

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

Trafic et maturation du canal potassique KCNQ1. Mécanismes impliqués dans le syndrome du QT long.

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale CHIMIE-BIOLOGIE

Discipline : **Sciences de la Vie et de la Santé**

Spécialité : Physiologie

Présentée et soutenue publiquement par

DAHIMÈNE Shehrazade

Le 24 octobre 2007

Rapporteurs **Mme. DARGENT Bénédicte**, Directeur de Recherche CNRS,
Université de Marseille, INSERM UMR 641

Mr. BENHAROUGA Mohamed, Maître de Conférence, Université de
Grenoble, LCBM-UMR 5249

Examineurs **Mr. ABRIEL Hugues**, Professeur, Université de Lausanne

Mr. PACAUD Pierre, Professeur, Université de Nantes, INSERM
U533

Directeur de thèse **Mr. MEROT Jean**, Chargé de Recherche, INSERM U533, Nantes

Signet non défini.

Liste des abréviations	5
Liste des figures	6
Introduction	8
Avant propos	9
I Première partie : le canal KCNQ1	11
A) Identification et clonage de KCNQ1	11
B) Relation structure-fonction	12
C) Les isoformes de KCNQ1	13
D) Rôles physiologiques	14
a) Rôle dans le cœur	14
b) Rôles dans les cellules épithéliales	16
1) L'oreille interne	17
2) L'estomac : sécrétion gastrique d'ions H ⁺	17
3) Le colon et l'intestin grêle	18
4) Le pancréas	19
5) Les autres tissus	20
E) Pathologies liées à KCNQ1	20
a) Mutations perte de fonction : le syndrome du QT long congénital	20
1) Historique	20
2) Description et symptômes	21
3) Les bases moléculaires du syndrome du QT long	22
4) Les traitements	24
b) Mutations gain de fonction	25
1) Syndrome du QT court	25
2) Fibrillation auriculaire	26
F) Partenaires et régulateurs	26
a) Les sous-unités régulatrices : les protéines KCNE	26
1) Propriétés électrophysiologiques	26
a) KCNE1	27
b) Les autres KCNE	28
2) Stœchiométrie et zones d'association	29
b) Calmoduline	30
c) Yotiao et la régulation β adrénergique (PKA)	31
d) Nedd4.2 et SGK1 : endocytose et exocytose de KCNQ1	32
1) Endocytose (Nedd4.2)	32
2) L'exocytose (SGK1)	32
e) Régulation par le PIP ₂	33
II Trafic et maturation des canaux : implications dans les canalopathies	33
A) Synthèse et insertion des protéines dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE)	33

B)	Tétramérisation des canaux ioniques et association avec les sous-unités régulatrices.....	36
C)	La N-glycosylation	36
D)	Système de contrôle qualité.....	38
a)	Les chaperones	40
b)	La rétro-translocation des protéines	44
c)	Le système ubiquitine-protéasome	44
1)	L'ubiquitination et le transport vers le cytoplasme des polypeptides cibles.....	45
2)	Le protéasome	48
3)	ERAD (ER-associated degradation) : implications dans les canalopathies	50
E)	L'adressage des protéines vers la membrane plasmique	51
a)	La sortie des protéines du RE.....	51
b)	La sortie des protéines de l'appareil de Golgi	54
F)	Le recyclage des protéines à la membrane plasmique : endocytose	55
	Matériel et méthodes	57
A)	BIOLOGIE MOLECULAIRE	58
a)	Plasmides utilisés	58
b)	Mutagenèse	58
c)	Clonage	59
d)	Transformation des bactéries électrocompétentes	59
e)	Amplification et purification des plasmides	60
B)	CULTURE CELLULAIRE	60
a)	Les lignées cellulaires COS-7, CHO et HEK 293 :.....	60
b)	Entretien des lignées cellulaires	60
c)	Transfection et établissement de lignées stables	61
1)	Transfection transitoire.....	61
2)	Etablissement de clones stables.....	62
3)	Congélation et décongélation des cellules	62
d)	Cardiomyocytes de souris néonatales	63
1)	Isolement.....	63
2)	Transfection	63
C)	MICROSCOPIE A FLUORESCENCE	63
D)	BIOCHIMIE	64
a)	Western-blot	64
b)	Marquage métabolique au S35 : pulse-chase.....	65
c)	Immunoprécipitation	66
E)	Patch-Clamp	66
a)	Dispositif expérimental.....	66
b)	Protocole expérimental	67
	Résultats	69
I	Un motif N terminal détermine le trafic de KCNQ1. Implication dans le syndrome de Romano-Ward.	70

A)	Introduction	70
B)	Résultats et discussion	72
II	Dégradation du canal KCNQ1 sauvage et muté par la voie du protéasome et implication de la Derlin-1	76
A)	Introduction	76
B)	Matériel et méthodes	78
C)	Résultats.....	81
D)	Discussion et perspectives	91
	Conclusions	97
	Références bibliographiques	98

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

Derlin-1 : Der1-like protein 1

DTT : Dithiothréitol

EAD : Early After Depolarizations

ENaC : Epithelial Na⁺ Channel

ERAD : ER Associated Degradation

hERG : human Ether-a-gogo Related Gene

Kir: Canal K⁺ inward rectifier (à rectification entrante)

Kv : Canal K⁺ dépendant du potentiel

MiRP : MinK Related Peptide

Nav: canal Na⁺ dépendant du potentiel

PA : Potentiel d'Action

PBS :Phosphate Buffer Saline

PEI: Polyéthylèneimine

PKA: Protéine Kinase A

PKC: Protéine Kinase C

PMSF : Phényl Méthyl Sulfonyl Fluoride

RE : Réticulum Endoplasmique

SUR: Sulfonyleurea Receptor

Syndrome du QT long : SQTL

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

KvLQT1 ou Kv7.1: noms de la protéine, KCNQ1 : nom du gène,

Minimum K channel (MinK) ou Isk : noms des protéines, KCNE1 : nom du gène

KCNQ1 et KCNE1 étaient initialement les noms des gènes, il est cependant devenu d'usage de les utiliser pour les noms des protéines.

Liste des figures

Figure 1 : Topologie du canal KCNQ1	13
Figure 2 : Activité électrique cardiaque et les canaux ioniques cardiaques	16
Figure 3 : Les étapes impliquées dans la sécrétion d'ions Cl ⁻ dans les cellules épithéliales.	19
Figure 4 : Activité électrique cardiaque de surface : l'électrocardiogramme.	21
Figure 5 : Les différents types de LQT associés aux courants.	23
Figure 6 : Propriétés électrophysiologiques du courant généré par le canal KCNQ1 seul et le complexe KCNQ1-KCNE1.	28
Figure 7 : Alignement de séquences peptidiques de la partie C-terminale des cinq membres de la famille des canaux KCNQ.	31
Figure 8 : Modèle de l'insertion des domaines transmembranaires du canal KAT1.	35
Figure 9 : N-glycosylation des protéines dans le RE et dans l'appareil de Golgi	37
Figure 10 : Les étapes de la dégradation des protéines par le système de contrôle qualité.	39
Figure 11 : Le cycle calnexine-calréticuline.	41
Figure 12 : Hsp 70 et ses co-facteurs.	42
Figure 13 : Modèle de reconnaissance des protéines anormales pour qu'elles soient dégradées	43
Figure 14 : Les étapes d'ubiquitination des protéines.	46
Figure 15: Les étapes de la rétro-translocation des chaînes légères du CMH de classe I.	48
Figure 16 : Schéma du protéasome	49
Figure 17 : Transport vésiculaire des différents compartiments cellulaires.	52
Figure 18 : Les motifs arginine.	53
Figure 19: Modèle de l'endocytose du canal Na _v 1.5.	56
Figure 20 : Protocole de stimulation	68
Figure 21 : effets des mutations sur la structure tridimensionnelle.	74
Figure 22 : Les protéines mutées sont moins exprimées que la protéine sauvage à l'état stationnaire.	82
Figure 23 : KCNQ1 WT et muté néo-synthétisés en 15 minutes.	83
Figure 24 : Le KCNQ1-Y111C est dégradé plus rapidement que le canal sauvage.	84

Figure 25: Le MG 132 inhibe la dégradation du canal sauvage et Y111C.....	85
Figure 26: Ubiquitination des canaux KCNQ1 wt et KCNQ1 Y111C	87
Figure 27: KCNQ1 et Derlin-1 co-immunoprécipitent.....	88
Figure 28: Derlin-1 diminue l'expression de KCNQ1 wt et KCNQ1 Y111C à l'état stationnaire.....	89

Introduction

Avant propos

Les canaux ioniques constituent des éléments essentiels de la signalisation électrique cellulaire. Ce sont des protéines enchâssées dans la bicouche lipidique qui assurent de façon sélective la diffusion d'ions en fonction du gradient électrochimique transmembranaire. Il existe une grande diversité structurale et mécanistique au sein des canaux ioniques, chacun ayant des propriétés biophysiques et des sensibilités aux agents pharmacologiques spécifiques. Le génome humain est constitué de plus de 340 gènes qui codent des canaux ioniques. Ces protéines sont exprimées dans différents tissus et ont de nombreuses fonctions telles que l'excitabilité des cellules musculaires et nerveuses, la mémoire et l'apprentissage, la sécrétion d'hormones et la prolifération cellulaire.

Leur dysfonctionnement, en particulier lors de pathologies héréditaires, sont appelées canalopathies. La liste des canalopathies n'a cessé de s'élargir ces dernières années. Les mutations des gènes codant les canaux ioniques peuvent induire une perte de fonction du canal, c'est notamment le cas des mutations du gène *CFTR* responsable de la mucoviscidose et des mutations du gène *CLCNKB* induisant le syndrome de Bartter (Riordan, J. R. et al. 1989, Simon, D. B. et al. 1997). A l'inverse, certaines engendrent un gain de fonction, comme par exemple, les mutations du canal épithélial sodique ENaC ou le canal cardiaque $Na_v1.5$, qui sont responsables respectivement du syndrome de Liddle et du syndrome du QT long (Schild, L. et al. 1995, Wang, Q. et al. 1995).

Durant ces dix dernières années, les progrès en biologie et en génétique moléculaires ont également permis de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans un grand nombre d'arythmies cardiaques familiales. De nombreux locus et gènes ont été liés à des pathologies rythmiques cardiaques. La plupart de ces syndromes sont liés à un dysfonctionnement des canaux ioniques cardiaques,

indispensables à la dépolarisation–repolarisation et à la contraction–relaxation du muscle cardiaque.

Au cours de mon travail de thèse je me suis intéressée à l'un de ces canaux ioniques, le canal potassique KCNQ1 impliqué dans une pathologie cardiaque : le syndrome du QT long.

I Première partie : le canal KCNQ1

L'activité électrique cardiaque est le résultat de l'activation coordonnée de canaux ioniques. Le maintien d'un rythme cardiaque normal dépend de leur bon fonctionnement. Les troubles du rythme, dans leur grande majorité, sont liés à des pathologies acquises. Néanmoins, les analyses génétiques ont permis d'identifier des mutations dans les gènes codant les canaux ioniques. Le syndrome du QT long en est un exemple. Ce dernier, est caractérisé par un allongement de l'intervalle QT sur l'électrocardiogramme, il a été classé en sous-groupes en fonction du gène muté. Le syndrome du QT long de type 1, le plus fréquent, est dû à des mutations dans le gène codant le canal KCNQ1. Ce canal est associé dans le cœur, à sa sous-unité régulatrice KCNE1 (IsK) et génèrent le courant I_{Ks} responsable de la repolarisation au cours du potentiel d'action.

A) Identification et clonage de KCNQ1

Le gène codant le canal KCNQ1 n'a été cloné que tardivement (en 1996) à cause des difficultés rencontrées pour l'identification de la structure moléculaire à l'origine du courant I_{Ks} . Tout a commencé en 1988 quand Takumi et ses collègues ont cloné le gène codant la protéine IsK. Bien que ne présentant aucune caractéristique structurelle commune aux autres canaux potassiques, IsK a été initialement présentée comme un canal potassique voltage-dépendant à part entière. Sa ré-expression dans les ovocytes de xénope induit un courant dont les propriétés électrophysiologiques sont proches de celles du courant cardiaque I_{Ks} (Takumi, T. et al. 1988). La protéine a été renommée MinK pour minimum K channel, car c'était la plus petite protéine (un seul domaine transmembranaire) constituant un canal potassique décrit jusqu'alors. Cependant, dans d'autres systèmes de ré-expression, tels que les cellules CHO, MinK ne génère aucun courant (Lesage, F. et al. 1993). Les travaux du groupe de M. Lazdunski ont montré que l'expression de MinK est, en fait, à l'origine de l'activation de canaux potassiques endogènes de l'ovocyte (Attali, B. et al. 1993). Ces résultats ont donc suggéré que MinK ne serait qu'une sous-unité régulatrice de ces canaux ioniques. C'est en 1996 que cette protéine a été identifiée

et que les équipes de Wang et Barhanin ont cloné le gène *KCNQ1* (Barhanin, J. et al. 1996, Wang, Q. et al. 1996) .

B) Relation structure-fonction

KCNQ1 est un canal potassique dont la structure est similaire à celle des autres canaux potassiques voltage-dépendants (Kv). Il est donc constitué de 6 hélices α transmembranaires avec des extrémités NH_2 et COOH terminales intracytoplasmiques (figure 1). Les acides aminés chargés positivement au niveau de son 4^{ème} segment (S4) lui confèrent sa sensibilité au potentiel et la séquence d'acides aminés glycine-tyrosine-glycine (GYG) dans le pore du canal entre les segments 5 et 6 joue le rôle de filtre de sélectivité.

Depuis le clonage du gène *KCNQ1*, quatre autres gènes de la même famille de canaux ont été clonés : *KCNQ2*, *KCNQ3*, *KCNQ4* et *KCNQ5*. Pour former des canaux fonctionnels à la membrane plasmique, ces canaux s'associent en tétramère. Il a été montré que l'extrémité C-terminale et notamment le domaine A de ces canaux joue un rôle important dans leur tétramérisation (Maljevic, S. et al. 2003, Schmitt, N. et al. 2000, Schwake, M. et al. 2000, Schwake, M. et al. 2003) (figure 1). Ce domaine forme une structure particulière appelée leucine-zipper (Howard, R. J. et al. 2007). Cependant, bien que ce domaine soit commun à tous les membres de cette famille, l'association entre les différents KCNQ est spécifique. En effet, KCNQ1, contrairement aux autres KCNQ, ne forme pas d'hétérotétramère (Jentsch, T. J. et al. 2000).

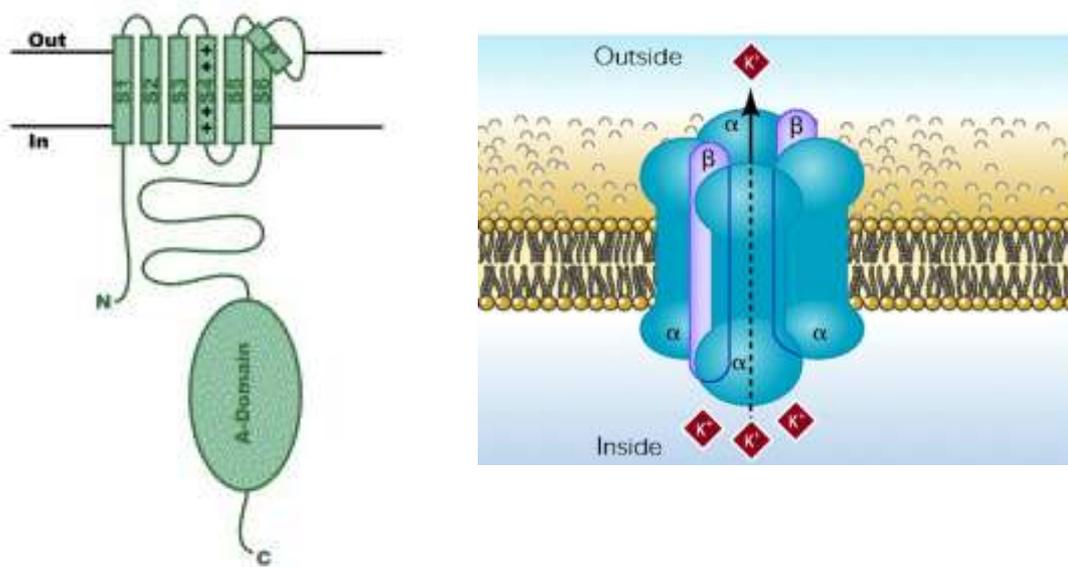


Figure 1 : Topologie du canal KCNQ1

Le canal est constitué de six segments transmembranaires (S1-S6), le pore du canal (P), le domaine A ou domaine de tétramérisation (gauche) (Howard, R. J. et al. 2007). Structure quaternaire de KCNQ1, association de quatre sous-unités α (KCNQ1) et deux sous-unités β (KCNE1) (droite) (Jespersen, T. et al. 2005).

C) Les isoformes de KCNQ1

Six variants d'épissage de KCNQ1 ont été identifiés, ces isoformes ont en commun la séquence entre les exons 2 à 15 (Lee, M. P. et al. 1997, Wang, Q. et al. 1996). L'isoforme 0 fut clonée en premier, l'équipe de Sanguinetti a montré que cette isoforme est fonctionnelle dans les systèmes de ré-expression (Sanguinetti, M. C. et al. 1996). L'identification de l'isoforme 1 a cependant permis de montrer qu'une erreur a été effectuée lors du clonage de l'extrémité 5' de l'isoforme 0. Les isoformes 1 et 2 ont été identifiées au niveau cardiaque. L'isoforme 1 (la plus longue) génère un courant potassique sortant, activé pour des valeurs de potentiel supérieur à -60mV. Ces deux isoformes diffèrent par la longueur de leur partie N-terminale. En effet, l'isoforme 2 a une extrémité N-terminale tronquée, cette isoforme n'est pas exprimée à la membrane plasmique mais est localisée dans le RE (Lee, M. P. et al. 1997, Perea, Y. et al. 2000, Yang, W. P. et al. 1997). La co-expression des deux isoformes induit une forte diminution de l'amplitude du courant, l'isoforme 2 exerce donc un effet dominant négatif sur l'isoforme 1. Cette isoforme est fortement

exprimée dans le cœur, elle représente environ 28% des ARNm totaux codant le canal KCNQ1 (Demolombe, S. et al. 1998). De manière très intéressante, le ratio des ARNm entre les isoformes 1 et 2 est différent selon les couches de la paroi du myocarde et est corrélé avec l'amplitude du courant I_{Ks} . En effet, l'isoforme 2 est plus exprimée dans les cellules du midmyocarde (32%) où l'amplitude du courant I_{Ks} est la plus faible. En revanche, dans les couches épocardique et endocardique, l'isoforme 2 représente 25% des ARNm totaux codant le canal KCNQ1 où l'amplitude du courant I_{Ks} est plus importante (Gintant, G. A. 1995, Liu, D. W. and Antzelevitch, C. 1995, Pereon, Y. et al. 2000). L'isoforme 2 pourrait donc jouer un rôle de régulateur de l'amplitude du courant I_{Ks} . Enfin, les isoformes 3, 4 et 5 ne codent probablement pas un canal potassique, du fait de l'existence de codons stop prématurés (Neyroud, N. et al. 1999, Wollnik, B. et al. 1997).

D) Rôles physiologiques

KCNQ1 est exprimé dans différents tissus et régule de nombreuses fonctions physiologiques. Les rôles les plus importants sont : la repolarisation au cours du potentiel d'action cardiaque et le transport de l'eau et des sels dans les cellules épithéliales.

a) Rôle dans le cœur

L'activité contractile du cœur permet d'irriguer tous les organes, elle est précédée et déclenchée par une activité électrique. Cette activité électrique née du nœud sinusal, zone de l'automatisme, se propage jusqu'aux ventricules en passant par les oreillettes grâce aux tissus conducteurs du cœur.

Le fonctionnement de la pompe cardiaque est assuré par l'activation de cellules contractiles et excitables hautement spécialisées : les cardiomyocytes. Les propriétés électriques de ces cellules se traduisent par la genèse et la propagation du potentiel d'action. Le PA est une dépolarisation transitoire de la membrane résultant de l'activation séquentielle des canaux ioniques. Au niveau du ventricule, le potentiel d'action comporte cinq phases successives (figure 2).

- ✓ Une phase rapide de dépolarisation ou phase 0 : le courant sodique I_{Na} est le courant responsable de cette phase. C'est un courant rapide, activé par la dépolarisation, son seuil d'activation est environ de -55 mV.
- ✓ Une phase courte de repolarisation ou phase 1 : son aspect en encoche ou « spike and dome » est associé au courant potassique I_{to} (transient outward). Ce courant est caractérisé par une activation et une inactivation rapide. Il est constitué de deux composantes $I_{to, fast}$ et $I_{to, slow}$.
- ✓ Une phase dite de plateau ou phase 2 : au cours de cette phase, il subsiste un faible courant sodique qui participe au maintien d'une légère dépolarisation. De plus pendant cette phase, les courants calciques sont activés, le courant majoritaire au niveau des ventricules est le courant $I_{ca,L}$. Son rôle principal est de permettre une entrée d'ions Ca^{2+} qui est l'élément initiateur du couplage excitation-contraction. L'entrée de calcium à travers les canaux calciques voltage-dépendants déclenche une sortie massive de calcium stocké dans le réticulum sarcoplasmique par le mécanisme de « Calcium Induced Calcium Release ». L'augmentation du calcium intracellulaire provoque l'activation des protéines contractiles et déclenche ainsi la contraction du myocarde.
- ✓ Une phase de repolarisation ou phase 3 : le courant principal activé lors de cette phase est le courant potassique retardé I_K . Il représente un facteur déterminant de la durée du potentiel d'action. Ce courant est la résultante de deux composantes principales : une composante rapide I_{Kr} ($I_{K, rapid}$) et une composante lente I_{Ks} ($I_{K, slow}$). Comme son nom l'indique, le courant I_{Kr} s'active rapidement à partir de -50 mV et atteint sa valeur maximale pour un potentiel de 0 mV. En revanche, le courant I_{Ks} s'active pour un potentiel membranaire moins négatif (vers -30 mV). Son activation est plus lente que celle du courant I_{Kr} . Les courants I_{Kr} et I_{Ks} sont générés respectivement par le canal hERG (human ether-a-go-go) (Sanguinetti, M. C. et al. 1995, Trudeau, M. C. et al. 1995) et le canal KCNQ1 associé à KCNE1 (Barhanin, J. et al. 1996, Sanguinetti, M. C. et al. 1996).
- ✓ Enfin la dernière phase ou phase 4 : cette phase correspond au retour du potentiel de membrane à sa valeur de repos. Ce potentiel diastolique est maintenu à -80 mV grâce au courant I_{K1} .

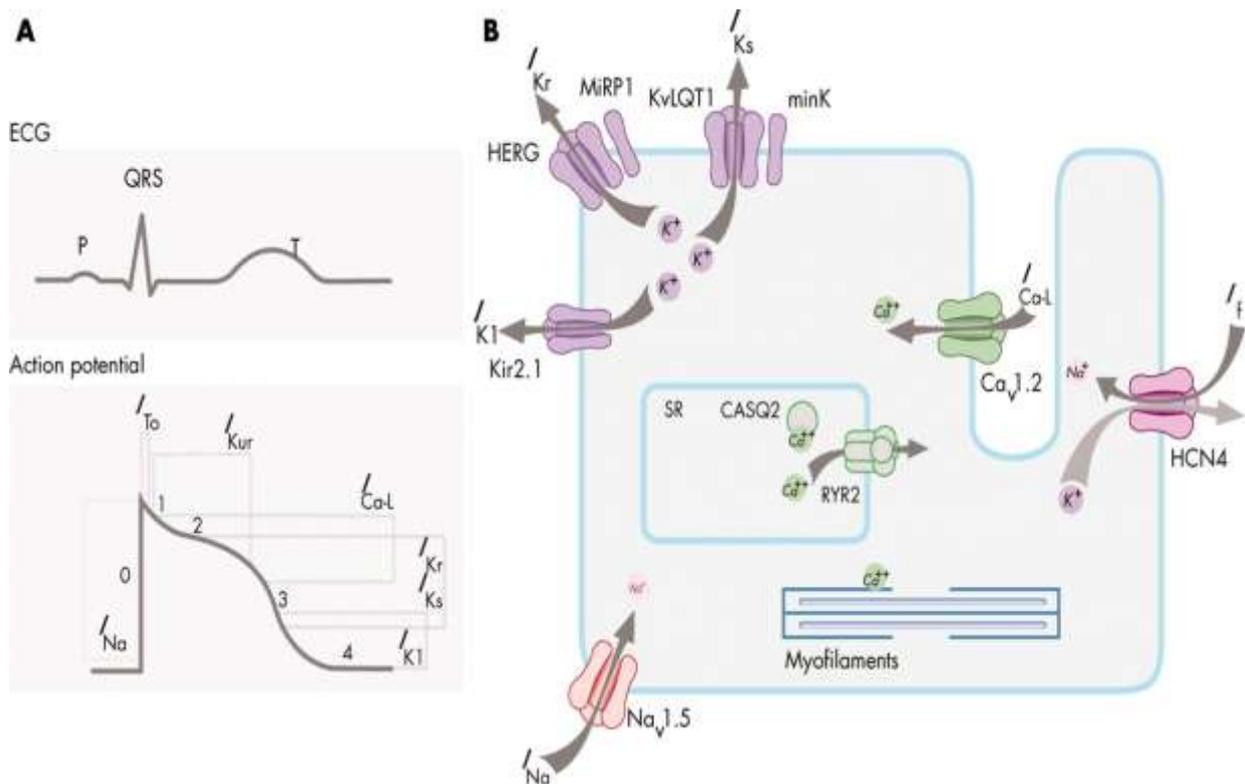


Figure 2 : Activité électrique cardiaque et les canaux ioniques cardiaques

A : électrocardiogramme de surface (haut). Schéma du potentiel d'action ventriculaire et les principaux courants intervenant lors des différentes phases (bas). **B** : représentation des canaux ioniques intervenant dans l'activité électrique et la contraction du muscle cardiaque (Wilde, A. A. and Bezzina, C. R. 2005)

b) Rôles dans les cellules épithéliales

En plus de son rôle dans la repolarisation cardiaque, KCNQ1 est exprimé dans les cellules épithéliales. L'épithélium est le siège d'échanges d'électrolytes entre l'environnement extérieur et le milieu intérieur. Contrairement aux cardiomyocytes, les cellules épithéliales sont polarisées : elles possèdent une membrane apicale et une membrane baso-latérale. Les canaux potassiques épithéliaux permettent de maintenir le potentiel membranaire et participent aux phénomènes d'absorption et de sécrétion.

1) *L'oreille interne*

Les variations de la pression de l'air déclenchées par les ondes sonores provoquent des mouvements de l'endolymphe dans l'oreille interne et induisent le déplacement des cils des cellules sensorielles de la cochlée. Les cellules ciliées transforment ces mouvements en messages nerveux (potentiels d'action), qu'elles transmettent au nerf cochléaire qui véhicule ces informations jusqu'au cerveau.

Les cellules épithéliales de l'oreille interne ont pour rôle de sécréter l'endolymphe. Cette solution extracellulaire est unique car, d'une part, elle possède une haute concentration en potassium (environ 150mM) équivalente à celle du milieu intracellulaire, et d'autre part, le potentiel endochocléaire est au voisinage de +80mV. Plusieurs groupes se sont intéressés à identifier les canaux potassiques responsables de la sécrétion de potassium endolympatique (Marcus, D. C. et al. 1992, Takeuchi, S. et al. 1992a, Takeuchi, S. et al. 1992b). C'est l'étude de Shen et Marcus qui a permis de mettre en évidence la participation du courant I_{Ks} dans la sécrétion de potassium (Marcus, D. C. and Shen, Z. 1994). Une étude plus récente, a montré que le complexe KCNQ1-KCNE1 est localisé au niveau de la membrane apicale des cellules impliquées dans la sécrétion de l'endolymphe : les cellules sombres vestibulaires et les cellules marginales (Nicolas, M. et al. 2001).

Le maintien de cette forte concentration en potassium est essentiel pour assurer une bonne mécanotransduction. En effet, les souris invalidées pour le gène *KCNE1*, développent un défaut de sécrétion des cellules vestibulaires et marginales induisant ainsi une surdité (Vetter, D. E. et al. 1996). De plus, des mutations perte de fonction des gènes codant les protéines KCNQ1 ou KCNE1 responsables du syndrome du QT long congénital, induisent également une surdité bilatérale (Neyroud, N. et al. 1997). Nous y reviendrons dans le paragraphe 'syndrome du QT long'.

2) *L'estomac : sécrétion gastrique d'ions H⁺*

Les cellules épithéliales gastriques sont responsables de la sécrétion de protons dans la lumière de l'estomac afin de diminuer le pH. Cette acidification du milieu est réalisée par la sortie d'ions H^+ à travers la pompe H^+-K^+ ATPase située sur la membrane apicale de ces cellules. Le canal KCNQ1 est exprimé dans les cellules pariétales de l'estomac et est impliqué dans le recyclage d'ions potassium et donc indirectement dans la sécrétion gastrique (Dedek, K. and Waldegger, S. 2001,

Grahammer, F. et al. 2001). L'inhibition du canal KCNQ1 abolit la sécrétion d'acide *in vivo* et *in vitro* et les souris KO (knock-out) pour le canal KCNQ1 développent une hypertrophie gastrique associée à un défaut de sécrétion de protons (Grahammer, F. et al. 2001, Lee, M. P. et al. 2000). Les trois sous-unités régulatrices : KCNE1, KCNE2 et KCNE3 sont exprimées dans l'estomac. Il est cependant plus vraisemblable que le canal KCNQ1 s'associe avec la sous-unité régulatrice KCNE2, car elle y est plus fortement exprimée (Dedek, K. and Waldegger, S. 2001).

3) *Le colon et l'intestin grêle*

Au niveau des cellules sécrétrices, l'entrée d'ions Cl^- se fait grâce à un co-transporteur $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$ situé dans la membrane baso-latérale. Ces ions Cl^- vont pouvoir sortir dans la lumière du colon et de l'intestin grêle à travers des canaux situés au niveau de la membrane apicale de ces cellules (figure 3). Cette sécrétion est maintenue grâce à un courant potassique activé par l'AMPc permettant le recyclage permanent de potassium. KCNQ1 a semblé être un bon candidat. En effet, l'ARNm KCNQ1 est exprimé dans le colon et l'intestin grêle où il semble être associé à KCNE3 (Schroeder, B. C. et al. 2000). Cependant, une autre étude a montré que bien que les protéines KCNQ1 et KCNE3 soient exprimées dans le colon, l'inhibition du courant issu du complexe KCNQ1-KCNE3 ne supprime pas totalement le courant Cl^- , suggérant l'intervention d'autres courants potassiques (Liao, T. et al. 2005).

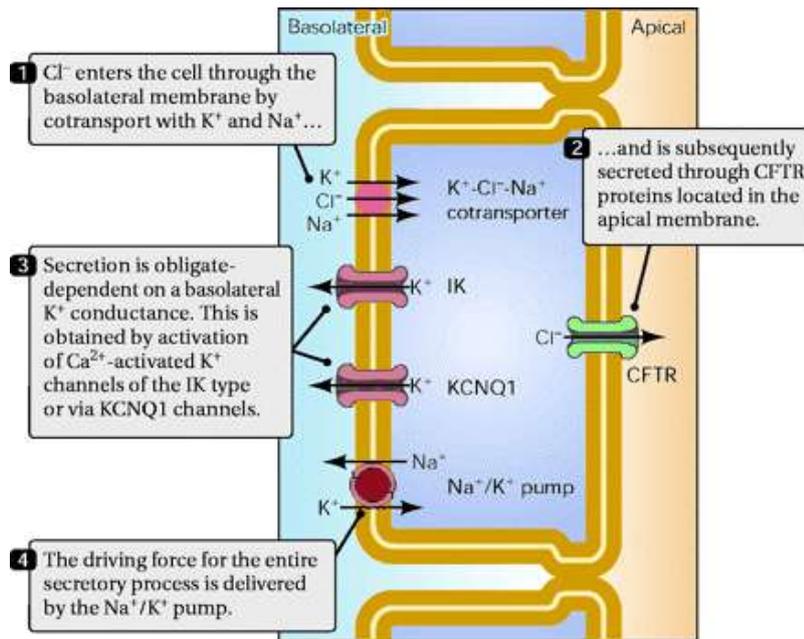


Figure 3 : Les étapes impliquées dans la sécrétion d'ions Cl⁻ dans les cellules épithéliales.

Description des étapes de la sécrétion d'ions Cl⁻ dans les cellules épithéliales et rôle du canal KCNQ1 dans le recyclage du potassium (Jespersen, T. et al. 2005).

4) Le pancréas

Le pancréas est une glande exocrine responsable de la sécrétion d'enzymes, d'eau et d'ions. Comme pour le colon et l'intestin grêle, la sécrétion des ions Cl⁻ nécessite le recyclage de potassium par l'intermédiaire du canal KCNQ1. En revanche dans le pancréas, ce canal KCNQ1 semble plutôt s'associer à la sous-unité KCNE1. En effet, un courant potassique proche de celui du courant I_{Ks} cardiaque semble être impliqué dans la sécrétion d'ions Cl⁻ (Kottgen, M. et al. 1999). De plus, les ARNm codant les protéines KCNQ1 et KCNE1 sont exprimés dans les cellules du pancréas (Demolombe, S. et al. 2001). L'invalidation de l'expression de la protéine KCNE1 chez les souris, induit une diminution de l'expression membranaire de KCNQ1 au niveau de la membrane baso-latérale des cellules pancréatiques (Warth, R. and Barhanin, J. 2002).

