

UNIVERSITÉ DE NANTES

UFR DE MÉDECINE

ÉCOLE DOCTORALE • BIOLOGIE SANTÉ (ED 502)

Année 2014

N° attribué par la bibliothèque

									0	9
--	--	--	--	--	--	--	--	--	---	---

Régulation des canaux ioniques cardiaques dépendants du potentiel par le cholestérol et la phosphorylation

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie

Spécialité : Electrophysiologie cardiaque

Présentée

et soutenue publiquement par

Fabien COYAN

Le 31 octobre 2014, devant le jury ci-dessous

Président : M. LE MAREC Hervé, PU-PH, Université de Nantes

Rapporteurs : M. ABRIEL Hugues, PU, Université de Berne

M. LORY Philippe, DR, Université de Montpellier 1 et 2

Examineur : M. CHARNET Pierre, DR, Université de Montpellier 1 et 2

Directeurs de thèse: M. LOUSSOUARN Gildas, DR, Université de Nantes

Mme MARIONNEAU Céline, CR, Université de Nantes

Remerciements

Mes premiers remerciements s'adressent au Pr Hervé Le Marec qui me fait l'honneur de présider mon jury de thèse ainsi qu'au Pr Hugues Abriel et au Dr Philippe Lory pour avoir accepté d'être rapporteurs de ces travaux. Merci également au Dr Pierre Charnet d'avoir accepté de juger ce travail, ainsi qu'aux Drs Arnaud Monteil et Gilles Guihard pour leur disponibilité et leurs précieux conseils prodigués tout au long de ce travail.

Je remercie les Prs Pierre Pacaud et Hervé Le Marec, ancien et nouveau directeurs de l'Institut du Thorax de m'y avoir accueilli. Pierre, je vous remercie de m'avoir donné l'envie de faire une thèse et de m'avoir motivé au moment du concours pour l'obtention d'un financement.

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements à Gildas Loussouarn et Céline Marionneau pour m'avoir encadré tout au long de ma thèse. Gildas, merci pour ta disponibilité, pour m'avoir appris le patch clamp et pris le temps de partager tes connaissances. J'ai réellement apprécié participer à tes discussions sur la biophysique des canaux et je regrette de ne pouvoir approfondir plus ce domaine. Céline, merci pour ta bonne humeur permanente, ta franchise, ton dynamisme et pour la passion que tu as mise dans les projets auxquels j'ai eu la chance de participer. Je ne suis pas prêt d'oublier nos discussions/réflexions sur les propriétés biophysiques de l'inactivation des canaux Na_v ! A vous deux, merci pour la confiance que vous m'avez portée, et pour les congrès nationaux et surtout internationaux auxquels vous m'avez fait participer. Enfin ce fut un réel plaisir de partager des moments avec vous en dehors du labo comme les nombreux restaurants en France ou à l'étranger, en compagnie notamment d'un rongeur indo-néerlandais!

Je remercie toutes les personnes qui ont contribué et qui contribuent à la bonne ambiance générale de ce labo. Je garde de très bons souvenirs des 48h, des séances de tournages des films de ces 48h et des différentes soirées organisées hors labo.

Je remercie tous les membres de l'équipe 1 « Cardiopathies et mort subite », notamment Flavien Charpentier, Isabelle Baró et Jean Mérot pour votre disponibilité et vos précieuses remarques et conseils.

Merci aux «  » : Benjamin pour ses conseils, ses remarques pertinentes et ses nombreuses blagues ; Valentine pour sa délicatesse et sa grande classe, la George Abitbol féminine ; Virginie pour son rire et ses imitations d'animaux ; Amandine pour sa gentillesse et sa compassion lorsque je parlais de mes problèmes de papa rejeté ; sans oublier Angélique et Marine pour leur bonne humeur quotidienne. Merci également à Sandie et à ses nombreuses amies (kg, millivolts, degrés ...).

Un grand merci particulièrement à Fayal pour ces cinq années à travailler à tes côtés. Merci pour ton aide, tes conseils mais aussi pour ta bonne humeur PERMANENTE. Ce fut un plaisir de partager avec toi tes expériences, ta philosophie et tes spécialités culinaires.

Au bureau 130b, d'abord les anciens avec Ludovic Martin, merci pour ton humour, ta bonne humeur quotidienne et pour m'avoir fait découvrir des chanteurs/groupes que je n'aurais pas écouté en temps normal. Rendez-vous au Roudourou pour Guingamp-Chelsea!!! Zeineb, un giant-merci pour ton sourire quotidien, ta bonne humeur, tes conseils, pour m'avoir motivé quand je ne l'étais plus et pour nos innombrables discussions tant sur le plan professionnel que personnel. Je vous souhaite plein de bonheur à toi, ton mari François et tes enfants Manel et Isaaq. En bref, ce fut un réel plaisir d'avoir partagé ce bureau avec vous deux. Je vous souhaite de la réussite sur le plan professionnel et plein de bonnes choses sur le plan personnel.

Les nouveaux du 130b, bravo à Maxime et Nadjat d'avoir survécu ces quelques semaines dans le même bureau que moi. Toujours dans les jeunes patchistes, Olfat je te souhaite de la réussite sur le plan professionnel et te remercie de m'avoir fait découvrir la culture libanaise. Tout ce que je vous souhaite les jeunes c'est d'avoir encore de nombreux seals!

Un grand merci également à Damien et Jérôme pour tous ces bons moments passés durant nos thèses. Je n'oublierai jamais toutes les soirées, les repas et les discussions que nous avons pu avoir, aussi bien scientifiques qu'au sujet de nos projets personnels. On l'ouvre quand ce camping? Dr Dudu, alias George Abitbol, n'oublie pas d'où tu viens quand tu seras médecin et ne snobe pas les scientifiques. Jérôme, je te souhaite un excellent post-doc et de la réussite dans ta carrière. Merci également à Agnès Carcouët pour tous les cafés que tu m'as payés, pour les bons moments et surtout pour m'avoir montré ce qu'un couple risque de devenir après quelques dizaines d'années de vie commune.

Je ne saurais oublier Sophie (allias So, ou encore S) qui, en plus de sa générosité, sa bonne humeur permanente et ses talents culinaires, n'a pas hésité à se déplacer de nombreuses fois les week-end et jours fériés pour que je puisse patcher autant. Je te souhaite de la réussite pour ta thèse. Prends soin de Betty Boop et soit vigilante avec la libellule, c'est elle qui nous fait perdre les seals!

Merci à ma famille, mes parents, mon frère Emmanuel et à ceux qui nous ont quitté pendant mes études ou ma thèse. Cette année a été particulièrement difficile et je regrette que tu ne sois pas présente pour partager l'aboutissement de ces années de travail. J'aurais une pensée pour toi le jour de ma soutenance. Emmanuel, merci d'avoir toujours été présent pour moi. Maman, Papa, merci pour tout ce que vous avez fait pour moi. Merci pour votre soutien inconditionnel tant moral, que sur mes choix ou encore financier. Merci de m'avoir offert cette chance d'étudier et d'arriver jusqu'à ce niveau. Vous avez contribué à ce que je suis devenu aujourd'hui et je ne vous remercierai jamais assez.

A Gaëlle ma fiancée, qui est arrivée dans ma vie juste avant ma thèse. Tu as été patiente, compréhensive et tu n'as pas hésité à faire des sacrifices tout au long de ces années. Avec tes enfants, Manon et Melvin, vous avez su faire face à mes multiples sautes d'humeur et aux soucis que je ramenaïs du labo. Merci d'avoir été présente en permanence pour me remonter le moral, m'éclairer pendant mes périodes de doute et de m'avoir apporté l'équilibre nécessaire durant ces années. Enfin toi, Méloë, le plus beau cadeau que tu aies pu me faire Gaëlle. Merci à toi ma fille d'être présente, tu as transformé ma vie, ma façon de penser, et de travailler aussi puisque je ne laisse plus mon ordinateur à traîner! Papa t'aime très fort.

Sommaire

Remerciements.....	1
Liste des abréviations	5
Table des illustrations.....	6
Index des tableaux.....	8
Introduction générale.....	9
I. Le canal potassique cardiaque dépendant du potentiel KCNQ1	11
I.1. Implication physiologique du canal KCNQ1.....	11
I.1.1. Structure	11
I.1.2. Courant potassique cardiaque I_{Ks}	12
I.2. Modulation de l'activité du canal KCNQ1 par le potentiel membranaire	13
I.2.1. Mouvement du voltage-sensor des canaux dépendants du potentiel.....	13
I.2.2. Couplage entre le voltage-sensor et l'ouverture du canal	14
I.3. Modulation de l'activité du canal KCNQ1 par des régulateurs membranaires	18
I.3.1. La sous-unité accessoire KCNE1.....	18
I.3.2. L'environnement lipidique.....	24
I.4. Modulation de l'activité du canal KCNQ1 par des régulateurs cytosoliques	29
I.4.1. Régulation par le système nerveux.....	29
I.4.2. Régulation par le Ca^{2+} et la calmoduline.....	32
I.5. Troubles du rythme cardiaque associés à I_{Ks}	33
I.5.1. Mutations gain-de-fonction.....	34
I.5.2. Mutations perte-de-fonction : le syndrome du QT long	36
II. Le canal sodique cardiaque dépendant du potentiel $Na_v1.5$	38
II.1. Structure du canal $Na_v1.5$	38
II.2. Mécanismes d'activation du canal $Na_v1.5$	40
II.3. Mécanismes d'inactivation du canal $Na_v1.5$	40
II.4. Courant sodique persistant	41
II.4.1. La théorie du ralentissement/échec de l'inactivation	42
II.4.2. La théorie de la réouverture en condition de non-équilibre	44
II.4.3. La théorie du courant de fenêtre.....	46
II.5. Complexe canalaire $Na_v1.5$ cardiaque	47
II.6. Régulation du canal $Na_v1.5$ par la calmoduline	49
II.7. Régulation du canal $Na_v1.5$ par les protéines FGF12/13	52
II.8. Phosphorylation du canal sodique cardiaque $Na_v1.5$	54
II.8.1. Régulation de $Na_v1.5$ par la PKA	54
II.8.2. Régulation de $Na_v1.5$ par la PKC	55
II.8.3. Régulation de $Na_v1.5$ par la SGK	56
II.8.4. Régulation de $Na_v1.5$ par l'Akt.....	56
II.8.5. Régulation de $Na_v1.5$ par les tyrosines kinases	57
II.8.6. Régulation de $Na_v1.5$ par la CaMKII	58

II.9. Implications physiopathologiques du canal Na _v 1.5	61
II.9.1. Mutations gain-de-fonction : le syndrome du QT long	62
II.9.2. Pathologies associées à des mutations perte-de-fonction.....	63
II.9.3. Pathologies associées à des mutations gain- et perte-de-fonction.....	65
II.9.4. Les syndromes chevauchants	65
II.9.5. Insuffisance cardiaque	66
Objectifs.....	69
Résultats	70
I. Projet 1 : Identification des déterminants moléculaires responsables d'une diminution de la sensibilité aux variations de PIP ₂ membranaire du canal KCNQ1-R539W.....	70
I.1. Introduction	70
Article.....	72
I.2. Discussion	87
I.2.1. Résumé des résultats.....	87
I.2.2. Limites de l'étude	88
I.2.3. Conclusion.....	89
II. Projet 2 : Identification des sites de phosphorylation natifs du canal sodique cardiaque Na _v 1.5 et conséquences fonctionnelles dans le contexte de l'insuffisance cardiaque	90
II.1. Introduction	90
II.2. Matériel et Méthodes.....	91
II.2.1. Expression hétérologue dans les cellules HEK-293.....	91
II.2.2. Technique de patch clamp.....	91
II.2.3. Analyses statistiques.....	93
II.3. Résultats	93
II.4. Discussion	102
Discussion générale	104
I. Le PIP ₂ : un phospholipide au centre de la modulation de l'activité de KCNQ1 par de nombreux régulateurs.	105
I.1. PIP ₂ et dépendance au potentiel du canal KCNQ1	105
I.2. PIP ₂ et régulation du canal KCNQ1 par KCNE1	106
I.3. PIP ₂ et régulation adrénergique du canal KCNQ1.....	106
I.4. Implication physiopathologique de la régulation de KCNQ1 par le PIP ₂	107
II. La CaMKII régule de nombreuses propriétés biophysiques de Na _v 1.5.....	108
II.1. Implication physiopathologique de la régulation de Na _v 1.5 par la CaMKII.....	109
II.2. Dualité des effets de la CaMKII.....	110
II.3. Lien entre CaM et CaMKII	111
Références bibliographiques	112
Annexe	141

Liste des abréviations

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

APD : durée du potentiel d'action

B4-5 : boucle entre S4 et S5

CaM : calmoduline

Ci-VSP : phosphatase dépendante du potentiel de l'ascidie *Ciona intestinalis*

CTD : domaine C-terminal

DAG : diacylglycerol

FA : fibrillation auriculaire

FRET : fluorescence resonance energy transfer

hERG : human ether-à-go-go-related gene

IDIII-IV : boucle entre les domaines DIII et DIV du canal Na_v1.5

I_{IM} : inactivation intermédiaire

IP₃ : inositol-1,4,5-trisphosphate

LQTS : long QT syndrome

MTSES : méthane thiosulfonate éthyltriméthylammonium

MTSET : méthane thiosulfonate éthylsulfonate

PA : potentiel d'action

PIP₂ : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

PKA : protéine kinase A dépendante de l'adénosine monophosphate cyclique

PKC : protéine kinase C

PLC : phospholipase C

SQTS : syndrome du QT court

TS6 : partie C-terminale du segment S6

TTX : tétrodotoxine

Table des illustrations

Figure 1 : Représentation schématique du potentiel d'action cardiaque et des différents courants ioniques impliqués.	10
Figure 2 : Structure schématique d'une sous-unité α du canal KCNQ1	11
Figure 3 : Représentation schématique des trois modèles de mouvement du voltage-sensor.....	14
Figure 4 : Modèle de levier mécanique.	16
Figure 5 : Modèle de ligand-récepteur	17
Figure 6 : Modulation de l'activité de KCNQ1 par des peptides exogènes B4-5 et TS6 selon le modèle ligand-récepteur.	17
Figure 7 : Représentation schématique du mécanisme d'ouverture du canal KCNQ1-KCNE1.	23
Figure 8: Un modèle basé sur la stabilisation de l'état ouvert par le PIP_2 qui récapitule les propriétés du courant KCNQ1-KCNE1.	26
Figure 9 : Représentation schématique de la régulation de l'interaction canal- PIP_2 par la PKA.....	32
Figure 10 : Electrocardiogrammes (ECG) et potentiels d'action (PA) ventriculaires dans les syndromes du QT long (LQTS) et du QT court (SQTS).....	36
Figure 11 : Représentations schématiques de la structure et du fonctionnement du canal $Na_v1.5$	39
Figure 12 : Représentation schématique et illustration des trois modes d'activités du canal $Na_v1.5$ pouvant expliquer le mécanisme de ralentissement/échec de l'inactivation à l'origine du courant I_{NaL}	44
Figure 13 : Exemples d'enregistrement de I_{NaL} obtenus grâce à des protocoles de stimulations dynamiques.....	45
Figure 14 : Représentation schématique du courant de fenêtre et son implication dans le potentiel d'action pour le canal $Na_v1.5$ sauvage et muté.	46
Figure 15 : Schéma représentant deux scénarios de mécanismes de régulation du canal $Na_v1.5$ par le Ca^{2+} et la calmoduline (CaM).	51
Figure 16 : Effets d'une augmentation de l'activité de la $CaMKII\delta_C$ sur les propriétés biophysiques du canal $Na_v1.5$	60
Figure 17 : Immunoprécipitation des complexes canaux de $Na_v1.5$ de ventricules de souris adultes sauvages et transgéniques surexprimant la $CaMKII\delta_C$	93
Figure 18 : Représentation schématique des sites de phosphorylation de $Na_v1.5$ identifiés <i>in situ</i>	94
Figure 19 : Quantification relative des sites de phosphorylation du canal $Na_v1.5$ dans les immunoprécipitats de $Na_v1.5$ à partir de ventricules de souris $CaMKII\delta_C$ -TG par rapport aux souris WT.....	95
Figure 20 : Propriétés biophysiques des courants Na^+ WT, S1933E, S1984E et S1933E-S1984E.	97

Figure 21 : Dépendance au potentiel de l'inactivation des canaux WT, S1933E, S1984E et S1933E-S1984E	99
Figure 22 : Levée d'inactivation des canaux WT, S1933E, S1984E et S1933E-S1984E dans les cellules HEK-293.	100
Figure 23 : Enregistrement du courant Na^+ persistant des canaux WT, S1933E, S1984E et S1933E-S1984E	101
Figure 24 : Mécanismes responsables des arythmies causées par une augmentation du I_{NaL} . D'après Shryock et al., 2013.....	109

Index des tableaux

Tableau I : Les différentes formes du syndrome du QT long et les gènes associés.	37
Tableau II : Partenaires régulateurs du canal sodique Na _v 1.5	48
Tableau III : Les différentes formes du syndrome de Brugada et les gènes associés.	64
Tableau IV : Densités moyennes de courant Na ⁺ mesurées (pA/pF) à différents potentiels.	96
Tableau V : Paramètres extraits des régressions non linéaires des différentes courbes.	101

Introduction générale

Les cellules sont délimitées par une membrane plasmique qui constitue une barrière entre le milieu intracellulaire (cytoplasme) et le milieu extracellulaire. Pour permettre l'entrée et la sortie des substrats ionisés essentiels au fonctionnement cellulaire, des transporteurs et canaux sont présents au sein de cette bicouche lipidique. Les canaux ioniques sont des protéines ancrées dans la membrane permettant la diffusion passive d'ions à un débit pouvant dépasser 100 millions d'ions par secondes (soit 10^5 fois plus vite que les transporteurs membranaires les plus rapides) (Hille, 1992). Ces protéines membranaires possèdent une perméabilité sélective pour un ion donné, qui est à la base de la classification des canaux ioniques (e.g. canaux potassiques, canaux sodiques et canaux calciques). A ces familles de canaux très sélectifs s'ajoutent des canaux qui sont perméables pour les cations (e.g. les récepteurs de type canaux TRP, ou encore les canaux activés par l'hyperpolarisation et modulés par les nucléotides cycliques HCN). La plupart des canaux ioniques ont des mécanismes d'ouverture-fermeture régulés par un stimulus spécifique : variation du potentiel membranaire, fixation d'un ligand sur le canal ou encore stress mécanique.

Comme toutes les cellules excitables, les cellules cardiaques (ou cardiomyocytes) sont soumises à une différence de composition ionique de part et d'autre de la membrane: le milieu intracellulaire est riche en potassium (K^+), et le milieu extracellulaire est plus concentré en sodium (Na^+), calcium (Ca^{2+}) et chlore (Cl^-). En raison d'une membrane perméable au repos quasi-exclusivement au K^+ , la valeur du potentiel de membrane de la plupart des cardiomyocytes est proche du potentiel d'équilibre pour ces ions (-80 à -90 mV). Lorsque la fibre cardiaque est stimulée, la membrane se dépolarise (variation du potentiel vers des valeurs moins négatives) jusqu'à atteindre une valeur de potentiel seuil, provoquant la genèse d'un potentiel d'action (PA). Ce PA résulte de l'apparition séquentielle de différents courants ioniques, portés par des canaux ioniques sensibles au potentiel membranaire, appelés canaux dépendants du potentiel (**Figure 1**). On distingue les courants dépolarisants qui correspondent à une entrée de cations (Na^+ ou Ca^{2+}) ou une sortie de Cl^- , des courants repolarisants générés par une sortie de cations (K^+) ou une entrée de Cl^- . Le PA va se propager tout au long du muscle cardiaque (myocarde) sous la forme d'une onde électrique et, grâce aux phénomènes de couplage excitation-contraction, provoquer la contraction du myocarde. Cette onde permet ainsi au cœur d'assurer sa fonction primordiale de pompe, délivrant le sang dans tout l'organisme.

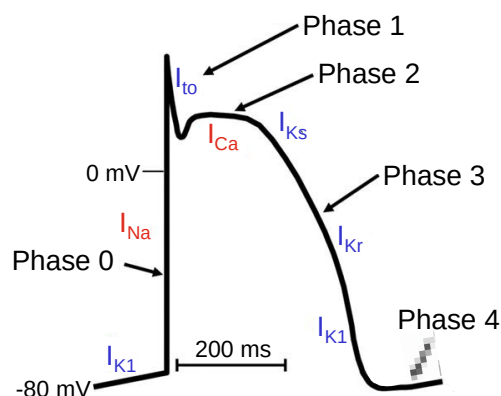


Figure 1 : Représentation schématique du potentiel d'action cardiaque et des différents courants ioniques impliqués.

Les courants dépolarisants sont représentés en rouge, et les courants repolarisants en bleu.

Les canaux ioniques cardiaques sont généralement des complexes multi-protéiques composés d'une ou plusieurs sous-unités canalaire, souvent appelées sous-unités α , qui constituent le pore, et de sous-unités auxiliaires ou régulatrices, souvent appelées sous-unités β . Ces protéines partenaires jouent un rôle essentiel dans la régulation de la stabilité du canal, de sa localisation subcellulaire, de son adressage à la surface cellulaire ou encore de ses propriétés biophysiques (Nerbonne and Kass, 2005). En plus des protéines partenaires, l'activité des canaux ioniques cardiaques est modulée par des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation (Herren et al., 2013; Martens et al., 1999; Rook et al., 2011; van der Heyden et al., 2005), mais aussi par les lipides membranaires (Levitan et al., 2010; Logothetis et al., 2010; Poveda et al., 2014). Ces modulations d'expression ou d'activité participent à divers aspects de la physiologie cardiaque mais peuvent aussi contribuer au développement de pathologies que l'on regroupe sous le terme de canalopathies. Les canalopathies cardiaques, responsables de troubles du rythme cardiaque, peuvent être acquises ou héréditaires *via* des mutations dans les gènes codant pour les sous-unités α ou β des canaux (Abriel and Zaklyazminskaya, 2013). Une meilleure compréhension des mécanismes de régulation des canaux ioniques cardiaques est une étape indispensable pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques contre les canalopathies cardiaques.

Dans ce contexte, mon travail de thèse a consisté à étudier les mécanismes de régulation physiologiques et pathologiques des canaux ioniques cardiaques dépendants du potentiel KCNQ1 et Na_v1.5.

Pour que le lecteur dispose de l'état actuel des connaissances sur les mécanismes de régulation des canaux ioniques cardiaques KCNQ1 et Na_v1.5, cette introduction est composée de deux parties. Dans un premier temps, le rôle physiologique du canal KCNQ1, ses mécanismes de régulation ainsi que

son implication dans les troubles du rythme cardiaque vont être présentés. Puis, les mécanismes de régulation du canal $\text{Na}_v1.5$ par ses protéines partenaires et sa phosphorylation seront présentés dans les contextes physiologique et pathologique.

I. Le canal potassique cardiaque dépendant du potentiel KCNQ1

I.1. Implication physiologique du canal KCNQ1

I.1.1. Structure

KCNQ1 (aussi appelé $\text{K}_v\text{LQT1}$ et plus récemment $\text{K}_v7.1$) est la sous-unité α d'un canal potassique dépendant du potentiel exprimée dans de nombreux types cellulaires et qui est impliquée dans de nombreux processus : la signalisation électrique dans le cerveau et les muscles, la synthèse hormonale, la sécrétion d'acide gastrique, d'ions, de glucose ou encore le contrôle du volume cellulaire (Abbott, 2014). Comme tous les canaux potassiques dépendants du potentiel (ou K_v), KCNQ1 n'est fonctionnel que sous la forme d'un tétramère formé par l'association de 4 sous-unités α (Long et al., 2005a; Smith et al., 2007). Chacune de ses sous-unités est formée de 6 segments transmembranaires (S1 à S6) qui peuvent être divisés en deux parties fonctionnelles distinctes: un domaine « voltage-sensor » composé des segments S1 à S4, et un domaine pore constitué des segments S5 et S6 (**Figure 2**). Le domaine voltage-sensor contrôle l'ouverture et la fermeture du pore dépendante du potentiel, et le domaine pore constitue à la fois la région de sélectivité et de conduction des ions. Les fragments N- et C-terminaux sont intracellulaires, des boucles extra ou intracellulaires relient les segments, et la boucle S5-S6 forme le filtre de sélectivité du pore du canal.

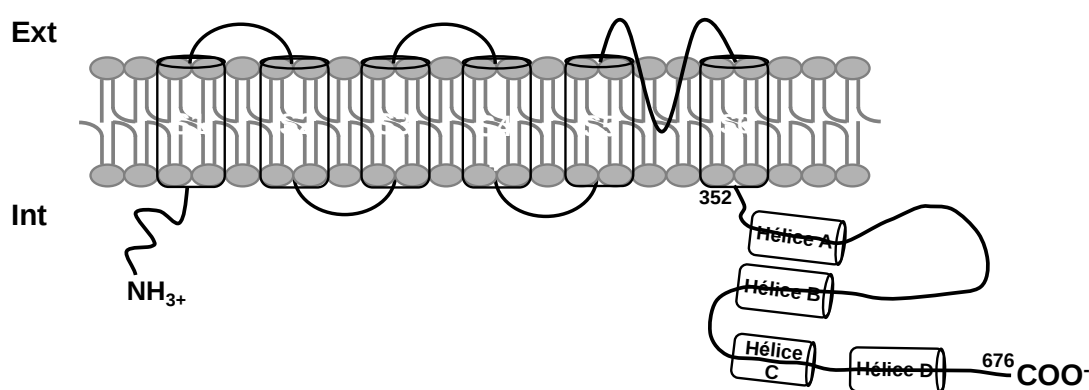


Figure 2 : Structure schématique d'une sous-unité α du canal KCNQ1

Les études réalisées sur la partie N-terminale du canal s'accordent pour dire que cette extrémité semble jouer un rôle unique dans la localisation du canal à la membrane (Dahimène et al., 2006; Jespersen et al., 2004). En revanche, la structure et le rôle du domaine C-terminal (en anglais : CTD pour

C-terminal domain) du canal KCNQ1 sont plus complexes. En effet, le CTD du canal KCNQ1 est un long fragment de 300 acides aminés qui représente environ 50% de la sous-unité α . Ce fragment intracellulaire peut être divisé en deux moitiés, une partie proximale contenant les hélices A (résidus 370 à 386) et B (résidus à 504 à 531), et une partie distale contenant les hélices C (résidus à 538 à 562) et D (résidus à 587 à 620) (Wiener et al., 2008). La partie proximale est le site de fixation pour la calmoduline (CaM) qui est connue pour moduler les propriétés biophysiques du canal KCNQ1, son repliement conformationnel, et son trafic membranaire (Ghosh et al., 2006; Shamgar et al., 2006). La partie distale contient un site de fixation pour une autre protéine régulatrice du canal, la protéine yotiao qui joue un rôle majeur dans la régulation β -adrénergique de l'activité du canal (Marx et al., 2002). De plus, cette partie distale intervient dans le trafic du canal à la membrane (Kanki et al., 2004). La détermination de la structure cristallographique du CTD du canal KCNQ1 a permis de montrer que cette région du canal régule l'oligomérisation des sous-unités α (Howard et al., 2007; Wiener et al., 2008). Wiener et ses collaborateurs ont notamment montré que la tétramérisation du canal KCNQ1 est permise grâce aux hélices C et D qui s'associent de manière hiérarchisée: les hélices C se dimérisent, puis ces dimères s'associent entre eux pour former des dimères de dimères, et la tétramérisation des hélices D permet de stabiliser l'oligomérisation du canal (Wiener et al., 2008).

1.1.2. Courant potassique cardiaque I_{Ks}

Dans le cœur humain, KCNQ1 en association avec sa sous-unité β régulatrice KCNE1 est responsable du courant I_{Ks} , composante lente du courant rectifiant retardé (Barhanin et al., 1996; Sanguinetti et al., 1996). I_{Kr} , la composante rapide de la phase de repolarisation du PA cardiaque est générée par le canal potassique cardiaque hERG (**Figure 1**). Ces deux courants potassiques I_{Ks} et I_{Kr} jouent un rôle majeur dans la modulation de la durée du PA (en anglais : APD pour Action Potential Duration) (Heath and Terrar, 1996; Sanguinetti and Jurkiewicz, 1990). Alors que le rôle de I_{Kr} est clairement démontré dans des conditions physiologiques normales, la contribution de I_{Ks} dans l'APD semble faible (Jost, 2005; Silva and Rudy, 2005). En effet, des études menées sur différents modèles animaux et sur des cardiomyocytes humains ont montré que l'utilisation de bloqueurs spécifiques du canal KCNQ1, malgré une inhibition du courant I_{Ks} , affecte peu la durée du PA ventriculaire (Jost, 2005; Lengyel et al., 2001; Varro et al., 2000). En revanche, lorsque la stimulation par le système nerveux sympathique est augmentée, ou lorsque la repolarisation du PA est excessivement ralentie par une augmentation des courants dépolarisants (I_{Na} ou I_{Ca}) ou une diminution des courants repolarisants (I_{Kr} ou I_{K1}), la contribution de I_{Ks} dans la repolarisation cardiaque est accrue. Ainsi, lorsque I_{Kr} est inhibé par des agents pharmacologiques, I_{Ks} joue un rôle majeur dans la limitation d'un allongement excessif de la durée du PA (Jost, 2005; Varro et al., 2000; Silva and Rudy, 2005). Enfin, il a été démontré que lorsque le

courant I_{Kr} est bloqué, il existe une relation inverse entre la durée du PA et la fréquence de stimulation des cardiomyocytes (Jost, 2005; Jurkiewicz and Sanguinetti, 1993; Silva and Rudy, 2005). Cette relation s'explique par une augmentation de la « réserve de repolarisation » portée par le courant I_{Ks} , due à une activation plus rapide du canal KCNQ1 à des fréquences de stimulation élevées (Silva and Rudy, 2005).

1.2. Modulation de l'activité du canal KCNQ1 par le potentiel membranaire

Le canal potassique cardiaque KCNQ1 appartient à la famille des canaux dépendants du potentiel, cela implique que son fonctionnement est étroitement lié aux variations de potentiel membranaire. A l'heure actuelle, nous manquons d'éléments pour comprendre en détail les mécanismes moléculaires responsables de la modulation de l'activité du canal KCNQ1 par le potentiel. C'est pourquoi cette partie va présenter les mécanismes connus pour KCNQ1, et pour les canaux dépendants du potentiel d'une manière générale, qui permettent son ouverture suite à un changement dans l'environnement électrique.

1.2.1. Mouvement du voltage-sensor des canaux dépendants du potentiel

La capacité d'un canal à ressentir les variations de potentiel membranaire est permise grâce au domaine voltage-sensor (S1-S4), et notamment grâce au segment S4. En effet, ce segment possède tous les trois acides aminés des résidus chargés positivement (arginine, R et lysine, K) qui vont se déplacer au sein de la membrane plasmique en réponse aux variations de potentiel. Le mouvement du S4 va induire des changements conformationnels du canal, permettant son ouverture ou sa fermeture selon le potentiel. De nombreuses études se sont intéressées à la nature du mouvement de ce segment S4, conduisant à la description de 3 modèles distincts.

Le modèle à vice hélicoïdale est le plus ancien, initialement décrit pour les canaux sodiques (Guy and Seetharamulu, 1986), il a ensuite été proposé pour les canaux potassiques (Durell and Guy, 1992). Basé sur une approche de modélisation, ce modèle décrit un mouvement du segment S4 à la fois de rotation autour de son axe et de translation (**Figure 3**). Différentes études ont alors décrit que suite à une dépolarisation, le segment S4 effectue une rotation de $\approx 180^\circ$ simultanément à un déplacement de $\approx 13,5 \text{ \AA}$ vers la surface extracellulaire de la membrane plasmique (Durell et al., 1998; Gandhi and Isacoff, 2002; Keynes and Elinder, 1999).

Le modèle de transporteur, contrairement au précédent, décrit un déplacement du S4 plus restreint, de $\approx 2-4 \text{ \AA}$ (Cha et al., 1999; Chanda et al., 2005; Glauner et al., 1999; Posson et al., 2005). Dans ce modèle, le transfert de charges s'effectue principalement grâce à la rotation du segment S4 permettant aux

résidus chargés positivement de passer d'une crevasse en contact avec le milieu intracellulaire à une crevasse en contact avec le milieu extracellulaire (**Figure 3**).

Plus récemment, le modèle du « voltage-sensor paddle » fut suggéré, grâce à une approche de cristallographie sur un canal potassique bactérien, K_vAP (Jiang et al., 2003). Ce modèle suggère que suite à une dépolarisation, le « voltage-sensor paddle », composé d'une partie du segment S3 (hélice S3b) et du segment S4, se déplace à travers la membrane plasmique de $\approx 15-20$ Å (**Figure 3** ; Jiang et al., 2003; Ruta et al., 2005). Cependant, ce modèle suggérant un déplacement plus important du S4 par rapport aux deux autres modèles est discutable en raison d'une structure non-native du canal K_vAP dans cette étude cristallographique. En effet, il a été suggéré par la suite que la conformation non-native de K_vAP était principalement due à l'absence de lipides membranaires dans les conditions de cristallisation (Lee et al., 2005).

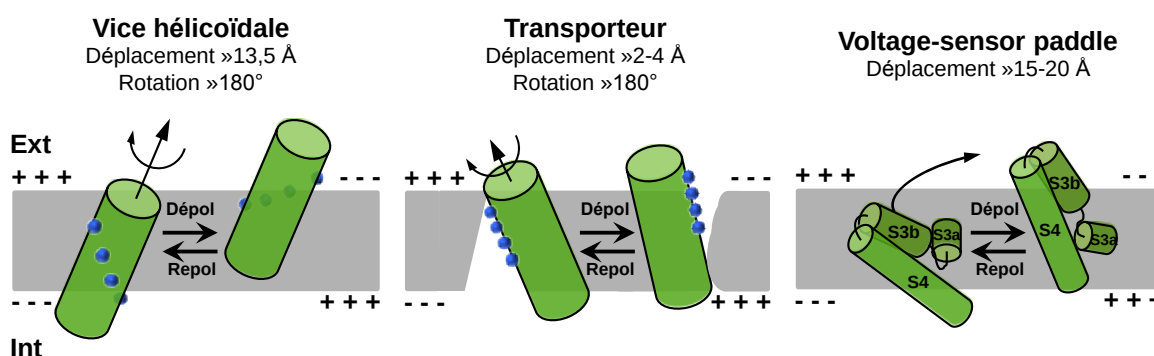


Figure 3 : Représentation schématique des trois modèles de mouvement du voltage-sensor.

Les charges positives du S4 sont représentées en bleu. Les charges positives et négatives du milieu extracellulaire (Ext) et du milieu intracellulaire (Int) représentent le potentiel membranaire après une dépolarisation (Dépol) ou une repolarisation (Repol).

Les différences d'amplitudes du mouvement du S4 observées dans ces trois modèles peuvent s'expliquer par la variabilité des techniques utilisées. En effet, certaines techniques comme le FRET vont sous-estimer son mouvement en ne révélant que des conformations rares où les fluorophores donneur et accepteur sont très proches. A l'inverse, des techniques comme le « cross-linking » et le ciblage par la biotine vont surestimer son mouvement en stabilisant de façon covalente des conformations rares et extrêmes où les cystéines substituées à des acides aminés du voltage-sensor sont accessibles du côté intra ou extracellulaire (Tombola et al., 2006).

1.2.2. Couplage entre le voltage-sensor et l'ouverture du canal

Le mouvement du S4, dépendant du potentiel, permet donc au domaine voltage-sensor de détecter des variations du potentiel membranaire. Les déplacements du S4 dans la membrane vont induire des modifications conformationnelles qui sont à l'origine de l'ouverture-fermeture du canal. De nombreuses études se sont intéressées aux bases moléculaires responsables de ce transfert du

mouvement du S4 en ouverture-fermeture du pore. L'interaction entre la boucle S4-S5 (appelée B4-5) et de la partie C-terminale du segment S6 (appelée TS6) semble être au centre de ces mécanismes.

Le modèle de levier mécanique repose sur un couplage physique entre les voltage-sensors S4 et le pore d'un canal ionique dépendant du potentiel. Dans ce modèle, aux potentiels repolarisant où le canal est fermé, les B4-5 vont pousser les TS6 provoquant une constriction du pore (**Figure 4**). Ce modèle fut initialement proposé à partir d'un travail portant sur une chimère dans laquelle le domaine pore du canal potassique de drosophile, Shaker, a été remplacé par celui d'un canal potassique bactérien KcsA (Lu et al., 2002; 2001). La fermeture incomplète de cette chimère a permis aux auteurs de suggérer qu'il existe une interaction entre les B4-5 et les TS6 à l'état fermé. Ce modèle est cohérent avec l'étude structurale portant sur un homologue de Shaker, le canal $K_v1.2$ (Long et al., 2005a). Dans cette étude, les auteurs suggèrent, grâce à une approche de modélisation par homologie, que même à l'état fermé B4-5 interagit toujours avec TS6. On peut penser que, comme la structure du canal K_vAP utilisé dans le modèle de « voltage-sensor paddle » pour décrire le mouvement du S4 (voir plus haut), la structure cristallographique de $K_v1.2$ correspond à une conformation non-native. En effet, cette structure montre une position du S4 par rapport au pore qui est incompatible avec la proximité entre le premier résidu arginine du S4 (R249) et le résidu A351 du pore (Lewis et al., 2008). Cette proximité avait été démontrée par la création de ponts métalliques en présence de Zn^{2+} ou de Cd^{2+} entre ces résidus R249 et A351 une fois mutés en histidines (Lewis et al., 2008). Toutefois, cette approche est discutable car l'introduction de site de fixation d'ion métallique pourrait également entraîner le canal à une conformation non-native. Enfin, ce modèle d'interaction entre B4-5 et TS6 dans les états fermé et ouvert a été renforcé par d'autres études fonctionnelles portant sur Shaker. L'une d'entre elle a montré que des mutations dans B4-5 ou TS6 modifient le mouvement des charges positives du S4 lorsqu'il passe de l'état activé à l'état de repos, mais également que l'interaction entre B4-5 et TS6 maintient les S4 en position activée et stabilise ainsi l'état ouvert du canal (Batulan et al., 2010). Le même groupe a identifié par la suite d'autres mutations dans B4-5 et TS6 qui provoquent un découplage entre le mouvement du S4 et l'ouverture du pore (Haddad and Blunck, 2011). En effet, ils ont observés que ces mutations qui provoquent une perte de fonction sur l'ouverture du pore, sont responsables d'un gain de fonction dans l'activation des S4 sur ces canaux mutés, suggérant un déplacement facilité des S4 lorsque l'influence mécanique du domaine pore sur le domaine voltage-sensor est abolie.

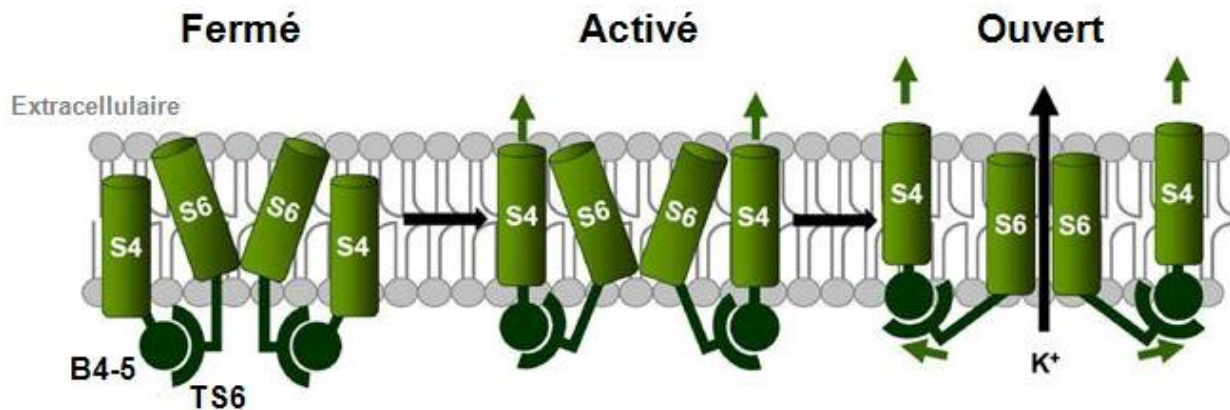


Figure 4 : Modèle de levier mécanique.

Ce modèle propose une interaction forte et permanente entre la boucle S4-S5 (B4-5) et la partie C-terminale de S6 (TS6) comme étant à la base du couplage entre le mouvement du segment voltage-sensor S4 et l'ouverture du pore. D'après Choveau et al., 2012.

Ces dernières études sont particulièrement cohérentes avec le modèle de levier mécanique dans lequel il existe une interaction forte et permanente entre B4-5 et TS6 qui permet de faire le lien entre le mouvement du S4 et l'ouverture-fermeture de la porte d'activation (Long et al., 2005b). Cependant, comme nous allons le voir dans la suite de cette partie, des études réalisées sur d'autres canaux dépendants du potentiel ont suggéré un modèle d'interaction labile selon lequel l'interaction entre B4-5 et TS6 n'intervient que pour la stabilisation de l'état ouvert ou de l'état fermé du canal.

Une étude réalisée sur le canal potassique hERG a révélé que forcer l'interaction entre les régions B4-5 et TS6 stabilise le canal à l'état fermé (Ferrer et al., 2006). Une interprétation possible serait que B4-5 agirait comme un ligand dépendant du potentiel capable de s'associer à TS6, son récepteur, pour stabiliser le canal à l'état fermé. A l'inverse, lors d'une dépolarisation membranaire, le segment S4 en se déplaçant vers l'espace extracellulaire tire B4-5 qui ne peut plus interagir avec la partie C-terminale du segment S6, son récepteur, provoquant l'ouverture du canal (**Figure 5**). Pour tester cette hypothèse, un travail récent a consisté à utiliser des peptides mimétiques de B4-5, assimilés au ligand, et TS6, assimilés au récepteur, sur le canal KCNQ1 (Choveau et al., 2010). Dans cette étude, il a été observé que la co-expression du canal et du peptide ligand B4-5 provoque une diminution de l'amplitude du courant I_{Ks} , suggérant une stabilisation de l'état fermé du canal (**Figure 6B**). A l'inverse, le peptide récepteur TS6 provoque un gain de fonction sur l'activité du canal en entrant en compétition avec les TS6 endogènes, diminuant ainsi l'inhibition provoquée par l'interaction endogène B4-5/TS6 (**Figure 6C**). Des approches de mutagenèse du canal et de mutagenèse compensatoire sur les peptides ligands B4-5 et récepteurs TS6 ont permis de valider la spécificité de l'interaction B4-5/TS6 endogène du canal dans la stabilisation du pore à l'état fermé.

De façon cohérente avec ce modèle de ligand-récepteur, la proximité à l'état fermé de B4-5 et TS6 a été démontrée sur le canal potassique cardiaque hERG, grâce à une approche de mutagenèse dirigée (Tristani-Firouzi et al., 2002). De plus, dans l'étude sur hERG énoncée précédemment, la formation d'un pont disulfure, par introduction de cystéines dans ces régions B4-5 et TS6 est favorisée pour des potentiels de repos négatifs, c'est-à-dire quand le canal se ferme (Ferrer et al., 2006). Ces études sur le canal hERG montrant une interaction entre les B4-5 et TS6 à l'état fermé valident alors le modèle ligand-récepteur proposé pour le canal KCNQ1 (**Figure 5**).

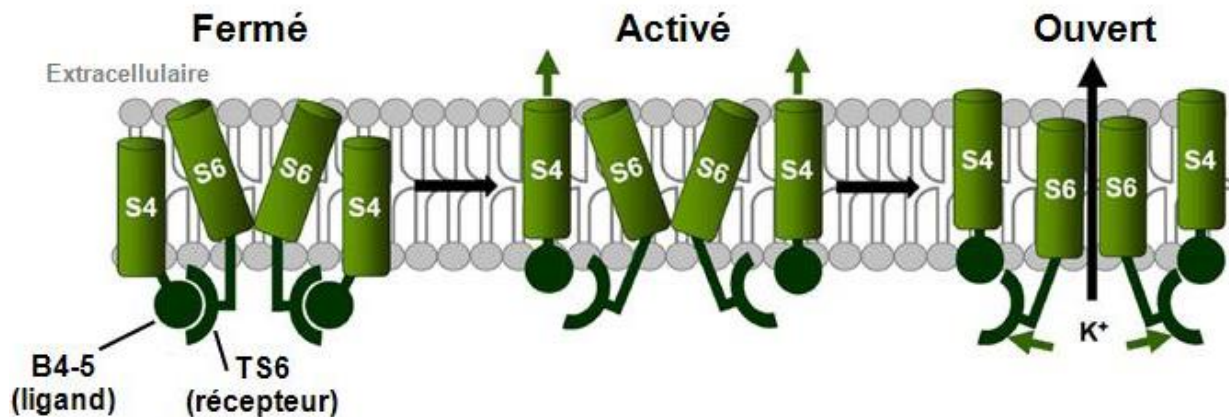


Figure 5 : Modèle de ligand-récepteur

Ce modèle propose une interaction labile et spécifique entre la boucle S4-S5 (B4-5) et la partie C-terminale de S6 (TS6), stabilisant la fermeture de la porte d'activation. D'après Choveau et al., 2012.

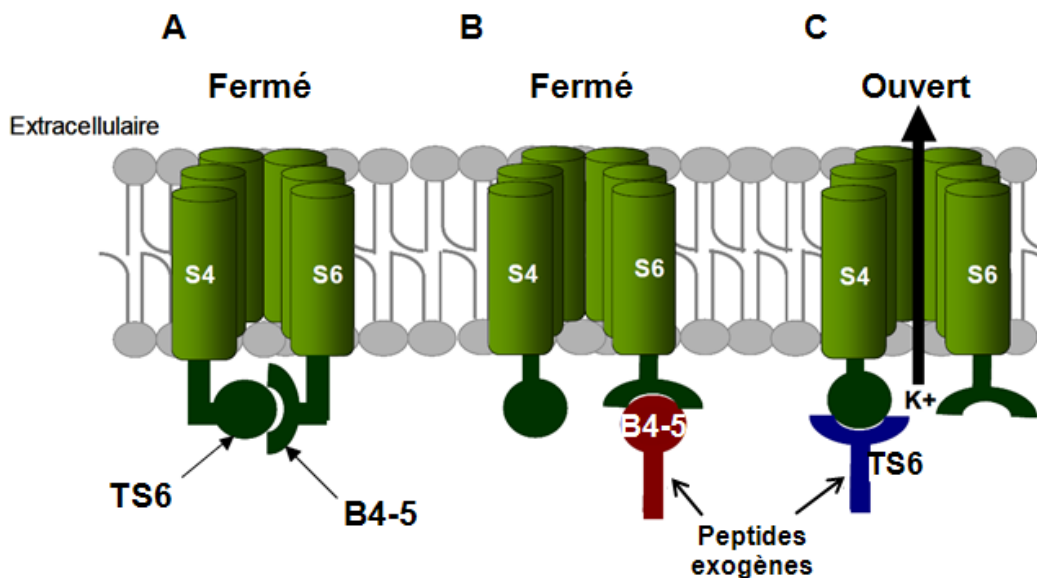


Figure 6 : Modulation de l'activité de KCNQ1 par des peptides exogènes B4-5 et TS6 selon le modèle ligand-récepteur.

B4-5 : boucle S4-S5. TS6 : partie C-terminale du S6.

Toutefois, des études réalisées sur les canaux KAT1 et HCN, suggèrent un modèle plus complexe dans ce couplage entre le domaine voltage-sensor et le domaine pore. En effet, Grabe et ses collaborateurs ont montré, grâce à une approche de modélisation par homologie, que la répulsion

électrostatique entre B4-5 (R190 et R197) et TS6 (R307 et R310) stabilise le canal à l'état fermé, alors que son ouverture se produit lorsque B4-5 tourne autour d'elle-même permettant une interaction entre D188 dans B4-5 et R307, R310 dans TS6 (Grabe et al., 2007). L'idée d'une interaction différente entre B4-5 et TS6 à l'état ouvert et à l'état fermé a été suggérée sur un autre canal, le canal HCN, dans lequel des interactions spécifiques entre B4-5 et TS6 ont été observées dans la stabilisation du canal à l'état fermé (Chen et al., 2001) mais également à l'état ouvert (Prole and Yellen, 2006). La complexité du modèle sur les canaux HCN a été confirmée dans une étude plus récente où des interactions impliquant des résidus différents de B4-5 en fonction de l'état ouvert ou fermé du canal ont été observées (Kwan et al., 2012). Une étude publiée la même année a révélé que ce modèle plus complexe pouvait être appliqué sur le canal hERG (Ng et al., 2012). Ils ont ainsi montré que certains résidus de B4-5 sont impliqués dans la stabilisation des états fermés, comme précédemment décrit (Ferrer et al., 2006; Tristani-Firouzi et al., 2002), ou ouvert du canal, tandis que d'autres sont plutôt impliqués dans des interactions stabilisant des états intermédiaires ou des états de transition très complexes.

Finalement, ce troisième modèle pourrait constituer un modèle consensuel conciliant les modèles de levier mécanique et d'interaction ligand-récepteur. En effet, le travail de Ng et de ses collaborateurs suggère que B4-5 interagit avec TS6 pour stabiliser différents états des canaux hERG, tout comme le modèle de levier mécanique où l'interaction est permanente quel que soit l'état du canal. De plus, grâce à une approche de mutagénèse par « alanine-scanning », les auteurs ont montré que ces interactions sont faibles et impliquent différents résidus bien précis de B4-5 en fonction de l'état du canal, tout comme le modèle d'interaction labile.

Pour résumer, nous venons de voir le rôle de la boucle B4-5 des canaux dépendants du potentiel d'une manière générale, mais également de KCNQ1, dans la médiation entre le module voltage-sensor et le module pore. Cependant, il ne faut pas oublier que des acteurs extrinsèques aux canaux peuvent aussi participer à cette modulation, telles que des protéines partenaires ou des lipides membranaires.

I.3. Modulation de l'activité du canal KCNQ1 par des régulateurs membranaires

I.3.1. La sous-unité accessoire KCNE1

La sous-unité α KCNQ1 lorsqu'elle est exprimée seule produit un courant potassique, cependant la co-expression de KCNQ1 avec la sous-unité KCNE1 est nécessaire pour récapituler le courant potassique retardé cardiaque I_{Ks} (Barhanin et al., 1996; Sanguinetti et al., 1996). En effet, KCNE1 modifie profondément les propriétés biophysiques de KCNQ1 puisqu'elle ralentit les cinétiques d'activation et

de désactivation, décale la dépendance au potentiel de l'activation vers les potentiels plus dépolarisés, supprime l'inactivation et augmente l'amplitude du courant. Bien que les études s'accordent pour les effets de KCNE1 sur les propriétés du canal KCNQ1, la compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents, ainsi que la détermination de la stœchiométrie du complexe KCNQ1-KCNE1 a fait l'objet de nombreuses controverses.

I.3.1.1. Controverse sur la stœchiométrie KCNQ1/KCNE1

Initialement, des travaux principalement basés sur des mesures du courant macroscopique ont révélé une stœchiométrie de 4:2 entre KCNQ1 et KCNE1 (Chen et al., 2003; Wang and Goldstein, 1995). Une étude ultérieure a validé cette hypothèse grâce à une approche qui teste combien de charybdotoxines couplées à un groupement thiol capable de créer un pont disulfure, peuvent se fixer sur une cystéine introduite en position 14 de KCNE1 (Morin and Kobertz, 2008). Mais cette stœchiométrie a par la suite été remise en question par le laboratoire d'Ehud Isacoff en utilisant une approche de dénombrement des sous-unités par une technique d'imagerie sur cellule unique, révélant une stœchiométrie variant de une à quatre sous-unités β dans le complexe KCNQ1-KCNE1 (Nakajo et al., 2010). Leur travail suggère que le courant I_{Ks} correspond à un mélange de plusieurs stœchiométries de KCNQ1-KCNE1, remettant ainsi en question les études précédentes qui ont utilisées comme approche la mesure du courant macroscopique (Chen et al., 2003; Wang and Goldstein, 1995). Cependant, une étude récente utilisant la même approche a remis en avant l'hypothèse de la présence de deux sous-unités KCNE1 dans le complexe canalaire (Plant et al., 2014). Ce travail a été réalisé sur des cellules CHO qui, contrairement à l'étude précédente réalisée dans des ovocytes de xénopes (Nakajo et al., 2010), n'expriment pas de façon endogène les sous-unités KCNQ1 et KCNE1. De plus, pour limiter la mobilité des sous-unités marquées par les fluorophores, Nakajo et ses collaborateurs avaient fait le choix d'ajouter à KCNQ1 et KCNE1 un motif permettant une interaction avec la protéine membranaire PSD-95, surexprimée dans leur modèle. Cependant, cette approche peut entraîner une agrégation non-native des sous-unités KCNQ1 et KCNE1. Plant et ses collaborateurs ont quant à eux choisi de travailler dans des CHO à température ambiante afin de diminuer la fluidité membranaire et la mobilité des sous-unités KCNQ1 et KCNE1 (Plant et al., 2014). Toutefois l'ensemble de ces études a été réalisé dans des systèmes d'expression hétérologues qui ne miment que partiellement la physiologie des cardiomyocytes humains, ce qui peut expliquer la variabilité des résultats obtenus selon le modèle utilisé ou encore la quantité de sous-unités exprimées. Pour pallier à cette limite, l'utilisation des cardiomyocytes dérivés de cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSC-CM) semble être une bonne alternative pour déterminer la réalité de la stœchiométrie du complexe KCNQ1-KCNE1 humain.

Cette sous-unité KCNE1 est le premier membre identifié de la famille des petites sous-unités régulatrices KCNE. Les quatre sous-unités KCNE2-5 sont également capables de s'assembler avec la sous-unité α KCNQ1, et induisent des changements de l'amplitude et des propriétés biophysiques de ce canal. Il a notamment été suggéré que des mutations dans KCNE2 et KCNE5 seraient impliquées dans une canalopathie cardiaque, la fibrillation auriculaire (FA), responsable d'un gain-de-fonction du courant I_{Ks} (Ravn et al., 2008; Yang et al., 2004). La co-expression de KCNQ1 avec KCNE3, de même qu'avec KCNE2, est responsable d'un courant constitutivement actif mais d'amplitude plus élevée qu'en présence de KCNE2 (Jespersen et al., 2004). Enfin, KCNE4 et KCNE5 provoquent une perte de fonction de l'activation de KCNQ1 qui se traduit par un grand décalage de la courbe d'activation du canal vers les potentiels plus positifs (Bendahhou et al., 2005). Ainsi, il apparaît nécessaire de comprendre les mécanismes moléculaires de la régulation de KCNQ1 par les sous-unités KCNE, car une meilleure compréhension de ces mécanismes est une étape qui pourrait se révéler utile pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques contre les canalopathies. Cela est d'autant plus vrai qu'il a été démontré que ces sous-unités β peuvent modifier la réponse du canal KCNQ1 aux traitements pharmacologiques (Panaghie and Abbott, 2006). Dans ce contexte, les parties qui vont suivre présentent les mécanismes moléculaires connus, à l'heure actuelle, et qui sont responsables de la modulation des propriétés du canal KCNQ1 par la sous-unité KCNE1, isoforme principale du cœur.

I.3.1.2. Effets de KCNE1 sur les propriétés biophysiques de KCNQ1

Tout comme l'identification de la stœchiométrie du complexe KCNQ1-KCNE1, la compréhension des mécanismes à l'origine d'un ralentissement de l'activation du canal KCNQ1 par KCNE1 fut soumise à controverse : est-ce que KCNE1 ralentit le mouvement du voltage-sensor, l'ouverture du pore, ou bien les deux ?

Tout d'abord, deux études ayant utilisé la technique d'accessibilité de cystéines introduites dans le S4 aux réactifs méthaneethiosulfonates (MTS) ont suggéré des effets différents de KCNE1. Une première a montré que KCNE1 provoque un ralentissement dans le mouvement du S4 (Nakajo and Kubo, 2007), tandis que l'autre suggère un ralentissement de l'ouverture du pore (Rocheleau and Kobertz, 2008). Le MTS est un réactif incapable de franchir la membrane plasmique, qui se fixe spécifiquement sur des groupements sulfhydryles des cystéines (Akabas et al., 1992). Dans ces expériences les auteurs ont étudié les effets du MTSET⁺ ou MTSES⁻ (MTS éthyltriméthylammonium ou MTS éthylsulfonate) sur l'activité du canal dans lequel un résidu du S4 a été préalablement muté en cystéine. La position du résidu est choisie de telle façon que la cystéine est uniquement accessible au MTS lorsque le S4 est activé. La fixation du MTS est donc un reporteur de l'état activé du S4. La

première étude a suggéré que le ralentissement de la fixation du MTS en présence de KCNE1 reflète un ralentissement de la vitesse de déplacement du S4 (Nakajo and Kubo, 2007). Cependant, Rocheleau et Kobertz ont montré que ce ralentissement de la fixation du MTS n'implique pas forcément un ralentissement des voltage-sensors, mais par exemple un accès restreint de la cystéine au MTS (suite à un changement de conformation du pore, par exemple) alors que les voltage-sensors sont déjà activés. En effet, des dépolarisations suffisamment courtes pour que les S4 ne soient pas accessibles si leur mouvement était effectivement ralenti sont en effet suffisantes pour observer la fixation des MTS (Rocheleau and Kobertz, 2008).

Plus récemment, des travaux basés sur l'approche de fluorimétrie à potentiel imposé se sont également intéressés à cette question (Osteen et al., 2010; 2012). Cette technique consiste à mesurer des variations de fluorescence d'un fluorophore attaché au niveau extracellulaire du S4, dont l'intensité de fluorescence varie en fonction de l'hydrophobicité de son environnement, reflétant ainsi le mouvement du S4. Dans leurs travaux, Osteen et ses collaborateurs ont montré que le mouvement d'un seul S4 est suffisant pour ouvrir le canal KCNQ1 lorsqu'il est exprimé seul (Osteen et al., 2012), alors que KCNE1, en plus de ralentir le mouvement des S4, impose la nécessité du déplacement de plusieurs S4 avant l'ouverture du canal (Osteen et al., 2010; 2012). En effet, contrairement aux mesures effectuées sur KCNQ1 seul, en présence de KCNE1 les cinétiques et dépendances au potentiel du mouvement des S4 et de l'ouverture du pore sont différentes (Osteen et al., 2010). Cette approche de fluorimétrie à potentiel imposé a alors suggéré que KCNE1 affecte à la fois le mouvement du voltage-sensor et le couplage entre le voltage-sensor et l'ouverture du canal. Ces résultats ont cependant été remis en question par un travail publié l'année dernière dans lequel les auteurs, à l'inverse des études d'Osteen et de ses collaborateurs, ont effectué les mesures de fluorescence du déplacement des S4 et de courant ionique sur les mêmes cellules afin de s'affranchir de la variabilité de mesure inter-cellules (Ruscic et al., 2013). Ils ont alors observés une dépendance au potentiel identique entre le mouvement des S4 et l'ouverture du pore en présence de KCNE1, concluant à un effet unique de KCNE1 sur la cinétique de déplacement du « voltage-sensor » (Ruscic et al., 2013). Cependant, une des limites de la fluorimétrie à potentiel imposé utilisée dans ces différentes études est qu'il est difficile d'affirmer si un changement conformationnel détecté par cette approche est lié au déplacement des S4, ou bien si la variation de fluorescence est causée par des changements conformationnels qui ne contribuent pas au processus d'activation du canal.

Ainsi, la compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine du ralentissement de la cinétique d'activation du courant potassique issu de KCNQ1 en présence de KCNE1 reste encore sujette à de nombreux débats. Néanmoins, une étude très récente a validé l'hypothèse d'un effet double de cette sous-unité β (Barro-Soria et al., 2014), tout en conciliant les résultats obtenus dans les différentes études

basées sur la fluorimétrie à potentiel imposé (Osteen et al., 2010; 2012; Ruscic et al., 2013). Cette étude a montré que la courbe de dépendance au potentiel de la fluorescence (F-V) présente deux composantes, une rapide et une plus lente. La première est associée à un mouvement rapide des S4 pour des potentiels négatifs et représente la majorité du déplacement de charge des S4, et une composante plus lente correspondant à un second changement conformationnel des voltage-sensors à des potentiels positifs (Barro-Soria et al., 2014). A partir de leurs données expérimentales, les auteurs de cette étude ont établi un modèle dans lequel KCNE1 stabilise KCNQ1 dans un état fermé mais activé (C4, **Figure 7**), divisant l'activation du voltage-sensor en deux temps. Dans ce modèle, la composante rapide de la courbe F-V est associée à un mouvement indépendant des quatre S4 (transitions α), et la composante lente correspond à un mouvement supplémentaire et concerté de tous les S4 au moment de l'ouverture du pore (transition γ , **Figure 7**). Leurs résultats sont cohérents avec leur travail précédent puisqu'ils observent à nouveau une différence des cinétiques et des dépendances au potentiel entre le mouvement des S4 et l'ouverture du pore en présence de KCNE1 (Osteen et al., 2010). De plus, les auteurs suggèrent que la différence avec les travaux de Ruscic et de ses collaborateurs peut s'expliquer par une différence de protocole utilisé. En effet, la composante rapide de la courbe F-V n'est visible que pour des potentiels de repos très négatifs, or Ruscic et ses collaborateurs ont effectué leurs mesures avec des potentiels de repos plus dépolarisés (-90 mV). Ainsi, les canaux sont déjà dans un état activé (C4), et le signal de fluorescence correspondra majoritairement à la composante lente du déplacement des S4 où leur dépendance au potentiel est identique à la dépendance au potentiel de l'ouverture du pore (Barro-Soria et al., 2014). Enfin, Ruscic et ses collaborateurs ont utilisé dans leur étude un fluorophore qui présente une fluorescence plus faible dans la première composante rapide de la courbe F-V (Barro-Soria et al., 2014).

Ce modèle valide alors les résultats de nombreuses études qui ont observé un effet de KCNE1 sur la cinétique de déplacement des voltage-sensors de KCNQ1 (Nakajo and Kubo, 2007; Osteen et al., 2012; 2010; Ruscic et al., 2013), tout en confirmant un ralentissement de l'ouverture du pore par KCNE1 (Osteen et al., 2010; 2012; Rocheleau and Kobertz, 2008). A nouveau, ces données issues de l'approche de fluorimétrie à potentiel imposé sont à considérer avec prudence en raison des différentes origines de changement conformationnel qui pourraient expliquer les variations de fluorescence observées.

En somme, il apparaît difficile de déterminer avec précision la conséquence du point de vue moléculaire sur les propriétés d'activation du canal KCNQ1 par sa sous-unité β . Même si les techniques ont progressé, il semble indispensable d'utiliser l'approche de cristallographie pour capturer la structure du canal KCNQ1 dans ses différents états : au repos, activé(s) et ouvert.

