv7) channel assembly and channelopathy. *Neuron* **53**, 663–675.
- Li Y, Gamper N, Hilgemann DW & Shapiro MS (2005). Regulation of Kv7 (KCNQ) K⁺ channel open probability by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Neurosci* **25**, 9825–9835.



- Logothetis DE, Jin T, Lupyan D & Rosenhouse-Dantsker A (2007). Phosphoinositide-mediated gating of inwardly rectifying K⁺ channels. *Pflugers Arch* **455**, 83–95.
- Long SB, Campbell EB & MacKinnon R (2005). Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* **309**, 897–903.
- Lopes CM, Zhang H, Rohacs T, Jin T, Yang J & Logothetis DE (2002). Alterations in conserved Kir channel-PIP₂ interactions underlie channelopathies. *Neuron* **34**, 933–944.
- Loussouarn G, Park KH, 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.
- Park KH, Piron J, Dahimene S, Merot J, Baro I, Escande D & Loussouarn G (2005). Impaired KCNQ1-KCNE1 and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate interaction underlies the long QT syndrome. *Circ Res* **96**, 730–739.
- Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A, Shen J, Spector PS, Atkinson DL & Keating MT (1996). Coassembly of K_vLQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I_{Ks} potassium channel. *Nature* **384**, 80–83.
- 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.
- Vohra J (2007). The long QT syndrome. *Heart Lung Circ* **16** (Suppl. 3), S5–S12.
- Zhang H, Craciun LC, Mirshahi T, Rohacs T, Lopes CM, Jin T & Logothetis DE (2003). PIP₂ activates KCNQ channels, and its hydrolysis underlies receptor-mediated inhibition of M currents. *Neuron* **37**, 963–975.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), from the Agence Nationale de Recherche to I.B. (ANR COD/A05045GS) and from Vaincre La Mucoviscidose to J.M. I.B., J.M. and G.L. are recipients of a tenure position supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). D.P. is supported by INSERM. N.R. is supported by the Agence Nationale de Recherche (ANR-05-JCJC-0160-01). F.C. is supported by the GenaVie Foundation and the GRRC (Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire).



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abi-CharJ, El-HaouS, BalseE, NeyroudN, VranckxR, CoulombeA & HatemSN.** The anchoring protein SAP97 retains Kv1.5 channels in the plasma membrane of cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2008, **294**, p. H1851-61.
- AbrielH.** Roles and regulation of the cardiac sodium channel Na(v)1.5: Recent insights from experimental studies. *Cardiovasc. Res.* 2007, **76**, p. 381-389.
- AbrielH & KassRS.** Regulation of the voltage-gated cardiac sodium channel Nav1.5 by interacting proteins. *Trends Cardiovasc. Med.* 2005, **15**, p. 35-40.
- AdamsJ.** The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treat. Rev.* 2003, **29 Suppl 1**, p. 3-9.
- AdamsJ, BehnkeM, ChenS, CruickshankAA, DickLR, GrenierL, KlunderJM, MaYT, PlamondonL & SteinRL.** Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1998, **8**, p. 333-338.
- AlderNN & JohnsonAE.** Cotranslational membrane protein biogenesis at the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 2004, **279**, p. 22787-22790.
- AltierC, DubelSJ, BarrèreC, JarvisSE, StotzSC, SpaetgensRL, ScottJD, CornetV, De WaardM, ZamponiGW, NargeotJ & BourinetE.** Trafficking of L-type calcium channels mediated by the postsynaptic scaffolding protein AKAP79. *J. Biol. Chem.* 2002, **277**, p. 33598-33603.
- AndersonCL, DelisleBP, AnsonBD, KilbyJA, WillML, TesterDJ, GongQ, ZhouZ, AckermanMJ & JanuaryCT.** Most LQT2 mutations reduce Kv11.1 (hERG) current by a class 2 (trafficking-deficient) mechanism. *Circulation.* 2006, **113**, p. 365-373.
- AnelliT & SitiaR.** Protein quality control in the early secretory pathway. *EMBO J.* 2008, **27**, p. 315-327.
- AngeloK, JespersenT, GrunnetM, NielsenMS, KlaerkeDA & OlesenS.** KCNE5 induces time- and voltage-dependent modulation of the KCNQ1 current. *Biophys. J.* 2002, **83**, p. 1997-2006.
- AntzelevitchC, PollevickGD, CordeiroJM, CasisO, SanguinettiMC, AizawaY, GuerchicoffA, PfeifferR, OlivaA, WollnikB, GelberP, BonarosEPJ, BurashnikovE, WuY, SargentJD, SchickelS, OberheidenR, BhatiaA, HsuL, HaïssaguerreM, SchimpfR, BorggrefeM & WolpertC.** 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.* 2007, **115**, p. 442-449.
- AridorM.** Visiting the ER: the endoplasmic reticulum as a target for therapeutics in traffic related diseases. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2007, **59**, p. 759-781.
- ArvanP, ZhaoX, Ramos-CastanedaJ & ChangA.** Secretory pathway quality control operating in Golgi, plasmalemmal, and endosomal systems. *Traffic.* 2002, **3**, p. 771-780.
- BabaS, DunW & BoydenPA.** Can PKA activators rescue Na⁺ channel function in epicardial border zone cells that survive in the infarcted canine heart?. *Cardiovasc. Res.* 2004, **64**, p. 260-267.
- BaiC, Namekatal, KurokawaJ, TanakaH, ShigenobuK & FurukawaT.** Role of nitric oxide in Ca²⁺ sensitivity of the slowly activating delayed rectifier K⁺ current in cardiac myocytes. *Circ. Res.* 2005, **96**, p. 64-72.
- Bardien-KrugerS, WulffH, ArieffZ, BrinkP, ChandyKG & CorfieldV.** Characterisation of the human voltage-gated potassium channel gene, KCNA7, a candidate gene for inherited cardiac disorders, and its exclusion as cause of progressive familial heart block I (PFHBI). *Eur. J. Hum. Genet.* 2002, **10**, p. 36-43.
- BarhaninJ, LesageF, GuillemareE, FinkM, LazdunskiM & RomeyG.** K(V)LQT1 and Isk (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature.* 1996, **384**, p. 78-80. **Cet article est le premier à montrer que KCNQ1 associé à KCNE1 produit le courant IKs. Avant, on pensait qu'IKs était du à KCNE1 seul.**
- BaysNW, GardnerRG, SeeligLP, JoazeiroCA & HamptonRY.** Hrd1p/Der3p is a membrane-anchored ubiquitin ligase required for ER-associated degradation. *Nat. Cell Biol.* 2001a, **3**, p. 24-29.
- BaysNW, WilhovskySK, GoradiaA, Hodgkiss-HarlowK & HamptonRY.** HRD4/NPL4 is required for the proteasomal processing of ubiquitinated ER proteins. *Mol. Biol. Cell.* 2001b, **12**, p. 4114-4128.

- BecamelC, AlonsoG, GaleottiN, DemeyE, JouinP, UllmerC, DumuisA, BockaertJ & MarinP.** Synaptic multiprotein complexes associated with 5-HT(2C) receptors: a proteomic approach. *EMBO J.* 2002, **21**, p. 2332-2342.
- BellocqC, van GinnekenACG, BezzinaCR, AldersM, EscandeD, MannensMMAM, BaróI & WildeAAM.** Mutation in the KCNQ1 gene leading to the short QT-interval syndrome. *Circulation.* 2004, **109**, p. 2394-2397.
- BendahhouS, MarionneauC, HaurogneK, LarroqueM, DerandR, SzutsV, EscandeD, DemolombeS & BarhaninJ.** In vitro molecular interactions and distribution of KCNE family with KCNQ1 in the human heart. *Cardiovasc. Res.* 2005, **67**, p. 529-538.
- BennettEJ, BenceNF, JayakumarR & KopitoRR.** Global impairment of the ubiquitin-proteasome system by nuclear or cytoplasmic protein aggregates precedes inclusion body formation. *Mol. Cell.* 2005, **17**, p. 351-365.
- BennettPB, YazawaK, MakitaN & GeorgeALJ.** Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia. *Nature.* 1995, **376**, p. 683-685.
- BerggårdT, LinseS & JamesP.** Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions. *Proteomics.* 2007, **7**, p. 2833-2842.
- BernalesS, McDonaldKL & WalterP.** Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS Biol.* 2006, **4**, p. e423.
- BersDM.** Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* 2002, **415**, p. 198-205.
- BleichM & WarthR.** The very small-conductance K⁺ channel KvLQT1 and epithelial function. *Pflugers Arch.* 2000, **440**, p. 202-206.
- BogyoM, McMasterJS, GaczynskaM, TortorellaD, GoldbergAL & PloeghH.** Covalent modification of the active site threonine of proteasomal beta subunits and the Escherichia coli homolog HslV by a new class of inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997, **94**, p. 6629-6634.
- BolinC & Cardozo-PelaezF.** Assessing biomarkers of oxidative stress: analysis of guanosine and oxidized guanosine nucleotide triphosphates by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2007, **856**, p. 121-130.
- BorggreffeM, WolpertC, AntzelevitchC, VeltmannC, GiustettoC, GaitaF & SchimpfR.** Short QT syndrome Genotype-phenotype correlations. *J Electrocardiol.* 2005, **38 Suppl**, p. 75-80.
- BouletIR, LabroAJ, RaesAL & SnydersDJ.** ROLE OF THE S6 C-TERMINUS IN KCNQ1 CHANNEL GATING. *J. Physiol. (Lond.).* 2007, **585**, p. 325-337.
- BouletIR, RaesAL, OttschytshN & SnydersDJ.** Functional effects of a KCNQ1 mutation associated with the long QT syndrome. *Cardiovasc. Res.* 2006, **70**, p. 466-474.
- BrinkPA, FerreiraA, MoolmanJC, WeymarHW, van der MerwePL & CorfieldVA.** Gene for progressive familial heart block type I maps to chromosome 19q13. *Circulation.* 1995, **91**, p. 1633-1640.
- BrugadaP & BrugadaJ.** Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1992, **20**, p. 1391-1396.
- BrugadaR, HongK, DumaineR, CordeiroJ, GaitaF, BorggreffeM, MenendezTM, BrugadaJ, PollevickGD, WolpertC, BurashnikovE, MatsuoK, WuYS, GuerchicoffA, BianchiF, GiustettoC, SchimpfR, BrugadaP & AntzelevitchC.** Sudden death associated with short-QT syndrome linked to mutations in HERG. *Circulation.* 2004, **109**, p. 30-35.
- BukauB, WeissmanJ & HorwichA.** Molecular chaperones and protein quality control. *Cell.* 2006, **125**, p. 443-451.
- CampomanesCR, CarrollKI, ManganasLN, HershbergerME, GongB, AntonucciDE, RhodesKJ & TrimmerJS.** Kv beta subunit oxidoreductase activity and Kv1 potassium channel trafficking. *J. Biol. Chem.* 2002, **277**, p. 8298-8305.
- CarameloJJ & ParodiAJ.** How sugars convey information on protein conformation in the endoplasmic reticulum. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2007, **18**, p. 732-742.
- Carey-Anne Eddy, Judith M MacCormick, Seo-Kyung Chung, Jackie R Crawford, Donald R Love, Mark I Rees, Jonathan R Skinner & Andrew N Shelling.** Identification of large gene deletions and duplications in KCNQ1 and KCNH2 in patients with long QT syndrome. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society.* 2008, **publié en ligne**.
- CarvalhoP, GoderV & RapoportTA.** Distinct ubiquitin-ligase complexes define convergent pathways

for the degradation of ER proteins. *Cell*. 2006, **126**, p. 361-373.