5) Les autres tissus

KCNQ1 est également exprimé dans l'épithélium respiratoire, il intervient dans le recyclage du potassium comme dans le colon et l'intestin grêle (Mall, M. et al. 2000). KCNQ1 est associé dans le rein avec sa sous-unité régulatrice KCNE1 au niveau des tubules proximal et distal du néphron (Vallon, V. et al. 2001). La fonction rénale de KCNQ1 n'a pas encore été déterminée. Cependant, les souris KO KCNE1 présentent une hypokaliémie et des troubles rénaux suggérant que le complexe KCNQ1-KCNE1 joue un rôle important dans la fonction rénale (Vallon, V. et al. 2001, Warth, R. and Barhanin, J. 2002).

E) Pathologies liées à KCNQ1

a) Mutations perte de fonction : le syndrome du QT long congénital

1) Historique

Le syndrome du QT long congénital est une pathologie rare, elle a été décrite pour la première fois par Jervell et Lange-Nielsen en 1957. Dans leur étude, les auteurs décrivent une famille dont certains membres sont atteints de surdité bilatérale et d'un allongement de l'intervalle QT sur l'électrocardiogramme. Ils constatent également une forte proportion de mort subite dans cette famille. Le syndrome qu'ils décrivent, qui portera leurs noms, correspond à la forme héréditaire transmise sur un mode autosomique récessif du syndrome du QT long (Jervell, A. and LANGE-NIELSEN, F. 1957). Le variant Romano-Ward du syndrome du QT long congénital a été décrit par Romano puis Ward. C'est en 1964 que Ward a décrit une famille dont la fratrie présentait un allongement de l'intervalle QT (Ward, O. C 1964). Les patients ne présentaient pas de surdité associée, ce qui semblait dire que ce syndrome était différent de celui décrit précédemment. En parallèle, Romano et son équipe ont décrit de nombreuses familles dont certains membres avaient le même phénotype (Romano, C 1965). Le syndrome de Romano-Ward est beaucoup plus fréquent que

le syndrome Jervell et Lange-Nielsen puisqu'il correspond à plus de 90% des cas de syndrome du QT long congénital qui est transmis selon un mode dominant.

2) Description et symptômes

Le syndrome du QT long est une pathologie cardiaque caractérisée par un allongement de l'intervalle QT observé sur l'électrocardiogramme qui témoigne d'une anomalie de la repolarisation (figure 4). Cet intervalle correspond à la durée séparant le début et la fin de la repolarisation des ventricules. Chez l'Homme, la limite supérieure de l'espace QT normal, corrigé en fonction de la fréquence cardiaque ($QTc = QT / \sqrt{RR}$) selon la formule de Bazett, a été fixée à 440ms. Un sujet atteint a donc un QTc supérieur à 440ms. Le diagnostic de cette pathologie se fait très tôt au cours de la vie car les sujets jeunes font, dans certaines conditions (exercice physique, stress, émotion, prise de médicaments), des syncopes, pouvant conduire à la mort subite. Ces syncopes sont dues à des épisodes de tachycardies ventriculaires polymorphes (torsades de pointes). Ces torsades de pointes sont induites par des activités déclenchées liées à l'apparition de post-dépolarisations précoces : les EAD (Early After Depolarization).

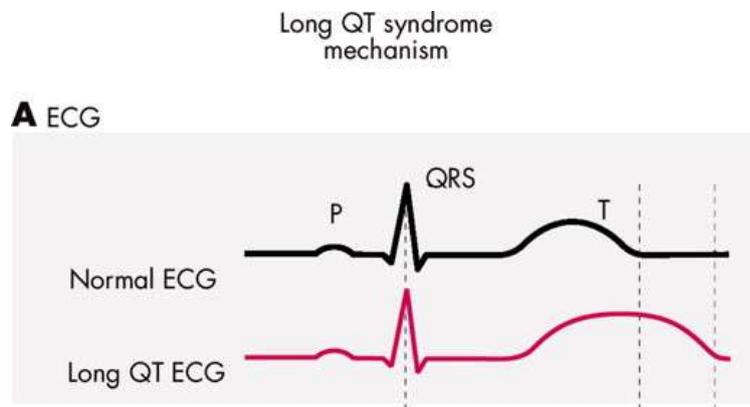


Figure 4 : Activité électrique cardiaque de surface : l'électrocardiogramme.

Le tracé en noir représente un enregistrement normal et le tracé rouge est caractérisé par un allongement de l'intervalle QT (Wilde, A. A. and Bezzina, C. R. 2005).

Sur la base des données cliniques, deux types de syndrome du QT long ont été distingués : les formes congénitales et les formes acquises. Les méthodes d'analyse

de liaisons génétiques ont permis de mettre en évidence des mutations dans les gènes codant des canaux ioniques cardiaques, leurs sous-unités régulatrices ou une protéine d'ancrage.

3) *Les bases moléculaires du syndrome du QT long*

Le syndrome du QT long semblait être lié à un seul gène jusqu'à la découverte de plusieurs loci en relation avec ce syndrome. Cette observation a montré l'hétérogénéité génétique de ce syndrome sans pour autant déterminer les gènes impliqués (Curran, M. et al. 1993, Jiang, C. et al. 1994, Kanki, H. et al. 2004, Keating, M. et al. 1991). Se basant sur le fait que cette pathologie est liée à une anomalie de la repolarisation ventriculaire, de nombreuses équipes ont utilisé l'approche d'analyse de liaisons avec comme gènes candidats les canaux ioniques cardiaques et leurs sous-unités régulatrices. Dans un premier temps, trois gènes codant des canaux ioniques ont été identifiés : le gène *KCNQ1* codant le canal $KCNQ1$, *KCNH2* codant le canal potassique hERG responsable du courant I_{Kr} et le gène *SCN5A* codant la protéine $Na_v1.5$ responsable du courant I_{Na} (Curran, M. E. et al. 1995, Wang, Q. et al. 1995, Wang, Q. et al. 1996). Des mutations au niveau de ces gènes sont responsables du syndrome du QT long de type 1, 2 et 3 (tableau 1). Des mutations au niveau des gènes codant les sous-unités régulatrices *KCNE1* et *KCNE2* sont également impliquées dans le syndrome du QT long (Abbott, G. W. et al. 1999, Splawski, I. et al. 1997). Un locus supplémentaire a été identifié dans de nombreuses familles par l'équipe de génétique du laboratoire (Schott, J. J. et al. 1995). C'est huit ans plus tard que le gène correspondant a été identifié, il s'agit du gène codant une protéine d'ancrage impliquée dans l'organisation cellulaire et la signalisation calcique : l'ankyrine B (Mohler, P. J. et al. 2003).

D'autres canalopathies sont associées à un allongement de l'intervalle QT, il s'agit du syndrome d'Andersen (ou LQT7) et le syndrome de Timothy (ou LQT8). Le LQT7 est lié à des mutations au niveau du gène *KCNJ2* et le LQT8 est lié à des mutations au niveau du gène *CACNA1*. Contrairement au syndrome du QT long, les patients atteints de ces deux pathologies, en plus des troubles de la repolarisation, souffrent de nombreux désordres affectant plusieurs systèmes (le système immunitaire, le système nerveux et des atteintes du muscle squelettique).

Nomenclature, gene names, and proteins associated with LQTS

Disease	Gene (historical name)	Protein
LQT1	<i>KCNQ1</i> (KVLQT1)	I_{Ks} K ⁺ channel α subunit
LQT2	<i>KCNH2</i> (HERG)	I_{Kr} K ⁺ channel α subunit
LQT3	<i>SCN5A</i>	I_{Na} Na ⁺ channel α subunit
LQT4	<i>ANKB</i>	Ankyrin-B
LQT5	<i>KCNE1</i> (minK)	I_{Ks} K ⁺ channel β subunit
LQT6	<i>KCNE2</i> (MiRP1)	I_{Kr} K ⁺ channel β subunit
LQT7	<i>KCNJ2</i>	I_{K1} K ⁺ channel α subunit
LQT8	<i>CACNA1</i>	Cav1.2 Calcium channel α subunit

Tableau 1 : Classification des différents types du syndrome du QT long selon le gène muté (Moss, A. J. and Kass, R. S. 2005).

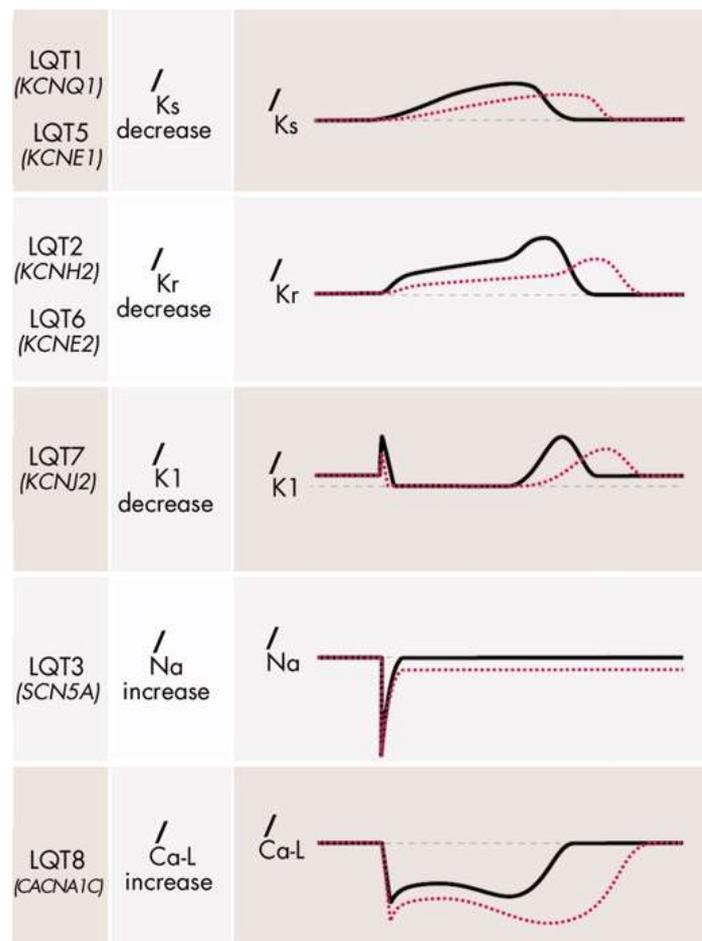


Figure 5 : Les différents types de LQT associés aux courants.

La courbe en noir représente le courant normal et la courbe en pointillé rouge le courant généré par le canal muté (Wilde, A. A. and Bezzina, C. R. 2005).

L'allongement de l'intervalle QT reflète un allongement du temps nécessaire pour la repolarisation ventriculaire. De ce fait, les courants induisant la repolarisation sont diminués (courants I_{Kr} , I_{Ks} , I_{K1}) alors que les courants qui favorisent un allongement sont augmentés (I_{Na} , I_{Ca}) (figure 5).

Plusieurs études ont suggéré une corrélation entre le phénotype et le génotype. Se basant sur l'étude d'une population de 400 patients génotypés, Schwartz et ses collaborateurs ont montré que les évènements déclenchant les accidents cardiaques étaient différents selon le type de LQT. Les patients atteints du syndrome du QT long de type 1 déclenchent un accident cardiaque durant un exercice physique ou à l'occasion d'un stress, alors que pour les patients LQT3, les arythmies surviennent majoritairement au repos (Schwartz, P. J. et al. 2001b). La durée de l'intervalle QTc est similaire dans les trois formes les plus fréquentes du syndrome du QT long (LQT1, LQT2 et LQT3), en revanche, il est possible de les distinguer par les différences de morphologie de l'onde T sur le tracé électrocardiographique (Moss, A. J. et al. 1995, Zareba, W. 2006).

4) *Les traitements*

Les β -bloquants sont des agents qui bloquent les récepteurs β -adrénergiques ; ils représentent le traitement de choix des patients atteints du syndrome de QT long. Ces agents pharmacologiques comme le nadolol ou le propranolol ont un effet bénéfique en ralentissant les battements cardiaques et en diminuant la force de contraction du myocarde empêchant ainsi la survenue des arythmies. Une étude réalisée sur une cohorte de patients a montré que ce traitement réduisait de manière significative la survenue d'arythmies (Moss, A. J. et al. 2000). D'autres traitements sont également utilisés, comme la pose d'un pace-maker pour prévenir la bradycardie, mais qui est le plus souvent associée à un traitement avec des β -bloquants (Viskin, S. 2000). Lorsque ni la thérapie β -bloquant, ni la stratégie de stimulation ne s'avèrent efficaces, il est possible d'effectuer la dénervation sympathique du cœur gauche. Il s'agit de l'ablation de certains ganglions thoraciques assurant son innervation sympathique. Une étude comprenant 174 patients a montré l'efficacité à long terme de la dénervation avec notamment une diminution de la

survenue d'arythmies (Schwartz, P. J. et al. 2004). L'implantation d'un défibrillateur automatique est également utilisée pour le traitement des patients sévères (Groh, W. J. et al. 1996).

Les études génétiques ont suggéré de nouvelles approches thérapeutiques (Chiang, C. E. and Roden, D. M. 2000). Ainsi, les bloqueurs des canaux sodiques (mexiletine et lidocaïne) peuvent prévenir l'ouverture répétitive de ces canaux et donc raccourcir l'intervalle QT, avec cependant, plus d'efficacité pour les patients LQT3 par rapport aux LQT1 et LQT2 (Schwartz, P. J. et al. 1995). Une étude a suggéré que l'augmentation de la concentration en potassium dans le sérum, l'injection intraveineuse de chlorure de potassium et un régime enrichi en potassium induisent une diminution de 24% de la durée de l'intervalle QT chez 7 patients atteints de LQT2 (Etheridge, S. P. et al. 2003).

b) Mutations gain de fonction

1) *Syndrome du QT court*

Le syndrome du QT court est un désordre cardiaque moins fréquent et moins étudié que le syndrome du QT long. Ce syndrome n'a été que récemment décrit comme une entité clinique à part entière (Gussak, I. et al. 2000). Il se caractérise comme son nom l'indique par un raccourcissement de l'intervalle QT sur un électrocardiogramme ($QT_c < 300\text{ms}$) et une forte prévalence de syncopes et de mort subite.

Depuis sa description phénotypique, de nombreuses équipes, ont montré que, comme dans le syndrome du QT long, des mutations des gènes codant les canaux ioniques pouvaient être responsables de ce syndrome. L'étude de trois familles présentant un syndrome du QT court transmis de génération en génération a permis d'identifier deux mutations faux-sens aboutissant à la même substitution N588K au niveau du pore du canal hERG (Brugada, R. et al. 2004). L'étude fonctionnelle a montré que cette mutation induit un gain de fonction de la protéine mutée. De plus, le courant hERG N588K semble intervenir de façon plus précoce au cours du potentiel d'action comparé au courant I_{Kr} sauvage. Dans la troisième famille incluse, aucune mutation sur hERG n'a pu être mise en évidence suggérant une hétérogénéité génétique. Une étude au laboratoire a permis de montrer, pour la première fois,

qu'une mutation dans le gène codant le canal KCNQ1 est responsable de ce syndrome (Bellocq, C. et al. 2004). Cette mutation a été identifiée chez une famille, il s'agit de la mutation V307L. L'étude fonctionnelle, a montré que cette mutation induit un gain de fonction du canal.

2) *Fibrillation auriculaire*

La fibrillation auriculaire (FA) est l'arythmie cardiaque la plus fréquente dans la population générale, elle affecte 2% de la population. L'existence de familles au sein desquelles un grand nombre de personnes est affecté laisse supposer qu'il existe un ou plusieurs substrats génétiques.

Une mutation dans le gène codant le canal KCNQ1 a été identifiée dans une famille chinoise. Cette mutation se traduit par une substitution S140G dans le premier segment transmembranaire de KCNQ1 (Chen, Y. H. et al. 2003). La ré-expression de cette protéine mutée dans les cellules COS-7, génère un courant dont l'amplitude est multipliée par un facteur 3 par rapport au courant sauvage, son activation et sa désactivation sont quasiment instantanées. Il est surprenant que cette étude ne mentionne pas un raccourcissement de l'intervalle QT. Ceci pourrait être expliqué par le fait que l'arythmie auriculaire pourrait induire, au niveau des ventricules, un remodelage électrique compensant l'augmentation du courant I_{Ks} au niveau des ventricules.

F) *Partenaires et régulateurs*

Jusqu'à présent, toutes les études effectuées ont montré que le canal KCNQ1 n'est jamais exprimé seul, mais fonctionne, au contraire, au sein d'un complexe canalaire. Ce canal est associé à des protéines partenaires permettant de réguler sa fonction.

a) Les sous-unités régulatrices : les protéines KCNE

1) *Propriétés électrophysiologiques*

La famille des protéines KCNE comprend 5 membres : KCNE1 à KCNE5 (KCNE1 est aussi appelée Mink ou IsK et KCNE2 à KCNE5 sont appelées MiRP1 à MiRP4).

KCNE1 fut le premier membre identifié, puis, l'équipe de Goldstein, par similarité structurale a identifié les autres membres en les nommant MiRP pour minK-Related Peptide (Abbott, G. W. and Goldstein, S. A. 1998, Takumi, T. et al. 1988). Ce sont des protéines de type 1, constituées d'un seul segment transmembranaire, une extrémité N-terminale extracellulaire et une extrémité C-terminale intracellulaire.

Ces protéines s'associent avec de nombreux canaux potassiques comme le canal hERG, Kv1, Kv2, Kv3 et Kv4. Cependant, seul le canal KCNQ1 est connu pour interagir avec tous les KCNE dans les systèmes de ré-expression (Abbott, G. W. and Goldstein, S. A. 1998).

a) KCNE1

KCNE1 a été la première sous-unité β décrite pour le canal KCNQ1. L'association de ces deux protéines génère le courant I_{Ks} (Barhanin, J. et al. 1996, Sanguinetti, M. C. et al. 1996). La co-expression de KCNQ1 et KCNE1 dans les cellules de mammifère induit un courant dépendant du potentiel, présentant une cinétique d'activation beaucoup plus lente que celle du courant KCNQ1 exprimé seul (figure 6). De plus, KCNE1 supprime l'inactivation du courant généré par KCNQ1 seul (Tristani-Firouzi, M. and Sanguinetti, M. C. 1998). L'amplitude du courant macroscopique générée par le complexe KCNQ1-KCNE1 est environ quatre fois supérieure à celle générée par KCNQ1 seul ; cet effet a plusieurs origines : 1) la conductance unitaire est augmentée de 4 à 7 fois en présence de KCNE1 (Pusch, M. 1998, Sesti, F. and Goldstein, S. A. 1998, Yang, Y. and Sigworth, F. J. 1998) ; 2) la suppression de l'inactivation par la sous-unité KCNE1 augmente le courant macroscopique. 3) KCNE1 pourrait probablement avoir un effet sur le trafic de KCNQ1 et augmenter la densité de canaux à la membrane.

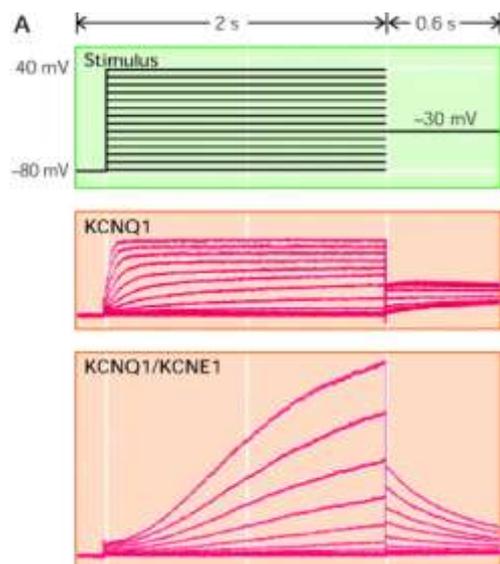


Figure 6 : Propriétés électrophysiologiques du courant généré par le canal KCNQ1 seul et le complexe KCNQ1-KCNE1.

La mesure du courant est effectuée sur des cellules HEK 293 transfectées avec KCNQ1 ou KCNQ1-KCNE1 par la technique de patch-clamp. Le protocole de stimulation est indiqué en haut (Jespersen, T. et al. 2005).

b) Les autres KCNE

KCNE2 (MiRP1) a été initialement décrite comme étant la sous-unité régulatrice du canal hERG (Abbott, G. W. et al. 1999). Barhanin et ses collaborateurs ont montré que KCNE2 est également une protéine partenaire de KCNQ1. La co-expression de KCNQ1 et KCNE2 induit un courant qui a une activation instantanée et une désactivation très rapide et de manière surprenante, KCNE2 induit une forte diminution de l'amplitude du courant (Tinel, N. et al. 2000). KCNE3, quant à lui, a été cloné par homologie avec KCNE1. La coexpression de KCNQ1 et KCNE3 induit un courant instantané qui s'active à des potentiels plus négatifs que le courant généré par le canal KCNQ1 seul (Schroeder, B. C. et al. 2000). Les effets et le rôle du quatrième membre de cette famille, KCNE4 restent controversés. D'une part, il a été montré que KCNE4 diminue fortement l'amplitude du courant généré par KCNQ1 sans modifier les paramètres électrophysiologiques (Grunnet, M. et al. 2005, Kagan, A. et al. 2002). D'autre part, Bendahhou et coll ont montré que la co-expression de KCNE4 ou de KCNE5 avec KCNQ1 génère un courant qui s'active à des potentiels très positifs (Bendahhou, S. et al. 2005).

2) *Stœchiométrie et zones d'association*

La stœchiométrie entre le canal KCNQ1 et les sous-unités régulatrices KCNE n'est pas clairement caractérisée. Wang et Goldstein ont suggéré l'association d'un canal KCNQ1 avec deux sous-unités KCNE1, en se basant sur le fait que la co-expression d'une quantité équivalente de KCNE1 sauvage et de KCNE1 muté dans les ovocytes de xénope supprime le courant I_{Ks} (Wang, K. W. and Goldstein, S. A. 1995). Cette hypothèse a récemment été confirmée par Chen et collaborateurs (Chen, H. et al. 2003). En revanche d'autres études ont suggéré une stœchiométrie variable allant de 4 à 14 monomères de KCNE1 (Tzounopoulos, T. et al. 1995, Wang, W. et al. 1998a).

Plusieurs études se sont attachées à comprendre comment la co-expression de KCNQ1 avec KCNE1 ou KCNE3 induit des courants ayant des propriétés aussi différentes, et quel domaine ou séquence de ces sous-unités régulatrices sont responsables de cette spécificité. L'utilisation de protéines chimères entre KCNE1 et KCNE3 a permis d'identifier trois acides aminés responsables de cette spécificité. En effet, la substitution au niveau du segment transmembranaire de KCNE1, des trois acides aminés 57-FTL-59 (phénylalanine, thréonine, leucine) par la séquence correspondante sur KCNE3 (TVG, thréonine, valine, glycine), induit un courant de type KCNQ1-KCNE3 et inversement (Melman, Y. F. et al. 2002).

De nombreuses études se sont intéressées à identifier les zones du canal KCNQ1 qui interagissent avec les protéines KCNE. Deux études ont montré que le pore, le segment S6 et la partie C-terminale sont essentiels et suffisants pour l'interaction avec KCNE1 et KCNE3 (Melman, Y. F. et al. 2004, Panaghie, G. et al. 2006). Certaines mutations responsables du syndrome du QT long sont situées dans cette région, et empêchent l'interaction avec la sous-unité régulatrice KCNE1 (Priori, S. G. et al. 1998, Thomas, D. et al. 2005). C'est notamment le cas de la mutation delta-F339, située dans le segment S6. Cette mutation diminue l'amplitude du courant induit par le canal KCNQ1. En revanche, la co-expression avec KCNE1, n'a aucun effet sur le courant suggérant que le canal KCNQ1 n'interagit plus avec la sous-unité KCNE1 (Thomas, D. et al. 2005).

b) Calmoduline

La calmoduline (CaM) possède des sites de fixation au calcium et module l'activité de nombreuses protéines telles que les canaux ioniques en activant les calcium-calmoduline kinases (CaMK) ou des phosphatases (Pitt, G. S. 2007). Il a été montré que la CaM interagit avec des protéines qui ont des motifs peptidiques particuliers comme le motif IQ, le motif 1-8-14 et le motif 1-5-10 (Rhoads, A. R. and Friedberg, F. 1997).

Par la technique de double hybride, il a été montré, que les canaux KCNQ s'associent avec la CaM par l'intermédiaire de leur extrémité C-terminale (Yus-Najera, E. et al. 2002). Trois sites d'association ont été identifiés, il s'agit du motif IQ et de deux motifs 1-5-10 (figure 7)

A l'inverse des canaux KCNQ2,3,4, la sensibilité du canal KCNQ1 (et du courant I_{Ks}) au calcium reste encore un sujet controversé. Certaines études ont suggéré que le calcium augmente l'amplitude du courant alors que d'autres indiquent un effet inhibiteur (Kerst, G. et al. 2001, Shen, Z. and Marcus, D. C. 1998). Cette variabilité de sensibilité au calcium dans les différents systèmes physiologiques a incité l'équipe de Shapiro à étudier le rôle fonctionnel de la CaM. Cette étude a montré que l'expression de la CaM dans les cellules CHO (Chinese hamster ovary) ne modifie pas l'amplitude du courant I_{Ks} . De plus, le complexe KCNQ1-KCNE1 ne semble pas être sensible aux variations du calcium (Gamper, N. et al. 2005). Récemment deux groupes se sont intéressés au rôle fonctionnel de la CaM sur le canal KCNQ1. Ces deux études ont confirmé l'interaction entre le canal KCNQ1 et la CaM et ont montré que la CaM, contrairement à l'étude précédente, confère la sensibilité au calcium du complexe KCNQ1-KCNE1. Ces divergences de résultats peuvent être dues aux modèles d'étude. Ils ont également montré que la calmoduline aurait un rôle dans l'assemblage en tétramère du canal (Ghosh, S. et al. 2006, Shamgar, L. et al. 2006).

A		B	
KCNQ1	AASLI IQ TAWRCYAAENPDS	KCNQ1	EHHRAT IKVIRRMQYFVAKKKFQQARK
KCNQ2	AAGLI IQ SAWRFYATNLSRT	KCNQ2	PGLKVS IRAVCVMRFLVSKRKFESLR
KCNQ3	AAEL IQ AAWRYYATNPRI	KCNQ3	PTLKA AIRAVRILQFRLYKKKFKETLR
KCNQ4	AANLI IQ SAWRLYSTDMSRA	KCNQ4	PTLKA AIRSRIRILKFLVAKRKFKETLR
KCNQ5	AANLI IQ CVWRSYAADEKSV	KCNQ5	PPLKT VIRAIRIMKFBVAKRKFKETLR
IQ motif	xxxx IQ xxx RxxxxRxxxx	1-5-10	xx LxxxxIxxxxVxxxx
		1-5-10	xxx MxxxxVxxxxFxxxx

Figure 7 : Alignement de séquences peptidiques de la partie C-terminale des cinq membres de la famille des canaux KCNQ.

A le motif IQ **B** le motif 1-5-10 (les acides aminés en gras indiquent les acides aminés constituant les deux motifs) (Yus-Najera, E. et al. 2002).

c) Yotiao et la régulation β adrénergique (PKA)

L'activité électrique du cœur est régulée par le système nerveux sympathique (SNS). La stimulation du SNS en réponse à un exercice physique ou à un stress provoque l'accélération du rythme cardiaque et un raccourcissement de la durée du potentiel d'action cardiaque. Le contrôle de l'activité électrique du cœur par le SNS est réalisé par l'activation des récepteurs β adrénergiques qui régulent l'activité des canaux ioniques cardiaques par leur phosphorylation. Le courant I_{Ks} est régulé par le système nerveux sympathique, la stimulation des récepteurs β adrénergiques induit l'augmentation de l'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) et donc l'activation de la Protéine Kinase A (PKA) qui phosphoryle KCNQ1. Cette phosphorylation induit une augmentation de l'amplitude du courant I_{Ks} , un décalage de la courbe d'activation vers les potentiels plus négatifs et un ralentissement de la désactivation (Terrenoire, C. et al. 2005).

La phosphorylation de KCNQ1 nécessite la présence de protéines AKAP (A Kinase Anchoring Protein) (Marx, S. O. et al. 2002, Potet, F. et al. 2001). Ces protéines possèdent des sites de fixation à la PKA, la protéine phosphatase 1 (PP1), la Protéine Kinase C (PKC) et à d'autres protéines de signalisation. Kass et son équipe ont montré que l'AKAP Yotiao se fixe au canal KCNQ1 par l'intermédiaire du motif leucine-zipper au niveau de l'extrémité C-terminale du canal et induit sa phosphorylation sur le résidu sérine 27 au niveau de l'extrémité N-terminale (Marx, S. O. et al. 2002). Yotiao possède un site de fixation à la protéine kinase A et la protéine

phosphatase 1. Yotiao permet donc le confinement à proximité du canal, de l'environnement nécessaire pour sa régulation par la PKA.

La phosphorylation de KCNQ1 ne semble pas dépendre de l'absence ou de la présence de KCNE1. Cependant en absence de la sous-unité KCNE1, la phosphorylation de KCNQ1 n'a pas d'effet sur le courant (Kurokawa, J. et al. 2003).

d) Nedd4.2 et SGK1 : endocytose et exocytose de KCNQ1

1) *Endocytose (Nedd4.2)*

Nedd4-2 a été identifiée comme étant un partenaire du canal, par la technique de pull-down (Jespersen, T. et al. 2007). Nedd4-2 est une ubiquitine ligase permettant l'ubiquitination de certaines protéines localisées au niveau de la membrane plasmique et notamment le canal sodique cardiaque $Na_v1.5$ (van Bemmelen, M. X. et al. 2004). La sur-expression de cette protéine induit une diminution de l'amplitude du courant I_{Ks} en augmentant l'endocytose du complexe KCNQ1-KCNE1 exprimé dans les cellules HEK293. En revanche, la sur-expression de Nedd4-2 CS dont l'activité catalytique est inactivée induit, à l'inverse, une augmentation de l'expression membranaire et une augmentation de l'amplitude du courant dans les cellules HEK293 et dans les cardiomyocytes de cobaye (Jespersen, T. et al. 2007).

2) *L'exocytose (SGK1)*

Une étude a montré que l'exocytose du complexe KCNQ1-KCNE1 est activée par la kinase SGK1 (serum-glucocorticoid-inductible kinase1). En effet, la co-expression du complexe canalaire et cette kinase induit une augmentation de l'amplitude du courant sans modification des propriétés biophysiques du courant. Ce résultat est corrélé avec une augmentation de l'expression membranaire du canal KCNQ1. En revanche, l'expression d'une forme inactive de cette kinase n'a aucun effet sur l'amplitude du courant (Seeböhm, G. et al. 2007). De plus, cette étude a permis de caractériser la voie de signalisation à l'origine de l'exocytose de complexe canalaire. Suite à un stress, l'activation de la kinase SGK1 induit la phosphorylation de la protéine PIKfyve (phosphoinositol 3-phosphate 5-kinase), une autre kinase. Ce complexe induit une

augmentation du 3,5-PIP₂ (phosphatidyl inositol-3,5-bisphosphate) qui à son tour induit l'exocytose de KCNQ1-KCNE1 via la voie rab11 (Seebohm, G. et al. 2007).

e) Régulation par le PIP₂

Le phosphatidyl inositol-4,5-bisphosphate (4,5-PIP₂) est un phospholipide majeur dans la signalisation cellulaire, il régule de nombreux canaux et transporteurs (Hilgemann, D. W. et al. 2001, Shyng, S. L. et al. 2000). Une étude effectuée au laboratoire a montré que le complexe KCNQ1-KCNE1 est régulé par le PIP₂ (Loussouarn, G. et al. 2003). Il induit une augmentation du courant I_{Ks} en stabilisant le canal à l'état ouvert. Des travaux réalisés sur ROMK, GIRK et IRK indiquent que le PIP₂ interagit avec ces canaux par des interactions électrostatiques (Huang, C. L. et al. 1998). D'autres travaux menés au laboratoire ont démontré que des mutations Romano-Ward (R243H, R539W et R555C) qui neutralisent des charges positives, diminuent l'affinité du canal KCNQ1 pour le PIP₂ (Park, K. H. et al. 2005).

II Trafic et maturation des canaux : implications dans les canalopathies

A) Synthèse et insertion des protéines dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE)

Les avancées technologiques ont permis de mieux comprendre les mécanismes permettant la traduction et l'insertion des protéines dans la membrane du RE. Des études biochimiques ont montré que les protéines destinées au RE sont synthétisées sous forme de précurseurs comportant des acides aminés supplémentaires dans leur extrémité N-terminale (Blobel, G. and Dobberstein, B. 1975). Cette séquence constituée d'acides aminés hydrophobes est appelée 'séquence signal'. Le ciblage d'un ribosome qui synthétise une protéine comportant le peptide signal nécessite l'intervention d'un complexe ARN-protéine du cytosol appelé particule de reconnaissance du signal (SRP pour « signal recognition particle ») (Walter, P. and Blobel, G. 1981, Walter, P. and Blobel, G. 1982). Lorsqu'une séquence signal sort du ribosome, la SRP se lie à la fois à la séquence signal et au ribosome. Ce dernier

suspend alors l'élongation du polypeptide jusqu'à ce qu'il soit mis en place devant un pore de translocation de la membrane du RE : le complexe Sec 61. Ce complexe forme un pore qui s'ouvre au cours de la synthèse du polypeptide et se referme lorsque le ribosome se dissocie (Simon, S. M. and Blobel, G. 1991).