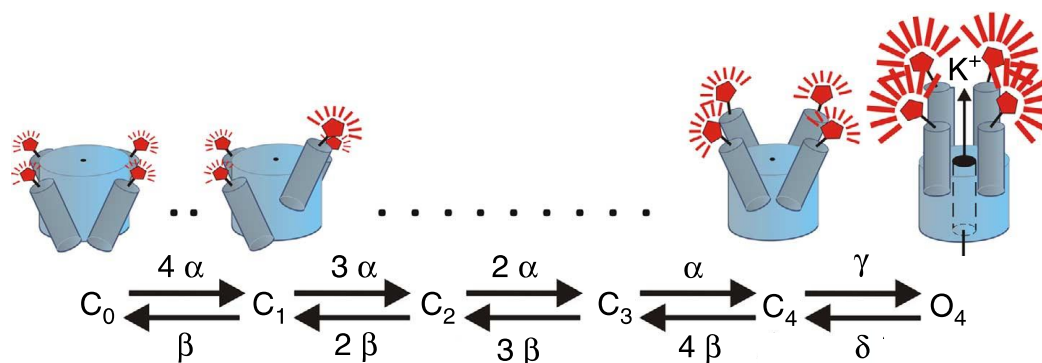


Figure 7 : Représentation schématic du mécanisme d'ouverture du canal KCNQ1-KCNE1.

Les 4 voltage-sensors sont marqués par un fluorophore (rouge). Les transitions de l'état de repos (C₀) à l'état intermédiaire (C₄) correspondent aux déplacements indépendants des quatre S4 qui augmentent l'émission de fluorescence. La dernière transition de l'état intermédiaire C₄ à l'état ouvert du canal (O₄) correspond à un mouvement concerté des S4 responsable d'une augmentation supplémentaire de l'émission de fluorescence. D'après Barro-Soria et al., 2014.

Le décalage de la dépendance au potentiel vers des potentiels positifs de KCNQ1 en présence de KCNE1 est probablement lié à une interaction de KCNE1 avec les voltage-sensors. En effet, de nombreuses études ont montré que KCNE1 déstabilise les interactions qui existent entre des résidus du S4 et d'autres résidus acides du canal, modifiant ainsi la réponse du S4 aux variations de potentiel, responsable du décalage de la courbe d'activation du canal KCNQ1 (Strutz-Seeböhm et al., 2011; Wu et al., 2010b; 2010a). De plus, une étude utilisant une approche de « docking », basée sur la structure de KCNE1 et une modélisation par homologie de KCNQ1, a suggérée une proximité entre la partie C-terminale de KCNE1 et la zone d'interface entre B4-5 et TS6, ce qui pourrait expliquer la modification de la dépendance au potentiel du canal par KCNE1 (Kang et al., 2008). Cependant, seule la détermination de la structure cristallographique de KCNQ1 associé à KCNE1 constituerait une preuve ultime d'une interaction entre ces deux protéines au niveau de ces régions.

Le gain de fonction de KCNE1 sur la densité de courant potassique est lié à la fois à un effet sur les propriétés biophysiques du canal, ainsi qu'à un effet sur l'expression à la surface cellulaire du canal. En effet, des travaux ont montré que KCNE1 provoque une augmentation de trois à cinq fois de la conductance unitaire du canal KCNQ1 (Sesti and Goldstein, 1998; Yang and Sigworth, 1998; Werry et al., 2013), ainsi qu'une augmentation d'environ trois fois de la densité de canal exprimé à la membrane (Plant et al., 2014).

Enfin, la suppression de l'inactivation de KCNQ1 par KCNE1 serait liée à une diminution des phénomènes de fluctuation du vestibule externe du pore et du filtre de sélectivité du canal (Gofman et al., 2012). En effet, dans ce travail basé sur l'approche de « docking », les auteurs ont suggéré que les déformations du filtre de sélectivité observées sur KCNQ1 sont semblables à celles impliquées dans l'inactivation du canal procaryote KcsA (Chakrapani et al., 2011). L'implication de cette région du canal

KCNQ1 dans l'inactivation avait déjà été suggérée dans des travaux portant sur une mutation de la phénylalanine en position 340, résidu interagissant avec la valine 310 contenue dans le filtre de sélectivité (Panaghie et al., 2008). Il avait été montré qu'en présence de KCNE1 la modification en tryptophane de ce résidu restaure l'inactivation du canal KCNQ1, suggérant une modulation de l'inactivation du canal par l'interaction entre le résidu F340 de KCNQ1 avec KCNE1.

En somme, la régulation des propriétés biophysiques du canal KCNQ1 par sa sous-unité β KCNE1 semble complexe et les déterminants moléculaires à l'origine de ces modulations font encore l'objet de nombreux débats. De plus, de nombreuses études ont montré que KCNE1 joue un rôle majeur dans la modulation de l'activité du canal KCNQ1 par ses différents régulateurs. C'est le cas par exemple de la régulation de KCNQ1 par le pH où une acidification des milieux extracellulaire et intracellulaire entraînent respectivement une diminution et une augmentation de l'amplitude du courant, effets qui sont annulés lorsque KCNQ1 est co-exprimé avec la sous-unité KCNE1 (Peretz et al., 2002; Unsöld et al., 2000). Il a également été décrit que KCNE1 est impliquée dans la modulation de l'activité du canal KCNQ1 par des régulateurs tels que le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP_2) ou encore la protéine kinase A (PKA). L'implication de KCNE1 dans ces régulations sera décrite dans les parties qui vont suivre. Il apparaît donc essentiel de déterminer la stœchiométrie exacte du complexe KCNQ1-KCNE1 cardiaque endogène pour s'approcher au plus de la réalité physiologique lorsqu'on étudie les mécanismes de régulation de l'activité du courant I_{Ks} .

1.3.2. L'environnement lipidique

Le canal KCNQ1, comme tous les canaux ioniques dépendants du potentiel, est une protéine contenant des domaines transmembranaires pouvant se déplacer au sein de la membrane plasmique pour adopter différentes conformations associées à des états fonctionnels différents. C'est pourquoi cette bicouche lipidique jouerait également un rôle majeur dans la modulation de la structure et de la fonction du canal KCNQ1, et de tous les canaux ioniques. De plus en plus d'observations montrent que ces modulations de structure et d'activité des canaux passent par une interaction directe avec certains lipides. Cette partie va présenter les mécanismes de régulation du canal KCNQ1 par un des composants majeur de la membrane plasmique, le cholestérol, et par un phospholipide connu pour réguler une grande variété de canaux ioniques, le PIP_2 .

1.3.2.1. Le PIP_2

Le PIP_2 est un phospholipide membranaire acide retrouvé essentiellement sur le feuillet interne de la membrane plasmique. Initialement, le PIP_2 fut décrit comme le précurseur des seconds messagers

inositol-1,4,5-trisphosphate (IP_3) et le diacylglycerol (DAG) lorsqu'il est clivé par la phospholipase C (PLC) (Berridge, 1981). Ce n'est que plus tard que le PIP_2 fut décrit comme une molécule de signalisation à part entière (pour revue voir Logothetis et al., 2010). En effet, tout comme pour une grande variété de transporteurs et de canaux ioniques (Gamper and Shapiro, 2007; Logothetis et al., 2010; Suh and Hille, 2008), il a été démontré que le PIP_2 est un cofacteur nécessaire pour le fonctionnement du canal KCNQ1 (Loussouarn et al., 2003). Dans cette étude, il a été observé que le PIP_2 augmente l'amplitude du courant potassique, ralentit la cinétique de désactivation, et décale la courbe d'activation vers les potentiels plus négatifs. Au vu de ces résultats, les auteurs ont suggéré que le PIP_2 stabilise le canal à l'état ouvert, et ont alors proposé un modèle cinétique dans lequel seule l'étape finale, correspondant à une transition concertée des quatre sous-unités qui conduit à l'ouverture du canal, était affectée par le PIP_2 (**Figure 8**). Dans ce modèle, au cours d'une dépolarisation membranaire, la vitesse de déplacement des S4 étant la transition limitante, la cinétique d'activation est indépendante du PIP_2 . À l'inverse, au cours d'une repolarisation, la transition de la fermeture concertée des quatre sous-unités du canal devient l'étape limitante, faisant de la cinétique de désactivation une étape dépendante de la quantité de PIP_2 . Rappelons que ce modèle est similaire à celui décrit précédemment pour le canal Kir6.2/SUR1 (Enkvetchakul et al., 2000), suggérant des effets similaires du PIP_2 sur les canaux potassiques à six et à deux domaines transmembranaires. De plus, de façon comparable avec de nombreux canaux potassiques à rectification entrante (Kir), ROMK, GIRK et IRK (Huang et al., 1998), une interaction directe du PIP_2 avec un cluster de résidus basiques situé sur le domaine C-terminale (CTD) et proche du pore a récemment été montré sur le canal KCNQ1 (Thomas et al., 2011). Cette homologie entre les canaux Kir et KCNQ1 pourrait apporter des précisions sur les mécanismes de régulation du canal KCNQ1. En effet, des études cristallographiques récentes des canaux Kir ont permis d'éclaircir les mécanismes moléculaires responsables de leur régulation par le PIP_2 (Hansen et al., 2011; Whorton and MacKinnon, 2011). Dans la première étude, la structure du canal GIRK a révélé que le PIP_2 se fixe à des résidus positifs situés à l'interface entre les domaines transmembranaires et le CTD. Les auteurs ont observé que cette fixation provoque des réarrangements de la porte d'activation située au niveau de ces domaines transmembranaires, et que cette étape semble être indispensable à l'ouverture du canal dépendante du GTP (Whorton and MacKinnon, 2011). Pour KCNQ1, la fixation du PIP_2 au cluster de résidus positifs situés juste après le S6 (Thomas et al., 2011) pourrait expliquer la stabilisation de la porte d'activation du canal à l'état ouvert, comme précédemment suggéré par le modèle mathématique (**Figure 8**). La deuxième étude cristallographique a révélé que le PIP_2 provoque l'ancrage de l'ensemble du domaine C-terminal aux domaines transmembranaires du canal Kir2.2, et l'ouverture consécutive de sa porte d'activation (Hansen et al., 2011). Ainsi, on peut imaginer une interaction similaire pour le canal KCNQ1 entre le CTD et la membrane plasmique, *via* le PIP_2 , permettant au CTD de se rapprocher

du pore afin de moduler son ouverture. Cette hypothèse est soutenue par des travaux précédents qui ont montré que la substitution d'arginines localisées au milieu de la partie distale du CTD de KCNQ1 (R539 et R555) diminue la sensibilité du canal pour le PIP_2 (Park, 2005). Cependant, ces hypothèses ne pourront être validées que par l'obtention de la structure cristallographique du canal KCNQ1.

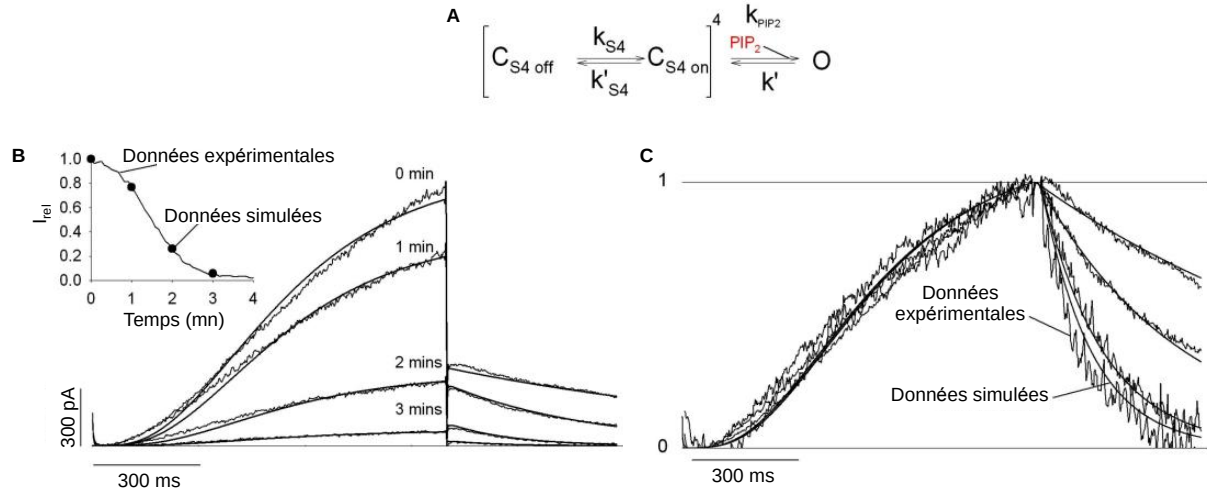


Figure 8: Un modèle basé sur la stabilisation de l'état ouvert par le PIP_2 qui récapitule les propriétés du courant KCNQ1-KCNE1.

(A) Durant l'activation k'_{S4} est négligeable alors que $k_{S4} = 3,56/\text{s}$, et durant la déactivation $k'_{S4} = 7,47/\text{s}$ alors que k_{S4} est négligeable. Dans ce modèle, le PIP_2 n'affecte que la transition de l'état fermé à l'état ouvert, quand les quatre S4 sont dans un état permissif ($C_{S4 \text{ on}}$). Ainsi, durant une diminution graduelle de la quantité de PIP_2 (appelée « rundown »), seulement k_{PIP_2} varie ($k' = 87,3/\text{s}$). (B) Superposition des traces expérimentales et des traces simulées. En haut à gauche sont représentées les amplitudes du courant simulé et du courant mesuré en fonction du temps après l'obtention de la configuration « inside-out », responsable du rundown. (C) Les traces en (B) ont été normalisées pour pouvoir comparer les cinétiques d'activation et de déactivation entre les traces observées et les traces simulées. D'après Loussouarn et al., 2003.

Une étude récente s'est intéressée aux effets du PIP_2 sur le couplage entre le domaine voltage-sensor et le domaine du pore du canal KCNQ1 (Zaydman et al., 2013). Dans cette étude, les auteurs ont utilisé la phosphatase de l'ascidie *Ciona intestinalis* (Ci-VSP) pour diminuer la quantité de PIP_2 disponible pour le canal KCNQ1. Cette phosphatase possède un domaine voltage-sensor, rendant ainsi l'activité enzymatique dépendante du potentiel (Murata et al., 2005). L'approche de fluorimétrie à potentiel imposé a montré que la variation de quantité de PIP_2 influence considérablement l'amplitude du courant ionique sans affecter la dépendance au potentiel du mouvement du voltage-sensor. Le PIP_2 ne semble donc pas nécessaire à l'activation du S4. En revanche, les auteurs ont observé que le PIP_2 provoque un décalage de la courbe F-V vers les potentiels plus négatif du mutant L353K de KCNQ1. Ce mutant est connu pour découpler le domaine voltage-sensor et le domaine pore, rendant le pore constitutivement ouvert (Boulet et al., 2007). Il semblerait donc que le PIP_2 permette de transférer le gain de fonction du domaine pore vers le domaine voltage-sensor. Les auteurs ont ensuite utilisé un modèle mathématique afin de valider leur hypothèse selon laquelle les effets du PIP_2 sur KCNQ1 impliquent une régulation directe du couplage entre les domaines voltage-sensor et les domaines du

pore, et sans effet direct sur les modules eux-mêmes. Enfin, le site de fixation du PIP₂ sur B4-5 a pu être déterminé grâce à une approche de mutagenèse dirigée associée à des études fonctionnelles.

Cependant, le fait que les auteurs n'observent pas d'effet d'une diminution de la quantité de PIP₂ sur le mouvement de S4 est contradictoire avec leur hypothèse d'un rôle du PIP₂ dans le couplage entre le domaine voltage-sensor et le domaine pore. En effet, si le PIP₂ module le couplage entre ces deux domaines, une diminution du PIP₂ devrait entraîner leur découplage et par conséquent, altérer le mouvement des S4. De plus, le modèle mathématique qui leur permet de valider leurs résultats est simple et ne comporte qu'un seul voltage-sensor. Pour justifier leur modèle, les auteurs se basent sur le modèle allostérique d'Osteen et al. ayant suggéré qu'un seul domaine voltage-sensor suffit pour ouvrir le canal (Osteen et al., 2012). Or, comme expliqué précédemment (voir le paragraphe intitulé « Effets de KCNE1 sur les propriétés biophysiques de KCNQ1 »), KCNE1 ralentit la cinétique d'activation du courant I_{Ks} en imposant notamment l'activation des quatre S4 avant l'ouverture du canal KCNQ1 (Osteen et al., 2010; 2012). Ainsi leur modèle mathématique est inapproprié puisque leurs études fonctionnelles sont réalisées dans des ovocytes de xénopes qui expriment une forme endogène de KCNE1, capable de réguler l'activité de KCNQ1 (Anantharam et al., 2003).

La contradiction qui existe entre le modèle de stabilisation du canal à l'état ouvert (Loussouarn et al., 2003) et ce modèle suggérant une régulation directe du couplage entre le domaine voltage-sensor et le domaine pore par le PIP₂, pourrait s'expliquer par la différence d'approches expérimentales entre ces deux études. En effet, la première étude a utilisé la configuration inside-out (giant-patch) de la technique de patch clamp sur des cellules de mammifères (COS-7) et l'addition de PIP₂ exogène directement sur la face interne de la membrane (Loussouarn et al., 2003). En revanche, la deuxième étude a utilisé la configuration cellule entière de la technique de double électrode sur des ovocytes de xénopes et une phosphatase dépendante du potentiel, la Ci-VSP, pour faire varier la quantité de PIP₂ disponible pour le canal (Zaydman et al., 2013). Ces deux hypothèses contradictoires révèlent un manque d'informations et une approche cristallographique du canal KCNQ1 en présence de PIP₂, comme celles publiées récemment sur les canaux Kir (Hansen et al., 2011; Whorton and MacKinnon, 2011), pourrait apporter des précisions quand aux mécanismes moléculaires à la base de la régulation du canal KCNQ1 par le PIP₂.

Couplage PIP₂/KCNE1

Comme écrit précédemment, la sous-unité KCNE1 a récemment été décrite comme modulateur de l'interaction entre le PIP₂ et le canal KCNQ1 (Li et al., 2011). En étudiant la diminution graduelle du courant à travers KCNQ1-KCNE1 (rundown), causée par la réduction de la quantité de PIP₂ membranaire, les auteurs de cette étude ont montré que KCNE1 augmente la sensibilité du canal pour

le PIP₂, lequel se fixe sur l'extrémité C-terminale de KCNQ1. De plus, l'étude structurale qui a suggéré une proximité de la partie C-terminale de KCNE1 avec la zone d'interface entre B4-5 et TS6 (Kang et al., 2008), où des sites de fixation du PIP₂ ont été identifiés (Park, 2005), suggère que le PIP₂ et KCNE1 modulent le courant potassique I_{Ks} *via* des interactions avec la même région de KCNQ1. Ainsi, le PIP₂ interagit avec des résidus du complexe KCNQ1-KCNE1, et KCNE1 régule sa capacité à moduler l'activité de KCNQ1 par des mécanismes qui restent à identifier, à nouveau par une approche cristallographique.

1.3.2.2. Le cholestérol

Le cholestérol est un des composants majeur de la membrane plasmique, il n'est donc pas surprenant que ce lipide soit impliqué dans la régulation de très nombreux canaux ioniques. Cependant, il apparaît clair aujourd'hui que l'impact du cholestérol sur la régulation des canaux ioniques est très hétérogène (Levitan et al., 2010). C'est ainsi que pour les canaux Kir, sur lesquels les effets du cholestérol ont été étudiés en détail, les variations de quantité de cholestérol membranaire ont des conséquences différentes en fonction de la famille de canal étudié. En effet, il a été observé qu'une diminution du cholestérol membranaire provoque une augmentation de l'activité des canaux Kir2 (Romanenko et al., 2002; 2004), mais diminue l'activité d'autres Kir, tels que Kir3.4 (Deng et al., 2012). Encore plus surprenant, les effets du cholestérol sur l'activité d'un même canal peuvent être opposés selon le modèle utilisé, comme observé pour les canaux K_v1.3 (Bock et al., 2003; Hajdú et al., 2003) et K_v2.1 (Gasque et al., 2005; Xia et al., 2004).

Enfin, pour ajouter plus de complexité à ce système, les effets d'une diminution du niveau de cholestérol sur le canal KCNQ1 sont dépendants du traitement utilisé (Hihara et al., 2013; Taniguchi et al., 2012). Parmi ces traitements, les mécanismes à l'origine de la diminution du cholestérol par le probucol ainsi que les effets de cet anti-hyperlipidémique sur le métabolisme du cholestérol cellulaire restent mal connus. Un travail récent a montré que le traitement par le probucol des cellules CHO-K1 ne semble pas diminuer la quantité de cholestérol cellulaire, ni même la synthèse de cholestérol (Hihara et al., 2013). Ainsi, les effets du probucol sur la diminution de l'amplitude du courant I_{Ks} ne semblent pas être liés à des modifications du métabolisme du cholestérol. A l'inverse, les deux autres molécules testées dans cette étude, le triparanol et la simvastatine, diminuent la quantité de cholestérol, accélèrent la cinétique d'activation du courant I_{Ks} , et la simvastatine provoque en plus une diminution d'environ 25 % de la densité de courant (Hihara et al., 2013). Ces molécules sont toutes deux des inhibiteurs de la synthèse du cholestérol (Avigan et al., 1960; Goldstein and Brown, 1990), cependant, le fait qu'ils interviennent à des étapes différentes de cette synthèse pourrait expliquer la différence d'effet observée sur l'activité du canal KCNQ1. Néanmoins, la modulation de son activité par le triparanol et la simvastatine semble donc passer par une diminution de la quantité de cholestérol. Cette

hypothèse est supportée par de nombreuses études qui ont montré la présence des sous-unités KCNQ1 et KCNE1 dans des rafts lipidiques (Balijepalli et al., 2007; Nakamura et al., 2007; Roura-Ferrer et al., 2010), dont la stabilité dépend directement de la quantité de cholestérol (Balijepalli et al., 2007; Sánchez-Wandelmer et al., 2009). En somme, le cholestérol régule l'activité du canal potassique cardiaque KCNQ1 par des mécanismes moléculaires qui restent à déterminer.

I.4. Modulation de l'activité du canal KCNQ1 par des régulateurs cytosoliques

I.4.1. Régulation par le système nerveux

La contribution du courant I_{Ks} dans la durée du PA ventriculaire cardiaque normale est faible (voir la partie 1.2 et Jost, 2005; Lengyel et al., 2001; Varro et al., 2000). Cependant, lorsque la durée de la repolarisation ventriculaire doit être modulée en réponse à différents stimuli, comme lors d'une augmentation du tonus sympathique dans des conditions de stress, la contribution du courant I_{Ks} est augmentée. L'activation des récepteurs adrénergiques par les catécholamines (neurotransmetteurs et hormones) va activer des voies de signalisation qui vont moduler l'activité du canal KCNQ1. Ces voies vont maintenant être abordées.

I.4.1.1. PKA

La stimulation des récepteurs β 1-adrénergiques provoque l'activation de l'adénylate cyclase (AC) qui catalyse la conversion de l'ATP en adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et l'activation de la PKA. Cette kinase, appartenant à un complexe situé au niveau de l'hélice D du CTD, va alors moduler le courant I_{Ks} par phosphorylation directe du canal KCNQ1 (Marx et al., 2002; Sanguinetti et al., 1991; Walsh and Kass, 1988). Yotiao (ou AKAP9), protéine d'ancrage de la PKA permet de rassembler le complexe KCNQ1-KCNE1 avec la PKA, la phosphatase PP1, la phosphodiesterase PDE4D3 et l'adénylate cyclase AC9 afin de réguler le courant I_{Ks} à la suite d'une stimulation β -adrénergique (Kurokawa et al., 2004; Li et al., 2012; Marx et al., 2002; Terrenoire et al., 2009). La phosphorylation de KCNQ1 par la PKA provoque un gain de fonction sur le courant I_{Ks} via une augmentation de la densité de courant, ainsi qu'un ralentissement de la cinétique de désactivation (Walsh and Kass, 1988). De façon intéressante, la présence de la protéine d'échafaudage yotiao est nécessaire à la fois pour la phosphorylation par la PKA d'un unique résidu au niveau de l'extrémité N-terminal, la sérine 27 (Marx et al., 2002), mais également pour traduire cette phosphorylation de KCNQ1 en gain de fonction sur son activité (Kurokawa et al., 2004).

Couplage PKA et KCNE1

La sous-unité β KCNE1 est également un acteur essentiel dans la régulation du canal par la phosphorylation PKA-dépendante. En effet, même si la phosphorylation de S27 par la PKA est observée en l'absence de l'expression de cette sous-unité β (Kurokawa et al., 2003; Marx et al., 2002), sa présence dans le complexe est néanmoins nécessaire à la transduction de la phosphorylation sur le gain de fonction du courant I_{Ks} (Kurokawa et al., 2003), mais les mécanismes impliqués restent à déterminer. Toutefois, une étude ayant utilisé la technique de FRET a révélé que l'interaction entre l'hélice C de KCNQ1 et le CTD de KCNE1 diminue la distance entre les extrémités N- et C-terminales de KCNQ1, suggérant que KCNE1 permet le transfert de la PKA du CTD de KCNQ1 (par son interaction avec yotiao) vers son extrémité N-terminale pour phosphoryler le résidu S27 (Haitin et al., 2009). Cette hypothèse a été renforcée par le fait que la proximité entre les extrémités C-terminales de KCNQ1 et de KCNE1 lors de l'ouverture du canal était annulée lorsque KCNE1 présente la mutation D76N, connue pour perturber les effets activateurs dépendant de l'AMPC (Haitin and Attali, 2008; Kurokawa et al., 2003).

En somme, ces résultats montrent que la modulation de l'activité de KCNQ1 par la phosphorylation dépendante de la PKA fait intervenir un complexe protéique localisé au niveau de son CTD, ainsi que la sous-unité KCNE1 qui régule des interactions essentielles pour la transduction de la phosphorylation en un gain de fonction sur le courant I_{Ks} .

I.4.1.2. PKC

Parmi les récepteurs aux catécholamines capables de réguler I_{Ks} , on trouve les récepteurs α -adrénergiques couplés aux petites protéines Gq/G11 qui activent la PLC. Comme expliqué précédemment, cette PLC hydrolyse le PIP_2 en IP_3 et DAG (Berridge, 1981), lequel va activer la protéine kinase C (PKC) capable de réguler dans le cœur l'activité de KCNQ1 (Walsh and Kass, 1991; Van Wagoner et al., 1996). En effet, des travaux ont montré que l'activation des récepteurs couplés aux protéines Gq régule le courant I_{Ks} mais de façon biphasique (Matavel and Lopes, 2009). La première phase correspond à une inhibition du canal provoquée par la diminution de la quantité PIP_2 suite à l'activation de la PLC, et la deuxième phase correspond à l'activation du canal KCNQ1 suite à la phosphorylation du canal par la PKC.

Couplage PLC/ PIP_2 /PKA

La réponse du courant potassique cardiaque I_{Ks} aux stimulations adrénégiques est donc complexe. En effet, la régulation du courant par les récepteurs β fait intervenir la phosphorylation PKA-dépendante qui est modulée par yotiao et KCNE1, et la régulation biphasique par les récepteurs α fait

intervenir la PLC et la phosphorylation PKC-dépendante. De plus, des travaux réalisés sur les ovocytes de xénopes ont montré qu'il existe un couplage réciproque entre la régulation de KCNQ1 par les récepteurs couplés aux protéines Gq/G11, comme les récepteurs M1, et la phosphorylation du canal par la PKA (Lopes et al., 2007; Matavel et al., 2010). Ainsi, une première étude a montré que l'inhibition du courant I_{Ks} par la stimulation des récepteurs α -adrénergiques M1 est diminuée lorsque la PKA est activée, et à l'inverse cette inhibition est potentialisée lorsque la PKA est bloquée (Lopes et al., 2007). Enfin, lorsque le site de phosphorylation de KCNQ1 par la PKA est supprimé, alors les effets de cette PKA sur l'inhibition du canal KCNQ1 par les récepteurs M1 sont annulés. Ces résultats suggèrent alors que la phosphorylation directe du canal par la PKA est responsable de l'atténuation des effets inhibiteurs des récepteurs α . Pour vérifier si les effets de la PKA passent par une modulation de la régulation du canal par le PIP_2 , les auteurs ont utilisé de la wortmannin, bloqueur de la PI4-kinase qui intervient dans la synthèse du PIP_2 . Ils ont alors observé que la PKA atténue l'inhibition de KCNQ1 par la wortmannin, de la même manière qu'elle atténue l'inhibition de KCNQ1 par les récepteurs M1. Tous ces résultats montrent donc que la PKA diminue la sensibilité du canal KCNQ1 aux variations de quantité de PIP_2 (par la PLC et par la wortmannin). Ainsi, la phosphorylation du canal KCNQ1 par la PKA semble augmenter l'affinité du canal pour le PIP_2 (**Figure 9**).

Une étude plus récente a testé des mutations sur 4 résidus de KCNQ1 supposés interagir avec le PIP_2 , deux situés sur le CTD (R366Q et R555C), un sur la boucle S2-S3 (R174C) et un sur B4-5 (R243C) (Matavel et al., 2010). Parmi ces mutations, seules celles situées dans le CTD augmentent la sensibilité du canal aux variations de quantité de PIP_2 , confirmant une diminution dans l'affinité de ces canaux mutés pour le PIP_2 . Le fait que la mutation R243C ne modifie pas la sensibilité du canal aux variations de PIP_2 est en contradiction avec un précédent travail ayant montré une augmentation de cette sensibilité du canal portant la mutation R243H (Park, 2005). Cette contradiction peut s'expliquer par une différence dans la nature du résidu substitué (cystéine dans un cas et histidine dans l'autre) ou par la différence d'approches expérimentales entre ces deux études (patch clamp en configuration cellule entière sur de l'ovocyte de xénope d'une part, et en configuration giant-patch sur COS-7 d'autre part). Dans cette étude de Matavel et de ses collaborateurs, les auteurs ont également montré que les canaux mutants R174C et R243C présentent une diminution de l'activation par la PKA et la PKC, alors que les canaux mutés sur le CTD présentent une augmentation de leur activation par ces kinases (Matavel et al., 2010). Ainsi, pour les mutants R366Q et R555C, la régulation du canal par le PIP_2 est potentialisée, suggérant que la PKA et la PKC activent le canal en renforçant l'interaction du canal KCNQ1 avec le PIP_2 .

Pour résumer, les voies de régulation de l'activité du courant I_{Ks} par la stimulation des récepteurs α - et β -adrénergiques semblent être couplées. Au centre de ce couplage on retrouve le PIP_2 dont la

quantité membranaire est diminuée par l'activation des récepteurs α via la PLC, mais dont l'interaction avec le canal est augmentée par la phosphorylation PKA-dépendante, diminuant ainsi l'inhibition de l'activité du canal par cette PLC. Pour ajouter plus de complexité à ce couplage dans les voies de signalisations, l'activation des récepteurs α va en plus augmenter l'affinité du canal pour le PIP_2 via la phosphorylation PKC-dépendante.

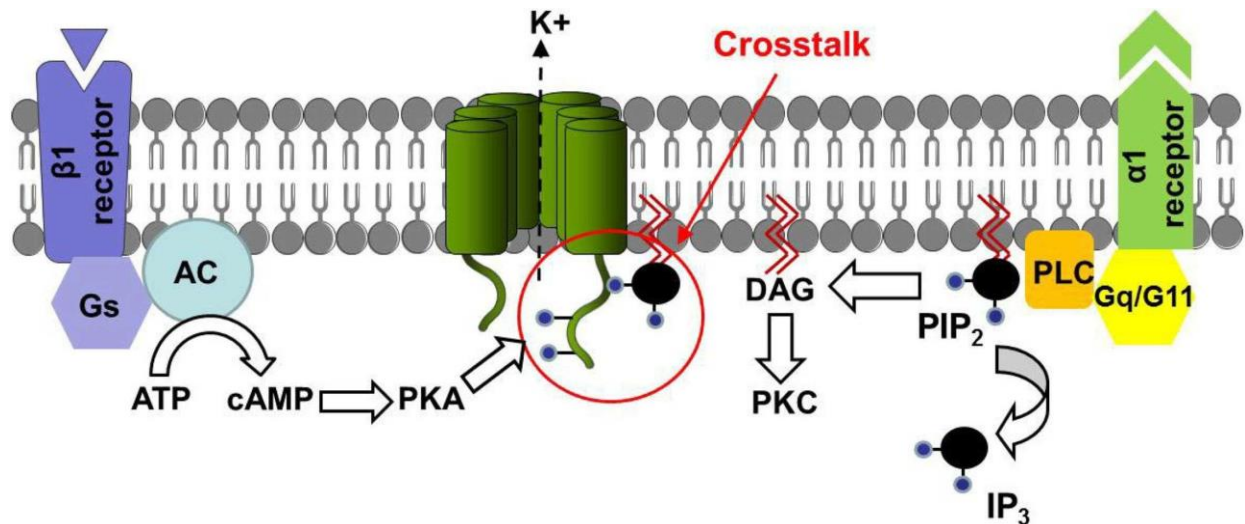


Figure 9 : Représentation schématique de la régulation de l'interaction canal- PIP_2 par la PKA.

Les récepteurs β 1-adrenergiques régulent l'interaction canal- PIP_2 par la phosphorylation PKA-dépendante, et par conséquent la modulation de l'activité du canal KCNQ1 par les protéines Gq/G11 couplées aux récepteurs α -adrenergiques. D'après Lopes et al., 2007.

1.4.2. Régulation par le Ca^{2+} et la calmoduline

La calmoduline (CaM) est une protéine cytosolique fixant le calcium (Ca^{2+}) qui appartient au complexe canalaire et module le courant I_{Ks} . Comme décrit précédemment (voir la partie 1.1.1), la CaM interagit avec la partie proximale du CTD de sorte qu'une protéine de CaM se fixe sur une sous-unité de KCNQ1 en interagissant avec les hélices A et B (Wiener et al., 2008). Même si la CaM ne joue pas un rôle direct dans l'oligomérisation de KCNQ1, sa présence est nécessaire pour un repliement conformationnel correct du CTD et l'adressage du canal à la membrane (Chen et al., 2009; Gamper et al., 2005; Ghosh et al., 2006; Shamgar et al., 2006; Yus-Najera et al., 2002; Wiener et al., 2008). En effet, en son absence, le canal est non fonctionnel et la partie C-terminal de KCNQ1 est insoluble, ce qui signifie que cette extrémité est instable en raison d'un mauvais repliement conformationnel du CTD.

De plus, il a été montré que la CaM élimine l'inactivation de KCNQ1 exprimé seul et ce de façon Ca^{2+} -dépendante (Ghosh et al., 2006). Ainsi, l'inactivation du canal semble dépendre de la concentration cytosolique en Ca^{2+} . En effet, Ghosh et ses collaborateurs ont montré que diminuer la concentration en Ca^{2+} intracellulaire en-dessous des concentrations physiologiques provoque une diminution de l'amplitude du courant ainsi qu'une augmentation de l'inactivation, ce dernier effet n'étant pas

retrouvé en présence de KCNE1. Le gain de fonction du canal se retrouve également sur ses propriétés d'activation, puisqu'une autre étude a révélé que lorsqu'elle est associée au Ca^{2+} , la CaM provoque un décalage de la courbe d'activation du courant I_{Ks} vers les potentiels plus négatifs (Shamgar et al., 2006). Enfin, une étude a suggéré que le site d'interaction du PIP_2 chevauche les sites d'interaction de la CaM que sont les (hélices A et B du CTD (Hernandez et al., 2008).

En somme, les différents régulateurs membranaires et cytosoliques du canal KCNQ1 peuvent avoir des effets cumulatifs, synergiques ou opposés. Ils peuvent partager des sites d'interactions ou augmenter l'affinité d'un autre régulateur pour le canal. La modulation de l'activité du courant potassique cardiaque I_{Ks} par ses régulateurs membranaires et cytosoliques est donc complexe et souvent soumise à controverse. L'utilisation de modèles plus intégrés se rapprochant au plus près de la physiologie des cardiomyocytes telles que les hiPSC-CM permettrait de préciser ces mécanismes de régulation. De plus, des études fonctionnelles sur des hiPSC-CM issues de patient atteint de troubles du rythme congénitaux constitueraient un plus dans la compréhension des déterminants moléculaires responsables des dérégulations du courant I_{Ks} . En effet, comme nous allons le voir par la suite, des altérations de la modulation du courant I_{Ks} par ses régulateurs sont à l'origine de nombreuses pathologies cardiaques héréditaires.

I.5. Troubles du rythme cardiaque associés à I_{Ks}

Comme expliqué au début de cette introduction sur le canal KCNQ1, la contribution du courant I_{Ks} porté par le complexe KCNQ1-KCNE1 dans la phase de repolarisation du PA cardiaque est faible dans des conditions physiologiques basales. Cependant, dans des conditions à risque, I_{Ks} assure une « réserve de repolarisation » prévenant ainsi un allongement excessif de la durée du PA et le développement de troubles du rythmes, notamment lorsque I_{Kr} est bloqué (Jost, 2005; Jurkiewicz and Sanguinetti, 1993; Lengyel et al., 2001; Sanguinetti et al., 1996; Silva and Rudy, 2005; Varro et al., 2000). Ainsi, des mutations dans les sous-unités KCNQ1 et KCNE1 qui modifient l'activité du courant I_{Ks} vont être à l'origine de pathologies cardiaques graves. A l'heure actuelle, plus de 300 mutations dans le gène codant pour KCNQ1 et au moins 40 mutations dans le gène codant pour KCNE1 ont été identifiées (Napolitano et al.). La majorité de ces mutations provoquent une perte de fonction du canal à l'origine du syndrome du QT long (en anglais : LQTS pour long QT syndrome), et seulement quelques mutations provoquent un gain de fonction du canal et sont à l'origine de fibrillation auriculaire (FA) ou du syndrome du QT court (en anglais : SQTS pour short QT syndrome).

1.5.1. Mutations gain-de-fonction

1.5.1.1. La fibrillation auriculaire

La fibrillation auriculaire est caractérisée par une activation rapide et irrégulière du tissu atrial. Cette pathologie est couramment associée au vieillissement et est le reflet de troubles cardiovasculaires. Cependant, dans 10 à 30% des cas, cette pathologie est d'origine génétique et liée à des mutations dans les canaux ioniques (Mahida et al., 2011). De nombreuses mutations dans le gène codant pour KCNQ1, provoquant un gain de fonction du courant I_{Ks} , ont été identifiées comme étant à l'origine de la forme familiale de la fibrillation auriculaire (Bartos et al., 2011; 2013; Chen, 2003; Das et al., 2009; Hasegawa et al., 2014; Henrion et al., 2012; Hong et al., 2005; Ki et al., 2014; Lundby et al., 2007). Ces mutations affectent les propriétés d'ouverture-fermeture de la porte d'activation, ce qui n'est pas surprenant puisque la plupart de ces mutations sont situées dans le domaine voltage-sensor de KCNQ1. Les mutations S140G et V141M situées dans le segment S1 ont été étudiées en détail, et de nombreux travaux se sont intéressés aux mécanismes moléculaires responsables du gain de fonction. Tout d'abord, il a été décrit que ces mutations sont responsables d'un courant potassique instantané, constitutivement actif en présence de KCNE1 (Chen, 2003; Hong et al., 2005). Par la suite, des travaux ont révélé que ces canaux mutés présentent un ralentissement extrême de leur cinétique de désactivation ainsi qu'un décalage vers les potentiels plus négatifs de la dépendance au potentiel de leur activation (Chan et al., 2012; Restier et al., 2008). Plus précisément, il a été suggéré que les résidus S140 et V141 du segment S1 se trouvent à proximité des résidus E160 du S2 et R237 du S4. Or, ces résidus du S2 et S4 sont capables de former un pont salin qui favorise l'état ouvert du canal, et cette interaction est stabilisée par KCNE1 (Restier et al., 2008; Van Horn et al., 2011). Ainsi, les mutations S140G et V141M pourraient favoriser cette interaction, et ce de façon dépendante de KCNE1, et donc stabiliser anormalement l'ouverture du canal.

En somme, des mutations à l'origine d'un gain de fonction du canal KCNQ1 vont provoquer un raccourcissement de la durée du PA auriculaire à l'origine de FA. Cependant, KCNQ1 est également exprimé dans les ventricules, ainsi ce type de mutation devrait aussi entraîner un raccourcissement du PA ventriculaire. En effet, avant que des études fonctionnelles associent la mutation V141M à la fibrillation auriculaire, cette mutation a été identifiée chez un patient présentant un raccourcissement de l'intervalle QT à l'électrocardiogramme (ECG), témoin d'un PA ventriculaire raccourci (voir ci-dessous, **Figure 10** et Hong et al., 2005).

I.5.1.2. Le syndrome du QT court

Le syndrome du QT court est une pathologie cardiaque identifiée récemment, caractérisée par un raccourcissement de l'intervalle de temps entre l'initiation du complexe QRS et la fin de l'onde T (correspondant à la dépolarisation et à la repolarisation ventriculaire, respectivement) observable sur un tracé ECG (**Figure 10**). Comme expliqué précédemment, des mutations gain-de-fonction du canal KCNQ1 entraînent une accélération de la repolarisation ventriculaire qui sont à l'origine d'un risque élevé d'arythmies et de mort subite (Gussak et al., 2000). A l'heure actuelle, deux mutations dans le gène codant pour KCNQ1 (V141M et V307L) ont été identifiées chez des patients présentant un SQTS. En ce qui concerne la mutation V307L, localisée au niveau du pore, le gain de fonction est dû à une accélération des cinétiques d'activation et à un décalage de l'activation vers des potentiels plus négatifs du courant I_{Ks} (Bellocq et al., 2004). Citée précédemment, la mutation V141M, en plus d'induire des FA, provoque un raccourcissement de l'intervalle QT (Hong et al., 2005). Les modifications des propriétés biophysiques du canal sont similaires pour les mutations S140G et V141M, cependant la différence phénotypique sur la durée de l'intervalle QT entre les patients porteur de ces deux mutations reste indéterminée. Néanmoins, un travail récent a montré que ces deux résidus, malgré leur proximité, interagissent différemment avec KCNE1 ce qui pourrait expliquer cette différence phénotypique (Restier et al., 2008). Dans cette étude, une approche de cross-linking a suggéré que le résidu V141, contrairement au résidu S140, est proche et fait face aux résidus E43 et A44 de KCNE1, ce qui expliquerait qu'à l'inverse de la mutation S140G, aucun effet de la mutation V141M ne soit observable sur l'activité du canal en absence de KCNE1 (Restier et al., 2008).

En somme, les mutations gain-de-fonction du canal KCNQ1 vont conduire à une réduction de la durée du PA auriculaire, ventriculaire ou les deux, conduisant respectivement à une FA, un SQTS ou à un phénotype mixte. De façon plus surprenante, il a été observé que certaines mutations de KCNQ1, Q147R et R231C, responsables d'une FA induisent également sous certaines conditions un allongement de l'intervalle QT, révélateur d'une perte de fonction du canal KCNQ1 (Bartos et al., 2011; Lundby et al., 2007). De plus, des différences phénotypiques ont également été observées chez des patients porteurs de la même mutation S140G, puisque certains d'entre eux présentent un QT allongé (Chen, 2003). Il apparaît de plus en plus qu'une seule mutation dans un canal ionique ne suffise pas à expliquer une pathologie, il faut prendre en compte l'ensemble des mécanismes de régulation du canal qui peuvent être variables d'un individu à l'autre et donc moduler différemment l'expression phénotypique d'une mutation. Ces observations soulèvent alors l'importance d'effectuer les analyses fonctionnelles des pathologies cardiaques dans des cardiomyocytes humains comme les hiPSC-CM.

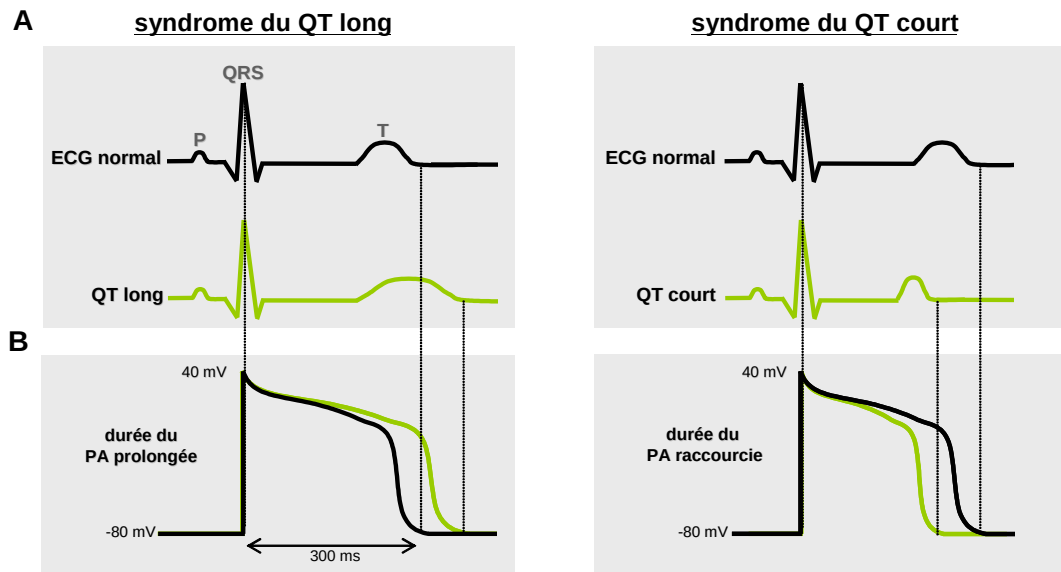


Figure 10 : Electrocardiogrammes (ECG) et potentiels d'action (PA) ventriculaires dans les syndromes du QT long (LQTS) et du QT court (SQTS).

(A) Représentation schématique des ECG chez un individu sain (traces noires), et des patients atteints du LQTS ou du SQTS (traces vertes, respectivement à gauche et à droite). (B) Représentation schématique du PA ventriculaire avec un prolongement ou raccourcissement de la repolarisation selon qu'il s'agit du LQTS ou du SQTS (traces vertes), par rapport à la condition normale (traces noires).

1.5.2. Mutations perte-de-fonction : le syndrome du QT long

Le syndrome du QT long est une canalopathie caractérisée par un retard de la repolarisation ventriculaire, qui se traduit par un allongement de l'intervalle QT à l'ECG (**Figure 10**), et est associé à des épisodes de syncopes et un risque élevé de mort subite (Moss et al., 1985). A l'heure actuelle, 14 gènes ont été identifiés comme étant mutés chez des patients atteints de la forme familiale du SQT (Tableau I ; Amin et al., 2009). Plus de 300 mutations dans le gène codant pour le canal KCNQ1 sont responsables du LQTS de type 1 (LQT1 ; Napolitano et al.), qui est la forme la plus répandue, retrouvée chez environ la moitié des patients génotypés. Le LQT1 est causé par des mutations perte-de-fonction du canal KCNQ1 qui entraînent une modification de son activité *via* un défaut de trafic membranaire, d'assemblage ou de régulation (Peroz et al., 2008). Les études fonctionnelles de ces mutations révèlent qu'un grand nombre d'entre elles modifient la dépendance au potentiel du courant I_{Ks} . Ces mutations induisent le plus souvent un décalage de la courbe d'activation vers les potentiels plus positifs, un ralentissement de la cinétique d'activation et/ou une accélération de la cinétique de désactivation. Pour certaines de ces mutations, un mécanisme moléculaire permet d'expliquer les modifications des propriétés biophysiques : altération de l'interaction du canal avec le PIP_2 (Park, 2005), avec la protéine yotiao diminuant la phosphorylation PKA-dépendante ou encore avec la CaM (Ghosh et al., 2006; Shamgar et al., 2006).

Tableau I : Les différentes formes du syndrome du QT long et les gènes associés.

Type	Gène	Protéine	Courant ionique affecté	Incidence (en %)	Références
1	<i>KCNQ1</i>	K _v 7.1	PdF I _{Ks}	42-54	(Wang et al., 1996b)
2	<i>KCNH2</i>	K _v 11.1	PdF I _{Kr}	35-45	(Curran et al., 1995; Sanguinetti et al., 1995)
3	<i>SCN5A</i>	Na _v 1.5	GdF I _{NaL}	1,7-8	(Wang et al., 1995)
4	<i>ANK2</i>	Ankyrine-B	Aucun, protéine adaptrice	<1	(Mohler et al., 2003)
5	<i>KCNE1</i>	minK	PdF I _{Ks}	<1	(Barhanin et al., 1996; Sanguinetti et al., 1996)
6	<i>KCNE2</i>	MiRP1	PdF I _{Kr}	<1	(Abbott et al., 1999)
7	<i>KCNJ2</i>	Kir2.1	PdF I _{K1}	Rare	(Plaster et al., 2001)
8	<i>CACNA1C</i>	Ca _v 1.2	GdF I _{Ca,L}	Rare	(Splawski et al., 2004)
9	<i>CAV3</i>	Cavéoline-3	GdF I _{NaL}	Rare	(Vatta et al., 2006)
10	<i>SCN4B</i>	Na _v β4	GdF I _{NaL}	<1	(Medeiros-Domingo et al., 2007)
11	<i>AKAP9</i>	Yotiao	PdF I _{Ks}	Rare	(Chen et al., 2007b)
12	<i>SNTA1</i>	Syntrophine-α1	GdF I _{NaL}	Rare	(Ueda et al., 2008)
13	<i>KCNJ5</i>	Kir3.4	PdF I _{KACH}	Rare	(Yang et al., 2010)
14	<i>CALM</i>	Calmoduline	Défaut dans la signalisation du Ca ²⁺	Rare	(Crotti et al., 2013)

GdF : gain de fonction ; PdF : perte de fonction.

Malgré tout, la corrélation entre les effets de la mutation sur les propriétés biophysiques du canal et la sévérité du phénotype n'est pas toujours claire. Deux mutations, R539W et R555C, impliquées respectivement dans des cas de mort subites et une forme fruste du LQT1, illustrent parfaitement cette difficulté (Chouabe et al., 2000; Donger et al., 1997). Ces deux mutations sont localisées au niveau du CTD, elles affectent toutes les deux des arginines, les canaux mutés présentent les mêmes propriétés biophysiques et la même diminution d'affinité pour le PIP₂ par rapport au canal sauvage (Park, 2005). De plus, ce travail a révélé que le canal mutant R539W était paradoxalement moins sensible à une diminution de la quantité de PIP₂ que le canal KCNQ1 sauvage, suggérant que la mutation R539W provoque une stabilisation partielle du canal KCNQ1 à l'état ouvert. Ainsi, **mon premier projet de thèse a consisté à déterminer les mécanismes moléculaires qui, indépendamment du PIP₂, provoquent cette stabilisation partielle du canal mutant R539W à l'état ouvert.**

II. Le canal sodique cardiaque dépendant du potentiel $\text{Na}_v1.5$

II.1. Structure du canal $\text{Na}_v1.5$

$\text{Na}_v1.5$ appartient à la famille des canaux Na^+ dépendants du potentiel (Na_v) qui comprend dix membres ($\text{Na}_v1.1$ à 1.9 , et $\text{Na}_v2.1$), et c'est la principale sous-unité α des canaux Na^+ exprimée au niveau du tissu cardiaque. Plus précisément, le canal $\text{Na}_v1.5$ est retrouvé dans les cardiomyocytes auriculaires et ventriculaires, ainsi que dans les fibres de Purkinje où il est préférentiellement localisé au niveau des disques intercalaires, du sarcolemme et des tubules T (Brette and Orchard, 2006; Scriven et al., 2000). Dans une moindre mesure, ce canal est également retrouvé dans le nœud sino-atrial et dans le nœud auriculo-ventriculaire (Lei et al., 2005; Mangoni and Nargeot, 2008). Bien que ce canal soit majoritairement exprimé au niveau du cœur, $\text{Na}_v1.5$ a également été identifié dans d'autres cellules excitables localisées dans le cerveau, le muscle squelettique au stade néonatal ou lors de myopathies, et le muscle lisse gastro-intestinal (Catterall et al., 2005; Mazzone et al., 2008; Wang et al., 1996c). Enfin, et de façon plus inattendue, le canal $\text{Na}_v1.5$ est également exprimé, et semblerait jouer un rôle fonctionnel majeur dans des types cellulaires traditionnellement considérés comme non-excitables tels que les cellules mammaires cancéreuses, les astrocytes ou certaines cellules du système immunitaire (Black and Waxman, 2013).

$\text{Na}_v1.5$ est constitué de quatre domaines (DI à DIV) homologues mais non identiques, reliés entre eux par des boucles intracellulaires (**Figure 11A**). Tout comme la sous-unité α du canal potassique KCNQ1, chacun de ces domaines est composé de six segments transmembranaires formés d'un domaine « voltage-sensor » (S1 à S4) avec un segment S4 chargé positivement, et un domaine pore formé des segments S5 et S6 reliés entre eux par une grande boucle réentrante (boucle P).

Tout comme le canal potassique cardiaque KCNQ1, le segment S4 de $\text{Na}_v1.5$ est impliqué dans la dépendance au potentiel de l'activation du canal. $\text{Na}_v1.5$ présente également une porte d'inactivation formée et stabilisée par l'interaction entre la boucle intracellulaire reliant les domaines DIII et DIV (IDIII-IV), et le domaine C-terminal (CTD) (Motoike, 2004). Lorsque la membrane d'un cardiomyocyte est au potentiel de repos, le canal sodique est fermé et seule la porte d'inactivation (i) est ouverte (**Figure 11B**). Suite à une stimulation du cardiomyocyte, la porte d'activation (a) s'ouvre et, simultanément, la porte i se referme : le canal est inactivé (Balser, 2001; Kühn and Greeff, 1999). Cependant, comme cette inactivation est légèrement plus lente que la cinétique d'activation, les canaux restent ouverts transitoirement pour conduire le courant Na^+ (I_{Na}) cardiaque, responsable de la phase de dépolarisation rapide du PA cardiaque (phase 0, **Figure 1**). Durant la phase de repolarisation du PA, le canal passe par un état fermé-inactivé où la porte d'activation se referme (transition 5, **Figure 11**), puis le retour du

potentiel membranaire vers sa valeur de repos favorise la levée d'inactivation du courant I_{Na} (ouverture de la porte i , transition 6), et une nouvelle activation du courant est alors possible. $Na_v1.5$ contrôle ainsi la propagation du potentiel d'action cardiaque et, de par la présence de cette porte d'inactivation dont la réouverture est dépendante du temps, la durée de la période réfractaire. Une faible proportion de canaux $Na_v1.5$ s'inactivent cependant plus lentement, ce qui est responsable d'un courant sodique persistant au cours du PA, courant appelé I_{NaL} , et contrôle ainsi la forme et la durée du PA.

Ainsi $Na_v1.5$ possède une porte d'activation et une porte d'inactivation pour lesquelles des modifications de leur activité peuvent avoir un impact majeur sur la forme, la durée et la propagation du PA cardiaque. La détermination des mécanismes moléculaires impliqués dans les processus d'activation et d'inactivation semble donc essentielle pour le traitement des troubles du rythme cardiaque impliquant le canal $Na_v1.5$.

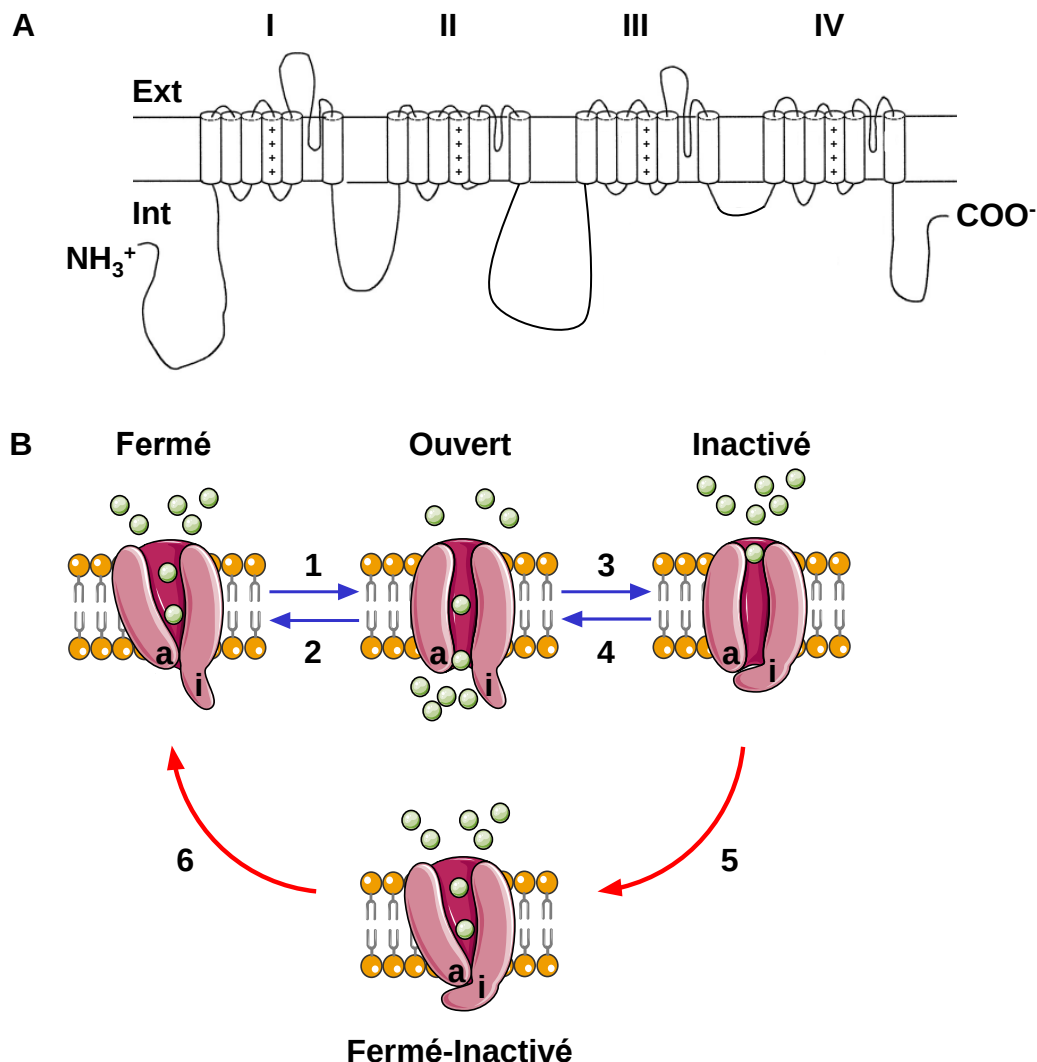


Figure 11 : Représentations schématiques de la structure et du fonctionnement du canal $Na_v1.5$.

(A) Schéma représentant les domaines composant la sous-unité α $Na_v1.5$. (B) Représentation schématique des états que peut adopter $Na_v1.5$ en fonction de la position des portes d'activation (a) et d'inactivation (i), ainsi que les transitions possibles (1 à 6) permettant de passer d'un état à l'autre au cours d'une dépolarisation (flèches bleues) et d'une repolarisation membranaire (flèches rouges).

II.2. Mécanismes d'activation du canal Na_v1.5

L'ouverture du canal Na_v1.5, comme tous les canaux dépendants du potentiel, dépend du potentiel membranaire. Ainsi, suite à une dépolarisation membranaire, les segments S4 du voltage-sensor vont se déplacer dans la membrane et conduire à l'ouverture du canal. Tout comme le canal KCNQ1, nous manquons d'éléments pour comprendre en détail les mécanismes moléculaires sous-jacents (voir les paragraphes portant sur le mouvement du voltage-sensor et le couplage entre le voltage-sensor et l'ouverture du canal dans la partie I.2 de l'introduction générale). Environ la moitié de la quantité de Na⁺ total qui entre dans un cardiomyocyte se produit pendant la phase de dépolarisation du PA, lorsque les canaux Na_v s'ouvrent (Makielski and Farley, 2006; Sheu and Lederer, 1985).

L'activation de Na_v1.5 provoque un pic de courant sodique I_{Na} qui atteint son maximum rapidement, en moins d'une milliseconde (ms), puis s'inactive plus lentement suivant un décours multi-exponentiel (Makielski et al., 1987; Maltsev and Undrovinas, 2006; Murray et al., 1990). Les estimations sur la densité de canaux sodiques exprimés à la surface cellulaire et contribuant au courant I_{Na} durant le PA sont variables, allant de 10 à 15 canaux par μm² pour des cardiomyocytes ventriculaires de rat (Brette and Orchard, 2006; Sheldon et al., 1986), à 260/μm² dans les fibres de Purkinje de chien (Makielski et al., 1987). Dans cette dernière étude, les auteurs ont montré que seulement 67 canaux par μm² (26%) contribuent au pic de courant I_{Na}, suggérant que de nombreux canaux ne sont pas ouverts au moment du pic de courant sodique. Ainsi, certains canaux Na_v1.5 peuvent s'ouvrir avant ou après le pic, d'autres peuvent s'inactiver durant la dépolarisation et donc ne s'ouvrent pas, ou encore certains peuvent se trouver à l'état inactivé au potentiel de repos.

II.3. Mécanismes d'inactivation du canal Na_v1.5

Il existe plusieurs types d'inactivations du courant I_{Na}, l'inactivation rapide (en anglais : I_{fast} pour fast inactivation), l'inactivation intermédiaire (en anglais : I_{IM} pour intermediate inactivation) et l'inactivation lente (en anglais : I_{slow} pour slow inactivation), voire ultra-lente (en anglais : I_{US} pour ultra-slow inactivation), qui se différencient de par leurs cinétiques. L'inactivation rapide des canaux sodiques dépendants du potentiel est couplée au mouvement des S4 lors de l'activation, et de nombreux travaux ont suggéré l'implication du S4 des domaines DIII et DIV dans l'initiation de l'inactivation rapide (Eaholtz et al., 1994; Kellenberger et al., 1996; 1997; Lou et al., 2004; McPhee et al., 1998; Smith and Goldin, 1997; Stühmer et al., 1989; Vassilev et al., 1988; 1989; West et al., 1992). Suite au déplacement de ces S4, le motif IFM constitué des résidus isoleucine, phénylalanine et méthionine situés dans l'interdomaine IDIII-IV (en position 1485-1487), va venir obstruer le pore en interagissant avec des

résidus des boucles B4-5 des domaines DIII et DIV(Balser, 2001). Cette boucle IDIII-IV va également interagir avec le CTD, stabilisant ainsi l'inactivation(Motoike, 2004; Potet et al., 2009).