ChandrasekharKD, BasT & KobertzWR. KCNE1 subunits require co-assembly with K⁺ channels for efficient trafficking and cell surface expression. *J. Biol. Chem.* 2006, **281**, p. 40015-40023.

ChauhanVS, TuviaS, BuhusiM, BennettV & GrantAO. Abnormal cardiac Na⁽⁺⁾ channel properties and QT heart rate adaptation in neonatal ankyrin(B) knockout mice. *Circ. Res.* 2000, **86**, p. 441-447.

ChengSH, GregoryRJ, MarshallJ, PaulS, SouzaDW, WhiteGA, O'RiordanCR & SmithAE. Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell*. 1990, **63**, p. 827-834.

ChenL, KurokawaJ & KassR. Phosphorylation of the AKAP Yotiao contributes to PKA regulation of a heart potassium channel. *J. Biol. Chem.* 2005, **280**, p. 31347-31352.

ChenY, XuS, BendahhouS, WangX, WangY, XuW, JinH, SunH, SuX, ZhuangQ, YangY, LiY, LiuY, XuH, LiX, MaN, MouC, ChenZ, BarhaninJ & HuangW. KCNQ1 gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation. *Science*. 2003, **299**, p. 251-254.

ChiangCE & RodenDM. The long QT syndromes: genetic basis and clinical implications. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2000, **36**, p. 1-12.

Choe, Chi-un and Schulze-Bahr, Eric and Neu, Axel and Xu, Jun and Zhu, Zheng I. and Sauter, Kathrin and Bähring, Robert and Priori, Silvia and Guicheney, Pascale and Monnig, Gerold and Neapolitano, Carlo and Heidemann, Jan and Clancy, Colleen E. and Pongs, Olaf and Isbrandt, Dirk. C-terminal HERG (LQT2) mutations disrupt I-Kr channel regulation through 14-3-3 epsilon. *HUMAN MOLECULAR GENETICS*. 2006, **15**, p. 2888-2902.

Choo-KangLR & ZeitlinPL. Induction of HSP70 promotes DeltaF508 CFTR trafficking. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2001, **281**, p. L58-68.

ChouabeC, NeyroudN, GuicheneyP, LazdunskiM, RomeyG & BarhaninJ. Properties of KvLQT1 K⁺ channel mutations in Romano-Ward and Jervell and Lange-Nielsen inherited cardiac arrhythmias. *EMBO J.* 1997, **16**, p. 5472-5479.

ChouabeC, NeyroudN, RichardP, DenjoyI, HainqueB, RomeyG, DriciMD, GuicheneyP & BarhaninJ. Novel mutations in KvLQT1 that affect I_{Ks} activation through interactions with I_{sk}. *Cardiovasc. Res.* 2000, **45**, p. 971-980.

CiechanoverA. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005, **6**, p. 79-87. **Cette revue donne un historique de la compréhension de la dégradation des protéines.**

CiechanoverA. The ubiquitin proteolytic system: from a vague idea, through basic mechanisms, and onto human diseases and drug targeting. *Neurology*. 2006, **66**, p. S7-19.

CohenMB, MaybaumJ & SadeeW. Guanine nucleotide depletion and toxicity in mouse T lymphoma (S-49) cells. *J. Biol. Chem.* 1981, **256**, p. 8713-8717.

ColleyBS, BijuKC, VisegradyA, Campbells & FadoolDA. Neurotrophin B receptor kinase increases Kv subfamily member 1.3 (Kv1.3) ion channel half-life and surface expression. *Neuroscience*. 2007, **144**, p. 531-546.

Cormet-BoyakaE, JablonskyM, NarenAP, JacksonPL, MuccioDD & KirkKL. Rescuing cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)-processing mutants by transcomplementation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004, **101**, p. 8221-8226.

CusdinFS, ClareJJ & JacksonAP. Trafficking and cellular distribution of voltage-gated sodium channels. *Traffic*. 2008, **9**, p. 17-26.

Czirjak, Gabor and Vuity, Drazsen and Enyedi, Peter. Phosphorylation-dependent binding of 14-3-3 proteins controls TRESK regulation. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 2008, **283**, p. 15672-15680.

DahimèneS, AlcoléaS, NaudP, JourdonP, EscandeD, BrasseurR, ThomasA, Baról & MérotJ. The N-terminal juxtamembranous domain of KCNQ1 is critical for channel surface expression: implications in the Romano-Ward LQT1 syndrome. *Circ. Res.* 2006, **99**, p. 1076-1083.

DalakasMC, ParkKY, Semino-MoraC, LeeHS, SivakumarK & GoldfarbLG. Desmin myopathy, a skeletal myopathy with cardiomyopathy caused by mutations in the desmin gene. *N. Engl. J. Med.* 2000, **342**, p. 770-780.

DarbarD, KannankerilPJ, DonahueBS, KuceraG, StubblefieldT, HainesJL, GeorgeALJ & RodenDM. Cardiac sodium channel (SCN5A) variants associated with atrial fibrillation. *Circulation*. 2008, **117**, p. 1927-1935.

De KeukeleireB, MicoudJ, BiardJ & BenharougaM. Endoplasmic reticulum-associated degradation of mutant CFTR requires a guanine nucleotide-sensitive step. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2008, **40**, p. 1729-1742.

DealKK, LovingerDM & TamkunMM. The brain Kv1.1 potassium channel: in vitro and in vivo studies on subunit assembly and posttranslational processing. *J. Neurosci.* 1994, **14**, p. 1666-1676.

DebonnevilleC, FloresSY, KamyninaE, PlantPJ, TauxeC, ThomasMA, MünsterC, ChraïbiA, PrattJH, HorisbergerJD, PearceD, LoffingJ & StaubO. Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na(+) channel cell surface expression. *EMBO J.* 2001, **20**, p. 7052-7059.

DelahuntyC & YatesJR3. Protein identification using 2D-LC-MS/MS. *Methods.* 2005, **35**, p. 248-255.

DelisleBP, AnsonBD, RajamaniS & JanuaryCT. Biology of cardiac arrhythmias: ion channel protein trafficking. *Circ. Res.* 2004, **94**, p. 1418-1428.

DemolombeS, Barol, PereaY, BliedJ, Mohammad-PanahR, PollardH, MoridS, MannensM, WildeA, BarhaninJ, CharpentierF & EscandeD. A dominant negative isoform of the long QT syndrome 1 gene product. *J. Biol. Chem.* 1998, **273**, p. 6837-6843.

DenningGM, AndersonMP, AmaraJF, MarshallJ, SmithAE & WelshMJ. Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature.* 1992, **358**, p. 761-764.

DeschênesI, NeyroudN, DiSilvestreD, MarbánE, YueDT & TomaselliGF. Isoform-specific modulation of voltage-gated Na(+) channels by calmodulin. *Circ. Res.* 2002, **90**, p. E49-57.

DeutschC. The birth of a channel. *Neuron.* 2003, **40**, p. 265-276. *Cette revue décrit les étapes clefs dans la synthèse d'un canal ionique.*

DickLR, CruikshankAA, GrenierL, MelandriFD, NunesSL & SteinRL. Mechanistic studies on the inactivation of the proteasome by lactacystin: a central role for clasto-lactacystin beta-lactone. *J. Biol. Chem.* 1996, **271**, p. 7273-7276.

DiFrancescoD & BorerJS. The funny current: cellular basis for the control of heart rate. *Drugs.* 2007, **67 Suppl 2**, p. 15-24.

DoH, FalconeD, LinJ, AndrewsDW & JohnsonAE. The cotranslational integration of membrane proteins into the phospholipid bilayer is a multistep process. *Cell.* 1996, **85**, p. 369-378.

DonosoG, HerzogV & SchmitzA. Misfolded BiP is degraded by a proteasome-independent endoplasmic-reticulum-associated degradation pathway. *Biochem. J.* 2005, **387**, p. 897-903.

EhrlichJR, ZichaS, CoutuP, HebertTE & NattelS. Atrial fibrillation-associated minK38G/S polymorphism modulates delayed rectifier current and membrane localization. *Cardiovasc. Res.* 2005, **67**, p. 520-528.

EllinorPT, ShinJT, MooreRK, YoergerDM & MacRaeCA. Locus for atrial fibrillation maps to chromosome 6q14-16. *Circulation.* 2003, **107**, p. 2880-2883.

ElsasserS & FinleyD. Delivery of ubiquitinated substrates to protein-unfolding machines. *Nat. Cell Biol.* 2005, **7**, p. 742-749.

EtlingerJD & GoldbergAL. A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1977, **74**, p. 54-58.

FagioliC, MezghraniA & SitiaR. Reduction of interchain disulfide bonds precedes the dislocation of Ig-mu chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol for proteasomal degradation. *J. Biol. Chem.* 2001, **276**, p. 40962-40967.

FarinhaCM & AmaralMD. Most F508del-CFTR is targeted to degradation at an early folding checkpoint and independently of calnexin. *Mol. Cell. Biol.* 2005, **25**, p. 5242-5252.

FenteanyG & SchreiberSL. Lactacystin, proteasome function, and cell fate. *J. Biol. Chem.* 1998, **273**, p. 8545-8548.

FenteanyG, StandaertRF, LaneWS, ChoiS, CoreyEJ & SchreiberSL. Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science.* 1995, **268**, p. 726-731.

FickerE, DennisAT, WangL & BrownAM. Role of the cytosolic chaperones Hsp70 and Hsp90 in maturation of the cardiac potassium channel HERG. *Circ. Res.* 2003, **92**, p. e87-100.

FickerE, ThomasD, ViswanathanPC, DennisAT, PrioriSG, NapolitanoC, MemmiM, WibleBA, KaufmanES, IyengarS, SchwartzPJ, RudyY & BrownAM. Novel characteristics of a misprocessed mutant HERG channel linked to hereditary long QT syndrome. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2000, **279**, p. H1748-56.