L'insertion des protéines membranaires a lieu au cours de leur synthèse (Hegde, R. S. and Lingappa, V. R. 1997). Les segments hydrophobes possèdent des signaux de début et d'arrêt de transfert. Une fois que le segment transmembranaire est synthétisé par le ribosome, il est transloqué dans le pore du complexe Sec 61. Le signal « stop transfert » lui permet d'arrêter sa translocation. Puis, le domaine transmembranaire se déplace latéralement hors du translocon vers la bicouche du RE et ancre le polypeptide dans la membrane du RE (Mothes, W. et al. 1997).

Les protéines possédant plusieurs domaines transmembranaires comme les canaux ioniques acquièrent leur topogénèse grâce à la coopération de plusieurs signaux (Sato, Y. et al. 2002, Tu, L. et al. 2000). Les segments transmembranaires ne semblent pas s'insérer dans la membrane du RE de manière indépendante. Ce mécanisme a été décrit pour quelques canaux. Le canal CFTR, par exemple, est constitué de deux domaines de 6 segments transmembranaires chacun. Il a été montré que les six segments transmembranaires sont transloqués progressivement dans le complexe Sec 61, puis insérés ensemble dans la membrane du RE (Kleizen, B. et al. 2005).

En ce qui concerne les canaux potassiques, il a été montré que l'insertion des domaines transmembranaires du canal KAT1 se fait deux par deux (figure 8). Les deux premiers domaines transmembranaires S1-S2 s'insèrent ensemble dans la bicouche lipidique, puis, les segments S3-S4 et enfin les segments S5-S6 (Sato, Y. et al. 2002).

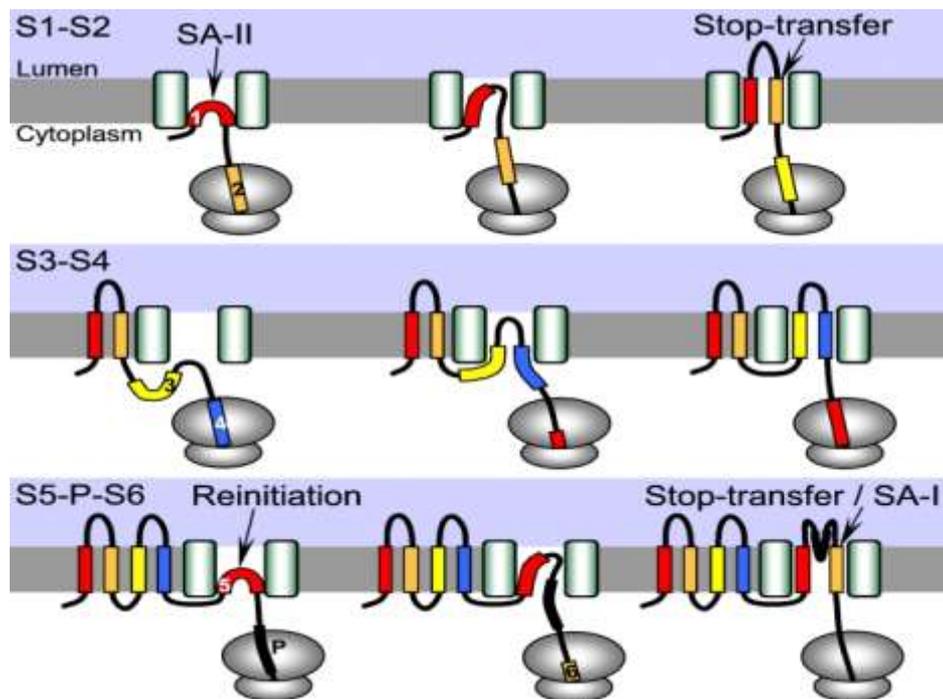


Figure 8 : Modèle de l'insertion des domaines transmembranaires du canal KAT1.

Les domaines transmembranaires S1 et S2 sont insérés dans la membrane du RE puis les domaines S3 et S4 et enfin les domaines S5 et S6. Le signal « stop-transfert » induit l'arrêt de la translocation alors que le « signal de réinitiation » induit la translocation du segment transmembranaire (Sato, Y. et al. 2002).

L'étude de la biogenèse de l'aquaporine 1 a permis de montrer que l'insertion des segments transmembranaires dans la membrane du RE est un processus dynamique qui débute pendant la traduction de la protéine et se poursuit après la dissociation du ribosome. Les aquaporines 1 et 4 sont constituées de 6 hélices transmembranaires. Cependant, l'aquaporine 4 possède seulement 4 segments transmembranaires dans le RE, suggérant un remaniement de la structure de cette protéine (Preston, G. M. et al. 1994). Il a été montré que le troisième domaine transmembranaire se réoriente de manière post-traductionnelle et induit l'insertion au niveau de la membrane du RE des segments 2 et 4 aboutissant à une protéine à 6 segments transmembranaires (Lu, Y. et al. 2000).

B) *Tétramérisation des canaux ioniques et association avec les sous-unités régulatrices*

Les canaux ioniques s'associent entre eux pour former des homomères ou des hétéromères. Cette association se fait de manière spécifique grâce à la présence de domaines permettant la reconnaissance des sous-unités entre elles. Par exemple, les canaux potassiques Kv1-Kv4 s'associent uniquement entre eux (Covarrubias, M. et al. 1991). Ces canaux ont en commun un domaine de tétramérisation dans leur extrémité N-terminale, appelé domaine T1 (Li, M. et al. 1992). Il a été montré que la tétramérisation du canal Kv1.3 par le domaine T1 se déroule pendant la synthèse de cette protéine avant même la dissociation du ribosome (Lu, J. et al. 2001).

En revanche, d'autres canaux s'associent par l'intermédiaire de leur extrémité C-terminale, comme le canal KCNQ1. Pour le moment, la séquence d'évènements induisant leur oligomérisation n'est pas encore connue (Deutsch, C. 2003).

Les canaux ioniques semblent également s'associer avec leurs sous-unités régulatrices dans le RE (Deutsch, C. 2002). Par exemple, la sous-unité cytoplasmique Kv β 2 s'associe avec le canal Kv1.2 dans le réticulum endoplasmique pendant la synthèse de cette dernière (Shi, G. et al. 1996). Cette sous-unité auxiliaire augmente la glycosylation, stabilise la protéine canal et accroît le nombre de canaux exprimés à la membrane. En ce qui concerne le canal KCNQ1, son association avec la sous-unité KCNE1 semble également être précoce. En effet, la mutation L51H au niveau du gène codant la sous-unité KCNE1 empêche l'expression membranaire de KCNE1 et induit la rétention dans le RE du canal KCNQ1, indiquant que ces protéines interagissent dans le RE (Krumerman, A. et al. 2004).

C) *La N-glycosylation*

La majeure partie des protéines synthétisées dans le réticulum endoplasmique sont des glycoprotéines qui sont ensuite transportées vers l'appareil de Golgi pour terminer leur maturation. Schématiquement, la synthèse des glycoprotéines se fait en deux étapes. La chaîne peptidique d'une part, et l'oligosaccharide précurseur de la chaîne glycanique d'autre part, sont synthétisés de façon concomitante dans le RE. L'addition de l'oligosaccharide se fait sur le groupement

NH₂ d'un résidu asparagine de la protéine en cours de synthèse par l'oligosaccharyl transférase. La séquence consensus pour cette modification est –N–X–S/T– (où X représente un acide aminé quelconque excepté la proline pour des raisons d'encombrement stérique) (Imperiali, B. and Rickert, K. W. 1995). Les monosaccharides constitués de deux N-acétylglucosamines (GlcNAc), neuf mannoses et trois glucoses subissent une maturation jusqu'à l'obtention de sa structure finale. La glycoprotéine subit une maturation, trois molécules de glucose et une molécule de mannose sont hydrolysées grâce à l'intervention de glucosidases et d'une mannosidase (figure 9).

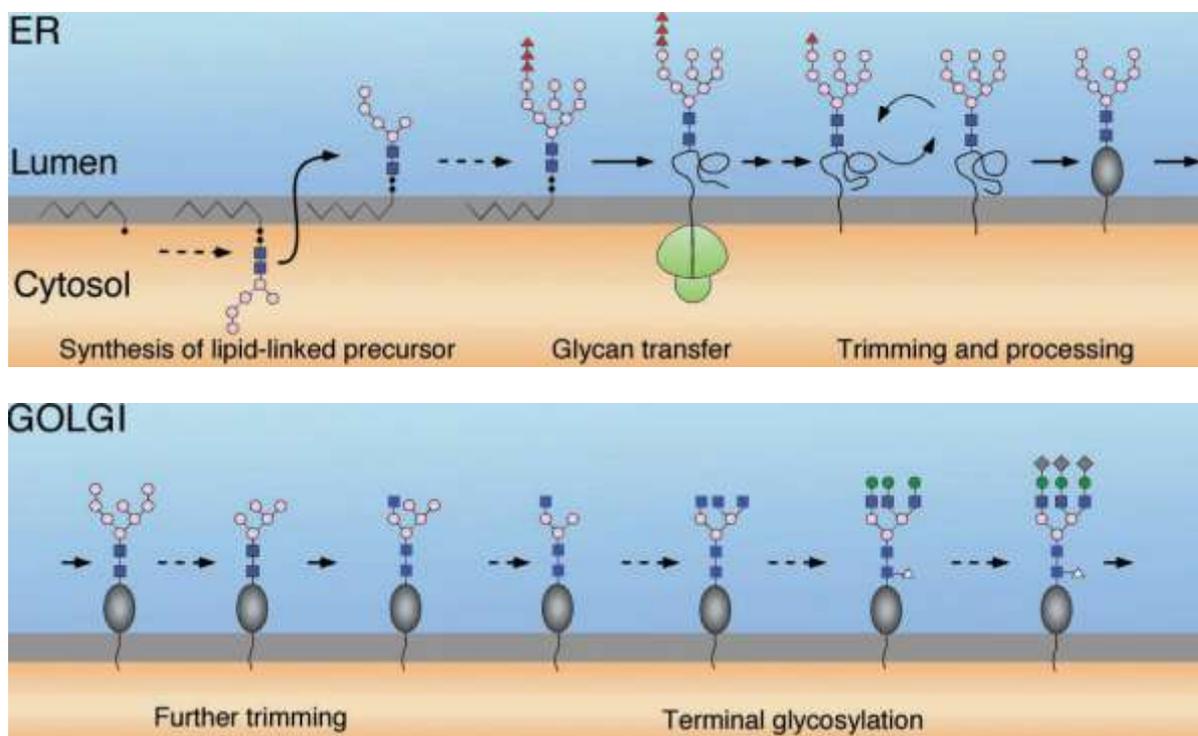


Figure 9 : N-glycosylation des protéines dans le RE et dans l'appareil de Golgi

Insertion de l'oligosaccharide sur la protéine en cours de synthèse et maturation de cette protéine dans le RE (haut). Carré bleu : N-acétylglucosamine, les ronds roses : mannose, les triangles rouges : glucose. Maturation des glycoprotéines dans l'appareil de Golgi (bas). Ronds verts : galactose, les triangles blancs : fructose et les losanges gris : l'acide sialique (Helenius, A. and Aebi, M. 2001).

Les glycoprotéines sont ensuite transportées vers l'appareil de Golgi pour terminer leur maturation. Cette maturation nécessite l'ajout et la suppression de résidus

sucrés aboutissant à une chaîne glycanique plus complexe (figure 9). La glycosylation joue plusieurs rôles. Elle permet de stabiliser la protéine, moduler la réponse immunitaire de la cellule et de réguler la demi-vie d'une protéine. La glycosylation des protéines, en particulier les canaux ioniques, est très importante pour l'acquisition de leur bonne conformation.

Une majorité des canaux sont des glycoprotéines. Il a été montré que la glycosylation du canal potassique Kv3, l'échangeur chlorure / proton. : ClC-5, est essentielle pour leur expression à la surface de la membrane plasmique (Cartwright, T. A. et al. 2007, Schmieder, S. et al. 2007). La glycosylation du canal TRPM 8 (transient receptor potential melastin like) facilite sa tétramérisation et son transport vers la membrane plasmique (Erler, I. et al. 2006). Alors que la glycosylation du canal potassique Kv1.2 régule son activité (Watanabe, I. et al. 2007).

Bien qu'un site potentiel de glycosylation ait été identifié dans le pore du canal, aucune étude n'a montré la glycosylation de KCNQ1. En revanche, sa sous-unité régulatrice KCNE1 possède deux sites de glycosylation (Takumi, T. et al. 1991). Il a été montré dans l'équipe que les deux sites sont indispensables à l'expression membranaire de KCNE1. En effet, la suppression d'un des deux sites ne modifie pas l'expression membranaire de KCNE1. En revanche, la substitution des deux résidus asparagine par un résidu alanine induit la rétention de la protéine dans le RE indiquant une coopérativité entre ces deux sites de glycosylation (résultats non publiés).

D) Système de contrôle qualité

Toutes les protéines synthétisées dans les cellules subissent un contrôle qualité qui garantit leur bon repliement et leur fonction. Les protéines anormales sont reconnues par ce système pour être dégradées, ce processus comprend plusieurs étapes (figure 10).

Les protéines sont tout d'abord reconnues par les chaperones, puis elles subissent une rétro-translocation pour qu'elles soient ubiquitinées. Elles sont ensuite relarguées dans le cytoplasme pour être dégradées par le protéasome. A l'heure actuelle de nombreuses données ont été accumulées concernant les mécanismes de contrôle qualité montrant la complexité de ce phénomène. Il reste cependant de nombreuses

inconnues. Dans ce paragraphe, ces étapes vont être résumées et illustrées de quelques exemples.

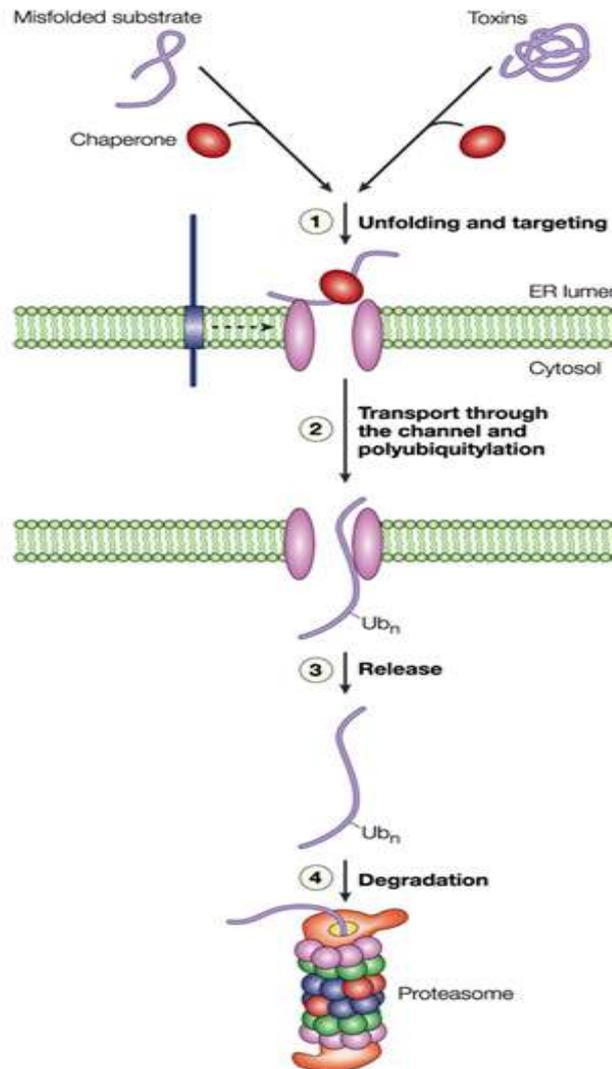


Figure 10 : Les étapes de la dégradation des protéines par le système de contrôle qualité.

Les protéines sont reconnues par les chaperones (1). Le polypeptide est rétro-transloqué vers le cytosol et ubiquitiné(2). Le polypeptide est ensuite libéré dans le cytoplasme(3). Puis le polypeptide est dégradé par le protéasome (4) (Tsai, B. et al. 2002).

a) Les chaperones

Le réticulum endoplasmique offre aux protéines membranaires hydrophobes un environnement favorable pour leur repliement et leur maturation. La lumière du RE a une composition différente de celle du cytoplasme de part son contenu ionique et l'expression des chaperones. Les chaperones ont un rôle important dans le repliement des polypeptides nouvellement synthétisés. Elles sont nombreuses, elles sont solubles (Bip) ou membranaires (calnexine). Certaines résidentes dans le RE comme la calréticuline et d'autres sont exprimées dans le cytoplasme comme la Hsp70.

La calnexine et la calréticuline sont des lectines du RE qui se fixent transitoirement aux protéines glycosylées nouvellement synthétisées (Ou, W. J. et al. 1993). Cette interaction ralentit le repliement des glycoprotéines mais augmente son efficacité. Ces chaperones interagissent avec les glycoprotéines une fois que les deux glucoses et le mannose sont hydrolysés (Spiro, R. G. et al. 1996, Ware, F. E. et al. 1995). Cette association subit plusieurs cycles de liaison et de libération de la glycoprotéine jusqu'à ce qu'elle ait acquis sa bonne conformation. Durant ces cycles, les glycoprotéines subissent une maturation de leur chaîne sucrée grâce à l'intervention de la glycosidase II, ce qui induit le détachement de la protéine du complexe des chaperones. A ce stade, si la protéine possède une bonne conformation, elle est dirigée vers l'appareil de Golgi, dans le cas contraire, l'oligosaccharide est transféré une fois de plus sur la chaîne peptidique. Le polypeptide va donc être reconnu par les chaperones pour subir un cycle supplémentaire (Helenius, A. and Aebi, M. 2001). En parallèle, les protéines vont acquérir des ponts disulfure leur permettant de se stabiliser. Contrairement au cytoplasme, la lumière du RE est un environnement oxydant qui favorise la formation de ponts disulfure. Les chaperones appelées les protéines disulfure isomérase (PDI) accélèrent ce processus (Huppa, J. B. and Ploegh, H. L. 1998). La ERp57 fait partie de cette famille d'enzymes et s'associe avec la calnexine et la calréticuline (figure11).

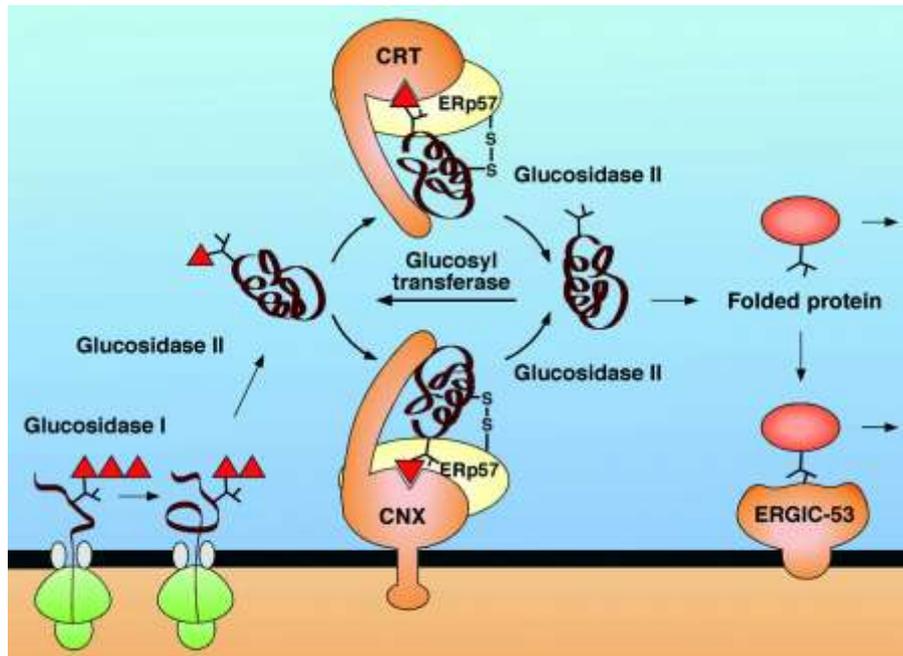


Figure 11 : Le cycle calnexine-calréticuline.

Les glycoprotéines sont reconnues par le calnexine (CNX) ou la calréticuline (CRT) et la ERp57 pour acquérir leur bonne conformation (Helenius, A. and Aebi, M. 2001).

Les Hsp (Heat Shock Protein) sont, comme leur nom l'indique, des protéines du choc thermique, elles protègent les cellules de l'accumulation de protéines dénaturées lors d'un stress thermique (Morimoto, R. I. 1998). La chaperone la plus étudiée dans cette classe de protéines est certainement la Hsp70. Cette protéine se lie de manière ATP dépendante aux séquences hydrophobes exposées sur les protéines en cours de synthèse (Frydman, J. et al. 1994). La Hsp 70 a été impliquée dans la maturation de nombreux canaux ioniques (Ficker, E. et al. 2003, Hinzpeter, A. et al. 2006, Krieger, A. et al. 2006, Loo, M. A. et al. 1998, Yang, Y. et al. 1993).

L'identification des interactions existant entre l'ubiquitine ligase et des co-facteurs des chaperones a permis d'établir un lien entre les chaperones et le système de dégradation. C'est notamment le cas de la protéine CHIP (Carboxy Terminus of Hsp70 binding Protein). Cette protéine possède un domaine TRP (chaperone-interacting tetratricopeptide) lui permettant d'interagir avec les Hsp. Son domaine U-box lui confère une activité E3 ligase lui permettant d'ubiquitiner ses substrats (figure

12). BAG1, un autre cofacteur de ces chaperones, possède également un domaine d'association avec la Hsp 70. Contrairement à la protéine CHIP, ce cofacteur ne renferme pas d'activité ubiquitine ligase, mais possède un domaine d'interaction avec le protéasome 26S (figure 12). Une étude a montré que l'association de la Hsc 70 (la Hsp 70 constitutivement active) et de son co-facteur CHIP intervient dans la dégradation de la protéine CFTR mal repliée. La sur-expression de la protéine CHIP privée du domaine U-box, bloque l'ubiquitination du canal et supprime sa dégradation (Meacham, G. C. et al. 2001).

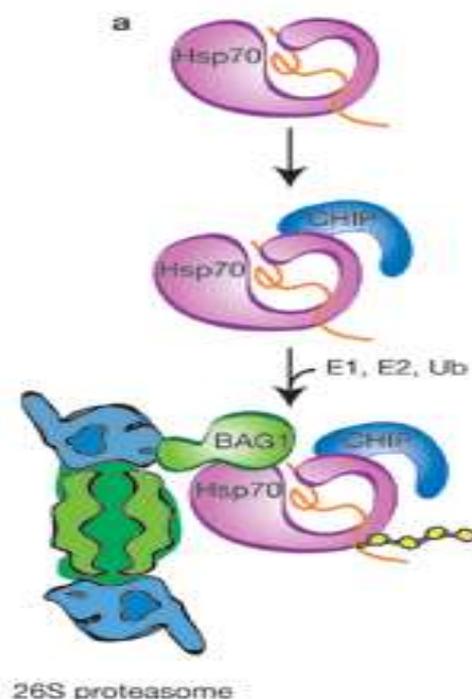


Figure 12 : Hsp 70 et ses co-facteurs.

La chaperone Hsp 70 interagit avec deux co-facteurs : CHIP (Carboxy Terminus of HSP70 binding Protein) et la protéine BAG 1 (McClellan, A. J. et al. 2005).

Le réticulum endoplasmique possède un système étroitement régulé pour empêcher l'exportation vers l'appareil de Golgi de protéines anormales. Les protéines chaperones ont la capacité d'interagir et d'assister d'autres protéines dans leur maturation, en leur assurant un repliement tridimensionnel adéquat. De plus, les chaperones sont les garants de la fidélité des protéines, elles induisent donc la

réretention dans le RE des protéines anormales. La machinerie cellulaire qui prend la décision de dégrader les protéines cibles n'est pas encore bien définie. Trois modèles ont été suggérés par McClellan et Frydman (figure 13). Le modèle le plus simple correspond aux cycles de fixation et de libération de la cible par l'hydrolyse de l'ATP permettant de maintenir le polypeptide dans un état soluble. Dans ce modèle l'incapacité du polypeptide à acquérir sa forme native, élève le nombre de cycles. Le prolongement de cette interaction augmente la probabilité du substrat d'être reconnu par une l'ubiquitine ligase.

Dans le deuxième modèle, l'ubiquitine ligase est directement recrutée par le complexe chaperone. Le troisième modèle propose que le complexe de chaperones, peut lui-même jouer le rôle d'ubiquitine ligase (McClellan, A. J. and Frydman, J. 2001).

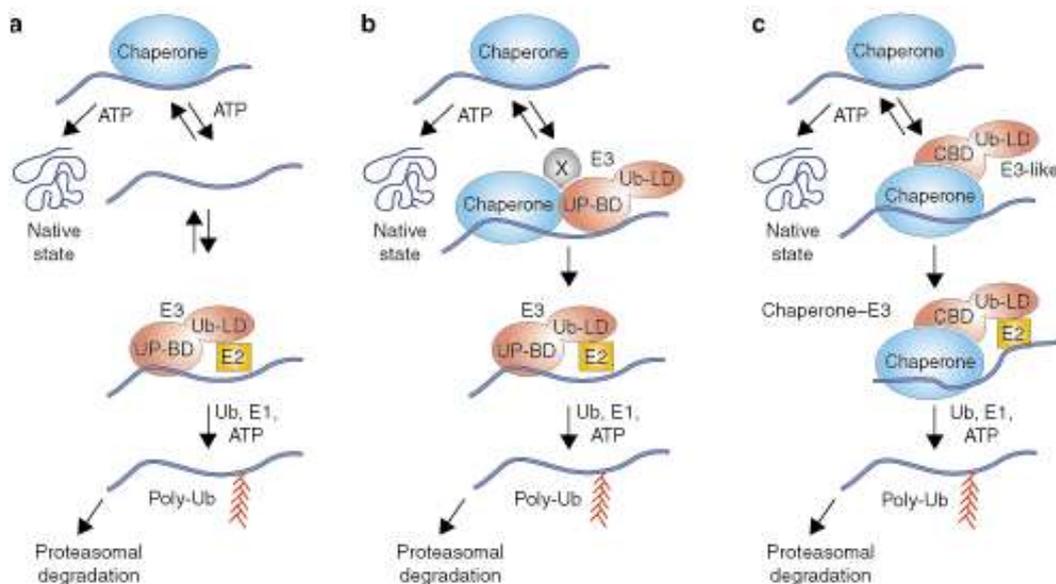


Figure 13 : Modèle de reconnaissance des protéines anormales pour qu'elles soient dégradées

a. Cycles de fixation et de libération aux chaperones et ubiquitination du polypeptide. b. Reconnaissance du polypeptide par la chaperone qui recrute l'ubiquitine ligase. c. Reconnaissance du polypeptide par le complexe de chaperones qui joue le rôle d'ubiquitine ligase (McClellan, A. J. and Frydman, J. 2001).

b) La rétro-translocation des protéines

Avant d'être ubiquitinées et dégradées par le protéasome, les protéines qui n'ont pas acquis la bonne conformation sont rétro-transloquées grâce au canal Sec 61. Son rôle dans la rétro-translocation a été initialement montré en le co-immunoprécipitant avec les polypeptides du CMH de classe I (Wiertz, E. J. et al. 1996). De plus, des mutations de Sec 61 de levure induisent un ralentissement ou la suppression de la dégradation de certaines protéines (Plempner, R. K. et al. 1997).

Le pore du complexe Sec 61 a donc deux fonctions : il induit l'insertion des protéines dans la membrane du RE au cours de leur synthèse et la rétro-translocation des protéines anormales vers le cytoplasme. Une étude a cependant montré que ces deux fonctions requièrent des domaines différents de Sec 61 chez la levure (Wilkinson, B. M. et al. 2000).

Un autre candidat a été récemment suggéré pour permettre la rétro-translocation des protéines. La protéine Der1 (pour « Degradation in the ER ») a été identifiée chez *S.cerevisiae* et impliquée dans la dégradation des protéines (Knop, M. et al. 1996). Son homologue Derlin-1 (Der1-like protein 1) chez les mammifères, a également été impliquée dans la dégradation des chaînes légères du CMH de classe I et du canal CFTR (Sun, F. et al. 2006, Ye, Y. et al. 2004, Younger, J. M. et al. 2006). L'étude de Rapoport suggère que Derlin-1 forme un tétramère et constitue probablement un canal laissant passer les protéines destinées à être dégradées (Ye, Y. et al. 2004, Ye, Y. et al. 2005).

c) Le système ubiquitine-protéasome

La description moléculaire du protéasome et son mode d'action ont été assez bien caractérisés ces dernières décennies. De nombreuses équipes se sont attachées à comprendre le fonctionnement du système ubiquitine-protéasome et notamment Aaron Ciechanover, Avram Hershko et Irwin Rose. Leurs travaux leur ont d'ailleurs valu le prix Nobel de chimie en 2004 (Goldberg, A. L. 2005).

1) *L'ubiquitination et le transport vers le cytoplasme des polypeptides cibles.*

Le protéasome est la dernière étape du contrôle qualité de la cellule. Cependant avant que les protéines soient dégradées, elles sont préalablement ubiquitinées. L'ubiquitination des protéines requiert l'activité séquentielle de plusieurs types d'enzymes (figure 14). L'ubiquitine est une protéine très conservée de 8 kDa, elle est tout d'abord activée et forme une liaison thio-ester avec une enzyme d'activation (ubiquitin-activating enzyme ou E1). Elle est ensuite transférée, en formant une autre liaison thio-ester, sur un membre de la famille des enzymes de conjugaison (ubiquitin-conjugating enzymes ou Ubc) encore appelées E2. Les E2 confèrent un premier niveau de spécificité dans la reconnaissance des substrats. Certaines d'entre elles peuvent transférer directement l'ubiquitine sur des protéines cibles. Cependant, dans la majorité des cas, un troisième acteur, appelé ubiquitine ligase ou E3 est nécessaire et joue le rôle principal dans la reconnaissance des substrats. Enfin, un dernier type d'enzyme, dit E4, a récemment été identifié. Cette enzyme jouerait un rôle dans l'élongation de certaines chaînes d'ubiquitine (Koegl, M. et al. 1999). Des études ont montré que l'accrochage de quatre molécules d'ubiquitine est le signal minimal pour que la protéine cible soit dégradée par le protéasome (Thrower, J. S. et al. 2000).

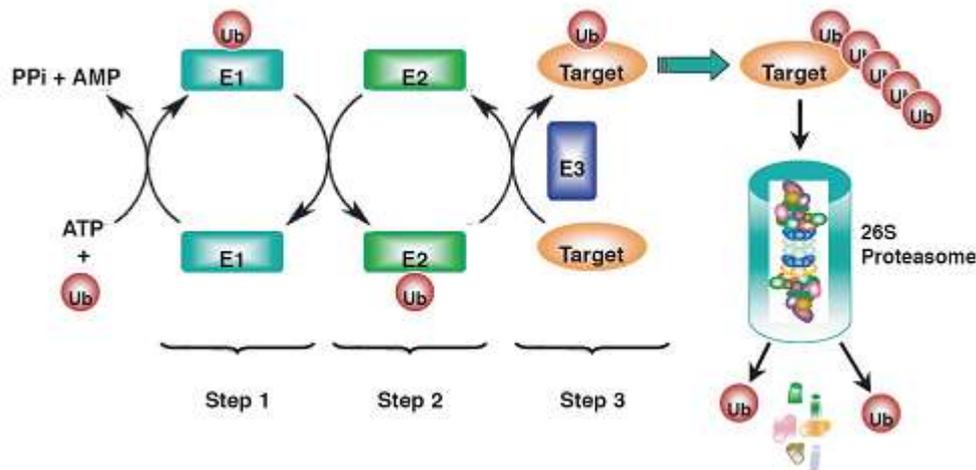


Figure 14 : Les étapes d'ubiquitination des protéines.

L'ubiquitination des protéines cibles nécessite l'intervention de trois protéines : la protéine E1 (l'enzyme d'activation), E2 (enzyme de conjugaison) et E3 (ubiquitine-ligase) (Wang, J. and Maldonado, M. A. 2006).

Dans le génome humain, il existe une seule enzyme E1, environ cinquante E2 et plus de quatre cents ubiquitine-ligase potentielles (Li, W. et al. 2005).

Les protéines peuvent être monoubiquitinées, multiubiquitinées ou polyubiquitinées. L'ubiquitination des protéines est un processus réversible grâce à l'intervention d'enzymes qui les deubiquitinent (Amerik, A. Y. and Hochstrasser, M. 2004).

L'ubiquitination des protéines cibles semble être essentielle pour leur exportation vers le cytoplasme où elles sont dégradées. En effet, l'inhibition de l'ubiquitinylation du canal CFTR, en exprimant un complexe E2-E3 inactif, empêche son exportation vers le cytoplasme et induit sa rétention dans le RE (Younger, J. M. et al. 2004). Ceci a été également suggéré par l'équipe de Kopito en étudiant la dégradation de la sous-unité α du récepteur des lymphocytes T (Yu, H. and Kopito, R. R. 1999).

La polyubiquitination du polypeptide n'est cependant pas suffisante pour sa libération de la membrane du RE vers le cytoplasme. Des résultats obtenus récemment ont montré l'implication d'une protéine ATPase, appelée Cdc48 chez la levure et p97 chez les mammifères, dans l'extraction des protéines anormales de la membrane du RE vers le cytoplasme (Jarosch, E. et al. 2002, Rabinovich, E. et al. 2002, Ye, Y. et

al. 2001). La p97 fait partie des protéines de la famille des AAA ATPases (pour *ATPases associated with different cellular activities*), elle possède un motif AAA commun qui leur permet de fixer et d'hydrolyser l'ATP (Patel, S. and Latterich, M. 1998). Cette protéine cytosolique interagit avec les cofacteurs Ufd1 et Npl4 qui ubiquitinent les protéines cibles (Meyer, H. H. et al. 2000). Il a été montré chez la levure que des mutations des constituants de la p97 bloquent la dégradation des protéines testées (Bays, N. W. et al. 2001, Jarosch, E. et al. 2002, Rabinovich, E. et al. 2002, Ye, Y. et al. 2001).