Dans la suite de ce manuscrit, les termes « stabiliser » et « déstabiliser » vont être utilisés pour décrire à la fois les propriétés de dépendance au potentiel de l'inactivation et l'état de la porte d'inactivation. Lorsqu'il s'agit de la dépendance au potentiel de la courbe d'inactivation, le terme « stabiliser » est utilisé pour décrire un décalage de cette courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs, et à l'inverse le terme « déstabiliser » décrit un décalage de cette courbe vers des potentiels dépolarisants. Lorsqu'il s'agit de décrire l'état dans lequel se trouve la porte d'inactivation, le terme « déstabiliser » fait référence à un état inactivé instable et donc susceptible d'induire des phénomènes de réouverture du canal à l'origine du courant persistant (décrit dans la partie suivante).

L'inactivation apparaît environ 2-10 ms après le début de l'activation du canal, et la cinétique de levée d'inactivation est également rapide ($\tau < 10$ ms) aux potentiels membranaires négatifs. Lorsque la dépolarisation membranaire se prolonge, de la dizaine à la centaine de ms, les canaux $\text{Na}_v1.5$ entrent progressivement en inactivation intermédiaire, et par conséquent cette I_{IM} se lève plus lentement(Kambouris et al., 1998). Enfin I_{slow} et I_{US} se produisent respectivement au-delà de plusieurs centaines de millisecondes et plusieurs secondes de dépolarisation membranaire, et la constante τ pour lever ces inactivations est de l'ordre de la seconde(Bers, 2011; Rudy, 1978). Contrairement à I_{fast} , les mécanismes moléculaires responsables de ces inactivations plus lentes restent méconnus. Cependant, différentes études ont suggéré, grâce à des approches de mutagénèse et de construction de chimère, que la boucle P joue un rôle essentiel dans ces inactivations lentes(Balser et al., 1996; Bénitah et al., 1999; Todt et al., 1999; Vilin et al., 1999).

II.4. Courant sodique persistant

Après la phase de dépolarisation du PA cardiaque déclenchée par l'activation des canaux $\text{Na}_v1.5$, ceux-ci sont pour la plupart inactivés au cours de la phase de plateau (phase 2 du PA), et ce pendant plusieurs centaines de ms. Cependant, bien qu'une majorité des canaux sodiques dépendants du potentiel s'inactivent rapidement (I_{fast}) et restent inactivés durant cette phase du PA cardiaque, quelques canaux peuvent s'ouvrir à nouveau, provoquant un courant de faible amplitude, appelé courant Na^+ persistant (en anglais : I_{NaL} pour late Na^+ current). Dans la suite de ce manuscrit, les termes « persistant », « tardif » et « retardé » seront utilisés de façon interchangeable pour désigner ce courant I_{NaL} . L'amplitude du courant tardif est faible, en effet des études réalisées sur des cardiomyocytes isolés de ventricule gauche de rat(Patlak and Ortiz, 1985), de cochon d'inde(Kiyosue and Arita, 1989) et d'humain(Maltsev and Undrovinas, 2006), ont révélé que son amplitude représente moins de 0,1% de

l'amplitude du courant I_{Na} au pic. Malgré tout, les influx de Na^+ associés au pic de I_{Na} et à I_{NaL} sont comparables, puisque ce dernier perdure pendant toute la phase de plateau du PA cardiaque (Makielski and Farley, 2006; Sheu and Lederer, 1985). Ainsi, la moindre augmentation de I_{NaL} a des graves conséquences sur le profil du PA. Il existe différentes théories pour expliquer l'origine moléculaire du courant sodique persistant ; la partie qui va suivre présente les trois grandes théories pouvant expliquer l'origine de ce courant I_{NaL} . Puisque la sensibilité du courant I_{NaL} aux médicaments semble varier d'une théorie à l'autre (Belardinelli et al., 2006; Ravens et al., 2004), la compréhension des mécanismes impliqués dans ce courant sodique retardé est une étape essentielle au développement de nouvelles molécules empêchant les troubles du rythmes.

II.4.1. La théorie du ralentissement/échec de l'inactivation

La principale théorie pouvant expliquer l'existence de ce courant sodique retardé est un ralentissement ou un échec de l'inactivation. Ce mécanisme serait responsable de la majorité du courant I_{NaL} au cours de la phase de plateau du PA, et il serait provoqué soit par la réouverture des canaux entrés en inactivation rapide (transition 4, **Figure 12A**), soit par des alternances entre les états ouvert et fermé (transitions 1 et 2, **Figure 12A**) (Kunze et al., 1985; Maltsev and Undrovinas, 2006; Patlak and Ortiz, 1985). En effet, la transition de l'état inactivé à l'état fermé est causée par la repolarisation, mais lorsque la dépolarisation est prolongée, l'ouverture du canal peut être suivie par plusieurs réouvertures.

Une approche de patch sur canal unitaire dans des cardiomyocytes ventriculaires humains a révélé que le canal $Na_v1.5$ peut présenter différents types d'activités (Maltsev and Undrovinas, 2006). Les auteurs ont alors utilisé des modèles mathématiques pour décrire trois modes de fonctionnement pour le canal $Na_v1.5$: le mode transitoire (TM), le mode « Burst » (BM) et le mode dispersé tardif (en anglais : LSM pour late scattered mode ; **Figures 12B et 12C**).

- Le mode transitoire dure moins de 40 ms et correspond à une première ouverture du canal suivie de 5 à 10 réouvertures rapides, provoquées par des transitions successives entre l'état ouvert et l'état inactivé (ouverture-fermeture de la porte d'inactivation, ou transitions 3 et 4, **Figures 12A et 12B**). La contribution du courant sodique par les canaux présentant ce mode TM serait d'environ 90% au moment du pic de I_{Na} , mais seulement 10% de l'amplitude du I_{Na} moins de 3 ms après le pic, et moins de 1% 20 ms après le pic (**Figure 12C**). Ainsi ce mode d'activité du canal $Na_v1.5$ peut expliquer la phase transitoire du I_{Na} , de 0 à 5 ms, mais ne peut pas expliquer la composante tardive du courant durant la phase de plateau.

- Le deuxième mode décrit par Maltsev et Undrovinas est le mode « Burst » qui correspond à des alternances rapides entre les états ouverts et fermés (ouverture-fermeture de la porte d'activation, ou

transitions 1 et 2, **Figure 12A et B**), séparés par des états inactivés plus longs (ouverture-fermeture de la porte d'inactivation, ou transition 3 et 4, **Figures 12A et 12B**). Ce mode est responsable d'une activité du canal $\text{Na}_v1.5$ qui perdure de 100 à 300 ms après le début de la dépolarisation. Cependant, puisque la proportion de canaux sodiques présentant cette activité BM est très faible ($\approx 0,2\%$), sa contribution au pic de I_{Na} et juste après (2-5 ms) serait très faible (**Figure 12C**). En revanche, lorsque la proportion de canaux présentant le mode d'activité transitoire TM diminue après le pic de courant I_{Na} , la contribution relative des canaux présentant cette activité BM dans le courant sodique peut augmenter jusqu'à 50%. Au-delà de 40 ms, le courant issu de l'activité des canaux présentant le BM décline, au profit du courant issu des canaux utilisant le troisième mode d'activité.

- Le mode d'activité dispersé tardif est comparable à l'activité TM, à la différence que l'activité LSM présente un ralentissement dans la cinétique de transition de l'état inactivé vers l'état ouvert (transition 4, **Figures 12A**). Ainsi, l'alternance entre ces deux états est ralentie, et les états ouverts du canal sont plus dispersés (**Figure 12B**). Ce mode de fonctionnement du canal est caractérisé par des réouvertures dispersées dans le temps et ce sur une période prolongée, allant de 500 à 1000 ms (**Figure 12C**).

L'implication de ces trois différents modes d'activité du canal $\text{Na}_v1.5$ évolue de manière dynamique au cours du PA cardiaque. La différence dans la durée de l'activité des canaux $\text{Na}_v1.5$ entre ces trois modes réside dans la facilité pour laquelle les canaux vont entrer en inactivation profonde (transition 5, **Figure 12A**). En effet, comme cette inactivation profonde ne peut se lever qu'avec une repolarisation membranaire (transition 6, **Figure 12A**), contrairement à l'état inactivé qui est réversible, la transition de l'état inactivé à l'état inactivé-profond (transition 5) est l'étape limitante qui détermine la période durant laquelle les canaux peuvent se ré-ouvrir. En d'autres termes, Maltsev et Undrovinas ont proposé dans leur modèle que cette transition finale (transition 5) serait facilitée dans le mode d'activité le plus court, TM, et à l'inverse cette transition serait plus difficile dans le mode LSM. L'inactivation en deux temps avait été proposée auparavant par Dumaine et ses collaborateurs (Dumaine et al., 1996). Ils avaient alors proposé que la première étape de l'inactivation (transition 3) serait provoquée par une liaison réversible entre le motif IFM et ses récepteurs (constitués des résidus des boucles B4-5 des domaines DIII et DIV (Balser, 2001) et du CTDMotoike, 2004; Potet et al., 2009), et que la deuxième étape correspondrait à une stabilisation de cette liaison entraînant le canal dans un état d'inactivation plus profonde (transition 5).

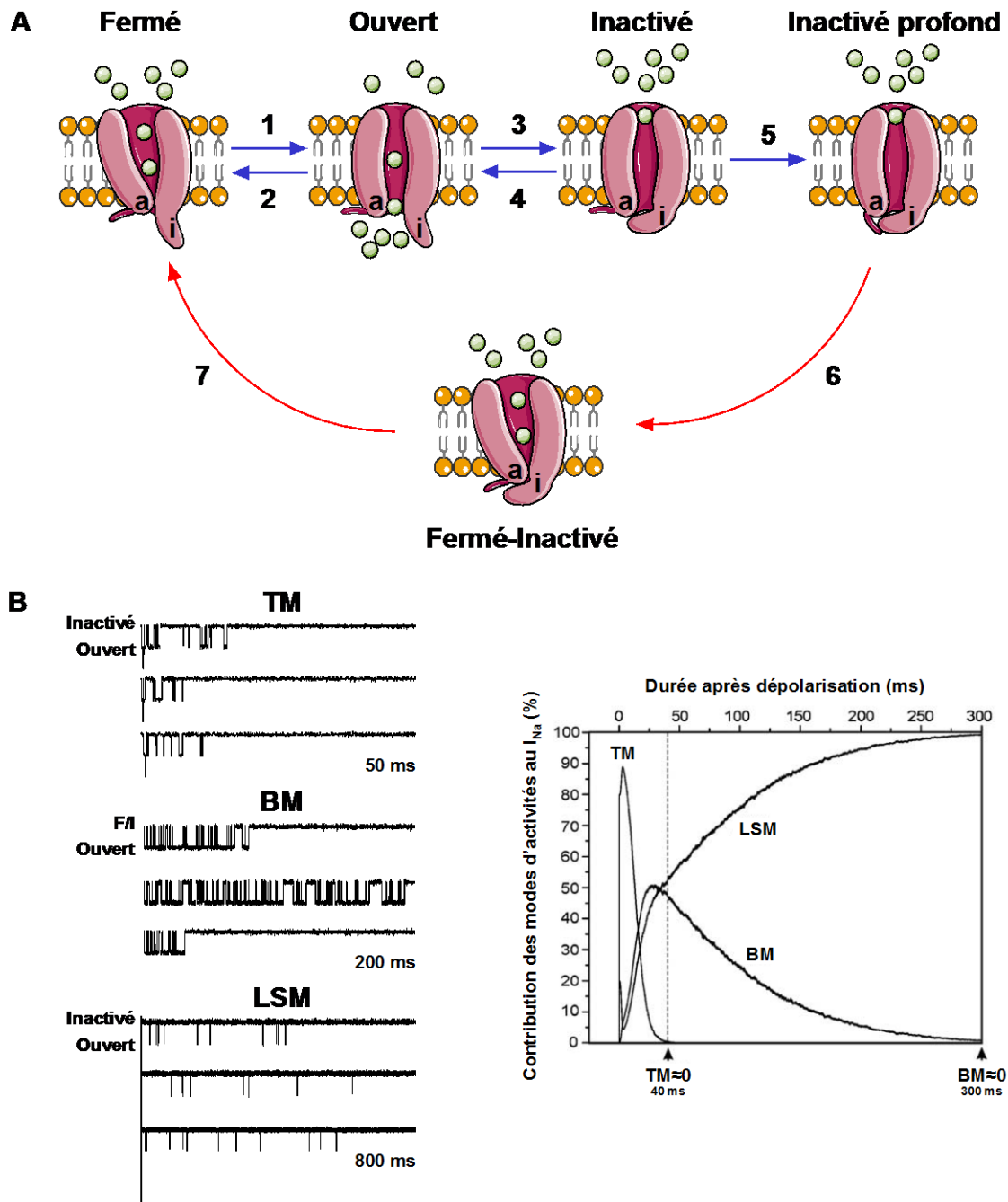


Figure 12 : Représentation schématique et illustration des trois modes d'activités du canal $\text{Na}_v1.5$ pouvant expliquer le mécanisme de ralentissement/échec de l'inactivation à l'origine du courant I_{NaL} .

(A) Schéma représentant les états que peut adopter $\text{Na}_v1.5$, similaire à celui de la Figure 11 mais avec un état inactivé-profond supplémentaire. **(B)** Pour chaque mode sont représentés trois traces simulées pendant les durées indiquées (50, 200 et 800 ms), obtenues à partir du modèle mathématique de Maltsev et ses collaborateurs. Les trois modes présentent les transitions entre les états ouvert et inactivé (I), mais le mode « burst » effectue également des transitions de l'état ouvert à l'état fermé (F). **(C)** Figure représentant la contribution au courant total I_{Na} prédit par le modèle de ces trois modes de fonctionnement de $\text{Na}_v1.5$ au cours d'une dépolarisation de 300ms. D'après Maltsev and Undrovinas, 2006.

II.4.2. La théorie de la réouverture en condition de non-équilibre

La deuxième théorie décrite pour expliquer la genèse d'un courant sodique retardé est une réouverture du canal, provoquée par une levée d'inactivation qui est facilitée grâce à une repolarisation

progressive (condition de non-équilibre). Dans les cardiomyocytes, les canaux $\text{Na}_v1.5$ sont soumis à des variations dynamiques de potentiel membranaire au cours du PA cardiaque. Clancy et ses collaborateurs ont utilisé un protocole de stimulation mimant la repolarisation d'un PA, le protocole de rampe négative (**Figure 13A**) : une dépolarisation à +20mV pendant 100 ms permet aux canaux de s'activer, puis d'entrer en inactivation profonde (voir paragraphe précédent), et la repolarisation progressive jusqu'au potentiel de repos (-100 mV) permet la levée d'inactivation (Clancy et al., 2003). Un autre travail a validé cette hypothèse d'une augmentation du courant I_{NaL} dans des conditions de non-équilibre en montrant que la probabilité d'ouverture du canal $\text{Na}_v1.5$ est augmentée pendant un protocole de rampe comparé à un protocole de stimulation rectangulaire (Magyar et al., 2004). Enfin, une étude plus récente a montré que la stimulation des cardiomyocytes ventriculaires de cochon d'inde avec un protocole mimant la forme d'un PA (en anglais : action potential-clamp ; **Figure 13B**) permet l'enregistrement de courant I_{NaL} d'une amplitude similaire à celle de chacun des courants potassiques repolarisants (Horvath et al., 2013). Ainsi, selon ce concept de fonctionnement du canal à l'état de non-équilibre, la levée d'inactivation des canaux $\text{Na}_v1.5$ serait modulée par un changement dynamique de potentiel, et la probabilité de réouverture des canaux serait augmentée durant une repolarisation membranaire progressive. Ainsi, les cinétiques de transition de changement d'état d'un canal dépendant du potentiel peuvent être modulées par l'historique des potentiels auxquels il est soumis.

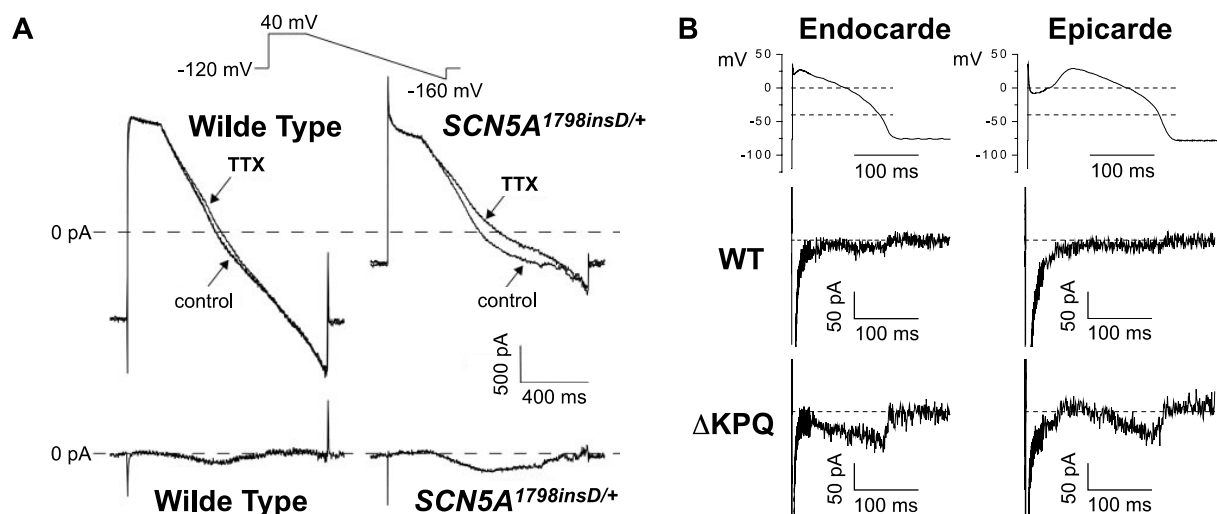


Figure 13 : Exemples d'enregistrement de I_{NaL} obtenus grâce à des protocoles de stimulations dynamiques.

(A) Enregistrement du courant I_{NaL} dans des cardiomyocytes ventriculaires isolés de cœur de souris sauvage (en anglais : WT pour wild type) ou exprimant de façon hétérozygote la mutation 1798insD dans le gène SCN5A . En haut sont représentées les traces de courant obtenues avant et après ajout du bloqueur des canaux sodiques, la tétrodotoxine (TTX), au cours d'un protocole de rampe. Les courants Na^+ TTX-sensibles, I_{NaL} , sont représentés en-dessous. D'après Remme et al., 2006. (B) Représentation des courants I_{Na} et I_{NaL} enregistrés dans des HEK293 exprimant le canal $\text{Na}_v1.5$ WT ou le canal muté ΔKPQ lors de protocoles mimant la forme des PA de cardiomyocyte endocardique ou épicaudique. D'après Magyar et al., 2004.

II.4.3. La théorie du courant de fenêtre

Enfin, la troisième théorie pouvant expliquer un courant sodique cardiaque retardé est le courant dit de fenêtre. La gamme de potentiel permettant la mesure de ce courant de fenêtre correspond aux potentiels pour lesquels se superpose la courbe de disponibilité des canaux Na^+ et la courbe de conductance du pic de courant Na^+ (**Figure 14**). Ainsi, dans une « fenêtre » de potentiel qui est suffisamment dépolarisée pour activer certains canaux $\text{Na}_v1.5$, mais pas assez pour causer l'inactivation de tous les canaux sodiques, un faible courant est théoriquement mesurable. Ce courant de fenêtre dans lequel certains canaux sodiques peuvent alterner entre l'état activé et l'état inactivé, responsable d'un courant I_{NaL} , est généralement le premier mécanisme étudié pour expliquer l'origine d'un allongement de la phase de plateau du PA cardiaque (pour revue, voir Moreno and Clancy, 2012; Zaza et al., 2008; Zaza and Rocchetti, 2013). Cependant, la contribution de ce courant de fenêtre dans le courant I_{NaL} au cours de la phase de plateau du PA est limitée en raison de la gamme de potentiel dans lequel cette phase est retrouvée. En effet, alors que la valeur médiane de la « fenêtre » de potentiel est en générale inférieure à -50 mV, la phase de plateau du PA dans la plupart des espèces est aux alentours de 0 mV (Chamberland et al., 2010; Kunze et al., 1985; Moreau et al., 2013; Pinet et al., 2002; Sakakibara et al., 1992; Spencer et al., 2001). De plus, les mesures de courant de fenêtre ont été obtenues sur des cardiomyocytes n'étant soumis à aucun stress mécanique, or récemment un travail a révélé que les forces de cisaillement décalent la « fenêtre » de potentiel vers des valeurs plus négatives (Beyder et al., 2010). Ce travail suggère alors que la contribution du courant de fenêtre au courant I_{NaL} durant la phase de plateau pourrait être encore plus faible que ce qui a été suggéré par ces études réalisées en l'absence de stress mécanique.

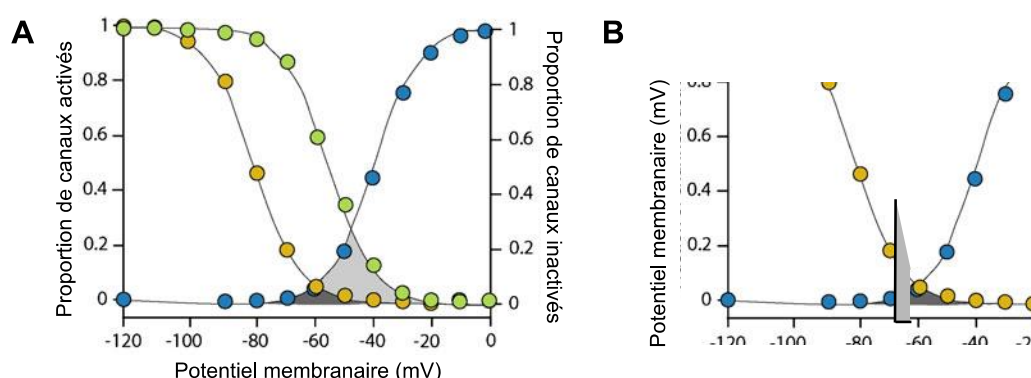


Figure 14 : Représentation schématique du courant de fenêtre et son implication dans le potentiel d'action pour le canal $\text{Na}_v1.5$ sauvage et muté.

(A) Deux courants de fenêtre sont représentés en gris (clair et foncé) sur la figure de superposition des courbes d'activation (bleu) et de disponibilité des canaux $\text{Na}_v1.5$ WT (orange) et exprimant une mutation qui induit un décalage de la dépendance au potentiel de l'inactivation vers des potentiels dépolarisés (vert). (B) Représentation de la gamme de potentiel dans lequel interviennent les courants de fenêtre des canaux WT et muté dans le potentiel d'action de cardiomyocyte ventriculaire. D'après Amin et al., 2009.

Cependant, chacune de ces trois théories présentées ici permettant d'expliquer l'origine du courant I_{NaL} reste discutable. Selon la théorie d'altération de l'inactivation rapide, Maltsev et Undrovinas expliquent notamment que la description des trois modes de fonctionnement du canal $Na_v1.5$ (BM, TM, LSM) présentent des limites en raison du faible effectif de cœur humain sur lesquels les mesures ont été effectuées. De plus, la validation de leurs trois modèles de fonctionnement du canal $Na_v1.5$ a été effectuée dans un système d'expression hétérologue, les cellules HEK293. Enfin, à l'heure actuelle, aucun mécanisme moléculaire n'a permis d'expliquer les différences de transitions observées entre ces différents modes. La deuxième théorie de modulation de I_{NaL} dans des conditions de stimulation dynamique ne permet pas d'exclure l'intervention d'autres mécanismes. En effet, les modes d'activité dispersée (LSM) et « Burst » (BM) du canal $Na_v1.5$ présentés par Maltsev et Undrovinas pourraient également participer au courant I_{NaL} observé lors des stimulations avec des protocoles de rampe négative ou mimant l'aspect d'un PA cardiaque. Enfin, bien que le courant de fenêtre ne semble pas impliqué à proprement dit dans la genèse du courant sodique persistant, de nombreuses études ont montré que des mutations de $Na_v1.5$ qui modifient la gamme de potentiel dans laquelle ce courant peut être mesuré (**Figure 14**), augmentent le courant (Abriel et al., 2001; Huang et al., 2011; Oginosawa et al., 2005; Wang et al., 1996a; Wedekind et al., 2001).

En somme, ces trois théories expliquant l'origine du courant I_{NaL} coexistent et contribuent à la modulation de la durée et de la forme du PA cardiaque. De nombreuses protéines régulatrices du canal sont capables de moduler les propriétés d'inactivations du canal, et certaines vont jouer un rôle majeur dans la régulation de ce courant I_{NaL} .

II.5. Complexe canalaire $Na_v1.5$ cardiaque

La sous-unité α du canal Na^+ cardiaque, tout comme le canal KCNQ1, appartient et fonctionne au sein d'un complexe macromoléculaire composé de diverses protéines partenaires capables de réguler l'expression et le fonctionnement du canal $Na_v1.5$. Depuis la première description des sous-unités β ($\beta1$ à $\beta4$) dans les complexes canaux sodiques neuronaux en 1981 (Hartshorne and Catterall, 1981), plus d'une vingtaine de protéines (ou familles de protéines) ont été montrées pour interagir et réguler le canal $Na_v1.5$ (**Tableau II**).

Tableau II : Partenaires régulateurs du canal sodique Na_v1.5

Protéine	Principaux effets sur Na _v 1.5	Site d'interaction sur Na _v 1.5
14-3-3η	– Décale la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs et ralentit la levée d'inactivation	Interdomaine IDI-II
actinine α2	– Régulation de l'expression à la surface cellulaire	Interdomaine IDIII-IV
Ankyrine G	– Ancrage à la surface cellulaire et au cytosquelette	Motif VPIAxxSD de l'interdomaine IDII-III
Calmoduline	– Confère au canal sa sensibilité au Ca ²⁺ – Régulation de l'inactivation	Motifs EF hand et IQ en C-terminale et interdomaine IDIII-IV
CaMKIIδ_C	– Phosphorylation et effets multiples sur les propriétés biophysiques	Interdomaine DI-II et <i>via</i> βIV-spectrine
CAR	– Diminution de la densité de courant I _{Na} aux disques intercalaires dans un modèle de souris hétérozygote CAR ^{+/-}	Indéterminé
Cavéoline 3	– Mutant impliqué dans le LQTS augmentent le courant sodique I _{NaL}	Indéterminé
Connexine 43	– Augmente l'expression à la surface cellulaire et la densité de courant I _{Na}	Indéterminé
Desmoglérine 2	– Surexprimée dans l'ARVC : diminution de I _{Na}	Indéterminé
FGF12/FGF13	– Décale la courbe d'inactivation vers des potentiels plus positifs	Extrémité C-terminale (1773–1832)
GPD1L	– Mutants diminuent le courant I _{Na}	Indéterminé
MOG1	– Augmente l'expression à la surface cellulaire et la densité de courant I _{Na}	Interdomaine IDII-III
Na_vβ1	– Augmente l'expression à la surface cellulaire et la densité de courant I _{Na} – Décale la courbe d'activation et d'inactivation vers des potentiels plus négatifs	Boucles P des domaines DIII et DIV et extrémité C-terminale
Na_vβ2	– Lorsqu'elle est entièrement sialylée, décale la courbe d'activation vers des potentiels plus négatifs	Indéterminé
Na_vβ3	– Effets controversés sur les propriétés biophysiques	Indéterminé
Na_vβ4	– Décale la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs	Indéterminé
Nedd4-2	– Ubiquitylation et internalisation – Diminue l'expression à la surface cellulaire	Motif PY dans l'extrémité C-terminale
Plakophiline 2	– Extinction de l'expression par un siRNA : diminution de I _{Na} , décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs et ralentissement de la levée d'inactivation	Indéterminé
PTPH1	– Phosphorylation et décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs	Domaine PDZ de l'extrémité C-terminale
SAP97	– Augmente l'expression à la surface cellulaire et stabilise le canal au niveau des disques intercalaires des cardiomyocytes – Associe le canal au complexe dystrophine et utrophine	Domaine PDZ de l'extrémité C-terminale
Syntrophine	– Stabilisation du canal au niveau des membranes latérales des cardiomyocytes – Ancrage à la membrane et au cytosquelette – Décale la courbe d'activation vers des potentiels plus positifs et ralentit les cinétiques d'activation et d'inactivation	Domaine PDZ de l'extrémité C-terminale
Téléthonine	– Extinction de l'expression par un siRNA : décalage de la courbe d'activation vers des potentiels plus positifs	Indéterminé
ZASP	– Mutant décale la courbe d'activation vers des potentiels plus positifs	Indéterminé

D'après Jansen et al., 2012; Marsman et al., 2014; Shy et al., 2013; Wilde & Brugada, 2011.

Le rôle de ces protéines auxiliaires est primordial non seulement dans la régulation de la physiologie du canal mais aussi dans la pathologie. Plusieurs mutations dans les gènes codant pour ces protéines partenaires ont d'ailleurs été identifiées dans des pathologies cardiaques héréditaires (voir la partie II.9). Ces protéines partenaires modulent le trafic du canal à la surface cellulaire et à des compartiments subcellulaires spécifiques, et modulent les propriétés biophysiques du canal. Certaines protéines partenaires modulent également la sensibilité du canal au Ca^{2+} telles que la calmoduline (CaM) et l'isoforme δ_c de la protéine CaMKII (CaMKII δ_c). Dans la suite de cette introduction, les mécanismes de régulation du canal par cette CaM ainsi que les protéines FGF12/FGF13 vont être détaillés.

II.6. Régulation du canal $\text{Na}_v1.5$ par la calmoduline

La régulation de $\text{Na}_v1.5$ par le Ca^{2+} a été étudiée par de nombreux groupes, mais à l'heure actuelle il existe encore de nombreux points de désaccord quant aux effets et mécanismes moléculaires impliqués dans la modulation directe ou indirecte de l'activité du canal par le Ca^{2+} .

Le calcium est un ion essentiel qui intervient notamment dans le couplage excitation-contraction des cardiomyocytes, il module également l'activité de canaux ioniques et de pompes, notamment *via* des mécanismes de rétrocontrôle. En 2004, Wingo et ses collaborateurs ont suggéré que le Ca^{2+} se fixe sur un motif dédié (EF-hand) du canal $\text{Na}_v1.5$, localisé entre la partie C-terminale du segment S6 du DIV et un motif IQ (Wingo et al., 2004). Les auteurs de cette étude ont montré que l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire provoque un décalage de la dépendance au potentiel de la disponibilité des canaux vers les potentiels plus positifs, suggérant un effet gain-de-fonction du Ca^{2+} sur l'inactivation du canal $\text{Na}_v1.5$. De plus, l'utilisation de différentes approches de spectroscopie ont permis de valider l'interaction directe entre le Ca^{2+} et le motif EF-hand. Enfin, le fait que des mutations localisées dans le motif EF empêchent la fixation du Ca^{2+} ainsi que le décalage de la courbe d'inactivation lorsque la concentration en Ca^{2+} est augmentée, renforce l'hypothèse d'un effet direct du Ca^{2+} dans la régulation de l'activité du canal $\text{Na}_v1.5$.

Cependant, d'autres travaux ont suggéré que le Ca^{2+} seul ne peut moduler directement l'activité du canal, mais que ses effets passeraient par la calmoduline (CaM) (Kim et al., 2004; Tan et al., 2002), petite protéine dont les extrémités N- et C-terminales présentent des structures globulaires (appelées lobes N et C) capables de fixer chacune 2 ions Ca^{2+} (**Figure 15**) *via* des motifs EF-hand. Ces résultats contradictoires avec les travaux de Wingo et ses collaborateurs pourraient s'expliquer par le fait que ces derniers ont utilisé dans leur étude un peptide inhibiteur de la CaM qui peut ne pas totalement bloquer la fixation de la CaM sur le canal $\text{Na}_v1.5$ (Van Petegem et al., 2012). De nombreuses études ont par la

suite validé l'interaction de la CaM avec le canal grâce à des techniques variées comme le FRET, ou l'approche de titration calorimétrique isotherme (ITC) qui a permis de quantifier l'affinité de la CaM sur des résidus isoleucine et glutamine (IQ) de Na_v1.5 (Biswas et al., 2008; 2009; Sarhan et al., 2012; Shah et al., 2006). Ce motif IQ localisé dans l'extrémité C-terminale (CTD) du canal Na_v1.5 est un motif bien décrit dans l'interaction des protéines avec la CaM (Bähler and Rhoads, 2002). De plus, des études fonctionnelles ont révélé que la mutation de ces deux résidus en alanine (IQ/AA) annule l'effet de l'augmentation du Ca²⁺ sur le décalage de la courbe d'inactivation (Shah et al., 2006), provoque un décalage Ca²⁺-indépendant de la courbe d'inactivation vers les potentiels plus négatifs et augmente le courant I_{NaL} (Kim et al., 2004). Ces derniers effets suggèrent alors que la CaM en se fixant sur ce motif IQ possède à la fois un effet gain-de-fonction sur l'activité du canal Na_v1.5 de part un décalage de la dépendance au potentiel de la disponibilité des canaux vers des potentiels plus positifs, et un effet perte de fonction de par une diminution du I_{NaL}. Ces résultats sont cohérents avec d'autres travaux qui ont révélé que la délétion du motif IQ provoque un décalage de la courbe d'inactivation vers les potentiels plus négatifs, responsable d'une diminution du I_{Na}, et une augmentation du courant I_{NaL} (Cormier et al., 2002; Motoike, 2004). De façon plus surprenante, contrairement aux travaux de Shah et de ses collaborateurs, la délétion de ce motif IQ ne supprime pas le décalage Ca²⁺-dépendant vers les potentiels plus positifs de la courbe d'inactivation du canal Na_v1.5 (Biswas et al., 2009). Cette dernière observation remet à nouveau en avant l'hypothèse d'un effet du Ca²⁺, indépendamment de la CaM, sur l'activité du canal.

Le canal sodique cardiaque Na_v1.5 pourrait finalement être régulé à la fois par une interaction directe du Ca²⁺ sur son motif EF-hand, et par une interaction de la CaM sur son motif IQ. Un modèle conciliant les deux hypothèses précédentes suggère qu'à des concentrations en Ca²⁺ cytosolique ([Ca²⁺]_i) faibles, comme pendant la phase de relaxation du myocarde (appelée diastole), la CaM n'est pas associée au Ca²⁺ (apo-CaM) et interagit avec le motif IQ du CTD de Na_v1.5 (**Figure 15** ; Shah et al., 2006). Cette interaction a récemment été validée par l'obtention de la structure cristallographique d'une partie du CTD de Na_v1.5 contenant les motifs EF et IQ (Wang et al., 2012). Une autre étude a précisé que dans cette configuration, le lobe N de la CaM n'interagit pas avec l'interdomaine IDIII-IV (Sarhan et al., 2012), pouvant expliquer l'absence d'effet sur l'inactivation pour des faibles [Ca²⁺]_i (Chagot and Chazin, 2011; Sarhan et al., 2012; Shah et al., 2006). Lorsque [Ca²⁺]_i augmente, le modèle suggère que l'association du Ca²⁺ avec la CaM (holo-CaM) diminue l'affinité de la CaM pour le motif IQ, lequel pourrait alors interagir avec le motif EF-hand du CTD du canal (Shah et al., 2006). Cette interaction entre les motifs IQ et EF-hand augmente l'affinité du Ca²⁺ pour ce motif EF (**Figure 15A**), ce qui est cohérent avec la modification de la dépendance au potentiel de l'inactivation du canal observée lorsque [Ca²⁺]_i est augmentée (Wingo et al., 2004). Les travaux de Sarhan et ses collaborateurs ont suggéré que la

fixation du Ca^{2+} sur la CaM provoquerait un changement conformationnel de l'holo-CaM, modifiant l'interaction du lobe C de l'apo-CaM avec le motif IQ en une interaction du lobe N de l'holo-CaM avec ce motif (**Figure 15B** ; Sarhan et al., 2012). Une approche cristallographique de l'interdomaine IDIII-IV avec l'holo-CaM a montré qu'à forte $[\text{Ca}^{2+}]_i$, le lobe C de la CaM interagit avec la boucle IDIII-IV du canal, provoquant un décalage de la dépendance au potentiel de l'inactivation vers les potentiels plus dépolarisés. L'interaction entre le lobe C de l'holo-CaM et l'interdomaine IDIII-IV du canal $\text{Na}_v1.5$ observée lorsque $[\text{Ca}^{2+}]_i$ est augmentée semble donc déstabiliser l'inactivation (**Figure 15B**), validant les précédents travaux (Cormier et al., 2002; Kim et al., 2004; Motoike, 2004).

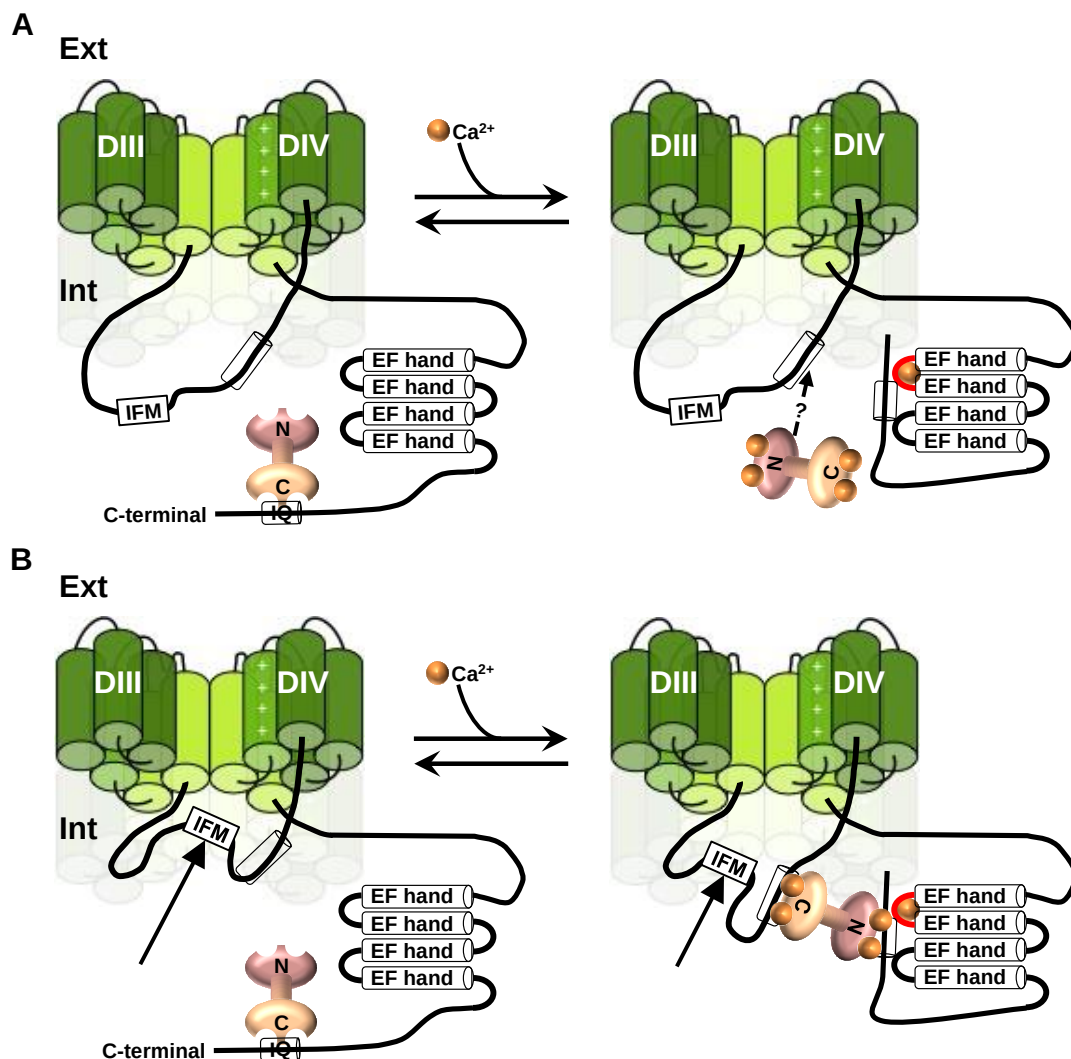


Figure 15 : Schéma représentant deux scénarios de mécanismes de régulation du canal $\text{Na}_v1.5$ par le Ca^{2+} et la calmoduline (CaM).

(A) Selon Shah et ses collaborateurs, à faible concentration en Ca^{2+} (à gauche), la calmoduline (apo-CaM, altère orange et rose) est associée au motif IQ de $\text{Na}_v1.5$ via son lobe C. Lorsque la concentration en ion Ca^{2+} (sphère orange) augmente (à droite), l'interaction holo-CaM/motif IQ est diminuée permettant l'interaction du motif IQ avec le motif EF hand (rectangles bleus), augmentant l'affinité du Ca^{2+} pour ce motif EF hand (boucle rouge). Ce modèle ne précise pas si l'holo-CaM interagit avec l'interdomaine IDIII-IV (Shah et al., 2006). (B) Le modèle de Sarhan et de ses collaborateurs propose un scénario proche, à la différence qu'à concentration en Ca^{2+} élevée (à droite), le lobe N de la CaM remplace le lobe C dans l'interaction avec le motif IQ de $\text{Na}_v1.5$. Le lobe C interagit alors avec l'IDIII-IV, modifiant les propriétés d'inactivations du canal (Sarhan et al., 2012).

Pour résumer, un modèle simplifié peut être établi où à faible concentration calcique, l'apo-CaM est liée au motif IQ du CTD de Na_v1.5 par son lobe C, mais quand la quantité de Ca²⁺ augmente, l'affinité du lobe C est déplacée vers l'interdomaine IDIII-IV du canal, laissant le N-lobe libre d'interagir avec le motif IQ du CTD du canal. Cette interaction de l'holo-CaM avec le motif IQ (*via* son lobe N) et l'IDIII-IV (*via* son lobe C) de Na_v1.5 crée une contrainte qui empêche l'IDIII-DIV d'interagir avec les domaines du canal précédemment décrits (boucles B4-5 des domaines DIII et DIV (Balser, 2001) et CTD Motoike, 2004; Potet et al., 2009), déstabilisant alors l'inactivation de Na_v1.5. Cependant, l'hypothèse de l'interaction simultanée entre les deux régions du canal Na_v1.5 (IDIII-IV et le motif IQ) avec les lobes C et N de l'holo-CaM reste à prouver. En effet, même si des structures cristallographiques existent, elles n'ont été obtenues qu'avec des fragments du canal sodique cardiaque (Sarhan et al., 2012; Wang et al., 2012). De plus, de nombreuses mutations sur l'IDIII-IV et le CTD affectent les propriétés d'inactivation de Na_v1.5, comme par exemple la mutation ΔKPQ ou la délétion du motif IQ (par insertion d'un codon STOP en position 1885) qui provoquent une augmentation d'I_{NaL} en l'absence de CaM (Motoike, 2004). Ces observations ont été confirmées par Biswas et ses collaborateurs qui ont montré que le canal présente toujours, malgré la mutation IQ/AA du motif IQ, un décalage de l'inactivation vers les potentiels plus positifs lorsque [Ca²⁺] augmente (Biswas et al., 2009). Toutes ces études suggèrent alors que l'interaction IDIII-IV/CTD du canal pourrait se faire indépendamment de la CaM. L'approche qui permettrait de valider, ou de réfuter le cas échéant, l'hypothèse d'un complexe IDIII-DIV/CTD avec la CaM serait l'obtention de la structure cristallographique du canal Na_v1.5 en entier en présence de l'holo-CaM.

Cependant, il n'est pas exclu que cette interaction entre l'interdomaine IDIII-IV et le CTD *via* la CaM ne soit pas le seul mécanisme capable d'expliquer la modulation de l'inactivation du canal Na_v1.5 par le Ca²⁺. En effet, d'autres protéines partenaires, telles que les protéines FGF12/13 par exemple, pourraient aussi être impliquées.

II.7. Régulation du canal Na_v1.5 par les protéines FGF12/13

Les protéines FHF (pour « Fibroblast growth factor Homologous Factors ») sont des protéines homologues aux facteurs de croissance des fibroblastes (FGF) qui sont exprimés préférentiellement dans les cellules excitables (Smallwood et al., 1996). Ces protéines, contrairement aux autres membres de la famille des FGF, ne possèdent pas de séquence signal permettant leur sécrétion, et n'ont pas la capacité de se fixer aux récepteurs au FGF, ni de les activer. Au contraire, ces protéines sont intracellulaires et ont été décrites comme pouvant interagir avec les canaux sodiques dépendants du potentiel et réguler leur activité (Liu et al., 2001; Wang et al., 2011a; Wittmack, 2004). Pour chacun

des quatre gènes codant pour les FHF (FGF11-FGF14), il existe des isoformes distinctes qui se différencient par des épissages alternatifs au niveau de l'extrémité N-terminale (Munoz-Sanjuan et al., 2000), et qui modulent différemment les canaux Na_v .

Les rôles des FHF ont été étudiés en détail dans le cerveau où une première mutation dans le gène codant pour FGF14, la mutation F145S, a été identifiée chez des patients atteints d'ataxies (van Swieten et al., 2003). Ces résultats ont confirmé les résultats précédents obtenus dans un modèle de souris n'exprimant pas la protéine FGF14, où les auteurs avaient montré que la diminution de l'excitabilité neuronale chez ces souris était liée à une perte de fonction des canaux Na_v (Wang et al., 2002). Par la suite, d'autres mutations dans le gène codant pour la protéine FGF14 ont été mises en cause dans des formes héréditaires d'ataxies (pour revue voir Krejci et al., 2009). Ces protéines sont également exprimées dans le cœur, mais leurs rôles dans la régulation de l'excitabilité cardiaque sont moins connus. Il a été décrit que la principale protéine FHF exprimée dans le cœur humain est l'isoforme 2 de FGF12, FGF12-2 ; elle interagit avec l'extrémité C-terminale du canal $\text{Na}_v1.5$ (Goetz et al., 2009; Liu et al., 2003). Un travail réalisé dans des cardiomyocytes de souris et de rat a montré que c'est l'isoforme FGF13-2 qui prédomine dans le cœur murin et interagit directement avec le CTD du canal $\text{Na}_v1.5$ (Wang et al., 2011a). Les différentes études réalisées dans des modèles d'expression hétérologue et dans des cardiomyocytes s'accordent pour montrer un rôle à la fois dans le trafic du canal à la surface cellulaire, mais aussi dans la régulation des propriétés d'inactivation (Goetz et al., 2009; Liu et al., 2003; Lou et al., 2005; Wang et al., 2011a; 2011b; 2012). Plus précisément, FGF13-2, ainsi que FGF12-2, provoquent un décalage de la dépendance au potentiel de la disponibilité des canaux Na_v vers les potentiels plus dépolarisés. Ces effets des FHF sur le courant I_{Na} sont en accord avec le ralentissement de la conduction observé lorsque l'expression de FGF13 est éteinte dans des cardiomyocytes ventriculaires de souris en culture (Wang et al., 2011a). De plus, Wang et ses collaborateurs ont montré que l'extinction de l'expression de FGF13 provoque un ralentissement de la levée d'inactivation du canal $\text{Na}_v1.5$. De façon intéressante, une mutation associée au syndrome de Brugada a récemment été identifiée dans le gène codant pour FGF12 (Hennessey et al., 2013). Dans ce travail, les auteurs ont montré que la mutation réduit l'affinité de FGF12 pour le CTD de $\text{Na}_v1.5$ provoquant une diminution de la densité du courant I_{Na} ainsi qu'un décalage de la courbe d'inactivation vers les potentiels plus négatifs.

Tous ces résultats sont en accord avec un effet gain-de-fonction des protéines FGF12 et FGF13 sur la disponibilité des canaux, en plus de son effet sur le trafic du canal à la surface cellulaire. De façon intéressante, le site d'interaction de la protéine FGF13 avec le canal (résidus 1886-1907 ; Wang et al., 2011b) est localisé juste en amont du motif IQ, site d'interaction avec la CaM. Ainsi, ces observations

laissent suggérer qu'il pourrait exister des relations dans la régulation de $\text{Na}_v1.5$ par la CaM et les protéines FHF, et que l'identification des mécanismes impliqués pourrait aider à la compréhension des défauts d'inactivation du canal $\text{Na}_v1.5$.

Ainsi, les protéines régulatrices du canal $\text{Na}_v1.5$ jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'expression et des propriétés du canal sodique cardiaque. Cependant, les modifications post-traductionnelles du canal $\text{Na}_v1.5$ sont également des processus clés dans la régulation de l'excitabilité cardiaque. Comme nous allons le voir dans la partie qui suit, de nombreuses kinases sont capables de phosphoryler le canal $\text{Na}_v1.5$.

II.8. Phosphorylation du canal sodique cardiaque $\text{Na}_v1.5$

Parmi les modifications post-traductionnelles du canal $\text{Na}_v1.5$, la phosphorylation est la plus étudiée. Tout comme le canal potassique KCNQ1 , différentes kinases sont capables de phosphoryler le canal $\text{Na}_v1.5$ avec des effets variés en fonction des kinases.

II.8.1. Régulation de $\text{Na}_v1.5$ par la PKA

Les effets de l'activation de la PKA sur l'expression et le fonctionnement du canal $\text{Na}_v1.5$ ont montré des résultats discordants (résumé dans (Schreibmayer, 1999). Puis en 2000, une étude a montré que les différences observées étaient liées à des différences de protocole de stimulation (Zhou et al., 2000). En effet, l'activation de cette kinase, *via* l'AMPc, provoque un décalage de la dépendance au potentiel des courbes d'activation et d'inactivation du courant I_{Na} vers les potentiels plus négatifs. Ce décalage de la dépendance au potentiel de la disponibilité des canaux implique que, pour un potentiel donné, l'amplitude du courant I_{Na} sera plus faible dans la condition où la PKA est activée par rapport à la condition non-activée. Zhou et ses collaborateurs ont alors suggéré que les travaux ayant montré une diminution de la densité du courant I_{Na} suite à l'activation de cette kinase s'expliquent par l'utilisation d'un potentiel de repos pas assez négatif dans leurs protocoles de stimulation pour que tous les canaux sodiques soient activables (Zhou et al., 2000). La conséquence principale de l'activation de la PKA est une augmentation de la densité de I_{Na} , effet qui a été retrouvé aussi bien en système d'expression hétérologue que dans des cardiomyocytes (Frohnwieser et al., 1997; Hallaq et al., 2006; Lu et al., 1999; Schreibmayer et al., 1994; Zhou et al., 2000; 2002). Plus précisément, plusieurs études réalisées dans des ovocytes de xénopes ont montré que la PKA augmente l'expression du canal $\text{Na}_v1.5$ à la surface cellulaire (Hallaq et al., 2006; Zhou et al., 2000; 2002). L'implication directe de la phosphorylation par la PKA dans l'augmentation de la densité de I_{Na} a été démontrée par Murphy et ses collaborateurs (Murphy et al., 1996) par l'identification de deux résidus sérines cibles de la PKA, S525 et S528, situés

dans l'IDI-II. De façon intéressante, cette région du canal présente trois motifs de rétention (RXR) dans le réticulum endoplasmique qui, lorsqu'ils sont supprimés, annulent l'augmentation de densité de I_{Na} AMPc-dépendante, tout comme le double phosphomutant S525A/S528A (Zhou et al., 2002). Ces résultats suggèrent alors que la phosphorylation de ces deux sérines par la PKA masque les signaux de rétention, permettant une augmentation de l'export des canaux $Na_v1.5$ du réticulum endoplasmique vers la surface cellulaire. Cette hypothèse a été confirmée grâce au marquage du canal avec la GFP dans des HEK293, où l'activation de la PKA par l'AMPc provoque une redistribution des pools de $Na_v1.5$ -GFP localisés dans le réticulum endoplasmique et sous la membrane vers la surface cellulaire (Hallaq et al., 2006; Zimmer et al., 2002).

II.8.2. Régulation de $Na_v1.5$ par la PKC

La régulation du canal $Na_v1.5$ par la protéine kinase C (PKC) a également été soumise à controverse. En effet, alors que la plupart des études menées dans des modèles d'expression hétérologue mais aussi dans des cardiomyocytes ont montré que l'activation de la PKC provoque une diminution de l'amplitude de I_{Na} (Benz et al., 1992; Liu et al., 2009; Qu et al., 1994; Xiao et al., 2001), d'autres ont décrit aucune modification d'amplitude (Watson and Gold, 1997), voir une augmentation (Ko et al., 2006; Moorman et al., 1989). De plus, certains travaux ont également montré des modifications des propriétés biophysiques comme un décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs (Ko et al., 2006; Qu et al., 1994; 1996), ou vers des potentiels plus positifs (Watson and Gold, 1997). Enfin une étude a également montré un décalage de la courbe d'activation vers les potentiels plus négatifs (Ko et al., 2006). Ces variabilités dans les effets de la PKC sur la régulation du canal $Na_v1.5$ peuvent s'expliquer par la différence de modèles choisis, ou bien par l'utilisation d'activateurs et/ou d'inhibiteurs plus ou moins spécifiques. L'effet principal de la PKC semble être un décalage de dépendance au potentiel de l'inactivation vers les potentiels hyperpolarisés, qui expliquerait la diminution de I_{Na} dépendante du potentiel observée lorsque la PKC est activée (Qu et al., 1996). Même si les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de $Na_v1.5$ par la PKC restent méconnus, certaines études fonctionnelles ayant utilisé des approches de mutagenèses ont montré que les effets de la PKC sont associés à la phosphorylation de la sérine 1505 situé sur l'IDIII-IV, (Murray et al., 1997; Qu et al., 1996). De plus Hallaq et ses collaborateurs, en utilisant la même approche que pour la PKA, ont montré dans des HEK293 que l'activation de la PKC provoque une diminution de l'expression de $Na_v1.5$ à la surface cellulaire, effet bloqué en présence d'inhibiteur de la PKC ou lorsque le canal porte la mutation S1503A (Hallaq et al., 2012). De façon intéressante, une mutation sur la glycerol-3-phosphate déshydrogénase (GPD1L) associée au syndrome de Brugada (London et al., 2007; Van Norstrand et al., 2007) provoque une réduction du courant I_{Na}

dépendante de la PKC (Valdivia et al., 2009). En effet, dans cette étude, les auteurs ont montré que la mutation A280V dans GPD1L empêche son activité de conversion du glycerol-3-phosphate (G3P) en dihydroxyacétone phosphate. Cette mutation provoque une accumulation de G3P et de phospholipides qui augmenterait la phosphorylation de la S1503 de $\text{Na}_v1.5$ par la PKC (Valdivia et al., 2009).

II.8.3. Régulation de $\text{Na}_v1.5$ par la SGK

La sérine/thréonine kinase de type 1 activée par le sérum et les glucocorticoïdes (SGK1) a initialement été décrite dans des cellules tumorales mammaires de rat comme étant une protéine dont le gène est activé par les glucocorticoïdes (Webster et al., 1993b; 1993a). Par la suite, de nombreux travaux ont montré que la transcription de SGK1 est activée par de nombreuses hormones et médiateurs (pour revue récente voir Lang and Stournaras, 2013). Le cœur est un des organes qui exprime le plus les isoformes SGK1 et SGK3 (Kobayashi et al., 1999; Waldegger et al., 1997), et l'isoforme SGK1 est la seule dont la transcription est activée par les glucocorticoïdes et les minéralocorticoïdes (Lang and Cohen, 2001). Concernant les conséquences de l'activation de la SGK sur les canaux Na^+ , un travail réalisé sur un autre canal sodique et exprimé dans des ovocytes de xénope, le canal sodique épithélial (ENaC), a montré que SGK1 augmente l'expression sur le canal à la surface cellulaire en diminuant son internalisation (Debonneville et al., 2001). En effet, dans ce travail les auteurs ont observé que SGK1 phosphoryle et inhibe l'ubiquitine ligase Nedd4-2. L'ubiquitylation par Nedd4-2 induit l'internalisation du canal, qui est alors ici réduite (Debonneville et al., 2001). De façon intéressante, Abriel et ses collaborateurs ont montré que l'expression à la surface cellulaire du canal sodique cardiaque $\text{Na}_v1.5$ est elle aussi régulée par Nedd4-2 (Abriel et al., 2000). Et en 2003, des travaux réalisés dans des ovocytes de xénope ont décrit que la co-expression de $\text{Na}_v1.5$ avec SGK1 ou SGK3 provoque une augmentation du courant sodique (Boehmer et al., 2003). SGK3 provoque de plus un décalage de la courbe d'inactivation vers les potentiels dépolarisés et de la courbe d'activation vers les potentiels hyperpolarisés. La co-expression de $\text{Na}_v1.5$ avec un mutant inactif de SGK1, K127N, reverse l'effet de SGK1 sur le courant et provoque même une diminution de I_{Na} par rapport au canal exprimé seul. Cette diminution serait liée à une compétition entre le mutant K127N surexprimé et SGK1 endogène aux ovocytes. Ces travaux suggèrent alors que, tout comme pour le canal ENaC, SGK1 augmente la quantité de canal $\text{Na}_v1.5$ exprimée à la surface cellulaire *via* une diminution de son internalisation par l'ubiquitine ligase Nedd4-2 (Boehmer et al., 2003).

II.8.4. Régulation de $\text{Na}_v1.5$ par l'Akt

L'Akt (appelée également protéine kinase B, PKB) est une sérine/thréonine kinase appartenant à la voie de signalisation PI3K/Akt. Lorsqu'ils sont activés, de nombreux récepteurs aux facteurs de

croissance, hormones et cytokines activent la lipide kinase PI3K qui va alors phosphoryler le PIP_2 en PIP_3 (phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate) à la membrane plasmique. L'Akt s'associe à ce PIP_3 via son domaine d'homologie à la pleckstrine (PH), et est alors relocalisée à la membrane plasmique où elle est activée suite à sa phosphorylation par les kinases PDK1 et mTORC2 (LoPiccolo et al., 2008). Le groupe de Richard Lin s'est intéressé à la régulation du canal $\text{Na}_v1.5$ par cette voie PI3K/Akt dans deux études récentes, l'une portant sur des traitements anti-cancéreux qui provoque un QT long et l'autre portant sur des modèles de souris diabétiques présentant un QT allongé (Lu et al., 2012; 2013). Dans la première étude, les auteurs ont montré que les inhibiteurs des tyrosines kinases, le dasatinib, le sunitinib, et le nilotinib, utilisés comme traitements anti-cancéreux provoquent, dans un modèle de chien, un allongement de la durée du PA, qui se traduit par un allongement de l'intervalle QT (Lu et al., 2012). Ils ont mis en évidence que cette prolongation du QT est liée à l'inhibition des canaux hERG, comme beaucoup de médicaments (Roden, 2004), mais aussi à une augmentation de la densité du courant I_{NaL} . Les auteurs ont montré dans des modèles de chien et de souris que l'activation de la PI3K est diminuée par ces inhibiteurs des tyrosines kinases. Ils ont alors suggéré que l'inhibition de cette voie PI3K/Akt serait responsable d'une augmentation de I_{NaL} via la modification de l'état de phosphorylation du canal $\text{Na}_v1.5$ par l'Akt. Dans la deuxième étude, ce même groupe a validé l'implication de la voie PI3K/Akt dans l'allongement de l'intervalle QT dans des modèles de souris présentant des diabètes de type 1 et de type 2 (Lu et al., 2013). A nouveau dans cette étude, les auteurs ont montré que l'augmentation de l'APD et l'allongement du QT consécutif, associé ici à la cardiomyopathie diabétique, est en partie causée par l'inhibition de la PI3K et l'augmentation du courant I_{NaL} . De plus, l'augmentation d' I_{NaL} dans des cardiomyocytes de souris sauvage observée en présence d'un inhibiteur de l'Akt (Akti) suggère fortement l'implication de l'Akt dans la régulation de $\text{Na}_v1.5$.

II.8.5. Régulation de $\text{Na}_v1.5$ par les tyrosines kinases

Parmi les mécanismes de régulation post-traductionnelle de $\text{Na}_v1.5$, la phosphorylation du canal par les tyrosines kinases est la moins étudiée. Tout d'abord, Wang et ses collaborateurs ont suggéré une régulation du canal sodique cardiaque par les tyrosines kinases dans des cardiomyocytes de lapin (Wang et al., 2003). Dans cette étude, les auteurs ont utilisé différents inhibiteurs des tyrosines kinases et ont observé un décalage de la dépendance au potentiel de la disponibilité des canaux sodiques vers les potentiels plus négatifs ainsi qu'un ralentissement de la levée d'inactivation. Une autre étude dans des cellules HEK293 a démontré par la suite, grâce à des approches biochimiques, que la tyrosine kinase Fyn, de la famille des Src, phosphoryle la tyrosine 1495 située dans l'IDIII-IV, non loin du motif $I_{1485}\text{FM}_{1487}$ du canal (Ahern et al., 2005). Des approches fonctionnelles utilisant un mutant de Fyn constitutivement actif ont montré que la phosphorylation du canal par cette tyrosine kinase provoque

un décalage de la courbe d'inactivation vers les potentiels plus positifs, une diminution de la proportion de canaux entrant en inactivation lente et une accélération de la levée d'inactivation. Cette étude montre également que les effets sur la courbe d'inactivation et la cinétique de levée de cette inactivation sont reversés respectivement par une mutation inactivant Fyn (K299M) ou par un inhibiteur de tyrosine kinase, confirmant ainsi les résultats précédents de Wang et de ses collaborateurs (Wang et al., 2003). De façon cohérente, une étude réalisée par Jespersen et ses collaborateurs a montré que la co-expression du canal $Na_v1.5$ et de la protéine tyrosine phosphatase PTPH1 (autrement appelée PTPN3) provoque, dans les HEK293, un décalage de la courbe d'inactivation opposé à celui de Fyn, c'est-à-dire vers les potentiels hyperpolarisés (Jespersen et al., 2006). Finalement, l'implication des tyrosines kinases dans la régulation de $Nav1.5$ a été validée dans un modèle de cardiomyocytes ventriculaires de cochon d'inde grâce à des approches fonctionnelles et biochimiques (Liu et al., 2007). Dans ce travail, les auteurs ont montré que l'activation du récepteur à l'EGF (epidermal growth factor pour facteur de croissance épidermique), couplés aux tyrosines kinases, augmente le niveau de phosphorylation des tyrosines des canaux sodiques cardiaques, augmente I_{Na} et décale la dépendance au potentiel de l'inactivation vers des potentiels dépolarisés.