- FiebigerE, StoryC, PloeghHL & TortorellaD.** Visualization of the ER-to-cytosol dislocation reaction of a type I membrane protein. *EMBO J.* 2002, **21**, p. 1041-1053.
- FieldsS & SongO.** A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature.* 1989, **340**, p. 245-246.
- FiskeJL, FominVP, BrownML, DuncanRL & SikesRA.** Voltage-sensitive ion channels and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2006, **25**, p. 493-500.
- FraA & SitiaR.** The endoplasmic reticulum as a site of protein degradation. *Subcell. Biochem.* 1993, **21**, p. 143-168.
- FreemanLC & KassRS.** Expression of a minimal K⁺ channel protein in mammalian cells and immunolocalization in guinea pig heart. *Circ. Res.* 1993, **73**, p. 968-973.
- FujitaE, KourokuY, IsoaiA, KumagaiH, MisutaniA, MatsudaC, HayashiYK & MomoiT.** Two endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) systems for the novel variant of the mutant dysferlin: ubiquitin/proteasome ERAD(I) and autophagy/lysosome ERAD(II). *Hum. Mol. Genet.* 2007, **16**, p. 618-629.
- FurutaniM, TrudeauMC, HagiwaraN, SekiA, GongQ, ZhouZ, ImamuraS, NagashimaH, KasanukiH, TakaoA, MommaK, JanuaryCT, RobertsonGA & MatsuokaR.** Novel mechanism associated with an inherited cardiac arrhythmia: defective protein trafficking by the mutant HERG (G601S) potassium channel. *Circulation.* 1999, **99**, p. 2290-2294.
- GaoY, ChotooCK, BalutCM, SunF, BaileyMA & DevorDC.** Role of S3 and S4 transmembrane domain charged amino acids in channel biogenesis and gating of KCa2.3 and KCa3.1. *J. Biol. Chem.* 2008, **283**, p. 9049-9059.
- GavilletB, RougierJ, Domenighetta, BeharR, BoixelC, RuchatP, LehrH, PedrazziniT & AbrielH.** Cardiac Sodium Channel Nav1.5 Is Regulated by a Multiprotein Complex Composed of Syntrophins and Dystrophin. *Circ. Res.* 2006, **99**, p. 407-414.
- GekkoK & TimasheffSN.** Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures. *Biochemistry.* 1981, **20**, p. 4667-4676.
- GellensME, GeorgeALJ, ChenLQ, ChahineM, HornR, BarchiRL & KallenRG.** Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992, **89**, p. 554-558.
- GelmanMS, KannegaardES & KopitoRR.** A principal role for the proteasome in endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded intracellular cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* 2002, **277**, p. 11709-11714.
- GeorgeALJ, VarkonyTA, DrabkinHA, HanJ, KnopsJF, FinleyWH, BrownGB, WardDC & HaasM.** Assignment of the human heart tetrodotoxin-resistant voltage-gated Na⁺ channel alpha-subunit gene (SCN5A) to band 3p21. *Cytogenet. Cell Genet.* 1995, **68**, p. 67-70.
- GhoshS, NunziatoDA & PittGS.** KCNQ1 assembly and function is blocked by long-QT syndrome mutations that disrupt interaction with calmodulin. *Circ. Res.* 2006, **98**, p. 1048-1054.
- GlickmanMH & CiechanoverA.** The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* 2002, **82**, p. 373-428.
- GongQ, AndersonCL, JanuaryCT & ZhouZ.** Pharmacological rescue of trafficking defective HERG channels formed by coassembly of wild-type and long QT mutant N470D subunits. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2004, **287**, p. H652-8.
- GongQ, JonesMA & ZhouZ.** Mechanisms of pharmacological rescue of trafficking-defective hERG mutant channels in human long QT syndrome. *J. Biol. Chem.* 2006, **281**, p. 4069-4074.
- GongQ, KeeneyDR, MolinariM & ZhouZ.** Degradation of trafficking-defective long QT syndrome type II mutant channels by the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 2005, **280**, p. 19419-19425.
- GrahammerF, HerlingAW, LangHJ, Schmitt-Graffa, WittekindtOH, NitschkeR, BleichM, BarhaninJ & WarthR.** The cardiac K⁺ channel KCNQ1 is essential for gastric acid secretion. *Gastroenterology.* 2001, **120**, p. 1363-1371.
- GrollM, Ditzell, LöweJ, StockD, BochtlerM, BartunikHD & HuberR.** Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature.* 1997, **386**, p. 463-471.
- GrollM, HeinemeyerW, JägerS, UllrichT, BochtlerM, WolfDH & HuberR.** The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999, **96**, p. 10976-10983.
- GrunnetM, JespersenT, RasmussenHB, LjungstromT, JorgensenNK, OlesenS & KiaerkeDA.**

KCNE4 is an inhibitory subunit to the KCNQ1 channel. *J. Physiol. (Lond.)*. 2002, **542**, p. 119-130.

GuizeL, ThomasF, BeanK, BenetosA & PannierB. [Atrial fibrillation: prevalence, risk factors and mortality in a large French population with 15 years of follow-up]. *Bull. Acad. Natl. Med.* 2007, **191**, p. 791-803; discussion 803-5.

Gussaki, BrugadaP, BrugadaJ, WrightRS, KopeckySL, ChaitmanBR & BjerregaardP. Idiopathic short QT interval: a new clinical syndrome?. *Cardiology*. 2000, **94**, p. 99-102.

GygiSP, RistB, GerberSA, TurecekF, GelbMH & AebersoldR. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat. Biotechnol.* 1999, **17**, p. 994-999.

HalicM & BeckmannR. The signal recognition particle and its interactions during protein targeting. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2005, **15**, p. 116-125.

HallaqH, YangZ, ViswanathanP, FukudaK, ShenW, WangD, WellsK, ZhouJ, YiJ & MurrayK. Quantitation of protein kinase A-mediated trafficking of cardiac sodium channels in living cells. *Cardiovasc. Res.* 2006a, **72**, p. 250-261.

HallaqH, YangZ, ViswanathanPC, FukudaK, ShenW, WangDW, WellsKS, ZhouJ, YiJ & MurrayKT. Quantitation of protein kinase A-mediated trafficking of cardiac sodium channels in living cells. *Cardiovasc. Res.* 2006b, **72**, p. 250-261.

HallMCS & ToddDM. Modern management of arrhythmias. *Postgrad Med J.* 2006, **82**, p. 117-125.

HamadaH, SuzukiM, YuasaS, MimuraN, ShinozukaN, TakadaY, SuzukiM, NishinoT, NakayaH, KosekiH & AoeT. Dilated cardiomyopathy caused by aberrant endoplasmic reticulum quality control in mutant KDEL receptor transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.* 2004, **24**, p. 8007-8017.

HammanBD, ChenJC, JohnsonEE & JohnsonAE. The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40-60 Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane. *Cell*. 1997, **89**, p. 535-544.

HaynesCM, CaldwellS & CooperAA. An HRD/DER-independent ER quality control mechanism involves Rsp5p-dependent ubiquitination and ER-Golgi transport. *J. Cell Biol.* 2002, **158**, p. 91-101.

HedaGD, TanwaniM & MarinoCR. The Delta F508 mutation shortens the biochemical half-life of plasma membrane CFTR in polarized epithelial cells. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 2001, **280**, p. C166-74.

HegdeNR, ChevalierMS, WisnerTW, DentonMC, ShireK, FrappierL & JohnsonDC. The role of BiP in endoplasmic reticulum-associated degradation of major histocompatibility complex class I heavy chain induced by cytomegalovirus proteins. *J. Biol. Chem.* 2006, **281**, p. 20910-20919.

HeleniusA & AebiM. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* 2004, **73**, p. 1019-1049.

HerbertE, Trusz-Gluzam, MoriceE, Smilowska-DzielickaE, MazurekU & WilczokT. KCNQ1 gene mutations and the respective genotype-phenotype correlations in the long QT syndrome. *Med. Sci. Monit.* 2002, **8**, p. RA240-8.

HirschC, BlomD & PloeghHL. A role for N-glycanase in the cytosolic turnover of glycoproteins. *EMBO J.* 2003, **22**, p. 1036-1046.

HowardRJ, ClarkKA, HoltonJM & MinorDLJ. Structural Insight into KCNQ (Kv7) Channel Assembly and Channelopathy. *Neuron*. 2007, **53**, p. 663-675.

HuangX, HetfeldBKJ, SeifertU, KähneT, KloetzelP, NaumannM, Bech-OtschirD & DubielW. Consequences of COP9 signalosome and 26S proteasome interaction. *FEBS J.* 2005, **272**, p. 3909-3917.

IkrarT, HanawaH, WatanabeH, OkadaS, AizawaY, RamadanMM, KomuraS, YamashitaF, ChinushiM & AizawaY. A double-point mutation in the selectivity filter site of the KCNQ1 potassium channel results in a severe phenotype, LQT1, of long QT syndrome. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 2008, **19**, p. 541-549.

ImaiY, SodaM, HatakeyamaS, AkagiT, HashikawaT, NakayamaKI & TakahashiR. CHIP is associated with Parkin, a gene responsible for familial Parkinson's disease, and enhances its ubiquitin ligase activity. *Mol. Cell.* 2002, **10**, p. 55-67.

IyerK, BurkleL, AuerbachD, ThaminyS, DinkelM, EngelsK & StagljarI. Utilizing the split-ubiquitin membrane yeast two-hybrid system to identify protein-protein interactions of integral membrane proteins. *Sci. STKE*. 2005, **2005**, p. pl3.

IwawakiT, AkaiR, KohnoK & MiuraM. A transgenic mouse model for monitoring endoplasmic reticulum stress. *Nat. Med.* 2004, **10**, p. 98-102.

JaroschE, TaxisC, VolkweinC, BordalloJ, FinleyD, WolfDH & SommerT. Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48. *Nat. Cell Biol.* 2002, **4**, p. 134-139.

JensenTJ, LooMA, PindS, WilliamsDB, GoldbergAL & RiordanJR. Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing. *Cell.* 1995, **83**, p. 129-135.

JERVELLA & LANGE-NIELSENF. Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval and sudden death. *Am. Heart J.* 1957, **54**, p. 59-68. **Première description d'une forme familiale de syndrome du QT long.**

JespersenT, GrunnetM & OlesenS. The KCNQ1 potassium channel: from gene to physiological function. *Physiology (Bethesda).* 2005, **20**, p. 408-416.

JespersenT, MembrezM, NicolasCS, PitardB, StaubO, OlesenS, Baról & AbrielH. The KCNQ1 potassium channel is down-regulated by ubiquitylating enzymes of the Nedd4/Nedd4-like family. *Cardiovasc. Res.* 2007, **74**, p. 64-74.

JiangY, RutaV, ChenJ, LeeA & MacKinnonR. The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature.* 2003, **423**, p. 42-48.

JohnsonLG, OlsenJC, SarkadiB, MooreKL, SwanstromR & BoucherRC. Efficiency of gene transfer for restoration of normal airway epithelial function in cystic fibrosis. *Nat. Genet.* 1992, **2**, p. 21-25.

JohnssonN & VarshavskyA. Ubiquitin-assisted dissection of protein transport across membranes. *EMBO J.* 1994, **13**, p. 2686-2698.

JohnstonJA, WardCL & KopitoRR. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J. Cell Biol.* 1998, **143**, p. 1883-1898.

JonesHM, HamiltonKL, PapworthGD, SymeCA, WatkinsSC, BradburyNA & DevorDC. Role of the NH2 terminus in the assembly and trafficking of the intermediate conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel hK1. *J. Biol. Chem.* 2004, **279**, p. 15531-15540.

KaganA, YuZ, FishmanGI & McDonaldTV. The dominant negative LQT2 mutation A561V reduces wild-type HERG expression. *J. Biol. Chem.* 2000, **275**, p. 11241-11248.

KaliesK, AllanS, SergeenkoT, KrögerH & RömischK. The protein translocation channel binds proteasomes to the endoplasmic reticulum membrane. *EMBO J.* 2005, **24**, p. 2284-2293.

KangC, TianC, SönnichsenFD, SmithJA, MeilerJ, GeorgeALJ, VanoyeCG, KimHJ & SandersCR. Structure of KCNE1 and Implications for How It Modulates the KCNQ1 Potassium Channel. *Biochemistry.* 2008, **Publié en ligne**, .

KankiH, KupersmidtS, YangT, WellsS & RodenDM. A structural requirement for processing the cardiac K⁺ channel KCNQ1. *J. Biol. Chem.* 2004, **279**, p. 33976-33983.

KantersJ, FanoesS, LarsenL, BlochTP, ToftE & ChristiansenM. T wave morphology analysis distinguishes between KvLQT1 and HERG mutations in long QT syndrome. *Heart Rhythm.* 2004, **1**, p. 285-292.

KartnerN, AugustinasO, JensenTJ, NaismithAL & RiordanJR. Mislocalization of delta F508 CFTR in cystic fibrosis sweat gland. *Nat. Genet.* 1992, **1**, p. 321-327.