Il est maintenant établi que la protéine Cdc48 induit l'exportation des protéines vers le cytoplasme chez la levure. Chez les mammifères, son homologue la p97 semble également avoir ce rôle. En effet, l'expression d'un dominant négatif de la p97 empêche le transport des chaînes légères du CMH vers le cytoplasme et bloque ainsi leur dégradation (Ye, Y. et al. 2001). Certaines questions restent cependant à élucider. Le mécanisme de reconnaissance du substrat par le complexe p97 n'est pas encore connu. Il a été suggéré que la p97 interagit directement avec l'ubiquitine. Rape et ses collaborateurs ont montré que la protéine Cdc48 interagit préférentiellement avec les protéines ubiquitinées (Rape, M. et al. 2001). En revanche, une autre étude a montré que la p97 interagit avec les protéines ubiquitinées et non ubiquitinées suggérant que cette protéine s'assemble avec les polypeptides avant et pendant leur ubiquitination (Ye, Y. et al. 2001). La mise en évidence des interactions entre la p97 et la protéine Derlin-1 a permis d'établir un lien entre la rétro-translocation des protéines et leur exportation vers le cytoplasme sans pour autant caractériser la succession des événements (Ye, Y. et al. 2004). Rapoport et ses collaborateurs ont étudié la dégradation des chaînes légères du CMH de classe I et ont suggéré un modèle où la protéine cible s'associe tout d'abord avec la Derlin-1 (figure 15). Ce complexe est alors reconnu par la p97 qui elle-même interagit avec des ubiquitine ligases. De plus, ils suggèrent que la structure hexamérique de la p97 lui permet d'interagir avec de nombreuses partenaires (Ye, Y. et al. 2005).

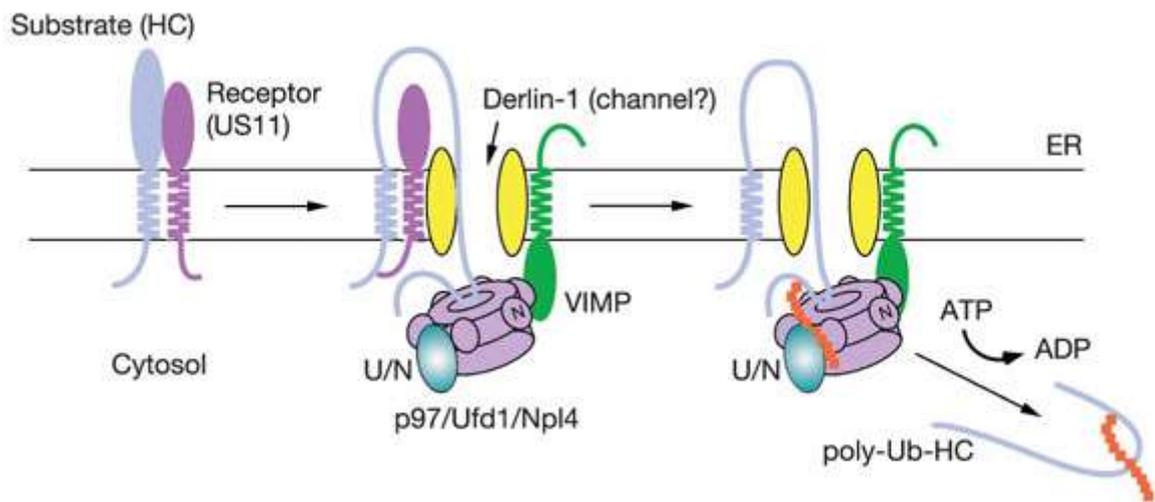


Figure 15: Les étapes de la rétro-translocation des chaînes légères du CMH de classe I.

La protéine virale US 11 induit la rétro-translocation des chaînes du CMH de la classe I (HC) à travers le pore formé par la Derlin-1 (en jaune). Le complexe p97 et ses partenaires sont recrutés. La chaîne polyubiquitinée (en rouge) est attachée à la protéine cible qui est reconnue par la p97 et le complexe Ufd1/Npl4 (UN). Puis la protéine cible est relarguée vers le cytoplasme pour être dégradée par le protéasome (Ye, Y. et al. 2004).

2) Le protéasome

Le protéasome 26S est formé par l'association de deux sous-complexes : un cœur protéolytique, le protéasome 20S, et un complexe régulateur appelé complexe 19S. Le protéasome 20S est très conservé lors de l'évolution. Il a la structure d'un cylindre creux composé de 28 sous-unités distribuées en 4 anneaux heptamériques. Les deux anneaux centraux sont identiques, et sont formés chacun de sept sous-unités différentes (dites de type β). Ils définissent une cavité interne qui renferme les sites catalytiques. Les deux anneaux extérieurs sont composés eux aussi de sept sous-unités différentes (dites de type α) ; ils permettent l'association du protéasome 20S à des complexes régulateurs et contrôlent l'entrée des substrats dans la chambre de catalyse. Le protéasome 20S possède au moins 5 activités peptidasiques, caractérisées par des substrats et des inhibiteurs différents. Cependant, seules trois sous-unités catalytiques ont été identifiées. Les sites catalytiques du protéasome

fonctionnent de manière allostérique et produisent des peptides de trois à vingt acides aminés. La plupart de ces peptides sont hydrolysés en acides aminés par des peptidases cellulaires.

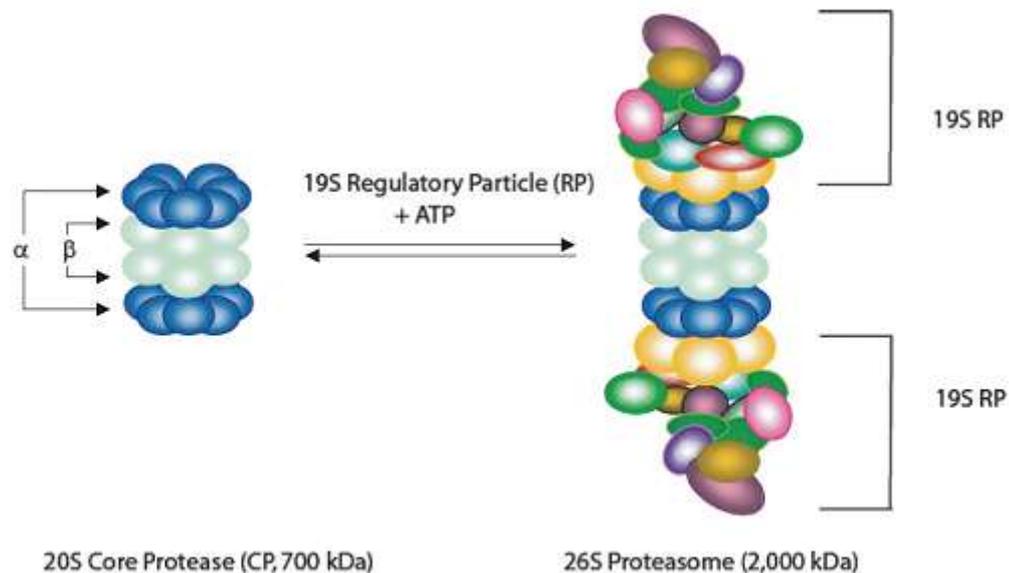


Figure 16 : Schéma du protéasome

Le protéasome est formé de l'association du corps protéolytique : le protéasome 20S (bleu) et du complexe régulateur : le protéasome 19S (RP) (Wang, J. and Maldonado, M. A. 2006).

Le système ubiquitine-protéasome est localisé dans deux compartiments cellulaires et est impliqué dans plusieurs processus cellulaires. En effet, le protéasome est localisé dans le noyau, il joue un rôle dans le contrôle des étapes initiales de l'expression génique, la réparation de l'ADN et le contrôle qualité. De récents travaux ont montré qu'un déséquilibre du système ubiquitine-protéasome du noyau induit le développement de pathologies comme l'expansion anormale de glutamine (polyQ) (Thrower, J. S. et al. 2000).

Le protéasome est aussi localisé dans le cytoplasme. En plus de son rôle dans la dégradation des protéines anormales, il intervient également dans la dégradation des protéines permettant ainsi la présentation des peptides antigéniques par le système immunitaire.

3) *ERAD (ER-associated degradation) : implications dans les canalopathies*

Le système ubiquitine-protéasome est le garant de l'homéostasie de la cellule, il permet de dégrader les protéines anormales afin d'éviter leur accumulation délétère dans les cellules. Son altération est responsable de pathologies, c'est notamment le cas de la maladie de Parkinson. En effet, 10% des patients atteints de cette neuropathie présentent des formes familiales. L'étude de leur génotype a révélé la présence de mutations dans de nombreuses protéines et notamment la parkine qui fait partie de la famille des ubiquitine-ligases (Hattori, N. and Mizuno, Y. 2004, Tanaka, K. et al. 2004). Ces études ont suggéré que les mutations de la parkine, induisent l'accumulation toxique de ses substrats. Deux équipes, ont d'ailleurs, identifié les substrats de la parkine (Imai, Y. et al. 2001, Shimura, H. et al. 2001). Cependant, le lien entre l'accumulation de ces substrats et la maladie de Parkinson n'a pas encore été défini. Une étude d'une famille allemande atteinte de la maladie de Parkinson, a permis également d'identifier des mutations au niveau du gène codant la protéine uchl-1 (ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1) (Leroy, E. et al. 1998). Cette hydrolase intervient dans le recyclage de l'ubiquitine. Des mutations au niveau de son site catalytique l'inactivent et empêchent ainsi la libération de l'ubiquitine.

Le processus de dégradation par le système ubiquitine-protéasome a été impliqué dans de nombreuses canalopathies. L'exemple le plus étudié est le canal CFTR, et notamment la mutation la plus fréquente rencontrée chez les patients atteints de mucoviscidose : la mutation Δ F508. La maturation du canal CFTR sauvage ou muté est lente et peu efficace. En effet, 60-75% (canal sauvage) et 99% (canal muté) des protéines synthétisées sont dégradées avant d'être exportées vers la membrane plasmique (Ward, C. L. and Kopito, R. R. 1994). C'est en 1995 que l'ubiquitination et la dégradation du canal CFTR ont été mises en évidence par deux équipes (Jensen, T. J. et al. 1995, Ward, C. L. et al. 1995).

Le génotypage de familles atteintes d'ataxie épisodique a permis de mettre en évidence des mutations dans le gène codant le canal potassique Kv1.1

(Rajakulendran, S. et al. 2007). Manganas et ses collaborateurs ont identifié une mutation dans l'extrémité C-terminale qui induit la rétention et la dégradation du canal par la voie du protéasome (Manganas, L. N. et al. 2001).

Plus de deux cents mutations responsables du QT long ont été décrites dans le gène codant le canal hERG. Certaines induisent un mauvais repliement des protéines mutantes qui sont retenues dans le réticulum endoplasmique puis dégradées (Ficker, E. et al. 2003, Gong, Q. et al. 2005).

En ce qui concerne le canal potassique KCNQ1, quelques mutations affectant son trafic vers la membrane plasmique ont été décrites (Schmitt, N. et al. 2000, Wilson, A. J. et al. 2005, Yamashita, F. et al. 2001) mais aucune étude n'a pour le moment mis en évidence l'implication du contrôle qualité. Dans mon travail de thèse, j'aborderai le rôle du contrôle qualité dans la maturation du canal KCNQ1.

E) L'adressage des protéines vers la membrane plasmique

a) La sortie des protéines du RE

Les protéines qui ont acquis leur bonne conformation sont transportées du RE jusqu'à la membrane plasmique en passant par l'appareil de Golgi grâce au transport vésiculaire. Ces vésicules possèdent un manteau protéique appelé COP (Coatomer Proteins) qui participe au tri des protéines qu'elles transportent. Il existe deux types de complexes COP : les vésicules contenant un manteau COP II permettent le transport antérograde des protéines (du RE vers l'appareil de Golgi) et les vésicules COP I permettent le transport rétrograde des protéines (de l'appareil de Golgi vers le RE).

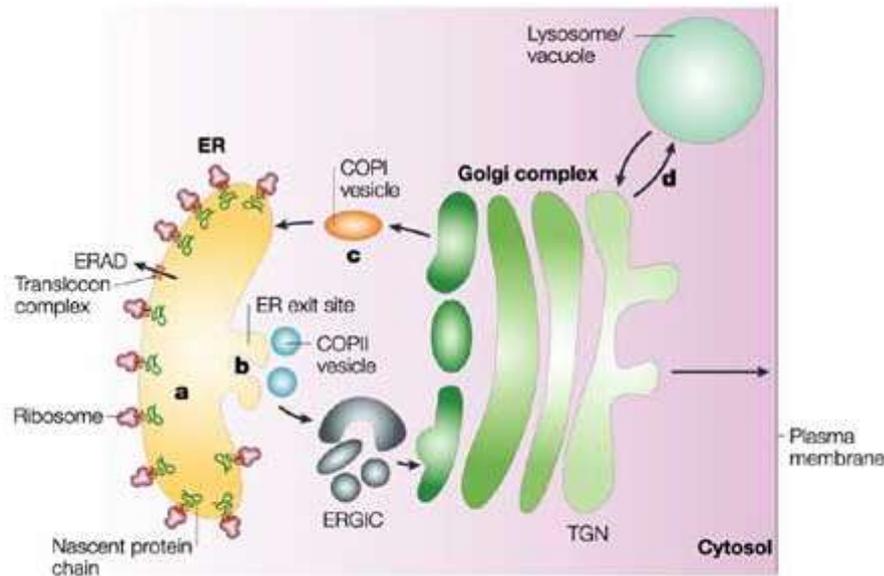


Figure 17 : Transport vésiculaire des différents compartiments cellulaires.

Synthèse des polypeptides (a) qui sont dégradés par le système contrôle qualité ou transportés vers l'appareil de Golgi via les vésicules COP II (b). Transport rétrograde des vésicules de l'appareil de Golgi vers le RE via les vésicules COP I (c). Transport vésiculaire entre l'appareil de Golgi et le lysosome (d) (Ellgaard, L. and Helenius, A. 2003).

Il est maintenant établi que certaines protéines résidentes du RE possèdent au niveau de leur extrémité C-terminale des motifs di-lysine qui sont reconnus par le complexe COP I (Jackson, M. R. et al. 1990, Shin, J. et al. 1991). Les protéines solubles résidentes dans le RE telle que la protéine disulfide isomérase (PDI) et la protéine Bip possèdent un motif Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) (Munro, S. and Pelham, H. R. 1987).

La sortie des protéines du RE est une étape importante qui permet d'une part de réguler le nombre de protéines exprimées à la membrane et d'assurer, d'autre part, l'assemblage des sous-unités. La cellule induit l'expression membranaire uniquement des complexes multimériques alors que les sous-unités séparées ou les complexes incomplètement associés sont retenus dans le réticulum endoplasmique. Ces mécanismes sont particulièrement importants dans le cas des canaux ioniques qui font eux aussi intervenir des motifs peptidiques. Ces derniers sont reconnus par la machinerie vésiculaire. Ainsi, il a été établi que des motifs arginines (RXR) présents sur les sous-unités du canal potassique sensible à l'ATP (K_{ATP}) participent au contrôle de la stœchiométrie du complexe canalaire. Chacune des sous-unités

possède un motif arginine et la formation d'un hétéromultimère permet de masquer ces motifs et induit donc le transport du canal K_{ATP} vers l'appareil de Golgi (Zerangue, N. et al. 1999) (figure 18). Alors que les sous unités isolées sont retenues dans le RE.

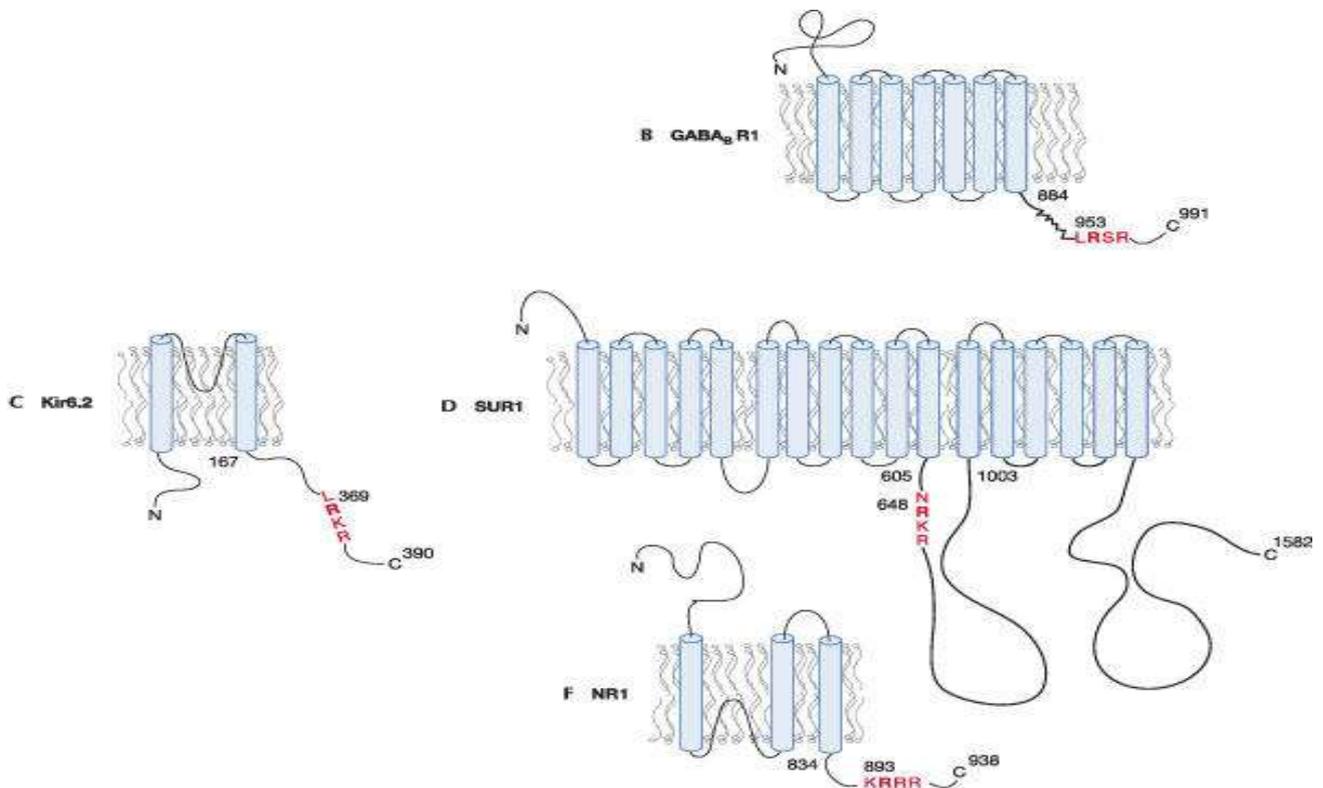


Figure 18 : Les motifs arginine.

La sous-unité R1 du récepteur γ -aminobutyric acid (GABA B) (B). La sous-unité Kir6.2 qui forme le pore du canal K_{ATP} (C) et la sous-unité régulatrice SUR 1 (D). La sous-unité NR 1 du récepteur NMDA (F). Les motifs arginine sont indiqués en rouge (Michelsen, K. et al. 2005).

Des motifs similaires ont été décrits sur les récepteurs GABA_B (γ -aminobutyric acid) (Margeta-Mitrovic, M. et al. 2000), CFTR (Chang, X. B. et al. 1999) et le canal hERG, responsable du courant cardiaque I_{Kr} . Pour ce dernier, ces mécanismes de rétention dans le RE pourraient expliquer certaines mutations responsables du LQT2 (Kupershmidt, S. et al. 2002).

Récemment, l'équipe de Schwappach a identifié la protéine 14.3.3 comme une de celle reconnaissant ces motifs arginine (Yuan, H. et al. 2003). Leur étude suggère que la protéine 14.3.3 aurait une affinité plus importante pour le tétramère de kir6.2

que pour les monomères masquant ainsi les motifs arginine et facilitant l'exportation des tétramères.

D'autres motifs induisent, au contraire, l'exportation des protéines vers l'appareil de Golgi ; tel que le motif DXE (D : pour l'acide aspartique, E : l'acide glutamique et X : un acide aminé quelconque). Ce motif a été identifié initialement dans la glycoprotéine vésiculaire du virus de la stomatite (VSV-G) (Nishimura, N. et al. 1999, Nishimura, N. and Balch, W. E. 1997). Il a également été décrit pour le canal CFTR. Pour CFTR, Wang et ses collaborateurs ont montré que des mutations du motif di-acide empêchent l'interaction du canal avec le complexe Sec23/Sec24 et bloquent ainsi l'exportation du canal vers l'appareil de Golgi (Wang, X. et al. 2004).

Un autre motif d'export (FCYENE) a été identifié dans les protéines de la famille des canaux potassiques Kir (inward rectifier). Ce motif permet à ces protéines d'être exportées du RE vers l'appareil de Golgi mais la protéine reconnaissant ce motif reste encore à être identifiée (Ma, D. et al. 2001).

b) La sortie des protéines de l'appareil de Golgi

Les protéines quittent le RE pour se diriger vers l'appareil de Golgi pour subir d'autres étapes de modifications et de maturation. L'appareil de Golgi peut être divisé en trois compartiments, le cis-Golgi qui reçoit les vésicules issues des sites de sortie du réticulum endoplasmique (RE), le Golgi median et le réseau trans-Golgien (Polishchuk and Mironov, 2004). Les protéines sont transportées vers le réseau trans-Golgien qui les expédie à différentes destinations. Les différents complexes adaptateurs de la clathrine (AP) interviennent dans le trafic et le tri des protéines à la sortie de l'appareil de Golgi (AP1), dans l'endocytose (AP2) et dans l'adressage vers le lysosome (AP3) en interagissant avec les protéines portant des motifs YxxΦ (Φ acide aminé aliphatique) . De tels motifs interviennent dans l'expression du canal Kir 2.1 ou de l'aquaporine AQP4 (Hofherr, A. et al. 2005, Madrid, R. et al. 2001).

F) Le recyclage des protéines à la membrane plasmique : endocytose

L'endocytose est un moyen pour les cellules de contrôler la densité de protéines présentes à la membrane plasmique et notamment celle des canaux ioniques (Bradbury, N. A. 1999, Lukacs, G. L. et al. 1997, Ma, D. et al. 2002, Prince, L. S. et al. 1999, Rotin, D. et al. 2001, Sterling, H. et al. 2002).

Aussi, le dysfonctionnement de l'endocytose a été impliqué dans une canalopathie : le syndrome de Liddle. Ce syndrome décrit par Liddle dans les années 60, est caractérisé par une hypertension artérielle sévère associée à une baisse du taux de potassium plasmatique, et une réabsorption sodique excessive au niveau rénal. Cette pathologie est due à une augmentation de l'activité du canal sodique résultant d'une diminution de son endocytose (Schild, L. et al. 1995, Schild, L. et al. 1996) qui est la conséquence de mutations sur le motif PPPXYXXL de ses sous-unités (Firsov, D. et al. 1996, Snyder, P. M. et al. 1995). Deux mécanismes permettent d'expliquer cette augmentation de l'expression membranaire. Cette séquence est similaire à deux motifs impliqués dans l'endocytose : le motif NPXY et le motif YXXΦ (X est un acide aminé quelconque et Φ est un acide aminé aliphatique) qui sont reconnus par les complexes AP2 du manteau de clathrine (Bonifacino, J. S. and Traub, L. M. 2003). Deuxièmement, cette séquence contient un motif PY reconnu par Nedd 4-2, une ubiquitine ligase (enzyme E3) (Goulet, C. C. et al. 1998). Comme pour la dégradation des protéines mal repliées, l'ubiquitination est un signal d'endocytose fort et les mutations de ce motif diminuent l'ubiquitination du canal et son endocytose.

Ce motif PY est également présent dans la séquence peptidique du canal sodique cardiaque Na_v1.5 (figure 20) et il a été montré que la protéine Nedd4-2 induit également son endocytose (Abriel, H. et al. 2000, Rougier, J. S. et al. 2005).

Il existe également des motifs contenant un doublet de résidus leucine appelés di-leucine. Ces résidus induisent l'endocytose des protéines qui les portent. Le canal sodique neuronal Nav1.2 possède ce type de motif au niveau de son extrémité C-terminale. Il a été montré que ce motif induit l'endocytose et participe à la

compartimentation du canal Nav1.2 au niveau des cellules neuronales (Garrido, J. J. et al. 2001).

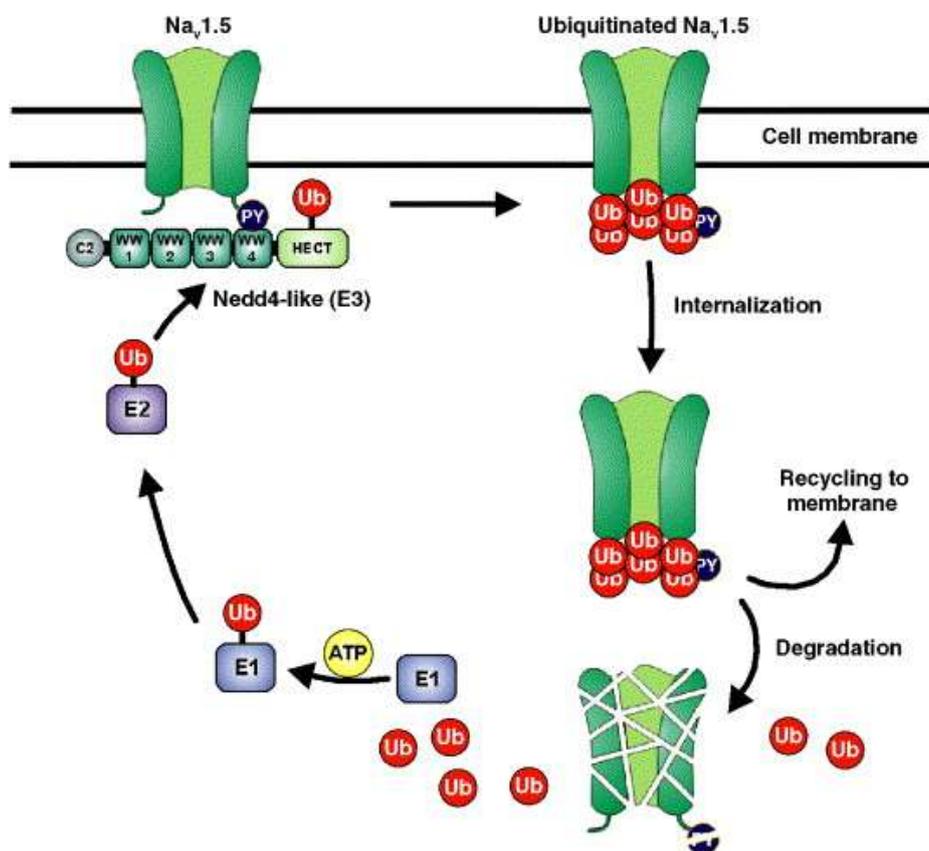


Figure 19: Modèle de l'endocytose du canal Na_v1.5.

Le canal est tout d'abord ubiquitiné par la machinerie cellulaire grâce à l'intervention des enzymes E1, E2 et E3 (Nedd4-2). Le canal est, ensuite, endocyté pour être soit dégradé ou recyclé (Abriel, H. and Staub, O. 2005).

Matériel et méthodes

A) BIOLOGIE MOLECULAIRE

a) Plasmides utilisés

L'ADNc codant le canal humain KCNQ1 dans lequel un tag HA (hémagglutinine) a été préalablement inséré a été réalisé par mutagenèse par PCR (Barhanin L, IPMC Valbonne France). Deux peptides codant deux tag HA ont été insérés au niveau de la seconde boucle extracellulaire de KCNQ1 entre le domaine S3 et S4 : 213-LCVGSKYPYDVPDYAKGQYPYDVPDYAVFATSA-226 (l'épitope HA est en gras). Deux autres constructions KCNQ2-HA et KCNQ3 nous ont été fournies par le Dr T Jentsch. Pour KCNQ2-HA un seul tag HA a été inséré au niveau de la première boucle extracellulaire du canal (Schroeder, B. C. et al. 2000). Un tag VSV modifié (Le Maout, S. et al. 1997) a été introduit juste après le codon d'initiation de la traduction de la protéine de fusion KCNE1-KCNQ1 qui nous a été donnée par le Dr R Kass (Wang, W. et al. 1998b) Les ADNc sont clonés dans le vecteur d'expression pCB6 contenant le gène de résistance à la généticine (G418) pour l'établissement des clones stables ou dans le plasmide pCI (Promega) pour les études de patch-clamp. Les plasmides CD4-KKXX (Zerangue, N. et al. 2001), pEGFP Derlin-1 (Lilley, B. N. and Ploegh, H. L. 2004) ont également été utilisés dans ce travail.

b) Mutagenèse

Pour l'étude du trafic de KCNQ1, le plasmide pCB6 KCNQ1 HA a été utilisé. Les délétions au niveau l'extrémité N-terminale de KCNQ1 ont été générées par mutagenèse dirigée par PCR en utilisant une amorce « sens » portant un site de restriction pour l'endonucléase EcoRI, une séquence Kozak (CCACC), un codon d'initiation (ATG) suivi de la séquence complémentaire codant la protéine KCNQ1. Une amorce « anti-sens » a également été utilisée, cette dernière est complémentaire de la séquence de KCNQ1 située en 3' du site XhoI utilisé pour cloner le fragment de PCR dans la séquence du canal.

Une approche similaire a été utilisée pour la mutation de la tyrosine 111 en cystéine (Y111C), la substitution de la leucine en position 114 en proline (L114P) et la substitution de la proline en leucine (P117L)

Les mutations ont été également introduites dans le plamide pCB6 VSV E1Q1 en utilisant la même approche et en sous clonant les fragments de PCR dans ce vecteur en utilisant les sites NotI et XbaI. En ce qui concerne la mutation KCNQ2 L85P, elle a été introduite par PCR et sous clonée NotI / MluI dans le plasmide pCB6 KCNQ2 HA. Vingt-cinq cycles de PCR ont été réalisés dans des conditions standards. 5% de Dimethyl Sulphoxyde (DMSO) ont été rajoutés au mélange réactionnel pour l'amplification des zones riches en guanosine et cytosine.

c) Clonage

Les fragments de PCR et le vecteur sont digérés avec deux enzymes de restriction l'une du côté 5' et l'autre du côté 3'. Ces endonucléases sont choisies selon les constructions et agissent pendant une heure à 37°C afin d'éviter les coupures non spécifiques (Biolabs). Après la digestion, les fragments de PCR et les plasmides digérés sont purifiés à l'aide de colonnes (QIAGEN). Puis, la ligation est effectuée pendant 12 heures à 16°C avec la T4 DNA ligase (Invitrogene).

d) Transformation des bactéries électrocompétentes

Deux µl du mélange de ligation est utilisé pour électroporer des bactéries compétentes (XI I bleu) puis, les bactéries transformées sont sélectionnées sur des boîtes d'agar contenant de l'ampicilline (100µg/ml).

Pour identifier les clones positifs, un criblage par PCR et/ou un profil de restriction par des endonucléases sont réalisés sur des préparations plasmidiques selon des protocoles conventionnels. Finalement les clones retenus sont séquencés pour s'assurer que la mutation désirée a bien été introduite dans l'ADNc et que d'autres mutations ne sont pas apparues au cours de la manipulation.

e) Amplification et purification des plasmides

Pour amplifier les plasmides, les bactéries sont électroporées avec environ 10 ng de plasmide, puis étalées sur une boîte d'agar contenant l'antibiotique approprié. Une colonie de bactéries est ensuite mise en culture liquide avec l'antibiotique toute une nuit. Arrivée à leur phase exponentielle de croissance, les bactéries sont centrifugées et les plasmides sont purifiés grâce à des kits d'extraction (QIAGEN).

B) CULTURE CELLULAIRE

a) Les lignées cellulaires COS-7, CHO et HEK 293 :

Trois lignées cellulaires ont été utilisées pour cette étude. Les cellules COS-7 dérivées des cellules épithéliales de singe vert d'Afrique et immortalisées par transformation avec un mutant du virus simien SV40 (Gluzman, Y. 1981) ont été utilisées comme modèle cellulaire pour le patch-clamp. Elles n'expriment pas de canaux potassiques endogènes et facilitent ainsi l'étude du courant I_{Ks} et du courant M en transfection transitoire. Elles ont été utilisées pour l'immunocytochimie, car du fait de leur étalement, elles ont un réseau de réticulum endoplasmique très développée. Les CHO pour Chinese Hamster ovary ont été utilisées pour établir des clones stables. La lignée humaine : les HEK (Human embrionic kidney), a été utilisée dans le deuxième partie du travail.

b) Entretien des lignées cellulaires

Les cellules sont maintenues à 37°C dans un incubateur avec un taux constant de CO₂ (5%). Les cellules COS-7 et les cellules HEK sont cultivées dans le DMEM (Dulbecco's modified Eeple's medium, Gibco) complété avec 10% de sérum de veau foetal et des antibiotiques : pénicilline 1000 UI/ml et streptomycine 1000 mg/ml (Gibco). Les CHO sont cultivées dans le milieu Ham F12 (complété également avec du sérum 10%).