En somme, la phosphorylation de $Na_v1.5$ par les tyrosines kinases provoque un gain de fonction du canal. Le niveau de phosphorylation des tyrosines du canal est régulé par les tyrosines kinases couplées aux récepteurs (tel le récepteur à l'EGF), les kinases de la famille des Src (comme Fyn), ainsi que la tyrosine phosphatase PTPH1. Même si aucun résidu n'a pu être décrit comme étant la cible de cette phosphatase, son interaction avec le domaine PDZ situé sur l'extrémité C-terminale de $Na_v1.5$ a été décrite (Jespersen et al., 2006). De façon intéressante, Sarhan et ses collaborateurs ont montré que le résidu Y1495, cible de la tyrosine kinase Fyn, est situé sur le site de fixation de la Ca^{2+}/CaM (holo- CaM). Ils ont alors suggéré que la phosphorylation de ce résidu par Fyn aurait le même effet que la fixation de l'holo- CaM sur ce site, c'est-à-dire d'empêcher l'interaction de l'IDIII-IV avec son récepteur (formé des résidus des boucles B4-5 des domaines DIII et DIV (Balser, 2001) et du CTD Motoike, 2004; Potet et al., 2009), déstabilisant ainsi l'inactivation de $Na_v1.5$ (Sarhan et al., 2009).

II.8.6. Régulation de $Na_v1.5$ par la CaMKII

La CaMKII est une sérine/thréonine kinase exprimée dans de nombreux types cellulaires, y compris les cardiomyocytes, et qui, suite à une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire, phosphoryle de nombreuses cibles comme les canaux ioniques et les protéines impliquées dans la régulation de l'homéostasie calcique (Couchonnal and Anderson, 2008). La CaMKII forme un complexe composé de plusieurs monomères identiques associés par leur extrémité C-terminale. Chaque monomère comprend

un domaine catalytique N-terminal qui permet le transfert d'un phosphate (γ) d'une molécule d'ATP, et au centre un domaine régulateur. Dans des conditions basales, la CaMKII est inactive en raison de la liaison du domaine catalytique avec le domaine régulateur. Lorsque $[Ca^{2+}]_i$ augmente, l'holo-CaM se fixe sur le domaine régulateur, provoquant un changement conformationnel qui permet la libération du domaine catalytique. Ainsi, le domaine catalytique devient accessible à l'ATP et la CaMKII peut phosphoryler ses protéines cibles, y compris elle-même. Cette autophosphorylation, correspondant à la phosphorylation d'un monomère par un autre, permet notamment à la CaMKII de maintenir sa fonction catalytique même en absence de l'holo-CaM. De plus, la CaMKII est également activable en présence d'espèces radicalaires oxygénées (ROS). En effet, l'oxydation par ces ROS de deux méthionines situées dans le domaine régulateur a le même effet que l'autophosphorylation de la CaMKII, c'est-à-dire qu'elle empêche la réassociation des domaines catalytique et régulateur. Dans les cardiomyocytes, il existe deux isoformes de la CaMKII, un nucléaire (CaMKII δ_B), et un cytoplasmique (CaMKII δ_C) qui est l'isoforme capable de moduler l'activité du canal Na $_v$ 1.5 (Edman and Schulman, 1994; Wagner et al., 2006).

Concernant le rôle de cette CaMKII dans la régulation des canaux Na $_v$ 1.5, Deschênes et ses collaborateurs ont montré, dans des cellules HEK293, que l'inhibition de la CaMKII par le KN93 décale la dépendance au potentiel de l'inactivation vers des potentiels plus dépolarisés, ralentit les cinétiques d'inactivation du courant I_{Na} , ralentit la levée d'inactivation et diminue la proportion de canaux entrant en inactivation intermédiaire I_{IM} et lente I_{slow} (Deschênes et al., 2002). Plus tard, Wagner et ses collaborateurs ont validé ces résultats dans des cardiomyocytes de lapin et ont montré pour la première fois l'interaction directe entre le canal Na $_v$ 1.5 et la CaMKII δ_C par des approches de co-immunoprécipitation, ainsi que leur co-localisation grâce à des expériences d'immunocytochimie dans des cardiomyocytes de lapin (Wagner et al., 2006). Ces travaux ont révélé que la surexpression chronique (dans un modèle de souris transgénique) ou aiguë (dans des cardiomyocytes de lapin en culture) de la CaMKII δ_C provoque simultanément un gain de fonction et une perte de fonction des canaux Na $_v$ 1.5. Plus précisément, les effets perte-de-fonction se caractérisent par un décalage de la disponibilité des canaux Na $_v$ 1.5 vers les potentiels plus négatifs, une augmentation de la proportion de canaux entrant en I_{IM} , qui est concomitante avec un ralentissement de la levée d'inactivation (**Figures 16A, 16B et 16C**), puisque cette inactivation se lève avec des cinétiques plus lentes que l' I_{fast} . Ces effets perte-de-fonction sont similaires à ceux qui caractérisent le syndrome de Brugada. Le gain de fonction de Na $_v$ 1.5 correspond à un ralentissement des cinétiques d'inactivation du courant I_{Na} et une augmentation du courant sodique persistant I_{NaL} (**Figure 16D**). Wagner et ses collaborateurs ont également montré une augmentation de la phosphorylation du canal dans leurs deux modèles de surexpression de la CaMKII δ_C , ce qui suggère fortement l'implication de la phosphorylation du canal par la CaMKII dans la modulation des propriétés d'inactivation de Na $_v$ 1.5 dans leurs modèles (Wagner et al.,

2006). Puis, dans l'objectif d'identifier les sites de phosphorylation impliqués dans cette régulation, Hund et ses collaborateurs ont utilisé une approche de mutagenèse dirigée consistant à muter les résidus sérines et thréonines de $\text{Na}_v1.5$ conformes à la séquence consensus de phosphorylation par la CaMKII (RXXS/T) (Hund et al., 2010). Cette approche leur a permis d'identifier la sérine en position 571 (S571) dans l'interdomaine DI-II comme cible potentielle. Ils ont alors montré que lorsque S571 est mutée en alanine non-phosphorylable (S571A), le canal muté dans des cellules HEK293 ne présente plus de décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs ni d'augmentation du I_{NaL} . Lorsque cette S571 est mutée en glutamate (S571E), résidu mimant la phosphorylation, les effets de la CaMKII sur l'inactivation du canal sont récapitulés. Plus récemment, Ashpole et ses collaborateurs ont montré que la CaMKII interagit avec l'IDI-DII et phosphoryle la sérine S516 et la thréonine T594 de l'IDI-II de $\text{Na}_v1.5$ (Ashpole et al., 2012), ce qui est cohérent avec une étude précédente d'Aiba et de ses collaborateurs sur la localisation de la phosphorylation du canal par la CaMKII (Aiba and Tomaselli, 2010). Cependant, la phosphorylation et le rôle de la S571 dans la modulation des propriétés biophysiques n'ont pas été observés (Ashpole et al., 2012). Les analyses fonctionnelles, consistantes avec les travaux précédents, ont montré que la $\text{CaMKII}\delta_c$ décale la dépendance au potentiel de l'inactivation vers des potentiels hyperpolarisés et augmente la proportion de canaux entrant en inactivation intermédiaire.

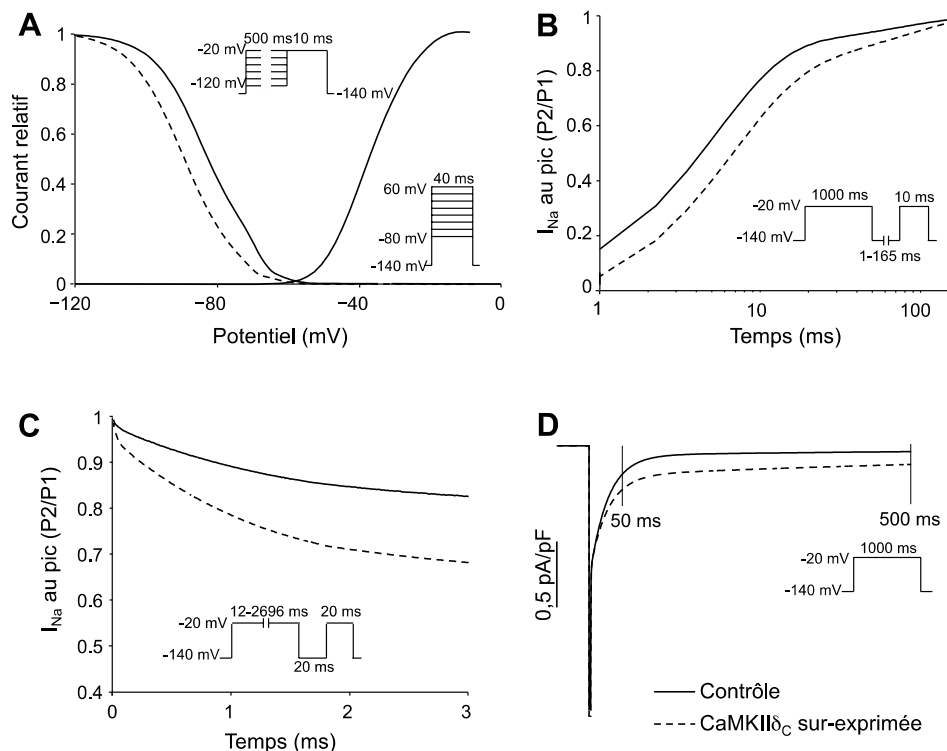


Figure 16 : Effets d'une augmentation de l'activité de la $\text{CaMKII}\delta_c$ sur les propriétés biophysiques du canal $\text{Na}_v1.5$.

Courbes d'activation et de disponibilité des canaux $\text{Na}_v1.5$ (A), de levée d'inactivation (B), de proportion de canaux entrant en inactivation intermédiaire (C) et représentation du courant I_{NaL} (D) estimées à partir des protocoles indiqués, dans des conditions contrôles (lignes pleines) ou de surexpression de la $\text{CaMKII}\delta_c$ (lignes en pointillées). D'après Herren et al., 2013.

En ce qui concerne les effets de la CaMKII sur l'activation du canal, les observations divergent. Alors que la majorité des études réalisées n'a révélé aucune modification de la dépendance au potentiel de l'activation (Aiba et al., 2010; Ashpole et al., 2012; Deschênes et al., 2002; Wagner et al., 2006), Young et Caldwell ont montré que la phosphorylation CaMKII-dépendante décale la courbe d'activation vers des potentiels plus négatifs (Young and Caldwell, 2005). Enfin, concernant la densité de courant, Aiba et ses collaborateurs ont observé que la CaMKII induit une augmentation de la densité de courant I_{Na} (Aiba et al., 2010), alors que d'autres n'ont observé aucun changement (Ashpole et al., 2012; Koval et al., 2012; Wagner et al., 2006).

Pour résumer, l'ensemble de ces études semble s'accorder pour dire que la CaMKII régule les canaux $Na_v1.5$ par phosphorylation et que les effets majeurs de cette phosphorylation concernent les propriétés d'inactivation du canal. Les observations contradictoires des effets de la CaMKII sur les propriétés d'activation, ainsi que sur les propriétés d'inactivation observées par Aiba et ses collaborateurs (décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels dépolarisés, diminution de la proportion de canaux entrant en I_{IM} et accélération de la levée d'inactivation) peuvent s'expliquer par des différences dans l'approche expérimentale utilisée : différences de modèle, d'isoforme de CaMKII, d'apport de CaMKII exogène, de composition des solutions de patch-clamp ou encore d'activateurs/inhibiteurs.

En somme, au même titre que les protéines régulatrices, la phosphorylation du canal sodique cardiaque $Na_v1.5$ joue un rôle clé dans la régulation de l'expression à la surface cellulaire et des propriétés biophysiques du canal. On comprend alors pourquoi une perturbation de l'interaction du canal avec une de ces protéines régulatrices, ou encore une modification de sa phosphorylation, provoquée par des mutations dans le gène *SCN5A*, peut être à l'origine de graves pathologies cardiaques.

II.9. Implications physiopathologiques du canal $Na_v1.5$

Le courant transitoire rapide I_{Na} généré par le canal $Na_v1.5$ joue un rôle clef dans la régulation de la vitesse de dépolarisation et de propagation du PA cardiaque ; le courant persistant I_{NaL} module la durée du PA ; et enfin l'inactivation d' I_{Na} contrôle la durée de la période réfractaire. Ainsi, le canal $Na_v1.5$ joue un rôle majeur dans l'excitabilité cardiaque physiologique, et la moindre perturbation de son fonctionnement ou de son expression peut provoquer des variations du rythme, appelé arythmies ou troubles du rythme cardiaque. Tout comme pour le canal *KCNQ1*, de nombreuses mutations du canal $Na_v1.5$ ont été identifiées dans différentes pathologies cardiaques humaines provoquant un gain ou une perte de fonction du canal. Et de la même manière que pour les mutations modulant l'activité du canal

KCNQ1, d'autres mutations localisées dans les gènes codant pour les protéines partenaires régulatrices du canal $\text{Na}_v1.5$ ont été identifiées et associées aux arythmies cardiaques.

II.9.1. Mutations gain-de-fonction : le syndrome du QT long

Parmi les mutations responsables du syndrome du QT long (LQTS), 13% des patients génotypés présentent un LQTS de type 3 (LQT3) causé par des mutations dans le gène *SCN5A* qui code pour le canal $\text{Na}_v1.5$ (Kapplinger et al., 2009; Wang et al., 1995). Contrairement au LQT1, présenté dans la première partie de cette introduction, le premier signe clinique des patients atteints du LQT3 est l'arrêt cardiaque, le risque de mort subite étant alors particulièrement élevé (Bennett et al., 1995; Zareba et al., 2001). Plus de 80 mutations ont été identifiées dans le gène *SCN5A* chez des patients atteints du LQT3 (Zimmer and Surber, 2008). Celles-ci induisent un gain de fonction du canal $\text{Na}_v1.5$ en altérant l'inactivation rapide, et provoquant ainsi une augmentation du courant I_{NaL} (Bennett et al., 1995). Ces mutations sont essentiellement localisées dans les régions du canal impliquées dans l'inactivation rapide comme le S4 du domaine IV, l'interdomaine IDIII-IV, les B4-5 des domaines III et IV et le CTD (Zimmer and Surber, 2008; Ruan et al., 2009). Les mutations du LQT3 peuvent affecter un ou plusieurs des mécanismes impliqués dans la genèse du courant persistant. Ainsi, de nombreuses mutations provoquent un ralentissement ou une inactivation incomplète (Balser, 1999; Chen et al., 2005; Deschenes et al., 2001; Kass, 2006; Kühn and Greeff, 1999; Motoike, 2004; Nguyen and Goldin, 2010; Ruan et al., 2007; Wedekind et al., 2001; West et al., 1992; Yarov-Yarovoy et al., 2002; Zimmer and Surber, 2008), une augmentation du courant de fenêtre (Abriel et al., 2001; Huang et al., 2011; Oginosawa et al., 2005; Wang et al., 1996c; Wedekind et al., 2001) ou bien une accélération de la levée d'inactivation (Clancy et al., 2003).

Des mutations dans les gènes codant pour les protéines régulatrices du canal $\text{Na}_v1.5$ ont également été identifiées dans d'autres types de LQTS moins fréquents (LQT9, LQT10 et LQT12 ; voir **Tableau I** dans la partie I.5.2). C'est le cas d'une mutation dans le gène codant pour la cavéoline-3 qui augmente la densité du courant I_{NaL} (Vatta et al., 2006). Une autre mutation dans le gène *SCN4B*, codant pour la sous-unité $\text{Na}_v\beta4$ des canaux Na_v , induit un décalage de la courbe d'inactivation vers les potentiels positifs, sans modification de la dépendance au potentiel de l'activation, provoquant alors une augmentation du courant de fenêtre (Medeiros-Domingo et al., 2007). Enfin, deux mutations dans le gène codant pour la syntrophine- $\alpha1$, une protéine du complexe contenant la dystrophine, la dystrobrevine, l'oxyde nitrique synthétase (NOS), et la sérine/thréonine kinase associée au microtubule, provoque une augmentation de la nitrification du canal $\text{Na}_v1.5$ et une augmentation consécutive du courant I_{NaL} (Ueda et al., 2008; Wu et al., 2008).

II.9.2. Pathologies associées à des mutations perte-de-fonction

Parmi les pathologies associées à des mutations perte-de-fonction de $\text{Na}_v1.5$, on retrouve le syndrome de Brugada (BrS) qui se caractérise par des troubles du rythme ventriculaire et un risque élevé de mort subite chez des patient âgés en moyenne de moins de 40 ans, avec un cœur structurellement sain (Brugada and Brugada, 1992). Le BrS est une pathologie à transmission autosomique dominante et qui, pour plus de 60% des patients, semble être d'origine sporadique, c'est-à-dire que la mutation du patient n'est retrouvée chez aucun de ses parents ou membre de sa famille (Schulze-Bahr et al., 2003). A l'heure actuelle, plus de 350 mutations portant sur 17 gènes différents ont été décrits chez les patients atteints du BrS (**Tableau III**). Malgré le grand nombre de gènes identifiés, l'origine génétique de cette pathologie n'a pu être déterminée que pour seulement $\approx 35\%$ des patients (Kapplinger et al., 2010). Près de 30% des patients génotypés sont porteurs d'une mutation dans le gène *SCN5A*, responsable du BrS de type 1 (BrS1). Même si ces mutations sont situées dans des régions différentes du canal, elles vont toutes conduire à une diminution du courant I_{Na} mais par des mécanismes différents comme une diminution de l'expression du canal à la surface cellulaire (Baroudi et al., 2001; Pfahnl et al., 2007; Valdivia et al., 2004), l'expression d'un canal non fonctionnel (Kyndt et al., 2001), ou encore des modifications des propriétés biophysiques du canal (Amin et al., 2005; Bezzina et al., 1999; Calloe et al., 2013; Chiang et al., 2009; Dumaine et al., 1999; Hsueh et al., 2009; Keller et al., 2005; Smits et al., 2005; Veldkamp et al., 2000). Ainsi, certaines mutations modifient les cinétiques et la dépendance au potentiel de l'activation, de l'inactivation ou de la levée d'inactivation (Bezzina et al., 1999; Calloe et al., 2013; Dumaine et al., 1999; Hsueh et al., 2009; Keller et al., 2005; Smits et al., 2005), alors que d'autres augmentent la proportion de canaux entrant en inactivation intermédiaire ou lente (Amin et al., 2005; Bezzina et al., 1999; Chiang et al., 2009; Veldkamp et al., 2000). Enfin, comme on peut le voir dans le **Tableau III**, des mutations dans les gènes codant pour les protéines capables de réguler le canal $\text{Na}_v1.5$ ont été identifiées pour d'autres types du BrS (BrS2, 5, 7, 11, 15 et 17 ; **Tableau III**).

D'autres mutations sur le canal sodique cardiaque et ses protéines régulatrices sont à l'origine d'autres pathologies cardiaques héréditaires. C'est le cas des troubles progressifs de la conduction (également appelés maladie de Lev ou maladie de Lenègre), par exemple, qui se manifestent par un ralentissement progressif de la conduction qui peut conduire à des épisodes de syncope, voir à la mort subite du patient. Dans les formes héréditaires, le ralentissement de la conduction peut être causé par des mutations dans le gène codant pour le canal $\text{Na}_v1.5$ ou la sous-unité $\text{Nav}\beta 1$, conduisant à une diminution du courant I_{Na} soit par une diminution d'expression du canal à la membrane plasmique, l'expression d'un canal non-fonctionnel, ou encore une modification des propriétés biophysiques du canal $\text{Na}_v1.5$ (Probst et al., 2003; Schott et al., 1999; Tan et al., 2001; Watanabe et al., 2008; Zimmer and

Surber, 2008). De façon similaire, les formes héréditaires du syndrome de dysfonctionnement du nœud sinusal, sont causés par des mutations dans le gène *SCN5A* qui vont induire une diminution de la densité de courant sodique *via* une diminution d'expression du canal fonctionnel à la surface cellulaire ou une perte de fonction sur l'activation ou l'inactivation du canal $\text{Na}_v1.5$ (Benson et al., 2003; Lei et al., 2008). De façon plus surprenante des mutations responsables d'un gain de fonction du canal ont également été décrites chez des patients présentant ce syndrome, qui se caractérise par un ralentissement, voir blocage, de la conduction des PA du nœud sinusal vers le muscle atrial qui l'entoure (Lei et al., 2008).

Ainsi, la même pathologie cardiaque peut être provoquée par un gain et une perte de fonction du canal $\text{Na}_v1.5$. Comme nous allons le voir par la suite, ce phénomène n'est pas attribuable qu'au syndrome de dysfonctionnement du nœud sinusal.

Tableau III : Les différentes formes du syndrome de Brugada et les gènes associés.

Type	Gène	Protéine	Courant ionique affecté	Incidence (en %)	Références
1	<i>SCN5A</i>	$\text{Na}_v1.5$	PdF I_{Na}	11-24	(Chen et al., 1998)
2	<i>GPD1-L</i>	G3PD1L	PdF I_{Na}	Rare	(London et al., 2007)
3	<i>CACNA1C</i>	$\text{Ca}_v1.2$	PdF Ica_{L}	6-7	(Antzelevitch et al., 2007)
4	<i>CACNB2</i>	$\text{Ca}_v\beta 2$	PdF Ica_{L}	4-5	(Antzelevitch et al., 2007)
5	<i>SCN1B</i>	$\text{Na}_v\beta 1$	PdF I_{Na}	1-2	(Watanabe et al., 2008)
6	<i>KCNE3</i>	MiRP2	GdF $\text{I}_{\text{to}}/\text{I}_{\text{Ks}}$	<1	(Delpón et al., 2008)
7	<i>SCN3B</i>	$\text{Na}_v\beta 3$	PdF I_{Na}	Rare	(Hu et al., 2009)
8	<i>KCNH2</i>	hERG1	PdF I_{Kr}	Rare	(Itoh et al., 2009; Verkerk et al., 2005)
9	<i>KCNJ8</i>	Kir6.1	GdF I_{KATP}	Rare	(Medeiros-Domingo et al., 2010)
10	<i>CACNA2D1</i>	$\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$	Indéterminé Ica_{L}	Rare	(Burashnikov et al., 2010)
11	<i>RANGRF</i>	MOG1	PdF I_{Na}	Rare	(Kattygnarath et al., 2011)
12	<i>KCNE5</i>	MiRP4	GdF $\text{I}_{\text{to}}/\text{I}_{\text{Ks}}$	Rare	(Ohno et al., 2011)
13	<i>KCND3</i>	$\text{K}_v4.3$	GdF I_{to}	Rare	(Giudicessi et al., 2011)
14	<i>HCN4</i>	HCN4	Indéterminé I_f	Rare	(Crotti et al., 2012)
15	<i>SLMAP</i>	SLMAP	PdF I_{Na}	Rare	(Ishikawa et al., 2012)
16	<i>TRMP4</i>	TRMP4	GdF et PdF NSC_{Ca}	6	(Liu et al., 2013)
17	<i>SCN2B</i>	$\text{Na}_v\beta 2$	PdF I_{Na}	Rare	(Riuró et al., 2013)

GdF : gain de fonction ; PdF : perte de fonction.

II.9.3. Pathologies associées à des mutations gain- et perte-de-fonction

La cardiomyopathie dilatée (CMD) est une pathologie cardiaque caractérisée par une dilatation ventriculaire associée à une diminution de sa fonction contractile (systole), pouvant conduire à une insuffisance cardiaque. La CMD est pour moitié d'origine idiopathique, c'est-à-dire qu'elle n'est pas la conséquence d'une pathologie acquise, et parmi ces formes idiopathiques, 20% d'entre elles sont héréditaires (Michels et al., 1992). Tout comme pour le syndrome de dysfonctionnement du nœud sinusal, des mutations gain-de-fonction et perte-de-fonction sur les propriétés d'activation et d'inactivation du canal sodique cardiaque ont pu être retrouvées chez des patients atteints de CMD (Ge et al., 2008; McNair et al., 2004; Nguyen et al., 2008; Olson and Keating, 1996). Les mécanismes responsables de CMD causée par des mutations sur *SCN5A* semblent complexes, et font intervenir des dysfonctionnements du canal ainsi que des anomalies structurales (Hesse et al., 2007).

La CMD est souvent associée à une autre pathologie cardiaque, la fibrillation auriculaire (FA) (Olson et al., 2005). La FA, qui est la pathologie la plus fréquemment retrouvée chez les patients atteints de trouble du rythme cardiaque, peut être héréditaire, causée par des mutations sur les gènes codants pour le canal $KCNQ1$ (voir la partie I.5.1), le canal $Na_v1.5$ (Chen et al., 2007a; Ellinor et al., 2008; Li et al., 2009; Makiyama et al., 2008; Olson et al., 2005), ou les sous-unités $Na_v\beta1$ et $Na_v\beta2$ (Watanabe et al., 2009). La FA, tout comme le SSS et la CMD, peut être provoquée par des mutations perte- et gain-de-fonction du canal $Na_v1.5$. Les mutations gain-de-fonction de *SCN5A* pourraient initier la fibrillation auriculaire par une augmentation de l'excitabilité des oreillettes (Li et al., 2009; Makiyama et al., 2008), et les mutations perte-de-fonction, en induisant un ralentissement dans la conduction, peuvent entretenir cette fibrillation par le maintien des phénomènes de réentrées (Chen et al., 2007a; Ellinor et al., 2008).

II.9.4. Les syndromes chevauchants

Les troubles du rythme associés à des mutations sur le gène *SCN5A* ont été considérés comme des entités cliniques séparées avec des propriétés phénotypiques différentes. Cependant, de plus en plus de travaux ont montré qu'il peut exister des chevauchements entre ces différentes canalopathies associées à $Na_v1.5$ sur le plan clinique et biophysique. On regroupe alors sous le terme de syndrome chevauchant ces pathologies arythmogéniques qui présentent des chevauchements dans les symptômes cliniques, ou encore lorsqu'une même mutation sur *SCN5A* provoque des troubles du rythme variés dans des familles différentes, ou même au sein d'une même famille. L'association phénotypique la plus inattendue est celle du LQT3 et du BrS puisque les mutations dans *SCN5A* responsables du LQT3 sont toutes associées à un gain de fonction du canal $Na_v1.5$, alors que le BrS est

causé par des mutations perte-de-fonction du canal. Plusieurs études d'une mutation provoquant l'insertion d'un acide aspartique (D) en position 1795 dans la séquence protéique du canal $\text{Na}_v1.5$ (1795insD) ont montré qu'à elle seule la mutation est suffisante pour expliquer les différents phénotypes (Baroudi and Chahine, 2000; Bezzina et al., 1999; Clancy and Rudy, 2002; Remme et al., 2006; van Den Berg et al., 2001; Veldkamp et al., 2000). Il s'agit de la première mutation décrite au sein d'une famille multigénérationnelle présentant des caractéristique électrocardiographiques spécifiques du LQT3 et du BrS (Bezzina et al., 1999). Grâce à un modèle mathématique, Clancy et Rudy ont montré que pour des fréquences basses de stimulation, l'APD des cellules M mutées est allongée, ce qui peut expliquer l'apparition d'un LQTS à basse fréquence cardiaque. En augmentant la fréquence de stimulation, ils ont observé une diminution de la disponibilité des canaux sodiques (décalage de la dépendance au potentiel de l'inactivation vers des potentiels plus négatifs), et donc une diminution du courant I_{Na} , provoquant ainsi une perte de la phase de plateau du PA. Ce phénomène augmente l'hétérogénéité de la repolarisation entre les différentes couches musculaires transmuraux cardiaques, se traduisant par un aspect de BrS à l'ECG (Clancy and Rudy, 2002). Ces résultats ont par la suite été confirmés dans un modèle de souris transgéniques hétérozygotes pour la mutation 1795insD (Remme et al., 2006). Les auteurs ont observé une dysfonction sinusale chez ces souris, un allongement des intervalles PQ, QT et du complexe QRS ainsi qu'un ralentissement de la conduction dans le ventricule droit. Des approches fonctionnelles dans des cardiomyocytes ventriculaires isolés à partir de ces souris ont mis en évidence une prolongation de la phase de repolarisation du PA surtout à faible fréquence de stimulation, et une diminution de la disponibilité des canaux sodiques à haute fréquence, validant ainsi les résultats basés sur le modèle de Clancy et Rudy. Ils ont montré de plus une diminution de la densité de courant I_{Na} , un ralentissement de l'inactivation rapide ainsi qu'une augmentation du courant Na^+ persistant (Remme et al., 2006). Ces différentes observations permettent d'expliquer la coexistence des deux phénotypes BrS et LQT chez les patients porteurs de la mutation 1795insD du canal $\text{Na}_v1.5$.

II.9.5. Insuffisance cardiaque

En plus de son implication dans des pathologies héréditaires, des dysfonctionnements du canal $\text{Na}_v1.5$ ont également été décrits dans des pathologies acquises fréquentes, comme l'insuffisance cardiaque (IC). L'IC est une pathologie caractérisée par une anomalie de la fonction cardiaque, et environ 50% des patients insuffisants cardiaques sont victimes de mort subite provoquée par des arythmies cardiaques (Huikuri et al., 2001). La plupart de ces arythmies sont les conséquences d'un remodelage fonctionnel des connexines, qui jouent un rôle majeur dans le couplage électrique entre cardiomyocytes, ainsi que des canaux ioniques (Aiba and Tomaselli, 2010; Wang and Hill, 2010). Le

remodelage cardiaque est un déterminant clinique dans l'évolution de l'IC qui englobe des modifications anatomiques et fonctionnelles du tissu cardiaque comme l'augmentation de la taille des cardiomyocytes (hypertrophie) ou la détérioration de la fonction cardiaque (Cohn et al., 2000). Ce remodelage permet de maintenir la fonction cardiaque, mais il devient progressivement défavorable conduisant à une décompensation, c'est-à-dire à l'apparition de troubles du rythme et la réduction de la fonction contractile (Nattel et al., 2001). Ces troubles du rythme sont majoritairement la conséquence des modifications de la fonction des canaux ioniques cardiaques, parmi lesquels le canal $\text{Na}_v1.5$ est connu pour influencer significativement la progression de l'IC (Aiba and Tomaselli, 2010; Wang and Hill, 2010).

En effet, de nombreuses études ont montrés que la densité de courant I_{NaL} est augmentée dans l'IC chez l'Homme et dans de nombreux modèles animaux (Aiba and Tomaselli, 2010; Ashpole et al., 2012; Maltsev et al., 2007; Maltsev and Undrovinas, 2008; Undrovinas et al., 1999; Valdivia et al., 2005; Wagner et al., 2006). Une perte de fonction du canal $\text{Na}_v1.5$ a également été montrée par une diminution du courant I_{Na} (Casini et al., 2009; Shang et al., 2007; Ufret-Vincenty et al., 2001). Cette diminution du courant I_{Na} décrite comme étant causée par des modifications de l'expression et/ou de l'épissage du transcrit du canal $\text{Na}_v1.5$ (Shang et al., 2007), de la glycosylation de la protéine $\text{Na}_v1.5$ (Ufret-Vincenty et al., 2001), ou encore par une augmentation de la concentration calcique intracellulaire (Casini et al., 2009), induit un ralentissement de conduction et des troubles du rythme ventriculaires provoqués par des phénomènes de réentrées.

Plusieurs études se sont intéressées aux déterminants moléculaires responsables de cette augmentation de I_{NaL} dans l'IC. Comme énoncé précédemment, de nombreuses protéines interagissent et modulent l'expression ou l'activité du canal $\text{Na}_v1.5$. Certaines d'entre elles, comme la sous-unité $\text{Na}_v\beta1$, ont été impliquées dans l'augmentation du I_{NaL} dans l'IC (Mishra et al., 2011). En effet, des travaux ont montré que l'expression relative de $\text{Na}_v\beta1$ était augmentée par rapport à $\text{Na}_v1.5$ dans un modèle de chien insuffisant cardiaque puisque la quantité de protéine du canal est diminuée dans l'IC (Shang et al., 2007), mais $\text{Na}_v\beta1$ reste inchangé dans ce modèle (Zicha et al., 2004). De plus, une étude récente a montré que l'extinction de l'expression de cette sous-unité $\beta1$ accélère la cinétique d'inactivation du courant I_{Na} , et diminue la densité de courant I_{NaL} dans des modèles de chiens sauvage et insuffisant cardiaque, suggérant que $\text{Na}_v\beta1$ serait impliquée dans la modulation du courant I_{NaL} (Mishra et al., 2011). Ces résultats sont cohérents avec le rôle précédemment décrit de $\text{Na}_v\beta1$ dans la modulation de l'inactivation du canal $\text{Na}_v1.5$, dépendante de l'état de polymérisation des microtubules du cytosquelette (Casini et al., 2010). Cette dernière étude valide l'implication des protéines du cytosquelette dans la modulation du courant I_{NaL} dans l'IC. Par exemple, des travaux ont montré que

l'organisation structurale de la fodrine (autre nom de la spectrine), composante du cytosquelette, est modifiée dans des conditions d'IC (Hein et al., 2000; Heling et al., 2000), et que des anticorps dirigés contre la spectrine augmentent le courant I_{NaL} dans des cardiomyocytes ventriculaires isolés à partir de rats (Maltsev and Undrovinas, 2008). Finalement, il a été démontré que les défauts d'inactivation du canal $Na_v1.5$ observés dans l'IC sont associés à l'activation de la CaMKII (Wagner et al., 2006). Le gain de fonction de la CaMKII sur le I_{NaL} peut ralentir la repolarisation, augmentant la durée du PA, et créant ainsi des conditions favorables au développement de post-dépolarisations précoces et retardées (respectivement EAD et DAD) (Shryock et al., 2013).

La phosphorylation du canal sodique cardiaque $Na_v1.5$ apparaît de plus en plus comme un mécanisme clé impliqué dans les phénomènes arythmogènes de nombreuses pathologies cardiaques. Cependant, les mécanismes impliqués dans la régulation de $Na_v1.5$ par les différentes kinases font encore l'objet de nombreuses controverses. C'est le cas pour la CaMKII, en particulier dans le contexte de l'IC où son expression et son activité sont augmentées. Ainsi, **mon deuxième projet de thèse a consisté à caractériser le rôle de deux sérines, S1933 et S1984, dans l'altération des propriétés d'inactivation du canal $Na_v1.5$ associée à l'insuffisance cardiaque.**

Objectifs

Projet 1 :

Mon premier projet de thèse a consisté à identifier les déterminants moléculaires responsables d'une diminution de la sensibilité aux variations de quantité de PIP_2 du canal potassique cardiaque KCNQ1 portant la mutation R539W, identifiée chez des patients atteints du syndrome du QT long.

Projet 2 :

Mon deuxième projet de thèse a consisté à caractériser le rôle de deux sérines, S1933 et S1984, dans l'altération des propriétés d'inactivation du canal $\text{Na}_v1.5$ dans le contexte de l'insuffisance cardiaque.

Résultats

I. Projet 1 : Identification des déterminants moléculaires responsables d'une diminution de la sensibilité aux variations de PIP₂ membranaire du canal KCNQ1-R539W

I.1. Introduction

Comme décrit dans l'introduction générale, le PIP₂ est un phospholipide membranaire essentiel pour l'activité de la plupart des canaux, à quelques exceptions près comme les canaux Na_v (Gamper and Shapiro, 2007; Logothetis et al., 2010; Suh and Hille, 2008). Tout comme pour de nombreux canaux ioniques (e.g. Kir6.2, hERG, Shaker), le PIP₂ stabilise le canal potassique cardiaque KCNQ1 à l'état ouvert (Choveau et al., 2012). Des études de cristallographie de canaux Kir ont permis de montrer que le PIP₂ interagit avec des résidus proches de la porte d'activation des canaux Kir2.2 et Kir3.2, ou encore qu'il permet l'ancrage de l'ensemble du domaine C-terminal (CTD) aux domaines transmembranaires des canaux Kir2.2 (Hansen et al., 2011; Whorton and MacKinnon, 2011), conduisant à l'ouverture du canal. Bien qu'il s'agisse de canaux à deux domaines transmembranaires, ces mécanismes pourraient s'appliquer au canal potassique KCNQ1 possédant six domaines. En effet, pour ces deux types de canaux, les études biophysiques suggèrent que le PIP₂ stabilise la porte du canal à l'état ouvert (Enkvetchakul et al., 2000; Loussouarn et al., 2003), et les résidus positifs identifiés juste après le segment S6 de KCNQ1 pourraient (Thomas et al., 2011), tout comme les résidus proches de la porte d'activation M2 de Kir2.2 et de Kir3.2 (Whorton and MacKinnon, 2011), interagir avec le PIP₂ provoquant une stabilisation de l'état ouvert du canal. De plus, tout comme pour les canaux Kir2.2 (Hansen et al., 2011), des résidus situés dans la partie distale du CTD pourraient également interagir avec le PIP₂ membranaire et provoquer un rapprochement de l'ensemble du CTD avec le pore du canal KCNQ1 afin de moduler son ouverture. Cette dernière hypothèse est soutenue par différentes études qui montrent le rôle physiopathologique de l'interaction PIP₂-CTD (Dvir et al., 2014; Li et al., 2011; Park, 2005). Ces travaux indiquent que des mutations localisées dans le CTD provoquent une diminution de l'affinité du canal KCNQ1 pour la PIP₂, ce qui provoque une perte de fonction du canal qui est à l'origine du syndrome du QT long de type 1 (LQT1) des patients porteurs de ces mutations.

Park et ses collaborateurs ont montré pour la première fois l'implication d'une diminution de l'affinité pour le PIP₂ du canal KCNQ1 exprimant des mutations responsables du LQT1 (Park, 2005). Les auteurs ont étudiés trois mutations, une localisée dans la boucle B4-5, la mutation R243H, et les deux autres situées dans le CTD, les mutations R539W et R555C. En plus de leur proximité, les mutations

R539W et R555C provoquent un décalage similaire de la courbe d'activation vers les potentiels plus dépolarisés, un ralentissement comparable de la cinétique de désactivation du canal KCNQ1 et ces deux canaux mutants présentent la même sensibilité pour le diC8-PIP₂. De façon surprenante, le phénotype des patients porteur de ces deux types de mutations est différent puisque la mutation R555C est associée à une forme fruste du LQT1, alors que des cas de morts subites ont été identifiés chez des patients porteurs de la mutation R539W (Chouabe et al., 2000; Donger et al., 1997). Deux éléments suggèrent qu'il peut finalement y avoir des différences entre les deux mutants. Premièrement, dans l'étude de Park et de ses collaborateurs, l'affinité relative des canaux mutants pour le PIP₂ a été déterminée grâce à l'utilisation d'un analogue à chaîne courte, le diC8-PIP₂. Cependant, il a été démontré depuis que le canal potassique hERG, qui est pourtant sensible au PIP₂, est insensible à cet analogue à chaîne courte, suggérant ainsi que l'affinité d'un canal pour le PIP₂ et le diC8-PIP₂ peut être différente (Rodriguez et al., 2010). Deuxièmement, le canal mutant R539W est, contrairement à R555C, moins sensible à une diminution de la quantité de PIP₂ que le canal KCNQ1 sauvage (Park, 2005). En général, un canal dont l'affinité au PIP₂ est réduite montre une diminution de courant (rundown) plus rapide lors d'une diminution du PIP₂, un critère largement utilisé pour déterminer l'affinité (apparente) du canal au PIP₂ (Ballester et al., 2007; Dvir et al., 2014; Huang et al., 1998; Kozak et al., 2005; Liu and Qin, 2005; Loussouarn et al., 2003; Park, 2005; Pattnaik and Hughes, 2009; Pian et al., 2006; Rodriguez et al., 2010; Suh and Hille, 2007).

A partir de ces observations, nous avons entrepris d'utiliser d'autres approches pour étudier plus en détail la sensibilité au PIP₂ des trois canaux KCNQ1 mutés R243H, R539W et R555C. Nous avons retenu trois méthodes complémentaires pour provoquer une diminution de PIP₂ : l'application de wortmannin, inhibiteur de la PI4-kinase intervenant dans la synthèse du PIP₂, en configuration patch perméabilisé ; l'application de Mg²⁺ qui interagit avec les charges négatives du PIP₂, en configuration inside-out ; et la co-expression de la phosphatase dépendante au potentiel de l'ascidie *Ciona intestinalis*, la Ci-VSP, en configuration cellule entière de la technique de patch clamp.

Cette étude a fait l'objet d'un article publié dans le journal « PLoS ONE » (Coyan et al., 2014).

A Long QT Mutation Substitutes Cholesterol for Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate in KCNQ1 Channel Regulation

Fabien C. Cohan^{1,2,3}, Fayal Abderemane-Ali^{1,2,3}, Mohamed Yassine Amarouch^{1,2,3}, Julien Piron^{1,2,3}, Jérôme Mordel^{1,2,3}, Céline S. Nicolas^{1,2,3ab}, Marja Steenman^{1,2}, Jean Mérot^{1,2,3}, Céline Marionneau^{1,2,3}, Annick Thomas⁴, Robert Brasseur⁵, Isabelle Baró^{1,2,3}, Gildas Loussouarn^{1,2,3*}

¹l'institut du thorax, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Nantes, France, ²Unité Mixte de Recherche 6291, Centre National de la Recherche Scientifique, Nantes, France, ³Unité de Formation et de Recherche de Médecine, Université de Nantes, Nantes, France, ⁴Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Centre National de la Recherche Scientifique, Toulouse, France, ⁵Centre de Biophysique Moléculaire Numérique, University of Liège, Gembloux, Belgium

Abstract

Introduction: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) is a cofactor necessary for the activity of KCNQ1 channels. Some Long QT mutations of KCNQ1, including R243H, R539W and R555C have been shown to decrease KCNQ1 interaction with PIP₂. A previous study suggested that R539W is paradoxically less sensitive to intracellular magnesium inhibition than the WT channel, despite a decreased interaction with PIP₂. In the present study, we confirm this peculiar behavior of R539W and suggest a molecular mechanism underlying it.

Methods and Results: COS7 cells were transfected with WT or mutated KCNE1-KCNQ1 channel, and patch-clamp recordings were performed in giant-patch, permeabilized-patch or ruptured-patch configuration. Similar to other channels with a decreased PIP₂ affinity, we observed that the R243H and R555C mutations lead to an accelerated current rundown when membrane PIP₂ levels are decreasing. As opposed to R243H and R555C mutants, R539W is not more but rather less sensitive to PIP₂ decrease than the WT channel. A molecular model of a fragment of the KCNQ1 C-terminus and the membrane bilayer suggested that a potential novel interaction of R539W with cholesterol stabilizes the channel opening and hence prevents rundown upon PIP₂ depletion. We then carried out the same rundown experiments under cholesterol depletion and observed an accelerated R539W rundown that is consistent with this model.

Conclusions: We show for the first time that a mutation may shift the channel interaction with PIP₂ to a preference for cholesterol. This de novo interaction wanes the sensitivity to PIP₂ variations, showing that a mutated channel with a decreased affinity to PIP₂ could paradoxically present a slowed current rundown compared to the WT channel. This suggests that caution is required when using measurements of current rundown as an indicator to compare WT and mutant channel PIP₂ sensitivity.

Citation: Cohan FC, Abderemane-Ali F, Amarouch MY, Piron J, Mordel J, et al. (2014) A Long QT Mutation Substitutes Cholesterol for Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate in KCNQ1 Channel Regulation. PLoS ONE 9(3): e93255. doi:10.1371/journal.pone.0093255

Editor: Alexander G. Obukhov, Indiana University School of Medicine, United States of America

Received: June 11, 2013; Accepted: March 3, 2014; Published: March 28, 2014

Copyright: © 2014 Cohan et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-05-JCJC-0160-01), the ARMTéléthon, and a Marie Curie International Outgoing Fellowship within the 7th European Community Framework Programme (GL). FCC and FA-A were recipients of a grant from the French Ministère de la Recherche. FA-A was supported by the Fondation d'entreprise Genavie. JP was supported by the Association Française contre les Myopathies. CSN was supported by the INSERM (poste d'accueil). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: gildas.loussouarn@inserm.fr

These authors contributed equally to this work.

^{aa} Current address: Department of Clinical Research, University of Bern, Bern, Switzerland

^{ab} Current address: Institut de Biologie Valrose, CNRS, Nice, France

Introduction

Cholesterol regulates several ion channels, and changes in membrane cholesterol levels provoke various effects depending on the channel type (reviewed in [1,2]). Regarding inwardly rectifying K⁺ channels (Kir), cholesterol effects have been studied in detail. Effects of cholesterol increase or depletion vary among families and even among channels of the same family. Similarly to Kir channels, functional effects of cholesterol on voltage-gated (Kv)

channel activity are highly variable: an increase in Kv2.1 current in *Drosophila* neurons [3] and a suppression of the same current in mammalian pancreatic b-cells [4]. Adding more complexity, effects on the cardiac potassium channel KCNQ1 are variable depending on the drug used to decrease cholesterol levels [5,6]. More specifically, Probucol - known as a cholesterol depleting agent - is able to decrease the coexpressed KCNE1/KCNQ1 current amplitude [5] without decreasing cholesterol levels in CHO-K1 [6]. Simvastatin and triparanol are more specific since

their main effects (activation kinetics) are similar and correlated to a cholesterol decrease. Clearly, cholesterol effects on KCNQ1 channels remain to be studied in more detail.

Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) is abundant in cholesterol-rich membrane domains [7]. The mechanisms by which PIP₂ regulates several channels, including KCNQ1, have been studied in much greater detail than the mechanism of their regulation by cholesterol [8–16]. PIP₂ is a minor acidic membrane lipid found primarily in the inner leaflet of the plasma membrane. It has been shown to be a necessary cofactor for a wide variety of ion channels and transporters [17]. In Kir and Kv channels, several stimuli impact channel activity by decreasing available PIP₂ or modulating channel-PIP₂ interactions [8,9,18–20]. Consistent with PIP₂ regulating channel activities, mutations that impair channel-PIP₂ interactions play a crucial role in channelopathies. Regarding KCNQ1, we have shown that type 1 long QT (LQT1) syndrome can be associated with a decrease in KCNQ1-PIP₂ interactions provoked by mutations in the S4–S5 linker (R243H) and in the C-terminal domain CTD (R539W and R555C) [10]. This has since been confirmed for mutations R539W and R555C [11,12].

In previous studies, PIP₂ sensitivity of the KCNQ1 mutants R243H, R539W and R555C was determined by using the soluble short acyl chains analog diC8-PIP₂ [10]. Since then, PIP₂-regulated Kv11.1 channels have been shown to be insensitive to diC8-PIP₂ [21], suggesting that channel affinity for PIP₂ and diC8-PIP₂ might be quite different. Moreover, the R539W behavior seems paradoxical since, in COS-7 cells, this mutant was shown to be less sensitive than WT to intracellular Mg²⁺, which decreases PIP₂ availability through masking its negative charges [10]. In general, any mutation that reduces channel affinity to PIP₂ provokes an increased inhibition by Mg²⁺ [18]. Hence, we set out to use other approaches to further study the PIP₂ affinity of KCNQ1 mutant channels in the presence of KCNE1. We measured the kinetics of Mg²⁺-, wortmannin- and Ci-VSP-induced current rundown and confirmed a decreased PIP₂ affinity for two of the three mutants. To our surprise, for the third mutant (R539W) the current is running down more slowly when available PIP₂ is decreased. We therefore hypothesized that the KCNQ1-R539W mutation leads to the stabilization of an open-pore conformation shortcutting the PIP₂ effect on the concerted opening. Using both modeling and functional analyses, we show for the first time that a mutation in the CTD domain shifts the channel interaction with PIP₂ to a preference for cholesterol.

In conclusion, our study shows that cholesterol affects the rundown of R539W but not of WT KCNE1-KCNQ1 channels, suggesting that cholesterol specifically stabilizes opening of R539W channels and decreases their need for PIP₂ to be open. Estimating a channel affinity to PIP₂ from the kinetics of the current rundown when PIP₂ decreases is an approach that has been commonly used. This study indicates that such an approach is not always relevant, since the mutation that disrupts the interaction with PIP₂ may stabilize the channel open state through another mechanism.

Methods

Cell culture and transfection

The African green monkey kidney-derived cell line COS-7 was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (GIBCO, Paisley, Scotland). Cells were transfected with plasmids (2 µg per 35 mm dish) complexed with Eugene-6 (Roche Molecular Biochemical) for giant-patch and ruptured-patch

experiments, or Jet-PEI (Polyplus-Transfection) for permeabilized-patch experiments, according to the standard protocol recommended by the manufacturers. We used a construct of hKCNQ1 fused to hKCNE1 (KCNE1-KCNQ1) to prevent variability caused by a variable KCNE1/KCNQ1 expression ratio [10]. This type of construct is justified by the fact that the cardiac channel is generated by the assembly of 4 KCNQ1 and up to 4 KCNE1 subunits [22]. For giant-patch experiments, the relative DNA composition was 80% pCDNA3.1 plasmid containing the human WT or mutated KCNE1-KCNQ1 concatemer [10,23] and 20% pEGFP coding for the green fluorescent protein (Clontech). For permeabilized-patch experiments testing the effects of osmolarity, relative DNA composition was 40% pCDNA3.1 KCNE1-KCNQ1 and 60% pEGFP. For permeabilized-patch experiments testing the PKA-dependent channel upregulation, relative DNA composition was 20% pCDNA3.1-KCNE1-KCNQ1, 40% pEGFP and 40% pCDNA3-yotiao (a kind gift of Dr Robert S. Kass, Department of Pharmacology, College of Physicians & Surgeons, Columbia University, New York, NY, USA). For ruptured-patch experiments testing the effects of Ci-VSP, relative DNA composition was 20% pCDNA3.1-KCNE1-KCNQ1, 70% pEGFP and 10% pRFP-C1-Ci-VSP (a kind gift of Dr Dominik Oliver, Institute of Physiology and Pathophysiology, Philipps-Universität Marburg, Marburg, Germany).

Electrophysiology

Forty-eight to seventy-two hours post-transfection, COS-7 cells were mounted on the stage of an inverted microscope and constantly perfused at a rate of 2 mL/min. Experiments were performed at room temperature for giant-patch and ruptured-patch configurations, or 35.0±1.0°C for permeabilized-patch configuration. Stimulation, data recording, and analysis were performed either by Acquis1 (Bio-logic Science Instruments, Claix, France) through an analog-to-digital converter (Tecmar TM100 Labmaster; Scientific Solution, Solon, OH, USA), or by pClamp10.4 through an analog-to-digital converter (Axon Digidata 1440, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Electrodes were electrically connected to a patch-clamp amplifier (RK-400, Bio-logic Science Instruments, Claix, France).

For giant-patch experiments, the procedure has been described previously [24]. An 'excision' pipette, filled with the standard solution, was connected to a 10 ml syringe to apply suction for excision. Pipettes were pulled from borosilicate glass capillaries (glass type 8250; Garner Glass) on a vertical puller (P30; Sutter Instruments Co., Novato, CA, USA) and fire polished using a microforge (MF-83; Narishige, Japan) to reach 9 to 12 µm tip diameters for patch pipettes and around 15 µm for excision pipettes. Cells were continuously perfused with the standard solution. KCNE1-KCNQ1 currents were analyzed using a protocol consisting of depolarizing voltage steps of 1 s from a holding potential of −80 mV to +80 mV and then to −40 mV for 0.5 s, every 5 or 2 s. A microperfusion system allowed local application and rapid change of the different experimental solutions.

For permeabilized-patch experiments, micropipettes (tip resistance: 2–3 MOhms) were pulled from soda lime glass (Kimble; Vineland, New Jersey, USA). KCNE1-KCNQ1 currents were investigated with a protocol consisting of depolarizing voltage steps of 4 s from a holding potential of −80 mV to +80 mV and then to −40 mV for 1 s, every 7 s. To obtain the WT activation curve, the membrane potential was stepped, from a holding potential (−80 mV) to six voltage steps (−20 to 80 mV, with a 20 mV increment) and then stepped back to −40 mV, where tail currents are visible. To obtain the R539W activation curve, the membrane

potential was stepped, from a holding potential (-80 mV) to six voltage steps (20 to 120 mV, with a 20 mV increment) and then stepped back to -40 mV, where tail currents are visible. Activation curves were fitted by a Boltzmann equation. KCNE1-KCNQ1 deactivation kinetics were obtained by a monoexponential fit.

For ruptured-patch experiments (Ci-VSP), the same pipettes as for permeabilized-patch experiments were used. KCNE1-KCNQ1 currents were investigated with a protocol consisting of depolarizing voltage steps of 2 s from a holding potential of -80 mV to $+80$ mV and then to -40 mV for 1 s, every 8 s.

Patch-clamp data are presented as mean $\pm$ SEM. Statistical significance of the observed effects was assessed by one-way ANOVA or Student's *t*-tests. Off-line analysis was performed using Acquis1, Clampfit and Microsoft Excel programs. Microsoft Solver was used to fit data by a least-square algorithm.

Solutions and drugs

For giant-patch experiments, the cells were perfused with a standard solution containing (in mmol/L): 145 KCl, 10 HEPES, 1 EGTA (pH 7.3 with KOH). The following solution (in mmol/L): 145 K-gluconate, 10 HEPES, 1 EGTA, (pH 7.3 with KOH) was used to perfuse the cell during K^+ current measurements and to fill the patch pipette tip (the Cl^- -containing solution was in contact with the $Ag^+/AgCl$ filament).

For permeabilized-patch experiments, the pipette (intracellular) solution had the following composition (in mmol/L): 145 KCl, 10 HEPES, 1 EGTA and 0.85 amphotericin B (pH 7.2 with KOH). The Tyrode superfusion solution contained (in mmol/L): 145 NaCl, 4 KCl, 1 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 5 HEPES, 5 glucose (pH 7.4 with NaOH). The locally applied extracellular control solution (334 mosmol/L) contained (in mmol/L): 145 NaCl, 4 KCl, 1 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 5 HEPES, 5 glucose, 20 mannitol (pH 7.4 with NaOH). Hypoosmotic challenge (234 mosmol/L) was induced by a decrease of NaCl from 145 mmol/L to 86 mmol/L and an increase of mannitol from 20 mmol/L to 39 mmol/L. In hyperosmotic solution (434 mosmol/L) NaCl was increased to 205 mmol/L and mannitol was decreased to 0.9 mmol/L. We looked at the effect of osmolarity on R539W and WT channels in the same set of experiments. The effects on the WT channel have been previously published and serve as a positive control [14]. For ruptured-patch experiments, the pipette (intracellular) solution had the following composition (in mmol/L): 145 KCl, 10 HEPES, 1 EGTA and 1 $MgCl_2$ (pH 7.2 with KOH). Cells were perfused with Tyrode solution.

Available PIP_2 was decreased by three ways: in the permeabilized-patch configuration, PIP_2 was decreased by application of 10 μ mol/L wortmannin [16,25,26]. In giant-patch experiments, available PIP_2 was decreased by direct application of 1.1 mmol/L free Mg^{2+} on the intracellular side of giant patches [14]. In ruptured-patch configuration, channels were coexpressed with the voltage-dependent phosphatase from *Ciona intestinalis*, Ci-VSP, allowing PIP_2 dephosphorylation [27,28].

In channel PKA-dependent phosphorylation experiments, cells were exposed to a solution containing (in μ mol/L) 400 cpt-cAMP, 10 forskolin and 0.2 okadaic acid. For cholesterol depletion experiments, two different approaches were used: one-hour pre-treatment of 2 mmol/L 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin in Tyrode solution at 37°C or twenty-four hour pre-treatment of 10 μ mol/L triparanol [6] in 1 ml of the cell culture medium. Free magnesium activities in gluconate-containing solutions were calculated using software designed by G. L. Smith (University of Glasgow, Scotland), using stability constants [29].

Molecular Modeling

Peptides. 3D models of the WT and mutated sequence fragments, QQARKPYDV-R539-DVIEQYSQG and QQARKPYDV-W539-DVIEQYSQG, were calculated using Peplook [30]. Briefly, populations of 3D models are built from sequences using a boltzmanian stochastic procedure in which calculated populations are 3D models of lower energy. Models are all-atoms and their energies take into account all interactions between non-bound atoms with a cut-off of 20 Å. Energy terms are van der waals (Lennard-Jones), electrostatic (coulomb with an exponentially variable dielectric constant from 1 to 80 on a distance of 2 to 30 Å) and two hydrophobicity terms, one for intramolecular interactions and the second for solvent effect. The first term uses atomic transfer energy (Etr) and atom distances, the second one uses atom accessible atom surface area and atom Etr in the corresponding solvent, as previously described [30]. The best model is named the Prime and the next 98 models of low energy are also sorted to form the peptide population. The populations are clustered around lead models on the basis of backbone RMSd < 1 Å.

Lipids. 3D models of lipids were calculated by the same procedure as PepLook but using a dataset of rotation angles covering the 360° rotation possibilities by steps of 7.5°.

Impala. The Prime models of each peptide and lipid were individually tested across the water/membrane slab named IMPALA to define their best position [31]. IMPALA is a continuous restraint potential mimicking membrane hydrophobicity, charge density and fluidity properties with respect to water. The mass centre of each model was set at 101 different levels *i.e.* every angstrom from -50 to $+50$ from the membrane centre, across the slab. At each position, the restraint potential of 10,000 different orientations (rotations in the x/y plane of the membrane) was calculated and used to select the best position. In the figures, colored grids indicate different membrane interfaces: pink, the water/membrane interface; purple, the polar head/acyl chain interface of lipids; yellow, the membrane centre.

Molecule hydrophobicity and charge. To illustrate molecule hydrophobicity and charge, we used MHP (Molecular Hydrophobicity Potential) and MEP (Molecular Electrostatic Potential). MHP and MEP are three-dimensional plots of the hydrophobicity and electrostatic isopotential surface of a molecule, respectively [32]. In the MHP plots, surfaces joining all points of ± 0.1 kcal are drawn; green for the hydrophilic surface, brown for the hydrophobic surface. In the MEP plots, surfaces joining all points of ± 10 kcal are drawn; blue for the negatively charged surface, red for the positively charged surface.

Results

R539W KCNE1-KCNQ1 is poorly sensitive to PIP_2 decrease

To obtain a quantification of channel PIP_2 sensitivity, addition of soluble diC8- PIP_2 is commonly used [8]. In a previous study, we used this approach to determine the PIP_2 sensitivity of three LQT1-associated KCNQ1 channels containing the R243H, R539W or R555C mutation [10]. However, this approach may be limited because, for some channels, the maximum effect of short-chain PIP_2 is less than that of PIP_2 , suggesting a lower affinity [33] and/or a contribution of the acyl chain to the channel- PIP_2 interaction. As an extreme example, the Kv11.1 channel is sensitive to PIP_2 but not to diC8- PIP_2 [21]. These new results prompted us to use alternative methods to confirm the decreased PIP_2 sensitivity of R243H, R539W and R555C mutant channels. We used three different approaches: Extracellular wortmannin effects on whole-cell currents, intracellular magne-

sium effects on excised-patch currents and Ci-VSP-coexpression effects on whole-cell currents [10,18,27,28,34].

In the permeabilized-patch configuration, we monitored the activity of WT and mutant KCNE1-KCNQ1 channel currents during application of 10 $\mu\text{mol/L}$ wortmannin that blocks the PI4-kinase required for PIP_2 synthesis. Current density measured at the end of the depolarizing step (+80 mV) was monitored every 7 s and normalized to the current value measured before wortmannin application (time 0). Wortmannin application led to a gradual decrease of WT KCNE1-KCNQ1 channel activity, called rundown (Figure 1A and 1B). This rundown is also significant for the R243H and R555C, but not for the R539W channel (Table S1 in File S1). In order to compare the rundown kinetics in the different conditions, the relative current amplitude after 63 s in 10 $\mu\text{mol/L}$ wortmannin was calculated. Rundown was accelerated for R243H and R555C mutants as compared to WT (Figures 1B and 1C), confirming a decreased PIP_2 sensitivity. Relative current amplitude after 63 s in 10 $\mu\text{mol/L}$ wortmannin was 0.88 ± 0.03 ($n=7$) for WT channel, and 0.77 ± 0.04 ($n=5$; $P<0.05$) and 0.76 ± 0.06 ($n=5$; $P<0.05$) for R243H and R555C mutants, respectively. Most importantly, despite the lower affinity of short-chain PIP_2 for R539W, the decrease of PIP_2 levels caused by wortmannin application had no effect on this mutant channel activity (Figures 1B and 1C).

We tried to decrease PIP_2 intracellular levels to a higher extent, in an attempt to decrease R539W channel activity. To do that, we used intracellular Mg^{2+} , which is known to mask PIP_2 negative charges [35]. We recorded WT and mutant channels activities during 1.1-mmol/L free Mg^{2+} application using the excised-patch configuration (Figure 2, Table S2 in File S1). As previously shown, Mg^{2+} application led to a gradual decrease of WT KCNE1-KCNQ1 channel activity (Figure 2A and 2B; $\tau = 18 \pm 3$ s, $n=12$). R243H and R555C currents decreased faster than that of WT, as during wortmannin application (Figure 2B and 2C; R243H, $\tau = 6.3 \pm 1.3$ s, $P<0.01$ and R555C, $\tau = 4.7 \pm 0.5$ s; $n=10-12$, $P<0.001$ as compared to WT). Conversely, the R539W channel current ran down more slowly than the WT ($\tau = 60 \pm 22$ s; $n=8$; $P<0.05$).