KeatingM, AtkinsonD, DunnC, TimothyK, VincentGM & LeppertM. Linkage of a cardiac arrhythmia, the long QT syndrome, and the Harvey ras-1 gene. *Science.* 1991, **252**, p. 704-706.

KeatingMT & SanguinettiMC. Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell.* 2001, **104**, p. 569-580.

KellerSH, PlatoshynO & YuanJX. Long QT Syndrome-Associated I593R Mutation in HERG Potassium Channel Activates ER Stress Pathways. *Cell Biochem. Biophys.* 2005, **43**, p. 365-378.

KhositsethA, TesterDJ, WillML, BellCM & AckermanMJ. Identification of a common genetic substrate underlying postpartum cardiac events in congenital long QT syndrome. *Heart Rhythm.* 2004, **1**, p. 60-64.

KisselevAF, AkopianTN, WooKM & GoldbergAL. The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J. Biol. Chem.* 1999, **274**, p. 3363-3371.

KlugerR & AlagicA. Chemical cross-linking and protein-protein interactions-a review with illustrative protocols. *Bioorg. Chem.* 2004, **32**, p. 451-472.

KoopmannTT, AldersM, JongbloedRJ, GuerreroS, MannensMMAM, WildeAAM & BezzinaCR. Long QT syndrome caused by a large duplication in the KCNH2 (HERG) gene undetectable by current polymerase chain reaction-based exon-scanning methodologies. *Heart Rhythm.* 2006, **3**, p. 52-55.

- KopitoRR.** Biosynthesis and degradation of CFTR. *Physiol. Rev.* 1999, **79**, p. S167-73.
- KopitoRR.** Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol.* 2000, **10**, p. 524-530.
- KrauseF.** Detection and analysis of protein-protein interactions in organellar and prokaryotic proteomes by native gel electrophoresis: (Membrane) protein complexes and supercomplexes. *Electrophoresis.* 2006, **27**, p. 2759-2781.
- KrumermanA, GaoX, BianJ, MelmanYF, KaganA & McDonaldTV.** An LQT mutant minK alters KvLQT1 trafficking. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 2004, **286**, p. C1453-63.
- KunjilwarK, StrangC, DeRubeisD & PfaffingerPJ.** KChIP3 rescues the functional expression of Shal channel tetramerization mutants. *J. Biol. Chem.* 2004, **279**, p. 54542-54551.
- KurodaK, KatoM, MimaJ & UedaM.** Systems for the detection and analysis of protein-protein interactions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006, **71**, p. 127-136.
- LaiL, SuM, YehH, LinJ, ChiangF, HwangJ, HsuK, TsengC, LienW, TsengY & HuangSKS.** Association of the human minK gene 38G allele with atrial fibrillation: evidence of possible genetic control on the pathogenesis of atrial fibrillation. *Am. Heart J.* 2002, **144**, p. 485-490.
- LederkremerGZ & GlickmanMH.** A window of opportunity: timing protein degradation by trimming of sugars and ubiquitins. *Trends Biochem. Sci.* 2005, **30**, p. 297-303.
- LeeS, LeeA, ChenJ & MacKinnonR.** Structure of the KvAP voltage-dependent K⁺ channel and its dependence on the lipid membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005, **102**, p. 15441-15446.
- LemailletG, WalkerB & LambertS.** Identification of a conserved ankyrin-binding motif in the family of sodium channel alpha subunits. *J. Biol. Chem.* 2003, **278**, p. 27333-27339.
- LeonoudakisD, ContiLR, AndersonS, RadekeCM, McGuireLMM, AdamsME, FroehnerSC, YatesJR3 & VandenbergCA.** Protein trafficking and anchoring complexes revealed by proteomic analysis of inward rectifier potassium channel (Kir2.x)-associated proteins. *J. Biol. Chem.* 2004, **279**, p. 22331-22346.
- LeonoudakisD, MailliardW, WingerdK, CleggD & VandenbergC.** Inward rectifier potassium channel Kir2.2 is associated with synapse-associated protein SAP97. *J. Cell. Sci.* 2001, **114**, p. 987-998.
- LesageF, AttaliB, LakeyJ, HonoréE, RomeyG, FaurobertE, LazdunskiM & BarhaninJ.** Are Xenopus oocytes unique in displaying functional IsK channel heterologous expression?. *Recept. Channels.* 1993, **1**, p. 143-152.
- Li, Yong and Wu, Yuying and Zhou, Yi.** Modulation of inactivation properties of Ca(v)2.2 channels by 14-3-3 proteins. *NEURON.* 2006, **51**, p. 755-771.
- LiaoT, WangL, HalmS, LuL, FyffeR & HalmD.** The K⁺channel KvLQT (Kcnq1) located in the basolateral membrane of distal colonic epithelium is not essential for activating Cl⁻ secretion. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 2005, **289**, p. C564-75.
- LilleyBN & PloeghHL.** A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature.* 2004, **429**, p. 834-840. **Premier article à proposer que Derlin-1 forme le canal de rétrotranslocation.**
- LilleyBN & PloeghHL.** Multiprotein complexes that link dislocation, ubiquitination, and extraction of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005, **102**, p. 14296-14301.
- LiM, JanYN & JanLY.** Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel. *Science.* 1992, **257**, p. 1225-1230.
- LipsonC, AlaloufG, BajorekM, RabinovichE, Atir-LandeA, GlickmanM & Bar-NunS.** A Proteasomal ATPase Contributes to Dislocation of Endoplasmic Reticulum-associated Degradation (ERAD) Substrates. *J. Biol. Chem.* 2008, **283**, p. 7166-7175.
- LiuC, Dib-HajjSD, RenganathanM, CumminsTR & WaxmanSG.** Modulation of the cardiac sodium channel Nav1.5 by fibroblast growth factor homologous factor 1B. *J. Biol. Chem.* 2003, **278**, p. 1029-1036.
- LiuJ, ChenQ, HuangW, HorakKM, ZhengH, MestriIR & WangX.** Impairment of the ubiquitin-proteasome system in desminopathy mouse hearts. *FASEB J.* 2006, **20**, p. 362-364.
- LohrmannE, Burhoffl, NitschkeRB, LangHJ, ManiaD, EnglertHC, HropotM, WarthR, RohmW, BleichM & et al.** A new class of inhibitors of cAMP-mediated Cl⁻ secretion in rabbit colon, acting by the reduction of cAMP-activated K⁺ conductance. *Pflugers Arch.* 1995, **429**, p. 517-530.
- LondonB, MichalecM, MehdiH, ZhuX, KerchnerL, SanyalS, ViswanathanPC, PfahnIAE, ShangLL,**

MadhusudananM, BatyCJ, LaganaS, AleongR, GutmannR, AckermanMJ, McNamaraDM, WeissR & DudleySCJ. Mutation in glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like gene (GPD1-L) decreases cardiac Na⁺ current and causes inherited arrhythmias. *Circulation*. 2007, **116**, p. 2260-2268.

Looma, JensenTJ, CuiL, HouY, ChangXB & RiordanJR. Perturbation of Hsp90 interaction with nascent CFTR prevents its maturation and accelerates its degradation by the proteasome. *EMBO J*. 1998, **17**, p. 6879-6887.

LooTW, BartlettMC & ClarkeDM. Rescue of folding defects in ABC transporters using pharmacological chaperones. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2005, **37**, p. 501-507.

LooTW, BartlettMC & ClarkeDM. Correctors promote folding of the CFTR in the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* 2008, **413**, p. 29-36.

LoussouarnG, CharpentierF, Mohammad-PanahR, KunzelmannK, Baról & EscandeD. KvLQT1 potassium channel but not IsK is the molecular target for trans-6-cyano-4-(N-ethylsulfonyl-N-methylamino)-3-hydroxy-2,2-dimethyl- chromane. *Mol. Pharmacol.* 1997, **52**, p. 1131-1136.

LoussouarnG, ParkK, BellocqC, Baról, CharpentierF & EscandeD. 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*. 2003, **22**, p. 5412-5421.

LuJ, RobinsonJM, EdwardsD & DeutschC. T1-T1 interactions occur in ER membranes while nascent Kv peptides are still attached to ribosomes. *Biochemistry*. 2001, **40**, p. 10934-10946.

LundbyA, RavnLS, SvendsenJH, HaunsS, OlesenS & SchmittN. KCNE3 mutation V17M identified in a patient with lone atrial fibrillation. *Cell. Physiol. Biochem.* 2008, **21**, p. 47-54.

LundbyA, RavnLS, SvendsenJH, OlesenS & SchmittN. KCNQ1 mutation Q147R is associated with atrial fibrillation and prolonged QT interval. *Heart Rhythm*. 2007, **4**, p. 1532-1541.

MaD, ZerangueN, LinYF, CollinsA, YuM, JanYN & JanLY. Role of ER export signals in controlling surface potassium channel numbers. *Science*. 2001, **291**, p. 316-319.

MaierSKG, WestenbroekRE, McCormickKA, CurtisR, ScheuerT & CatterallWA. Distinct subcellular localization of different sodium channel alpha and beta subunits in single ventricular myocytes from mouse heart. *Circulation*. 2004, **109**, p. 1421-1427.

MakridesSC. Strategies for achieving high-level expression of genes in Escherichia coli. *Microbiol. Rev.* 1996, **60**, p. 512-538.

MallM, WissnerA, SchreiberR, KuehrJ, SeydewitzHH, BrandisM, GregerR & KunzelmannK. Role of K(V)LQT1 in cyclic adenosine monophosphate-mediated Cl⁻ secretion in human airway epithelia. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2000, **23**, p. 283-289.

ManciniR, AebiM & HeleniusA. Multiple endoplasmic reticulum-associated pathways degrade mutant yeast carboxypeptidase Y in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 2003, **278**, p. 46895-46905.

ManderfieldLJ & GeorgeALJ. KCNE4 can co-associate with the I(Ks) (KCNQ1-KCNE1) channel complex. *FEBS J*. 2008, **275**, p. 1336-1349.

MarxSO, KurokawaJ, ReikenS, MotoikeH, D'ArmientoJ, MarksAR & KassRS. Requirement of a macromolecular signaling complex for beta adrenergic receptor modulation of the KCNQ1-KCNE1 potassium channel. *Science*. 2002, **295**, p. 496-499.

MayerTU, BraunT & JentschS. Role of the proteasome in membrane extraction of a short-lived ER-transmembrane protein. *EMBO J*. 1998, **17**, p. 3251-3257.

MazzoneA, StregePR, TesterDJ, BernardCE, FaulknerG, De GiorgioR, MakielskiJC, StanghelliniV, GibbonsSJ, AckermanMJ & FarrugiaG. A mutation in telethonin alters Nav1.5 function. *J. Biol. Chem.* 2008, **283**, p. 16537-16544.

McCrackenAA & BrodskyJL. Assembly of ER-associated protein degradation in vitro: dependence on cytosol, calnexin, and ATP. *J. Cell Biol.* 1996, **132**, p. 291-298. **Premier article dans lequel le terme ERAD est utilisé.**

MeachamGC, PattersonC, ZhangW, YoungerJM & CyrDM. The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat. Cell Biol.* 2001, **3**, p. 100-105.

Medeiros-DomingoA, KakuT, TesterDJ, Iturralde-TorresP, IttyA, YeB, ValdiviaC, UedaK, Canizales-QuinterosS, Tusié-LunaMT, MakielskiJC & AckermanMJ. SCN4B-encoded sodium channel beta4 subunit in congenital long-QT syndrome. *Circulation*. 2007, **116**, p. 134-142.