Chaque lignée est repiquée lorsque les cellules ont atteint 80 à 90% de confluence. Le repiquage est réalisé selon les étapes suivantes :

- Le milieu de culture est remplacé par 2 ml de tampon phosphate: NaCl (137 mM), KCl (2.7 mM), Na₂HPO₄ (8 mM), KH₂PO₄ (1.5 mM) à pH=7.4 contenant 0.1% d'EDTA pendant 2 à 3 minutes.
- Afin de détacher les cellules de leur support, elles sont traitées avec 1 ml d'une solution à 0.25% de trypsine, solubilisée dans du PBS/EDTA, pendant 2 minutes. L'action enzymatique est arrêtée par addition de milieu de culture.
- Afin d'éliminer la trypsine du milieu de culture, les cellules sont centrifugées pendant 10 minutes à 192g (Eppendorf, centrifuge 5810R). Le culot est re-suspendu dans 5 ml de milieu de culture et les cellules sont mécaniquement individualisées.
- La concentration en cellules de cette suspension est ensuite estimée sur une lame de Malassez après coloration au bleu de trypan 0.05%. Le taux d'ensemencement est ensuite adapté au type d'expérience et au support.

c) Transfection et établissement de lignées stables

1) *Transfection transitoire*

Pour les expériences de patch clamp, les COS-7 sont transfectées à l'aide du polyéthylèneimine 22kDa (Pei, Poly transfection). Les cellules sont transfectées quand elles atteignent 60-70% de confluence. Les plasmides sont dilués dans du NaCl 150 mM et sont mélangés à du PEI dilué dans du NaCl 150 mM. Ce mélange est laissé 30 minutes à température ambiante afin que les complexes PEI/ADN se forment. En routine, nous utilisons 2 µg d'ADN par boîtes de cellules à transfecter (boîte de Pétri de 35 mm de diamètre). Les cellules transfectées sont ensuite incubées à 37 °C pendant au minimum 8 heures. Les cellules sont ensuite repiquées et ensemencées à faible densité pour avoir des cellules isolées. Le plasmide d'intérêt est transfecté avec un plasmide codant la GFP (Green Fluorescent Protein) afin de pouvoir repérer les cellules transfectées. Pour les expériences d'immunocytochimie et de biochimie, les cellules sont transfectées avec le fugene (roche). Pour cela, 3 µl de Fugene et 2µg d'ADN sont déposés dans 100µl du DMEM sans sérum. Le mélange est ensuite incubé pendant 30 minutes puis déposé sur les cellules en culture.

2) *Etablissement de clones stables*

Les clones stables sont établis à partir des cellules CHO. Dans un premier temps, les cellules sont ensemencées dans des plaques 6 puits avec deux lamelles en verre. Les cellules sont transfectées avec 2µg de plasmide (selon le protocole décrit précédemment). 48 heures plus tard, l'efficacité de transfection est vérifiée par un immunomarquage sur les lamelles en verre (protocole décrit au paragraphe pages 63-64). Les cellules sont ensuite trypsinées, diluées et ensemencées dans 4 boîtes de 100 mm de diamètre. Le lendemain le milieu de culture est remplacé par du milieu de sélection contenant la géniticine (500mg/ml, BRL). Le milieu de sélection est changé toutes les 48 heures et au bout d'une dizaine de jours, les clones apparaissent. Les clones choisis sont isolés à l'aide de cylindres stériles puis trypsinés et ensemencés dans une boîte 24 puits. La sélection des clones s'effectue par immunofluorescence et les clones qui possèdent le plus grand nombre de cellules qui expriment la protéine sont choisis et amplifiés pour être congelés.

3) *Congélation et décongélation des cellules*

Les cellules sont conservées dans des tubes cryogéniques stériles placés dans l'azote liquide. Pour la congélation, les cellules sont dissociées et ramenées à 2×10^6 cellules/1.5 ml de milieu de culture contenant 10 % de DMSO et 20 % de sérum. Les cellules sont ensuite réparties dans des tubes cryogéniques (2.5×10^6 cellules/tube) dans une boîte contenant de l'isopropanol afin que les cellules subissent une congélation progressive.

Pour remettre les cellules en culture après conservation dans l'azote liquide, il faut procéder à une décongélation rapide par immersion du tube à 37°C. Les cellules sont ensuite centrifugées à 192g dans 5 ml de milieu de culture afin d'éliminer le DMSO. Le culot est repris dans 10 ml de milieu de culture et les cellules sont réparties dans des flasques de culture (25 cm²).

d) Cardiomyocytes de souris néonatales

1) *Isolement*

Les souris néonatales âgées de 1 à 3 jours sont disséquées et les cœurs sont prélevés. Les oreillettes et les ventricules sont ensuite séparés sous la loupe binoculaire. Les ventricules sont dilacérés en petits morceaux puis digérés avec une solution contenant 35 mg de collagénase de type II (342 U/mg, Gibco) et 5 mg de pancréatine (sigma) dans 50ml de HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) froid. Le mélange est placé 10 minutes sous agitation douce dans l'incubateur où la température et le taux de CO₂ sont maintenus à 37°C et 5% respectivement. Le surnageant contenant les cellules dissociées est récupéré et le reste est remis à 37°C. Environ huit cycles sont répétés afin que toutes les cellules soient bien isolées. Les cellules sont ensuite centrifugées pendant 5 minutes à 192 g. Le culot est repris dans 6 ml de milieu de culture composé de DMEM complété avec 5% de sérum de veau foetal (PERBIO) et 10% de sérum de cheval (Gibco). Les cellules sont ensuiteensemencées dans une boîte de Pétri de 100 mm de diamètre pendant 90 minutes. Les fibroblastes adhérant plus vite que les cardiomyocytes, le surnageant est récupéré, les cellules comptées etensemencées dans une plaque 24 puits à raison de 30 000 cellules par puits.

2) *Transfection*

La transfection des cardiomyocytes de souris néonatales est effectuée à l'aide du Fugene dans les mêmes conditions que la transfection des lignées cellulaires (page 61)

C) MICROSCOPIE A FLUORESCENCE

L'immunofluorescence est effectuée sur des cellulesensemencées sur des lamelles de verre.

Pour le marquage de surface, les cellules sont incubées avec l'anticorps dirigé contre le tag HA extracellulaire (ascites 12CA5 purifiés, Dr Le Maout, CEA-Saclay) ou l'anticorps anti VSV (Sigma Aldrich) à 4°C pendant une heure. Ces anticorps sont dilués au 1/500 dans le PBS BSA 1%. Après cette incubation, les lamelles sont

rincées trois fois avec du PBS contenant du calcium et du magnésium à 1mM. Les cellules sont ensuite fixées au paraformaldéhyde 4 % (Invitrogene) pendant 15 minutes puis sont perméabilisées avec 0.1 % Triton X100 (Sigma) pendant également 15 minutes. Pour visualiser le canal localisé dans les compartiments intercellulaires, un marquage est effectué en utilisant un anticorps dirigé contre l'extrémité C-terminale de KCNQ1 (Santa Cruz C20 dilué au 1/500 ou Alomone au 1/2000). En ce qui concerne la colocalisation du canal KCNQ1 avec la protéine CD4-KKXX, les cellules sont marquées avec les anticorps anti-KCNQ1 et anti-CD4 (Sim2.1 ascites, dilué au 1/1000). Le marquage des cardiomyocytes, s'effectue selon le même protocole, avec un marquage supplémentaire de l'alpha actinine (Santa Cruz, dilué au 1/1000). Après plusieurs rinçages, les cellules sont incubées avec les anticorps secondaires couplés à l'Alexa-488, l'Alexa-568 ou l'Alexa 647 correspondants (1:1000 dilution, Molecular Probes). Les lamelles sont montées sur lame avec le milieu de montage : vectashield contenant du DAPI pour marquer les noyaux (Vector).

L'acquisition des images est effectuée grâce à un microscope inversé équipé d'épifluorescence (Zeiss Axiover) ou à l'aide d'un microscope confocal (Leica).

D) BIOCHIMIE

a) Western-blot

Pour les expériences de western-blot les cellules sont ensemencées sur des boîtes de pétri de 35mm. 24 heures après la transfection, les cellules sont lysées avec le tampon de lyse (NaCl 150mM, EDTA 5 mM, Tris 20 mM, Triton X100 1%, anti-protéases (Complete, Roche Diagnostics) et 1 mM de phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, Sigma)). Les cellules sont grattées et broyées à l'aide d'une seringue avec une aiguille « 25g » puis incubées à 4°C pendant 40 minutes pour solubiliser les membranes. Le lysat est ensuite centrifugé à 15 000 g pendant 15 minutes pour éliminer les noyaux et les cellules mal lysées. Le surnageant est ensuite récupéré et les protéines sont dénaturées dans le tampon Laemmli (glycérol 2%, du Tris pH 6.8 à 13 mM, du SDS 0.46 %, du DTT 2 mM et du bleu de bromophénol) pendant 30 minutes à température ambiante. 25 µl de chaque échantillon sont déposés sur un

gel de polyacrylamide 10% et les protéines sont séparées par électrophorèse en présence de sodium dodecylsulfate (SDS). Après leur migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Schleicher et Schull) pendant 30 minutes à 20V. Afin de s'assurer du bon transfert des protéines, elles sont colorées à l'aide du rouge Ponceau (Sigma). Après lavage, la membrane est saturée avec un tampon TBS-T (Tris 10mM, NaCl 150m et du Tween 20 à 0.1%) contenant 5 % lait. Puis, la membrane est incubée en présence de l'anticorps primaire dilué dans le TBS-T lait 5% toute la nuit à 4°C ou pendant 1 heure à température ambiante. Après trois lavages de 10 minutes, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire couplé à la HRP (Santa Cruz) dilué au 1/10000 pendant une heure à température ambiante. Après un rinçage d'une demi-heure dans le TBS-T, la révélation est effectuée avec un kit de détection de chemiluminescence (GE Healthcare). La quantification des bandes de western-blot est effectuée par le logiciel Image J.

b) Marquage métabolique au S35 : pulse-chase

Les HEK 293 sont ensemencées sur une boîte de 100 mm de diamètre, puis décollées 48 heures après leur transfection. Les cellules sont ensuite déplétées en cystéine et méthionine pendant 5 minutes en les incubant à 37°C dans 1 ml de DMEM dépourvu méthionine et cystéine (Gibco). Les cellules sont marquées avec 40µl de cystéine méthionine ³⁵S (250µC/ml, Amersham) pendant 15 minutes. Une fois le marquage terminé, l'excès de radioactivité est éliminé en rinçant les cellules au PBS puis au DMEM contenant de la méthionine et de la cystéine « froides ». Les cellules sont ensuite re-suspendues dans 10 ml de DMEM puis réparties dans différents tubes et incubées à 37 °C pendant 5, 30, 60, 120 et 240 minutes pour étudier la décroissance du signal radioactif. Les cellules sont ensuite centrifugées et rincées dans du PBS. La lyse des cellules s'effectue dans 500µl tampon de lyse. Pour pouvoir analyser la cinétique de dégradation de KCNQ1, une immunoprécipitation est réalisée (voir paragraphe suivant). Une fois l'électrophorèse effectuée, le gel est fixé puis séché et la révélation est réalisée par autoradiographie. Pour tester l'inhibition de la dégradation du canal par le protéasome, les cellules sont incubées avec 25 µM de MG132 (Bio Mol) pendant 4 heures après le marquage radioactif.

c) Immunoprécipitation

Les lysats sont incubés avec 1µg d'anticorps anti-KCNQ1 toute la nuit sous agitation à 4°C. Les billes d'agarose couplées à la protéine G (GE Healthcare) sont préalablement rincées dans le tampon de lyse puis 20µl de billes sont ajoutés aux lysats. Après une incubation d'une heure à 4°C, les billes sont rincées trois fois avec 200µl tampon de lyse complet, un fois avec le tampon de lyse sans Triton X100 et une fois avec du Tris 10 mM pH 7.5. Après le dernier rinçage, les billes sont centrifugées et le culot est repris dans 25µl de tampon de dénaturation contenant (glycérol 5%, du Tris pH 6.8 à 32 mM, du SDS 1.15 %, du DTT 100 mM et du bleu de bromophénol). La dénaturation est réalisée à température ambiante pendant 30 minutes. Les échantillons sont ensuite déposés sur gel acrylamide 10% puis un western-blot est effectué selon le protocole décrit précédemment (pages 64-65).

E) Patch-Clamp

a) Dispositif expérimental

Après leur transfection, les cellules COS-7 sontensemencées dans des boîtes de Pétri, la dilution des cellules est choisie de façon à ce qu'elles soient isolées le jour de l'étude. La boîte de Pétri contenant les cellules est placée dans une chambre annulaire en laiton posée sur la platine d'un microscope inversé (Nikon ECLIPSE, TS 100). Le microscope est couplé à une lampe fluorescente permettant de repérer les cellules transfectées avec l'ADNc codant la GFP. Les cellules sont perfusées en continu avec une solution de tyrode (NaCl 145mM, KCl 4mM, MgCl₂ 1mM, CaCl₂ 1mM, HEPES 5mM, glucose 5mM, pH 7.5) maintenue à 35°C par l'intermédiaire d'un circuit d'eau portée à température par un chauffage thermostaté (Polystat, Bioblock Scientific). Les pipettes de verre sont étirées à partir de tubes à hématocrite (Kimble) avec une étireuse verticale (modèle P-30, Sutter instrument & Co) pour que leur résistance soit comprise entre 2.5 et 3.5 Mohm. La pipette est remplie de deux solutions intracellulaires, la première solution est composée de 145 mM K-gluconate, 5 mM HEPES, 2 mM EGTA, 2 mM Mg-gluconate, pH 7.2. Le haut de la pipette est quant à lui rempli avec une solution composée de 145 mM KCl, 5 mM HEPES, 2 mM

EGTA, 2 mM MgCl, pH 7.2. La pipette est montée sur un porte électrode relié à un micromanipulateur permettant de la placer avec précision sur les cellules. La pipette est connectée par un fil d'argent chloruré à un amplificateur de patch-clamp (Biologic, RK 300) qui permet d'imposer un potentiel et de mesurer des courants. Une électrode de référence Ag/AgCl (Phymep) est plongée dans le bain.

b) Protocole expérimental

La configuration qui a été utilisée lors de cette étude est la configuration cellule-entière. Les cellules COS-7 sont transfectées avec le canal sauvage ou muté KCNQ1 (400 ng), KCNE1 (800 ng) et GFP (800 ng) 24 ou 48 heures avant l'expérience. Pour étudier l'effet dominant négatif des mutations responsables du syndrome de Romano-Ward, les cellules sont transfectées avec 200ng de KCNQ1 sauvage ou co-transfectées avec 200 ng de KCNQ1 sauvage et 200 ng de KCNQ1 muté.

Le courant I_{Ks} est activé par une dépolarisation de la membrane et se désactive lors d'une repolarisation à des potentiels suffisamment négatifs. Le protocole de stimulation (figure 20) est composé d'une phase de dépolarisation de deux secondes qui va activer le courant (de -80 mV à $+40$ mV avec un incrément de 20 mV) et d'une phase de repolarisation ou pulse à -40 mV qui induit la fermeture des canaux. L'amplitude du courant de queue est mesurée à -40 mV. La courbe d'activation du courant I_{Ks} est une exponentielle qui peut être modélisée par l'équation de Boltzman : $I = (1 + \exp(-(V_{pp} - V_{1/2})/k))$ avec k et $V_{1/2}$ constants. I est l'amplitude du courant, V_{pp} est le potentiel de pré-pulse. Cette équation permet de mesurer le potentiel permettant l'activation de la moitié des canaux ou $V_{1/2}$. La désactivation du courant de queue suit un décaissement mono-exponentiel, elle peut être modélisée selon l'équation suivante : $I(t) = a' + b' \cdot \exp(-t/\tau_{\text{désact}})$. $\tau_{\text{désact}}$: constante de temps de désactivation.

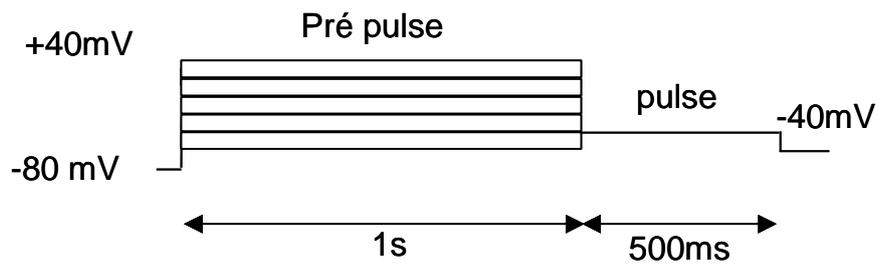


Figure 20 : Protocole de stimulation

En ce qui concerne le courant « M » résultant de l'association des canaux KCNQ2 et KCNQ3, les mêmes protocoles de stimulation ont été utilisés pour le mesurer.

Les cellules COS-7 ont été transfectées avec KCNQ2, KCNQ3 ou KCNQ2 L85P (1,2 μg) et la GFP (0,8 μg). Pour la mesure du courant hétéromérique KCNQ2/KCNQ3, les cellules ont été transfectées avec 0,6 μg de KCNQ3 et 0,6 μg de KCNQ2 wt ou KCNQ2 L85P.

Résultats

I Un motif N terminal détermine le trafic de KCNQ1. Implication dans le syndrome de Romano-Ward.

A) Introduction

KCNQ1 est un canal potassique voltage-dépendant, il est exprimé dans le cœur avec sa sous-unité régulatrice KCNE1. L'association de ces deux protéines génère le courant I_{Ks} responsable de la repolarisation au cours du potentiel d'action cardiaque (Barhanin, J. et al. 1996, Sanguinetti, M. C. et al. 1996).

Des mutations au niveau des gènes codant ces deux protéines ont été impliquées dans le syndrome du QT long (SQTL). Ce syndrome est caractérisé par un allongement de l'intervalle QT sur l'électrocardiogramme signe d'une anomalie de la repolarisation. Deux formes du SQTL congénital ont été décrites. Le syndrome de Jervell et Lange-Nielsen, tout d'abord, est un variant transmis selon un mode récessif. En plus des atteintes cardiaques, les patients souffrent d'une surdité bilatérale. Le syndrome de Romano-Ward, quant à lui, est la forme la plus fréquente, il est transmis selon un mode dominant, sans surdité associée.

Le pré-ARNm codant le canal KCNQ1 subit un épissage alternatif ; deux principales isoformes ont été décrites (Demolombe, S. et al. 1998, Yang, W. P. et al. 1997). L'isoforme 2 ne possède pas les 126 premiers acides aminés et, contrairement à l'isoforme 1, n'est pas exprimée au niveau de la membrane plasmique mais reste localisée dans le réticulum endoplasmique. Il est intéressant de noter que peu de mutations impliquées dans le syndrome du QT long ont été identifiées dans cette partie de KCNQ1 mais que la plupart induisent un phénotype particulièrement grave (Splawski, I. et al. 2000).

Ces observations nous ont amenés à étudier le rôle de l'extrémité N-terminale dans le trafic de KCNQ1. Au cours de ce travail, notre attention s'est focalisée sur les effets de trois mutations qui induisent un phénotype très sévère : Y111C, L114P et P117L. La mutation Y111C, a été identifiée chez une femme âgée de 36 ans qui a subi des syncopes depuis l'âge de 3 ans (Splawski, I. et al. 2000). Le jeune garçon

Résultats : Un motif N terminal détermine le trafic de KCNQ1. Implication dans le syndrome de Romano-Ward.

de 7 ans porteur de la mutation L114P a été identifié par Jongbloed et ses collaborateurs. Il a développé des épisodes de syncopes durant des exercices physiques (Jongbloed, R. et al. 2002). La dernière mutation P117L, a été identifiée chez deux familles italiennes. Pour l'une, la mutation a été découverte chez plusieurs de ses membres ayant un intervalle QT anormalement long. Chez l'autre, la mutation est apparue *de novo* chez un seul membre de cette famille (Schwartz, P. J. et al. 2001a).

[Circ Res.](#) 2006 Nov 10;99(10):1076-83. Epub 2006 Oct 19.



The N-terminal juxtamembranous domain of KCNQ1 is critical for channel surface expression: implications in the Romano-Ward LQT1 syndrome.

[Dahimène S.](#), [Alcoléa S.](#), [Naud P.](#), [Jourdon P.](#), [Escande D.](#), [Brasseur R.](#), [Thomas A.](#), [Baró I.](#), [Mérot J.](#)

Inserm, U533, Nantes, France.

N-terminal mutations in the KCNQ1 channel are frequently linked to fatal arrhythmias in newborn children and adolescents but the cellular mechanisms involved in this dramatic issue remain, however, to be discovered. Here, we analyzed the trafficking of a series of N-terminal truncation mutants and identified a critical trafficking motif of KCNQ1. This determinant is located in the juxtamembranous region preceding the first transmembrane domain of the protein. Three mutations (Y111C, L114P and P117L) implicated in inherited Romano-Ward LQT1 syndrome, are embedded within this domain. Reexpression studies in both COS-7 cells and cardiomyocytes showed that the mutant proteins fail to exit the endoplasmic reticulum. KCNQ1 subunits harboring Y111C or L114P exert a dominant negative effect on the wild-type KCNQ1 subunit by preventing plasma membrane trafficking of heteromultimeric channels. The P117L mutation had a less pronounced effect on the trafficking of heteromultimeric channels but altered the kinetics of the current. Furthermore, we showed that the trafficking determinant in KCNQ1 is structurally and functionally conserved in other KCNQ channels and constitutes a critical trafficking determinant of the KCNQ channel family. Computed structural predictions correlated the potential structural changes introduced by the mutations with impaired protein trafficking. In conclusion, our studies unveiled a new role of the N-terminus of KCNQ channels in their trafficking and its implication in severe forms of LQT1 syndrome.

B) Résultats et discussion

Dans les paragraphes suivants, j'ai résumé les résultats obtenus au cours de cette étude en insistant sur certains aspects qui ont été moins développés dans l'article joint.

Nous avons montré que la délétion des 106 premiers acides aminés de KCNQ1 n'affecte ni l'expression membranaire ni la fonction du canal. En revanche, la suppression des 114 premiers acides aminés induit une rétention du canal dans le RE. Ces observations suggèrent que cette zone (107-QGRVYNF-114), proche du premier segment transmembranaire, est essentielle pour l'expression du canal à la surface des cellules.

Cette séquence nous apparut d'autant plus intéressante que les trois mutations responsables du syndrome du QT long, citées plus haut (Y111C, L114P et P117L), se situent dans ou proche de cette région. Nous avons montré, dans les cellules CHO ou les cardiomyocytes transfectés, que les protéines mutées ne sont pas transportées vers la membrane plasmique de ces deux modèles cellulaires. Ces protéines restent localisées dans le RE avec une protéine témoin qui porte une séquence de rétention dans le RE : le CD4-KKXX. Ce résultat a été confirmé par les études électrophysiologiques qui ont montré que contrairement au canal sauvage les protéines mutées ne génèrent aucun courant.

Le rôle des sous-unités mutées sur l'état hétérozygote du canal a ensuite été étudié en co-transfectant une quantité équivalente de plasmide codant le canal sauvage et le canal muté. Nous avons montré que les mutations Y111C et L114P ont un effet dominant négatif sur le canal sauvage car elles induisent une diminution de plus de 50% du courant généré par le canal KCNQ1 sauvage homozygote. En revanche, la co-expression du canal P117L avec le canal sauvage, n'induit aucune modification de l'amplitude du courant. L'effet dominant négatif n'est observé pour ce mutant, que

Résultats : *Un motif N terminal détermine le trafic de KCNQ1. Implication dans le syndrome de Romano-Ward.*

si la quantité de plasmide transfectée est trois fois supérieure à celle du canal sauvage.

L'ensemble de ces résultats a permis de définir cette région, localisée juste avant le premier segment transmembranaire du canal, comme une zone importante pour son trafic vers la membrane plasmique. Son importance s'est confirmée dans l'étude d'autres membres de la famille des canaux KCNQ : les canaux « neuronaux » KCNQ2 et KCNQ3. En effet, l'analyse des séquences a montré que cette région est très conservée parmi les canaux KCNQ. De plus, nous avons montré que la mutation de la leucine 85 sur le canal KCNQ2 (KCNQ2-L85P), correspondant à la leucine 114 sur le canal KCNQ1, semble également induire la rétention de la protéine dans le RE.

L'étude électrophysiologique des mutations Y111C et L114P a montré que ces deux mutations ont, comme toutes les mutations RW, un effet dominant négatif expliquant la forte diminution de l'amplitude du courant I_{Ks} et donc le phénotype (Huang, L. et al. 2001, Wilson, A. J. et al. 2005).

En revanche, l'effet de la mutation P117L est différent. L'expression de KCNQ1 wt et KCNQ1 P117L à un ratio 1 : 1, n'induit aucune modification de l'amplitude du courant. Alors que l'expression des deux protéines à un ratio 1 : 3, induit une forte diminution de la densité du courant I_{Ks} . Il est peu probable que l'absence d'effet dominant négatif soit dû à un défaut d'interaction du canal muté avec le canal KCNQ1 sauvage car la zone de tétramérisation entre les différentes sous-unités située dans l'extrémité C-terminale est présente dans le mutant KCNQ1 P117L. De plus, nous avons montré que l'expression du canal sauvage restaure l'expression membranaire du canal muté P117L ce qui confirme une interaction entre les deux protéines.

Une interprétation possible des résultats est que la stœchiométrie des sous-unités mutantes-sauvages dans l'hétérotétramère détermine son trafic. Avec un rapport 1 : 1 des ADN transfectés, le défaut de structure induit par la mutation P117L est corrigé ou masqué par les sous-unités sauvages. Lorsque les sous-unités P117L deviennent majoritaires, le défaut ne serait plus corrigé et le complexe reconnu par le contrôle qualité de la cellule. Cette interprétation n'est pas en contradiction avec les données cliniques qui identifient cette mutation comme étant particulièrement grave. En plus

Résultats : Un motif N terminal détermine le trafic de KCNQ1. Implication dans le syndrome de Romano-Ward.

de son effet sur le trafic, cette mutation modifie les propriétés électrophysiologiques des hétéromultimères. Ainsi, le décalage du potentiel de demi-activation vers les potentiels plus positifs et l'accélération de la fermeture du canal (accélération de la désactivation) que nous avons mis en évidence vont dans le sens d'une perte de fonction du canal. Ces modifications peuvent être à l'origine du ralentissement de la repolarisation des cardiomyocytes et donc du SQT/L observé chez les patients.

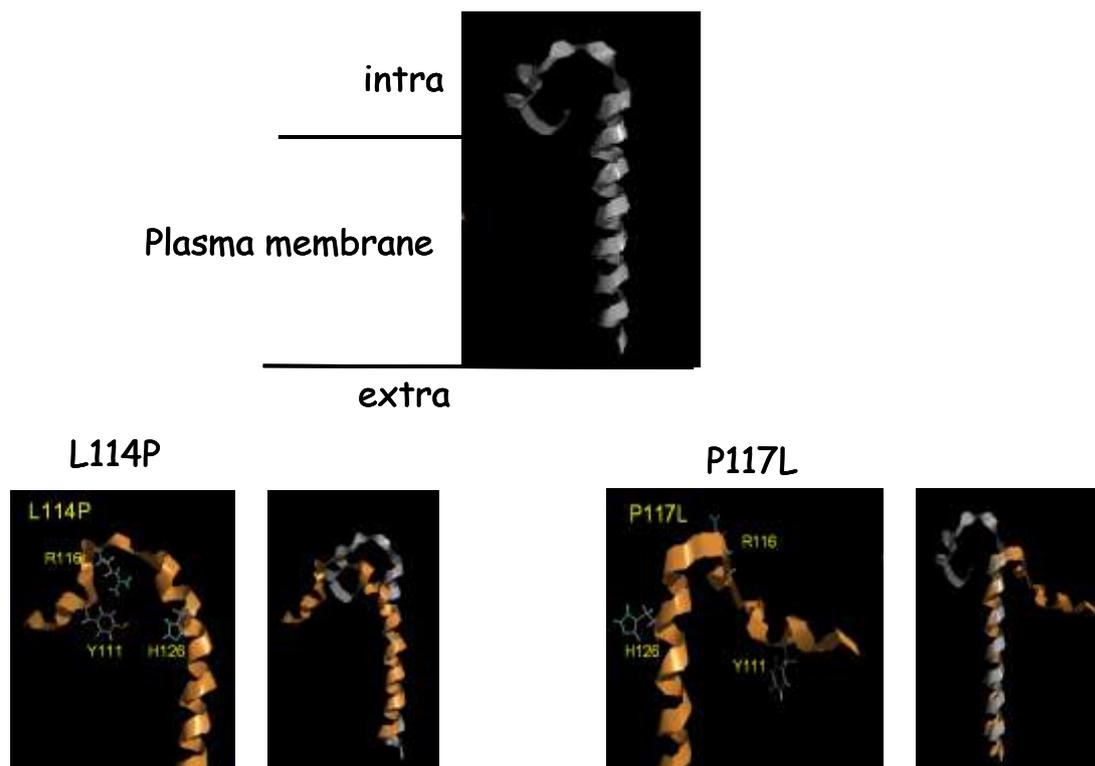


Figure 21 : Effets des mutations sur la structure tridimensionnelle.

Modèle de structure représentant la fin de l'extrémité N-terminale (zone des mutations) et le premier segment transmembranaire. En gris est représenté la protéine sauvage et en marron les protéines mutées L114P et P117L

Pour tenter de caractériser les effets des mutations sur la stabilité de la protéine, des prédictions de structure ont été réalisées en collaboration avec les Drs Brasseur R et Thomas A. Le modèle de structure obtenu propose que la séquence V106-L114 forme une hélice alpha, suivie d'une boucle 115-ERPTG-119 (figure 21). Cette courte hélice ainsi que le premier segment transmembranaire sont proches et sont stabilisés

Résultats : *Un motif N terminal détermine le trafic de KCNQ1. Implication dans le syndrome de Romano-Ward.*

par des interactions hydrophobes notamment entre la Y111 et l'histidine 126 du premier segment transmembranaire. Selon ce modèle cette structure tridimensionnelle serait perturbée par les trois mutations (Y111C, L114P et P117L). La substitution de la proline, responsable de la formation d'un coude, en leucine (P117L) induit une structure plus lâche. La co-expression du canal sauvage pourrait dans une certaine mesure restaurer la structure de cette zone de la protéine mutée et induire donc son expression à la membrane. Ce modèle de prédiction de structure représente un outil intéressant mais ne concerne qu'une zone réduite de la protéine et ne présage pas des effets des mutations sur la structure de la protéine entière.

II Dégradation du canal KCNQ1 sauvage et muté par la voie du protéasome et implication de la Derlin-1

A) Introduction

Le RE est un milieu favorable au bon repliement des protéines nouvellement synthétisées. En revanche, il est aussi le site de la dégradation des protéines anormales afin d'éviter leur accumulation délétère dans la cellule. Ce phénomène est appelé ERAD (ER associated degradation) et comprend plusieurs étapes (Sitia, R. and Braakman, I. 2003). Dans un premier temps, les chaperones interagissent avec les protéines dès le début de leur synthèse et contribuent à leur bon repliement. Les protéines qui, en dépit de l'assistance des chaperones, n'acquièrent pas une structure tridimensionnelle adéquate sont reconnues par des ubiquitine ligases pour être ubiquitinées. Pour être reconnus par ces dernières, les polypeptides doivent exposer leurs résidus lysine vers le cytoplasme. Cette étape nécessite donc la rétro-translocation du polypeptide vers le cytoplasme. Il a été montré récemment que la Derlin-1 intervient dans la rétro-translocation des chaînes légères du CMH de classe I (Ye, Y. et al. 2005). Cette protéine localisée dans la membrane du RE, intervient également dans la dégradation du canal CFTR (Sun, F. et al. 2006). Cette dernière étude a montré que la Derlin-1 induit une augmentation de la dégradation du canal sauvage ainsi que celle du canal muté.

Une fois que les protéines sont reconnues par des ubiquitine ligases, elles sont ubiquitinylées puis relarguées vers le cytoplasme pour être reconnues et dégradées par le protéasome.

Le contrôle qualité a été impliqué dans certaines canalopathies (Ficker, E. et al. 2003, Gong, Q. et al. 2005, Jensen, T. J. et al. 1995, Manganas, L. N. et al. 2001, Ward, C. L. et al. 1995). Par exemple, l'étude de Gong et ses collaborateurs a montré que la voie de l'ubiquitine-protéasome est responsable de la dégradation du canal hERG portant la mutation Y661H responsable du LQT2 (Gong, Q. et al. 2005).

Dans la première partie de ce travail, nous avons mis en évidence l'effet de trois mutations responsables du syndrome de Romano-Ward localisées dans l'extrémité N-terminale du canal KCNQ1 : Y111C, L114P et P117L (Jongbloed, R. et al. 2002, Schwartz, P. J. et al. 2001a, Splawski, I. et al. 2000). Nous avons montré que ces protéines mutées sont retenues dans le RE et exercent un effet dominant négatif sur le canal sauvage. Dans cette deuxième partie nous nous sommes intéressés aux effets de la mutation Y111C sur la maturation de la protéine et notamment l'implication du contrôle qualité cellulaire.

Au cours de cette étude, nous avons observé qu'à l'état stationnaire, la quantité totale de protéines mutantes est plus faible que celle de la protéine sauvage suggérant un taux de synthèse plus faible et/ou une dégradation accrue des canaux mutants. Les résultats préliminaires présentés dans les paragraphes suivants indiquent que la protéine mutante Y111C a une demi-vie plus courte que celle du canal sauvage. La dégradation de KCNQ1 semble être médiée par le protéasome et la Derlin-1, impliquée dans la rétro-translocation des protéines, semble moduler sa dégradation.