To confirm these results, we depleted PIP_2 by coexpressing the channels with the voltage-dependent phosphatase Ci-VSP, which is known to dephosphorylate PIP_2 under membrane depolarization [27]. Ci-VSP activation led to a gradual decrease of WT KCNE1-KCNQ1 channel activity (Figure 3A and 3B). As a negative control, the WT KCNE1-KCNQ1 channel was expressed without Ci-VSP and no current rundown was observed (Figure 3, Table S3 in File S1). Tail current density measured at -40 mV was monitored and normalized to the current value measured at time 0. The relative current amplitude after 64 s of Ci-VSP activity was calculated. Rundown was accelerated for

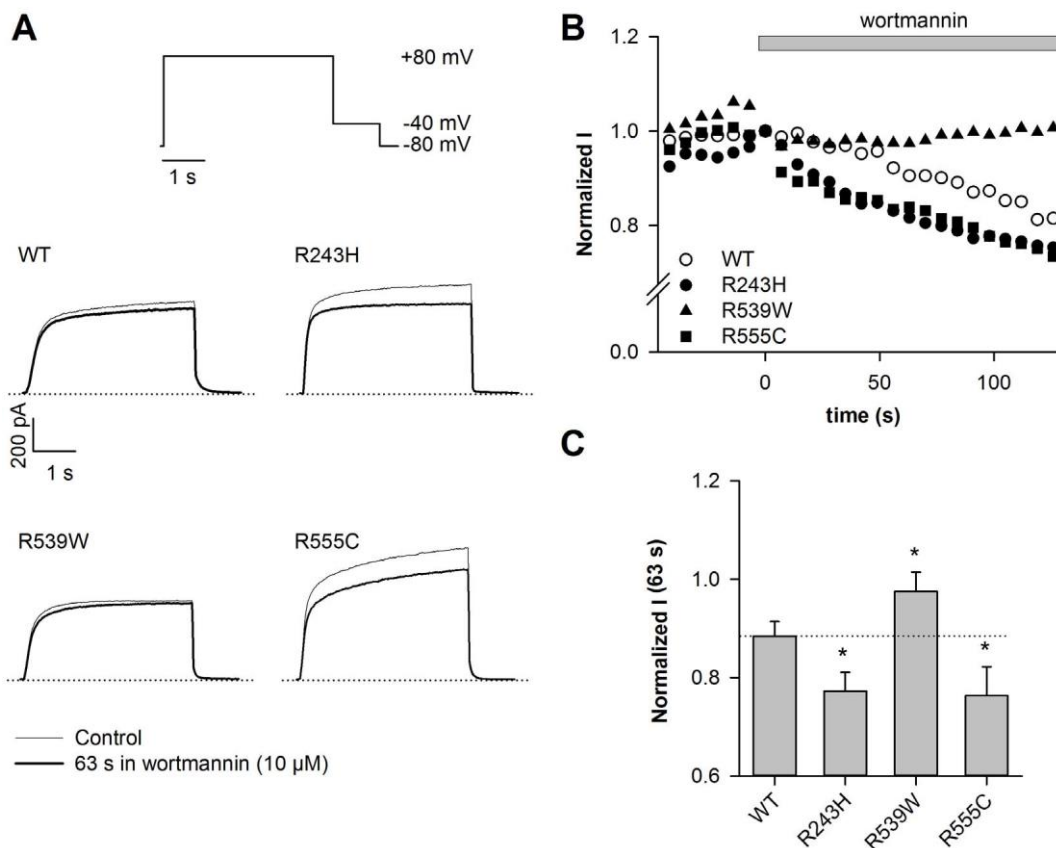


Figure 1. R539W is insensitive to wortmannin. A, representative permeabilized-patch current recordings of WT or mutant channels measured before or after a 63-s wortmannin application (10 $\mu\text{mol/L}$), and during the voltage-clamp protocol shown. Start-to-start interval = 7 s. B, relative current amplitude of WT or mutant channels measured at the end of the depolarizing step (+80 mV), plotted against time. Current values are normalized to the current level measured before wortmannin application (time 0). These experiments were performed at 35°C in the permeabilized-patch configuration. In this configuration, it has been shown that there is no spontaneous current rundown [24]. C, mean relative current amplitude of WT or mutant channels measured after a 63-s wortmannin application ($n=5-7$). * $p<0.05$, versus WT. doi:10.1371/journal.pone.0093255.g001

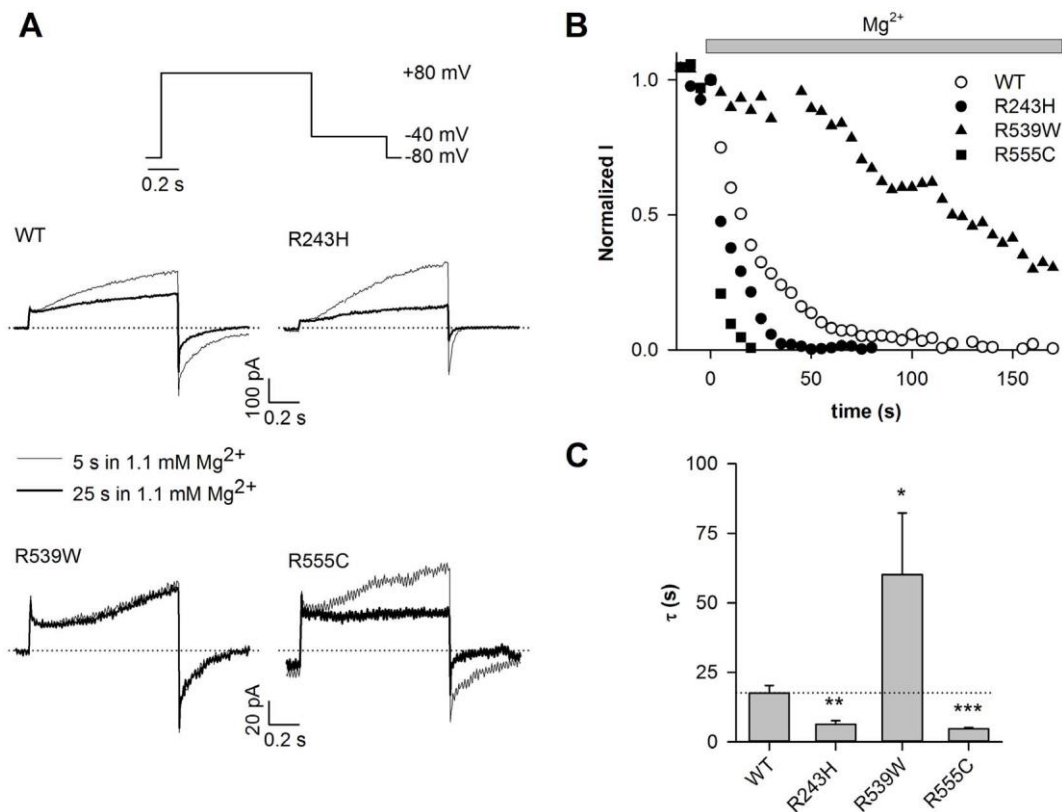


Figure 2. R539W is poorly sensitive to intracellular magnesium. A, representative giant-patch current recordings of WT or mutant channels measured after 5 and 25-s Mg²⁺ application (1.1 mmol/L free Mg²⁺), and during the voltage-clamp protocol shown. Start-to-start interval = 5 s. B, relative tail-current amplitude (measured at -40 mV) of WT or mutant channels after a depolarization to +80 mV, plotted against time. Current values are normalized to the current level measured before magnesium application (time 0). C, rundown time constant (τ) of WT and mutant channel currents ($n=8-12$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ versus WT. doi:10.1371/journal.pone.0093255.g002

R243H mutant as compared to WT (Figure 3B), confirming a decreased PIP₂ sensitivity. The relative current amplitude after 64 s of Ci-VSP activity was 0.35 ± 0.04 ($n=11$) and 0.21 ± 0.02 ($n=6$; $P<0.05$) for WT and R243H, respectively. When coexpressed with Ci-VSP, the R555C mutant channel had a very low current density (at time 0, $I_{\text{tail}} = 0.16 \pm 0.08$ pA/pF, $p<0.001$, $n=18$) as compared to the mutant channel activity without Ci-VSP coexpression ($I_{\text{tail}} = 4.27 \pm 1.64$ pA/pF, $n=4$). Such a Ci-VSP coexpression had no effect on the WT current density ($I_{\text{tail}} = 13.4 \pm 7.64$ pA/pF, $n=7$ and $I_{\text{tail}} = 25.4 \pm 6.15$ pA/pF, $n=11$ without and with Ci-VSP respectively, N.S.). Consistent with the lower affinity of the R555C mutant to diC8-PIP₂ [10], these results suggest that Ci-VSP has enough basal activity (i.e. without any depolarization to +80 mV) to decrease membrane-PIP₂ levels and that such a basal PIP₂ decrease is able to affect the R555C channel current density without any effect on the WT channel. In contrast, the decrease of PIP₂ levels caused by Ci-VSP activation had no effect on R539W channel activity (normalized I at 64 s = 0.99 ± 0.06 , $n=9$, $p<0.001$ versus WT; Figure 3C).

These three different approaches show that, contrary to R243H and R555C mutants, R539W is much less sensitive to variation in PIP₂ levels than WT. *A priori*, the results are inconsistent with the similar sensitivity of R539W and R555C to diC8-PIP₂ observed previously [10]. The impaired Mg²⁺, wortmannin and Ci-VSP effects on R539W channel rundown questioned the validity of these approaches in the evaluation of PIP₂ sensitivity. We will

address, later in this article, why the R539W channel is less sensitive to PIP₂ variation than WT.

R539W is insensitive to osmolarity

We then studied the R539W channel response to a physiological range of PIP₂ variation, by varying extracellular osmolarity. We previously showed that switching from hyperosmolar to hypoosmolar extracellular solution leads to an increase in available membrane PIP₂, provoking an increase in the WT KCNE1-KCNQ1 current density, a shift of the activation curve towards negative potentials and slower deactivation kinetics (Figure 4A, 4C and [14]). During the same set of experiments, we measured R539W channel current in isoosmolar (334 mosmol.L⁻¹), hypoosmolar (234 mosmol.L⁻¹, 70% of control osmolarity) and hyperosmolar extracellular solutions (434 mosmol.L⁻¹, 130% of control osmolarity; cf. Methods). Tail current density (measured after a +120-mV depolarization), half-activation potential and time constant of deactivation at -40 mV (τ_{deact}) were changed neither by switching from isoosmolar to hypoosmolar condition, nor by switching from isoosmolar to hyperosmolar condition (Figure 4B and 4D). This lack of R539W channel osmoregulation is supporting the idea that the mutant is much less sensitive to variations in PIP₂ levels than the WT channel.

R539W is as sensitive to PKA as WT KCNE1-KCNQ1

For some Kir channels, it has been established that phosphorylation by PKA increases their interactions with PIP₂ [9,19].

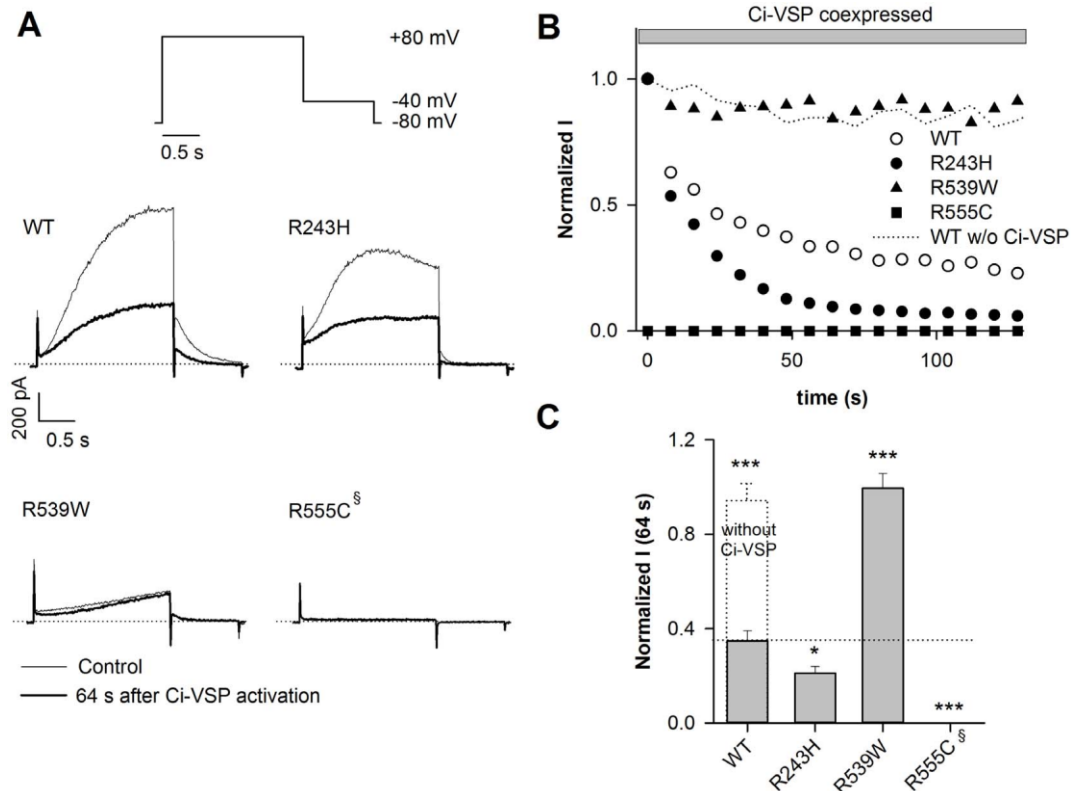


Figure 3. R539W is insensitive to Ci-VSP. A, representative ruptured-patch current recordings of WT or mutant channels coexpressed with the voltage-dependent membrane phosphatase, Ci-VSP, at the first ($t = 0$ s) and 9th ($t = 64$ s) step of depolarization. These currents were measured during the voltage-clamp protocol shown. Start-to-start interval = 8 s. The +80-mV depolarization also allows Ci-VSP activation. B, relative tail-current amplitude (measured at -40 mV) of WT or mutant channels after a depolarization to +80 mV, plotted against time. Current values are normalized to the current amplitude measured before Ci-VSP activation (time 0). C, mean relative current amplitude of WT or mutant channels measured after a 64-s Ci-VSP activation ($n = 6-11$). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ versus WT. [§]R555C already ran down before Ci-VSP activation, due to basal Ci-VSP activity, it is thus assimilated to 0 ($n = 18$). WT condition without Ci-VSP is shown in (B) and (C). doi:10.1371/journal.pone.0093255.g003

Several studies have shown that KCNQ1 activity is regulated by PKA-dependent phosphorylation [36–38] and two studies suggested that the PKA-dependent phosphorylation of KCNQ1 increases its interaction with PIP₂ [9,11]. If so, PKA should have less impact on R539W KCNE1-KCNQ1 current since R539W is less sensitive to PIP₂ variation. To test this idea, cells expressing KCNQ1, KCNE1 and the PKA-anchoring protein yotiao, were exposed to a solution containing (in $\mu\text{mol/L}$) 400 cpt-cAMP, 10 forskolin and 0.2 okadaic acid. Tail current density after a 1-s depolarization to +80 mV was measured in the permeabilized-patch configuration. cAMP had a similar effect on normalized tail currents of the WT and of the R539W channel (Figure 5; WT, 1.45 ± 0.11 and R539W, 1.63 ± 0.14 ; $n = 12-13$), indicating that the R539W mutant channel is as sensitive to PKA-dependent phosphorylation as the WT channel. Therefore, PKA regulation of KCNE1-KCNQ1 channel does not seem to act through a modulation of channel-PIP₂ interaction, which is consistent with the recent publication of Li et al, where phospho-mimetic mutations do not affect PIP₂ dependent rundown [12].

Hypothesis on the molecular basis of the low sensitivity to PIP₂ variation of R539W

R539W and R555C mutants have fully-activated current amplitude similar to the WT channel [10], supporting the conclusion that they are similarly expressed, correctly folded, and fully processed to the cell membrane. R539W and R555C

mutants have similar sensitivity to diC8-PIP₂ on one hand [10], but different responses to a decrease in membrane PIP₂ on the other hand (Figures 1, 2 and 3). Since a decrease in membrane PIP₂ closes the WT channel [13], our data indicate that the R539W channel is steadily open and poorly sensitive to membrane PIP₂ variation. Thus, R539W open state is not or less dependent on a direct or indirect interaction with PIP₂, as compared to WT.

To better understand the mechanism by which R539W is desensitized to variations in PIP₂ levels, we used molecular modeling to analyze the structure of the WT and mutant QQARKPYDV-R/W539-DVIEQYSQG fragments of the KCNQ1 C-terminus and their potential interaction with the membrane bilayer. In the absence of a full 3D model of the channel, only partial models were used to reach a working hypothesis.

Three dimensional structures of the fragments were calculated with PepLook [30]. For both fragments the 99 lower energy models were sorted and compared. For the WT sequence, the 99 models had a similar conformation *i.e.* a β -extended polar hairpin. R539 was located in the U-turn (Figure 6B). Models were clustered into three leads on the basis of RMSd less than 1 Å (Figure 6A). Leads were stabilized by aromatic (Y536/Y545) side chain interactions or by NH... π and NH...O H-bonds but mainly by side chain (R533-E543 and/or K534-D540) salt bridges. Of note, mutations of R533 and E543 are associated with LQT1 [39], consistent with their role in the hairpin structure stabilization. The

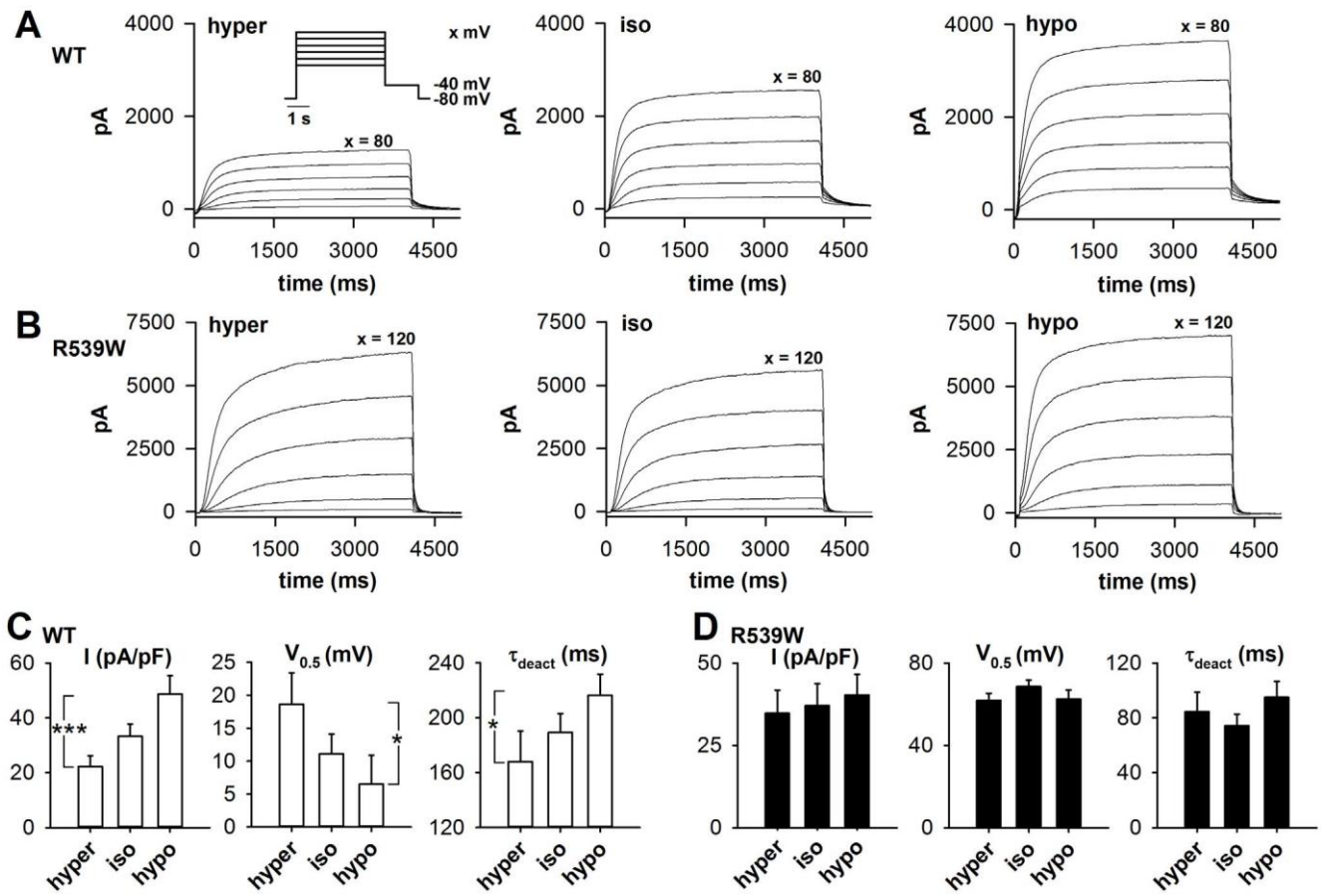


Figure 4. R539W is insensitive to osmolarity. A, B, superimposed representative permeabilized-patch recordings of WT (A) and R539W (B) KCNE1-KCNQ1 concatemer currents, respectively, measured in hyper-, iso- and hypoosmotic conditions using the voltage protocol shown in the insert. C, D, averaged tail-current density (in pA/pF), $V_{0.5}$ (in mV) and τ_{deact} (in ms) measured at -40 mV after a depolarization step to $+80$ mV for WT (C) and $+120$ mV for R539W (D) channel, in hyperosmotic (hyper), control (iso), and hypoosmotic solutions (hypo) ($n = 10$); same voltage protocol as in A. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ (one-way ANOVA for repeated measures). Protocol and experimental conditions are similar to those used in our previous study analyzing the osmoregulation of KCNE1-KCNQ1 [14].
doi:10.1371/journal.pone.0093255.g004

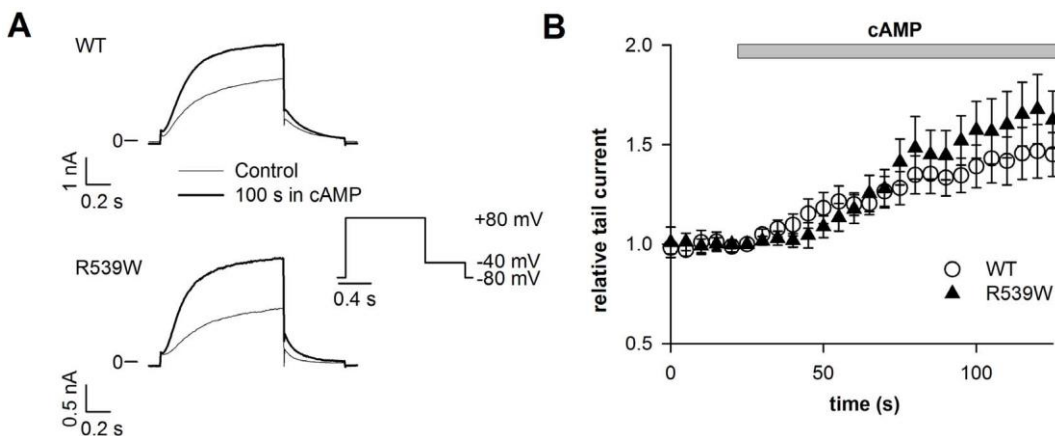


Figure 5. R539W is sensitive to PKA. A, representative permeabilized-patch current recordings of WT or R539W channels (co-transfected with yotiao) measured during the voltage-clamp protocol shown. B, mean time course of channel activation by $400 \mu\text{M}$ cpt-cAMP, $10 \mu\text{M}$ forskolin and $0.2 \mu\text{M}$ okadaic acid (cAMP) for WT or R539W KCNE1-KCNQ1 concatemer channel tail currents measured at -40 mV after a 1 s depolarization to $+80$ mV and normalized to the current value before cAMP application ($n = 12-13$).
doi:10.1371/journal.pone.0093255.g005

lead models were polar structures with a mean hydrophobic to hydrophilic accessible surface ratio of 0.73 ± 0.20 (Figure 6C). Because of its hydrophilicity, the fragment should map to the channel protein surface rather than in its core, being accessible to external partnership. In addition, due to its high content in positively-charged residues (R533, K534 and R539) and especially to the fact that R539 was accessible in all models, the fragment might be able to interact with negative charges of membrane phospholipids. As a basis for this hypothesis, we found that the best position of the WT fragment models was to be adsorbed on the membrane surface, with R539 diving in the interface (Figure 7A). In that position, what could be the R539 membrane partner? In Figure 7D, we show the optimal positions of PIP₂, cholesterol and DOPC in the same membrane slab. The depth of insertion of the WT fragment models argues for a possible interaction of R539 with the C=O moiety of PIP₂ (Figure 7D–7F).

For the R539W mutant, changing R to W changed the 3D structure but not the extended conformation (Figure 6A compared with 6D). Four lead models were sorted (Figure 6D) and W539, like R539, was a structural protuberance. The hydrophobicity profiles of the WT and R539W models demonstrate that changing R to W decreased the hydrophilicity (Figure 6F to be compared with Figures 6C, 7B and 7C). The R539W mutant had a mean hydrophobic to hydrophilic accessible surface ratio of 0.81 ± 0.10 supporting the conclusion that the fragment was still polar and that the R539 polar protuberance of the native fragment was now a W539 hydrophobic protuberance. The best position of the R539W mutant channel fragment in the membrane/water slab was the membrane interface similar to the WT fragment (Figures 7A–7C). Even though fragment positions are similar, their partners in the membrane should be different. The WT fragment could have a polar R-phospholipid interaction whereas the mutant fragment would more likely favor an interaction of the apolar W539 with a more hydrophobic partner.

Among natural membrane lipids, cholesterol has been implicated in direct interactions with some channels and in the regulation of their activities [40,41]. Various studies have

suggested that protein-cholesterol interactions implicate tryptophan [42,43]. Interestingly, in another ion channel, a mutation of a cysteine to a tryptophan in a lipid-exposed position enhances the effect of cholesterol [42]. Tryptophan can interact with cholesterol in a rigid cycle-to-cycle hydrophobic fit stabilized by OH (cholesterol) - π (tryptophan cycle) or by NH (tryptophan cycle) - O (cholesterol) interactions if the two partners are at the same depth of insertion in the membrane. Our calculations indicate that the cholesterol polar head and tryptophan are at the same level in the membrane and thus justify the hypothesis that changing R539 to W could switch a polar R-PIP₂ interaction to a W-cholesterol interaction.

R539W interacts with membrane cholesterol

To test this hypothesis, we probed whether the decreased sensitivity of the R539W mutant to PIP₂ was associated with a gain in cholesterol sensitivity. We tried three different approaches: first, we measured the Mg²⁺-induced current rundown of the R539F KCNE1-KCNQ1 channel, phenylalanine being less hydrophobic and bulky than tryptophan and thus likely to be a less efficient membrane anchor than tryptophan. Second, we compared the effect of depleting the membrane cholesterol by 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (cyclodextrin) on WT and R539W channel current [44]. Since cyclodextrin is not very specific, we used another way of depleting membrane cholesterol. We selected triparanol because it has been shown to decrease cholesterol in a similar model [6]. In all these approaches we measured the relative tail-current amplitude of WT and mutant channels after a depolarization to +80 mV, during 1.1-mmol/L free Mg²⁺ application in the giant-patch configuration.

As expected, the Mg²⁺-induced current rundown of the R539F mutant channel was faster than the rundown of the R539W mutant channel activity and as fast as the rundown of WT current (Figures 8A and 8B). This behavior is consistent with a lower anchoring of the F539 on the membrane as compared to that of W539. The fact that R539F mutant channel is not running down

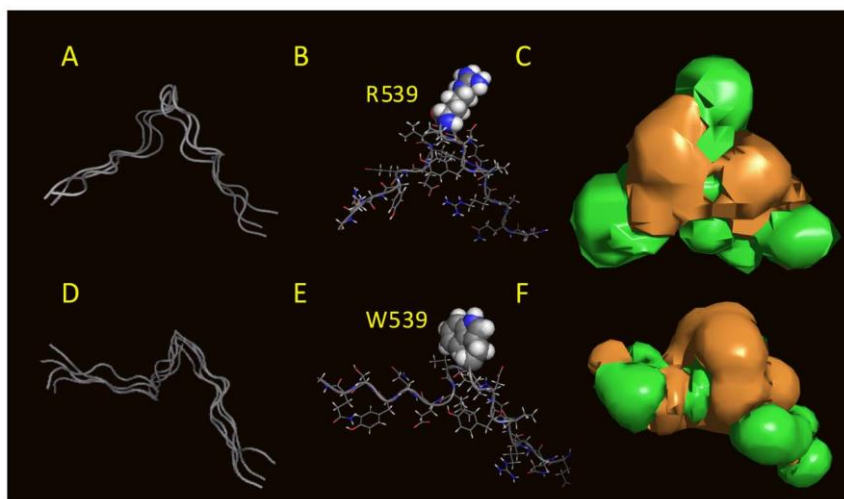


Figure 6. PepLook models of the 19-aa sequence surrounding R539 and W539. The sequences QQARKPYDVR539DVIEQYSQG and QQARKPYDVW539DVIEQYSQG were used to calculate amphipathic 3D structure models in water. A, D, the 99 PepLook models of low energy were clustered into three WT (A) and four R539W (D) lead models on the basis of backbone RMSd < 1 Å. Ribbon structures of these lead models are fitted in (A and D) demonstrating their large similarity. B, E best models (Prime), with R539 in CPK for the WT fragment (B) and W539 in CPK for the mutant fragment (E). Both residues are protruding in a pin loop-like structure. C, F, hydrophobicity profiles of the WT and R539W Primes are visualized by the hydrophobic (brown) and hydrophilic (green) isopotential surface (+0.1 kcal/mol) around the molecule. The MHP profiles demonstrate, first, the rather important hydrophilicity of the models, and second, that changing R to W, transforms a very polar protuberance to an apolar one. doi:10.1371/journal.pone.0093255.g006

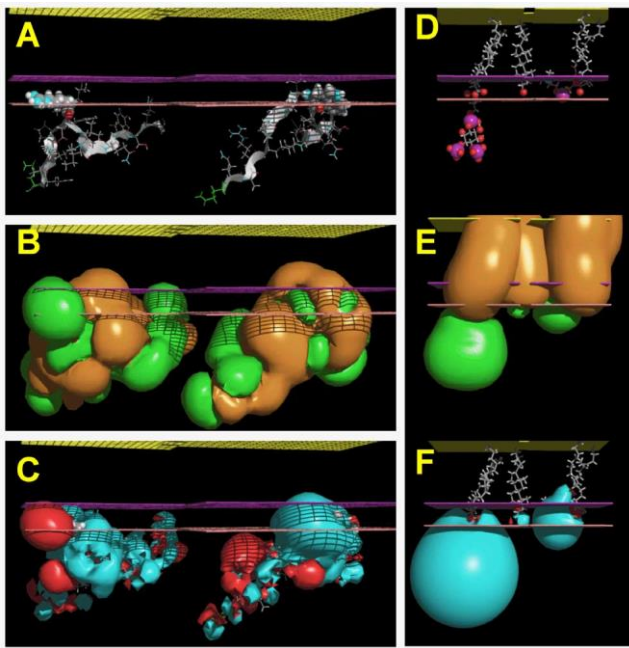


Figure 7. Relative position of a series of molecules in the membrane. All molecules are shown at their optimal position in the IMPALA slab after they were systematically tested at every Å across a water/membrane continuous layer. In all plots, the yellow grid represents the membrane center; the purple grid, the averaged lipid head/acyl chain interface, and the pink grid the averaged lipid/water interface. A, PepLook model of the WT (left) and R539W (right) peptides. In both cases, residue 539 is imbedded in the membrane. B, MHP (Molecular Hydrophobicity Potential) profiles of fragments. R539 is responsible for a large hydrophilic (green) protuberance, whereas W539 is a hydrophobic (brown) protuberance in the membrane. C, MEP (molecular electrostatic profile) of the same molecules showing the e-attractivity of the R539 protuberance. D, E and F, same as in A, B and C except that molecules are, from left to right, an extended fluid form of PIP₂, cholesterol, and a fluid form of DOPC. They highlight the relative position of PIP₂ and peptides and the fact that the more hydrophobic cholesterol is embedded in the membranes.
doi:10.1371/journal.pone.0093255.g007

faster than WT suggests that phenylalanine still interacts with cholesterol although less than the tryptophan does.

Second, we compared the Mg²⁺-induced rundown of the R539W mutant current without and with 2 mmol/L of cyclodextrin. As shown in Figures 8C and 8D, cyclodextrin pre-treatment accelerated the R539W rundown. Thus, when membrane cholesterol is decreased, the R539W channel is more sensitive to PIP₂ variation. In WT channels, only activation kinetics were affected by cholesterol depletion, as shown in Figure S1 in File S1 and consistent with a previous work [6], but rundown was not affected (Figure 8C and 8D). As opposed to WT channels, R539W activation kinetics were not modified by cyclodextrin (Figure S1 in File S1).

Finally, we compared the Mg²⁺-induced rundown of the R539W mutant current without and with 10 μmol/L of triparanol. Like cyclodextrin, triparanol pre-treatment accelerated the R539W rundown without any significant change in the WT rundown (Figure 8E and 8F). These results confirm that the R539W channel is more sensitive to PIP₂ variation when membrane cholesterol is decreased. In addition, as for cyclodextrin, in WT channels, only activation kinetics were affected by the triparanol pre-treatment. In R539W mutant channels, activation kinetics were unchanged by the triparanol pre-treatment (Figure

S2 in File S1), consistent with the results using cyclodextrin to deplete membrane cholesterol. These results reinforce the idea that interaction of cholesterol with WT and R539W channels is quite different.

Altogether, data from experiments manipulating the residue at position 539, and cholesterol levels in the membrane, are in agreement with the hypothesis that the tryptophan in position 539 interacts (or induces an interaction) with membrane cholesterol. This channel-cholesterol interaction might overrule the channel-PIP₂ interaction to stabilize the channel open-state.

Discussion

In previous studies, we have shown that KCNE1-KCNQ1 channel open-state is stabilized by PIP₂ and impairment of this stabilization by arginine neutralization at position 243, 539 or 555 in KCNQ1 is correlated with the long QT syndrome [10,13]. For the three mutants, higher diC8-PIP₂ concentrations than for WT were needed to stabilize the open state after the channel activity had run down, suggesting a decrease in interaction with PIP₂ [10]. The R539W and R555C mutations are localized in the cytosolic C-terminus (CTD) [45]. The supposed interaction of arginines 539 and 555 with PIP₂ suggests that they are situated on the membrane-cytosol interface, which may be surprising since they are located in the middle of the distal half of the KCNQ1 cytosolic CTD [45]. In a recent crystallographic study, Hansen et al. described that PIP₂ mediates docking of the whole CTD to the transmembrane module and subsequent opening of the inner helix gate of the Kir2.2 channel [46]. Thereby, the KCNQ1 distal CTD might come close in order to interact with the membrane, *via* interactions such as R539-PIP₂ and R555-PIP₂, allowing the CTD to be in the vicinity of the pore domain for modulating its opening. However, further crystallographic studies should address this hypothesis.

In the present study, the most striking result was that decreasing endogenous PIP₂ has a very small effect on the open-state stability of the R539W mutant. R539W is paradoxically less sensitive to a decrease in PIP₂ than WT. This is in contrast with many channel mutations that reduce their affinity for PIP₂ or diC8-PIP₂ [47,48], including the two other KCNQ1 mutations R243H and R555C. Here we suggest that the paradoxical behavior of R539W is due to the stabilizing effect of tryptophan-cholesterol interaction that replaces the arginine-PIP₂ interaction. Indeed, severe cholesterol depletion of the membrane restored the PIP₂ sensitivity of the channel. After cyclodextrin or triparanol pre-treatment, R539W rundown kinetics during Mg²⁺ application were restored to values similar to WT, suggesting that membrane cholesterol depletion abolished the R539W open pore stabilization, now only maintaining its open stabilization through other PIP₂-interacting residues (such as R243 and R555). It is important to note that - when expressed in *Xenopus* oocytes - R539W behaved exactly as R555C [12]. In that model, both excision-induced rundown and PIP₂ sensitivity were the same for R555C and R539W. This apparent inconsistency between models may be due to different cholesterol levels around the channel in *X. oocytes* *versus* COS-7 cells, with higher levels in the latter, slowing down R539W rundown.

For Kir4.1, Hibino and Kurachi showed that cyclodextrin abolishes the function of Kir4.1 channels in HEK293 cells [49]. One of the proposed mechanistic hypotheses suggests that cholesterol influences the conformation of Kir4.1 and activates it by specific protein-cholesterol interactions [49]. This hypothesis is supported by some studies performed on other channels. Singh et al. demonstrated a direct effect of cholesterol on the activity of

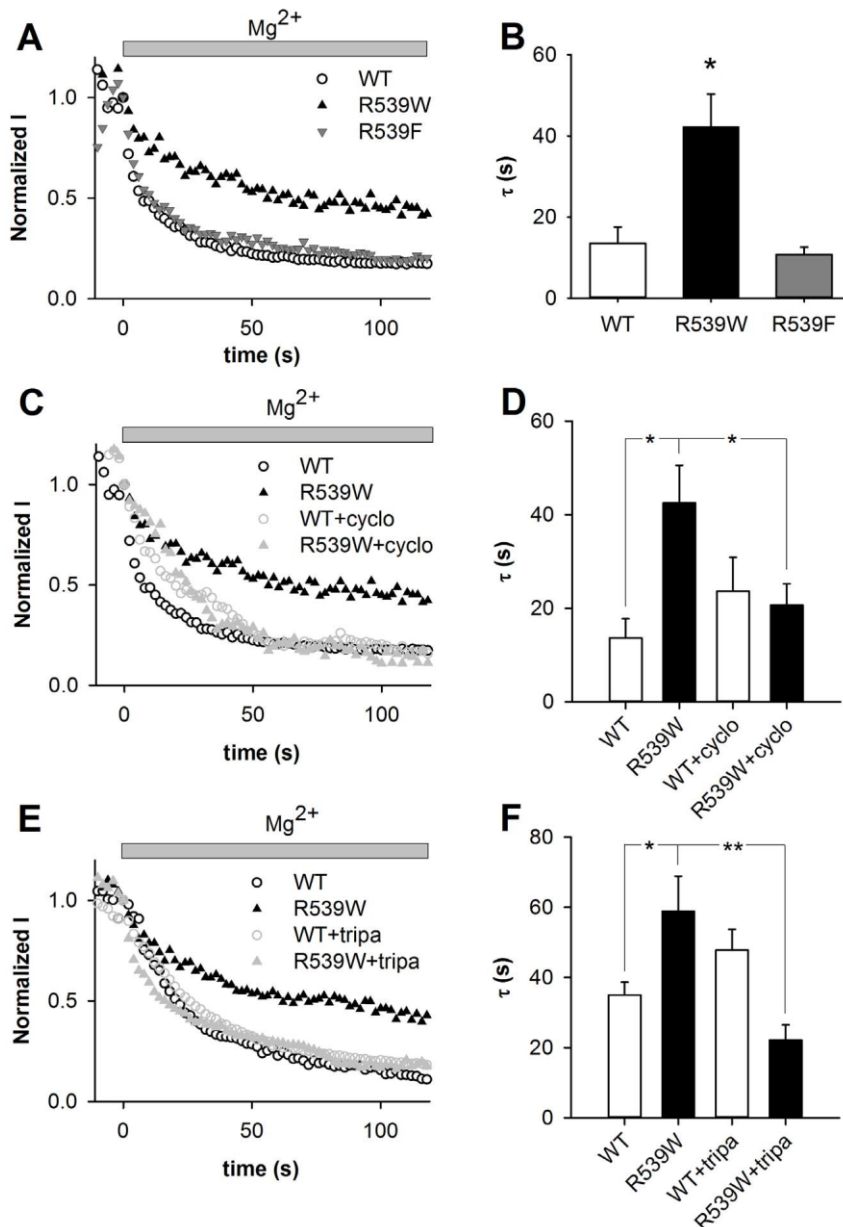


Figure 8. Effect of intracellular magnesium on WT, R539W and R539F mutant channels, and after membrane cholesterol depletion. A, C, E, relative tail-current amplitude (at -40 mV) of WT or mutant channels measured after a depolarization to $+80$ mV plotted against time during a 1.1 mmol/L free Mg^{2+} application on a giant-patch. Start-to-start interval = 2 s. Current values are normalized to the current level measured before magnesium application (time 0). Cholesterol depletion was induced by 1 hour of 2 mmol/L cyclodextrin (cyclo) or 24 hours of 10 μ mol/L triparanol (tripa) pre-treatment. B, D, F, mean rundown time constant (τ) of WT and mutant channels (B), and with and without 2 mmol/L cyclodextrin (D, $n = 9-13$) or 10 μ mol/L triparanol (F, $n = 9-15$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus WT. DMSO in which triparanol was diluted (E and F) has an effect on rundown kinetics ($\tau = 15.4 \pm 1.6$, $n = 7$ versus $\tau = 35.0 \pm 3.65$, $n = 15$, without and with DMSO pre-treatment respectively, $p < 0.01$). doi:10.1371/journal.pone.0093255.g008

KirBac1.1 [40]. They showed that changes in membrane fluidity could not account for the effects of the sterols on KirBac1.1 activity, and their data strongly pointed to a direct cholesterol-channel interaction. The present study is also supporting a direct and specific cholesterol-channel interaction.

We have previously reported that KCNE1-KCNQ1 activity is regulated by intracellular ATP in addition to PIP_2 [13]. More precisely, Li et al. recently showed that ATP binds to the cytosolic domain and promotes pore opening [50]. Since the patch-clamp experiments were performed without ATP in the intracellular solution, the gradual decrease of channel activity is probably the

sum of the PIP_2 - and the ATP-dependent channel rundown. This is especially true in giant-patch experiments, during which ATP is diffusing out of the patch very quickly. Even though the regulation of KCNQ1 by PIP_2 and by ATP concerns two distinct mechanisms [13], and distinct binding sites [51], there may be some interplay between both types of regulation. For instance, it has been shown that variations in intracellular ATP provoke variations in membrane PIP_2 levels [25,52]. In that context, using R539W - which is much less PIP_2 -sensitive - may reveal to what extent PIP_2 -dependent rundown influences the ATP-dependent rundown.

KCNQ1 and KCNE1 localize in lipid rafts [53–55] as well as the G-protein-dependent machinery involved in β -adrenergic signaling [56]. From the literature, it appears that cholesterol may be involved in KCNQ1 expression levels and channel-complex trafficking [5,57] and gating [6]. Here we show that cholesterol does not stabilize WT KCNE1-KCNQ1 channel opening *per se*. Substitution of R539 by W introduces a new sensitivity to acute cholesterol changes, possibly by favoring a direct binding of this residue to cholesterol, which is abundant in lipid rafts. In Kir2.1 channels, Epshtein et al. identified a specific region that plays a critical role in the sensitivity of these channels to cholesterol [58]. This region is in the CTD, consistent with the location of R539 in KCNQ1. Nonetheless, PIP₂ still regulates partially the R539W mutant, since in the presence of cholesterol, severe depletion of PIP₂ eventually induced open-state destabilization. This indicates that other PIP₂ interacting residues (such as R243 and R555) are still needed for channel opening. This severe depletion of PIP₂ allowed unmasking of the reduced diC8-PIP₂ sensitivity of the R539W mutant, since higher doses of diC8-PIP₂ are necessary to activate the channel [10].

We inferred the PIP₂ sensitivity of WT and mutated channels from the measurement of the rundown kinetics of the corresponding current during a decrease in available PIP₂. The decrease in PIP₂ was triggered using three common approaches: extracellular wortmannin application on permeabilized-patch configuration, intracellular Mg²⁺ application on excised-patch configuration, and Ci-VSP coexpression on ruptured-patch configuration [10,18,27,28,34]. Although the R539W mutant showed a decreased affinity to diC8-PIP₂ compared to WT [10], all these three approaches show that this mutant is less sensitive to a PIP₂ decrease, which would classically suggest a higher affinity to PIP₂. This peculiar behavior suggests that caution should be taken when using the current rundown in the evaluation of a channel PIP₂ affinity, because, in some cases (e.g. R539W), the mutation that disrupts the interaction with PIP₂ may stabilize the channel in the open state through another mechanism.

In conclusion, the present study shows that a channel mutation can induce or favor an interaction between the channel and a membrane component. We speculate that this PIP₂-independent tryptophan-cholesterol interaction is responsible for the difference in phenotypes observed for patients with long QT syndrome caused by R539W and R555C mutations of KCNQ1. Until now,

both mutations were characterized by similar functional effects in cellular models, but the R555C mutation is associated with a ‘forme fruste’ of type 1 long QT syndrome [59] whereas R539W is associated with cardiac sudden death [60]. This difference could be caused by the drastic decrease of sensitivity of the R539W mutant to PIP₂ variation (cf wortmannin, Mg²⁺, osmolarity and Ci-VSP effects), and thus the poor sensitivity of the channel to signaling dependent on PLC-coupled receptors [61].

Supporting Information

File S1 Supporting Information Figures and Tables.

Figure S1, Effect of cyclodextrin on WT and R539W activation kinetics. A, Representative recording of a COS-7 cell transfected with WT or R539W KCNE1-KCNQ1 concatamer channel, without and with 1-hour pre-treatment by 2 mmol/L cyclodextrin. B and C, Mean $\pm$ sem of WT and R539W activation tau from monoexponential fit of activation without and with cyclodextrin pre-treatment. * $p < 0.05$. **Figure S2, Effect of triparanol on WT and R539W activation kinetics.** A, Representative recording of a COS-7 cell transfected with WT or R539W KCNE1-KCNQ1 concatamer channel, without and with 24-hour pre-treatment by 10 μ mol/L triparanol. B and C, Mean $\pm$ sem of WT and R539W activation tau from monoexponential fit of activation without and with triparanol pre-treatment. * $p < 0.05$. **Table S1, Wortmannin-induced rundown. Table S2, Magnesium-induced rundown. Table S3, Ci-VSP-induced rundown.** (PDF)

Acknowledgments

We thank Béatrice Leray and Agnès Carcouët (INSERM, UMR 1087, Nantes) for expert technical assistance. We thank Flavien Charpentier (INSERM, UMR 1087, Nantes) for careful reading of the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AT RB IB GL J. Mérot. Performed the experiments: AT FCC FA-A MYA JP J. Mordel CSN MS CM GL. Analyzed the data: AT FCC FA-A MYA JP J. Mordel CSN MS CM GL. Wrote the paper: AT IB GL MYA JP FCC FA-A.

References

- Levitani I, Fang Y, Rosenhouse-Dantsker A, Romanenko V (2010) Cholesterol and ion channels. *Subcell Biochem* 51: 509–549.
- Coyan FC, Loussouarn G (2013) Cholesterol regulation of ion channels: Crosstalk in proteins, crosstalk in lipids. *Channels* 7: 415–416.
- Gasque G, Labarca P, Darszon A (2005) Cholesterol-depleting compounds modulate K⁺-currents in *Drosophila* Kenyon cells. *FEBS Lett* 579: 5129–5134.
- Xia F, Gao X, Kwan E, Lam PPL, Chan L, et al. (2004) Disruption of pancreatic beta-cell lipid rafts modifies Kv2.1 channel gating and insulin exocytosis. *J Biol Chem* 279: 24685–24691.
- Taniguchi T, Uesugi M, Arai T, Yoshinaga T, Miyamoto N, et al. (2012) Chronic probucol treatment decreases the slow component of the delayed-rectifier potassium current in CHO cells transfected with KCNQ1 and KCNE1: a novel mechanism of QT prolongation. *J Cardiovasc Pharmacol* 59: 377–386.
- Hihara T, Taniguchi T, Ueda M, Yoshinaga T, Miyamoto N, et al. (2013) Probucol and the cholesterol synthesis inhibitors simvastatin and triparanol regulate I_{Ks} channel function differently. *Hum Exp Toxicol* 32: 1028–1037.
- Pike LJ, Casey L (1996) Localization and turnover of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in caveolin-enriched membrane domains. *J Biol Chem* 271: 26433–26456.
- Zhang H, Craciun LC, Mirshahi T, Rohács T, Lopes CMB, et al. (2003) PIP₂ activates KCNQ channels, and its hydrolysis underlies receptor-mediated inhibition of M currents. *Neuron* 37: 963–975.
- Lopes CMB, Remon JJ, Matavel A, Sui JL, Keselman I, et al. (2007) Protein kinase A modulates PLC-dependent regulation and PIP₂-sensitivity of K⁺ channels. *Channels (Austin)* 1: 124–134.
- Park KH, Piron J, Dahimene S, Mérot J, Baró I, et al. (2005) Impaired KCNQ1-KCNE1 and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate interaction underlies the long QT syndrome. *Circ Res* 96: 730–739.
- Matavel A, Medei E, Lopes CMB (2010) PKA and PKC partially rescue long QT type 1 phenotype by restoring channel-PIP₂ interactions. *Channels (Austin)* 4: 3–11.
- Li Y, Zaydman MA, Wu D, Shi J, Guan M, et al. (2011) KCNE1 enhances phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) sensitivity of I_{Ks} to modulate channel activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 9095–9100.
- Loussouarn G, Park KH, Bellocq C, Baró I, Charpentier F, et al. (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.
- Piron J, Choveau FS, Amarouch MY, Rodríguez N, Charpentier F, et al. (2010) KCNE1-KCNQ1 osmoregulation by interaction of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate with Mg²⁺ and polyamines. *J Physiol (Lond)* 588: 3471–3483.
- Abderemane-Ali F, Es-Salah-Lamoureux Z, Delemotte L, Kasimova MA, Labro AJ, et al. (2012) Dual effect of phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate PIP₂ on Shaker K(+) [corrected] channels. *J Biol Chem* 287: 36158–36167.
- Suh BC, Hille B (2002) Recovery from muscarinic modulation of M current channels requires phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis. *Neuron* 35: 507–520.
- Logothetis DE, Petrou VI, Adney SK, Mahajan R (2010) Channelopathies linked to plasma membrane phosphoinositides. *Pflügers Arch* 460: 321–341.

18. Du X, Zhang H, Lopes C, Mirshahi T, Rohacs T, et al. (2004) Characteristic interactions with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate determine regulation of kir channels by diverse modulators. *J Biol Chem* 279: 37271–37281.
19. Liou HH, Zhou SS, Huang CL (1999) Regulation of ROMK1 channel by protein kinase A via a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5820–5825.
20. Bian J, Cui J, McDonald TV (2001) HERG K(+) channel activity is regulated by changes in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Circ Res* 89: 1168–1176.
21. Rodriguez N, Amarouch MY, Montnach J, Piron J, Labro AJ, et al. (2010) Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) stabilizes the open pore conformation of the Kv11.1 (hERG) channel. *Biophys J* 99: 1110–1118.
22. Nakajo K, Ulbrich MH, Kubo Y, Isacoff EY (2010) Stoichiometry of the KCNQ1 - KCNE1 ion channel complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 18862–18867.
23. Wang W, Xia J, Kass RS (1998) MinK-KvLQT1 fusion proteins, evidence for multiple stoichiometries of the assembled Isk channel. *J Biol Chem* 273: 34069–34074.
24. Loussouarn G, Baró I, Escande D (2006) KCNQ1 K+ channel-mediated cardiac channelopathies. *Methods Mol Biol* 337: 167–183.
25. Loussouarn G, Pike LJ, Ashcroft FM, Makhina EN, Nichols CG (2001) Dynamic sensitivity of ATP-sensitive K(+) channels to ATP. *J Biol Chem* 276: 29098–29103.
26. Yasuda Y, Matsuura H, Ito M, Matsumoto T, Ding WG, et al. (2005) Regulation of the muscarinic K+ channel by extracellular ATP through membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in guinea-pig atrial myocytes. *Br J Pharmacol* 145: 156–165.
27. Murata Y, Iwasaki H, Sasaki M, Inaba K, Okamura Y (2005) Phosphoinositide phosphatase activity coupled to an intrinsic voltage sensor. *Nature* 435: 1239–1243.
28. Rodriguez-Menchaca AA, Adney SK, Tang QY, Meng XY, Rosenhouse-Dantsker A, et al. (2012) PIP₂ controls voltage-sensor movement and pore opening of Kv channels through the S4–S5 linker. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: E2399–E2408.
29. Sillén LG, Martell AE, Bjerrum J (1964) Stability constants of metal-ion complexes. London: Chemical Society.
30. Thomas A, Deshayes S, Decaffmeyer M, Van Eyck MH, Charleaux B, et al. (2006) Prediction of peptide structure: how far are we? *Proteins* 65: 889–897.
31. Ducarme P, Rahman M, Brasseur R (1998) IMPALA: a simple restraint field to simulate the biological membrane in molecular structure studies. *Proteins* 30: 357–371.
32. Brasseur R (1991) Differentiation of lipid-associating helices by use of three-dimensional molecular hydrophobicity potential calculations. *J Biol Chem* 266: 16120–16127.
33. Rohács T, Lopes C, Mirshahi T, Jin T, Zhang H, et al. (2002) Assaying phosphatidylinositol bisphosphate regulation of potassium channels. *Meth Enzymol* 345: 71–92.
34. Liu B, Qin F (2005) Functional control of cold- and menthol-sensitive TRPM8 ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Neurosci* 25: 1674–1681.
35. Shyng SL, Nichols CG (1998) Membrane phospholipid control of nucleotide sensitivity of KATP channels. *Science* 282: 1138–1141.
36. Nicolas CS, Park KH, El Harchi A, Camonis J, Kass RS, et al. (2008) IKs response to protein kinase A-dependent KCNQ1 phosphorylation requires direct interaction with microtubules. *Cardiovasc Res* 79: 427–435.
37. Walsh KB, Kass RS (1988) Regulation of a heart potassium channel by protein kinase A and C. *Science* 242: 67–69.
38. Yazawa K, Kameyama M (1990) Mechanism of receptor-mediated modulation of the delayed outward potassium current in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol (Lond)* 421: 135–150.
39. Napolitano C, deGiuli L, Wilson J (n.d.) INHERITED ARRRHYTHMIAS DATABASE. Available: <http://www.fsm.it/cardmoc/>.
40. Singh DK, Rosenhouse-Dantsker A, Nichols CG, Enkvetchakul D, Levitan I (2009) Direct regulation of prokaryotic Kir channel by cholesterol. *J Biol Chem* 284: 30727–30736.
41. Bukiya AN, Belani JD, Rychnovsky S, Dopico AM (2011) Specificity of cholesterol and analogs to modulate BK channels points to direct sterol-channel protein interactions. *J Gen Physiol* 137: 93–110.
42. Santiago J, Guzmán GR, Rojas LV, Martí R, Asmar-Rovira GA, et al. (2001) Probing the effects of membrane cholesterol in the Torpedo californica acetylcholine receptor and the novel lipid-exposed mutation alpha C418W in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 276: 46523–46532.
43. Carozzi AJ, Roy S, Morrow IC, Pol A, Wyse B, et al. (2002) Inhibition of lipid raft-dependent signaling by a dystrophy-associated mutant of caveolin-3. *J Biol Chem* 277: 17944–17949.
44. Atger VM, de la Llera Moya M, Stoudt GW, Rodriguez WV, Phillips MC, et al. (1997) Cyclodextrins as catalysts for the removal of cholesterol from macrophage foam cells. *J Clin Invest* 99: 773–780.
45. Wiener R, Haitin Y, Shamgar L, Fernández-Alonso MC, Martos A, et al. (2008) The KCNQ1 (Kv7.1) COOH terminus, a multitiered scaffold for subunit assembly and protein interaction. *J Biol Chem* 283: 5815–5830.
46. Hansen SB, Tao X, MacKinnon R (2011) Structural basis of PIP₂ activation of the classical inward rectifier K+ channel Kir2.2. *Nature* 477: 495–498.
47. Lopes CMB, Zhang H, Rohacs T, Jin T, Yang J, et al. (2002) Alterations in conserved Kir channel-PIP₂ interactions underlie channelopathies. *Neuron* 34: 933–944.
48. Fan Z, Makielski JC (1997) Anionic phospholipids activate ATP-sensitive potassium channels. *J Biol Chem* 272: 5388–5395.
49. Hibino H, Kurachi Y (2007) Distinct detergent-resistant membrane microdomains (lipid rafts) respectively harvest K(+) and water transport systems in brain astroglia. *Eur J Neurosci* 26: 2539–2555.
50. Li Y, Gao J, Lu Z, McFarland K, Shi J, et al. (2013) Intracellular ATP binding is required to activate the slowly activating K+ channel I(Ks). *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 18922–18927.
51. Zaydman MA, Silva JR, Delaloye K, Li Y, Liang H, et al. (2013) Kv7.1 ion channels require a lipid to couple voltage sensing to pore opening. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 13180–13185.
52. Hilgemann DW, Ball R (1996) Regulation of cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchange and KATP potassium channels by PIP₂. *Science* 273: 956–959.
53. Nakamura H, Kurokawa J, Bai CX, Asada K, Xu J, et al. (2007) Progesterone regulates cardiac repolarization through a nongenomic pathway: an in vitro patch-clamp and computational modeling study. *Circulation* 116: 2913–2922.
54. Roura-Ferrer M, Solé L, Oliveras A, Dahan R, Bielanska J, et al. (2010) Impact of KCNE subunits on KCNQ1 (Kv7.1) channel membrane surface targeting. *J Cell Physiol* 225: 692–700.
55. Balijepalli RC, Delisle BP, Balijepalli SY, Foell JD, Slind JK, et al. (2007) Kv11.1 (ERG1) K+ channels localize in cholesterol and sphingolipid enriched membranes and are modulated by membrane cholesterol. *Channels (Austin)* 1: 263–272.
56. Yarbrough TL, Lu T, Lee HC, Shibata EF (2002) Localization of cardiac sodium channels in caveolin-rich membrane domains: regulation of sodium current amplitude. *Circ Res* 90: 443–449.
57. Varga A, Bagossi P, Tözsér J, Peitl B, Szilvassy Z (2007) Effect of experimental hypercholesterolaemia on K+ channel alpha-subunit mRNA levels in rabbit hearts. *Eur J Pharmacol* 562: 130–131.
58. Epshtein Y, Chopra AP, Rosenhouse-Dantsker A, Kowalsky GB, Logothetis DE, et al. (2009) Identification of a C-terminus domain critical for the sensitivity of Kir2.1 to cholesterol. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 8055–8060.
59. Donger C, Denjoy I, Berthet M, Neyroud N, Cruaud C, et al. (1997) KVLQT1 C-terminal missense mutation causes a forme fruste long-QT syndrome. *Circulation* 96: 2778–2781.
60. Chouabe C, Neyroud N, Richard P, Denjoy I, Hainque B, et al. (2000) Novel mutations in KvLQT1 that affect IKs activation through interactions with Isk. *Cardiovasc Res* 45: 971–980.
61. Jalili T, Takeishi Y, Walsh RA (1999) Signal transduction during cardiac hypertrophy: the role of G alpha q, PLC beta I, and PKC. *Cardiovasc Res* 44: 5–9.

Supplemental figures

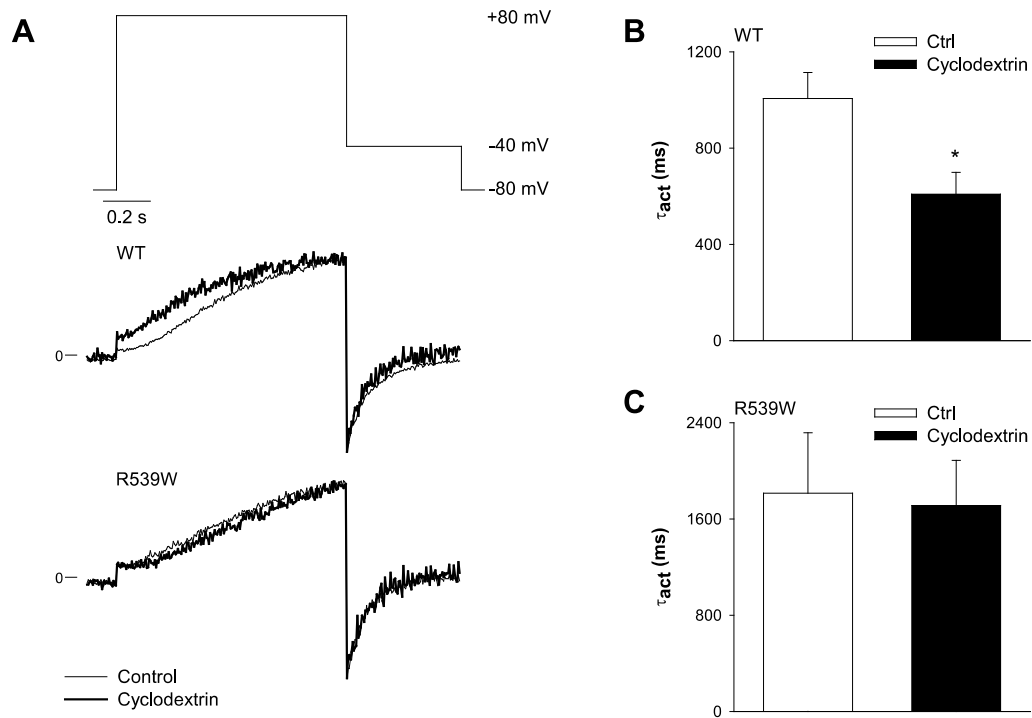


Figure S1

Effect of cyclodextrin on WT and R539W activation kinetics. A, Representative recording of a COS-7 cell transfected with WT or R539W KCNE1-KCNQ1 concatemer channel, without and with 1-hour pre-treatment by 2 mmol/L cyclodextrin. B and C, Mean $\pm$ sem of WT and R539W activation tau from monoexponential fit of activation without and with cyclodextrin pre-treatment. * $p < 0.05$.

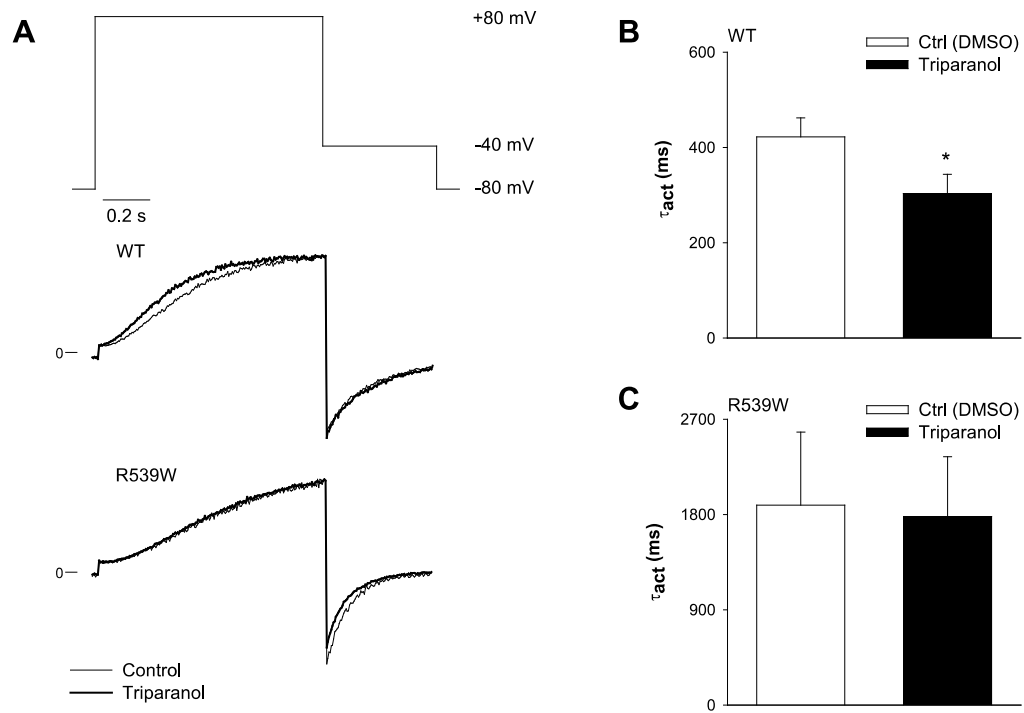


Figure S2

Effect of triparanol on WT and R539W activation kinetics. A, Representative recording of a COS-7 cell transfected with WT or R539W KCNE1-KCNQ1 concatemer channel, without and with 24-hour pre-treatment by 10 $\mu\text{mol/L}$ triparanol. B and C, Mean $\pm$ sem of WT and R539W activation tau from monoexponential fit of activation without and with triparanol pre-treatment. * $p < 0.05$.