MelmanYF, KrummermanA & McDonaldTV. KCNE regulation of KvLQT1 channels: structure-function correlates. *Trends Cardiovasc. Med.* 2002, **12**, p. 182-187.

MelmanYF, UmSY, KrummermanA, KaganA & McDonaldTV. KCNE1 binds to the KCNQ1 pore to

regulate potassium channel activity. *Neuron*. 2004, **42**, p. 927-937.

MeusserB, HirschC, JaroschE & SommerT. ERAD: the long road to destruction. *Nat. Cell Biol.* 2005, **7**, p. 766-772.

MeyerHH, WangY & WarrenG. Direct binding of ubiquitin conjugates by the mammalian p97 adaptor complexes, p47 and Ufd1-Npl4. *EMBO J.* 2002, **21**, p. 5645-5652.

MezghraniA, MonteilA, WatschingerK, Sinnegger-BraunsMJ, BarrèreC, BourinetE, NargeotJ, StriessnigJ & LoryP. A destructive interaction mechanism accounts for dominant-negative effects of misfolded mutants of voltage-gated calcium channels. *J. Neurosci.* 2008, **28**, p. 4501-4511.

MiernykJA & ThelenJJ. Biochemical approaches for discovering protein-protein interactions. *Plant J.* 2008, **53**, p. 597-609.

MillatG, ChevalierP, Restier-MironL, Da CostaA, BouvagnetP, KugenerB, FayolL, Gonzalez ArmengodC, OddouB, ChanavatV, FroidefondE, PerraudinR, RoussonR & Rodriguez-LafresseC. Spectrum of pathogenic mutations and associated polymorphisms in a cohort of 44 unrelated patients with long QT syndrome. *Clin. Genet.* 2006, **70**, p. 214-227.

MohlerPJ, RivoltaI, NapolitanoC, LeMailletG, LambertS, PrioriSG & BennettV. Nav1.5 E1053K mutation causing Brugada syndrome blocks binding to ankyrin-G and expression of Nav1.5 on the surface of cardiomyocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004, **101**, p. 17533-17538.

MohlerPJ, SchottJ, GramoliniAO, DillyKW, GuatimosimS, duBellWH, SongL, HaurognéK, KyndtF, AliME, RogersTB, LedererWJ, EscandeD, Le MarecH & BennettV. Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature*. 2003, **421**, p. 634-639.

MolinariM, CalancaV, GalliC, LuccaP & PaganettiP. Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle. *Science*. 2003, **299**, p. 1397-1400.

MorinTJ & KobertzWR. Counting membrane-embedded KCNE beta-subunits in functioning K⁺ channel complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008, **105**, p. 1478-1482.

MossAJ, ZarebaW, BenhorinJ, LocatiEH, HallWJ, RobinsonJL, SchwartzPJ, TowbinJA, VincentGM & LehmannMH. ECG T-wave patterns in genetically distinct forms of the hereditary long QT syndrome. *Circulation*. 1995, **92**, p. 2929-2934.

Mrowiec, Thomas and Schwappach, Blanche. 14-3-3 proteins in membrane protein transport. *BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 2006, **387**, p. 1227-1236.

NadalMS, OzaitaA, AmarilloY, Vega-Saenz de MieraE, MaY, MoW, GoldbergEM, MisumiY, IkeharaY, NeubertTA & RudyB. The CD26-related dipeptidyl aminopeptidase-like protein DPPX is a critical component of neuronal A-type K⁺ channels. *Neuron*. 2003, **37**, p. 449-461.

NagaiK, OubridgeC, KuglstatlerA, MenicelliE, IseIC & JovineL. Structure, function and evolution of the signal recognition particle. *EMBO J.* 2003, **22**, p. 3479-3485.

NagayaN & PapazianDM. Potassium channel alpha and beta subunits assemble in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 1997, **272**, p. 3022-3027.

NakajoK & KuboY. Second coiled-coil domain of KCNQ channel controls current expression and subfamily specific heteromultimerization by salt bridge networks. *J. Physiol. (Lond.)*. 2008, **586**, p. 2827-2840.

NakamuraK, KatayamaY, KusanoKF, HaraokaK, TaniY, NagaseS, MoritaH, MiuraD, FujimotoY, FurukawaT, UedaK, AizawaY, KimuraA, KurachiY & OheT. Anti-KCNH2 antibody-induced long QT syndrome: novel acquired form of long QT syndrome. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2007, **50**, p. 1808-1809.

NakatsukasaK & BrodskyJL. The Recognition and Retrotranslocation of Misfolded Proteins from the Endoplasmic Reticulum. *Traffic*. 2008, **9**, p. 861-870. **Cette revue fait le point sur les protéines intervenant dans la reconnaissance des substrats de l'ERAD.**

NerbonneJM & KassRS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol. Rev.* 2005, **85**, p. 1205-1253.

NguyenTN & GoodrichJA. Protein-protein interaction assays: eliminating false positive interactions. *Nat. Methods*. 2006, **3**, p. 135-139.

NgW, SergeenkoT, ZengN, BrownJD & RömischK. Characterization of the proteasome interaction with the Sec61 channel in the endoplasmic reticulum. *J. Cell. Sci.* 2007, **120**, p. 682-691.

NicolasCS, ParkK, El HarchiA, CamonisJ, KassRS, EscandeD, MérotJ, LoussouarnG, Le BouffantF & BaróI. IKs response to protein kinase A-dependent KCNQ1 phosphorylation requires direct interaction with microtubules. *Cardiovasc. Res.* 2008, **79**, p. 427-435.

NicolasM, DememesD, MartinA, KupersmidtS & BarhaninJ. KCNQ1/KCNE1 potassium channels

in mammalian vestibular dark cells. *Hear. Res.* 2001, **153**, p. 132-145.

NozakiJI, KubotaH, YoshidaH, NaitohM, GojiJ, YoshinagaT, MoriK, KoizumiA & NagataK. The endoplasmic reticulum stress response is stimulated through the continuous activation of transcription factors ATF6 and XBP1 in Ins2+/Akita pancreatic beta cells. *Genes Cells.* 2004, **9**, p. 261-270.

O'Kelly, Ita and Goldstein, Steve A. N. Forward transport of K(2P)3.1: Mediation by 14-3-3 and COPI, modulation by p11. *TRAFFIC.* 2008, **9**, p. 72-78.

O'KellyI, ButlerMH, ZilberbergN & GoldsteinSAN. Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals. *Cell.* 2002, **111**, p. 577-588.

ObrdlikP, El-BakkouryM, HamacherT, CappellaroC, VilarinoC, FleischerC, EllerbrokH, KamuzinziR, LedentV, BlaudezD, SandersD, RevueltaJL, BolesE, AndreB & FrommerWB. K+ channel interactions detected by a genetic system optimized for systematic studies of membrane protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004, **101**, p. 12242-12247.

OdaY, OkadaT, YoshidaH, KaufmanRJ, NagataK & MoriK. Derlin-2 and Derlin-3 are regulated by the mammalian unfolded protein response and are required for ER-associated degradation. *J. Cell Biol.* 2006, **172**, p. 383-393.

OgataM, HinoS, SaitoA, MorikawaK, KondoS, KanemotoS, MurakamiT, TaniguchiM, Taniil, YoshinagaK, ShiosakaS, HammarbackJA, UranoF & ImaizumiK. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol. Cell. Biol.* 2006, **26**, p. 9220-9231.

Okiyonedat, NiiboriA, HaradaK, KohnoT, MichalakM, DuszykM, Wadal, IkawaM, ShutoT, SuicoMA & KaiH. Role of calnexin in the ER quality control and productive folding of CFTR; differential effect of calnexin knockout on wild-type and DeltaF508 CFTR. *Biochim. Biophys. Acta.* 2008, **1783**, p. 1585-1594.

OrlowskiM. The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system. *Biochemistry.* 1990, **29**, p. 10289-10297.

OtschytschN, RaesA, Van HoorickD & SnydersDJ. Obligatory heterotetramerization of three previously uncharacterized Kv channel alpha-subunits identified in the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002, **99**, p. 7986-7991.

PanaghieG, TaiK & AbbottGW. Interaction of KCNE subunits with the KCNQ1 K+ channel pore. *J. Physiol. (Lond.).* 2006, **570**, p. 455-467.

ParkK, PironJ, DahimeneS, MérotJ, Baról, EscandeD & LoussouarnG. Impaired KCNQ1-KCNE1 and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate interaction underlies the long QT syndrome. *Circ. Res.* 2005, **96**, p. 730-739.

ParkS & RainesRT. Fluorescence gel retardation assay to detect protein-protein interactions. *Methods Mol. Biol.* 2004, **261**, p. 155-160.

PearceD. The role of SGK1 in hormone-regulated sodium transport. *Trends Endocrinol. Metab.* 2001, **12**, p. 341-347.

PedemonteN, LukacsGL, DuK, CaciE, Zegarra-MoranO, GaliettaLJV & VerkmanAS. Small-molecule correctors of defective DeltaF508-CFTR cellular processing identified by high-throughput screening. *J. Clin. Invest.* 2005, **115**, p. 2564-2571.

PerozD, RodriguezN, ChoveauF, Baról, MérotJ & LoussouarnG. Kv7.1 (KCNQ1) properties and channelopathies. *J. Physiol. (Lond.).* 2008, **586**, p. 1785-1789.

PfleggerKDG & EidneKA. Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Nat. Methods.* 2006, **3**, p. 165-174.

PilonM, SchekmanR & RömischK. Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation. *EMBO J.* 1997, **16**, p. 4540-4548.

PindS, RiordanJR & WilliamsDB. Participation of the endoplasmic reticulum chaperone calnexin (p88, IP90) in the biogenesis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* 1994, **269**, p. 12784-12788.

PittGS. Calmodulin and CaMKII as molecular switches for cardiac ion channels. *Cardiovasc. Res.* 2007, **73**, p. 641-647.

PizzirussoM & ChangA. Ubiquitin-mediated targeting of a mutant plasma membrane ATPase, Pma1-7, to the endosomal/vacuolar system in yeast. *Mol. Biol. Cell.* 2004, **15**, p. 2401-2409.

PlempereRK, BöhmelerS, BordalloJ, SommerT & WolfDH. Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature.* 1997, **388**, p. 891-895.

PoelzingS, ForleoC, SamodelIM, DudashL, SorrentinoS, AnaclerioM, TroccoliR, IacovielloM,

RomitoR, GuidaP, ChahineM, PitzalisM & Deschenesi. SCN5A polymorphism restores trafficking of a Brugada syndrome mutation on a separate gene. *Circulation*. 2006, **114**, p. 368-376.

PotetF, ScottJD, Mohammad-PanahR, EscandeD & Barol. AKAP proteins anchor cAMP-dependent protein kinase to KvLQT1/IsK channel complex. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2001, **280**, p. H2038-45.

PrioriSG, NapolitanoC & SchwartzPJ. Low penetrance in the long-QT syndrome: clinical impact. *Circulation*. 1999, **99**, p. 529-533.

PrioriSG, PanditSV, Rivoltal, BerenfeldO, RonchettiE, DharmoonA, NapolitanoC, AnumonwoJ, di BarlettaMR, GudapakkamS, BosiG, Stramba-BadialeM & JalifeJ. A novel form of short QT syndrome (SQT3) is caused by a mutation in the KCNJ2 gene. *Circ. Res.* 2005, **96**, p. 800-807.

RapoportTA. Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature*. 2007, **450**, p. 663-669.

RapoportTA, GoderV, HeinrichSU & MatlackKES. Membrane-protein integration and the role of the translocation channel. *Trends Cell Biol.* 2004, **14**, p. 568-575.