B) Matériel et méthodes

✓ Les plasmides utilisés et mutagenèse

Les ADNc codant le canal KCNQ1 sauvage ou les canaux mutés : Y111C et P117L sont clonés dans le plasmide pCB6 et l'ADNc L114P dans le plasmide pCI. L'ADNc codant la Derlin-1 a été obtenu par mutagenèse dirigée à partir d'une construction pEGFP-Derlin-1 fournie par HL Ploegh, puis sous cloné dans le plasmide pCB6 (Lilley, B. N. and Ploegh, H. L. 2004).

✓ Culture cellulaire Transfection

Les méthodes de culture des cellules HEK 293 et de leur transfection par le FuGENE sont présentées dans le chapitre Matériel et Méthodes (pages 60-61). Dans ces expériences, il nous est apparu important de garder le rapport ADN-FuGENE constant et d'utiliser comme « ballast », en remplacement de KCNE1 ou de la Derlin-1, un ADNc codant une protéine membranaire (CD4) plutôt qu'un ADN non codant ou une protéine soluble. Aussi, les cellules sont transfectées avec 667 ng de plasmide codant pour KCNQ1 wt ou KCNQ1 muté (Y111C, L114P et P117L) et 1,34 µg de plasmide codant pour le CD4. Pour étudier les effets de KCNE1, les cellules sont, en plus, transfectées avec 667 ng de KCNE1 et 667 ng de CD4 pour chaque condition. De même, les effets de la Derlin-1 sont étudiés en transfectant le pCB6-KCNQ1 wt ou le pCB-KCNQ1 Y111C (667 ng), pRC-KCNE1 (667 ng) et le pCB6-Derlin-1 (667 ng).

✓ Immunoprécipitation et western-blot

Western-blot.

Les protocoles sont décrits dans le paragraphe Matériel et Méthodes (pages 64-65). Brièvement, les cellules sont lysées deux jours après leur transfection dans le tampon de lyse contenant : NaCl 150mM, Tris 20mM, EDTA 5mM, Triton X100 1%, PMSF 1mM, antiprotéases (Roche). Les cellules sont ensuite centrifugées pendant

Résultats : dégradation du canal *KCNQ1* sauvage et muté par la voie du protéasome et implication de la *Derlin-1*.

10 minutes à 16000g. Les lysats sont dénaturés à température ambiante pendant 30 minutes dans le Laemmli (glycérol 10%, du Tris pH 6.8 à 65 mM, du SDS 2.3%, du DTT 10mM et du bleu de bromophénol). Puis une électrophorèse est effectuée en conditions dénaturantes. Les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose. La membrane est incubée avec l'anticorps anti-KCNQ1 (Alomone, 1/2000) ou l'anticorps anti-Derlin-1 (Clini Sciences, 1/500) ou l'anticorps anti-GAPDH (1/20000, RDI). Le signal est ensuite visualisé avec un anticorps couplé à la peroxydase (Santa Cruz, 1/10000) et un kit de détection ECL (GE Healthcare).

Immunoprécipitation Derlin-1

Pour l'immunoprécipitation, le lysat cellulaire est incubé avec 1µg d'anticorps anti-KCNQ1 (Alomone) toute la nuit à 4°C. Des billes d'agarose couplées à la protéine G (GE Healthcare) sont rajoutées au lysat cellulaire. Les billes sont rincées trois fois avec le tampon de lyse complet et une fois avec le tampon de lyse dépourvu de Triton X100. Les protéines sont ensuite dénaturées et un western-blot est effectué.

Ubiquitination de KCNQ1

Pour étudier l'effet de l'inhibition du protéasome, les cellules sont incubées à 37°C en présence du MG132 (25µM) pendant 4 heures (Bio Mol). Les cellules sont ensuite lysées comme décrit précédemment. L'ubiquitination étant un phénomène réversible, nous avons rajouté du NEM (N-éthymaléimide, Pierce) 10mM au tampon de lyse pour inhiber la de-ubiquitination des protéines. Les cellules sont ensuite lysées et une immunoprécipitation est effectuée dans les mêmes conditions que celles de la *Derlin-1*. Après électrophorèse et transfert sur une membrane de nitrocellulose, la saturation et les incubations avec les anticorps sont réalisées en présence de la BSA (4% pour la saturation et 2% pour les incubations avec les anticorps). La révélation de l'ubiquitine est effectuée avec l'anticorps FK2 (dilué au 1/500, Bio Mol).

Marquage métabolique : le pulse-chase

Les cellules sont cultivées sur des boîtes de pétri de 10cm de diamètre, elles sont ensuite mises en suspension et incubées à 37°C dans un milieu de culture DMEM

dépourvu de cystéine et méthionine (Gibco). Le marquage est effectué en incubant les cellules avec 400 $\mu\text{Ci/ml}$ de méthionine et cystéine marquées au ^{35}S (Amersham) pendant 15 minutes. Puis, les cellules sont rincées, une fois avec du PBS et une fois avec du milieu de culture DMEM. Elles sont ensuite incubées dans le milieu « froid » (non radioactif) pendant 5, 60, 120 et 240 minutes. Les cellules sont rincées deux fois avec le PBS. La lyse des cellules est effectuée selon le protocole décrit précédemment. Une immunoprécipitation de KCNQ1 est effectuée avec 1 μg d'anticorps anti-KCNQ1 (Alomone). Les protéines sont ensuite dénaturées à température ambiante pendant 30 minutes, séparées par électrophorèse en conditions dénaturantes et révélées par autoradiographie. La quantification est réalisée à l'aide d'un phosphoimager (GE Healthcare, Typhoon 9400 scanner) en utilisant le logiciel Image Quant (GE Healthcare).

C) Résultats

✓ Expression du canal KCNQ1 sauvage et des trois mutants de la partie N-terminale (Y111C, L114P et P117L) à l'état stationnaire

Dans la précédente étude, nous avons montré que les trois mutations (Y111C, L114P et P117L) localisées dans l'extrémité N-terminale du canal, à proximité du premier segment transmembranaire, induisent la rétention du canal dans le réticulum endoplasmique. En étudiant le niveau d'expression des différents mutants à l'état stationnaire, nous avons observé une différence d'expression entre le canal sauvage et les canaux mutés. En effet, comme le montre le western-blot réalisé sur des lysats de cellules HEK 293 transfectées avec les canaux sauvages et mutés (figure 22 à gauche), les protéines mutées sont moins exprimées à l'état stationnaire. Nous avons quantifié ces résultats en normalisant les signaux KCNQ1 par rapport à ceux de la GAPDH pour corriger les variations de la quantité de lysat déposé dans chaque puits. Cette quantification réalisée sur trois expériences indépendantes, indique que l'expression des protéines mutées est plus faible que celle du canal sauvage. Bien que le nombre d'expériences (n=3), ne permette pas de déterminer la validité statistique de cette différence d'expression, le résultat est reproductible. Dans chaque expérience, l'expression des mutants est toujours plus faible que celle de la protéine sauvage.

Dans le cœur KCNQ1 est associé avec sa sous-unité régulatrice KCNE1. Nous avons donc analysé l'effet de cette protéine sur le niveau d'expression des protéines mutées. Les résultats présentés sur la figure 22B montrent que ni le niveau d'expression du canal sauvage (comparer aux figures 22A), ni celui des mutants n'est affecté par l'expression de KCNE1.

Après avoir vérifié que les constructions plasmidiques étaient rigoureusement identiques aux mutations Y111C, L114P et P117L près, nous avons conclu que cette différence d'expression à l'état stationnaire peut avoir deux origines : les mutations

Résultats : dégradation du canal KCNQ1 sauvage et muté par la voie du protéasome et implication de la Derlin-1.

peuvent induire une diminution de la synthèse de KCNQ1 et/ou une augmentation de sa dégradation.

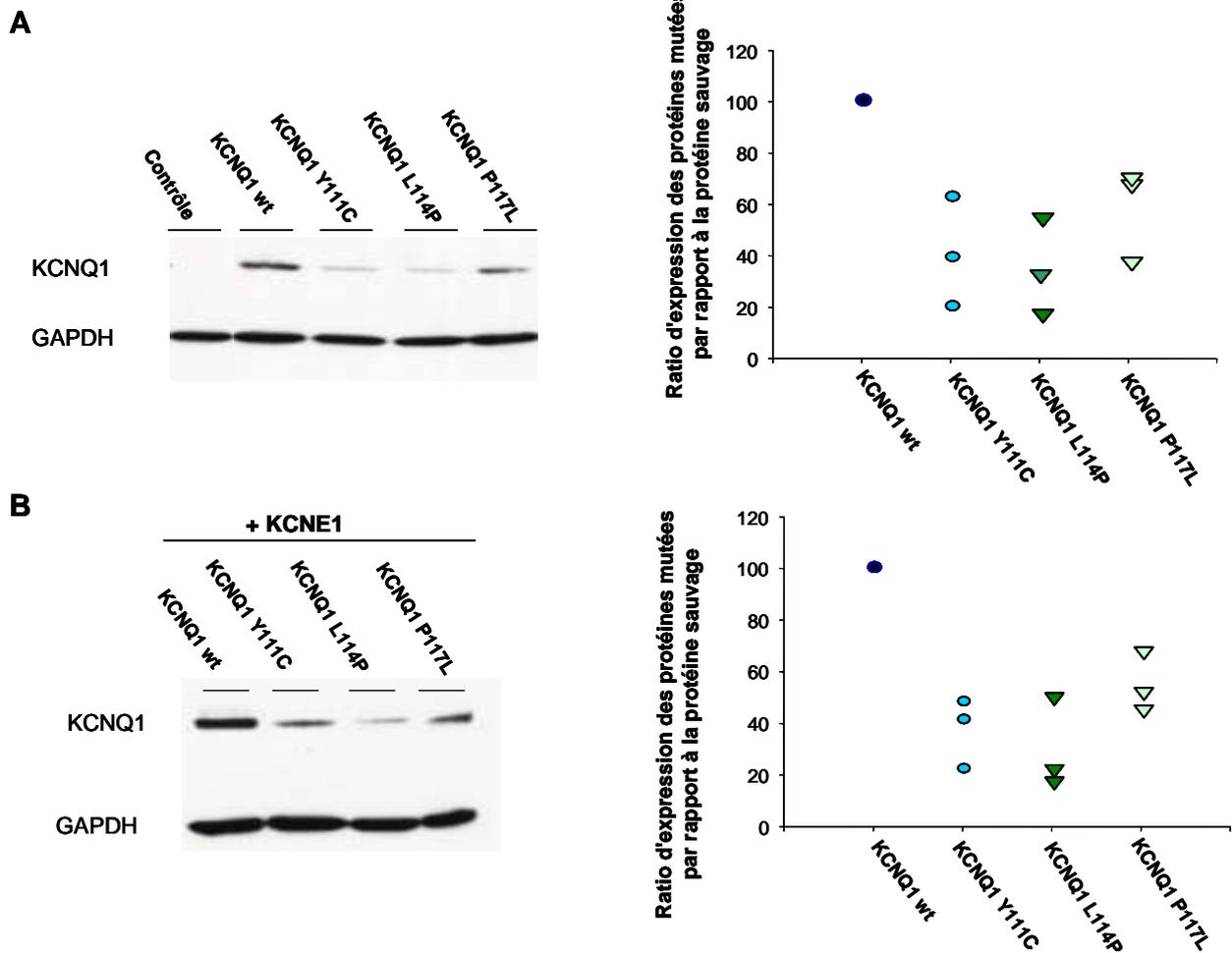


Figure 22 : Les protéines mutées sont moins exprimées que la protéine sauvage à l'état stationnaire.

A : western-blot du lysat des cellules exprimant le canal KCNQ1 sauvage (WT) ou les canaux mutés. Le graphique représente le rapport entre l'expression des protéines mutées et celle de la protéine sauvage, ce ratio est effectué sur des valeurs normalisées sur l'expression de la GAPDH. **B** : western-blot du lysat des cellules exprimant les canaux KCNQ1 sauvage ou mutés en présence de KCNE1. Le graphique représente le rapport entre l'expression des protéines mutées et le canal sauvage, ce ratio est effectué sur des valeurs normalisées sur l'expression de la GAPDH.

✓ **Synthèse et demi-vie de la protéine sauvage et des protéines mutées**

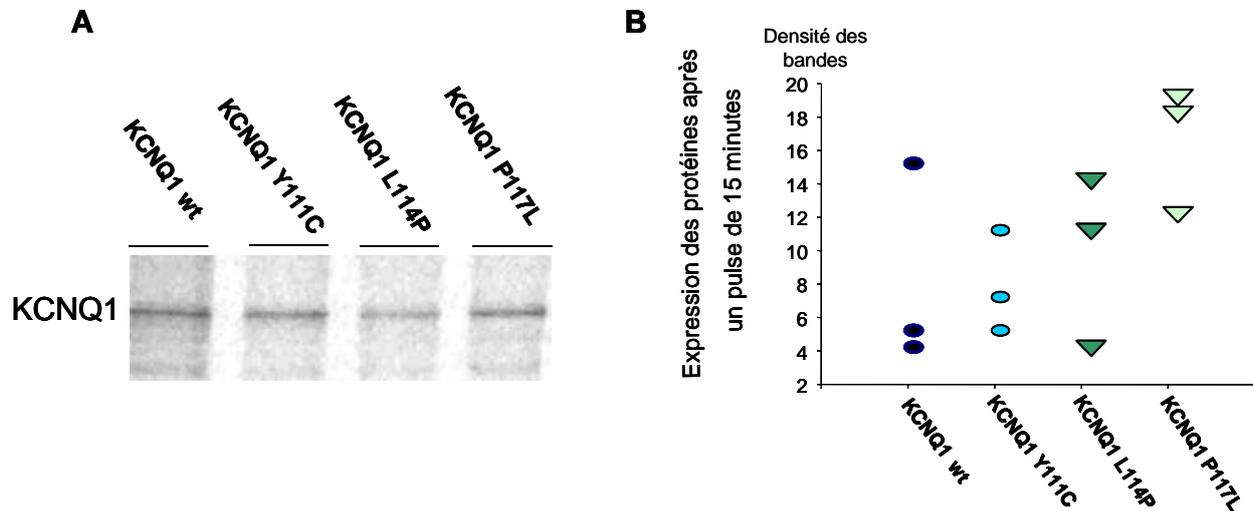


Figure 23 : KCNQ1 WT et muté néo-synthétisés en 15 minutes.

A : exemple de signaux KCNQ1 wt, Y111C, L114P et P117L après une synthèse de 15 minutes par autoradiographie. Les cellules ont été incubées 15 minutes avec de la méthionine et cystéine marquées au ^{35}S , puis lysées et le canal KCNQ1 est immunoprécipité. Une électrophorèse est réalisée en conditions dénaturantes puis révélée par autoradiographie. **B** : quantification de la synthèse du canal wt et des mutants.

Pour déterminer si cette différence d'expression à l'état stationnaire, résulte d'une diminution de la synthèse des protéines mutées, nous avons évalué la synthèse de KCNQ1 par la technique de marquage métabolique au ^{35}S . Les cellules transfectées avec le canal sauvage ou muté sont incubées avec cet isotope radioactif pendant 15 minutes. Les protéines synthétisées vont donc incorporer la méthionine et la cystéine marquées au ^{35}S . Après lyse des cellules et immunoprécipitation du canal, une électrophorèse est effectuée puis révélée par autoradiographie (figure 23 A). Trois expériences ont été effectuées et quantifiées. Bien qu'il y ait une dispersion importante des mesures d'une expérience à l'autre, le taux de synthèse des canaux sauvages et mutants n'est pas très différent dans une même expérience voire même plus important pour le

mutant P117L ce qui va à l'encontre des mesures à l'état stationnaire (figure 23 B). Ces résultats suggèrent que la différence d'expression à l'état stationnaire n'est pas due à une différence des taux de synthèse des protéines.

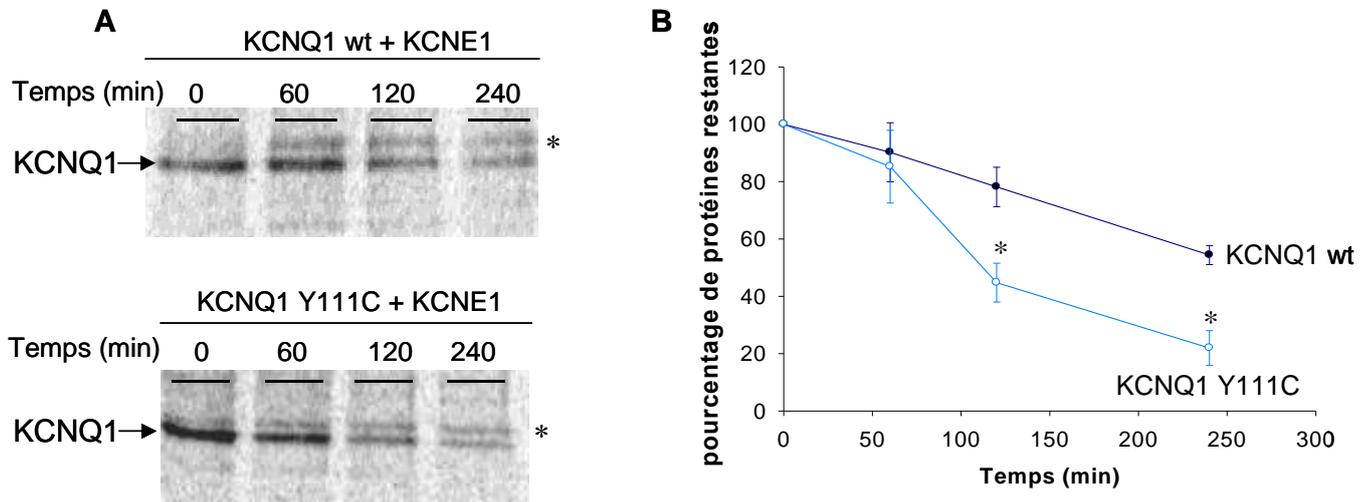


Figure 24 : Le KCNQ1-Y111C est dégradé plus rapidement que le canal sauvage.

A : exemple de KCNQ1 WT et Y111C immunoprécipités après le marquage de 15 minutes avec la méthionine et la cystéine marquées au ^{35}S (t_0) et après 60, 120 et 240 min de chasse dans le milieu « froid ». La bande repérée par un astérisque (*) correspond à une bande aspécifique co-immunoprécipitée avec le canal dans quelques expériences. **B** : quantification du signal restant par rapport au signal à t_0 ($n=5$ pour le wt et $n=4$ pour le Y111C). Les moyennes sont significativement différentes pour les temps 120 et 240 minutes (test de Mann et Whitney).

Nous avons alors comparé les cinétiques de dégradation de ces protéines en choisissant la mutation Y111C comme modèle. Dans ces expériences, les cellules transfectées avec le canal sauvage ou muté sont marquées pendant 15 minutes avec de la méthionine et cystéine couplées ^{35}S puis incubées dans du milieu « froid » (sans méthionine et cystéine radioactives) pendant une, deux et quatre heures (figure 24 A). Après immunoprécipitation, le KCNQ1 restant est quantifié par rapport à la quantité mesurée au temps t_0 (figure 24 B). Par ces expériences nous avons montré que le mutant Y111C est dégradé plus

Résultats : dégradation du canal KCNQ1 sauvage et muté par la voie du protéasome et implication de la Derlin-1.

rapidement que la protéine sauvage (Fig 24 B). Les temps de demi-vie étant de plus de 4 heures pour KCNQ1 WT et de l'ordre de 2 heures pour KCNQ1-Y111C. La différence de signal observé à l'état stationnaire est donc probablement due à une dégradation plus rapide de la protéine mutée.

✓ **Dégradation par le protéasome**

Nous avons ensuite déterminé la voie impliquée dans la dégradation de KCNQ1, nous avons focalisé notre attention sur la voie de dégradation par le protéasome.

❖ **Effet de l'inhibition du protéasome**

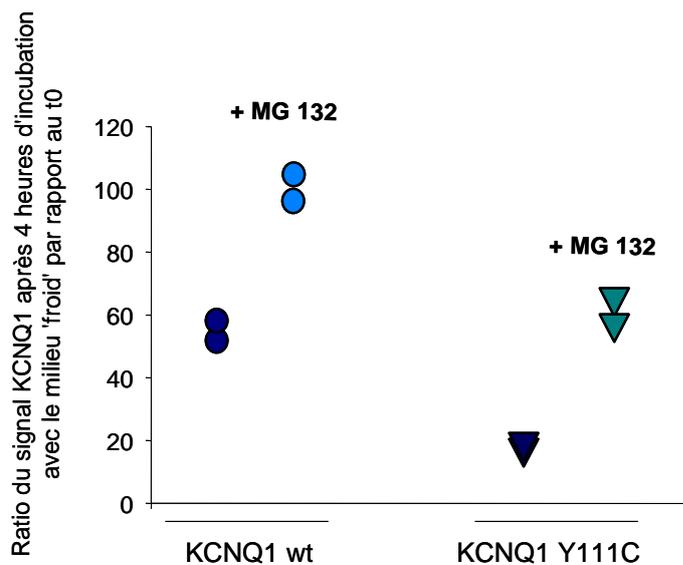


Figure 25: Le MG 132 inhibe la dégradation du canal sauvage et Y111C.

Après marquage avec du ^{35}S , les cellules sont incubées dans du milieu « froid » en présence ou en absence de MG 132 pendant 4 heures. Le graphique représente le pourcentage du signal à 4 heures par rapport au signal à t_0 .

Dans un premier temps, nous avons évalué l'effet d'un inhibiteur du protéasome sur la dégradation de KCNQ1. Nous avons utilisé le MG 132 (Z-Leu-Leu-Leu-aldéhyde). Cette molécule bloque l'activité enzymatique du protéasome et plus particulièrement

l'activité chymotrypsine (Rock, K. L. et al. 1994). Après la synthèse de 15 minutes en présence de ^{35}S , les cellules sont incubées pendant quatre heures dans du milieu « froid » en présence ou en absence de 25 μM de MG132. Nous avons ensuite mesuré le signal KCNQ1 restant au bout de quatre heures. Les résultats sont exprimés en pourcentage du signal mesuré à t_0 . Comme cela est illustré pour deux expériences sur la figure 25, le MG132 bloque presque totalement la dégradation du KCNQ1 sauvage et à 50% celle du Y111C.

Ces résultats suggèrent que la voie principale de dégradation du canal KCNQ1 est le protéasome.

❖ Ubiquitination de KCNQ1

Les protéines étant ubiquitinées avant d'être dégradées par le protéasome, nous avons étudié l'ubiquitination de KCNQ1. Après immunoprécipitation spécifique du canal KCNQ1 sauvage ou muté exprimé dans des cellules transfectées, l'immunoprécipitat est révélé avec un anticorps dirigé contre l'ubiquitine (figure 26 A). Comme cela est illustré sur la figure 26 A, un marquage diffus apparaît spécifiquement au-dessus du poids moléculaire de KCNQ1 (75kDa) dans les immunoprécipitations faites sur les cellules transfectées avec KCNQ1 et KCNQ1 Y111C mais pas pour les cellules non transfectées (contrôle). Ce signal augmente quand les cellules ont été incubées 4 heures avec l'inhibiteur du protéasome le MG 132 (25 μM) mais ne semble pas modifié par l'expression de la protéine auxiliaire KCNE1. L'effet inhibiteur du MG 132 est attesté par l'augmentation du signal « ubiquitine » observé sur le lysat des cellules traitées par rapport aux cellules non traitées (Fig 26 A blot de droite). Ces résultats indiquent que le signal observé correspond bien au canal KCNQ1 ubiquitiné. D'autre part, pour s'assurer que le canal KCNQ1 est exprimé, les lysats ont été révélés avec l'anticorps anti-KCNQ1 (figure 26 B).

L'ensemble de ces observations suggèrent que les canaux KCNQ1 wt et muté sont dégradés par la voie du protéasome.

Résultats : dégradation du canal KCNQ1 sauvage et muté par la voie du protéasome et implication de la Derlin-1.

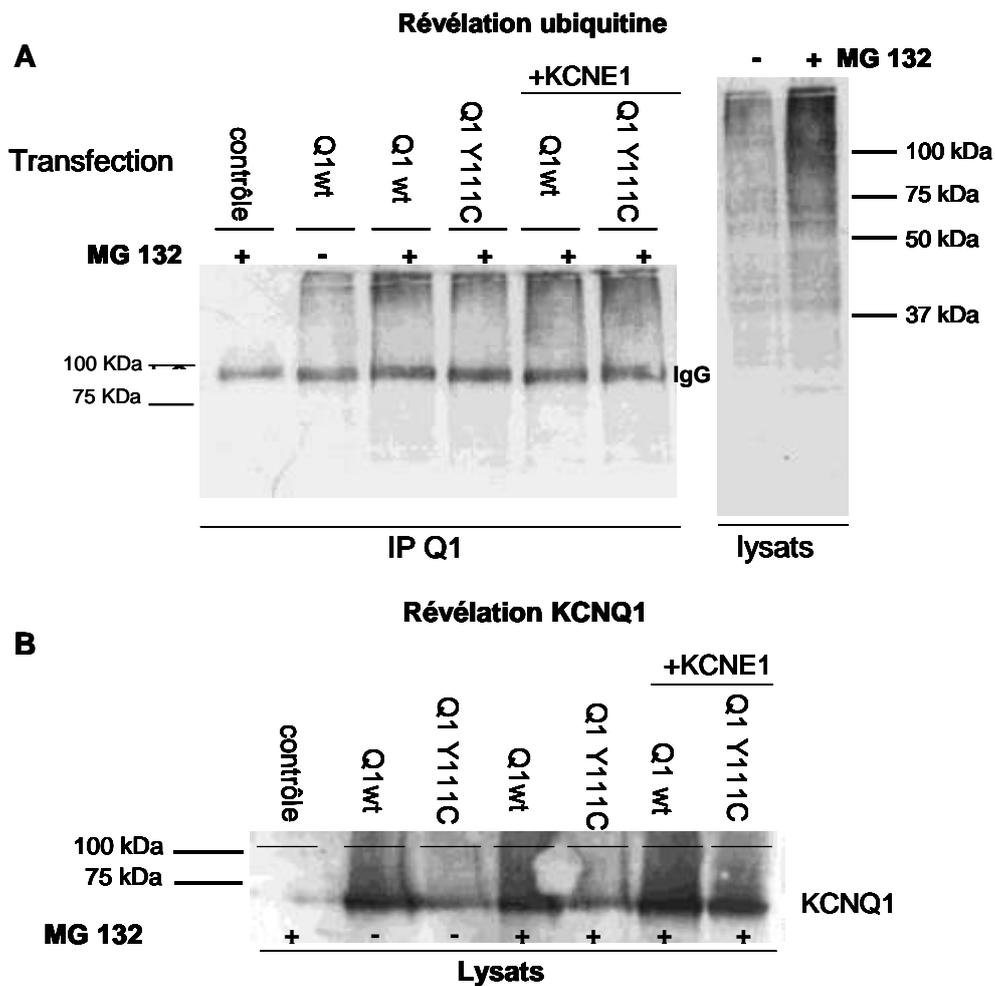


Figure 26: Ubiquitination des canaux KCNQ1 wt et KCNQ1 Y111C

A : immunoprécipitation de KCNQ1 et révélation avec l'anticorps anti-ubiquitine. Les cellules sont transfectées, comme indiqué sur la figure, avec le canal sauvage (wt) ou Y111C en présence ou en absence de KCNE1. Deux conditions sont testées : cellules non traitées et cellules préalablement traitées avec l'inhibiteur du protéasome, le MG 132 (25 μ M). L'efficacité de cette inhibition est montrée sur le lysat total (image de droite). **B** : western-blot révélé KCNQ1, les conditions de transfection sont indiquées sur la figure.

✓ **Rôle de la Derlin-1 dans la dégradation de KCNQ1**

Pour mieux caractériser la voie de dégradation du canal, nous avons étudié le rôle de la Derlin-1. Cette protéine identifiée préalablement chez la levure (Knop, M. et al.

Résultats : dégradation du canal KCNQ1 sauvage et muté par la voie du protéasome et implication de la Derlin-1.

1996) a été impliquée dans la dégradation des chaînes légères du CMH de classe I (Lilley, B. N. and Ploegh, H. L. 2004, Ye, Y. et al. 2004). Récemment, la Derlin-1 a également été impliquée dans la dégradation du canal CFTR (Sun, F. et al. 2006, Younger, J. M. et al. 2006)

❖ *KCNQ1* immunoprécipite la *Derlin-1*

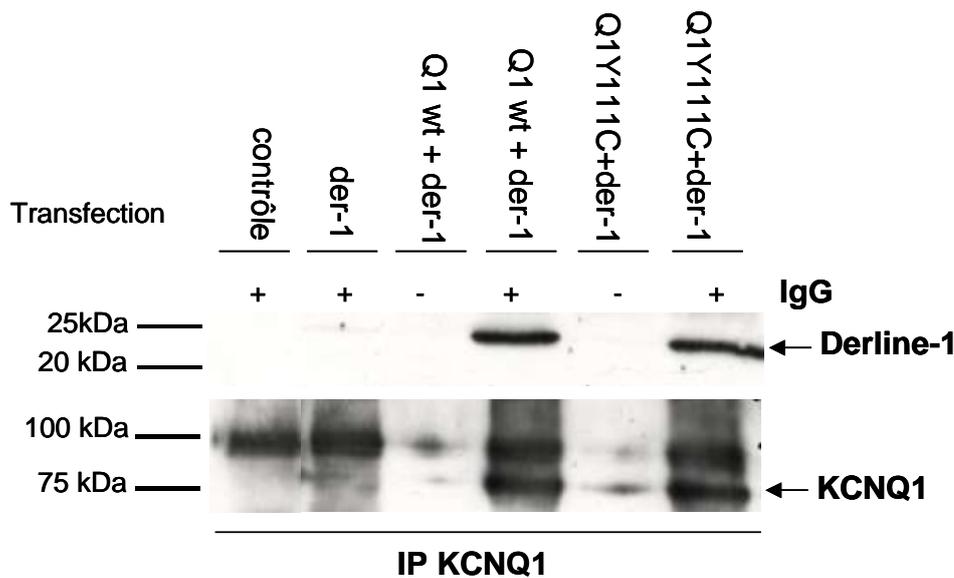


Figure 27: KCNQ1 et Derlin-1 co-immunoprécipitent.

Les cellules HEK 293 sont transfectées avec le canal KCNQ1 (wt) ou muté seul ou en présence de Derlin-1 comme indiqué sur la figure. L'immunoprécipitation est effectuée à l'aide de l'anticorps anti-KCNQ1 (la présence ou l'absence d'anticorps anti-KCNQ1 est indiquée par + ; - respectivement). La Derlin-1 est spécifiquement co-immunoprécipitée avec KCNQ1 et KCNQ1-Y111C. L'expression de KCNQ1 et KCNQ1 Y111C ainsi que l'efficacité de l'immunoprécipitation sont vérifiées en révélant le blot avec l'anticorps anti-KCNQ1 (blot inférieur). Les faibles bandes KCNQ1 visibles sur les contrôles (ligne 3 et 5) sont dues à une petite contamination de ces lignes par les dépôts faits sur les lignes 4 et 5.

Dans un premier temps, nous avons testé si KCNQ1 et la Derlin-1 sont présents dans le même complexe protéique. Nous avons effectué une immunoprécipitation du canal que nous avons révélé avec l'anticorps anti-derline1. Comme le montre la

Résultats : dégradation du canal KCNQ1 sauvage et muté par la voie du protéasome et implication de la Derlin-1.

figure 27, KCNQ1 wt et KCNQ1 Y111C co-immunoprécipitent avec le Derlin-1. Le signal Derlin-1 est spécifique, puisqu'il n'est pas observé quand l'immunoprécipitation est réalisée sur des cellules non transfectées ou sur des cellules transfectées uniquement avec la Derlin-1 (première et deuxième ligne respectivement). L'absence de bande Derlin-1 dans le témoin de l'immunoprécipitation sans les IgG (troisième ligne) montre également la spécificité du signal Derlin-1.