Supplemental tables

	WT		R243H		R539W		R555C	
Time (s)	0	63	0	63	0	63	0	63
Mean of current density (pA/pF)	112	98.4	40.7	31.8	85.5	83.3	63.0	52.7
SEM	21.0	17.3	13.1	10.8	13.2	13.0	27.6	24.0
n	7	7	5	5	7	7	5	5
p value (one-tail paired t-test)	0.03		0.02		0.24		0.03	
Significant difference	YES		YES		NO		YES	

Table S1: Wortmannin-induced rundown.

	WT		R243H		R539W		R555C	
Time (s)	0	25	0	25	0	25	0	25
Mean of tail current amplitude (pA)	-406	-167	-171	-28.4	-72.8	-54.8	-110	-7.43
SEM	148	57.7	80.8	12.6	11.8	12.1	24.7	1.81
n	11	11	6	6	6	6	6	6
p value (one-tail paired t-test)	0.021		0.046		0.043		0.005	
Significant difference	YES		YES		YES		YES	

Table S2: Magnesium-induced rundown.

	WT		R243H		R539W		R555C		WT without Ci-VSP	
Time (s)	0	64	0	64	0	64	0	64	0	64
Mean of tail current density (pA/pF)	25.4	10.2	6.87	1.57	5.47	5.88	0.00	0.00	13.4	13.3
SEM	6.15	2.81	2.06	0.55	1.19	1.49	0.00	0.00	7.64	8.20
n	11	11	6	6	9	9	7	7	7	7
P value (one-tail paired t-test)	0.01		0.01		0.38		N/A		0.45	
Significant difference	YES		YES		NO		N/A		NO	

Table S3: Ci-VSP-induced rundown.

I.2. Discussion

I.2.1. Résumé des résultats

Le but de cette étude était de déterminer les mécanismes pouvant expliquer le comportement complexe du mutant R539W. En effet, les études précédentes ont montré que cette mutation est responsable à la fois d'une perte de fonction du canal KCNQ1 par rapport au canal sauvage sur la dépendance au potentiel (Chouabe et al., 2000), mais également d'un gain de fonction puisque ce canal mutant présente peu ou pas de diminution du courant (rundown) suite à une diminution de la quantité de PIP₂ (Park, 2005).

De façon cohérente avec les travaux de Park et de ses collaborateurs (Park, 2005), nous avons observé que les mutations R243H et R555C de KCNQ1, impliquées dans le LQT1, provoquent une augmentation de la sensibilité aux variations de la quantité de PIP₂ en comparaison avec le canal sauvage. Toujours en accord avec ces travaux de Park et de ses collaborateurs, nous avons montré que, contrairement aux mutations R243H et R555C, la mutation R539W diminue cette sensibilité du canal aux variations de quantité de PIP₂ membranaire par rapport au canal sauvage. En effet, l'application de wortmannin en configuration patch perméabilisé, de Mg²⁺ en configuration inside-out ou la co-expression de la Ci-VSP en configuration cellule entière, provoque une accélération de la cinétique de diminution du courant (« rundown ») pour les mutants R243H et R555C, par rapport au canal sauvage, et au contraire ce rundown est nettement ralenti pour le canal mutant R539W. De plus, nous avons montré que le mutant R539W ne répond pas à des changements d'osmolarité extracellulaire qui miment des variations physiologiques du niveau de PIP₂, contrairement à ce qui a été décrit pour le canal sauvage (Piron et al., 2010). Un modèle moléculaire nous a suggéré que le tryptophane, substitué à l'arginine en position 539, interagit avec le cholestérol membranaire, ce qui provoque la stabilisation partielle du canal à l'état ouvert, perturbant ainsi la sensibilité du canal KCNQ1 aux variations de quantité de PIP₂. Cette hypothèse a été validée par l'utilisation de deux molécules qui, par des mécanismes différents, conduisent à une diminution du cholestérol intracellulaire. En effet, nous avons montré que suite à un traitement avec de la cyclodextrine, connue pour induire une extrusion du cholestérol membranaire, ou du triparanol, inhibiteur de la synthèse de cholestérol, la cinétique de rundown du canal mutant R539W est accélérée et devient comparable à celle du canal sauvage. De plus, la substitution de l'arginine R539 par une phénylalanine (R539F), résidu moins hydrophobe et, d'après notre modèle, possédant un potentiel d'ancrage à la membrane plus faible, présente une cinétique de rundown du courant I_{Ks} comparable à celle du canal sauvage. L'ensemble de ces résultats confirme l'hypothèse d'une interaction entre le tryptophane, W539, avec le cholestérol qui se substitue à l'interaction de l'arginine, R539, avec le PIP₂ dans la stabilisation du canal à l'état ouvert.

Cependant, il est à noter que cette interaction R539W-KCNQ1 avec le cholestérol est sans doute moins forte que l'interaction R539-KCNQ1 avec le PIP_2 . En effet, même si le tryptophane en position 539 stabilise le canal à l'état ouvert grâce à interaction avec le cholestérol, qui remplace l'interaction avec le PIP_2 , l'expression phénotypique de cette mutation, impliquée dans le LQT1, est une perte de fonction sur l'activité du canal.

1.2.2. Limites de l'étude

La principale limite de notre étude est l'utilisation d'approches peu spécifiques à la fois pour l'étude de la sensibilité des canaux sauvage et mutants pour le PIP_2 , et pour la diminution du niveau de cholestérol intracellulaire.

En effet, la cinétique de diminution du courant au cours du temps pourrait dépendre de nombreux facteurs, parmi lesquels la sensibilité du canal KCNQ1 pour le PIP_2 . Par exemple, la wortmannin est une molécule qui inhibe spécifiquement la PI3-kinase, responsable de la synthèse des $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$ et $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$, et dans une moindre mesure, la PI4-kinase, responsable de la synthèse du $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ (Nakanishi et al., 1995). Même si le PIP_2 est le phospholipide le plus abondant dans la membrane et qu'on peut attribuer les effets de la wortmannin sur KCNQ1 à une diminution du PIP_2 , il faudrait étudier les effets des $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$ et $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$ car si par exemple le $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$ est plus efficace que le $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ sur la modulation du canal, il jouerait un rôle régulateur non négligeable. Nous avons également attribué l'accélération du rundown du courant I_{Ks} , observée en présence de Mg^{2+} , à une diminution du PIP_2 disponible en raison d'une interaction électrostatique $\text{Mg}^{2+}/\text{PIP}_2$. Cependant, il n'est pas à exclure que le Mg^{2+} puisse modifier l'activité du canal KCNQ1 *via* des mécanismes indépendants du PIP_2 . En effet, le Mg^{2+} est un cofacteur de nombreuses kinases, telle que la PKC (Hannun and Bell, 1990), ou des phospholipases (Alvarez-Leefmans et al., 1987), et l'application de Mg^{2+} pourrait activer l'une d'entre elles qui modulerait différemment l'activité du mutant R539W. Enfin, nous avons utilisé la phosphatase dépendante du potentiel Ci-VSP pour diminuer la quantité de PIP_2 disponible, cependant une étude a montré que cette Ci-VSP déphosphoryle le $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ mais aussi le $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$, ce qui remet en cause la spécificité de cette enzyme (Halaszovich et al., 2009).

Cependant, l'utilisation de ces trois approches différentes qui présentent des limites dans leur spécificité convergent toutes néanmoins vers un résultat identique, i.e. une accélération du rundown du courant I_{Ks} pour les canaux sauvage et mutés R243H et R555C, suggérant fortement l'implication d'une diminution de la quantité de PIP_2 disponible dans les effets observés.

De la même manière, les approches utilisées pour diminuer le cholestérol membranaire manquent de spécificité. En effet la méthyl- β -cyclodextrin ($\text{M}\beta\text{CD}$) est connue pour modifier

l'architecture de la membrane plasmique, inhiber l'endocytose, réduire la mobilité des protéines membranaires et diminuer certains phosphoinositides (Kwik et al., 2003; Zidovetzki and Levitan, 2007). De plus, des travaux ont montré que la diminution du cholestérol par la M β CD modifie la localisation intracellulaire du PIP₂ et affecte la synthèse du phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P), précurseur de la synthèse du PIP₂ (Minogue et al., 2010; Pike and Miller, 1998). Ainsi, l'accélération du rundown du mutant R539W suite à un traitement à la M β CD pourrait être attribuée à la délocalisation ou à la diminution de la synthèse de PIP₂ plutôt qu'à une diminution du niveau de cholestérol membranaire. De même, une diminution d'autres phosphoinositides (tel le PI4P) pourrait, comme pour le PIP₂ sur le canal sauvage, accélérer la cinétique de rundown par une déstabilisation de l'état ouvert du canal mutant R539W, *via* une perte d'interaction PI4P-R539W par exemple. L'utilisation de triparanol est également discutable puisqu'en plus de l'inhibition de la 24-dehydrocholesterol réductase (Avigan et al., 1960), enzyme intervenant dans la synthèse du cholestérol, il a été démontré que le triparanol augmente la libération de Ca²⁺ stocké dans la cellule, augmentant [Ca²⁺]_i (Takahashi et al., 1999), ou encore empêche la prolifération de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses en induisant leur apoptose (Bi et al., 2012).

A nouveau, le fait que le M β CD et le triparanol conduisent aux mêmes effets sur le courant I_{Ks} du canal sauvage, ou du canal mutant R539W, suggère fortement l'implication du cholestérol dans la perturbation de la sensibilité du canal KCNQ1-R539W aux variations de quantité de PIP₂.

1.2.3. Conclusion

Cette étude montre qu'une mutation peut déstabiliser l'interaction du canal avec un régulateur, et simultanément créer une nouvelle interaction entre ce canal et un composant membranaire. Ce travail révèle également qu'il faut être prudent lorsqu'on utilise la mesure du rundown comme outil pour déterminer la sensibilité d'un canal muté pour le PIP₂, puisqu'une mutation peut substituer l'interaction canal-PIP₂ avec un autre partenaire membranaire. La stabilisation partielle à l'état ouvert du canal mutant R539W est paradoxale avec le phénotype du LQT1, qui est causé par une perte de fonction du canal KCNQ1. Mais gardons à l'esprit que même si cette mutation diminue la sensibilité du canal aux variations de quantité de PIP₂ intracellulaire, la mutation R539W provoque une diminution de l'affinité du canal KCNQ1 pour le PIP₂. Cette perturbation de l'interaction du canal avec le PIP₂ provoque un décalage de la dépendance au potentiel de l'activation vers des potentiels plus dépolarisés et une accélération de la cinétique de désactivation du canal KCNQ1 qui se traduisent par un allongement de l'intervalle QT au niveau de l'ECG.

II. Projet 2 : Identification des sites de phosphorylation natifs du canal sodique cardiaque $\text{Na}_v1.5$ et conséquences fonctionnelles dans le contexte de l'insuffisance cardiaque

II.1. Introduction

Comme décrit dans l'introduction générale, de nombreux travaux ont suggéré l'implication du canal $\text{Na}_v1.5$ dans les troubles du rythme observés dans l'IC (Aiba and Tomaselli, 2010; Wang and Hill, 2010). En effet, différentes études ont montré que le courant Na^+ est diminué (Casini et al., 2009; Shang et al., 2007; Ufret-Vincenty et al., 2001), ou encore que le courant I_{NaL} est augmenté dans l'IC (Aiba and Tomaselli, 2010; Ashpole et al., 2012; Maltsev et al., 2007; Maltsev and Undrovinas, 2008; Undrovinas et al., 1999; Valdivia et al., 2005; Wagner et al., 2006). Parmi les mécanismes moléculaires identifiés dans ces modifications d'activité du canal $\text{Na}_v1.5$ dans l'IC, Wagner et ses collaborateurs ont montré que la phosphorylation du canal est augmentée et que les propriétés d'inactivation du canal sont modifiées dans leur modèle animal d'IC surexprimant la $\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}$ ($\text{CaMKII}\delta_{\text{C}}\text{-Tg}$; (Wagner et al., 2006). Plus précisément, ils ont montré, ainsi que la plupart des études qui se sont intéressées à la régulation du canal $\text{Na}_v1.5$ par la CaMKII , que la CaMKII décale de la disponibilité des canaux $\text{Na}_v1.5$ vers des potentiels plus négatifs, augmente la proportion de canaux entrant en inactivation intermédiaire, I_{IM} , ralentit la cinétique de levée d'inactivation, et par ailleurs ralentit les cinétiques d'inactivation du courant I_{Na} et augmente la densité du courant sodique persistant I_{NaL} (Ashpole et al., 2012; Deschênes et al., 2002; Hund et al., 2010; Koval et al., 2012; Wagner et al., 2006). De façon surprenante, les résultats obtenus jusqu'alors ont montré que la CaMKII phosphoryle le canal préférentiellement sur l'interdomaine IDI-II (S516, S571 et T594), loin des régions impliquées dans l'inactivation de $\text{Na}_v1.5$ (i.e. le S4 du domaine IV, l'interdomaine IDIII-IV, les B4-5 des domaines III et IV et le CTD). Cependant, ces sites de phosphorylation ont été identifiés par des approches *in silico* et *in vitro*, et on peut alors s'interroger sur la validité de ces résultats dans des conditions plus physiologiques et physiopathologiques. En ce qui concerne le résidu S571, identifié par l'équipe de Peter Mohler, une étude a révélé que la phosphorylation de cette sérine par la CaMKII est légèrement augmentée dans le myocarde de patients atteints d'insuffisance cardiaque, ainsi que dans un modèle de chiens d'infarctus du myocarde (Koval et al., 2012). En revanche, les résidus S516 et T594, identifiés par l'équipe de Donald Bers, ont été étudiés seulement en système d'expression hétérologue, les cellules HEK-293 (Ashpole et al., 2012). Dans le but d'identifier les sites de phosphorylation de $\text{Na}_v1.5$ qui pourraient conduire aux modifications des propriétés d'inactivation de $\text{Na}_v1.5$ dans l'IC, des analyses phosphoprotéomiques comparatives ont été développées au laboratoire à partir de ventricules de souris dans des conditions

normales (WT) et dans le contexte de l'ICsur les cœurs de souris CaMKII δ -Tg(Wagner et al., 2006). Une étude fonctionnelle par la technique de patch-clamp dans des cellules HEK-293 a par la suite permis de déterminer l'implication de deux de ces sites de phosphorylation nouvellement identifiés dans la régulation des propriétés d'inactivation des canaux Na_v1.5.

II.2. Matériel et Méthodes

II.2.1. Expression hétérologue dans les cellules HEK-293

La lignée cellulaire HEK-293 (human embryonic kidney) a été utilisée pour exprimer de façon hétérologue et transitoire le canal Na_v1.5 avec sa sous-unité accessoire β 1. Les cellules HEK-293 (à environ 60% de confluence) sont transfectées à l'aide de *Lipofectamine 2000* par 0,2 μ g de plasmide contenant l'ADNc Na_v1.5 humain sauvage ou muté, 0,4 μ g de Na_v β 1, 0,2 μ g de GFP et 1,2 μ g de plasmide pcDNA3.1 vide. Pour les enregistrements du courant sodique persistant I_{NaL} , les quantités de plasmides utilisés sont de 0,9 μ g de Na_v1.5 humain sauvage ou muté, 0,9 μ g de Na_v β 1, 0,2 μ g de GFP de façon à augmenter la densité de courant I_{Na} et I_{NaL} .

Les mutations ponctuelles S1933E, S1984E et S1933E-S1984E ont été réalisées par mutagenèse dirigée à partir du kit *QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis* (Aligent Technologies).

Le repiquage des cellules est réalisé 36 heures après transfection et les enregistrements de patch clamp sont effectués 48 heures après transfection.

II.2.2. Technique de patch clamp

Les expériences de patch clamp ont été réalisées à température ambiante. Le pilotage du potentiel imposé, l'acquisition des tracés ainsi que l'analyse sont réalisés avec le logiciel pClamp version 10 (Molecular Devices). L'électrode de mesure et de stimulation est connectée à un amplificateur de patch-clamp (Axopatch 200A, Axon Instruments). Les pipettes ont été étirées à partir de capillaires de verre borosilicate (TW150F-3, WPI, Sarasota, USA) dans une étireuse horizontale (Sutter Instrument, modèle P-97) de façon à obtenir des pipettes de résistance comprise entre 1,5 et 2,5 M Ω .

La solution intrapipette contient (en mM) : NaCl 5, CsCl 105, HEPES 10, Glucose 5, EGTA 10, CaCl₂ 4, MgCl₂ 1, Mg-ATP 5 (pH 7.2 avec du CsOH). Les cellules HEK-293 baignent dans une solution extracellulaire composée (en mM) : NaCl 25, CsCl 94, TEA-Cl 25, HEPES 10, Glucose 5, CaCl₂ 1, MgCl₂ 2 (pH 7.4 avec du CsOH).

Pour les études du courant I_{NaL} , toujours afin d'augmenter la densité de courant I_{Na} et I_{NaL} , la concentration en Na^+ extracellulaire est augmentée comme suit (en mM) : NaCl 140, CsCl 5, HEPES 10, Glucose 5, $CaCl_2$ 1, $MgCl_2$ 2 (pH 7.4 avec du CsOH). Afin de perfuser la tétródotoxine (TTX), 20 mM de mannitol ont été ajouté à la solution extracellulaire sans, puis avec 30 μ M de TTX.

Les mesures de courant Na^+ ont été effectuées à partir d'un potentiel de repos à -120 mV, suivi d'une dépolarisation du potentiel de membrane allant de -80 à +40 mV avec un incrément de 5 mV pendant 50ms, toutes les 5s. Ce protocole permet la mesure de différents paramètres :

- Les densités de courant Na^+ et la représentation de la courbe courant-potentiel (I-V)
- Le potentiel de demi-activation ($V_{1/2}$) et le facteur de pente (k) de la courbe d'activation ont été déterminés grâce à une régression non linéaire de la conductance (G) normalisée par la conductance maximale (G_{max}), à l'aide d'une équation du type Boltzmann :

$$G_{rel} = G_{max} / (1 + \exp(-(V_m - V_{1/2})/k)) \text{ (équation 1)}$$

- Le temps au pic qui reflète la cinétique d'activation
- Les constantes de temps de l'inactivation à l'état ouvert (τ_2 et τ_1) du courant Na^+ et la proportion de canaux s'inactivant rapidement par rapport aux canaux s'inactivant lentement (A_2/A_1) sont déterminées grâce de l'équation de la régression non linéaire de type bi-exponentielle de la partie décroissante du courant Na^+ : $I(t) = A_1 \times \exp(-t/\tau_1) + A_2 \times \exp(-t/\tau_2) + y_0$ (équation 2)

La dépendance au potentiel de l'inactivation a été déterminée à l'aide d'une dépolarisation (stimulation P1) du potentiel membranaire de -120 mV à un potentiel allant de -120 à -40 mV avec un incrément de 5 mV pendant 500 ms, suivi d'une dépolarisation (stimulation P2) à -20mV pendant 20 ms, toutes les 5s. Des courbes d'inactivations, obtenus en normalisant le pic le courant Na^+ par rapport au courant maximum (I_{max}), lors de la stimulation P2, ont été tracées à l'aide d'une régression non linéaire de type Boltzmann : $I_{rel} = I_{max} / (1 - \exp((V_m - V_{1/2inact})/k))$ (équation 3)

La levée d'inactivation a été déterminée à l'aide d'une dépolarisation du potentiel membranaire de -120 mV à -20 mV pendant 350 ms (stimulation P1), suivie d'une repolarisation à -120mV pendant une durée variant de 1 à 200 ms, avant une seconde dépolarisation à -20 mV pendant 20 ms (stimulation P2), toutes les 5 s. La constante de temps (τ_{rec}) et l'amplitude (A) de levée d'inactivation ont été déterminées à l'aide d'une régression non linéaire du pic de courant Na^+ mesurée en P2 normalisé par rapport au pic de courant mesuré en P1, à l'aide d'une équation de type mono-exponentielle : $I_{rel} = A (1 - \exp(-t/\tau_{rec}))$ (équation 4)

Le courant sodique tardif I_{NaL} a été mesuré à partir d'une dépolarisation du potentiel membranaire de -120 mV à -20mV pendant 350 ms, toutes les 5s. I_{NaL} a été déterminé grâce à une régression non linéaire de la partie décroissante du courant Na^+ sensible au TTX (TTX-sensible), à l'aide de l'équation 2 où $y_0 = I_{NaL}$.

II.2.3. Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous la forme de moyenne $\pm$ erreur standard à la moyenne. Les différences sont statistiquement testées en utilisant les tests de Mann-Whitney, l'analyse de variances à une ou à deux voies (ANOVA) suivi d'un test de Kruskal-Wallis ou de Bonferroni quand les comparaisons multiples sont nécessaires. Une différence avec une valeur de $p < 0.05$ est considérée comme significative.

II.3. Résultats

Dans le but d'identifier *in situ* les résidus de $\text{Na}_v1.5$ phosphorylés qui pourraient jouer un rôle dans l'altération des propriétés d'inactivation des canaux $\text{Na}_v1.5$ dans l'IC, des analyses de phosphoprotéomique ont été réalisées à partir de ventricules de souris $\text{CaMKII}\delta_c\text{-Tg}$. Cette approche développée et réalisée par Céline Marionneaua consisté à immunoprécipiter le canal $\text{Na}_v1.5$ à l'aide de l'anticorps monoclonal anti- Na_vPAN à partir de lysats de ventricules de souris WT et $\text{CaMKII}\delta_c\text{-Tg}$. Les protéines immunoprécipitées sont digérées avec de la trypsine et les fragments peptidiques obtenus sont analysés par spectrométrie de masse. Comme illustré dans la **Figure 17**, l'abondance relative du canal $\text{Na}_v1.5$ est trois à quatre fois plus grande dans les ventricules de souris $\text{CaMKII}\delta_c\text{-Tg}$ par rapport aux souris sauvages, ainsi que dans les IPs respectives.

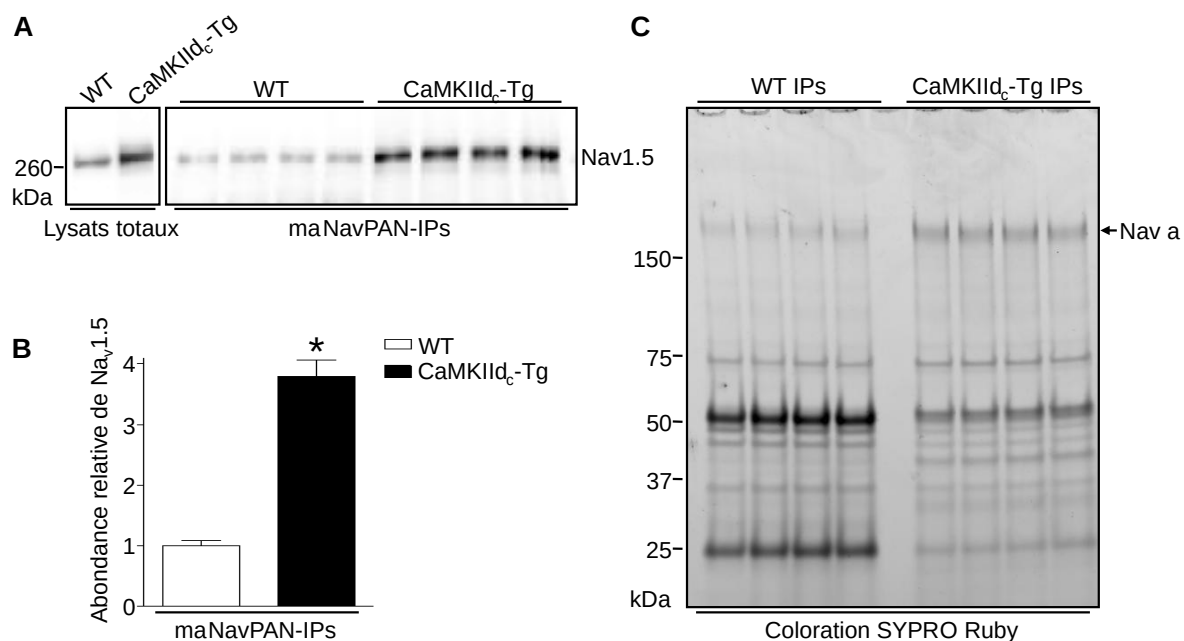


Figure 17 : Immunoprécipitation des complexes canaux de $\text{Na}_v1.5$ de ventricules de souris adultes sauvages et transgéniques surexprimant la $\text{CaMKII}\delta_c$.

(A) Western blots représentatifs de $\text{Na}_v1.5$ (révélés avec un anticorps polyclonal de lapin anti- $\text{Na}_v1.5$) des lysats totaux et des immunoprécipitations (IPs) de ventricules isolés de souris sauvages (WT) et de souris surexprimant la $\text{CaMKII}\delta_c$ ($\text{CaMKII}\delta_c\text{-Tg}$) à l'aide de l'anticorps monoclonal anti- NavPAN ($\text{m}\alpha\text{NavPAN}$, dirigé contre toutes les sous-unités α des canaux Na_v). **(B)** Moyenne de l'abondance relative de $\text{Na}_v1.5$ dans les IPs de souris WT et de souris $\text{CaMKII}\delta_c\text{-Tg}$. * $p < 0.05$, $n = 4$, test Mann-Whitney. **(C)** Coloration du gel au SYPRO Ruby des IPs réalisées avec l'anticorps $\text{m}\alpha\text{NavPAN}$ dans les ventricules de souris WT et $\text{CaMKII}\delta_c\text{-Tg}$.

Des analyses de phosphoprotéomiques des protéines Na_v1.5 immunoprécipitées ont permis d'identifier dix-huit sites de phosphorylation parmi lesquels huit sont nouveaux (en bleu, **Figure 18**), par rapport à notre étude précédemment publiée (Marionneau et al., 2012). La plupart de ces sites sont situés sur l'IDI-II, un seul site a été identifié sur l'extrémité N-terminale et l'interdomaine IDII-III, et trois sur l'extrémité C-terminale.

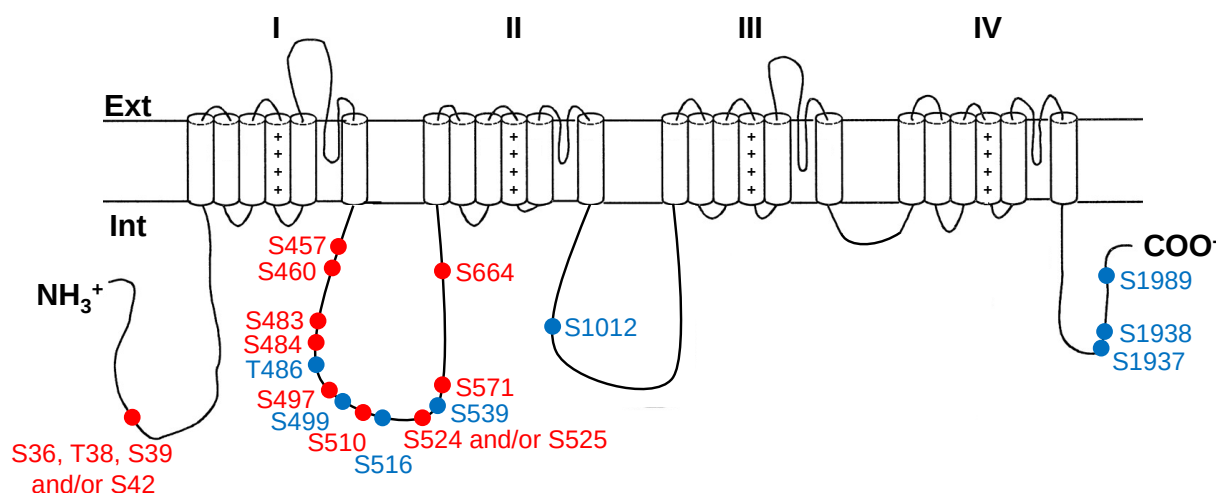


Figure 18 : Représentation schématisée des sites de phosphorylation de Na_v1.5 identifiés *in situ*.

Localisation des sites de phosphorylations du canal sodique cardiaque Na_v1.5 de souris identifiés *in situ* par spectrométrie de masse. Parmi les dix-huit sites de phosphorylation identifiés, dix (en rouge) ont déjà été publiés dans une précédente étude de phosphoprotéomique (Marionneau et al., 2012), et huit sont nouveaux (en bleu). Quatre et deux localisations de site de phosphorylation sont possibles aux acides aminés 36 à 42 et 524 à 525.

Afin de déterminer l'implication potentielle des sites de phosphorylation identifiés dans l'altération des propriétés d'inactivation des canaux Na_v1.5 dans l'IC, l'abondance relative de chaque phosphopeptide détecté a été quantifiée dans les IP réalisées à partir des souris CaMKII δ_c -Tg et WT. De façon cohérente avec les résultats de biochimie (**Figure 17**), l'abondance relative des peptides non phosphorylés de Na_v1.5 est trois fois plus élevée dans les IP des souris CaMKII δ_c -Tg, par rapport aux souris sauvages (**Figure 19A**). Cette augmentation par trois représentera la valeur de référence pour comparer l'abondance relative des phosphopeptides dans les souris. Parmi les 86 peptides non phosphorylés et les 35 phosphopeptides pour lesquels un site de phosphorylation a été identifié, seul deux phosphopeptides, RL(pS)(pS)GTEDGGDDR contenant les phosphosérines pS483 et pS484, et RL(pS)(pS)GTEDGGDDR contenant la phosphosérine pS1989, présentent un changement significatif d'abondance relative (7,13 et 8,96, respectivement) par rapport à l'abondance relative moyenne de référence (3.6 ± 0.11 ; **Figure 19A et 19B**). De plus, le phosphopeptide Q(-17.03)QAGS(pS)GLSDEDAPER, contenant la pS1937 et/ou pS1938, est présent dans les immunoprécipitats de souris CaMKII δ_c -Tg (n = 3/4) et absent dans les immunoprécipitats de souris WT (0/4) (**Figure 19D**). L'alignement des séquences encadrant les régions des pS1937/pS1938 et pS1989 montre une conservation élevée dans d'autres

espèces, et de façon intéressante révèle que les pS1937/1938 sont localisées juste en sortie du motif IQ de liaison à la CaM qui joue un rôle clé dans l'inactivation du canal (voir la partie II.6 de l'introduction générale), et la pS1989 appartient à un site consensus de phosphorylation par la CaMKII, RXX(S/T) (Songyang et al., 1996) (**Figure 19C**).

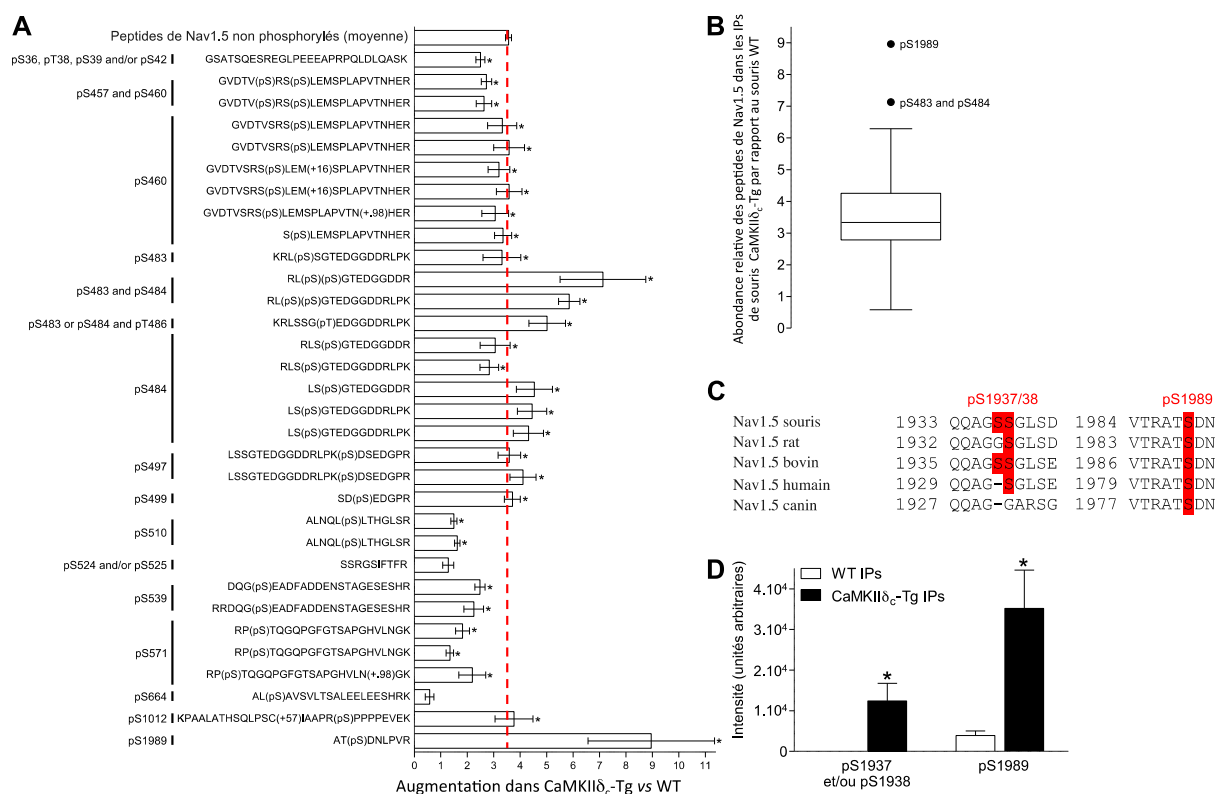


Figure 19 :Quantification relative des sites de phosphorylation du canal Na_v1.5 dans les immunoprécipitats de Na_v1.5 à partir de ventricules de souris CaMKII δ_c -Tg par rapport aux souris WT.

(A) Abondance relative de 35 phosphopeptides contenant les sites de phosphorylation de Na_v1.5 (listés à gauche) dans les immunoprécipitats de Na_v1.5 réalisés à partir de cœur des souris surexprimant la CaMKII δ_c (CaMKII δ_c -Tg) par rapport aux cœurs de souris sauvages (WT). La moyenne de l'abondance relative des peptides non phosphorylés de Na_v1.5 a été calculée à partir de 86 peptides non phosphorylés. De façon cohérente avec les analyses biochimiques, ces peptides non phosphorylés sont 3,6 fois plus représentés dans les immunoprécipitats de souris CaMKII δ_c -Tg par rapport aux de souris WT. * $p < 0,05$, test Mann-Whitney. (B) Représentation en boîte à moustaches de l'abondance relative des peptides de Na_v1.5. Parmi les 121 peptides (86 non phosphorylés et 35 phosphorylés), seul le peptide doublement phosphorylé RL(pS)(pS)GTEDGGDDRLPK contenant les phosphosérines 483 et 484 (pS483 et pS484) ainsi que le phosphopeptide AT(pS)DNLPVR contenant la phosphosérine 1989 (pS1989) présentent un changement significatif d'abondance relative (respectivement 7,13 et 8,96) par rapport au ratio d'abondance moyen (CaMKII δ_c -Tg vs WT). (C) Conservation des deux phosphosérines 1938 et 1989 de l'extrémité C-terminale (pS1938 et pS1989) dans différentes espèces. (D) Moyenne des intensités des phosphopeptides Q(-17.03)QAGS(pS)GLSDEDAPEP et AT(pS)DNLPVR contenant, respectivement, les sérines phosphorylés S1937 et/ou S1938 (pS1937/pS1938) et S1989 (pS1989). * $p < 0,05$, test Mann-Whitney.

Pour évaluer l'impact de la phosphorylation des sérines S1938 (correspondant au résidu S1933 chez l'Homme) et S1989 (correspondant au résidu S1984 chez l'Homme) sur les propriétés d'inactivation des canaux Na_v1.5, des phosphomutants ont été réalisés en mutant ces deux sérines en glutamate, de façon individuelles ou simultanées, afin de mimer leur phosphorylation et des analyses

fonctionnelles ont été effectuées grâce à la technique de patch clamp, en configuration cellule entière, dans le modèle des cellules HEK-293.

Les courants Na^+ ont été enregistrés en configuration cellule entière en réponse à des dépolarisations de -120 mV à des potentiels membranaires allant de -80 mV à +40 mV (**Figure 20A**). À partir des enregistrements obtenus, des courbes « courant-potentiel » représentant la densité de courant mesuré en fonction du potentiel imposé ont été établies (**Figure 20B**). Nos résultats montrent que seule la mutation S1984E induit une augmentation significative de la densité de courant pour les potentiels allant de -40 mV à -10 mV, par rapport au canal sauvage (WT) (**Tableau IV**).

Tableau IV : Densités moyennes de courant Na^+ mesurées (pA/pF) à différents potentiels.

Potentiels	WT (n = 22)	S1933E (n = 12)	S1984E (n = 13)	S1933E-S1984E (n = 9)
-40 mV	-135,8 ± 9,4	-148,3 ± 21,5**	-180,6 ± 16,4	-170,8 ± 35,5
-35 mV	-152,0 ± 10,8	-162,6 ± 22,5**	-200,2 ± 17,8	-190,3 ± 40,6
-30 mV	-157,8 ± 11,4	-166,3 ± 22,2**	-207,4 ± 18,2	-203,2 ± 48,1
-25 mV	-155,9 ± 11,5	-162,8 ± 21,3**	-203,6 ± 18,2	-195,8 ± 43,4
-20 mV	-148,5 ± 11,1	-154,3 ± 20,0**	-193,8 ± 17,3	-186,5 ± 42,4
-15 mV	-137,9 ± 10,4	-142,3 ± 18,3*	-179,4 ± 16,4	-173,5 ± 39,5
-10 mV	-124,5 ± 9,5	-128,2 ± 16,6*	-162,1 ± 15,2	-158,2 ± 36,7

WT : canal sauvage ; S1933E, S1984E et S1933E-S1984E : canaux $\text{Na}_v1.5$ présentant une simple ou une double mutation sur les sérines S1933, S1984 et S1933-S1984, respectivement en glutamate (E), qui mime leur phosphorylation. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, analyse de variances à deux voies (ANOVA) suivi d'un test de Bonferroni.

Ces enregistrements nous ont par ailleurs permis de tracer les courbes d'activation, et ainsi de déterminer la dépendance au potentiel des canaux WT et mutés sur les sérines S1933 et S1984 en résidu phosphomimétique (glutamate, E) (**Figure 20C**). Nos résultats montrent que la substitution en glutamate des sérines S1933 et S1984, seules ou simultanément, n'a aucun effet significatif sur la dépendance au potentiel de l'activation (**Figure 20C**). En effet, le $V_{1/2}$ d'activation pour le canal WT (-45,03 ± 0,36 mV) et le mutant S1933E (-45,55 ± 0,57 mV), S1984E (-45,31 ± 0,60 mV) ou le double phosphomutant S1933-S1984E (-45,53 ± 0,70 mV) ne sont pas statistiquement différents (**Tableau V**). La pente de la courbe d'activation, qui reflète la sensibilité du canal aux variations du potentiel membranaire, est également inchangée entre le canal WT ($k = 6,05 \pm 0,1$, $n = 22$) et les canaux mutés S1933E ($k = 6,0 \pm 0,11$, $n = 12$), S1984E ($k = 5,96 \pm 0,12$, $n = 13$) et S1933E-S1984E ($k = 6,09 \pm 0,14$, $n = 8$; **Tableau V**).

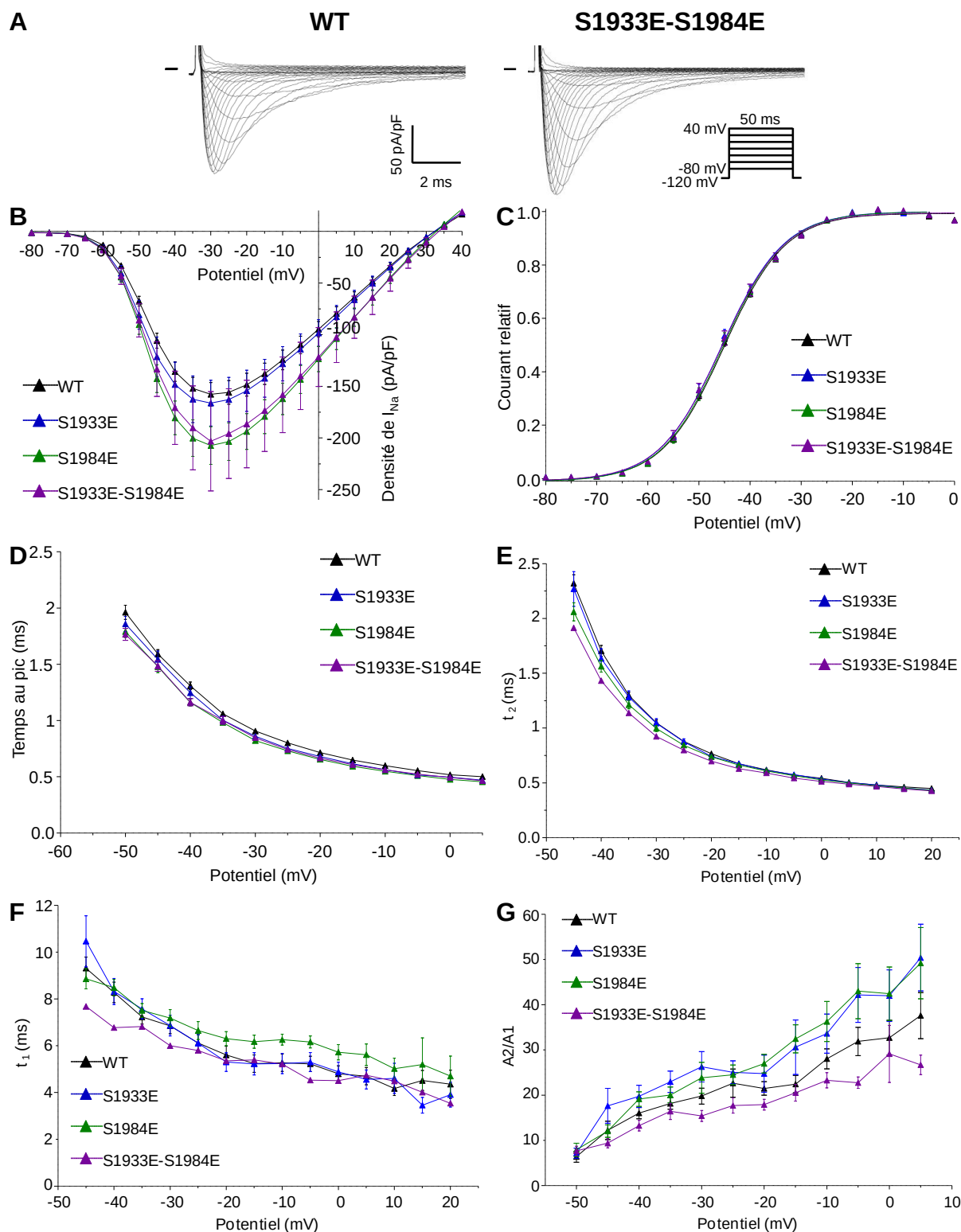


Figure 20 : Propriétés biophysiques des courants Na^+ WT, S1933E, S1984E et S1933E-S1984E.

(A) Traces de courant Na^+ représentatives enregistrées pour le canal WT (à gauche) et mutant S1933E-S1984E (à droite) à différents potentiels. (B) Moyennes des courbes présentant la relation courant-potentiel du canal WT et des canaux mutants S1933E, S1984E et S1933E-S1984E. (C) Moyenne des courbes présentant la dépendance au potentiel de l'activation du canal WT et des trois canaux mutants. (D) Temps au pic en fonction du potentiel des canaux WT et mutants. (E à G) Constante de temps rapide (τ_2) et lente (τ_1) de l'inactivation à l'état ouvert, et proportion de canaux s'inactivant rapidement par rapport aux canaux s'inactivant lentement (A2/A1) en fonction du potentiel, respectivement. Ces paramètres ont été déterminés grâce à une régression non linéaire bi-exponentielle d'équation $I(t) = A1 \times \exp(-t/\tau_1) + A2 \times \exp(-t/\tau_2) + y_0$, de la partie décroissante des courants Na^+ .

A partir des mêmes enregistrements, nous avons étudié si la phosphorylation des sérines S1933 et S1984 a un impact sur les cinétiques d'activation et d'inactivation à l'état ouvert des canaux $\text{Na}_v1.5$. Nos résultats montrent que les phosphomutants $\text{Na}_v1.5\text{-S1933E}$, $\text{Na}_v1.5\text{-S1984E}$ et $\text{Na}_v1.5\text{-S1933E-S1984E}$ ne modifient pas la cinétique d'activation, déterminée par le temps au pic qui reflète la vitesse à laquelle les canaux s'activent, ni les cinétiques d'inactivation à l'état ouvert du courant Na^+ , déterminées par les constantes de temps τ_2 et τ_1 des composantes rapides et lentes de l'inactivation du courant Na^+ (**Figure 20D à 20F**). Les ratios A_2/A_1 , qui reflètent la proportion de canaux s'inactivant plus rapidement par rapport aux canaux s'inactivant plus lentement, sont également inchangés (**Figure 20G**).

Afin d'étudier les effets de la phosphorylation de ces résidus S1933 et S1984 sur la dépendance au potentiel de l'inactivation à l'état stable des canaux $\text{Na}_v1.5$, les courants Na^+ ont été enregistrés grâce à un protocole constitué d'une première stimulation conditionnant (P1) de 500 ms à différents potentiels allant de -120 à -40 mV, suivi d'une seconde stimulation (P2) qui permet de mesurer l'activité des canaux disponibles (**Figure 21A**). Les enregistrements obtenus permettent d'établir la courbe d'inactivation qui représente le courant relatif mesuré lors de la stimulation P2, par rapport au potentiel de P1 (**Figure 21B**). Le potentiel de demi-inactivation $V_{1/2\text{inac}}$, qui est le potentiel auquel 50% des canaux sont inactivés, ainsi que la pente reflétant la sensibilité de l'inactivation aux variations du potentiel sont également estimés à partir de la courbe d'inactivation. Nos résultats montrent que le double phosphomutant S1933E-S1984E, mais pas les simples phosphomutants S1933E et S1984E, provoque un décalage de la courbe d'inactivation vers les potentiels plus négatifs (**Figure 21B**), ce qui se traduit par une hyperpolarisation de la valeur du $V_{1/2\text{inac}}$, qui est le potentiel auquel 50% des canaux sont inactivés, pour le double phosphomutant S1933E-S1984E ($V_{1/2\text{inac}} = -88,67 \pm 0,94$ mV) par rapport au canal $\text{Na}_v1.5$ WT ($V_{1/2\text{inac}} = -86,65 \pm 0,62$ mV). Cependant, cet effet n'est qu'une tendance puisque la diminution de la valeur du $V_{1/2\text{inac}}$ n'est pas significative (**Tableau V**). En revanche, la pente de la courbe d'inactivation est inchangée entre le canal WT ($k = 5,0 \pm 0,08$, $n = 22$) et les canaux mutés S1933E ($k = 5,02 \pm 0,15$, $n = 14$), S1984E ($k = 5,27 \pm 0,13$, $n = 12$) et S1933E-S1984E ($k = 5,06 \pm 0,06$, $n = 11$) ; **Tableau V**).

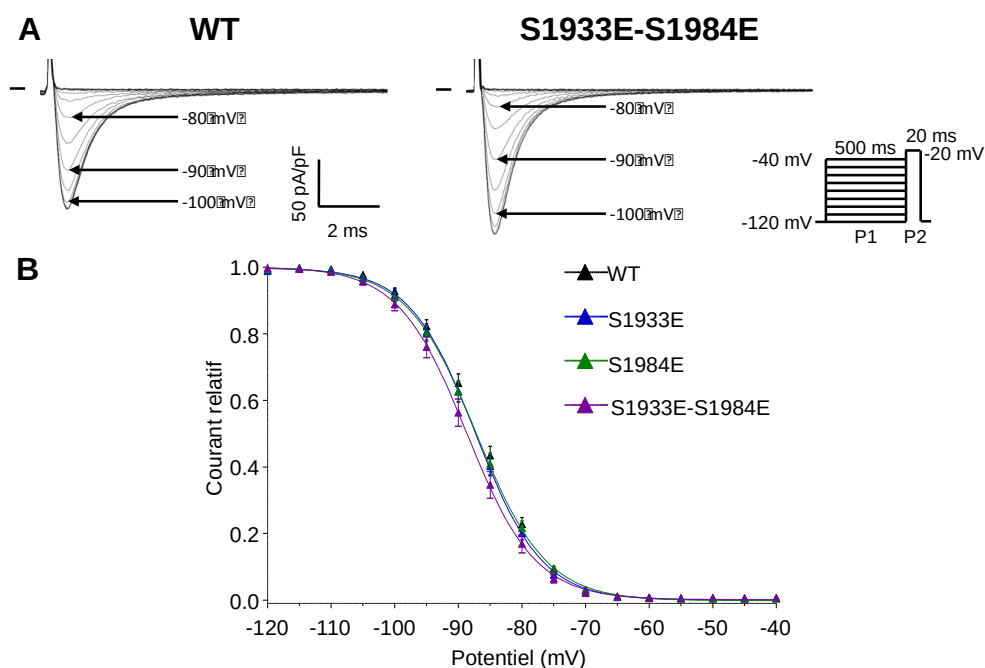


Figure 21 : Dépendance au potentiel de l'inactivation des canaux WT, S1933E, S1984E et S1933E-S1984E

(A) Traces de courant Na^+ représentatives enregistrées durant la stimulation P2 sur le canal WT (à gauche) et mutant S1933E-S1984E (à droite) à différents potentiels de P1. **(B)** Moyenne des courbes présentant la dépendance au potentiel de l'inactivation du canal WT et des canaux mutants S1933E, S1984E et S1933E-S1984E.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'impact de la phosphorylation de ces deux sérines sur la levée d'inactivation. Pour cela, des enregistrements de courant ont été effectués grâce à un protocole constitué de deux dépolarisations à -20 mV, séparés par un retour au potentiel de repos à -120 mV pendant une durée allant de 1 à 200 ms (**Figure 22A**). Nos résultats montrent que les mutations mimant la phosphorylation des deux sérines, individuellement ou simultanément, n'ont aucun effet sur la levée d'inactivation du canal $\text{Na}_v1.5$ (**Figure 22B**).

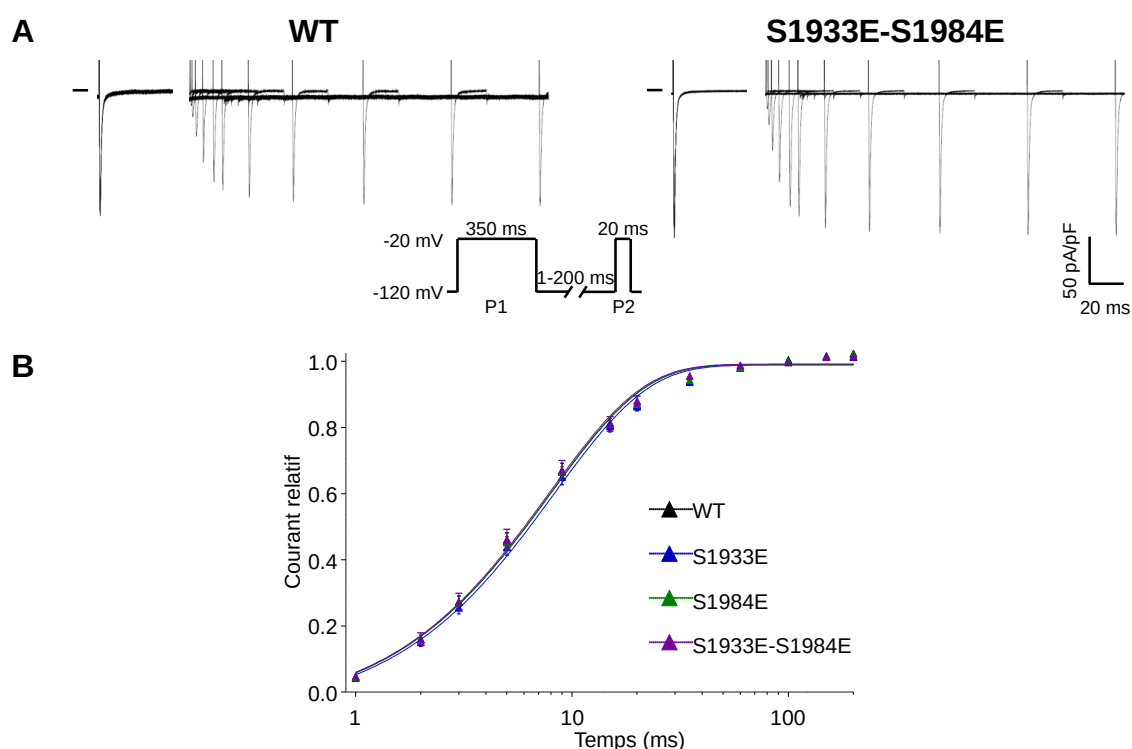


Figure 22 : Levée d'inactivation des canaux WT, S1933E, S1984E et S1933E-S1984E dans les cellules HEK-293.

(A) Traces de courant Na⁺ représentatives enregistrées durant les stimulation P1 et P2, après des intervalles de temps croissant sur le canal WT (à gauche) et mutant S1933E-S1984E (à droite) **(B)** A partir de ces enregistrements, les courbes représentant le courant relatif mesuré en P2, normalisé par rapport au courant mesuré en P1, ont été construites selon une régression non linéaire mono-exponentielle d'équation $I_{rel} = A(1 - \exp(-t/\tau_{rec}))$.

Afin d'évaluer l'impact des mutations mimant la phosphorylation des sérines S1933 et S1984 sur le courant Na⁺ persistant, des enregistrements ont été effectués à l'aide d'un protocole de stimulation à saut unique du potentiel membranaire (de -120 mV à -20 mV pendant 350 ms). Ce protocole a été répété dans le temps, toutes les 5 secondes, avant et après application de tétródotoxine (TTX, 30 μ M) (**Figure 23A**). Nos résultats montrent que la double mutation S1933E-S1984E provoque une augmentation de la densité du courant Na⁺ persistant. En effet, le pourcentage de courant Na⁺ persistant par rapport au courant Na⁺ est de $0,043 \pm 0,004$ ($n = 31$) pour le canal WT, et de $0,069 \pm 0,006$ ($n = 35$) pour le double phosphomutant S1933E-S1984E (**Figure 23B**). Aucune différence significative n'a été observée pour les simples phosphomutants (S1933E, $\%I_{NaL}/I_{Na} = 0,050 \pm 0,004$, $n = 18$; S1984E, $\%I_{NaL}/I_{Na} = 0,057 \pm 0,004$, $n = 31$).

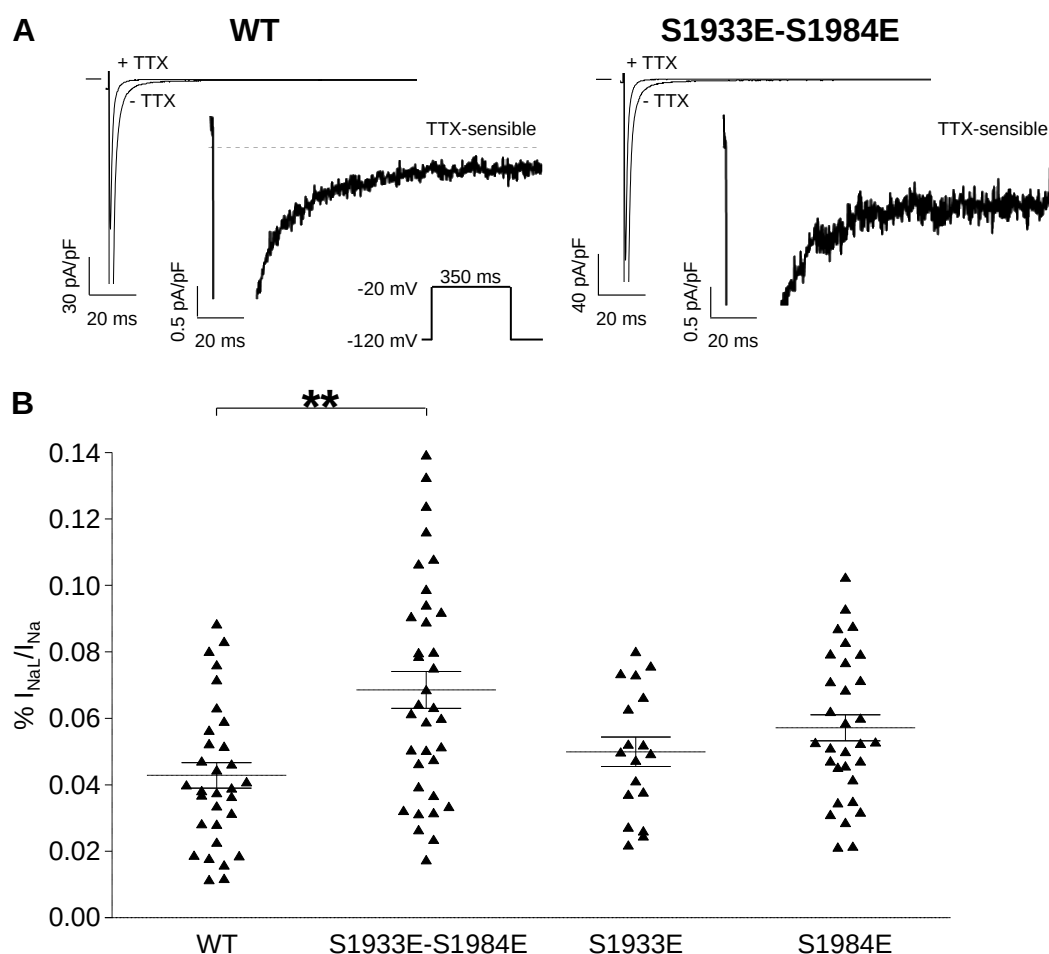


Figure 23 : Enregistrement du courant Na^+ persistant des canaux WT, S1933E, S1984E et S1933E-S1984E

(A) Traces de courant Na^+ représentatives enregistrées avant (-) et après (+) TTX sur le canal WT (à gauche) et mutant S1933E-S1984E (à droite). Le courant Na^+ sensible à la TTX (TTX-sensible) a été déterminé en soustrayant les traces de courant enregistrées en présence de 30 μM de TTX, des traces enregistrées en absence de TTX. **(B)** Représentation des valeurs de pourcentage de I_{NaL}/I_{Na} pour les différentes conditions testées, et les moyennes et erreurs standard associées. ** $p < 0,01$, analyse de variances à une voie (ANOVA) suivi d'un test de Kruskal-Wallis.

Tableau V : Paramètres extraits des régressions non linéaires des différentes courbes.

Protocole	Paramètre	WT (n)	S1933E (n)	S1984E (n)	S1933E-S1984E (n)
Activation	$V_{1/2}$ (mV)	$-45,03 \pm 0,36$ (22)	$-45,55 \pm 0,57$ (12)	$-45,31 \pm 0,60$ (13)	$-45,53 \pm 0,70$ (8)
	k	$6,05 \pm 0,1$	$6,0 \pm 0,11$	$5,96 \pm 0,12$	$6,09 \pm 0,14$
Inactivation	$V_{1/2inact}$ (mV)	$-86,65 \pm 0,62$ (22)	$-87,37 \pm 0,7$ (14)	$-87,20 \pm 0,74$ (12)	$-88,67 \pm 0,94$ (11)
	k	$5,0 \pm 0,08$	$5,02 \pm 0,15$	$5,27 \pm 0,13$	$5,06 \pm 0,06$
Levée	A	$0,94 \pm 0,01$ (20)	$0,95 \pm 0,01$ (13)	$0,96 \pm 0,00$ (12)	$0,98 \pm 0,00$ (9)
d'inactivation	τ_{rec} (ms)	$9,43 \pm 0,70$	$9,62 \pm 0,70$	$9,09 \pm 0,49$	$9,07 \pm 0,72$
Courant I_{NaL}	% I_{NaL}/I_{Na}	$0,043 \pm 0,04$ (31)	$0,050 \pm 0,004$ (18)	$0,057 \pm 0,004$ (31)	$0,069 \pm 0,006$ (35)**

Paramètres des régressions non linéaires de l'activation, de l'inactivation à l'état stable, de la levée d'inactivation et % I_{NaL}/I_{Na} . La régression non linéaire des courbes d'activation et d'inactivation suivent une équation de type Boltzmann : $G_{rel} = G_{max}/(1 + \exp(-(V_m - V_{1/2})/k))$ et $I_{rel} = I_{max}/(1 - \exp((V_m - V_{1/2inact})/k))$, respectivement. La régression non linéaire de la levée d'inactivation suit une équation de type mono-exponentielle : $I_{rel} = A (1 - \exp(-t/\tau_{rec}))$. ** $p < 0,01$, analyse de variances à une voie (ANOVA) suivi d'un test de Kruskal-Wallis.

II.4. Discussion

Le but de ce projet 2 était d'évaluer l'impact de la phosphorylation des sérines S1933 et S1984 sur les propriétés d'inactivation des canaux $\text{Na}_v1.5$.

Nous avons vu que seule la mutation S1984E a un impact sur les densités de courant Na^+ aux potentiels allant de -40 à -10 mV. De plus, les mutations mimant la phosphorylation des sérines S1933 et S1984 ne semblent pas avoir d'effet sur la cinétique ou la dépendance au potentiel de l'activation. Rappelons que ces deux sites de phosphorylations du canal $\text{Na}_v1.5$ ont été identifiés dans des ventricules de cœur de souris transgéniques surexprimant la $\text{CaMKII}\delta_c$. Les effets des mutations mimant la phosphorylation de ces sites sur la densité de courant et les propriétés d'activation ne sont pas incohérents avec les données de la littérature sur les effets de la CaMKII sur les propriétés d'activation de $\text{Na}_v1.5$. En effet, comme énoncé dans l'introduction générale (voir la partie II.8.6), les effets de la phosphorylation du canal par la CaMKII sont encore soumis à controverses. En revanche, l'absence d'effet de ces mutations S1933E et S1984E sur les cinétiques d'inactivations, τ_1 et τ_2 , et sur le ratio $A2/A1$ est en désaccord avec les effets connus de la kinase sur ces paramètres. Ces différences peuvent s'expliquer soit par le faible nombre d'échantillons, ou bien par des conditions expérimentales non optimales.

De plus, les effets sur les propriétés d'inactivation des canaux $\text{Na}_v1.5$ de la substitution des sérines S1933 et S1984 en résidu mimant la phosphorylation sont partiellement en accord avec les données de la littérature. En effet, nous avons observé que dans les HEK-293, le double phosphomutant S1933E-S1984E provoque un décalage, non significatif, de l'inactivation vers des potentiels plus négatifs et une augmentation, significative, du courant Na^+ persistant par rapport au canal WT, ce qui correspond au phénotype attendu en réponse à l'activation de la CaMKII . L'absence d'effet des mutants $\text{Na}_v1.5$ -S1933E, $\text{Na}_v1.5$ -S1984E et $\text{Na}_v1.5$ -S1933E-S1984E sur les cinétiques de levée d'inactivation est, en revanche, en contradiction avec le ralentissement de cette cinétique par la CaMKII (voir la partie II.8.6 de l'introduction générale). A nouveau, l'absence d'effet significatif sur l'inactivation et sur la levée d'inactivation peut s'expliquer par des effectifs trop faibles et/ou des conditions expérimentales non optimales.