RavnLS, AizawaY, PollevickGD, Hofman-BangJ, CordeiroJM, DixenU, JensenG, WuY, BurashnikovE, HaunsoS, GuerchicoffA, HuD, SvendsenJH, ChristiansenM & AntzelevitchC. Gain of function in I(Ks) secondary to a mutation in KCNE5 associated with atrial fibrillation. *Heart Rhythm*. 2008, **5**, p. 427-435.

RechsteinerM & HillCP. Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. *Trends Cell Biol.* 2005, **15**, p. 27-33.

RiordanJR, RommensJM, KeremB, AlonN, RozmahelR, GrzelczakZ, ZielenskiJ, LokS, PlavsicN, ChouJL & et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 1989, **245**, p. 1066-1073.

RodenDM. Mechanisms and management of proarrhythmia. *Am. J. Cardiol.* 1998, **82**, p. 491-571.

RodenDM. Clinical practice. Long-QT syndrome. *N. Engl. J. Med.* 2008, **358**, p. 169-176.

RodenDM & YangT. Protecting the heart against arrhythmias: potassium current physiology and repolarization reserve. *Circulation*. 2005, **112**, p. 1376-1378.

RoepkeT, AnantharamA, KirchoffP, BusqueS, YoungJ, GeibelJ, LernerD & AbbottG. The KCNE2 potassium channel ancillary subunit is essential for gastric acid secretion. *J. Biol. Chem.* 2006, **281**, p. 23740-23747. **Dans cet article, un modèle de souris KO KCNE2 est utilisé.**

RomanoC, GemmeG & PongiglioneR. RARE CARDIAC ARRHYTHMIAS OF THE PEDIATRIC AGE. II. SYNCOPAL ATTACKS DUE TO PAROXYSMAL VENTRICULAR FIBRILLATION. (PRESENTATION OF 1ST CASE IN ITALIAN PEDIATRIC LITERATURE). *Clin Pediatr (Bologna)*. 1963, **45**, p. 656-683.

RomeyG, AttaliB, ChouabeC, Abitboll, GuillemareE, BarhaninJ & LazdunskiM. Molecular mechanism and functional significance of the MinK control of the KvLQT1 channel activity. *J. Biol. Chem.* 1997, **272**, p. 16713-16716.

RubensteinRC & ZeitlinPL. Sodium 4-phenylbutyrate downregulates Hsc70: implications for intracellular trafficking of DeltaF508-CFTR. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 2000, **278**, p. C259-67.

RusconiR, ScalmaniP, CassuliniRR, GiuntiG, GambardellaA, FranceschettiS, AnnesiG, WankeE & MantegazzaM. Modulatory proteins can rescue a trafficking defective epileptogenic Nav1.1 Na⁺ channel mutant. *J. Neurosci.* 2007, **27**, p. 11037-11046.

SanguinettiMC, CurranME, ZouA, ShenJ, SpectorPS, AtkinsonDL & KeatingMT. Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature*. 1996, **384**, p. 80-83. **Cet article est le premier à montrer que KCNQ1 associé à KCNE1 produit le courant IKs. Avant, on pensait qu'IKs était du à KCNE1 seul.**

SatoK, SatoM & NakanoA. Rer1p, a retrieval receptor for endoplasmic reticulum membrane proteins, is dynamically localized to the Golgi apparatus by coatomer. *J. Cell Biol.* 2001, **152**, p. 935-944.

SatoS, WardCL, KrouseME, WineJJ & KopitoRR. Glycerol reverses the misfolding phenotype of the most common cystic fibrosis mutation. *J. Biol. Chem.* 1996, **271**, p. 635-638.

SatoY, SakaguchiM, GoshimaS, NakamuraT & UozumiN. Integration of Shaker-type K⁺ channel, KAT1, into the endoplasmic reticulum membrane: synergistic insertion of voltage-sensing segments, S3-S4, and independent insertion of pore-forming segments, S5-P-S6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002, **99**, p. 60-65.

SchmittN, CalloeK, NielsenNH, BuschmannM, SpeckmannE, Schulze-BahrE & SchwarzM. The novel C-terminal KCNQ1 mutation M520R alters protein trafficking. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*

2007, **358**, p. 304-310.

SchmittN, SchwarzM, PeretzA, Abitboll, AttaliB & PongsO. A recessive C-terminal Jervell and Lange-Nielsen mutation of the KCNQ1 channel impairs subunit assembly. *EMBO J.* 2000, **19**, p. 332-340.

SchmitzA & HerzogV. Endoplasmic reticulum-associated degradation: exceptions to the rule. *Eur. J. Cell Biol.* 2004, **83**, p. 501-509.

SchmitzA, SchneiderA, KummerMP & HerzogV. Endoplasmic reticulum-localized amyloid beta-peptide is degraded in the cytosol by two distinct degradation pathways. *Traffic.* 2004, **5**, p. 89-101.

SchottJJ, AlshinawiC, KyndtF, ProbstV, HoorntjeTM, HulsbeekM, WildeAA, EscandeD, MannensMM & Le MarechH. Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A. *Nat. Genet.* 1999, **23**, p. 20-21.

SchroederBC, WaldeggerS, FehrS, BleichM, WarthR, GregerR & JentschTJ. A constitutively open potassium channel formed by KCNQ1 and KCNE3. *Nature.* 2000, **403**, p. 196-199.

SchulteU, ThumfartJ, KlöckerN, SailerCA, BildIW, BiniossekM, DehdD, DellerT, EbleS, AbbassK, WanglerT, Knaush & FaklerB. The epilepsy-linked Lgi1 protein assembles into presynaptic Kv1 channels and inhibits inactivation by Kvbeta1. *Neuron.* 2006, **49**, p. 697-706.

SchwakeM, AthanasiaduD, BeimgrabenC, BlanzJ, BeckC, JentschTJ, SaftigP & FriedrichT. Structural determinants of M-type KCNQ (Kv7) K⁺ channel assembly. *J. Neurosci.* 2006, **26**, p. 3757-3766.

SchwartzPJ. The congenital long QT syndromes from genotype to phenotype: clinical implications. *J. Intern. Med.* 2006, **259**, p. 39-47.

SchwartzPJ, VanoliE, CrottiL, SpazzoliniC, FerrandiC, GoosenA, HedleyP, HeradienM, BacchiniS, TurcoA, La RovereMT, BartoliA, GeorgeALJ & BrinkPA. Neural control of heart rate is an arrhythmia risk modifier in long QT syndrome. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008, **51**, p. 920-929.

Schwiegerl, LautzK, KrauseE, RosenthalW, WiesnerB & HermosillaR. Derlin-1 and p97/VCP Mediate the ER-Associated Degradation of Human V2 Vasopressin Receptors. *Mol. Pharmacol.* 2007, **73**, p. 697-708.

ScottDC & SchekmanR. Role of Sec61p in the ER-associated degradation of short-lived transmembrane proteins. *J. Cell Biol.* 2008, **181**, p. 1095-1105.

SeeböhmG, Strutz-SeeböhmN, BirkinR, DellIG, BucciC, SpinosoMR, BaltaevR, MackAF, KorniyuchukG, ChoudhuryA, MarksD, PaganoRE, AttaliB, PfeuferA, KassRS, SanguinettiMC, TawareJM & LangF. Regulation of endocytic recycling of KCNQ1/KCNE1 potassium channels. *Circ. Res.* 2007, **100**, p. 686-692.

ShahM, AkarFG & TomaselliGF. Molecular basis of arrhythmias. *Circulation.* 2005, **112**, p. 2517-2529.

ShamgarL, MaL, SchmittN, HaitinY, PeretzA, WienerR, HirschJ, PongsO & AttaliB. Calmodulin is essential for cardiac IKS channel gating and assembly: impaired function in long-QT mutations. *Circ. Res.* 2006, **98**, p. 1055-1063.

ShiG, NakahiraK, HammondS, RhodesKJ, SchechterLE & TrimmerJS. Beta subunits promote K⁺ channel surface expression through effects early in biosynthesis. *Neuron.* 1996, **16**, p. 843-852.

Shikano, Sojin and Coblitz, Brian and Wu, Meng and Li, Min. 14-3-3 proteins: regulation of endoplasmic reticulum localization and surface expression of membrane proteins. *TRENDS IN CELL BIOLOGY.* 2006, **16**, p. 370-375.

ShimizuW. The long QT syndrome: therapeutic implications of a genetic diagnosis. *Cardiovasc. Res.* 2005, **67**, p. 347-356.

SinghOV, VijnN, MogayzelPJJ, JozwikC, PollardHB & ZeitlinPL. Pharmacoproteomics of 4-phenylbutyrate-treated IB3-1 cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *J. Proteome Res.* 2006, **5**, p. 562-571.

SoldovieriMV, CastaldoP, IodiceL, MiceliF, BarreseV, BelliniG, Miraglia del GiudiceE, PascottoA, BonattiS, AnnunziatoL & TagliatelaM. Decreased subunit stability as a novel mechanism for potassium current impairment by a KCNQ2 C terminus mutation causing benign familial neonatal convulsions. *J. Biol. Chem.* 2006, **281**, p. 418-428.

Sottocornola, B. and Gazzarrini, S. and Olivari, C. and Romani, G. and Valbuzzi, P. and Thiel, G. and Moroni, A. 14-3-3 proteins regulate the potassium channel KAT1 by dual modes. *PLANT BIOLOGY.* 2008, **10**, p. 231-236.

Sottocornola, Barbara and Visconti, Sabina and Orsi, Sara and Gazzarrini, Sabrina and Giacometti, Sonia and Olivari, Claudio and Camoni, Lorenzo and Aducci, Patrizia and Marra, Mauro and Abenavoli, Alessandra and Thiel, Gerhard and Moroni, Anna. The potassium channel KAT1 is activated by plant and animal 14-3-3 proteins. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 2006, **281**, p. 35735-35741.

Splawskil, ShenJ, TimothyKW, LehmannMH, PrioriS, RobinsonJL, MossAJ, SchwartzPJ, TowbinJA, VincentGM & KeatingMT. Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation*. 2000, **102**, p. 1178-1185.

Stagljarl, KorostenskyC, JohnssonN & te HeesenS. A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998, **95**, p. 5187-5192.

StefanovicS & HegdeR. Identification of a targeting factor for posttranslational membrane protein insertion into the ER. *Cell*. 2007, **128**, p. 1147-1159.

SuchanekM, RadzikowskaA & ThieleC. Photo-leucine and photo-methionine allow identification of protein-protein interactions in living cells. *Nat. Methods*. 2005, **2**, p. 261-267.

SunF, ZhangR, GongX, GengX, DrainP & FrizzellIR. Derlin-1 promotes the efficient degradation of CFTR and CFTR folding mutants. *J. Biol. Chem.* 2006a, **281**, p. 36856-36863.

SunF, ZhangR, GongX, GengX, DrainPF & FrizzellIRA. Derlin-1 promotes the efficient degradation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and CFTR folding mutants. *J. Biol. Chem.* 2006b, **281**, p. 36856-36863.

Swiatecka-UrbanA, BrownA, Moreau-MarquisS, RenukaJ, CoutermarshB, BarnabyR, KarlsonKH, FlotteTR, FukudaM, LangfordGM & StantonBA. The short apical membrane half-life of rescued {Delta}F508-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) results from accelerated endocytosis of {Delta}F508-CFTR in polarized human airway epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 2005, **280**, p. 36762-36772.

TakumiT, OhkuboH & NakanishiS. Cloning of a membrane protein that induces a slow voltage-gated potassium current. *Science*. 1988, **242**, p. 1042-1045.