❖ *Effet de la Derlin-1 sur l'état stationnaire*

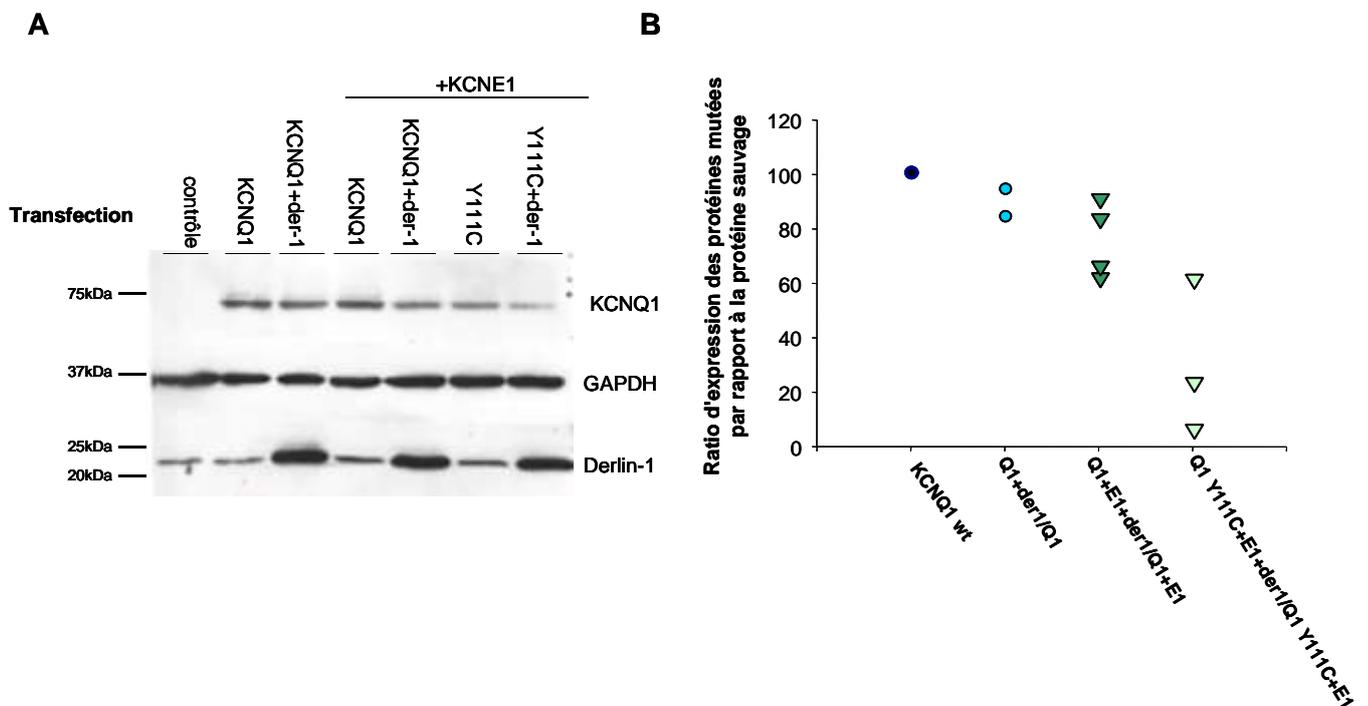


Figure 28: Derlin-1 diminue l'expression de KCNQ1 wt et KCNQ1 Y111C à l'état stationnaire.

A : les cellules HEK 293 sont transfectées comme indiqué sur la figure. Le western-blot est révélé avec l'anticorps anti-KCNQ1, anti-GAPDH et anti-Derlin-1. **B** : quantification et ratio d'expression du canal en présence de Derlin-1 par rapport au signal KCNQ1 en absence de Derlin-1.

Résultats : dégradation du canal KCNQ1 sauvage et muté par la voie du protéasome et implication de la Derlin-1.

Nous avons commencé à étudier le rôle de Derlin-1 sur le niveau d'expression des canaux sauvage et muté à l'état stationnaire. Comme cela est illustré sur la figure 28 A, la Derlin-1 diminue légèrement l'expression du canal KCNQ1. Cet effet n'est pas ou peu modifié par la présence de la sous unité KCNE1. En revanche, sur les premières expériences réalisées, l'effet de la Derlin-1 semble être plus important sur le mutant KCNQ1 Y111C (figure 28 B) que sur le KCNQ1 sauvage.

Ce résultat suggère que la Derlin-1 aurait un rôle dans la dégradation du canal KCNQ1 et plus particulièrement dans la dégradation du canal muté Y111C.

D) Discussion et perspectives

Le contrôle qualité de la cellule a été impliqué dans certaines canalopathies. En revanche, aucune étude n'avait pour le moment étudié son implication dans le syndrome du QT long de type 1. Dans cette deuxième partie du travail, nous avons donc tenté de mieux caractériser les mécanismes impliqués dans la maturation et la dégradation de KCNQ1.

✓ Cinétiques de dégradation de KCNQ1

Nous avons montré que, à l'état stationnaire, les protéines mutées (Y111C, L114P et P117L) sont moins exprimées que le canal KCNQ1 sauvage. Le taux de néo-synthèse ne semble pas être différent entre ces protéines alors que la dégradation du canal muté Y111C est accélérée par rapport au sauvage. Cette augmentation de la dégradation pourrait donc être à l'origine de la diminution du niveau d'expression observée.

L'étude des cinétiques de dégradation du canal sauvage a montré que sa demi-vie est courte (un peu plus de 4 heures). Ce temps est néanmoins de l'ordre de ceux mesurés pour d'autres canaux potassiques notamment le canal KCNQ2 : 2,4 heures, le canal potassique activé par le calcium hK1 : 3,2 heures, le canal Kv1.1 : 5 heures et le canal hERG : 8 heures (Deal, K. K. et al. 1994, Jones, H. M. et al. 2004, Kagan, A. et al. 2000, Soldovieri, M. V. et al. 2006).

La dégradation « rapide » du KCNQ1 sauvage par le protéasome indique l'inefficacité de sa biogenèse qui traduit en fait la très grande précision du contrôle de la qualité des protéines membranaires néo-synthétisées dans le RE. Ce phénomène a été décrit pour la biogenèse des canaux ioniques et tout particulièrement pour le canal CFTR. La demi-vie plus courte du mutant Y111C laisse penser que la mutation introduit suffisamment de modifications structurales pour qu'il soit reconnu plus efficacement par le système de contrôle qualité.

Nous pouvons cependant émettre l'hypothèse que la transfection et donc la sur-expression du canal KCNQ1 sauvage ou muté provoque un stress cellulaire qui induit leurs dégradations. En effet, l'accumulation de protéines anormales peut surcharger les capacités de synthèse de la cellule en saturant certains des composants cellulaires notamment les chaperones. Les protéines anormales ont alors tendance à s'accumuler plaçant la cellule dans une situation de « stress ». La cellule réagit alors par une réponse appelée UPR pour unfolded protein response (Mori, K. 2000). Elle va notamment activer la transcription des gènes codant les chaperones résidentes dans le RE telle que la Bip.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons comparé le niveau d'expression de la chaperone Bip, par western-blot, en réponse à un stress (un traitement à la tunicamycine) et dans nos conditions de transfection. Nous n'avons pas observé de différences significatives du niveau d'expression de Bip entre les cellules non transfectées, les cellules transfectées avec le canal KCNQ1 sauvage ou les cellules transfectées avec le canal muté (Y111C). En revanche, l'expression de la Bip augmente quand les cellules sont soumises à un traitement avec la tunicamycine (5µg/ml). Ce résultat indique que la transfection et donc la sur-expression de KCNQ1 n'induisent pas un « stress » de la cellule suggérant que la dégradation de ces protéines n'est pas un processus secondaire à un stress cellulaire.

✓ **Reconnaissance par les chaperones**

La reconnaissance des protéines « anormales » par les chaperones constitue la première étape du contrôle qualité. Les protéines interagissent avec les chaperones au cours de leur synthèse. Ces dernières contribuent au bon repliement des protéines afin d'acquérir leur structure tridimensionnelle adéquate. Si les protéines n'ont pas acquis leur bonne conformation, les chaperones les dirigent vers la voie de dégradation.

Afin de caractériser les chaperones qui interviennent dans la maturation du canal, nous avons étudié son interaction avec des chaperones connues telles que les chaperones du stress thermique (Hsp70 et Hsp 90), une lectine (la calnexine),

d'autres chaperones de la lumière du RE (la Bip, la PDI, Erp72) et une cochaperone (STI 1).

Curieusement nous n'avons observé de co-immunoprécipitation qu'avec la Hsp70 et uniquement en présence d'un agent pontant des protéines le DTSP (dithiobis succinimidyl propionate) ce qui laisse penser que l'interaction est très labile. Cette chaperone reconnaît les zones hydrophobes des polypeptides et permet de les garder dans un état soluble. Il est probable que le maintien de l'interaction de cette chaperone avec KCNQ1 induit sa reconnaissance par la machinerie cellulaire pour être dégradé.

L'absence d'interaction avec la calnexine et la PDI peuvent s'expliquer par le fait que KCNQ1 ne soit pas glycosylé et ne comporte pas à notre connaissance de ponts disulfures. De plus, ces expériences n'ont pas dévoilé d'interactions du mutant Y111C avec des chaperones supplémentaires. Il est donc probable que d'autres chaperones participent à la détection des perturbations structurales apportées par la mutation Y111C telles que celles envisagées par notre analyse de prédiction de structure (figure 21 page 74). Ces chaperones restent à être identifiées.

Il a été montré que la Hsp 70 interagit avec un cofacteur : CHIP. Son domaine U-box lui confère une activité E3 ligase lui permettant d'ubiquitiner ses substrats. Bien que le canal sauvage et le canal muté (Y111C) semblent être dans un environnement très proche de la Hsp70, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'interaction entre le canal KCNQ1 et le cofacteur CHIP. Cela étant, la Hsp70 interagit avec un autre co-facteur (BAG1). Il sera intéressant d'étudier son interaction éventuelle avec KCNQ1 d'autant plus que BAG1 possède un domaine d'interaction avec le protéasome 26S et pourrait donc être un intermédiaire entre le canal et ce dernier.

✓ **Rétro-translocation de KCNQ1 et implication de la Derlin-1**

Pour être ubiquitinées puis dégradées par le protéasome, les polypeptides cibles sont rétro-transloqués du RE. L'extraction de la protéine membranaire anormale hors de la membrane du RE fait intervenir des complexes protéiques particuliers. Ainsi, le translocon Sec 61 a été impliqué dans la rétro-translocation des protéines

membranaires virales US2 et US11 (Wiertz, E. J. et al. 1996). Plus récemment, un complexe comportant la Derlin-1 a été mis en évidence dans la rétro-translocation de protéines virales et du canal CFTR (Lilley, B. N. and Ploegh, H. L. 2004, Sun, F. et al. 2006, Ye, Y. et al. 2004, Younger, J. M. et al. 2006). Derlin-1 recruterait autour de la protéine à dégrader l'ATP-ase p97 et ses cofacteurs l'Ufd1 et Npl4. Ce complexe participerait à l'extraction du polypeptide vers le cytoplasme et Derlin-1 formerait le pore à travers lequel les protéines seraient rétro-transloquées (Wahlman, J. et al. 2007, Ye, Y. et al. 2004).

Par des expériences de co-expression et de co-immunoprécipitation nous avons montré que les canaux KCNQ1 sauvage et muté (Y111C) font partie d'un complexe protéique contenant la Derlin-1. Bien que l'interaction avec la protéine endogène soit difficile à mettre en évidence car le signal observé est à la limite du bruit de fond, plusieurs observations laissent penser qu'elle est réelle et qu'elle pourrait avoir un rôle physiologique. Premièrement, KCNQ1 sauvage et mutant co-immunoprécipitent avec la Derlin-1 lorsque cette dernière est sur-exprimée. Ensuite, sa sur-expression induit une diminution du niveau d'expression de KCNQ1 à l'état stationnaire. Enfin, cet effet est encore plus prononcé pour le mutant Y111C.

Des expériences restent à réaliser pour, confirmer l'effet de la Derlin-1 notamment, des expériences de pulse-chase afin de vérifier qu'elle accélère la dégradation de KCNQ1. La participation d'autres composants du complexe impliqué dans la rétro-translocation telle que la p97 devra aussi être recherchée. Enfin, comme cela est discuté plus loin, le rôle physiologique de l'interaction Derlin-1/KCNQ1 devra être étudié dans un système cellulaire où ces protéines et leurs partenaires sont exprimés de manière endogène.

✓ **Dégradation de KCNQ1 par la voie du protéasome**

Nous avons montré que les canaux KCNQ1 sauvage et muté (Y111C) sont ubiquitinés et dégradés par une voie sensible au MG 123 qui est vraisemblablement celle du protéasome. Il faut cependant noter que contrairement au canal sauvage, l'inhibition de la dégradation par le MG 132 n'est pas totale pour le mutant Y111C. Cette observation peut avoir deux origines. Il est possible que le traitement avec le

MG 132 à 25 μ M pendant 4 heures n'inhibe pas totalement le protéasome bien que ces conditions soient comparables à celles utilisées dans d'autres études et que la dégradation du canal KCNQ1 sauvage est presque entièrement inhibée par le MG 132. (Benharouga, M. et al. 2001, Gelman, M. S. et al. 2002). Alternativement, il est possible qu'une fraction des canaux Y111C soit dégradée par une autre voie que celle de la voie du protéasome. Une voie de dégradation indépendante de l'ATP a été suggérée pour le mutant CFTR Δ F508 (De Keukeleire, B. et al 2005, 6^{ème} colloque des jeunes chercheurs de la mucoviscidose).

✓ **Modèles d'étude**

Qu'en est-il de la dégradation du canal KCNQ1 sauvage ou mutant dans les cardiomyocytes ? Il faut garder à l'esprit que la maturation et la dégradation des protéines sont le plus souvent étudiées, comme nous l'avons fait, dans des systèmes hétérologues. L'impact de la sur-expression sur la demi-vie de la protéine dans ces conditions n'est pas toujours vérifié et rend hasardeuse. Bien que dans nos expériences, nous ayons tenté d'évaluer le stress apporté par la sur-expression du canal, la transposition directe des résultats aux conditions physiologiques reste audacieuse. Par exemple, alors que CFTR a depuis longtemps été considéré comme une protéine présentant une maturation difficile et inefficace, des études récentes tendent à prouver le contraire. Ainsi, Ward et Kopito ont montré que 70-80% du CFTR néo-synthétisé est dégradé par le contrôle qualité cellulaire (Ward, C. L. et al. 1995, Ward, C. L. and Kopito, R. R. 1994). En revanche, l'équipe de Bebok a récemment montré que la maturation du CFTR exprimé de façon endogène par les cellules Calu-3 est très efficace (Varga, K. et al. 2004). Cette équipe a également montré que le CFTR endogène des cellules Calu-3 n'interagissait pas avec le complexe p97 (Goldstein, R. F. et al. 2007). Ce point devra être éclairci pour KCNQ1 en analysant sa dégradation dans un système cellulaire où il est exprimé de manière endogène telles que les cellules épithéliales T84 voire des cardiomyocytes.

✓ **Les effets des autres mutations**

Dans ce travail, seule la mutation Y111C a été étudiée. Il nous a paru plus judicieux d'examiner, dans un premier temps, les effets de cette mutation car les expériences fonctionnelles ont montré qu'elle induisait un effet dominant négatif très important. Il sera également très intéressant d'étudier les effets de la mutation P117L. L'étude fonctionnelle a en effet montré que le mutant P117L induit un effet dominant négatif plus faible que les deux autres. De plus, les prédictions de structures suggèrent que cette mutation provoque des modifications moins délétères que les mutations Y111C et L114P. Il sera intéressant d'étudier la dégradation du mutant P117L en présence ou en absence du canal sauvage et à différents ratio d'expression entre les deux protéines. Nous avons en effet montré qu'au ratio 1 : 1, le trafic de KCNQ1 P117L est restauré alors que l'expression de trois fois plus de mutants par rapport au canal sauvage induit la rétention du canal muté dans le RE. On peut imaginer que la présence d'une sous-unité sauvage au minimum dans un hétérotétramère stabilise le complexe sauvage/mutant et ralentit la dégradation du P117L. L'expression de trois fois plus de sous-unités P117L, induit au contraire une déstabilisation des hétérotétramères et une accélération de la dégradation du mutant P117L. Cette hypothèse devra être vérifiée.

Conclusions

Ce travail de thèse a permis dans un premier temps de caractériser une zone du canal qui est essentielle pour son expression à la membrane plasmique. Des mutations impliquées dans le syndrome du QT long, situées dans sa partie N-terminale, induisent la rétention du canal dans le RE et un effet dominant négatif sur le canal sauvage. Dans un deuxième temps, nous avons commencé à préciser les mécanismes impliqués dans cette canalopathie. Les résultats préliminaires montrent que les cinétiques de dégradation du canal muté sont accélérées par rapport au canal sauvage. Le canal KCNQ1 sauvage et le canal muté (Y111C) semblent être dégradés par la voie de l'ubiquitine-protéasome. De plus, nous avons pu mettre en évidence un rôle potentiel de la protéine Derlin-1 dans la dégradation.

Une meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans le trafic de KCNQ1 et en particulier l'étude des effets des mutations sur l'expression membranaire du canal permettra d'identifier des cibles pharmacologiques pour restaurer son trafic à condition que le canal muté soit fonctionnel. Des études concernant le canal cardiaque hERG ont montré que certaines molécules pharmacologiques permettent de restaurer l'expression à la membrane du canal hERG N470D (Gong, Q. et al. 2004, Gong, Q. et al. 2006, Rajamani, S. et al. 2002). Une seule étude a pour l'instant testé l'effet de telles « chaperones chimiques » pour restaurer le trafic de certains mutants KCNQ1 retenus dans le RE mais sans grand succès (Wilson, A. J. et al. 2005).

Références bibliographiques

Abbott,G.W. and Goldstein,S.A. (1998) A superfamily of small potassium channel subunits: form and function of the MinK-related peptides (MiRPs). *Q.Rev.Biophys.* **31**:357-398.

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

Abriel,H., Kamynina,E., Horisberger,J.D., and Staub,O. (2000) Regulation of the cardiac voltage-gated Na⁺ channel (H1) by the ubiquitin-protein ligase Nedd4. *FEBS Lett.* **466**:377-380.

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

Amerik,A.Y. and Hochstrasser,M. (2004) Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim.Biophys.Acta* **1695**:189-207.

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

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

Bays,N.W., Wilhovsky,S.K., Goradia,A., Hodgkiss-Harlow,K., and Hampton,R.Y. (2001) HRD4/NPL4 is required for the proteasomal processing of ubiquitinated ER proteins. *Mol.Biol.Cell* **12**:4114-4128.

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

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

Benharouga,M., Haardt,M., Kartner,N., and Lukacs,G.L. (2001) COOH-terminal truncations promote proteasome-dependent degradation of mature cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from post-Golgi compartments. *J.Cell Biol.* **153**:957-970.

Blobel,G. and Dobberstein,B. (1975) Transfer to proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J.Cell Biol.* **67**:852-862.

Bonifacino,J.S. and Traub,L.M. (2003) Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu.Rev.Biochem.* **72**:395-447.

Bradbury,N.A. (1999) Intracellular CFTR: localization and function. *Physiol Rev.* **79**:S175-S191.

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

Cartwright,T.A., Corey,M.J., and Schwalbe,R.A. (2007) Complex oligosaccharides are N-linked to Kv3 voltage-gated K⁺ channels in rat brain. *Biochim.Biophys.Acta* **1770**:666-671.

Chang,X.B., Cui,L., Hou,Y.X., Jensen,T.J., Aleksandrov,A.A., Mengos,A., and Riordan,J.R. (1999) Removal of multiple arginine-framed trafficking signals overcomes misprocessing of delta F508 CFTR present in most patients with cystic fibrosis. *Mol.Cell* **4**:137-142.

Chen,H., Kim,L.A., Rajan,S., Xu,S., and Goldstein,S.A. (2003) Charybdotoxin binding in the I(Ks) pore demonstrates two MinK subunits in each channel complex. *Neuron* **40**:15-23.

Chen,Y.H., Xu,S.J., Bendahhou,S., Wang,X.L., Wang,Y., Xu,W.Y., Jin,H.W., Sun,H., Su,X.Y., Zhuang,Q.N., Yang,Y.Q., Li,Y.B., Liu,Y., Xu,H.J., Li,X.F., Ma,N., Mou,C.P., Chen,Z., Barhanin,J., and Huang,W. (2003) KCNQ1 gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation. *Science* **299**:251-254.

Chiang,C.E. and Roden,D.M. (2000) The long QT syndromes: genetic basis and clinical implications. *J.Am.Coll.Cardiol.* **36**:1-12.

Covarrubias,M., Wei,A.A., and Salkoff,L. (1991) Shaker, Shal, Shab, and Shaw express independent K⁺ current systems. *Neuron* **7**:763-773.

Curran,M., Atkinson,D., Timothy,K., Vincent,G.M., Moss,A.J., Leppert,M., and Keating,M. (1993) Locus heterogeneity of autosomal dominant long QT syndrome. *J.Clin.Invest* **92**:799-803.

Curran,M.E., Splawski,I., Timothy,K.W., Vincent,G.M., Green,E.D., and Keating,M.T. (1995) A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* **80**:795-803.

- Deal, K.K., Lovinger, D.M., and Tamkun, M.M.** (1994) The brain Kv1.1 potassium channel: in vitro and in vivo studies on subunit assembly and posttranslational processing. *J. Neurosci.* **14**:1666-1676.
- Dedek, K. and Waldegger, S.** (2001) Colocalization of KCNQ1/KCNE channel subunits in the mouse gastrointestinal tract. *Pflugers Arch.* **442**:896-902.
- Demolombe, S., Baro, I., Pereon, Y., Bliet, J., Mohammad-Panah, R., Pollard, H., Morid, S., Mannens, M., Wilde, A., Barhanin, J., Charpentier, F., and Escande, D.** (1998) A dominant negative isoform of the long QT syndrome 1 gene product. *J. Biol. Chem.* **273**:6837-6843.
- Demolombe, S., Franco, D., de Boer, P., Kuperschmidt, S., Roden, D., Pereon, Y., Jarry, A., Moorman, A.F., and Escande, D.** (2001) Differential expression of KvLQT1 and its regulator IsK in mouse epithelia. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **280**:C359-C372.
- Deutsch, C.** (2002) Potassium channel ontogeny. *Annu. Rev. Physiol.* **64**:19-46.
- Deutsch, C.** (2003) The birth of a channel. *Neuron* **40**:265-276.
- Ellgaard, L. and Helenius, A.** (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**:181-191.
- Erler, I., Al Ansary, D.M., Wissenbach, U., Wagner, T.F., Flockerzi, V., and Niemeyer, B.A.** (2006) Trafficking and assembly of the cold-sensitive TRPM8 channel. *J. Biol. Chem.* **281**:38396-38404.
- Etheridge, S.P., Compton, S.J., Tristani-Firouzi, M., and Mason, J.W.** (2003) A new oral therapy for long QT syndrome: long-term oral potassium improves repolarization in patients with HERG mutations. *J. Am. Coll. Cardiol.* **42**:1777-1782.
- Ficker, E., Dennis, A.T., Wang, L., and Brown, A.M.** (2003) Role of the cytosolic chaperones Hsp70 and Hsp90 in maturation of the cardiac potassium channel HERG. *Circ. Res.* **92**:e87-100.
- Firsov, D., Schild, L., Gautschi, I., Merillat, A.M., Schneeberger, E., and Rossier, B.C.** (1996) Cell surface expression of the epithelial Na channel and a mutant causing Liddle syndrome: a quantitative approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**:15370-15375.
- Frydman, J., Nimmesgern, E., Ohtsuka, K., and Hartl, F.U.** (1994) Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature* **370**:111-117.
- Gamper, N., Li, Y., and Shapiro, M.S.** (2005) Structural requirements for differential sensitivity of KCNQ K⁺ channels to modulation by Ca²⁺/calmodulin. *Mol. Biol. Cell* **16**:3538-3551.

- Garrido,J.J., Fernandes,F., Giraud,P., Mouret,I., Pasqualini,E., Fache,M.P., Jullien,F., and Dargent,B.** (2001) Identification of an axonal determinant in the C-terminus of the sodium channel Na(v)1.2. *EMBO J.* **20**:5950-5961.
- Gelman,M.S., Kannegaard,E.S., and Kopito,R.R.** (2002) A principal role for the proteasome in endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded intracellular cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J.Biol.Chem.* **277**:11709-11714.
- Ghosh,S., Nunziato,D.A., and Pitt,G.S.** (2006) KCNQ1 assembly and function is blocked by long-QT syndrome mutations that disrupt interaction with calmodulin. *Circ.Res.* **98**:1048-1054.
- Gintant,G.A.** (1995) Regional differences in IK density in canine left ventricle: role of IK,s in electrical heterogeneity. *Am.J.Physiol* **268**:H604-H613.
- Goldberg,A.L.** (2005) Nobel committee tags ubiquitin for distinction. *Neuron* **45**:339-344.
- Goldstein,R.F., Niraj,A., Sanderson,T.P., Wilson,L.S., Rab,A., Kim,H., Bebok,Z., and Collawn,J.F.** (2007) 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.
- Gong,Q., Anderson,C.L., January,C.T., and Zhou,Z.** (2004) 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* **287**:H652-H658.
- Gong,Q., Jones,M.A., and Zhou,Z.** (2006) Mechanisms of pharmacological rescue of trafficking-defective hERG mutant channels in human long QT syndrome. *J.Biol.Chem.* **281**:4069-4074.
- Gong,Q., Keeney,D.R., Molinari,M., and Zhou,Z.** (2005) Degradation of trafficking-defective long QT syndrome type II mutant channels by the ubiquitin-proteasome pathway. *J.Biol.Chem.* **280**:19419-19425.
- Goulet,C.C., Volk,K.A., Adams,C.M., Prince,L.S., Stokes,J.B., and Snyder,P.M.** (1998) Inhibition of the epithelial Na⁺ channel by interaction of Nedd4 with a PY motif deleted in Liddle's syndrome. *J.Biol.Chem.* **273**:30012-30017.
- Grahammer,F., Herling,A.W., Lang,H.J., Schmitt-Graff,A., Wittekindt,O.H., Nitschke,R., Bleich,M., Barhanin,J., and Warth,R.** (2001) The cardiac K⁺ channel KCNQ1 is essential for gastric acid secretion. *Gastroenterology* **120**:1363-1371.
- Groh,W.J., Silka,M.J., Oliver,R.P., Halperin,B.D., McAnulty,J.H., and Kron,J.** (1996) Use of implantable cardioverter-defibrillators in the congenital long QT syndrome. *Am.J.Cardiol.* **78**:703-706.

Grunnet,M., Olesen,S.P., Klaerke,D.A., and Jespersen,T. (2005) hKCNE4 inhibits the hKCNQ1 potassium current without affecting the activation kinetics. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **328**:1146-1153.

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

Hattori,N. and Mizuno,Y. (2004) Pathogenetic mechanisms of parkin in Parkinson's disease. *Lancet* **364**:722-724.

Hegde,R.S. and Lingappa,V.R. (1997) Membrane protein biogenesis: regulated complexity at the endoplasmic reticulum. *Cell* **91**:575-582.

Helenius,A. and Aebi,M. (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **291**:2364-2369.

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

Hinzpeter,A., Lipecka,J., Brouillard,F., Baudoin-Legros,M., Dadlez,M., Edelman,A., and Fritsch,J. (2006) Association between Hsp90 and the ClC-2 chloride channel upregulates channel function. *Am.J.Physiol Cell Physiol* **290**:C45-C56.

Hofherr,A., Fakler,B., and Klocker,N. (2005) Selective Golgi export of Kir2.1 controls the stoichiometry of functional Kir2.x channel heteromers. *J.Cell Sci.* **118**:1935-1943.

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

Huang,C.L., Feng,S., and Hilgemann,D.W. (1998) Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP2 and its stabilization by Gbetagamma. *Nature* **391**:803-806.

Huang,L., Bitner-Glindzicz,M., Tranebjaerg,L., and Tinker,A. (2001) A spectrum of functional effects for disease causing mutations in the Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Cardiovasc.Res.* **51**:670-680.

Huppa,J.B. and Ploegh,H.L. (1998) The eS-Sence of -SH in the ER. *Cell* **92**:145-148.

Imai,Y., Soda,M., Inoue,H., Hattori,N., Mizuno,Y., and Takahashi,R. (2001) An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell* **105**:891-902.

- Imperiali,B. and Rickert,K.W.** (1995) Conformational implications of asparagine-linked glycosylation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**:97-101.
- Jackson,M.R., Nilsson,T., and Peterson,P.A.** (1990) Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **9**:3153-3162.
- Jarosch,E., Taxis,C., Volkwein,C., Bordallo,J., Finley,D., Wolf,D.H., and Sommer,T.** (2002) Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48. *Nat.Cell Biol.* **4**:134-139.
- Jensen,T.J., Loo,M.A., Pind,S., Williams,D.B., Goldberg,A.L., and Riordan,J.R.** (1995) Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing. *Cell* **83**:129-135.
- Jentsch,T.J., Schroeder,B.C., Kubisch,C., Friedrich,T., and Stein,V.** (2000) Pathophysiology of KCNQ channels: neonatal epilepsy and progressive deafness. *Epilepsia* **41**:1068-1069.
- Jervell,A. and LANGE-NIELSEN,F.** (1957) Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval and sudden death. *Am.Heart J.* **54**:59-68.
- Jespersen,T., Grunnet,M., and Olesen,S.P.** (2005) The KCNQ1 potassium channel: from gene to physiological function. *Physiology.(Bethesda.)* **20**:408-416.
- Jespersen,T., Membrez,M., Nicolas,C.S., Pitard,B., Staub,O., Olesen,S.P., Baro,I., and Abriel,H.** (2007) The KCNQ1 potassium channel is down-regulated by ubiquitylating enzymes of the Nedd4/Nedd4-like family. *Cardiovasc.Res.* **74**:64-74.
- Jiang,C., Atkinson,D., Towbin,J.A., Splawski,I., Lehmann,M.H., Li,H., Timothy,K., Taggart,R.T., Schwartz,P.J., Vincent,G.M., and .** (1994) Two long QT syndrome loci map to chromosomes 3 and 7 with evidence for further heterogeneity. *Nat.Genet.* **8**:141-147.
- Jones,H.M., Hamilton,K.L., Papworth,G.D., Syme,C.A., Watkins,S.C., Bradbury,N.A., and Devor,D.C.** (2004) Role of the NH2 terminus in the assembly and trafficking of the intermediate conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel hK1. *J.Biol.Chem.* **279**:15531-15540.
- Jongbloed,R., Marcelis,C., Velter,C., Doevendans,P., Geraedts,J., and Smeets,H.** (2002) DHPLC analysis of potassium ion channel genes in congenital long QT syndrome. *Hum.Mutat.* **20**:382-391.
- Kagan,A., Melman,Y.F., Krumerman,A., and McDonald,T.V.** (2002) 14-3-3 amplifies and prolongs adrenergic stimulation of HERG K⁺ channel activity. *EMBO J.* **21**:1889-1898.

- Kagan,A., Yu,Z., Fishman,G.I., and McDonald,T.V.** (2000) The dominant negative LQT2 mutation A561V reduces wild-type HERG expression. *J.Biol.Chem.* **275**:11241-11248.
- Kanki,H., Kupershmidt,S., Yang,T., Wells,S., and Roden,D.M.** (2004) A structural requirement for processing the cardiac K⁺ channel KCNQ1. *J.Biol.Chem.* **279**:33976-33983.
- Keating,M., Dunn,C., Atkinson,D., Timothy,K., Vincent,G.M., and Leppert,M.** (1991) Consistent linkage of the long-QT syndrome to the Harvey ras-1 locus on chromosome 11. *Am.J.Hum.Genet.* **49**:1335-1339.
- Kerst,G., Beschorner,U., Unsold,B., von Hahn,T., Schreiber,R., Greger,R., Gerlach,U., Lang,H.J., Kunzelmann,K., and Bleich,M.** (2001) Properties and function of KCNQ1 K⁺ channels isolated from the rectal gland of *Squalus acanthias*. *Pflugers Arch.* **443**:146-154.
- Kleizen,B., van Vlijmen,T., de Jonge,H.R., and Braakman,I.** (2005) Folding of CFTR is predominantly cotranslational. *Mol.Cell* **20**:277-287.
- Knop,M., Finger,A., Braun,T., Hellmuth,K., and Wolf,D.H.** (1996) Der1, a novel protein specifically required for endoplasmic reticulum degradation in yeast. *EMBO J.* **15**:753-763.
- Koegl,M., Hoppe,T., Schlenker,S., Ulrich,H.D., Mayer,T.U., and Jentsch,S.** (1999) A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* **96**:635-644.
- Kottgen,M., Hoefler,A., Kim,S.J., Beschorner,U., Schreiber,R., Hug,M.J., and Greger,R.** (1999) Carbachol activates a K⁺ channel of very small conductance in the basolateral membrane of rat pancreatic acinar cells. *Pflugers Arch.* **438**:597-603.
- Krieger,A., Radhakrishnan,K., Pereverzev,A., Siapich,S.A., Banat,M., Kamp,M.A., Leroy,J., Klockner,U., Hescheler,J., Weiergraber,M., and Schneider,T.** (2006) The molecular chaperone hsp70 interacts with the cytosolic II-III loop of the Cav2.3 E-type voltage-gated Ca²⁺ channel. *Cell Physiol Biochem.* **17**:97-110.
- Krumerman,A., Gao,X., Bian,J.S., Melman,Y.F., Kagan,A., and McDonald,T.V.** (2004) An LQT mutant minK alters KvLQT1 trafficking. *Am.J.Physiol Cell Physiol* **286**:C1453-C1463.
- Kupershmidt,S., Yang,T., Chanthaphaychith,S., Wang,Z., Towbin,J.A., and Roden,D.M.** (2002) Defective human Ether-a-go-go-related gene trafficking linked to an endoplasmic reticulum retention signal in the C terminus. *J.Biol.Chem.* **277**:27442-27448.

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

Le Maout,S., Brejon,M., Olsen,O., Merot,J., and Welling,P.A. (1997) Basolateral membrane targeting of a renal-epithelial inwardly rectifying potassium channel from the cortical collecting duct, CCD-IRK3, in MDCK cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**:13329-13334.

Lee,M.P., Hu,R.J., Johnson,L.A., and Feinberg,A.P. (1997) Human KVLQT1 gene shows tissue-specific imprinting and encompasses Beckwith-Wiedemann syndrome chromosomal rearrangements. *Nat.Genet.* **15**:181-185.

Lee,M.P., Ravenel,J.D., Hu,R.J., Lustig,L.R., Tomaselli,G., Berger,R.D., Brandenburg,S.A., Litzi,T.J., Bunton,T.E., Limb,C., Francis,H., Gorelikow,M., Gu,H., Washington,K., Argani,P., Goldenring,J.R., Coffey,R.J., and Feinberg,A.P. (2000) Targeted disruption of the Kvlqt1 gene causes deafness and gastric hyperplasia in mice. *J.Clin.Invest* **106**:1447-1455.