En somme, notre hypothèse d'une implication de la phosphorylation par la CaMKII des sérines S1933 et S1984 dans la modulation des propriétés d'inactivation du canal $\text{Na}_v1.5$ dans le contexte d'IC est en partie vérifiée.

Le fait que nous ne retrouvons pas tous les effets publiés associés à l'activation de la CaMKII pour le double phosphomutant S1933E-S1984E peut s'expliquer de différentes manières :

Tout d'abord, notre modèle utilisé est un système d'expression hétérologue, les cellules HEK-293, qui est éloigné des conditions physiologiques d'un cardiomyocyte.

De plus, il est possible que le glutamate utilisé pour mimer la phosphorylation des résidus 1933 et 1984 ne soit pas un bon phosphomimétique. On pourrait envisager d'étudier le mimétisme de ces sites par une autre approche, en substituant par exemple ces sérines en aspartates (D).

Enfin, l'absence d'effet des phosphomutants sur certaines propriétés du canal $\text{Na}_v1.5$ (comme sur les cinétiques d'inactivation ou de levée d'inactivation), ou le fait que les effets observés soient faibles (comme pour le décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs) peuvent s'expliquer par des protocoles de stimulation inadaptés. En effet, en ce qui concerne la levée d'inactivation, puisque la phosphorylation dépendante de la CaMKII augmente la proportion de canaux $\text{Na}_v1.5$ entrant en inactivation intermédiaire, I_{IM} et/ou lente (voir la partie II.8.6 de l'introduction générale), on peut penser que l'augmentation de la durée du pulse P1 dans le protocole de levée d'inactivation (de 350 ms à 1 s) puisse révéler une différence de cinétique de levée d'inactivation des phosphomutants par rapport au canal WT.

Dans le même ordre d'idée, il sera intéressant de mesurer l'effet de ces phosphomutants sur l'inactivation intermédiaire des canaux $\text{Na}_v1.5$.

Afin de compléter les résultats ci-dessus, il reste à déterminer la kinase impliquée dans la phosphorylation de ces sérines S1933 et 1984 grâce à des analyses fonctionnelles en présence ou non d'activateur et d'inhibiteur des différentes kinases.

Discussion générale

Mes projets de thèse ont porté sur l'étude de la régulation du fonctionnement de deux canaux ioniques cardiaques dépendants du potentiel. Le premier projet s'est intéressé à la régulation du canal KCNQ1 par les lipides membranaires, et le deuxième concernait les mécanismes de régulation du canal Na_v1.5 par la phosphorylation.

Même si ces deux projets sont très différents, ils mettent l'accent sur la complexité des mécanismes de régulation de l'activité de ces deux canaux ioniques cardiaques, et plus généralement des canaux ioniques dépendants du potentiel. En effet, comme nous l'avons vu dans l'introduction générale, les canaux ioniques dépendants du potentiel sont régulés par le potentiel membranaire, par des sous-unités auxiliaires (ou sous-unité β), par des protéines partenaires, par des modifications post-traductionnelles ou encore par des lipides membranaires. Nous avons également vu que ces modulateurs d'expression ou d'activité des canaux agissent *via* des mécanismes moléculaires qui peuvent partager des points communs, pouvant conduire à des effets cumulatifs, synergiques ou opposés.

Au vu de la complexité des mécanismes moléculaires impliqués dans la modulation des canaux ioniques dépendants du potentiel, il n'est pas surprenant de voir qu'il existe des mutations dans les gènes codant pour la sous-unité α d'un canal, ou codant pour un de ses régulateurs, qui sont retrouvées chez des patients porteurs de canalopathies différentes, ou encore qu'un même phénotype pathologique soit provoqué par des mutations gain- et perte-de-fonction. En effet, nous avons vu qu'il existe de nombreuses mutations sur *SNC5A* impliquées dans ce qu'on appelle les syndromes chevauchants (pour revue voir Remme et al., 2008; Zimmer and Surber, 2008). Cette caractéristique est aussi retrouvée pour des mutations sur *KCNQ1*, comme les mutations Q147R, R231C ou S140G responsables d'une FA (gain de fonction du canal KCNQ1) et qui induisent également sous certaines conditions un allongement de la durée de l'intervalle QT (perte de fonction) (Bartos et al., 2011; Chen, 2003; Lundby et al., 2007). Ainsi, l'existence de ces associations phénotypiques augmente la difficulté pour les cliniciens de choisir un traitement adapté. De plus, ces syndromes chevauchants montrent le risque de surinterprétation des conséquences sur les propriétés biophysiques de certaines mutations quand elles se basent seulement sur des études en systèmes d'expression hétérologue. Pour s'affranchir de ce problème, de plus en plus d'études utilisent un modèle sans doute plus physiologique que sont les cardiomyocytes dérivés des cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSC-CM) pour étudier de nombreuses pathologies cardiaques (pour revue voir Hoekstra et al., 2012; Moretti et al., 2013; Shinnawi and Gepstein, 2014). Ces hiPSC-CM permettent de s'affranchir des modèles

d'expression hétérologue, mais aussi des modèles murins qui ne présentent pas la même fréquence cardiaque que l'Homme, ni le même niveau d'expression ou profil de distribution des canaux ioniques cardiaques entre autre. L'hétérogénéité phénotypique et biophysique observée chez des individus porteurs d'une même mutation d'un canal dépendant du potentiel révèle que d'autres facteurs entrent en jeu dans l'effet d'une mutation sur le fonctionnement du canal. En effet, de nombreuses études ont suggéré l'implication du fond génétique du patient, de pathologies concomitantes ou encore de facteurs environnementaux dans l'expression fonctionnelle d'une mutation, comme sur le gène *SCN5A* par exemple (Probst et al., 2003; Remme et al., 2009; Remme and Wilde, 2008; Smits et al., 2005). Ces études renforcent l'importance de l'utilisation de modèles qui intègrent un maximum de ces facteurs dans l'analyse fonctionnelle comme les hiPSC-CM.

Mes deux projets de thèse s'inscrivent directement dans ces complexités de régulation des canaux dépendants du potentiel dans des conditions physiologiques et physiopathologiques. En effet, le premier s'est intéressé aux mécanismes pouvant expliquer le comportement complexe du canal KCNQ1-R539W impliqué dans le LQT1, et le deuxième a porté sur l'identification des sites de phosphorylation impliqués dans la régulation des mécanismes complexes de l'inactivation du canal $\text{Na}_v1.5$.

I. Le PIP_2 : un phospholipide au centre de la modulation de l'activité de KCNQ1 par de nombreux régulateurs.

I.1. PIP_2 et dépendance au potentiel du canal KCNQ1

Le phospholipide membranaire phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate est un régulateur qui a été décrit comme activant les canaux Kir à deux domaines transmembranaires et les canaux K_v à six domaines transmembranaires via une stabilisation de leur état ouvert (Loussouarn et al., 2003; Rodriguez et al., 2010; Shyng and Nichols, 1998). Concernant le canal KCNQ1, le PIP_2 est également décrit comme un modulateur de sa dépendance au potentiel en décalant la courbe d'activation du canal vers des potentiels plus négatifs. Ces effets peuvent s'expliquer en raison des domaines d'interaction du PIP_2 avec le canal KCNQ1 qui ont été décrits. En effet, l'étude de Park et de ses collaborateurs montrant l'implication physiopathologique de l'interaction PIP_2 -KCNQ1, a suggéré que ce phospholipide se fixe à des résidus situés dans la zone d'interface B4-5 et TS6 (Park, 2005), zone charnière du couplage entre le voltage-sensor et l'ouverture du canal (voir la partie I.2.2 de l'introduction générale).

I.2. PIP₂ et régulation du canal KCNQ1 par KCNE1

Comme décrit dans l'introduction générale, KCNE1 est une sous-unité auxiliaire qui s'associe avec le canal KCNQ1 et module ses propriétés biophysiques pour générer le courant repolarisant cardiaque I_{Ks} (Barhanin et al., 1996; Sanguinetti et al., 1996). De façon intéressante, une étude structurale a montré une proximité entre le CTD de KCNE1 et la zone d'interface B4-5/TS6 précédemment citée (Kang et al., 2008). Ces résultats suggèrent fortement une coordination des molécules du PIP₂ par des résidus positifs situés sur B4-5, TS6 et la partie C-terminale de KCNE1, au niveau de la zone de couplage entre le domaine voltage-sensor et le domaine pore. Cette hypothèse, méritant d'être vérifiée par une approche cristallographique, expliquerait le rôle majeur de cette sous-unité sur les propriétés biophysiques de KCNQ1.

I.3. PIP₂ et régulation adrénergique du canal KCNQ1

L'exemple le plus fort d'interactions croisées entre différents modulateurs de l'activité du canal KCNQ1 est sûrement la régulation du courant potassique cardiaque I_{Ks} par la stimulation adrénergique. En effet, nous avons vu dans l'introduction générale que cette régulation adrénergique fait intervenir à la fois la phosphorylation du canal par la PKA et par la PKC, la sous-unité KCNE1 et le PIP₂ (voir la partie I.4.1 de l'introduction générale).

La stimulation des récepteurs β 1-adrénergiques provoque l'activation de la PKA qui phosphoryle KCNQ1, à l'origine d'un gain de fonction sur le courant I_{Ks} en augmentant de la densité de courant et en ralentissant la cinétique de désactivation (Walsh and Kass, 1988). Cette phosphorylation fait intervenir la sous-unité KCNE1 qui est essentielle pour la transduction de la phosphorylation de la PKA en un gain de fonction sur le courant I_{Ks} .

La stimulation des récepteurs α -adrénergiques régule le courant I_{Ks} mais de façon biphasique, avec une première phase qui est une inhibition du canal liée à une diminution de la quantité PIP₂ suite à l'activation de la PLC, et la deuxième correspond à l'activation du canal KCNQ1 via la phosphorylation dépendante de la PKC (Matavel and Lopes, 2009).

Au centre de ces régulations adrénergiques on retrouve le PIP₂ car, comme on vient de le voir, sa quantité membranaire est diminuée par l'activation des récepteurs α via la PLC. De plus, son interaction avec le canal KCNQ1 est augmentée par la phosphorylation PKA- et PKC-dépendante, diminuant ainsi l'inhibition de l'activité du canal par la PLC (Matavel et al., 2010). Dans cette étude, Matavel et ses collaborateurs ont montré que des canaux portant des mutations impliquées dans le LQT1, responsables d'une diminution de l'affinité du canal pour le PIP₂, peuvent avoir leur activité partiellement corrigée suite à l'activation de la PKA et de la PKC qui renforcent alors l'interaction canal-PIP₂. Une étude récente a confirmé l'implication de KCNE1 dans la modulation de la régulation du canal

par la phosphorylation PKA-dépendante, ainsi que l'implication du CTD dans la régulation du canal KCNQ1 par le PIP₂ (Dvir et al., 2014). Dans ce travail, les auteurs se sont intéressés à des mutations impliquées dans le LQT1, localisées dans l'hélice C du CTD (S546L, K557E, R555H, R555C et R562M), et à une mutation impliquée dans le LQT5, située dans la partie distale du CTD de KCNE1 (P127T). Ils ont alors observé qu'en plus de diminuer l'interaction entre KCNQ1 et KCNE1, les mutations LQT1 provoquent une diminution de l'affinité du canal KCNQ1 pour le PIP₂ et la mutation LQT5 supprime la régulation du courant I_{Ks} par la PKA. Il est à noter que ces régions cytosoliques de KCNQ1 et KCNE1 avaient déjà été suggérées comme zone d'interface entre ces deux sous-unités (Haitin et al., 2009). Ainsi, le travail de Dvir et de ses collaborateurs suggère que les parties distales de KCNQ1 et KCNE1 jouent un rôle majeur dans l'interaction de ces deux sous-unités et dans la modulation de I_{Ks} par le PIP₂ et la PKA. Cette hypothèse, méritant d'être vérifiée par une approche cristallographique, expliquerait l'interrelation qui existe dans la régulation de l'activité du canal KCNQ1 par ces régulateurs.

I.4. Implication physiopathologique de la régulation de KCNQ1 par le PIP₂

Comme décrit dans l'introduction générale, de nombreuses mutations impliquées dans le LQT1 affectent les propriétés biophysiques de KCNQ1 via une diminution de l'interaction canal-PIP₂ (Dvir et al., 2014; Park, 2005). Cependant, comme nous avons pu le voir, la corrélation entre les effets des mutations R539W et R555C sur les propriétés biophysiques de KCNQ1 et la sévérité du phénotype n'est pas toujours claire. En effet, alors que les valeurs moyennes de QTc (mesure de l'intervalle QT, corrigée par rapport à la fréquence cardiaque) sont similaires chez les patients porteur de ces deux mutations (R539W : 459 ± 5, n = 41 ; R555C : 460 ± 10, n=6), la mutation R539W est impliquée dans des cas de mort subite et la mutation R555C dans une forme fruste du LQT1 (Chouabe et al., 2000; Donger et al., 1997). Dans les trois familles étudiées par Donger et ses collaborateurs, seul cinq porteurs de la mutation R555C sur 44 présentaient des épisodes de syncope, et deux sont mort subitement (Donger et al., 1997). De plus, trois des cinq patients présentant des épisodes de syncope, et les deux autres mort subitement étaient sous traitement médicamenteux, connu pour allonger la durée de la repolarisation ventriculaire, suggérant que ces symptômes et la mort subite étaient d'origine médicamenteuse. Ainsi, si on exclu les patients sous traitement, moins de 5% des individus porteur de la mutation R555C étaient symptomatiques. A l'inverse, la famille étudiée par Chouabe et ses collaborateurs montrait que 71% des patients porteurs de la mutation R539W étaient symptomatiques (cinq parmi sept), dont deux sont mort subitement, sans cause médicamenteuse avérée (Chouabe et al., 2000).

Notre étude apporte de nouveaux éléments sur la compréhension des mécanismes moléculaires qui pourraient expliquer cette différence phénotypique entre les patients porteurs des mutations

R539W et R555C. En effet, nos travaux montrent que l'interaction du tryptophane (W) substitué à l'arginine (R) en position 539 interagit avec le cholestérol membranaire, rendant le canal KCNQ1 à peine sensible aux variations de quantité de PIP_2 . Puisque KCNQ1 est normalement sensible à la régulation des récepteurs α -adrénergiques couplés à la PLC, l'insensibilité du courant KCNQ1-KCNE1 aux effecteurs en aval de ces récepteurs pourrait avoir des conséquences pro-arythmiques, en dépit du fait que la mutation a un effet gain de fonction sur la réponse aux variations de PIP_2 qui s'ajoute à l'effet perte de fonction sur la sensibilité au potentiel. Il serait intéressant d'étudier cette hypothèse dans un modèle plus intégré que celui des COS-7, telles les hiPSC-CM déjà citées. En effet, nous pourrions vérifier si la stimulation α -adrénergique des hiPSC-CM issues de patient porteur de la mutation R539W a un impact plus faible sur la régulation de KCNQ1 que sur la régulation du canal dans des hiPSC-CM de personnes exprimant un canal non muté.

Concernant la régulation du canal mutant R539W par la PKA, nos résultats semblent incohérents avec les travaux de Matavel et de ses collaborateurs qui observe une augmentation d'affinité du PIP_2 pour le canal KCNQ1 par la phosphorylation dépendante de la PKA (Matavel et al., 2010). En effet, comme la mutation R539W provoque une diminution de la sensibilité du canal pour des variations de niveau de PIP_2 , on se serait attendu à avoir une réponse diminuée du mutant pour la PKA par rapport au canal sauvage. Or, nous avons observé que la réponse des canaux sauvage et mutant R539W est similaire lors de l'activation de la PKA par l'AMPC. Ces résultats qui suggèrent que la régulation du canal KCNQ1 par la PKA semble indépendante de la modulation de l'interaction canal- PIP_2 sont cohérents avec une étude récente montrant que des mutations mimant la phosphorylation des résidus de KCNQ1 par la PKA (S27D et S92D) n'ont pas d'impact sur le rundown dépendant du PIP_2 (Li et al., 2011). Ces études contradictoires, réalisées dans des ovocytes de xénopes ou des cellules COS-7, soulèvent à nouveau la limite de l'utilisation des modèles d'expression hétérologue dans la compréhension des mécanismes de régulation des canaux ioniques dépendants du potentiel par leurs régulateurs.

II. La CaMKII régule de nombreuses propriétés biophysiques de $\text{Na}_v1.5$.

Un grand nombre de paramètres de l'activité du canal sodique cardiaque $\text{Na}_v1.5$ sont modulés par la CaMKII, et de nombreux travaux suggèrent fortement que ces effets dépendent de la phosphorylation du canal. En effet, comme décrit dans l'introduction, malgré quelques exceptions, les études s'accordent pour dire que les principaux effets de la CaMKII sont une modification des propriétés d'inactivation de $\text{Na}_v1.5$. Ces modulations d'activité de $\text{Na}_v1.5$ peuvent être divisées en deux catégories : effets perte-de-fonction de part un décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs, une augmentation de la proportion de canaux entrant en I_{IM} , un ralentissement de la levée

d'inactivation ;effets gain-de-fonction *via* un ralentissement des cinétiques d'inactivation et une augmentation du courant sodique persistant I_{NaL} .

II.1. Implication physiopathologique de la régulation de $Na_v1.5$ par la CaMKII

Les effets de la CaMKII sur le canal $Na_v1.5$ sont proches des conséquences fonctionnelles observées dans le syndrome chevauchant, causé par des mutations du canal comme la mutation 1795insD. En effet, le gain de fonction de la CaMKII sur le I_{NaL} est semblable à celui observé dans le LQT3, et la perte de fonction causée par cette kinase est proche du phénotype du BrS. De façon similaire, dans le contexte de l'IC, l'activation de la CaMKII pourrait donc contribuer aux troubles du rythme associés au canal sodique cardiaque : la diminution de l'amplitude du courant sodique transitoire I_{Na} peut induire un ralentissement de la conduction connu pour faciliter les phénomènes de réentrées, alors que l'augmentation du courant sodique I_{NaL} peut ralentir la repolarisation, augmentant la durée du PA, et créant ainsi des conditions favorables au développement de post-dépolarisations précoces et retardées (respectivement EAD et DAD). En effet, lorsque la durée du PA est augmentée, les canaux calciques voltage-dépendants de type L, intervenant dans la phase de plateau du PA, ont le temps de sortir de leur état inactivé, provoquant une augmentation du calcium intracellulaire (Shryock et al., 2013). Cette augmentation du $[Ca^{2+}]_i$ active la CaMKII qui phosphoryle et active des effecteurs du relargage du Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique. Cette forte $[Ca^{2+}]_i$ provoque l'activation de l'échangeur NCX, provoquant une sortie de Ca^{2+} et une entrée de Na^+ , responsable d'un courant sodique entrant dépolarisant. Avec le courant I_{NaL} , ce courant dépolarisant porté par NCX produit un courant entrant suffisamment fort pour contrer les courants potassiques repolarisant et provoquer des EAD (**Figure 27**). Dans des conditions où les cardiomyocytes sont fortement concentrés en Ca^{2+} , il y aura des vagues de Ca^{2+} durant la période de diastole, provoquées par des relargages de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique, induisant des DAD (**Figure 27**).

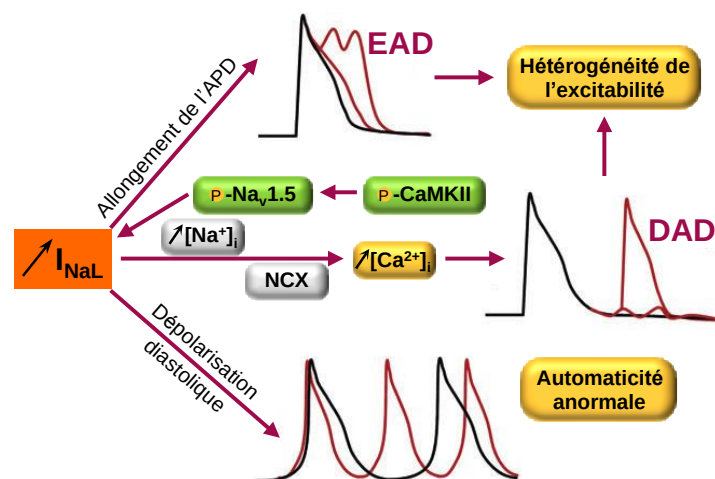


Figure 24 : Mécanismes responsables des arythmies causées par une augmentation du I_{NaL} . D'après Shryock et al., 2013.

II.2. Dualité des effets de la CaMKII

La CaMKII présente une dualité dans ses effets sur les propriétés d'inactivation du canal $\text{Na}_v1.5$:

- une perte de fonction qui se traduit par un décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs, une augmentation de la proportion de canaux entrant en inactivation intermédiaire et un ralentissement de la levée d'inactivation à l'état ouvert
- un gain de fonction *via* un ralentissement des cinétiques d'inactivation à l'état ouvert et une augmentation du courant Na^+ persistant I_{NaL}

Wagner et ses collaborateurs ont suggéré que les effets gain-de-fonction sur $\text{Na}_v1.5$ par la CaMKII sont fonctionnellement et, peut être, mécanistiquement reliés (Wagner et al., 2006). En effet, la relation directe entre le ralentissement des cinétiques d'inactivation à l'état ouvert et l'augmentation du courant sodique persistant en fin de stimulation est compréhensible. En revanche, le lien mécanistique entre les différents effets perte-de-fonction sur $\text{Na}_v1.5$ qu'ils suggèrent dans cette étude est plus discutable. Même si le lien entre les effets de la CaMKII sur la levée d'inactivation et I_{IM} peut s'expliquer par un ralentissement de la sortie de l'état inactivé de I_{IM} par rapport à l'inactivation rapide, la relation entre ces deux effets avec le décalage de la dépendance au potentiel de l'inactivation vers des potentiels plus négatifs est moins évidente :

Il est établi que l'inactivation des canaux Na_v est initiée par la translocation du voltage-sensor du DIV qui permet l'accessibilité de résidus situés dans l'IDIII-IV (exemple du motif IFM de $\text{Na}_v1.5$) à ses récepteurs (constitués des résidus des boucles B4-5 des domaines DIII et DIV (Balser, 2001) et du CTD (Motoike, 2004; Potet et al., 2009) pour $\text{Na}_v1.5$).

De plus, le temps que mettent les voltage-sensors à retourner à leur position de repos est dépendant d'un phénomène appelé « immobilisation de charges » des voltage-sensors (Armstrong and Bezanilla, 1977; Bezanilla and Armstrong, 1977), étape limitante dans la levée d'inactivation des canaux Na_v . Au cours de cette levée d'inactivation, ou remobilisation des S4, l'IDIII-IV se dissocie de ses récepteurs, permettant l'ouverture de la porte d'inactivation.

On peut alors supposer qu'un effet déstabilisateur sur la fermeture de cette porte d'inactivation, comme observé avec l'augmentation du I_{NaL} par la CaMKII, aura pour effet de rendre l'état inactivé énergétiquement défavorable pour le canal $\text{Na}_v1.5$. Par conséquent, pour obtenir une même proportion de canaux inactivés, il faudra une dépolarisation plus grande. En d'autres termes, ceci devrait avoir comme conséquence de décaler la courbe d'inactivation de $\text{Na}_v1.5$ vers des potentiels plus positifs.

En revanche, si les effets gain- et perte-de-fonctions sont indépendants, on pourrait penser que la CaMKII module la dépendance au potentiel de l'inactivation, la levée d'inactivation et la proportion de canaux entrant en I_{IM} indépendamment de ses effets sur le courant I_{NaL} et sur les

cinétiques d'inactivation à l'état ouvert. On peut en effet imaginer que la CaMKII facilite le déplacement et l'immobilisation de charges des voltage-sensors, ce qui provoque le décalage de la courbe d'inactivation vers les potentiels plus négatifs, ralentit la levée d'inactivation et augmente la proportion de canaux entrant en I_{IM} d'une part, et déstabilise la fermeture de la porte d'inactivation provoquant un ralentissement des cinétiques d'inactivation du courant I_{Na} et augmente le courant I_{NaL} d'autre part. Pour étudier ces hypothèses, il serait intéressant de comparer le courant de porte du canal $Na_v1.5$, reflétant les déplacements des S4, dans des conditions d'activation ou non de la CaMKII.

II.3. Lien entre CaM et CaMKII

De façon intéressante, les effets de la CaMKII sur les propriétés d'inactivations du canal $Na_v1.5$ sont opposés à ceux de la CaM. En effet, les travaux sur la CaM montrent un décalage de la dépendance au potentiel de la disponibilité des canaux vers les potentiels dépolarisés et une diminution du courant I_{NaL} (voir la partie II.6 de l'introduction générale). Ces effets opposés laissent penser qu'il pourrait exister un lien dans la régulation des propriétés d'inactivations de $Na_v1.5$ par la CaMKII et la CaM. Cette hypothèse est d'autant plus fondée que l'activité de la CaMKII est dépendante de l'holo-CaM (Couchonnal and Anderson, 2008). De plus, un des sites de phosphorylation identifié par notre approche de phosphoprotéomique, les pS1937/pS1938 (ou S1933 chez l'Homme), est situé juste en aval d'un des sites prédit pour interagir avec la CaM (acides aminés 1897 à 1930) et contenant le motif IQ (résidus 1908 à 1919) (Mruk et al., 2014). Ainsi, lorsque la CaM interagit avec le canal *via* ses lobes N et C, avec le motif IQ et l'IDIII-IV du canal, respectivement (Figure 15 dans la partie II.6 de l'introduction générale), elle exerce un effet déstabilisateur sur la dépendance au potentiel de l'inactivation (décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus positifs) et stabilisateur sur l'état de fermeture de la porte d'inactivation (diminution du courant I_{NaL}). En revanche, on peut supposer que suite à la phosphorylation de $Na_v1.5$ par la CaMKII sur la sérine S1933, il va y avoir un changement conformationnel altérant alors la fixation de la CaM sur le motif IQ et provoquant une stabilisation de la dépendance au potentiel de l'inactivation (décalage de la courbe de disponibilité des canaux $Na_v1.5$ vers des potentiels hyperpolarisés) ainsi qu'une déstabilisation de la fermeture de la porte d'inactivation (augmentation du courant I_{NaL}). Cependant, ces hypothèses ne pourront être vérifiées, ou infirmées, que par l'obtention de la structure cristallographique du canal $Na_v1.5$ en entier, en présence de la CaMKII et/ou de la CaM, avec ou sans Ca^{2+} .

Références bibliographiques

- Abbott, G. W. (2014). Biology of the KCNQ1 Potassium Channel. *New Journal of Science* 2014, 1–26.
- 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., and Zaklyazminskaya, E. V. (2013). Cardiac channelopathies: genetic and molecular mechanisms. *Gene* 517, 1–11.
- Abriel, H., Cabo, C., Wehrens, X. H., Rivolta, I., Motoike, H. K., Memmi, M., Napolitano, C., Priori, S. G., and Kass, R. S. (2001). Novel arrhythmogenic mechanism revealed by a long-QT syndrome mutation in the cardiac Na⁺ channel. *Circulation Research* 88, 740–745.
- 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.
- Ahern, C. A., Zhang, J.-F., Wookalis, M. J., and Horn, R. (2005). Modulation of the cardiac sodium channel NaV1.5 by Fyn, a Src family tyrosine kinase. *Circulation Research* 96, 991–998.
- Aiba, T., and Tomaselli, G. F. (2010). Electrical remodeling in the failing heart. *Current Opinion in Cardiology* 25, 29–36.
- Aiba, T., Hesketh, G. G., Liu, T., Carlisle, R., Villa-Abrille, M. C., O'Rourke, B., Akar, F. G., and Tomaselli, G. F. (2010). Na⁺ channel regulation by Ca²⁺/calmodulin and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in guinea-pig ventricular myocytes. *Cardiovascular Research* 85, 454–463.
- Akabas, M. H., Stauffer, D. A., Xu, M., and Karlin, A. (1992). Acetylcholine receptor channel structure probed in cysteine-substitution mutants. *Science* 258, 307–310.
- Alvarez-Leefmans, F. J., Giraldez, F., and Gamiño, S. M. (1987). Intracellular free magnesium in excitable cells: its measurement and its biologic significance. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65, 915–925.
- Amin, A. S., Asghari-Roodsari, A., and Tan, H. L. (2009). Cardiac sodium channelopathies. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 460, 223–237.
- Amin, A. S., Verkerk, A. O., Bhuiyan, Z. A., Wilde, A. A. M., and Tan, H. L. (2005). Novel Brugada syndrome-causing mutation in ion-conducting pore of cardiac Na⁺ channel does not affect ion selectivity properties. *Acta Physiol. Scand.* 185, 291–301.
- Anantharam, A., Lewis, A., Panaghie, G., Gordon, E., McCrossan, Z. A., Lerner, D. J., and Abbott, G. W. (2003). RNA interference reveals that endogenous *Xenopus* Mink-related peptides govern mammalian K⁺ channel function in oocyte expression studies. *Journal of Biological Chemistry* 278, 11739–11745.
- Antzelevitch, C., Pollevick, G. D., Cordeiro, J. M., Casis, O., Sanguinetti, M. C., Aizawa, Y., Guerchicoff, A., Pfeiffer, R., Oliva, A., Wollnik, B., et al. (2007). Loss-of-function mutations in the cardiac calcium channel underlie a new clinical entity characterized by ST-segment elevation, short QT intervals, and sudden cardiac death. *Circulation* 115, 442–449.

- Armstrong, C. M., and Bezanilla, F. (1977). Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. *J. Gen. Physiol.* 70, 567–590.
- Ashpole, N. M., Herren, A. W., Ginsburg, K. S., Brogan, J. D., Johnson, D. E., Cummins, T. R., Bers, D. M., and Hudmon, A. (2012). Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase II (CaMKII) Regulates Cardiac Sodium Channel NaV1.5 Gating by Multiple Phosphorylation Sites. *Journal of Biological Chemistry* 287, 19856–19869.
- Avigan, J., Steinberg, D., Vroman, H. E., Thompson, M. J., and Mosettig, E. (1960). Studies of cholesterol biosynthesis. I. The identification of desmosterol in serum and tissues of animals and man treated with MER-29. *Journal of Biological Chemistry* 235, 3123–3126.
- Balijepalli, R. C., Delisle, B. P., Balijepalli, S. Y., Foell, J. D., Slind, J. K., Kamp, T. J., and January, C. T. (2007). Kv11.1 (ERG1) K⁺ channels localize in cholesterol and sphingolipid enriched membranes and are modulated by membrane cholesterol. *Channels (Austin)* 1, 263–272.
- Ballester, L. Y., Vanoye, C. G., and George, A. L. (2007). Exaggerated Mg²⁺ inhibition of Kir2.1 as a consequence of reduced PIP2 sensitivity in Andersen syndrome. *Channels (Austin)* 1, 209–217.
- Balser, J. R. (1999). Structure and function of the cardiac sodium channels. *Cardiovascular Research* 42, 327–338.
- Balser, J. R. (2001). The cardiac sodium channel: gating function and molecular pharmacology. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 33, 599–613.
- Balser, J. R., Nuss, H. B., Chiamvimonvat, N., Pérez-García, M. T., Marban, E., and Tomaselli, G. F. (1996). External pore residue mediates slow inactivation in mu 1 rat skeletal muscle sodium channels. *The Journal of Physiology* 494 (Pt 2), 431–442.
- 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.
- Baroudi, G., and Chahine, M. (2000). Biophysical phenotypes of SCN5A mutations causing long QT and Brugada syndromes. *FEBS Lett.* 487, 224–228.
- Baroudi, G., Pouliot, V., Denjoy, I., Guicheney, P., Shrier, A., and Chahine, M. (2001). Novel mechanism for Brugada syndrome: defective surface localization of an SCN5A mutant (R1432G). *Circulation Research* 88, E78–83.
- Barro-Soria, R., Rebolledo, S., Liin, S. I., Perez, M. E., Sampson, K. J., Kass, R. S., and Larsson, H. P. (2014). KCNE1 divides the voltage sensor movement in KCNQ1/KCNE1 channels into two steps. *Nat Commun* 5, 3750.
- Bartos, D. C., Anderson, J. B., Bastiaenen, R., Johnson, J. N., Gollob, M. H., Tester, D. J., Burgess, D. E., Homfray, T., Behr, E. R., Ackerman, M. J., et al. (2013). A KCNQ1 mutation causes a high penetrance for familial atrial fibrillation. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 24, 562–569.
- Bartos, D. C., Duchatelet, S., Burgess, D. E., Klug, D., Denjoy, I., Peat, R., Lupoglazoff, J.-M., Fressart, V., Berthet, M., Ackerman, M. J., et al. (2011). R231C mutation in KCNQ1 causes long QT syndrome type 1 and familial atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 8, 48–55.
- Batulan, Z., Haddad, G. A., and Blunck, R. (2010). An intersubunit interaction between S4-S5 linker and S6 is responsible for the slow off-gating component in Shaker K⁺ channels. *J. Biol. Chem.* 285, 14005–

14019.

Bähler, M., and Rhoads, A. (2002). Calmodulin signaling via the IQ motif. *FEBS Lett.* 513, 107–113.

Belardinelli, L., Shryock, J. C., and Fraser, H. (2006). Inhibition of the late sodium current as a potential cardioprotective principle: effects of the late sodium current inhibitor ranolazine. *Heart* 92 Suppl 4, iv6–iv14.

Bellocq, C., van Ginneken, A. C. G., Bezzina, C. R., Alders, M., Escande, D., Mannens, M. M. A. M., Baró, I., and Wilde, A. A. M. (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. *Cardiovascular Research* 67, 529–538.

Bennett, P. B., Yazawa, K., Makita, N., and George, A. L. (1995). Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia. *Nature* 376, 683–685.

Benson, D. W., Wang, D. W., Dymont, M., Knilans, T. K., Fish, F. A., Strieper, M. J., Rhodes, T. H., and George, A. L. (2003). Congenital sick sinus syndrome caused by recessive mutations in the cardiac sodium channel gene (SCN5A). *J. Clin. Invest.* 112, 1019–1028.

Benz, I., Herzig, J. W., and Kohlhardt, M. (1992). Opposite effects of angiotensin II and the protein kinase C activator OAG on cardiac Na⁺ channels. *J. Membr. Biol.* 130, 183–190.

Berridge, M. J. (1981). Phosphatidylinositol hydrolysis: a multifunctional transducing mechanism. *Mol. Cell. Endocrinol.* 24, 115–140.

Bers, D. M. (2011). *Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force*. ed.K. A. Publishers.

Beyder, A., Rae, J. L., Bernard, C., Strege, P. R., Sachs, F., and Farrugia, G. (2010). Mechanosensitivity of Nav1.5, a voltage-sensitive sodium channel. *The Journal of Physiology* 588, 4969–4985.

Bezanilla, F., and Armstrong, C. M. (1977). Inactivation of the sodium channel. I. Sodium current experiments. *J. Gen. Physiol.* 70, 549–566.

Bezzina, C., Veldkamp, M. W., van Den Berg, M. P., Postma, A. V., Rook, M. B., Viersma, J. W., van Langen, I. M., Tan-Sindhunata, G., Bink-Boelkens, M. T., van Der Hout, A. H., et al. (1999). A single Na⁺ channel mutation causing both long-QT and Brugada syndromes. *Circulation Research* 85, 1206–1213.

Bénitah, J. P., Chen, Z., Balser, J. R., Tomaselli, G. F., and Marban, E. (1999). Molecular dynamics of the sodium channel pore vary with gating: interactions between P-segment motions and inactivation. *Journal of Neuroscience* 19, 1577–1585.

Bi, X., Han, X., Zhang, F., He, M., Zhang, Y., Zhi, X.-Y., and Zhao, H. (2012). Triparanol suppresses human tumor growth in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 425, 613–618.

Biswas, S., Deschenes, I., DiSilvestre, D., Tian, Y., Halperin, V. L., and Tomaselli, G. F. (2008). Calmodulin Regulation of Nav1.4 Current: Role of Binding to the Carboxyl Terminus. *J. Gen. Physiol.* 131, 197–209.

Biswas, S., DiSilvestre, D., Tian, Y., Halperin, V. L., and Tomaselli, G. F. (2009). Calcium-mediated dual-mode regulation of cardiac sodium channel gating. *Circulation Research* 104, 870–878.

- Black, J. A., and Waxman, S. G. (2013). Noncanonical Roles of Voltage-Gated Sodium Channels. *Neuron* 80, 280–291.
- Bock, J., Szabó, I., Gamper, N., Adams, C., and Gulbins, E. (2003). Ceramide inhibits the potassium channel Kv1.3 by the formation of membrane platforms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305, 890–897.
- Boehmer, C., Wilhelm, V., Palmada, M., Wallisch, S., Henke, G., Brinkmeier, H., Cohen, P., Pieske, B., and Lang, F. (2003). Serum and glucocorticoid inducible kinases in the regulation of the cardiac sodium channel SCN5A. *Cardiovascular Research* 57, 1079–1084.
- Boulet, I. R., Labro, A. J., Raes, A. L., and Snyders, D. J. (2007). Role of the S6 C-terminus in KCNQ1 channel gating. *The Journal of Physiology* 585, 325–337.
- Brette, F., and Orchard, C. H. (2006). Density and sub-cellular distribution of cardiac and neuronal sodium channel isoforms in rat ventricular myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348, 1163–1166.
- Brugada, P., and Brugada, J. (1992). Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report. *J. Am. Coll. Cardiol.* 20, 1391–1396.
- Burashnikov, E., Pfeiffer, R., Barajas-Martinez, H., Delpón, E., Hu, D., Desai, M., Borggrefe, M., Haïssaguerre, M., Kanter, R., Pollevick, G. D., et al. (2010). Mutations in the cardiac L-type calcium channel associated with inherited J-wave syndromes and sudden cardiac death. *Heart Rhythm* 7, 1872–1882.
- Calloe, K., Refaat, M. M., Grubb, S., Wojciak, J., Campagna, J., Thomsen, N. M., Nussbaum, R. L., Scheinman, M. M., and Schmitt, N. (2013). Characterization and mechanisms of action of novel Nav1.5 channel mutations associated with Brugada syndrome. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 6, 177–184.
- Casini, S., Tan, H. L., Demirayak, I., Remme, C. A., Amin, A. S., Scicluna, B. P., Chatyan, H., Ruijter, J. M., Bezzina, C. R., van Ginneken, A. C. G., et al. (2010). Tubulin polymerization modifies cardiac sodium channel expression and gating. *Cardiovascular Research* 85, 691–700.
- Casini, S., Verkerk, A. O., van Borren, M. M. G. J., van Ginneken, A. C. G., Veldkamp, M. W., de Bakker, J. M. T., and Tan, H. L. (2009). Intracellular calcium modulation of voltage-gated sodium channels in ventricular myocytes. *Cardiovascular Research* 81, 72–81.
- Catterall, W. A., Goldin, A. L., and Waxman, S. G. (2005). International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol. Rev.* 57, 397–409.
- Cha, A., Snyder, G. E., Selvin, P. R., and Bezanilla, F. (1999). Atomic scale movement of the voltage-sensing region in a potassium channel measured via spectroscopy. *Nature* 402, 809–813.
- Chagot, B., and Chazin, W. J. (2011). Solution NMR Structure of Apo-Calmodulin in Complex with the IQ Motif of Human Cardiac Sodium Channel Nav1.5. *Journal of Molecular Biology* 406, 106–119.
- Chakrapani, S., Cordero-Morales, J. F., Jogini, V., Pan, A. C., Cortes, D. M., Roux, B., and Perozo, E. (2011). On the structural basis of modal gating behavior in K(+) channels. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 67–74.

- Chamberland, C., Barajas-Martinez, H., Haufe, V., Fecteau, M.-H., Delabre, J.-F., Burashnikov, A., Antzelevitch, C., Lesur, O., Chraïbi, A., Sarret, P., et al. (2010). Modulation of canine cardiac sodium current by Apelin. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 48, 694–701.
- Chan, P. J., Osteen, J. D., Xiong, D., Bohnen, M. S., Doshi, D., Sampson, K. J., Marx, S. O., Karlin, A., and Kass, R. S. (2012). Characterization of KCNQ1 atrial fibrillation mutations reveals distinct dependence on KCNE1. *J. Gen. Physiol.* 139, 135–144.
- Chanda, B., Asamoah, O. K., Blunck, R., Roux, B., and Bezanilla, F. (2005). Gating charge displacement in voltage-gated ion channels involves limited transmembrane movement. *Nature* 436, 852–856.
- Chen, H., Kim, L. A., Rajan, S., Xu, S., and Goldstein, S. A. N. (2003). Charybdotoxin binding in the I(Ks) pore demonstrates two MinK subunits in each channel complex. *Neuron* 40, 15–23.
- Chen, J., Mitcheson, J. S., Tristani-Firouzi, M., Lin, M., and Sanguinetti, M. C. (2001). The S4-S5 linker couples voltage sensing and activation of pacemaker channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 11277–11282.
- Chen, J., Zheng, R., Melman, Y. F., and McDonald, T. V. (2009). Functional interactions between KCNE1 C-terminus and the KCNQ1 channel. *PLoS ONE* 4, e5143.
- Chen, L. Y., Ballew, J. D., Herron, K. J., Rodeheffer, R. J., and Olson, T. M. (2007a). A common polymorphism in SCN5A is associated with lone atrial fibrillation. *Clin. Pharmacol. Ther.* 81, 35–41.
- Chen, L., Marquardt, M. L., Tester, D. J., Sampson, K. J., Ackerman, M. J., and Kass, R. S. (2007b). Mutation of an A-kinase-anchoring protein causes long-QT syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 20990–20995.
- Chen, Q., Kirsch, G. E., Zhang, D., Brugada, R., Brugada, J., Brugada, P., Potenza, D., Moya, A., Borggrefe, M., Breithardt, G., et al. (1998). Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature* 392, 293–296.
- Chen, T., Inoue, M., and Sheets, M. F. (2005). Reduced voltage dependence of inactivation in the SCN5A sodium channel mutation delF1617. *AJP: Heart and Circulatory Physiology* 288, H2666–76.
- Chen, Y. H. (2003). KCNQ1 Gain-of-Function Mutation in Familial Atrial Fibrillation. *Science* 299, 251–254.
- Chiang, K.-C., Lai, L.-P., and Shieh, R.-C. (2009). Characterization of a novel Nav1.5 channel mutation, A551T, associated with Brugada syndrome. *J. Biomed. Sci.* 16, 76.
- Chouabe, C., Neyroud, N., Richard, P., Denjoy, I., Hainque, B., Romey, G., Drici, M. D., Guicheney, P., and Barhanin, J. (2000). Novel mutations in KvLQT1 that affect I_{Ks} activation through interactions with Isk. *Cardiovascular Research* 45, 971–980.
- Choveau, F. S., Abderemane-Ali, F., Cohan, F. C., Es-Salah-Lamoureux, Z., Baró, I., and Lousouarn, G. (2012). Opposite Effects of the S4-S5 Linker and PIP(2) on Voltage-Gated Channel Function: KCNQ1/KCNE1 and Other Channels. *Front Pharmacol* 3, 125.
- Choveau, F. S., Rodriguez, N., Ali, F. A., Labro, A. J., Rose, T., Dahimene, S., Boudin, H., Le Henaff, C., Escande, D., Snyders, D. J., et al. (2010). KCNQ1 Channels Voltage Dependence through a Voltage-dependent Binding of the S4-S5 Linker to the Pore Domain. *Journal of Biological Chemistry* 286, 707–716.

- Clancy, C. E., and Rudy, Y. (2002). Na(+) channel mutation that causes both Brugada and long-QT syndrome phenotypes: a simulation study of mechanism. *Circulation* 105, 1208–1213.
- Clancy, C. E., Tateyama, M., Liu, H., Wehrens, X. H. T., and Kass, R. S. (2003). Non-equilibrium gating in cardiac Na⁺ channels: an original mechanism of arrhythmia. *Circulation* 107, 2233–2237.
- Cohn, J. N., Ferrari, R., and Sharpe, N. (2000). Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. in, 569–582.
- Cormier, J. W., Rivolta, I., Tateyama, M., Yang, A. S., and Kass, R. S. (2002). Secondary Structure of the Human Cardiac Na⁺ Channel C Terminus: EVIDENCE FOR A ROLE OF HELICAL STRUCTURES IN MODULATION OF CHANNEL INACTIVATION. *Journal of Biological Chemistry* 277, 9233–9241.
- Couchonnal, L. F., and Anderson, M. E. (2008). The role of calmodulin kinase II in myocardial physiology and disease. *Physiology (Bethesda)* 23, 151–159.
- Coyan, F. C., Abderemane-Ali, F., Amarouch, M. Y., Piron, J., Mordel, J., Nicolas, C. S., Steenman, M., Mérot, J., Marionneau, C., Thomas, A., et al. (2014). A Long QT Mutation Substitutes Cholesterol for Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate in KCNQ1 Channel Regulation. *PLoS ONE* 9, e93255.
- Crotti, L., Johnson, C. N., Graf, E., De Ferrari, G. M., Cuneo, B. F., Ovadia, M., Papagiannis, J., Feldkamp, M. D., Rath, S. G., Kunic, J. D., et al. (2013). Calmodulin mutations associated with recurrent cardiac arrest in infants. *Circulation* 127, 1009–1017.
- Crotti, L., Marcou, C. A., Tester, D. J., Castelletti, S., Giudicessi, J. R., Torchio, M., Medeiros-Domingo, A., Simone, S., Will, M. L., Dagradi, F., et al. (2012). Spectrum and prevalence of mutations involving BrS1-through BrS12-susceptibility genes in a cohort of unrelated patients referred for Brugada syndrome genetic testing: implications for genetic testing. *J. Am. Coll. Cardiol.* 60, 1410–1418.
- 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.
- Dahimène, S., Alcoléa, S., Naud, P., Jourdon, P., Escande, D., Brasseur, R., Thomas, A., Baró, I., and Mérot, J. (2006). The N-terminal juxtamembranous domain of KCNQ1 is critical for channel surface expression: implications in the Romano-Ward LQT1 syndrome. *Circulation Research* 99, 1076–1083.
- Das, S., Makino, S., Melman, Y. F., Shea, M. A., Goyal, S. B., Rosenzweig, A., Macrae, C. A., and Ellinor, P. T. (2009). Mutation in the S3 segment of KCNQ1 results in familial lone atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 6, 1146–1153.
- Debonneville, C., Flores, S. Y., Kamynina, E., Plant, P. J., Tauxe, C., Thomas, M. A., Münster, C., Chraïbi, A., Pratt, J. H., Horisberger, J. D., et al. (2001). Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na(+) channel cell surface expression. *EMBO J.* 20, 7052–7059.
- Delpón, E., Cordeiro, J. M., Núñez, L., Thomsen, P. E. B., Guerchicoff, A., Pollevick, G. D., Wu, Y., Kanter, J. K., Larsen, C. T., Hofman-Bang, J., et al. (2008). Functional effects of KCNE3 mutation and its role in the development of Brugada syndrome. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 1, 209–218.
- Deng, W., Bukiya, A. N., Rodríguez-Menchaca, A. A., Zhang, Z., Baumgarten, C. M., Logothetis, D. E., Levitan, I., and Rosenhouse-Dantsker, A. (2012). Hypercholesterolemia induces up-regulation of KACH cardiac currents via a mechanism independent of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Gβγ. *J. Biol. Chem.* 287, 4925–4935.

- Deschenes, I., Trottier, E., and Chahine, M. (2001). Implication of the C-terminal region of the alpha-subunit of voltage-gated sodium channels in fast inactivation. *J. Membr. Biol.* 183, 103–114.
- Deschênes, I., Neyroud, N., DiSilvestre, D., Marbán, E., Yue, D. T., and Tomaselli, G. F. (2002). Isoform-specific modulation of voltage-gated Na(+) channels by calmodulin. *Circulation Research* 90, E49–57.
- Donger, C., Denjoy, I., Berthet, M., Neyroud, N., Cruaud, C., Bennaceur, M., Chivoret, G., Schwartz, K., Coumel, P., and Guicheney, P. (1997). KVLQT1 C-terminal missense mutation causes a forme fruste long-QT syndrome. *Circulation* 96, 2778–2781.
- Dumaine, R., Towbin, J. A., Brugada, P., Vatta, M., Nesterenko, D. V., Nesterenko, V. V., Brugada, J., Brugada, R., and Antzelevitch, C. (1999). Ionic mechanisms responsible for the electrocardiographic phenotype of the Brugada syndrome are temperature dependent. *Circulation Research* 85, 803–809.
- Dumaine, R., Wang, Q., Keating, M. T., Hartmann, H. A., Schwartz, P. J., Brown, A. M., and Kirsch, G. E. (1996). Multiple mechanisms of Na⁺ channel-linked long-QT syndrome. *Circulation Research* 78, 916–924.
- Durell, S. R., and Guy, H. R. (1992). Atomic scale structure and functional models of voltage-gated potassium channels. *Biophysj* 62, 238–47– discussion 247–50.
- Durell, S. R., Hao, Y., and Guy, H. R. (1998). Structural models of the transmembrane region of voltage-gated and other K⁺ channels in open, closed, and inactivated conformations. *J. Struct. Biol.* 121, 263–284.
- Dvir, M., Strulovich, R., Sachyani, D., Ben-Tal Cohen, I., Haitin, Y., Dessauer, C., Pongs, O., Kass, R., Hirsch, J. A., and Attali, B. (2014). Long QT mutations disrupt IKS regulation by PKA and PIP2 at the same KCNQ1 helix C-KCNE1 interface. *J. Cell. Sci.*
- Eaholtz, G., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (1994). Restoration of inactivation and block of open sodium channels by an inactivation gate peptide. *Neuron* 12, 1041–1048.
- Edman, C. F., and Schulman, H. (1994). Identification and characterization of delta B-CaM kinase and delta C-CaM kinase from rat heart, two new multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase isoforms. *Biochim. Biophys. Acta* 1221, 89–101.
- Ellinor, P. T., Nam, E. G., Shea, M. A., Milan, D. J., Ruskin, J. N., and Macrae, C. A. (2008). Cardiac sodium channel mutation in atrial fibrillation. *HRTM* 5, 99–105.
- Enkvetchakul, D., Loussouarn, G., Makhina, E., Shyng, S. L., and Nichols, C. G. (2000). The kinetic and physical basis of K(ATP) channel gating: toward a unified molecular understanding. *Biophysj* 78, 2334–2348.
- Ferrer, T., Rupp, J., Piper, D. R., and Tristani-Firouzi, M. (2006). The S4-S5 linker directly couples voltage sensor movement to the activation gate in the human ether-a'-go-go-related gene (hERG) K⁺ channel. *Journal of Biological Chemistry* 281, 12858–12864.
- Frohnwieser, B., Chen, L. Q., Schreibmayer, W., and Kallen, R. G. (1997). Modulation of the human cardiac sodium channel alpha-subunit by cAMP-dependent protein kinase and the responsible sequence domain. *The Journal of Physiology* 498 (Pt 2), 309–318.
- Gamper, N., and Shapiro, M. S. (2007). Regulation of ion transport proteins by membrane phosphoinositides. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 921–934.

- 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.
- Gandhi, C. S., and Isacoff, E. Y. (2002). Molecular models of voltage sensing. *J. Gen. Physiol.* 120, 455–463.
- Gasque, G., Labarca, P., and Darszon, A. (2005). Cholesterol-depleting compounds modulate K⁺-currents in *Drosophila* Kenyon cells. *FEBS Lett.* 579, 5129–5134.
- Ge, J., Sun, A., Paajanen, V., Wang, S., Su, C., Yang, Z., Li, Y., Wang, S., Jia, J., Wang, K., et al. (2008). Molecular and clinical characterization of a novel SCN5A mutation associated with atrioventricular block and dilated cardiomyopathy. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 1, 83–92.
- 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. *Circulation Research* 98, 1048–1054.
- Giudicessi, J. R., Ye, D., Tester, D. J., Crotti, L., Mugione, A., Nesterenko, V. V., Albertson, R. M., Antzelevitch, C., Schwartz, P. J., and Ackerman, M. J. (2011). Transient outward current (I_{to}) gain-of-function mutations in the KCND3-encoded Kv4.3 potassium channel and Brugada syndrome. *Heart Rhythm* 8, 1024–1032.
- Glauner, K. S., Mannuzzu, L. M., Gandhi, C. S., and Isacoff, E. Y. (1999). Spectroscopic mapping of voltage sensor movement in the Shaker potassium channel. *Nature* 402, 813–817.
- Goetz, R., Dover, K., Laezza, F., Shtraizent, N., Huang, X., Tchetchik, D., Eliseenkova, A. V., Xu, C. F., Neubert, T. A., Ornitz, D. M., et al. (2009). Crystal Structure of a Fibroblast Growth Factor Homologous Factor (FHF) Defines a Conserved Surface on FHF for Binding and Modulation of Voltage-gated Sodium Channels. *Journal of Biological Chemistry* 284, 17883–17896.
- Gofman, Y., Shats, S., Attali, B., Haliloglu, T., and Ben-Tal, N. (2012). How does KCNE1 regulate the Kv7.1 potassium channel? Model-structure, mutations, and dynamics of the Kv7.1-KCNE1 complex. *Structure* 20, 1343–1352.
- Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343, 425–430.
- Grabe, M., Lai, H. C., Jain, M., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (2007). Structure prediction for the down state of a potassium channel voltage sensor. *Nature* 445, 550–553.
- 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.
- Guy, H. R., and Seetharamulu, P. (1986). Molecular model of the action potential sodium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 508–512.
- Haddad, G. A., and Blunck, R. (2011). Mode shift of the voltage sensors in Shaker K⁺ channels is caused by energetic coupling to the pore domain. *J. Gen. Physiol.* 137, 455–472.
- Haitin, Y., and Attali, B. (2008). The C-terminus of Kv7 channels: a multifunctional module. *The Journal of Physiology* 586, 1803–1810.
- Haitin, Y., Wiener, R., Shaham, D., Peretz, A., Cohen, E. B.-T., Shamgar, L., Pongs, O., Hirsch, J. A., and Attali, B. (2009). Intracellular domains interactions and gated motions of I(KS) potassium channel subunits. *EMBO J.* 28, 1994–2005.

- Hajdú, P., Varga, Z., Pieri, C., Panyi, G., and Gáspár, R. (2003). Cholesterol modifies the gating of Kv1.3 in human T lymphocytes. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 445, 674–682.
- Halaszovich, C. R., Schreiber, D. N., and Oliver, D. (2009). Ci-VSP is a depolarization-activated phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 5'-phosphatase. *Journal of Biological Chemistry* 284, 2106–2113.
- Hallaq, H., Wang, D. W., Kunic, J. D., George, A. L., Wells, K. S., and Murray, K. T. (2012). Activation of protein kinase C alters the intracellular distribution and mobility of cardiac Na⁺ channels. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 302, H782–9.
- Hallaq, H., Yang, Z., Viswanathan, P. C., Fukuda, K., Shen, W., Wang, D. W., Wells, K. S., Zhou, J., Yi, J., and Murray, K. T. (2006). Quantitation of protein kinase A-mediated trafficking of cardiac sodium channels in living cells. *Cardiovascular Research* 72, 250–261.
- Hannun, Y. A., and Bell, R. M. (1990). Rat brain protein kinase C. Kinetic analysis of substrate dependence, allosteric regulation, and autophosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 265, 2962–2972.
- Hansen, S. B., Tao, X., and MacKinnon, R. (2011). Structural basis of PIP₂ activation of the classical inward rectifier K⁺ channel Kir2.2. *Nature* 477, 495–498.
- Hartshorne, R. P., and Catterall, W. A. (1981). Purification of the saxitoxin receptor of the sodium channel from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 4620–4624.
- Hasegawa, K., Ohno, S., Ashihara, T., Itoh, H., Ding, W.-G., Toyoda, F., Makiyama, T., Aoki, H., Nakamura, Y., Delisle, B. P., et al. (2014). A novel KCNQ1 missense mutation identified in a patient with juvenile-onset atrial fibrillation causes constitutively open IKs channels. *Heart Rhythm* 11, 67–75.
- Heath, B. M., and Terrar, D. A. (1996). Separation of the components of the delayed rectifier potassium current using selective blockers of IKr and IKs in guinea-pig isolated ventricular myocytes. *Exp. Physiol.* 81, 587–603.
- Hein, S., Kostin, S., Heling, A., Maeno, Y., and Schaper, J. (2000). The role of the cytoskeleton in heart failure. *Cardiovascular Research* 45, 273–278.
- Heling, A., Zimmermann, R., Kostin, S., Maeno, Y., Hein, S., Devaux, B., Bauer, E., Klövekorn, W. P., Schlepper, M., Schaper, W., et al. (2000). Increased expression of cytoskeletal, linkage, and extracellular proteins in failing human myocardium. *Circulation Research* 86, 846–853.
- Hennessey, J. A., Marcou, C. A., Wang, C., Wei, E. Q., Wang, C., Tester, D. J., Torchio, M., Dagradi, F., Crotti, L., Schwartz, P. J., et al. (2013). FGF12 is a candidate Brugada syndrome locus. *HRTM* 10, 1886–1894.
- Henrion, U., Zumhagen, S., Steinke, K., Strutz-Seeböhm, N., Stallmeyer, B., Lang, F., Schulze-Bahr, E., and Seeböhm, G. (2012). Overlapping cardiac phenotype associated with a familial mutation in the voltage sensor of the KCNQ1 channel. *Cell. Physiol. Biochem.* 29, 809–818.
- Hernandez, C. C., Zaika, O., and Shapiro, M. S. (2008). A carboxy-terminal inter-helix linker as the site of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate action on Kv7 (M-type) K⁺ channels. *J. Gen. Physiol.* 132, 361–381.
- Herren, A. W., Bers, D. M., and Grandi, E. (2013). Post-translational modifications of the cardiac Na

- channel: contribution of CaMKII-dependent phosphorylation to acquired arrhythmias. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 305, H431–45.
- Hesse, M., Kondo, C. S., Clark, R. B., Su, L., Allen, F. L., Geary-Joo, C. T. M., Kunnathu, S., Severson, D. L., Nygren, A., Giles, W. R., et al. (2007). Dilated cardiomyopathy is associated with reduced expression of the cardiac sodium channel Scn5a. *Cardiovascular Research* 75, 498–509.
- Hihara, T., Taniguchi, T., Ueda, M., Yoshinaga, T., Miyamoto, N., and Sawada, K. (2013). Probucol and the cholesterol synthesis inhibitors simvastatin and triparanol regulate I_{ks} channel function differently. *Hum Exp Toxicol* 32, 1028–1037.
- Hille, B. (1992). *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Sunderland: Sinauer Associates.
- Hoekstra, M., Mummery, C. L., Wilde, A. A. M., Bezzina, C. R., and Verkerk, A. O. (2012). Induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes as models for cardiac arrhythmias. *Front Physiol* 3, 346.
- Hong, K., Piper, D. R., Diaz-Valdecantos, A., Brugada, J., Oliva, A., Burashnikov, E., Santos-de-Soto, J., Grueso-Montero, J., Diaz-Enfante, E., Brugada, P., et al. (2005). De novo KCNQ1 mutation responsible for atrial fibrillation and short QT syndrome in utero. *Cardiovascular Research* 68, 433–440.
- Horvath, B., Bányász, T., Jian, Z., Hegyi, B., Kistamas, K., Nanasi, P. P., Izu, L. T., and Chen-Izu, Y. (2013). Dynamics of the late Na⁺ current during cardiac action potential and its contribution to afterdepolarizations. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 64, 59–68.
- 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.
- Hsueh, C.-H., Chen, W.-P., Lin, J.-L., Tsai, C.-T., Liu, Y.-B., Juang, J.-M., Tsao, H.-M., Su, M.-J., and Lai, L.-P. (2009). Distinct functional defect of three novel Brugada syndrome related cardiac sodium channel mutations. *J. Biomed. Sci.* 16, 23.
- Hu, D., Barajas-Martinez, H., Burashnikov, E., Springer, M., Wu, Y., Varró, A., Pfeiffer, R., Koopmann, T. T., Cordeiro, J. M., Guerchicoff, A., et al. (2009). A mutation in the beta 3 subunit of the cardiac sodium channel associated with Brugada ECG phenotype. *Circ Cardiovasc Genet* 2, 270–278.
- 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, H., Priori, S. G., Napolitano, C., O'Leary, M. E., and Chahine, M. (2011). Y1767C, a novel SCN5A mutation, induces a persistent Na⁺ current and potentiates ranolazine inhibition of Nav1.5 channels. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 300, H288–99.
- Huikuri, H. V., Castellanos, A., and Myerburg, R. J. (2001). Sudden death due to cardiac arrhythmias. *N Engl J Med* 345, 1473–1482.
- Hund, T. J., Koval, O. M., Li, J., Wright, P. J., Qian, L., Snyder, J. S., Gudmundsson, H., Kline, C. F., Davidson, N. P., Cardona, N., et al. (2010). A β IV-spectrin/CaMKII signaling complex is essential for membrane excitability in mice. *J. Clin. Invest.* 120, 3508–3519.
- Ishikawa, T., Sato, A., Marcou, C. A., Tester, D. J., Ackerman, M. J., Crotti, L., Schwartz, P. J., On, Y. K., Park, J. E., Nakamura, K., et al. (2012). A novel disease gene for Brugada syndrome: sarcolemmal membrane-associated protein gene mutations impair intracellular trafficking of hNav1.5. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 5, 1098–1107.