TanguyG, DrévilionL, ArousN, HasnainA, HinzpeterA, FritschJ, GoossensM & FanenP. CSN5 binds to misfolded CFTR and promotes its degradation. *Biochim. Biophys. Acta*. 2008, **1783**, p. 1189-1199.

TanHL, KupersmidtS, ZhangR, StepanovicS, RodenDM, WildeAAM, AndersonME & BalserJR. A calcium sensor in the sodium channel modulates cardiac excitability. *Nature*. 2002, **415**, p. 442-447.

TapperAR & GeorgeALJ. MinK subdomains that mediate modulation of and association with KvLQT1. *J. Gen. Physiol.* 2000, **116**, p. 379-390.

TaxisC, HittR, ParksS, DeakPM, KostovaZ & WolfDH. Use of modular substrates demonstrates mechanistic diversity and reveals differences in chaperone requirement of ERAD. *J. Biol. Chem.* 2003, **278**, p. 35903-35913.

TesterDJ, CronkLB, CarrJL, SchulzV, SalisburyBA, JudsonRS & AckermanMJ. Allelic dropout in long QT syndrome genetic testing: a possible mechanism underlying false-negative results. *Heart Rhythm*. 2006, **3**, p. 815-821.

TesterDJ, WilIML, HaglundCM & AckermanMJ. Compendium of cardiac channel mutations in 541 consecutive unrelated patients referred for long QT syndrome genetic testing. *Heart Rhythm*. 2005, **2**, p. 507-517.

ThiedeB, HöhenwarterW, KrahaA, MattowJ, SchmidM, SchmidtF & JungblutPR. Peptide mass fingerprinting. *Methods*. 2005, **35**, p. 237-247.

ThueraufDJ, MarcinkoM, GudeN, RubioM, SussmanMA & GlembotskiCC. Activation of the unfolded protein response in infarcted mouse heart and hypoxic cultured cardiac myocytes. *Circ. Res.* 2006, **99**, p. 275-282.

TinelN, DiochotS, BorsottoM, LazdunskiM & BarhaninJ. KCNE2 confers background current characteristics to the cardiac KCNQ1 potassium channel. *EMBO J.* 2000, **19**, p. 6326-6330.

TiroshB, FurmanMH, TortorellaD & PloeghHL. Protein unfolding is not a prerequisite for endoplasmic reticulum-to-cytosol dislocation. *J. Biol. Chem.* 2003, **278**, p. 6664-6672.

ToyodaF, UeyamaH, DingW & MatsuuraH. Modulation of functional properties of KCNQ1 channel by association of KCNE1 and KCNE2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006, **344**, p. 814-820.

TsaiB, RodighieroC, LencerWI & RapoportTA. Protein disulfide isomerase acts as a redox-

- dependent chaperone to unfold cholera toxin. *Cell*. 2001, **104**, p. 937-948.
- TuL & DeutschC**. Evidence for dimerization of dimers in K⁺ channel assembly. *Biophys. J.* 1999, **76**, p. 2004-2017.
- TuL, WangJ, HelmaA, SkachWR & DeutschC**. Transmembrane biogenesis of Kv1.3. *Biochemistry*. 2000, **39**, p. 824-836.
- Tutor, Antonio S. and Delpon, Eva and Caballero, Ricardo and Gomez, Ricardo and Nunez, Lucia and Vaquero, Miguel and Tamargo, Juan and Mayor, Jr., Federico and Penela, Petronila**. Association of 14-3-3 proteins to beta(1)-adrenergic receptors modulates Kv11.1 K⁺ channel activity in recombinant systems. *MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL*. 2006, **17**, p. 4666-4674.
- UmigaiN, SatoY, MizutaniA, UtsumiT, SakaguchiM & UozumiN**. Topogenesis of two transmembrane type K⁺ channels, Kir 2.1 and KcsA. *J. Biol. Chem.* 2003, **278**, p. 40373-40384.
- UnnoM, MizushimaT, MorimotoY, TomisugiY, TanakaK, YasuokaN & TsukiharaT**. The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution. *Structure*. 2002, **10**, p. 609-618.
- VallonV, GrahammerF, RichterK, BleichM, LangF, BarhaninJ, VolkIH & WarthR**. Role of KCNE1-dependent K⁺ fluxes in mouse proximal tubule. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2001, **12**, p. 2003-2011.
- VallonV, GrahammerF, VolkIH, SanduC, RichterK, RexhepajR, GerlachU, RongQ, PfeiferK & LangF**. KCNQ1-dependent transport in renal and gastrointestinal epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005, **102**, p. 17864-17869.
- van BemmelenMX, RougierJ, GavilletB, ApothelozF, DaidieD, TateyamaM, Rivoltal, ThomasMA, KassRS, StaubO & AbrielH**. Cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5 is regulated by Nedd4-2 mediated ubiquitination. *Circ. Res.* 2004, **95**, p. 284-291.
- Van den BergB, ClemonsWMJ, CollinsonI, ModisY, HartmannE, HarrisonSC & RapoportTA**. X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature*. 2004, **427**, p. 36-44.
- van der HeydenMAG, SmitsME & VosMA**. Drugs and trafficking of ion channels: a new pro-arrhythmic threat on the horizon?. *Br. J. Pharmacol.* 2008, **153**, p. 406-409.
- Van GoorF, StraleyKS, CaoD, GonzalezJ, HadidaS, HazlewoodA, JoubranJ, KnappT, MakingsLR, MillerM, NeubergerT, OlsonE, PanchenkoV, RaderJ, SinghA, StackJH, TungR, GrootenhuisPDJ & NegulescuP**. Rescue of DeltaF508-CFTR trafficking and gating in human cystic fibrosis airway primary cultures by small molecules. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2006, **290**, p. L1117-30.
- VargaK, GoldsteinRF, JurkuvenaiteA, ChenL, MatalonS, SorscherEJ, BeboKZ & CollawnJF**. Enhanced cell-surface stability of rescued DeltaF508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) by pharmacological chaperones. *Biochem. J.* 2008, **410**, p. 555-564.
- VargaK, JurkuvenaiteA, WakefieldJ, HongJS, GuimbellotJS, VenglarikCJ, NirajA, MazurM, SorscherEJ, CollawnJF & BeboKZ**. Efficient intracellular processing of the endogenous cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in epithelial cell lines. *J. Biol. Chem.* 2004, **279**, p. 22578-22584.
- VashistS & NgDTW**. Misfolded proteins are sorted by a sequential checkpoint mechanism of ER quality control. *J. Cell Biol.* 2004, **165**, p. 41-52.
- VattaM, AckermanMJ, YeB, MakielskiJC, UghanzeEE, TaylorEW, TesterDJ, BalijepalliRC, FoellJD, LiZ, KampTJ & TowbinJA**. Mutant caveolin-3 induces persistent late sodium current and is associated with long-QT syndrome. *Circulation*. 2006, **114**, p. 2104-2112.
- VetterDE, MannJR, WangemannP, LiuJ, McLaughlinKJ, LesageF, MarcusDC, LazdunskiM, HeinemannSF & BarhaninJ**. Inner ear defects induced by null mutation of the *isk* gene. *Neuron*. 1996, **17**, p. 1251-1264.
- VikisHG & GuanK**. Glutathione-S-transferase-fusion based assays for studying protein-protein interactions. *Methods Mol. Biol.* 2004, **261**, p. 175-186.
- VoldersPGA, ZhuQ, TimmermansC, EurlingsPMH, SuX, ArensYH, LiL, JongbloedRJ, XiaM, RodriguezL & ChenYH**. Mapping a novel locus for familial atrial fibrillation on chromosome 10p11-q21. *Heart Rhythm*. 2007, **4**, p. 469-475.
- WagnerS, DybkovaN, RasenackECL, JacobshagenC, FabritzL, KirchhofP, MaierSKG, ZhangT, HasenfussG, BrownJH, BersDM & MaierLS**. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na⁺ channels. *J. Clin. Invest.* 2006, **116**, p. 3127-3138.
- WalkerVE, AtanasiuR, LamH & ShrierA**. Co-chaperone FKBP38 Promotes HERG Trafficking. *J. Biol. Chem.* 2007, **282**, p. 23509-23516.
- WalshKB & KassRS**. Regulation of a heart potassium channel by protein kinase A and C. *Science*.

1988, **242**, p. 67-69.

WalterJ, UrbanJ, VolkweinC & SommerT. Sec61p-independent degradation of the tail-anchored ER membrane protein Ubc6p. *EMBO J.* 2001, **20**, p. 3124-3131.

WangB, Heath-EngelH, ZhangD, NguyenN, ThomasDY, HanrahanJW & ShoreGC. BAP31 interacts with Sec61 translocons and promotes retrotranslocation of CFTRDeltaF508 via the derlin-1 complex. *Cell.* 2008, **133**, p. 1080-1092.

WangB, PelletierJ, MassaadMJ, HerscovicsA & ShoreGC. The yeast split-ubiquitin membrane protein two-hybrid screen identifies BAP31 as a regulator of the turnover of endoplasmic reticulum-associated protein tyrosine phosphatase-like B. *Mol. Cell. Biol.* 2004, **24**, p. 2767-2778.

WangJ, ZhangL, YaoY, ViroonchatapanN, RotheE & WangZ. A transmembrane motif governs the surface trafficking of nicotinic acetylcholine receptors. *Nat. Neurosci.* 2002, **5**, p. 963-970.

WangL, WibleBA, WanX & FickerE. Cardiac glycosides as novel inhibitors of human ether-a-go-go-related gene channel trafficking. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007a, **320**, p. 525-534.

WangQ, CurranME, Splawskil, BurnTC, MillhollandJM, VanRaayTJ, ShenJ, TimothyKW, VincentGM, de JagerT, SchwartzPJ, ToubinJA, MossAJ, AtkinsonDL, LandesGM, ConnorsTD & KeatingMT. Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat. Genet.* 1996, **12**, p. 17-23.

WangY, LooTW, BartlettMC & ClarkeDM. Additive effect of multiple pharmacological chaperones on maturation of CFTR processing mutants. *Biochem. J.* 2007b, **406**, p. 257-263.

WangY, LooTW, BartlettMC & ClarkeDM. Correctors promote maturation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)-processing mutants by binding to the protein. *J. Biol. Chem.* 2007c, **282**, p. 33247-33251.

WardCL & KopitoRR. Intracellular turnover of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Inefficient processing and rapid degradation of wild-type and mutant proteins. *J. Biol. Chem.* 1994, **269**, p. 25710-25718.

WardCL, OmuraS & KopitoRR. Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell.* 1995, **83**, p. 121-127.

WardOC. A NEW FAMILIAL CARDIAC SYNDROME IN CHILDREN. *J Ir Med Assoc.* 1964, **54**, p. 103-106.

WestermeierR & ScheibeB. Difference gel electrophoresis based on lys/cys tagging. *Methods Mol. Biol.* 2008, **424**, p. 73-85.

WibleBA, YangQ, KuryshevYA, AcciliEA & BrownAM. Cloning and expression of a novel K⁺ channel regulatory protein, KChAP. *J. Biol. Chem.* 1998, **273**, p. 11745-11751.