Leroy,E., Boyer,R., Auburger,G., Leube,B., Ulm,G., Mezey,E., Harta,G., Brownstein,M.J., Jonnalagada,S., Chernova,T., Dehejia,A., Lavedan,C., Gasser,T., Steinbach,P.J., Wilkinson,K.D., and Polymeropoulos,M.H. (1998) The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* **395**:451-452.

Lesage,F., Attali,B., Lakey,J., Honore,E., Romey,G., Faurobert,E., Lazdunski,M., and Barhanin,J. (1993) Are Xenopus oocytes unique in displaying functional IsK channel heterologous expression? *Receptors.Channels* **1**:143-152.

Li,M., Jan,Y.N., and Jan,L.Y. (1992) Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel. *Science* **257**:1225-1230.

Li,W., Chanda,S.K., Micik,I., and Joazeiro,C.A. (2005) Methods for the functional genomic analysis of ubiquitin ligases. *Methods Enzymol.* **398**:280-291.

Liao,T., Wang,L., Halm,S.T., Lu,L., Fyffe,R.E., and Halm,D.R. (2005) K⁺ channel KVLQT1 located in the basolateral membrane of distal colonic epithelium is not essential for activating Cl⁻ secretion. *Am.J.Physiol Cell Physiol* **289**:C564-C575.

Lilley,B.N. and Ploegh,H.L. (2004) A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature* **429**:834-840.

Liu,D.W. and Antzelevitch,C. (1995) Characteristics of the delayed rectifier current (IKr and IKs) in canine ventricular epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes. A weaker IKs contributes to the longer action potential of the M cell. *Circ.Res.* **76**:351-365.

- Loo, M.A., Jensen, T.J., Cui, L., Hou, Y., Chang, X.B., and Riordan, J.R.** (1998) Perturbation of Hsp90 interaction with nascent CFTR prevents its maturation and accelerates its degradation by the proteasome. *EMBO J.* **17**:6879-6887.
- Loussouarn, G., Park, K.H., Bellocq, C., Baro, I., Charpentier, F., and 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.
- Lu, J., Robinson, J.M., Edwards, D., and Deutsch, C.** (2001) T1-T1 interactions occur in ER membranes while nascent Kv peptides are still attached to ribosomes. *Biochemistry* **40**:10934-10946.
- Lu, Y., Turnbull, I.R., Bragin, A., Carveth, K., Verkman, A.S., and Skach, W.R.** (2000) Reorientation of aquaporin-1 topology during maturation in the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* **11**:2973-2985.
- Lukacs, G.L., Segal, G., Kartner, N., Grinstein, S., and Zhang, F.** (1997) Constitutive internalization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator occurs via clathrin-dependent endocytosis and is regulated by protein phosphorylation. *Biochem. J.* **328** (Pt 2):353-361.
- Ma, D., Zerangue, N., Lin, Y.F., Collins, A., Yu, M., Jan, Y.N., and Jan, L.Y.** (2001) Role of ER export signals in controlling surface potassium channel numbers. *Science* **291**:316-319.
- Ma, D., Zerangue, N., Raab-Graham, K., Fried, S.R., Jan, Y.N., and Jan, L.Y.** (2002) Diverse trafficking patterns due to multiple traffic motifs in G protein-activated inwardly rectifying potassium channels from brain and heart. *Neuron* **33**:715-729.
- Madrid, R., Le Maout, S., Barrault, M.B., Janvier, K., Benichou, S., and Merot, J.** (2001) Polarized trafficking and surface expression of the AQP4 water channel are coordinated by serial and regulated interactions with different clathrin-adaptor complexes. *EMBO J.* **20**:7008-7021.
- Maljevic, S., Lerche, C., Seebohm, G., Alekov, A.K., Busch, A.E., and Lerche, H.** (2003) C-terminal interaction of KCNQ2 and KCNQ3 K⁺ channels. *J. Physiol* **548**:353-360.
- Mall, M., Wissner, A., Schreiber, R., Kuehr, J., Seydewitz, H.H., Brandis, M., Greger, R., and Kunzelmann, K.** (2000) Role of K(V)LQT1 in cyclic adenosine monophosphate-mediated Cl⁻ secretion in human airway epithelia. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **23**:283-289.
- Manganas, L.N., Akhtar, S., Antonucci, D.E., Campomanes, C.R., Dolly, J.O., and Trimmer, J.S.** (2001) Episodic ataxia type-1 mutations in the Kv1.1 potassium channel display distinct folding and intracellular trafficking properties. *J. Biol. Chem.* **276**:49427-49434.

Marcus,D.C. and Shen,Z. (1994) Slowly activating voltage-dependent K⁺ conductance is apical pathway for K⁺ secretion in vestibular dark cells. *Am.J.Physiol* **267**:C857-C864.

Marcus,D.C., Takeuchi,S., and Wangemann,P. (1992) Ca(2+)-activated nonselective cation channel in apical membrane of vestibular dark cells. *Am.J.Physiol* **262**:C1423-C1429.

Margeta-Mitrovic,M., Jan,Y.N., and Jan,L.Y. (2000) A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron* **27**:97-106.

Marx,S.O., Kurokawa,J., Reiken,S., Motoike,H., D'Armiento,J., Marks,A.R., and Kass,R.S. (2002) Requirement of a macromolecular signaling complex for beta adrenergic receptor modulation of the KCNQ1-KCNE1 potassium channel. *Science* **295**:496-499.

McClellan,A.J. and Frydman,J. (2001) Molecular chaperones and the art of recognizing a lost cause. *Nat.Cell Biol.* **3**:E51-E53.

McClellan,A.J., Tam,S., Kaganovich,D., and Frydman,J. (2005) Protein quality control: chaperones culling corrupt conformations. *Nat.Cell Biol.* **7**:736-741.

Meacham,G.C., Patterson,C., Zhang,W., Younger,J.M., and Cyr,D.M. (2001) The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat.Cell Biol.* **3**:100-105.

Melman,Y.F., Krumerman,A., and McDonald,T.V. (2002) A single transmembrane site in the KCNE-encoded proteins controls the specificity of KvLQT1 channel gating. *J.Biol.Chem.* **277**:25187-25194.

Melman,Y.F., Um,S.Y., Krumerman,A., Kagan,A., and McDonald,T.V. (2004) KCNE1 binds to the KCNQ1 pore to regulate potassium channel activity. *Neuron* **42**:927-937.

Meyer,H.H., Shorter,J.G., Seemann,J., Pappin,D., and Warren,G. (2000) A complex of mammalian ufd1 and npl4 links the AAA-ATPase, p97, to ubiquitin and nuclear transport pathways. *EMBO J.* **19**:2181-2192.

Michelsen,K., Yuan,H., and Schwappach,B. (2005) Hide and run. Arginine-based endoplasmic-reticulum-sorting motifs in the assembly of heteromultimeric membrane proteins. *EMBO Rep.* **6**:717-722.

Mohler,P.J., Schott,J.J., Gramolini,A.O., Dilly,K.W., Guatimosim,S., duBell,W.H., Song,L.S., Haurogne,K., Kyndt,F., Ali,M.E., Rogers,T.B., Lederer,W.J., Escande,D., Le Marec,H., and Bennett,V. (2003) Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature* **421**:634-639.

- Mori, K.** (2000) Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* **101**:451-454.
- Morimoto, R.I.** (1998) Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev.* **12**:3788-3796.
- Moss, A.J. and Kass, R.S.** (2005) Long QT syndrome: from channels to cardiac arrhythmias. *J.Clin.Invest* **115**:2018-2024.
- Moss, A.J., Zareba, W., Benhorin, J., Locati, E.H., Hall, W.J., Robinson, J.L., Schwartz, P.J., Towbin, J.A., Vincent, G.M., and Lehmann, M.H.** (1995) ECG T-wave patterns in genetically distinct forms of the hereditary long QT syndrome. *Circulation* **92**:2929-2934.
- Moss, A.J., Zareba, W., Hall, W.J., Schwartz, P.J., Crampton, R.S., Benhorin, J., Vincent, G.M., Locati, E.H., Priori, S.G., Napolitano, C., Medina, A., Zhang, L., Robinson, J.L., Timothy, K., Towbin, J.A., and Andrews, M.L.** (2000) Effectiveness and limitations of beta-blocker therapy in congenital long-QT syndrome. *Circulation* **101**:616-623.
- Mothes, W., Heinrich, S.U., Graf, R., Nilsson, I., von Heijne, G., Brunner, J., and Rapoport, T.A.** (1997) Molecular mechanism of membrane protein integration into the endoplasmic reticulum. *Cell* **89**:523-533.
- Munro, S. and Pelham, H.R.** (1987) A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* **48**:899-907.
- Neyroud, N., Richard, P., Vignier, N., Donger, C., Denjoy, I., Demay, L., Shkolnikova, M., Pesce, R., Chevalier, P., Hainque, B., Coumel, P., Schwartz, K., and Guicheney, P.** (1999) Genomic organization of the KCNQ1 K⁺ channel gene and identification of C-terminal mutations in the long-QT syndrome. *Circ.Res.* **84**:290-297.
- Neyroud, N., Tesson, F., Denjoy, I., Leibovici, M., Donger, C., Barhanin, J., Faure, S., Gary, F., Coumel, P., Petit, C., Schwartz, K., and Guicheney, P.** (1997) A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nat.Genet.* **15**:186-189.
- Nicolas, M., Dememes, D., Martin, A., Kupersmidt, S., and Barhanin, J.** (2001) KCNQ1/KCNE1 potassium channels in mammalian vestibular dark cells. *Hear.Res.* **153**:132-145.
- Nishimura, N. and Balch, W.E.** (1997) A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum. *Science* **277**:556-558.

Nishimura,N., Bannykh,S., Slabough,S., Matteson,J., Altschuler,Y., Hahn,K., and Balch,W.E. (1999) A di-acidic (DXE) code directs concentration of cargo during export from the endoplasmic reticulum. *J.Biol.Chem.* **274**:15937-15946.

Ou,W.J., Cameron,P.H., Thomas,D.Y., and Bergeron,J.J. (1993) Association of folding intermediates of glycoproteins with calnexin during protein maturation. *Nature* **364**:771-776.

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

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

Patel,S. and Latterich,M. (1998) The AAA team: related ATPases with diverse functions. *Trends Cell Biol.* **8**:65-71.

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

Pitt,G.S. (2007) Calmodulin and CaMKII as molecular switches for cardiac ion channels. *Cardiovasc.Res.* **73**:641-647.

Plemper,R.K., Bohmler,S., Bordallo,J., Sommer,T., and Wolf,D.H. (1997) Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature* **388**:891-895.

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

Preston,G.M., Jung,J.S., Guggino,W.B., and Agre,P. (1994) Membrane topology of aquaporin CHIP. Analysis of functional epitope-scanning mutants by vectorial proteolysis. *J.Biol.Chem.* **269**:1668-1673.

Prince,L.S., Peter,K., Hatton,S.R., Zaliauskiene,L., Cotlin,L.F., Clancy,J.P., Marchase,R.B., and Collawn,J.F. (1999) Efficient endocytosis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator requires a tyrosine-based signal. *J.Biol.Chem.* **274**:3602-3609.

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

- Pusch,M.** (1998) Increase of the single-channel conductance of KvLQT1 potassium channels induced by the association with mink. *Pflugers Arch.* **437**:172-174.
- Rabinovich,E., Kerem,A., Frohlich,K.U., Diamant,N., and Bar-Nun,S.** (2002) AAA-ATPase p97/Cdc48p, a cytosolic chaperone required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Mol.Cell Biol.* **22**:626-634.
- Rajakulendran,S., Schorge,S., Kullmann,D.M., and Hanna,M.G.** (2007) Episodic ataxia type 1: a neuronal potassium channelopathy. *Neurotherapeutics.* **4**:258-266.
- Rajamani,S., Anderson,C.L., Anson,B.D., and January,C.T.** (2002) Pharmacological rescue of human K(+) channel long-QT2 mutations: human ether-a-go-go-related gene rescue without block. *Circulation* **105**:2830-2835.
- Rape,M., Hoppe,T., Gorr,I., Kalocay,M., Richly,H., and Jentsch,S.** (2001) Mobilization of processed, membrane-tethered SPT23 transcription factor by CDC48(UFD1/NPL4), a ubiquitin-selective chaperone. *Cell* **107**:667-677.
- Rhoads,A.R. and Friedberg,F.** (1997) Sequence motifs for calmodulin recognition. *FASEB J.* **11**:331-340.
- Riordan,J.R., Rommens,J.M., Kerem,B., Alon,N., Rozmahel,R., Grzelczak,Z., Zielenski,J., Lok,S., Plavsic,N., Chou,J.L., and .** (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**:1066-1073.
- Rock,K.L., Gramm,C., Rothstein,L., Clark,K., Stein,R., Dick,L., Hwang,D., and Goldberg,A.L.** (1994) Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* **78**:761-771.
- Romano,C.** (1965) Congenital cardiac arrhythmia. *Lancet* **17**:658-659.
- Rotin,D., Kanelis,V., and Schild,L.** (2001) Trafficking and cell surface stability of ENaC. *Am.J.Physiol Renal Physiol* **281**:F391-F399.
- Rougier,J.S., van Bemmelen,M.X., Bruce,M.C., Jespersen,T., Gavillet,B., Apotheloz,F., Cordonier,S., Staub,O., Rotin,D., and Abriel,H.** (2005) Molecular determinants of voltage-gated sodium channel regulation by the Nedd4/Nedd4-like proteins. *Am.J.Physiol Cell Physiol* **288**:C692-C701.
- Sanguinetti,M.C., Curran,M.E., Zou,A., Shen,J., Spector,P.S., Atkinson,D.L., and Keating,M.T.** (1996) Coassembly of K(V)LQT1 and mink (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature* **384**:80-83.

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

Sato,Y., Sakaguchi,M., Goshima,S., Nakamura,T., and Uozumi,N. (2002) 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* **99**:60-65.

Schild,L., Canessa,C.M., Shimkets,R.A., Gautschi,I., Lifton,R.P., and Rossier,B.C. (1995) A mutation in the epithelial sodium channel causing Liddle disease increases channel activity in the *Xenopus laevis* oocyte expression system. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**:5699-5703.

Schild,L., Lu,Y., Gautschi,I., Schneeberger,E., Lifton,R.P., and Rossier,B.C. (1996) Identification of a PY motif in the epithelial Na channel subunits as a target sequence for mutations causing channel activation found in Liddle syndrome. *EMBO J.* **15**:2381-2387.

Schmieder,S., Bogliolo,S., and Ehrenfeld,J. (2007) N-glycosylation of the *Xenopus laevis* ClC-5 protein plays a role in cell surface expression, affecting transport activity at the plasma membrane. *J.Cell Physiol* **210**:479-488.

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

Schott,J.J., Charpentier,F., Peltier,S., Foley,P., Drouin,E., Bouhour,J.B., Donnelly,P., Vergnaud,G., Bachner,L., Moisan,J.P., and . (1995) Mapping of a gene for long QT syndrome to chromosome 4q25-27. *Am.J.Hum.Genet.* **57**:1114-1122.

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

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

Schwake,M., Pusch,M., Kharkovets,T., and Jentsch,T.J. (2000) Surface expression and single channel properties of KCNQ2/KCNQ3, M-type K⁺ channels involved in epilepsy. *J.Biol.Chem.* **275**:13343-13348.

Schwartz,P.J., Priori,S.G., Bloise,R., Napolitano,C., Ronchetti,E., Piccinini,A., Goj,C., Breithardt,G., Schulze-Bahr,E., Wedekind,H., and Nastoli,J. (2001a)

Molecular diagnosis in a child with sudden infant death syndrome. *Lancet* **358**:1342-1343.

Schwartz,P.J., Priori,S.G., Cerrone,M., Spazzolini,C., Odero,A., Napolitano,C., Bloise,R., De Ferrari,G.M., Klersy,C., Moss,A.J., Zareba,W., Robinson,J.L., Hall,W.J., Brink,P.A., Toivonen,L., Epstein,A.E., Li,C., and Hu,D. (2004) Left cardiac sympathetic denervation in the management of high-risk patients affected by the long-QT syndrome. *Circulation* **109**:1826-1833.

Schwartz,P.J., Priori,S.G., Locati,E.H., Napolitano,C., Cantu,F., Towbin,J.A., Keating,M.T., Hammoude,H., Brown,A.M., and Chen,L.S. (1995) Long QT syndrome patients with mutations of the SCN5A and HERG genes have differential responses to Na⁺ channel blockade and to increases in heart rate. Implications for gene-specific therapy. *Circulation* **92**:3381-3386.

Schwartz,P.J., Priori,S.G., Spazzolini,C., Moss,A.J., Vincent,G.M., Napolitano,C., Denjoy,I., Guicheney,P., Breithardt,G., Keating,M.T., Towbin,J.A., Beggs,A.H., Brink,P., Wilde,A.A., Toivonen,L., Zareba,W., Robinson,J.L., Timothy,K.W., Corfield,V., Wattanasirichaigoon,D., Corbett,C., Haverkamp,W., Schulze-Bahr,E., Lehmann,M.H., Schwartz,K., Coumel,P., and Bloise,R. (2001b) Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation* **103**:89-95.

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

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

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

Shen,Z. and Marcus,D.C. (1998) Divalent cations inhibit I_{sK}/K_vLQT1 channels in excised membrane patches of strial marginal cells. *Hear.Res.* **123**:157-167.

Shi,G., Nakahira,K., Hammond,S., Rhodes,K.J., Schechter,L.E., and Trimmer,J.S. (1996) Beta subunits promote K⁺ channel surface expression through effects early in biosynthesis. *Neuron* **16**:843-852.

Shimura,H., Schlossmacher,M.G., Hattori,N., Frosch,M.P., Trockenbacher,A., Schneider,R., Mizuno,Y., Kosik,K.S., and Selkoe,D.J. (2001) Ubiquitination of a

new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. *Science* **293**:263-269.

Shin,J., Dunbrack,R.L., Jr., Lee,S., and Strominger,J.L. (1991) Signals for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum studied with CD4 truncation mutants. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**:1918-1922.

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

Simon,D.B., Bindra,R.S., Mansfield,T.A., Nelson-Williams,C., Mendonca,E., Stone,R., Schurman,S., Nayir,A., Alpay,H., Bakkaloglu,A., Rodriguez-Soriano,J., Morales,J.M., Sanjad,S.A., Taylor,C.M., Pilz,D., Brem,A., Trachtman,H., Griswold,W., Richard,G.A., John,E., and Lifton,R.P. (1997) Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III. *Nat.Genet.* **17**:171-178.

Simon,S.M. and Blobel,G. (1991) A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Cell* **65**:371-380.

Sitia,R. and Braakman,I. (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature* **426**:891-894.

Snyder,P.M., Price,M.P., McDonald,F.J., Adams,C.M., Volk,K.A., Zeiher,B.G., Stokes,J.B., and Welsh,M.J. (1995) Mechanism by which Liddle's syndrome mutations increase activity of a human epithelial Na⁺ channel. *Cell* **83**:969-978.

Soldovieri,M.V., Castaldo,P., Iodice,L., Miceli,F., Barrese,V., Bellini,G., Miraglia,d.G., Pascotto,A., Bonatti,S., Annunziato,L., and Taglialatela,M. (2006) 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.* **281**:418-428.

Spiro,R.G., Zhu,Q., Bhojroo,V., and Soling,H.D. (1996) Definition of the lectin-like properties of the molecular chaperone, calreticulin, and demonstration of its copurification with endomannosidase from rat liver Golgi. *J.Biol.Chem.* **271**:11588-11594.

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

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

- Sterling,H., Lin,D.H., Gu,R.M., Dong,K., Hebert,S.C., and Wang,W.H.** (2002) Inhibition of protein-tyrosine phosphatase stimulates the dynamin-dependent endocytosis of ROMK1. *J.Biol.Chem.* **277**:4317-4323.
- Sun,F., Zhang,R., Gong,X., Geng,X., Drain,P.F., and Frizzell,R.A.** (2006) Derlin-1 promotes the efficient degradation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and CFTR folding mutants. *J.Biol.Chem.* **281**:36856-36863.
- Takeuchi,S., Marcus,D.C., and Wangemann,P.** (1992a) Ca(2+)-activated nonselective cation, maxi K⁺ and Cl⁻ channels in apical membrane of marginal cells of stria vascularis. *Hear.Res.* **61**:86-96.
- Takeuchi,S., Marcus,D.C., and Wangemann,P.** (1992b) Maxi K⁺ channel in apical membrane of vestibular dark cells. *Am.J.Physiol* **262**:C1430-C1436.
- Takumi,T., Moriyoshi,K., Aramori,I., Ishii,T., Oiki,S., Okada,Y., Ohkubo,H., and Nakanishi,S.** (1991) Alteration of channel activities and gating by mutations of slow ISK potassium channel. *J.Biol.Chem.* **266**:22192-22198.
- Takumi,T., Ohkubo,H., and Nakanishi,S.** (1988) Cloning of a membrane protein that induces a slow voltage-gated potassium current. *Science* **242**:1042-1045.
- Tanaka,K., Suzuki,T., Hattori,N., and Mizuno,Y.** (2004) Ubiquitin, proteasome and parkin. *Biochim.Biophys.Acta* **1695**:235-247.
- Terrenoire,C., Clancy,C.E., Cormier,J.W., Sampson,K.J., and Kass,R.S.** (2005) Autonomic control of cardiac action potentials: role of potassium channel kinetics in response to sympathetic stimulation. *Circ.Res.* **96**:e25-e34.
- Thomas,D., Wimmer,A.B., Karle,C.A., Licka,M., Alter,M., Khalil,M., Ulmer,H.E., Kathofer,S., Kiehn,J., Katus,H.A., Schoels,W., Koenen,M., and Zehelein,J.** (2005) Dominant-negative I(Ks) suppression by KCNQ1-deltaF339 potassium channels linked to Romano-Ward syndrome. *Cardiovasc.Res.* **67**:487-497.
- Thrower,J.S., Hoffman,L., Rechsteiner,M., and Pickart,C.M.** (2000) Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* **19**:94-102.
- Tinel,N., Diochot,S., Borsotto,M., Lazdunski,M., and Barhanin,J.** (2000) KCNE2 confers background current characteristics to the cardiac KCNQ1 potassium channel. *EMBO J.* **19**:6326-6330.
- Tristani-Firouzi,M. and Sanguinetti,M.C.** (1998) Voltage-dependent inactivation of the human K⁺ channel KvLQT1 is eliminated by association with minimal K⁺ channel (mink) subunits. *J.Physiol* **510 (Pt 1)**:37-45.

- Trudeau,M.C., Warmke,J.W., Ganetzky,B., and Robertson,G.A.** (1995) HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family. *Science* **269**:92-95.
- Tsai,B., Ye,Y., and Rapoport,T.A.** (2002) Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **3**:246-255.
- Tu,L., Wang,J., Helm,A., Skach,W.R., and Deutsch,C.** (2000) Transmembrane biogenesis of Kv1.3. *Biochemistry* **39**:824-836.
- Tzounopoulos,T., Guy,H.R., Durell,S., Adelman,J.P., and Maylie,J.** (1995) min K channels form by assembly of at least 14 subunits. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**:9593-9597.
- Vallon,V., Grahammer,F., Richter,K., Bleich,M., Lang,F., Barhanin,J., Volkl,H., and Warth,R.** (2001) Role of KCNE1-dependent K⁺ fluxes in mouse proximal tubule. *J.Am.Soc.Nephrol.* **12**:2003-2011.
- van Bemmelen,M.X., Rougier,J.S., Gavillet,B., Apotheloz,F., Daidie,D., Tateyama,M., Rivolta,I., Thomas,M.A., Kass,R.S., Staub,O., and Abriel,H.** (2004) Cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5 is regulated by Nedd4-2 mediated ubiquitination. *Circ.Res.* **95**:284-291.
- Varga,K., Jurkuvenaite,A., Wakefield,J., Hong,J.S., Guimbellot,J.S., Venglarik,C.J., Niraj,A., Mazur,M., Sorscher,E.J., Collawn,J.F., and Bebok,Z.** (2004) Efficient intracellular processing of the endogenous cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in epithelial cell lines. *J.Biol.Chem.* **279**:22578-22584.
- Vetter,D.E., Mann,J.R., Wangemann,P., Liu,J., McLaughlin,K.J., Lesage,F., Marcus,D.C., Lazdunski,M., Heinemann,S.F., and Barhanin,J.** (1996) Inner ear defects induced by null mutation of the *isk* gene. *Neuron* **17**:1251-1264.
- Viskin,S.** (2000) Cardiac pacing in the long QT syndrome: review of available data and practical recommendations. *J.Cardiovasc.Electrophysiol.* **11**:593-600.
- Wahlman,J., DeMartino,G.N., Skach,W.R., Bulleid,N.J., Brodsky,J.L., and Johnson,A.E.** (2007) Real-time fluorescence detection of ERAD substrate retrotranslocation in a mammalian in vitro system. *Cell* **129**:943-955.
- Walter,P. and Blobel,G.** (1981) Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. *J.Cell Biol.* **91**:557-561.
- Walter,P. and Blobel,G.** (1982) Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Nature* **299**:691-698.

Wang, J. and Maldonado, M.A. (2006) The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases. *Cell Mol. Immunol.* **3**:255-261.

Wang, K.W. and Goldstein, S.A. (1995) Subunit composition of minK potassium channels. *Neuron* **14**:1303-1309.

Wang, Q., Curran, M.E., Splawski, I., Burn, T.C., Millholland, J.M., VanRaay, T.J., Shen, J., Timothy, K.W., Vincent, G.M., de Jager, T., Schwartz, P.J., Toubin, J.A., Moss, A.J., Atkinson, D.L., Landes, G.M., Connors, T.D., and Keating, M.T. (1996) Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat. Genet.* **12**:17-23.

Wang, Q., Shen, J., Splawski, I., Atkinson, D., Li, Z., Robinson, J.L., Moss, A.J., Towbin, J.A., and Keating, M.T. (1995) SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* **80**:805-811.

Wang, W., Xia, J., and Kass, R.S. (1998a) MinK-KvLQT1 fusion proteins, evidence for multiple stoichiometries of the assembled IsK channel. *J. Biol. Chem.* **273**:34069-34074.

Wang, W., Xia, J., and Kass, R.S. (1998b) MinK-KvLQT1 fusion proteins, evidence for multiple stoichiometries of the assembled IsK channel. *J. Biol. Chem.* **273**:34069-34074.

Wang, X., Matteson, J., An, Y., Moyer, B., Yoo, J.S., Bannykh, S., Wilson, I.A., Riordan, J.R., and Balch, W.E. (2004) COPII-dependent export of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from the ER uses a di-acidic exit code. *J. Cell Biol.* **167**:65-74.

Ward, C.L. and Kopito, R.R. (1994) Intracellular turnover of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Inefficient processing and rapid degradation of wild-type and mutant proteins. *J. Biol. Chem.* **269**:25710-25718.

Ward, C.L., Omura, S., and Kopito, R.R. (1995) Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* **83**:121-127.

Ward, O.C. (1964) A new familial cardiac syndrome in children. *J. Ir. Med. Assoc.* **54**:103-106.

Ware, F.E., Vassilakos, A., Peterson, P.A., Jackson, M.R., Lehrman, M.A., and Williams, D.B. (1995) The molecular chaperone calnexin binds Glc1Man9GlcNAc2 oligosaccharide as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins. *J. Biol. Chem.* **270**:4697-4704.

Warth, R. and Barhanin, J. (2002) The multifaceted phenotype of the knockout mouse for the KCNE1 potassium channel gene. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **282**:R639-R648.

Watanabe,I., Zhu,J., Sutachan,J.J., Gottschalk,A., Recio-Pinto,E., and Thornhill,W.B. (2007) The glycosylation state of Kv1.2 potassium channels affects trafficking, gating, and simulated action potentials. *Brain Res.* **1144**:1-18.

Wiertz,E.J., Tortorella,D., Bogyo,M., Yu,J., Mothes,W., Jones,T.R., Rapoport,T.A., and Ploegh,H.L. (1996) Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* **384**:432-438.

Wilde,A.A. and Bezzina,C.R. (2005) Genetics of cardiac arrhythmias. *Heart* **91**:1352-1358.

Wilkinson,B.M., Tyson,J.R., Reid,P.J., and Stirling,C.J. (2000) Distinct domains within yeast Sec61p involved in post-translational translocation and protein dislocation. *J.Biol.Chem.* **275**:521-529.

Wilson,A.J., Quinn,K.V., Graves,F.M., Bitner-Glindzicz,M., and Tinker,A. (2005) Abnormal KCNQ1 trafficking influences disease pathogenesis in hereditary long QT syndromes (LQT1). *Cardiovasc.Res.* **67**:476-486.

Wollnik,B., Schroeder,B.C., Kubisch,C., Esperer,H.D., Wieacker,P., and Jentsch,T.J. (1997) Pathophysiological mechanisms of dominant and recessive KVLQT1 K⁺ channel mutations found in inherited cardiac arrhythmias. *Hum.Mol.Genet.* **6**:1943-1949.

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

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

Yang,Y., Janich,S., Cohn,J.A., and Wilson,J.M. (1993) The common variant of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is recognized by hsp70 and degraded in a pre-Golgi nonlysosomal compartment. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**:9480-9484.

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

Ye,Y., Meyer,H.H., and Rapoport,T.A. (2001) The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. *Nature* **414**:652-656.

Ye,Y., Shibata,Y., Kikkert,M., van Voorden,S., Wiertz,E., and Rapoport,T.A. (2005) 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 **102**:14132-14138.

Ye,Y., Shibata,Y., Yun,C., Ron,D., and Rapoport,T.A. (2004) A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. Nature **429**:841-847.

Younger,J.M., Chen,L., Ren,H.Y., Rosser,M.F., Turnbull,E.L., Fan,C.Y., Patterson,C., and Cyr,D.M. (2006) Sequential quality-control checkpoints triage misfolded cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Cell **126**:571-582.

Younger,J.M., Ren,H.Y., Chen,L., Fan,C.Y., Fields,A., Patterson,C., and Cyr,D.M. (2004) A foldable CFTR{Delta}F508 biogenic intermediate accumulates upon inhibition of the Hsc70-CHIP E3 ubiquitin ligase. J.Cell Biol. **167**:1075-1085.

Yu,H. and Kopito,R.R. (1999) The role of multiubiquitination in dislocation and degradation of the alpha subunit of the T cell antigen receptor. J.Biol.Chem. **274**:36852-36858.

Yuan,H., Michelsen,K., and Schwappach,B. (2003) 14-3-3 dimers probe the assembly status of multimeric membrane proteins. Curr.Biol. **13**:638-646.

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

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

Zerangue,N., Malan,M.J., Fried,S.R., Dazin,P.F., Jan,Y.N., Jan,L.Y., and Schwappach,B. (2001) Analysis of endoplasmic reticulum trafficking signals by combinatorial screening in mammalian cells. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **98**:2431-2436.

Zerangue,N., Schwappach,B., Jan,Y.N., and Jan,L.Y. (1999) A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. Neuron **22**:537-548.

Trafic et maturation du canal potassique KCNQ1. Mécanismes impliqués dans le syndrome du QT long de type 1.

Les mutations dans l'extrémité N-terminale du canal potassique KCNQ1 sont fréquemment liées à des arythmies cardiaques graves pouvant induire la mort dès le jeune âge. Les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués restent, cependant, inconnus. Dans cette étude nous avons effectué une série de délétions dans l'extrémité N-terminale de KCNQ1 et étudié leurs effets sur son trafic vers la membrane plasmique. Nous avons identifié un motif essentiel pour l'expression membranaire de KCNQ1 proche du premier segment transmembranaire. De plus, nous avons montré que trois mutations impliquées dans le syndrome du QT long de type 1 (Y111C, L114P et P117L) localisées dans ou proche de cette zone induisent la rétention du canal dans le réticulum endoplasmique (RE) et ont un effet dominant négatif sur le canal sauvage. L'étude de la demi-vie de KCNQ1 a montré que le canal muté a une cinétique de dégradation accélérée par rapport au canal sauvage. Cette dégradation passe par le système ubiquitine-protéasome et semble être régulée par la Derlin-1, une protéine impliquée dans la rétro-translocation des protéines destinées à être dégradées.

Mots clés : KCNQ1, SQT1, trafic, réticulum endoplasmique, dégradation, ubiquitine-protéasome.

KCNQ1 trafficking and maturation. Mechanisms implicated in the long QT syndrome 1.

N-terminal mutations in the KCNQ1 channel are frequently linked to fatal arrhythmias in newborn children and adolescents but the cellular mechanisms involved in this dramatic issue remain, however, to be discovered. Here, we analyzed the trafficking of a series of N-terminal truncation mutants and identified a critical trafficking motif of KCNQ1. This determinant is located in the juxtamembranous region preceding the first transmembrane domain of the protein. Three mutations (Y111C, L114P and P117L) implicated in inherited long QT syndrome 1 syndrome, are embedded within this domain. We showed that the mutant proteins fail to exit the endoplasmic reticulum and have a dominant negative effect on the wild type channel. The half-life study showed that the KCNQ1 Y111C is rapidly degraded compare to the wild type channel. We showed that the degradation of both wt and mutant channels is mediated by the ubiquitin-proteasome pathway and seems to be regulated by Derlin-1, a protein implicated in the retro-translocation of misfolded ER proteins.

keywords : KCNQ1, LQTS, traffic, endoplasmic reticulum, degradation, ubiquitin-proteasome.