WienerR, HaitinY, ShamgarL, Fernández-AlonsoMC, MartosA, Chomsky-HechtO, RivasG, AttaliB & HirschJA. The KCNQ1 (Kv7.1) COOH terminus, a multitiered scaffold for subunit assembly and protein interaction. *J. Biol. Chem.* 2008, **283**, p. 5815-5830. ***Cet article étudie en détail la tétramérisation de KCNQ1 et fournit des éléments cristallographiques de la partie C-terminale.***

WiertzEJ, TortorellaD, BogyoM, YuJ, MothesW, JonesTR, RapoportTA & PloeghHL. Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature.* 1996, **384**, p. 432-438. ***Cet article donne les premières preuves de la participation de Sec61 à la rétrotranslocation.***

WildeAAM & BezzinaCR. Genetics of cardiac arrhythmias. *Heart.* 2005, **91**, p. 1352-1358.

WilkinsonBM, CritchleyAJ & StirlingCJ. Determination of the transmembrane topology of yeast Sec61p, an essential component of the endoplasmic reticulum translocation complex. *J. Biol. Chem.* 1996, **271**, p. 25590-25597.

WilsonAJ, QuinnKV, GravesFM, Bitner-GlindziczM & TinkerA. Abnormal KCNQ1 trafficking influences disease pathogenesis in hereditary long QT syndromes (LQT1). *Cardiovasc. Res.* 2005, **67**, p. 476-486. ***Cet article montre qu'il est plus difficile de restaurer le trafic de KCNQ1 que de HERG ou CFTR.***

WilsonCGM, MaglieryTJ & ReganL. Detecting protein-protein interactions with GFP-fragment reassembly. *Nat. Methods.* 2004, **1**, p. 255-262.

WollnikB, SchroederBC, KubischC, EspererHD, WieackerP & JentschTJ. Pathophysiological mechanisms of dominant and recessive KVLQT1 K⁺ channel mutations found in inherited cardiac arrhythmias. *Hum. Mol. Genet.* 1997, **6**, p. 1943-1949.

WuL, YongSL, FanC, NiY, YooS, ZhangT, ZhangX, PazCO, RhoH, KeT, SzafranskiP, JonesS,

- ChenQ & WangQK.** Identification of a new co-factor, MOG1, required for the function of cardiac sodium channel Nav1.5. *J. Biol. Chem.* 2008, **283**, p. 6968-6978.
- WuY, LiQ & ChenX.** Detecting protein-protein interactions by Far western blotting. *Nat Protoc.* 2007, **2**, p. 3278-3284.
- WysockiVH, ResingKA, ZhangQ & ChengG.** Mass spectrometry of peptides and proteins. *Methods.* 2005, **35**, p. 211-222.
- YamamotoK, FujiiR, ToyofukuY, SaitoT, KosekiH, HsuVW & AoeT.** The KDEL receptor mediates a retrieval mechanism that contributes to quality control at the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 2001, **20**, p. 3082-3091.
- YamashitaF, HorieM, KubotaT, YoshidaH, YumotoY, KoboriA, NinomiyaT, KonoY, HarunaT, TsujiK, WashizukaT, TakanoM, OtaniH, SasayamaS & AizawaY.** Characterization and subcellular localization of KCNQ1 with a heterozygous mutation in the C terminus. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2001, **33**, p. 197-207.
- YarbroughTL, LuT, LeeH & ShibataEF.** Localization of cardiac sodium channels in caveolin-rich membrane domains: regulation of sodium current amplitude. *Circ. Res.* 2002, **90**, p. 443-449.
- YeY, MeyerHH & RapoportTA.** The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. *Nature.* 2001, **414**, p. 652-656. **Cet article montre que l'AAA-ATPase p97 est impliquée dans l'ERAD.**
- YeY, MeyerHH & RapoportTA.** Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains. *J. Cell Biol.* 2003, **162**, p. 71-84.
- YeY, ShibataY, KikkertM, van VoordenS, WiertzE & RapoportTA.** Inaugural Article: Recruitment of the p97 ATPase and ubiquitin ligases to the site of retrotranslocation at the endoplasmic reticulum membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005, **102**, p. 14132-14138.
- YeY, ShibataY, YunC, RonD & RapoportTA.** A membrane protein complex mediates retrotranslocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature.* 2004, **429**, p. 841-847. **Premier article à proposer que Derlin-1 forme le canal de rétrotranslocation.**
- YoshidaH.** ER stress and diseases. *FEBS J.* 2007, **274**, p. 630-658.
- YoungerJM, ChenL, RenH, RosserMFN, TurnbulLEL, FanC, PattersonC & CyrDM.** Sequential quality-control checkpoints triage misfolded cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Cell.* 2006, **126**, p. 571-582.
- YoungerJM, RenH, ChenL, FanC, FieldsA, PattersonC & CyrDM.** A foldable CFTR{Delta}F508 biogenic intermediate accumulates upon inhibition of the Hsc70-CHIP E3 ubiquitin ligase. *J. Cell Biol.* 2004, **167**, p. 1075-1085.
- Yus-NajeraE, Santana-Castrol & VillarroelA.** The identification and characterization of a noncontinuous calmodulin-binding site in noninactivating voltage-dependent KCNQ potassium channels. *J. Biol. Chem.* 2002, **277**, p. 28545-28553.
- ZafarKS, Inayat-HussainSH & RossD.** A comparative study of proteasomal inhibition and apoptosis induced in N27 mesencephalic cells by dopamine and MG132. *J. Neurochem.* 2007, **102**, p. 913-921.
- ZengZ, TanC, TengS, ChenJ, SuS, ZhouX, WangF, ZhangS, GuD, MakielskiJ & PuJ.** The Single Nucleotide Polymorphisms of I(Ks) Potassium Channel Genes and Their Association with Atrial Fibrillation in a Chinese Population. *Cardiology.* 2006, **108**, p. 97-103.
- ZerangueN, JanYN & JanLY.** An artificial tetramerization domain restores efficient assembly of functional Shaker channels lacking T1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000, **97**, p. 3591-3595.
- ZerangueN, SchwappachB, JanYN & JanLY.** A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron.* 1999, **22**, p. 537-548. **Cet article est le premier à décrire le motif de rétention RKR.**
- ZhangK & KaufmanRJ.** The unfolded protein response: a stress signaling pathway critical for health and disease. *Neurology.* 2006, **66**, p. S102-9. **Cette revue décrit les trois voies d'activation de l'UPR.**
- ZhangL, FosterK, LiQ & MartensJR.** S-acylation regulates Kv1.5 channel surface expression. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 2007, **293**, p. C152-61.
- ZhengW, VerlanderJ, LynchI, CashM, ShaoJ, StowL, CainB, WeinerI, Walls & WingoC.** Cellular distribution of the potassium channel, KCNQ1, in normal mouse kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2006, **292**, p. F456-66.

ZielenskiJ & TsuiLC. Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Annu. Rev. Genet.* 1995, 29, p. 777-807.

Sites internet.

Biacore website. 2008. Biacore. <http://www.biacore.com/lifesciences/index.html>.

Cepidc website. 2008. CépiDc : Centre d'épidémiologie sur les causes médicales de décès. <http://www.cepidc.vesinet.inserm.fr/>.

E-anatomie website. 2008. Atlas d'anatomie cardiaque : illustrations, modèle 3D et photographies légendées. <http://www.e-anatomy.org/fr/anatomie/corps-humain/thorax/coeur-anatomie.html>.

FSM website. 2008. GENE CONNECTION FOR THE HEART. <http://www.fsm.it/cardmoc/>.

GenetSickkids website. 2008. Cystic Fibriosis Mutation Database. <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage.html>.

Harvard website. 2008. Disease Biophysics Group Harvard University. http://www.seas.harvard.edu/diseasebiophysics/research_mechanotransduction.html.

Logopharm website. 2008. Logopharm. <http://www.complexio-gmbh.de/>.

Torsade.org website. 2008. Drugs That Prolong the QT Interval and/or Induce Torsades de Pointes. <http://www.torsades.org/medical-pros/drug-lists/pubMed-drug-list.cfm>.

Thèse.

Dahimène Shehrazade. Trafic et maturation du canal potassique KCNQ1. Mécanismes impliqués dans le syndrome du QT long de type 1. 2007. Université de Nantes.

Dégradation du canal KCNQ1 dans le syndrome du QT long. Nouveaux partenaires des canaux KCNQ1 et SCN5A

Le syndrome du QT long est une arythmie cardiaque responsable de morts subites. Les formes familiales de QT long sont dues à des mutations sur des gènes codant pour des canaux ioniques. Je me suis intéressé à deux de ces canaux : KCNQ1 et SCN5A.

La mutation Y111C située sur la partie N-terminale du canal KCNQ1 provoque une rétention du canal dans le réticulum endoplasmique. J'ai étudié les conséquences de cette rétention sur la biosynthèse du canal KCNQ1 et j'ai cherché à identifier les acteurs du contrôle qualité mis en jeu. Par des expériences de western blot et de pulse-chase, j'ai montré que la protéine mutante était moins exprimée que la protéine sauvage et que ceci était dû à une stabilité moindre de la protéine mutante. J'ai également montré que le canal KCNQ1 était dégradé par le système ubiquitine protéasome et que la chaperonne Hsp70 était capable de s'associer avec KCNQ1. Enfin, la protéine Derlin-1 ne participe pas à la dégradation du canal KCNQ1. En effet, ni la sur-expression ni la sous-expression de cette protéine n'ont eu d'impact ni sur le niveau d'expression ni sur la demi-vie du canal sauvage ou mutant.

Les canaux ioniques KCNQ1 et SCN5A fonctionnent au sein de complexes protéiques. Par des expériences de pull-down et de double hybride, j'ai identifié plusieurs partenaires potentiels pour KCNQ1 ; leurs rôles sur le trafic ou la fonction du canal restent à déterminer. Nous avons également identifié 14-3-3 comme nouveau partenaire de SCN5A et montré qu'il modulait le courant sodique cardiaque. Identifier ces protéines permet de mieux comprendre le fonctionnement des canaux ioniques et de pointer vers de nouveaux gènes candidats d'intérêt diagnostic.

Mots clés : arythmies cardiaques, syndrome du QT long, canaux ioniques, dégradation des protéines, interactions protéiques

KCNQ1 degradation in long QT syndrome. New partners of KCNQ1 and SCN5A channels.

The long QT syndrome is a cardiac arrhythmia responsible for sudden deaths. The familial forms of long QT are induced by mutations in genes coding for ion channels. During my thesis I have worked on two of these channels : KCNQ1 and SCN5A.

The Y111C mutation located in the N-terminus of KCNQ1 channel leads to endoplasmic reticulum retention of the channel. I have studied the consequences of this retention on the biosynthesis of KCNQ1 and identified some of the players implicated in the quality control of the proteins. Using western blot and pulse-chase experiments, I have showed that the mutant protein was less expressed than the wild and that it was due to a lower stability of the mutated protein. I have also showed that the KCNQ1 channel was degraded by the ubiquitin proteasome system and that the chaperone Hsp70 was able to associate with KCNQ1. Finally, the protein Derlin-1 was not involved in the degradation of KCNQ1 channel. Indeed, neither over nor under-expression of this protein had any impact on the expression level or the half-life of wild or mutated channel.

The ion channels KCNQ1 and SCN5A operate within protein complexes. By a combination of pull-down and double hybrid experiments, I have identified several potential partners for KCNQ1. Their roles on KCNQ1 function or trafficking remain to be analyzed. We have also identified 14-3-3 as a new partner of SCN5A and we have showed that it modulated the cardiac sodium current. Identification of these proteins help to better understand how ion channels function and point to new candidate genes for diagnosis.

Keywords : Cardiac arrhythmias, long QT syndrome, ion channels, proteins degradation, proteins interactions

David PEROZ
19 rue bois robillard
44 300 Nantes France