- Itoh, H., Sakaguchi, T., Ashihara, T., Ding, W.-G., Nagaoka, I., Oka, Y., Nakazawa, Y., Yao, T., Jo, H., Ito, M., et al. (2009). A novel KCNH2 mutation as a modifier for short QT interval. *Int. J. Cardiol.* 137, 83–85.
- Jansen, J. A., Noorman, M., Musa, H., Stein, M., de Jong, S., van der Nagel, R., Hund, T. J., Mohler, P. J., Vos, M. A., van Veen, T. A., et al. (2012). Reduced heterogeneous expression of Cx43 results in decreased Nav1.5 expression and reduced sodium current that accounts for arrhythmia vulnerability in conditional Cx43 knockout mice. *Heart Rhythm* 9, 600–607.
- Jespersen, T., Gavillet, B., van Bemmelen, M. X., Cordonier, S., Thomas, M. A., Staub, O., and Abriel, H. (2006). Cardiac sodium channel Na(v)1.5 interacts with and is regulated by the protein tyrosine phosphatase PTPH1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348, 1455–1462.
- Jespersen, T., Rasmussen, H. B., Grunnet, M., Jensen, H. S., Angelo, K., Dupuis, D. S., Vogel, L. K., Jorgensen, N. K., Klaerke, D. A., and Olesen, S.-P. (2004). Basolateral localisation of KCNQ1 potassium channels in MDCK cells: molecular identification of an N-terminal targeting motif. *J. Cell. Sci.* 117, 4517–4526.
- Jiang, Y., Ruta, V., Chen, J., Lee, A., and MacKinnon, R. (2003). The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 423, 42–48.
- Jost, N. (2005). Restricting Excessive Cardiac Action Potential and QT Prolongation: A Vital Role for IKs in Human Ventricular Muscle. *Circulation* 112, 1392–1399.
- Jurkiewicz, N. K., and Sanguinetti, M. C. (1993). Rate-dependent prolongation of cardiac action potentials by a methanesulfonanilide class III antiarrhythmic agent. Specific block of rapidly activating delayed rectifier K⁺ current by dofetilide. *Circulation Research* 72, 75–83.
- Kambouris, N. G., Hastings, L. A., Stepanovic, S., Marban, E., Tomaselli, G. F., and Balser, J. R. (1998). Mechanistic link between lidocaine block and inactivation probed by outer pore mutations in the rat micro1 skeletal muscle sodium channel. *The Journal of Physiology* 512 (Pt 3), 693–705.
- Kang, C., Tian, C., Sönnichsen, F. D., Smith, J. A., Meiler, J., George, A. L., Vanoye, C. G., Kim, H. J., and Sanders, C. R. (2008). Structure of KCNE1 and Implications for How It Modulates the KCNQ1 Potassium Channel †‡. *Biochemistry* 47, 7999–8006.
- Kanki, H., Kupersmidt, S., Yang, T., Wells, S., and Roden, D. M. (2004). A structural requirement for processing the cardiac K⁺ channel KCNQ1. *Journal of Biological Chemistry* 279, 33976–33983.
- Kapplinger, J. D., Tester, D. J., Alders, M., Benito, B., Berthet, M., Brugada, J., Brugada, P., Fressart, V., Guerchicoff, A., Harris-Kerr, C., et al. (2010). An international compendium of mutations in the SCN5A-encoded cardiac sodium channel in patients referred for Brugada syndrome genetic testing. *Heart Rhythm* 7, 33–46.
- Kapplinger, J. D., Tester, D. J., Salisbury, B. A., Carr, J. L., Harris-Kerr, C., Pollevick, G. D., Wilde, A. A. M., and Ackerman, M. J. (2009). Spectrum and prevalence of mutations from the first 2,500 consecutive unrelated patients referred for the FAMILION long QT syndrome genetic test. *Heart Rhythm* 6, 1297–1303.
- Kass, R. S. (2006). Sodium channel inactivation in heart: a novel role of the carboxy-terminal domain. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 17 Suppl 1, S21–S25.
- Kattygnarath, D., Maugenre, S., Neyroud, N., Balse, E., Ichai, C., Denjoy, I., Dilanian, G., Martins, R. P., Fressart, V., Berthet, M., et al. (2011). MOG1: a new susceptibility gene for Brugada syndrome. *Circ*

Cardiovasc Genet 4, 261–268.

Kellenberger, S., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (1996). Movement of the Na⁺ channel inactivation gate during inactivation. *Journal of Biological Chemistry* 271, 30971–30979.

Kellenberger, S., West, J. W., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (1997). Molecular analysis of the putative inactivation particle in the inactivation gate of brain type IIA Na⁺ channels. *J. Gen. Physiol.* 109, 589–605.

Keller, D. I., Rougier, J.-S., Kucera, J. P., Benammar, N., Fressart, V., Guicheney, P., Madle, A., Fromer, M., Schläpfer, J., and Abriel, H. (2005). Brugada syndrome and fever: genetic and molecular characterization of patients carrying SCN5A mutations. *Cardiovascular Research* 67, 510–519.

Keynes, R. D., and Elinder, F. (1999). The screw-helical voltage gating of ion channels. *Proc. Biol. Sci.* 266, 843–852.

Ki, C.-S., Jung, C. L., Kim, H.-J., Baek, K.-H., Park, S. J., On, Y. K., Kim, K.-S., Noh, S. J., Youm, J. B., Kim, J. S., et al. (2014). A KCNQ1 mutation causes age-dependant bradycardia and persistent atrial fibrillation. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 466, 529–540.

Kim, J., Ghosh, S., Liu, H., Tateyama, M., Kass, R. S., and Pitt, G. S. (2004). Calmodulin Mediates Ca²⁺ Sensitivity of Sodium Channels. *Journal of Biological Chemistry* 279, 45004–45012.

Kiyosue, T., and Arita, M. (1989). Late sodium current and its contribution to action potential configuration in guinea pig ventricular myocytes. *Circulation Research* 64, 389–397.

Ko, J. H., Park, W. S., Kim, S. J., and Earm, Y. E. (2006). Slowing of the inactivation of voltage-dependent sodium channels by staurosporine, the protein kinase C inhibitor, in rabbit atrial myocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 534, 48–54.

Kobayashi, T., Deak, M., Morrice, N., and Cohen, P. (1999). Characterization of the structure and regulation of two novel isoforms of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase. *Biochem. J.* 344 Pt 1, 189–197.

Koval, O. M., Snyder, J. S., Wolf, R. M., Pavlovicz, R. E., Glynn, P., Curran, J., Leymaster, N. D., Dun, W., Wright, P. J., Cardona, N., et al. (2012). Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II-Based Regulation of Voltage-Gated Na⁺ Channel in Cardiac Disease. *Circulation* 126, 2084–2094.

Kozak, J. A., Matsushita, M., Nairn, A. C., and Cahalan, M. D. (2005). Charge screening by internal pH and polyvalent cations as a mechanism for activation, inhibition, and rundown of TRPM7/MIC channels. *J. Gen. Physiol.* 126, 499–514.

Krejci, P., Prochazkova, J., Bryja, V., Kozubik, A., and Wilcox, W. R. (2009). Molecular pathology of the fibroblast growth factor family. *Hum. Mutat.* 30, 1245–1255.

Kunze, D. L., Lacerda, A. E., Wilson, D. L., and Brown, A. M. (1985). Cardiac Na currents and the inactivating, reopening, and waiting properties of single cardiac Na channels. *J. Gen. Physiol.* 86, 691–719.

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.

Kurokawa, J., Motoike, H. K., Rao, J., and Kass, R. S. (2004). Regulatory actions of the A-kinase anchoring

- protein Yotiao on a heart potassium channel downstream of PKA phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 16374–16378.
- Kühn, F. J., and Greeff, N. G. (1999). Movement of voltage sensor S4 in domain 4 is tightly coupled to sodium channel fast inactivation and gating charge immobilization. *J. Gen. Physiol.* 114, 167–183.
- Kwan, D. C. H., Prole, D. L., and Yellen, G. (2012). Structural changes during HCN channel gating defined by high affinity metal bridges. *J. Gen. Physiol.* 140, 279–291.
- Kwik, J., Boyle, S., Fooksman, D., Margolis, L., Sheetz, M. P., and Edidin, M. (2003). Membrane cholesterol, lateral mobility, and the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent organization of cell actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 13964–13969.
- Kyndt, F., Probst, V., Potet, F., Demolombe, S., Chevallier, J. C., Baro, I., Moisan, J. P., Boisseau, P., Schott, J. J., Escande, D., et al. (2001). Novel SCN5A mutation leading either to isolated cardiac conduction defect or Brugada syndrome in a large French family. *Circulation* 104, 3081–3086.
- Lang, F., and Cohen, P. (2001). Regulation and physiological roles of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase isoforms. *Sci. STKE* 2001, re17–re17.
- Lang, F., and Stournaras, C. (2013). Serum and glucocorticoid inducible kinase, metabolic syndrome, inflammation, and tumor growth. *Hormones (Athens)* 12, 160–171.
- Lee, S.-Y., Lee, A., Chen, J., and MacKinnon, R. (2005). Structure of the KvAP voltage-dependent K⁺ channel and its dependence on the lipid membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 15441–15446.
- Lei, M., Goddard, C., Liu, J., Léoni, A.-L., Royer, A., Fung, S. S.-M., Xiao, G., Ma, A., Zhang, H., Charpentier, F., et al. (2005). Sinus node dysfunction following targeted disruption of the murine cardiac sodium channel gene *Scn5a*. *The Journal of Physiology* 567, 387–400.
- Lei, M., Huang, C. L.-H., and Zhang, Y. (2008). Genetic Na⁺ channelopathies and sinus node dysfunction. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 98, 171–178.
- Lengyel, C., Iost, N., Virág, L., Varro, A., Lathrop, D. A., and Papp, J. G. (2001). Pharmacological block of the slow component of the outward delayed rectifier current (I(Ks)) fails to lengthen rabbit ventricular muscle QT(c) and action potential duration. *Br. J. Pharmacol.* 132, 101–110.
- Levitan, I., Fang, Y., Rosenhouse-Dantsker, A., and Romanenko, V. (2010). “Cholesterol and Ion Channels,” in *Cholesterol Binding and Cholesterol Transport Proteins: Subcellular Biochemistry*. (Dordrecht: Springer Netherlands), 509–549.
- Lewis, A., Jogini, V., Blachowicz, L., Lainé, M., and Roux, B. (2008). Atomic constraints between the voltage sensor and the pore domain in a voltage-gated K⁺ channel of known structure. *J. Gen. Physiol.* 131, 549–561.
- Li, Q., Huang, H., Liu, G., Lam, K., Rutberg, J., Green, M. S., Birnie, D. H., Lemery, R., Chahine, M., and Gollob, M. H. (2009). Gain-of-function mutation of Nav1.5 in atrial fibrillation enhances cellular excitability and lowers the threshold for action potential firing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 380, 132–137.
- Li, Y., Chen, L., Kass, R. S., and Dessauer, C. W. (2012). The A-kinase anchoring protein Yotiao facilitates complex formation between adenylyl cyclase type 9 and the IKs potassium channel in heart. *J. Biol. Chem.* 287, 29815–29824.

- Li, Y., Zaydman, M. A., Wu, D., Shi, J., Guan, M., Virgin-Downey, B., and Cui, J. (2011). KCNE1 enhances phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) sensitivity of IKs to modulate channel activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 9095–9100.
- Liu Cj, Dib-Hajj, S. D., and Waxman, S. G. (2001). Fibroblast growth factor homologous factor 1B binds to the C terminus of the tetrodotoxin-resistant sodium channel rNav1.9a (NaN). *Journal of Biological Chemistry* 276, 18925–18933.
- Liu, B., and Qin, F. (2005). Functional control of cold- and menthol-sensitive TRPM8 ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Neurosci.* 25, 1674–1681.
- Liu, C.-J., Dib-Hajj, S. D., Renganathan, M., Cummins, T. R., and Waxman, S. G. (2003). Modulation of the cardiac sodium channel Nav1.5 by fibroblast growth factor homologous factor 1B. *Journal of Biological Chemistry* 278, 1029–1036.
- Liu, H., Chatel, S., Simard, C., Syam, N., Salle, L., Probst, V., Morel, J., Millat, G., Lopez, M., Abriel, H., et al. (2013). Molecular genetics and functional anomalies in a series of 248 Brugada cases with 11 mutations in the TRPM4 channel. *PLoS ONE* 8, e54131.
- Liu, H., Sun, H.-Y., Lau, C.-P., and Li, G.-R. (2007). Regulation of voltage-gated cardiac sodium current by epidermal growth factor receptor kinase in guinea pig ventricular myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 42, 760–768.
- Liu, M., Sanyal, S., Gao, G., Gurung, I. S., Zhu, X., Gaconnet, G., Kerchner, L. J., Shang, L. L., Huang, C. L.-H., Grace, A., et al. (2009). Cardiac Na⁺ current regulation by pyridine nucleotides. *Circulation Research* 105, 737–745.
- Logothetis, D. E., Petrou, V. I., Adney, S. K., and Mahajan, R. (2010). Channelopathies linked to plasma membrane phosphoinositides. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 460, 321–341.
- London, B., Michalec, M., Mehdi, H., Zhu, X., Kerchner, L., Sanyal, S., Viswanathan, P. C., Pfahnl, A. E., Shang, L. L., Madhusudanan, M., et al. (2007). Mutation in glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like gene (GPD1-L) decreases cardiac Na⁺ current and causes inherited arrhythmias. *Circulation* 116, 2260–2268.
- Long, S. B., Campbell, E. B., and MacKinnon, R. (2005a). Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* 309, 897–903.
- Long, S. B., Campbell, E. B., and MacKinnon, R. (2005b). Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science* 309, 903–908.
- Lopes, C. M. B., Remon, J. I., Matavel, A., Sui, J. L., Keselman, I., Medei, E., Shen, Y., Rosenhouse-Dantsker, A., Rohacs, T., and Logothetis, D. E. (2007). Protein kinase A modulates PLC-dependent regulation and PIP2-sensitivity of K⁺ channels. *Channels (Austin)* 1, 124–134.
- LoPiccolo, J., Blumenthal, G. M., Bernstein, W. B., and Dennis, P. A. (2008). Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist. Updat.* 11, 32–50.
- Lou, B.-S., Lin, T.-H., and Lo, C.-Z. (2004). The conformation and movement of Na channel inactivation gate peptide in linker between domain III and IV during inactivation by NMR spectroscopy and molecular modeling study. *J. Pept. Res.* 63, 313–323.

- Lou, J. Y., Laezza, F., Gerber, B. R., Xiao, M., Yamada, K. A., Hartmann, H., Craig, A. M., Nerbonne, J. M., and Ornitz, D. M. (2005). Fibroblast growth factor 14 is an intracellular modulator of voltage-gated sodium channels. *The Journal of Physiology* 569, 179–193.
- 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, T., Lee, H. C., Kabat, J. A., and Shibata, E. F. (1999). Modulation of rat cardiac sodium channel by the stimulatory G protein alpha subunit. *The Journal of Physiology* 518 (Pt 2), 371–384.
- Lu, Z., Jiang, Y.-P., Wu, C.-Y. C., Ballou, L. M., Liu, S., Carpenter, E. S., Rosen, M. R., Cohen, I. S., and Lin, R. Z. (2013). Increased persistent sodium current due to decreased PI3K signaling contributes to QT prolongation in the diabetic heart. *Diabetes* 62, 4257–4265.
- Lu, Z., Klem, A. M., and Ramu, Y. (2002). Coupling between voltage sensors and activation gate in voltage-gated K⁺ channels. *J. Gen. Physiol.* 120, 663–676.
- Lu, Z., Klem, A. M., and Ramu, Y. (2001). Ion conduction pore is conserved among potassium channels. *Nature* 413, 809–813.
- Lu, Z., Wu, C. Y. C., Jiang, Y. P., Ballou, L. M., Clausen, C., Cohen, I. S., and Lin, R. Z. (2012). Suppression of Phosphoinositide 3-Kinase Signaling and Alteration of Multiple Ion Currents in Drug-Induced Long QT Syndrome. *Science Translational Medicine* 4, 131ra50–131ra50.
- Lundby, A., Ravn, L. S., Svendsen, J. H., Olesen, S.-P., and Schmitt, N. (2007). KCNQ1 mutation Q147R is associated with atrial fibrillation and prolonged QT interval. *HRTHM* 4, 1532–1541.
- Magyar, J., Kiper, C. E., Dumaine, R., Burgess, D. E., Bányász, T., and Satin, J. (2004). Divergent action potential morphologies reveal nonequilibrium properties of human cardiac Na channels. *Cardiovascular Research* 64, 477–487.
- Mahida, S., Lubitz, S. A., Rienstra, M., Milan, D. J., and Ellinor, P. T. (2011). Monogenic atrial fibrillation as pathophysiological paradigms. *Cardiovascular Research* 89, 692–700.
- Makielski, J. C., and Farley, A. L. (2006). Na⁺ current in human ventricle: implications for sodium loading and homeostasis. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 17 Suppl 1, S15–S20.
- Makielski, J. C., Sheets, M. F., Hanck, D. A., January, C. T., and Fozzard, H. A. (1987). Sodium current in voltage clamped internally perfused canine cardiac Purkinje cells. *Biophysj* 52, 1–11.
- Makiyama, T., Akao, M., Shizuta, S., Doi, T., Nishiyama, K., Oka, Y., Ohno, S., Nishio, Y., Tsuji, K., Itoh, H., et al. (2008). A novel SCN5A gain-of-function mutation M1875T associated with familial atrial fibrillation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 52, 1326–1334.
- Maltsev, V. A., and Undrovinas, A. (2008). Late sodium current in failing heart: friend or foe? *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 96, 421–451.
- Maltsev, V. A., and Undrovinas, A. I. (2006). A multi-modal composition of the late Na⁺ current in human ventricular cardiomyocytes. *Cardiovascular Research* 69, 116–127.
- Maltsev, V. A., Silverman, N., Sabbah, H. N., and Undrovinas, A. I. (2007). Chronic heart failure slows late

sodium current in human and canine ventricular myocytes: implications for repolarization variability. *Eur. J. Heart Fail.* 9, 219–227.

Mangoni, M. E., and Nargeot, J. (2008). Genesis and regulation of the heart automaticity. *Physiol. Rev.* 88, 919–982.

Marionneau, C., Lichti, C. F., Lindenbaum, P., Charpentier, F., Nerbonne, J. M., Townsend, R. R., and Mérot, J. (2012). Mass Spectrometry-Based Identification of Native Cardiac Nav1.5 Channel α Subunit Phosphorylation Sites. *J. Proteome Res.*, 121109162634007.

Marsman, R. F. J., Bezzina, C. R., Freiberg, F., Verkerk, A. O., Adriaens, M. E., Podliesna, S., Chen, C., Purfürst, B., Spallek, B., Koopmann, T. T., et al. (2014). Coxsackie and adenovirus receptor is a modifier of cardiac conduction and arrhythmia vulnerability in the setting of myocardial ischemia. *J. Am. Coll. Cardiol.* 63, 549–559.

Martens, J. R., Kwak, Y. G., and Tamkun, M. M. (1999). Modulation of Kv channel α / β subunit interactions. *Trends in Cardiovascular Medicine* 9, 253–258.

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.

Matavel, A., and Lopes, C. M. B. (2009). PKC activation and PIP2 depletion underlie biphasic regulation of IKs by Gq-coupled receptors. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 46, 704–712.

Matavel, A., Medei, E., and Lopes, C. M. B. (2010). PKA and PKC partially rescue long QT type 1 phenotype by restoring channel-PIP2 interactions. *Channels (Austin)* 4, 3–11.

Mazzone, A., Strega, P. R., Tester, D. J., Bernard, C. E., Faulkner, G., De Giorgio, R., Makielski, J. C., Stanghellini, V., Gibbons, S. J., Ackerman, M. J., et al. (2008). A mutation in telethonin alters Nav1.5 function. *Journal of Biological Chemistry* 283, 16537–16544.

McNair, W. P., Ku, L., Taylor, M. R. G., Fain, P. R., Dao, D., Wolfel, E., Mestroni, L., Familial Cardiomyopathy Registry Research Group (2004). SCN5A mutation associated with dilated cardiomyopathy, conduction disorder, and arrhythmia. *Circulation* 110, 2163–2167.

McPhee, J. C., Ragsdale, D. S., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (1998). A critical role for the S4-S5 intracellular loop in domain IV of the sodium channel α -subunit in fast inactivation. *Journal of Biological Chemistry* 273, 1121–1129.

Medeiros-Domingo, A., Kaku, T., Tester, D. J., Iturralde-Torres, P., Itty, A., Ye, B., Valdivia, C., Ueda, K., Canizales-Quinteros, S., Tusié-Luna, M. T., et al. (2007). SCN4B-encoded sodium channel β 4 subunit in congenital long-QT syndrome. *Circulation* 116, 134–142.

Medeiros-Domingo, A., Tan, B. H., Crotti, L., Tester, D. J., Eckhardt, L., Cuoretti, A., Kroboth, S. L., Song, C., Zhou, Q., Kopp, D., et al. (2010). Gain-of-Function Mutation, S422L, in the KCNJ8-Encoded Cardiac K ATP Channel Kir6.1 as a Pathogenic Substrate for J Wave Syndromes. *HRTM*, 1–27.

Michels, V. V., Moll, P. P., Miller, F. A., Tajik, A. J., Chu, J. S., Driscoll, D. J., Burnett, J. C., Rodeheffer, R. J., Chesebro, J. H., and Tazelaar, H. D. (1992). The frequency of familial dilated cardiomyopathy in a series of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 326, 77–82.

Minogue, S., Chu, K. M. E., Westover, E. J., Covey, D. F., Hsuan, J. J., and Waugh, M. G. (2010).

- Relationship between phosphatidylinositol 4-phosphate synthesis, membrane organization, and lateral diffusion of PI4KIIalpha at the trans-Golgi network. *J. Lipid Res.* 51, 2314–2324.
- Mishra, S., Undrovinas, N. A., Maltsev, V. A., Reznikov, V., Sabbah, H. N., and Undrovinas, A. (2011). Post-transcriptional silencing of SCN1B and SCN2B genes modulates late sodium current in cardiac myocytes from normal dogs and dogs with chronic heart failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 301, H1596–605.
- Mohler, P. J., Schott, J.-J., Gramolini, A. O., Dilly, K. W., Guatimosim, S., duBell, W. H., Song, L.-S., Haurogné, K., Kyndt, F., Ali, M. E., et al. (2003). Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature* 421, 634–639.
- Moorman, J. R., Kirsch, G. E., Lacerda, A. E., and Brown, A. M. (1989). Angiotensin II modulates cardiac Na⁺ channels in neonatal rat. *Circulation Research* 65, 1804–1809.
- Moreau, A., Krahn, A. D., Gosselin-Badaroudine, P., Klein, G. J., Christé, G., Vincent, Y., Boutjdir, M., and Chahine, M. (2013). Sodium overload due to a persistent current that attenuates the arrhythmogenic potential of a novel LQT3 mutation. *Front Pharmacol* 4, 126.
- Moreno, J. D., and Clancy, C. E. (2012). Pathophysiology of the cardiac late Na current and its potential as a drug target. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 52, 608–619.
- Moretti, A., Laugwitz, K.-L., Dorn, T., Sinnecker, D., and Mummery, C. (2013). Pluripotent stem cell models of human heart disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3, a014027–a014027.
- Morin, T. J., and Kobertz, W. R. (2008). Counting membrane-embedded KCNE beta-subunits in functioning K⁺ channel complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 1478–1482.
- Moss, A. J., Schwartz, P. J., Crampton, R. S., Locati, E., and Carleen, E. (1985). The long QT syndrome: a prospective international study. *Circulation* 71, 17–21.
- Motoike, H. K. (2004). The Na⁺ Channel Inactivation Gate Is a Molecular Complex: A Novel Role of the COOH-terminal Domain. *J. Gen. Physiol.* 123, 155–165.
- Mruk, K., Farley, B. M., Ritacco, A. W., and Kobertz, W. R. (2014). Calmodulation meta-analysis: Predicting calmodulin binding via canonical motif clustering. *J. Gen. Physiol.* 144, 105–114.
- Munoz-Sanjuan, I., Smallwood, P. M., and Nathans, J. (2000). Isoform diversity among fibroblast growth factor homologous factors is generated by alternative promoter usage and differential splicing. *Journal of Biological Chemistry* 275, 2589–2597.
- Murata, Y., Iwasaki, H., Sasaki, M., Inaba, K., and Okamura, Y. (2005). Phosphoinositide phosphatase activity coupled to an intrinsic voltage sensor. *Nature* 435, 1239–1243.
- Murphy, B. J., Rogers, J., Perdichizzi, A. P., Colvin, A. A., and Catterall, W. A. (1996). cAMP-dependent phosphorylation of two sites in the alpha subunit of the cardiac sodium channel. *Journal of Biological Chemistry* 271, 28837–28843.
- Murray, K. T., Anno, T., Bennett, P. B., and Hondeghem, L. M. (1990). Voltage clamp of the cardiac sodium current at 37 degrees C in physiologic solutions. *Biophysj* 57, 607–613.
- Murray, K. T., Hu, N. N., Daw, J. R., Shin, H. G., Watson, M. T., Mashburn, A. B., and George, A. L. (1997). Functional effects of protein kinase C activation on the human cardiac Na⁺ channel. *Circulation*

Research 80, 370–376.

Nakajo, K., and Kubo, Y. (2007). KCNE1 and KCNE3 stabilize and/or slow voltage sensing S4 segment of KCNQ1 channel. *J. Gen. Physiol.* 130, 269–281.

Nakajo, K., Ulbrich, M. H., Kubo, Y., and Isacoff, E. Y. (2010). Stoichiometry of the KCNQ1 - KCNE1 ion channel complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 18862–18867.

Nakamura, H., Kurokawa, J., Bai, C.-X., Asada, K., Xu, J., Oren, R. V., Zhu, Z. I., Clancy, C. E., Isobe, M., and Furukawa, T. (2007). Progesterone regulates cardiac repolarization through a nongenomic pathway: an in vitro patch-clamp and computational modeling study. *Circulation* 116, 2913–2922.

Nakanishi, S., Catt, K. J., and Balla, T. (1995). A wortmannin-sensitive phosphatidylinositol 4-kinase that regulates hormone-sensitive pools of inositolphospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 5317–5321.

Napolitano, C., deGiuli, L., and Wilson, J. Inherited arrhythmias Database. Available at: <http://93.62.239.78/cardmoc/>.

Nattel, S., Khairy, P., and Schram, G. (2001). Arrhythmogenic ionic remodeling: adaptive responses with maladaptive consequences.

Nerbonne, J. M., and Kass, R. S. (2005). Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol. Rev.* 85, 1205–1253.

Ng, C. A., Perry, M. D., Tan, P. S., Hill, A. P., Kuchel, P. W., and Vandenberg, J. I. (2012). The S4-S5 linker acts as a signal integrator for HERG K⁺ channel activation and deactivation gating. *PLoS ONE* 7, e31640.

Nguyen, H. M., and Goldin, A. L. (2010). Sodium channel carboxyl-terminal residue regulates fast inactivation. *J. Biol. Chem.* 285, 9077–9089.

Nguyen, T. P., Wang, D. W., Rhodes, T. H., and George, A. L. (2008). Divergent biophysical defects caused by mutant sodium channels in dilated cardiomyopathy with arrhythmia. *Circulation Research* 102, 364–371.

Oginosawa, Y., Nagatomo, T., Abe, H., Makita, N., Makielski, J. C., and Nakashima, Y. (2005). Intrinsic mechanism of the enhanced rate-dependent QT shortening in the R1623Q mutant of the LQT3 syndrome. *Cardiovascular Research* 65, 138–147.

Ohno, S., Zankov, D. P., Ding, W.-G., Itoh, H., Makiyama, T., Doi, T., Shizuta, S., Hattori, T., Miyamoto, A., Naiki, N., et al. (2011). KCNE5 (KCNE1L) variants are novel modulators of Brugada syndrome and idiopathic ventricular fibrillation. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 4, 352–361.

Olson, T. M., and Keating, M. T. (1996). Mapping a cardiomyopathy locus to chromosome 3p22-p25. *J. Clin. Invest.* 97, 528–532.

Olson, T. M., Michels, V. V., Ballew, J. D., Reyna, S. P., Karst, M. L., Herron, K. J., Horton, S. C., Rodeheffer, R. J., and Anderson, J. L. (2005). Sodium channel mutations and susceptibility to heart failure and atrial fibrillation. *JAMA* 293, 447–454.

Osteen, J. D., Barro-Soria, R., Robey, S., Sampson, K. J., Kass, R. S., and Larsson, H. P. (2012). Allosteric gating mechanism underlies the flexible gating of KCNQ1 potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 7103–7108.

- Osteen, J. D., Gonzalez, C., Sampson, K. J., Iyer, V., Rebolledo, S., Larsson, H. P., and Kass, R. S. (2010). KCNE1 alters the voltage sensor movements necessary to open the KCNQ1 channel gate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 22710–22715.
- Panaghie, G., and Abbott, G. W. (2006). The impact of ancillary subunits on small-molecule interactions with voltage-gated potassium channels. *Curr. Pharm. Des.* 12, 2285–2302.
- Panaghie, G., Purtell, K., Tai, K.-K., and Abbott, G. W. (2008). Voltage-dependent C-type inactivation in a constitutively open K⁺ channel. *Biophys. J.* 95, 2759–2778.
- Park, K. H. (2005). Impaired KCNQ1-KCNE1 and Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate Interaction Underlies the Long QT Syndrome. *Circulation Research* 96, 730–739.
- Patlak, J. B., and Ortiz, M. (1985). Slow currents through single sodium channels of the adult rat heart. *J. Gen. Physiol.* 86, 89–104.
- Pattnaik, B. R., and Hughes, B. A. (2009). Regulation of Kir channels in bovine retinal pigment epithelial cells by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 297, C1001–11.
- Peretz, A., Schottelndreier, H., Aharon-Shamgar, L. B., and Attali, B. (2002). Modulation of homomeric and heteromeric KCNQ1 channels by external acidification. *The Journal of Physiology* 545, 751–766.
- Peroz, D., Rodriguez, N., Choveau, F., Baro, I., Merot, J., and Loussouarn, G. (2008). Kv7.1 (KCNQ1) properties and channelopathies. *The Journal of Physiology* 586, 1785–1789.
- Pfahnl, A. E., Viswanathan, P. C., Weiss, R., Shang, L. L., Sanyal, S., Shusterman, V., Kornblit, C., London, B., and Dudley, S. C. (2007). A sodium channel pore mutation causing Brugada syndrome. *HRTHM* 4, 46–53.
- Pian, P., Bucchi, A., Robinson, R. B., and Siegelbaum, S. A. (2006). Regulation of gating and rundown of HCN hyperpolarization-activated channels by exogenous and endogenous PIP₂. *J. Gen. Physiol.* 128, 593–604.
- Pike, L. J., and Miller, J. M. (1998). Cholesterol depletion delocalizes phosphatidylinositol bisphosphate and inhibits hormone-stimulated phosphatidylinositol turnover. *Journal of Biological Chemistry* 273, 22298–22304.
- Pinet, C., Le Grand, B., John, G. W., and Coulombe, A. (2002). Thrombin facilitation of voltage-gated sodium channel activation in human cardiomyocytes: implications for ischemic sodium loading. *Circulation* 106, 2098–2103.
- Piron, J., Choveau, F. S., Amarouch, M. Y., Rodriguez, N., Charpentier, F., Merot, J., Baro, I., and Loussouarn, G. (2010). KCNE1-KCNQ1 osmoregulation by interaction of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate with Mg²⁺ and polyamines. *The Journal of Physiology* 588, 3471–3483.
- Plant, L. D., Xiong, D., Dai, H., and Goldstein, S. A. N. (2014). Individual IKs channels at the surface of mammalian cells contain two KCNE1 accessory subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, E1438–46.
- Plaster, N. M., Tawil, R., Tristani-Firouzi, M., Canún, S., Bendahhou, S., Tsunoda, A., Donaldson, M. R., Iannaccone, S. T., Brunt, E., Barohn, R., et al. (2001). Mutations in Kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen's syndrome. *Cell* 105, 511–519.
- Posson, D. J., Ge, P., Miller, C., Bezanilla, F., and Selvin, P. R. (2005). Small vertical movement of a K⁺

channel voltage sensor measured with luminescence energy transfer. *Nature* 436, 848–851.

Potet, F., Chagot, B., Anghelescu, M., Viswanathan, P. C., Stepanovic, S. Z., Kupersmidt, S., Chazin, W. J., and Balser, J. R. (2009). Functional Interactions between Distinct Sodium Channel Cytoplasmic Domains through the Action of Calmodulin. *Journal of Biological Chemistry* 284, 8846–8854.

Poveda, J. A., Giudici, A. M., Renart, M. L., Molina, M. L., Montoya, E., Fernández-Carvajal, A., Fernández-Ballester, G., Encinar, J. A., and González-Ros, J. M. (2014). Lipid modulation of ion channels through specific binding sites. *Biochim. Biophys. Acta* 1838, 1560–1567.

Probst, V., Kyndt, F., Potet, F., Trochu, J.-N., Mialet, G., Demolombe, S., Schott, J.-J., Baró, I., Escande, D., and Le Marec, H. (2003). Haploinsufficiency in combination with aging causes SCN5A-linked hereditary Lenègre disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 41, 643–652.

Prole, D. L., and Yellen, G. (2006). Reversal of HCN channel voltage dependence via bridging of the S4-S5 linker and Post-S6. *J. Gen. Physiol.* 128, 273–282.

Qu, Y., Rogers, J. C., Tanada, T. N., Catterall, W. A., and Scheuer, T. (1996). Phosphorylation of S1505 in the cardiac Na⁺ channel inactivation gate is required for modulation by protein kinase C. *J. Gen. Physiol.* 108, 375–379.

Qu, Y., Rogers, J., Tanada, T., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (1994). Modulation of cardiac Na⁺ channels expressed in a mammalian cell line and in ventricular myocytes by protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 3289–3293.

Ravens, U., Wettwer, E., and Hála, O. (2004). Pharmacological modulation of ion channels and transporters. *Cell Calcium* 35, 575–582.

Ravn, L. S., Aizawa, Y., Pollevick, G. D., Hofman-Bang, J., Cordeiro, J. M., Dixen, U., Jensen, G., Wu, Y., Burashnikov, E., Haunso, S., et al. (2008). Gain of function in IKs secondary to a mutation in KCNE5 associated with atrial fibrillation. *HRTHM* 5, 427–435.

Remme, C. A., and Wilde, A. A. M. (2008). SCN5A overlap syndromes: no end to disease complexity? *Europace* 10, 1253–1255.

Remme, C. A., Scicluna, B. P., Verkerk, A. O., Amin, A. S., van Brunschot, S., Beekman, L., Deneer, V. H. M., Chevalier, C., Oyama, F., Miyazaki, H., et al. (2009). Genetically determined differences in sodium current characteristics modulate conduction disease severity in mice with cardiac sodium channelopathy. *Circulation Research* 104, 1283–1292.

Remme, C. A., Verkerk, A. O., Nuyens, D., van Ginneken, A. C. G., van Brunschot, S., Belterman, C. N. W., Wilders, R., van Roon, M. A., Tan, H. L., Wilde, A. A. M., et al. (2006). Overlap syndrome of cardiac sodium channel disease in mice carrying the equivalent mutation of human SCN5A-1795insD. *Circulation* 114, 2584–2594.

Remme, C. A., Wilde, A. A. M., and Bezzina, C. R. (2008). Cardiac sodium channel overlap syndromes: different faces of SCN5A mutations. *Trends in Cardiovascular Medicine* 18, 78–87.

Restier, L., Cheng, L., and Sanguinetti, M. C. (2008). Mechanisms by which atrial fibrillation-associated mutations in the S1 domain of KCNQ1 slow deactivation of IKs channels. *The Journal of Physiology* 586, 4179–4191.

Riuró, H., Beltran-Alvarez, P., Tarradas, A., Selga, E., Campuzano, O., Vergés, M., Pagans, S., Iglesias, A.,

- Brugada, J., Brugada, P., et al. (2013). A missense mutation in the sodium channel $\beta 2$ subunit reveals SCN2B as a new candidate gene for Brugada syndrome. *Hum. Mutat.* 34, 961–966.
- Rocheleau, J. M., and Kobertz, W. R. (2008). KCNE peptides differently affect voltage sensor equilibrium and equilibration rates in KCNQ1 K⁺ channels. *J. Gen. Physiol.* 131, 59–68.
- Roden, D. M. (2004). Drug-induced prolongation of the QT interval. *N Engl J Med* 350, 1013–1022.
- Rodriguez, N., Amarouch, M. Y., Montnach, J., Piron, J., Labro, A. J., Charpentier, F., Mérot, J., Baró, I., and Loussouarn, G. (2010). Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate (PIP₂) Stabilizes the Open Pore Conformation of the Kv11.1 (hERG) Channel. *Biophysj* 99, 1110–1118.
- Romanenko, V. G., Fang, Y., Byfield, F., Travis, A. J., Vandenberg, C. A., Rothblat, G. H., and Levitan, I. (2004). Cholesterol sensitivity and lipid raft targeting of Kir2.1 channels. *Biophysj* 87, 3850–3861.
- Romanenko, V. G., Rothblat, G. H., and Levitan, I. (2002). Modulation of endothelial inward-rectifier K⁺ current by optical isomers of cholesterol. *Biophysj* 83, 3211–3222.
- Rook, M. B., Evers, M. M., Vos, M. A., and Bierhuizen, M. F. A. (2011). Biology of cardiac sodium channel Nav1.5 expression. *Cardiovascular Research* 93, 12–23.
- Roura-Ferrer, M., Solé, L., Oliveras, A., Dahan, R., Bielanska, J., Villarroel, A., Comes, N., and Felipe, A. (2010). Impact of KCNE subunits on KCNQ1 (Kv7.1) channel membrane surface targeting. *J. Cell. Physiol.* 225, 692–700.
- Ruan, Y., Liu, N., and Priori, S. G. (2009). Sodium channel mutations and arrhythmias. *Nat Rev Cardiol* 6, 337–348.
- Ruan, Y., Liu, N., Bloise, R., Napolitano, C., and Priori, S. G. (2007). Gating properties of SCN5A mutations and the response to mexiletine in long-QT syndrome type 3 patients. *Circulation* 116, 1137–1144.
- Rudy, B. (1978). Slow inactivation of the sodium conductance in squid giant axons. Pronase resistance. *The Journal of Physiology* 283, 1–21.
- Ruscic, K. J., Miceli, F., Villalba-Galea, C. A., Dai, H., Mishina, Y., Bezanilla, F., and Goldstein, S. A. N. (2013). IKs channels open slowly because KCNE1 accessory subunits slow the movement of S4 voltage sensors in KCNQ1 pore-forming subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, E559–66.
- Ruta, V., Chen, J., and MacKinnon, R. (2005). Calibrated measurement of gating-charge arginine displacement in the KvAP voltage-dependent K⁺ channel. *Cell* 123, 463–475.
- Sakakibara, Y., Wasserstrom, J. A., Furukawa, T., Jia, H., Arentzen, C. E., Hartz, R. S., and Singer, D. H. (1992). Characterization of the sodium current in single human atrial myocytes. *Circulation Research* 71, 535–546.
- Sanguinetti, M. C., and Jurkiewicz, N. K. (1990). Two components of cardiac delayed rectifier K⁺ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J. Gen. Physiol.* 96, 195–215.
- Sanguinetti, M. C., 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.

Sanguinetti, M. C., Jurkiewicz, N. K., Scott, A., and Siegl, P. K. (1991). Isoproterenol antagonizes prolongation of refractory period by the class III antiarrhythmic agent E-4031 in guinea pig myocytes. Mechanism of action. *Circulation Research* 68, 77–84.

Sarhan, M. F., Tung, C.-C., Van Petegem, F., and Ahern, C. A. (2012). Crystallographic basis for calcium regulation of sodium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 3558–3563.

Sarhan, M. F., Van Petegem, F., and Ahern, C. A. (2009). A Double Tyrosine Motif in the Cardiac Sodium Channel Domain III-IV Linker Couples Calcium-dependent Calmodulin Binding to Inactivation Gating. *Journal of Biological Chemistry* 284, 33265–33274.

Sánchez-Wandelmer, J., Dávalos, A., Herrera, E., Giera, M., Cano, S., la Peña, de, G., Lasunción, M. A., and Busto, R. (2009). Inhibition of cholesterol biosynthesis disrupts lipid raft/caveolae and affects insulin receptor activation in 3T3-L1 preadipocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 1731–1739.

Schott, J. J., Alshinawi, C., Kyndt, F., Probst, V., Hoorntje, T. M., Hulsbeek, M., Wilde, A. A., Escande, D., Mannens, M. M., and Le Marec, H. (1999). Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A. *Nat. Genet.* 23, 20–21.

Schreibmayer, W. (1999). Isoform diversity and modulation of sodium channels by protein kinases. *Cell. Physiol. Biochem.* 9, 187–200.

Schreibmayer, W., Frohnwieser, B., Dascal, N., Platzer, D., Spreitzer, B., Zechner, R., Kallen, R. G., and Lester, H. A. (1994). Beta-adrenergic modulation of currents produced by rat cardiac Na⁺ channels expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Recept. Channels* 2, 339–350.

Schulze-Bahr, E., Eckardt, L., Breithardt, G., Seidl, K., Wichter, T., Wolpert, C., Borggrefe, M., and Haverkamp, W. (2003). Sodium channel gene (SCN5A) mutations in 44 index patients with Brugada syndrome: different incidences in familial and sporadic disease. *Hum. Mutat.* 21, 651–652.

Scriven, D. R., Dan, P., and Moore, E. D. (2000). Distribution of proteins implicated in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Biophysj* 79, 2682–2691.

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

Shah, V. N., Wingo, T. L., Weiss, K. L., Williams, C. K., Balser, J. R., and Chazin, W. J. (2006). Calcium-dependent regulation of the voltage-gated sodium channel hH1: intrinsic and extrinsic sensors use a common molecular switch. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 3592–3597.

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 IKs channel gating and assembly: impaired function in long-QT mutations. *Circulation Research* 98, 1055–1063.

Shang, L. L., Pfahnl, A. E., Sanyal, S., Jiao, Z., Allen, J., Banach, K., Fahrenbach, J., Weiss, D., Taylor, W. R., Zafari, A. M., et al. (2007). Human heart failure is associated with abnormal C-terminal splicing variants in the cardiac sodium channel. *Circulation Research* 101, 1146–1154.

Sheldon, R. S., Cannon, N. J., and Duff, H. J. (1986). Binding of [3H]batrachotoxinin A benzoate to specific sites on rat cardiac sodium channels. *Mol. Pharmacol.* 30, 617–623.

- Sheu, S. S., and Lederer, W. J. (1985). Lidocaine's negative inotropic and antiarrhythmic actions. Dependence on shortening of action potential duration and reduction of intracellular sodium activity. *Circulation Research* 57, 578–590.
- Shinnawi, R., and Gepstein, L. (2014). iPCS Cell Modeling of Inherited Cardiac Arrhythmias. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 16, 331–18.
- Shryock, J. C., Song, Y., Rajamani, S., Antzelevitch, C., and Belardinelli, L. (2013). The arrhythmogenic consequences of increasing late I_{Na} in the cardiomyocyte. *Cardiovascular Research* 99, 600–611.
- Shy, D., Gillet, L., and Abriel, H. (2013). Cardiac sodium channel NaV1.5 distribution in myocytes via interacting proteins: the multiple pool model. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 886–894.
- Shyng, S. L., and Nichols, C. G. (1998). Membrane phospholipid control of nucleotide sensitivity of KATP channels. *Science* 282, 1138–1141.
- Silva, J., and Rudy, Y. (2005). Subunit interaction determines IKs participation in cardiac repolarization and repolarization reserve. *Circulation* 112, 1384–1391.
- Smallwood, P. M., Munoz-Sanjuan, I., Tong, P., Macke, J. P., Hendry, S. H., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Nathans, J. (1996). Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors: new members of the FGF family implicated in nervous system development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 9850–9857.
- Smith, J. A., Vanoye, C. G., George, A. L., Meiler, J., and Sanders, C. R. (2007). Structural models for the KCNQ1 voltage-gated potassium channel. *Biochemistry* 46, 14141–14152.
- Smith, M. R., and Goldin, A. L. (1997). Interaction between the sodium channel inactivation linker and domain III S4-S5. *Biophysj* 73, 1885–1895.
- Smits, J. P. P., Koopmann, T. T., Wilders, R., Veldkamp, M. W., Opthof, T., Bhuiyan, Z. A., Mannens, M. M. A. M., Balser, J. R., Tan, H. L., Bezzina, C. R., et al. (2005). A mutation in the human cardiac sodium channel (E161K) contributes to sick sinus syndrome, conduction disease and Brugada syndrome in two families. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 38, 969–981.
- Songyang, Z., Lu, K. P., Kwon, Y. T., Tsai, L. H., Filhol, O., Cochet, C., Brickey, D. A., Soderling, T. R., Bartleson, C., Graves, D. J., et al. (1996). A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: primary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, CDK5, and Erk1. *Mol. Cell. Biol.* 16, 6486–6493.
- Spencer, C. I., Yuill, K. H., Borg, J. J., Hancox, J. C., and Kozlowski, R. Z. (2001). Actions of pyrethroid insecticides on sodium currents, action potentials, and contractile rhythm in isolated mammalian ventricular myocytes and perfused hearts. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298, 1067–1082.
- Splawski, I., Timothy, K. W., Sharpe, L. M., Decher, N., Kumar, P., Bloise, R., Napolitano, C., Schwartz, P. J., Joseph, R. M., Condouris, K., et al. (2004). Ca_v1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell* 119, 19–31.
- Strutz-Seebohm, N., Pusch, M., Wolf, S., Stoll, R., Tapken, D., Gerwert, K., Attali, B., and Seebohm, G. (2011). Structural basis of slow activation gating in the cardiac I_{Ks} channel complex. *Cell. Physiol. Biochem.* 27, 443–452.
- Stühmer, W., Conti, F., Suzuki, H., Wang, X. D., Noda, M., Yahagi, N., Kubo, H., and Numa, S. (1989).

- Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* 339, 597–603.
- Suh, B.-C., and Hille, B. (2007). Electrostatic interaction of internal Mg^{2+} with membrane PIP₂ Seen with KCNQ K⁺ channels. *J. Gen. Physiol.* 130, 241–256.
- Suh, B.-C., and Hille, B. (2008). PIP₂ is a necessary cofactor for ion channel function: how and why? *Annu Rev Biophys* 37, 175–195.
- Takahashi, M. P., Kimura, T., Yanagihara, T., and Sakoda, S. (1999). Calcium increase in mouse skeletal muscles by triparanol: a drug to induce myotonic dystrophy-like clinical manifestations. *Neurosci. Lett.* 272, 87–90.
- Tan, H. L., Bink-Boelkens, M. T., Bezzina, C. R., Viswanathan, P. C., Beaufort-Krol, G. C., van Tintelen, P. J., van Den Berg, M. P., Wilde, A. A., and Balser, J. R. (2001). A sodium-channel mutation causes isolated cardiac conduction disease. *Nature* 409, 1043–1047.
- Tan, H. L., Kupersmidt, S., Zhang, R., Stepanovic, S., Roden, D. M., Wilde, A. A. M., Anderson, M. E., and Balser, J. R. (2002). A calcium sensor in the sodium channel modulates cardiac excitability. *Nature* 415, 442–447.
- Taniguchi, T., Uesugi, M., Arai, T., Yoshinaga, T., Miyamoto, N., and Sawada, K. (2012). Chronic Probucol Treatment Decreases the Slow Component of the Delayed-Rectifier Potassium Current in CHO Cells Transfected With KCNQ1 and KCNE1. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 59, 377–386.
- Terrenoire, C., Houslay, M. D., Baillie, G. S., and Kass, R. S. (2009). The cardiac IKs potassium channel macromolecular complex includes the phosphodiesterase PDE4D3. *Journal of Biological Chemistry* 284, 9140–9146.
- Thomas, A. M., Harmer, S. C., Khambra, T., and Tinker, A. (2011). Characterization of a binding site for anionic phospholipids on KCNQ1. *J. Biol. Chem.* 286, 2088–2100.
- Todt, H., Dudley, S. C., Kyle, J. W., French, R. J., and Fozzard, H. A. (1999). Ultra-slow inactivation in $\mu 1$ Na⁺ channels is produced by a structural rearrangement of the outer vestibule. *Biophysj* 76, 1335–1345.
- Tombola, F., Pathak, M. M., and Isacoff, E. Y. (2006). How does voltage open an ion channel? *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 23–52.
- Tristani-Firouzi, M., Chen, J., and Sanguinetti, M. C. (2002). Interactions between S4-S5 linker and S6 transmembrane domain modulate gating of HERG K⁺ channels. *Journal of Biological Chemistry* 277, 18994–19000.
- Ueda, K., Valdivia, C., Medeiros-Domingo, A., Tester, D. J., Vatta, M., Farrugia, G., Ackerman, M. J., and Makielski, J. C. (2008). Syntrophin mutation associated with long QT syndrome through activation of the nNOS-SCN5A macromolecular complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 9355–9360.
- Ufret-Vincenty, C. A., Baro, D. J., Lederer, W. J., Rockman, H. A., Quinones, L. E., and Santana, L. F. (2001). Role of sodium channel deglycosylation in the genesis of cardiac arrhythmias in heart failure. *Journal of Biological Chemistry* 276, 28197–28203.
- Undrovinas, A. I., Maltsev, V. A., and Sabbah, H. N. (1999). Repolarization abnormalities in cardiomyocytes of dogs with chronic heart failure: role of sustained inward current. *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 494–505.

- Unsöld, B., Kerst, G., Brousos, H., Hübner, M., Schreiber, R., Nitschke, R., Greger, R., and Bleich, M. (2000). KCNE1 reverses the response of the human K⁺ channel KCNQ1 to cytosolic pH changes and alters its pharmacology and sensitivity to temperature. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 441, 368–378.
- Valdivia, C. R., Chu, W. W., Pu, J., Foell, J. D., Haworth, R. A., Wolff, M. R., Kamp, T. J., and Makielski, J. C. (2005). Increased late sodium current in myocytes from a canine heart failure model and from failing human heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 38, 475–483.
- Valdivia, C. R., Tester, D. J., Rok, B. A., Porter, C.-B. J., Munger, T. M., Jahangir, A., Makielski, J. C., and Ackerman, M. J. (2004). A trafficking defective, Brugada syndrome-causing SCN5A mutation rescued by drugs. *Cardiovascular Research* 62, 53–62.
- Valdivia, C. R., Ueda, K., Ackerman, M. J., and Makielski, J. C. (2009). GPD1L links redox state to cardiac excitability by PKC-dependent phosphorylation of the sodium channel SCN5A. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297, H1446–52.
- van Den Berg, M. P., Wilde, A. A., Viersma TJW, Brouwer, J., Haaksma, J., van Der Hout, A. H., Stolte-Dijkstra, I., Bezzina TCR, van Langen, I. M., Beaufort-Krol, G. C., et al. (2001). Possible bradycardic mode of death and successful pacemaker treatment in a large family with features of long QT syndrome type 3 and Brugada syndrome. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 12, 630–636.
- van der Heyden, M. A. G., Wijnhoven, T. J. M., and Opthof, T. (2005). Molecular aspects of adrenergic modulation of cardiac L-type Ca²⁺ channels. *Cardiovascular Research* 65, 28–39.
- Van Horn, W. D., Vanoye, C. G., and Sanders, C. R. (2011). Working model for the structural basis for KCNE1 modulation of the KCNQ1 potassium channel. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 21, 283–291.
- Van Norstrand, D. W., Valdivia, C. R., Tester, D. J., Ueda, K., London, B., Makielski, J. C., and Ackerman, M. J. (2007). Molecular and functional characterization of novel glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like gene (GPD1-L) mutations in sudden infant death syndrome. *Circulation* 116, 2253–2259.
- Van Petegem, F., Lobo, P. A., and Ahern, C. A. (2012). Seeing the forest through the trees: towards a unified view on physiological calcium regulation of voltage-gated sodium channels. *Biophys. J.* 103, 2243–2251.
- van Swieten, J. C., Brussee, E., de Graaf, B. M., Krieger, E., van de Graaf, R., de Koning, I., Maat-Kievit, A., Leegwater, P., Dooijes, D., Oostra, B. A., et al. (2003). A mutation in the fibroblast growth factor 14 gene is associated with autosomal dominant cerebellar ataxia [corrected]. *Am. J. Hum. Genet.* 72, 191–199.
- Van Wagoner, D. R., Kirian, M., and Lamorgese, M. (1996). Phenylephrine suppresses outward K⁺ currents in rat atrial myocytes. *Am. J. Physiol.* 271, H937–46.
- Varro, A., Baláti, B., Istó, N., Takács, J., Virág, L., Lathrop, D. A., Csaba, L., Tólosi, L., and Papp, J. G. (2000). The role of the delayed rectifier component IKs in dog ventricular muscle and Purkinje fibre repolarization. *The Journal of Physiology* 523 Pt 1, 67–81.
- Vassilev, P. M., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (1988). Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. *Science* 241, 1658–1661.
- Vassilev, P., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (1989). Inhibition of inactivation of single sodium channels by a site-directed antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 8147–8151.
- Vatta, M., Ackerman, M. J., Ye, B., Makielski, J. C., Ughanze, E. E., Taylor, E. W., Tester, D. J., Balijepalli,

- R. C., Foell, J. D., Li, Z., et al. (2006). Mutant caveolin-3 induces persistent late sodium current and is associated with long-QT syndrome. *Circulation* 114, 2104–2112.
- Veldkamp, M. W., Viswanathan, P. C., Bezzina, C., Baartscheer, A., Wilde, A. A., and Balser, J. R. (2000). Two distinct congenital arrhythmias evoked by a multidysfunctional Na(+) channel. *Circulation Research* 86, E91–7.
- Verkerk, A. O., Wilders, R., Schulze-Bahr, E., Beekman, L., Bhuiyan, Z. A., Bertrand, J., Eckardt, L., Lin, D., Borggreffe, M., Breithardt, G., et al. (2005). Role of sequence variations in the human ether-a-go-go-related gene (HERG, KCNH2) in the Brugada syndrome. *Cardiovascular Research* 68, 441–453.
- Vilin, Y. Y., Makita, N., George, A. L., and Ruben, P. C. (1999). Structural determinants of slow inactivation in human cardiac and skeletal muscle sodium channels. *Biophysj* 77, 1384–1393.
- Wagner, S., Dybkova, N., Rasenack, E. C. L., Jacobshagen, C., Fabritz, L., Kirchhof, P., Maier, S. K. G., Zhang, T., Hasenfuss, G., Brown, J. H., et al. (2006). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na⁺ channels. *J. Clin. Invest.* 116, 3127–3138.
- Waldegger, S., Barth, P., Raber, G., and Lang, F. (1997). Cloning and characterization of a putative human serine/threonine protein kinase transcriptionally modified during anisotonic and isotonic alterations of cell volume. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 4440–4445.
- Walsh, K. B., and Kass, R. S. (1991). Distinct voltage-dependent regulation of a heart-delayed IK by protein kinases A and C. *Am. J. Physiol.* 261, C1081–90.
- Walsh, K. B., and Kass, R. S. (1988). Regulation of a heart potassium channel by protein kinase A and C. *Science* 242, 67–69.
- Wang, C., Ben C Chung, Yan, H., Lee, S.-Y., and Pitt, G. S. (2012). Crystal Structure of the Ternary Complex of a NaV C-Terminal Domain, a Fibroblast Growth Factor Homologous Factor, and Calmodulin. *Structure/Folding and Design* 20, 1167–1176.
- Wang, C., Hennessey, J. A., Kirkton, R. D., Wang, C., Graham, V., Puranam, R. S., Rosenberg, P. B., Bursac, N., and Pitt, G. S. (2011a). Fibroblast Growth Factor Homologous Factor 13 Regulates Na⁺ Channels and Conduction Velocity in Murine Hearts. *Circulation Research* 109, 775–782.
- Wang, C., Hoch, E. G., and Pitt, G. S. (2011b). Identification of Novel Interaction Sites that Determine Specificity between Fibroblast Growth Factor Homologous Factors and Voltage-gated Sodium Channels. *Journal of Biological Chemistry* 286, 24253–24263.
- Wang, D. W., Yazawa, K., George, A. L., and Bennett, P. B. (1996a). Characterization of human cardiac Na⁺ channel mutations in the congenital long QT syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 13200–13205.
- Wang, K. W., and Goldstein, S. A. (1995). Subunit composition of minK potassium channels. *Neuron* 14, 1303–1309.
- Wang, Q., Bardgett, M. E., Wong, M., Wozniak, D. F., Lou, J., McNeil, B. D., Chen, C., Nardi, A., Reid, D. C., Yamada, K., et al. (2002). Ataxia and paroxysmal dyskinesia in mice lacking axonally transported FGF14. *Neuron* 35, 25–38.
- 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., et al. (1996b). Positional cloning of a novel potassium channel gene:

- KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat. Genet.* 12, 17–23.
- Wang, Q., Li, Z., Shen, J., and Keating, M. T. (1996c). Genomic organization of the human SCN5A gene encoding the cardiac sodium channel. *Genomics* 34, 9–16.
- 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, Y., and Hill, J. A. (2010). Electrophysiological remodeling in heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 48, 619–632.
- Wang, Y., Wagner, M. B., Kumar, R., Cheng, J., and Joyner, R. W. (2003). Inhibition of fast sodium current in rabbit ventricular myocytes by protein tyrosine kinase inhibitors. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 446, 485–491.
- Watanabe, H., Darbar, D., Kaiser, D. W., Jiramongkolchai, K., Chopra, S., Donahue, B. S., Kannankeril, P. J., and Roden, D. M. (2009). Mutations in sodium channel $\beta 1$ - and $\beta 2$ -subunits associated with atrial fibrillation. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 2, 268–275.
- Watanabe, H., Koopmann, T. T., Le Scouarnec, S., Yang, T., Ingram, C. R., Schott, J.-J., Demolombe, S., Probst, V., Anselme, F., Escande, D., et al. (2008). Sodium channel $\beta 1$ subunit mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans. *J. Clin. Invest.* 118, 2260–2268.
- Watson, C. L., and Gold, M. R. (1997). Modulation of Na⁺ current inactivation by stimulation of protein kinase C in cardiac cells. *Circulation Research* 81, 380–386.
- Webster, M. K., Goya, L., and Firestone, G. L. (1993a). Immediate-early transcriptional regulation and rapid mRNA turnover of a putative serine/threonine protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* 268, 11482–11485.
- Webster, M. K., Goya, L., Ge, Y., Maiyar, A. C., and Firestone, G. L. (1993b). Characterization of sgk, a novel member of the serine/threonine protein kinase gene family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum. *Mol. Cell. Biol.* 13, 2031–2040.
- Wedekind, H., Smits, J. P., Schulze-Bahr, E., Arnold, R., Veldkamp, M. W., Bajanowski, T., Borggrefe, M., Brinkmann, B., Warnecke, I., Funke, H., et al. (2001). De novo mutation in the SCN5A gene associated with early onset of sudden infant death. *Circulation* 104, 1158–1164.
- Werry, D., Eldstrom, J., Wang, Z., and Fedida, D. (2013). Single-channel basis for the slow activation of the repolarizing cardiac potassium current, I(Ks). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, E996–1005.
- West, J. W., Patton, D. E., Scheuer, T., Wang, Y., Goldin, A. L., and Catterall, W. A. (1992). A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na⁽⁺⁾-channel inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 10910–10914.
- Whorton, M. R., and MacKinnon, R. (2011). Crystal Structure of the Mammalian GIRK2 K⁺ Channel and Gating Regulation by G Proteins, PIP2, and Sodium. *Cell* 147, 199–208.
- Wiener, R., Haitin, Y., Shamgar, L., Fernández-Alonso, M. C., Martos, A., Chomsky-Hecht, O., Rivas, G., Attali, B., and Hirsch, J. A. (2008). The KCNQ1 (Kv7.1) COOH terminus, a multitiered scaffold for subunit assembly and protein interaction. *Journal of Biological Chemistry* 283, 5815–5830.

- Wilde, A. A. M., and Brugada, R. (2011). Phenotypical manifestations of mutations in the genes encoding subunits of the cardiac sodium channel. *Circulation Research* 108, 884–897.
- Wingo, T. L., Shah, V. N., Anderson, M. E., Lybrand, T. P., Chazin, W. J., and Balser, J. R. (2004). An EF-hand in the sodium channel couples intracellular calcium to cardiac excitability. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 219–225.
- Wittmack, E. K. (2004). Fibroblast Growth Factor Homologous Factor 2B: Association with Nav1.6 and Selective Colocalization at Nodes of Ranvier of Dorsal Root Axons. *Journal of Neuroscience* 24, 6765–6775.
- Wu, D., Delaloye, K., Zaydman, M. A., Nekouzadeh, A., Rudy, Y., and Cui, J. (2010a). State-dependent electrostatic interactions of S4 arginines with E1 in S2 during Kv7.1 activation. *J. Gen. Physiol.* 135, 595–606.
- Wu, D., Pan, H., Delaloye, K., and Cui, J. (2010b). KCNE1 remodels the voltage sensor of Kv7.1 to modulate channel function. *Biophys. J.* 99, 3599–3608.
- Wu, G., Ai, T., Kim, J. J., Mohapatra, B., Xi, Y., Li, Z., Abbasi, S., Purevjav, E., Samani, K., Ackerman, M. J., et al. (2008). alpha-1-syntrophin mutation and the long-QT syndrome: a disease of sodium channel disruption. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 1, 193–201.
- Xia, F., Gao, X., Kwan, E., Lam, P. P. L., Chan, L., Sy, K., Sheu, L., Wheeler, M. B., Gaisano, H. Y., and Tsushima, R. G. (2004). Disruption of pancreatic beta-cell lipid rafts modifies Kv2.1 channel gating and insulin exocytosis. *Journal of Biological Chemistry* 279, 24685–24691.
- Xiao, G. Q., Qu, Y., Sun, Z. Q., Mochly-Rosen, D., and Boutjdir, M. (2001). Evidence for functional role of epsilonPKC isozyme in the regulation of cardiac Na(+) channels. *AJP: Cell Physiology* 281, C1477–86.
- Yang, Y., and Sigworth, F. J. (1998). Single-channel properties of IKs potassium channels. *J. Gen. Physiol.* 112, 665–678.
- Yang, Y., Xia, M., Jin, Q., Bendahhou, S., Shi, J., Chen, Y., Liang, B., Lin, J., Liu, Y., Liu, B., et al. (2004). Identification of a KCNE2 gain-of-function mutation in patients with familial atrial fibrillation. *Am. J. Hum. Genet.* 75, 899–905.
- Yang, Y., Yang, Y., Liang, B., Liu, J., Li, J., Grunnet, M., Olesen, S.-P., Rasmussen, H. B., Ellinor, P. T., Gao, L., et al. (2010). Identification of a Kir3.4 mutation in congenital long QT syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 86, 872–880.
- Yarov-Yarovoy, V., McPhee, J. C., Idsvoog, D., Pate, C., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (2002). Role of amino acid residues in transmembrane segments IS6 and IIS6 of the Na⁺ channel alpha subunit in voltage-dependent gating and drug block. *Journal of Biological Chemistry* 277, 35393–35401.
- Young, K. A., and Caldwell, J. H. (2005). Modulation of skeletal and cardiac voltage-gated sodium channels by calmodulin. *The Journal of Physiology* 565, 349–370.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* 277, 28545–28553.
- Zareba, W., Sattari, M. N., Rosero, S., Couderc, J. P., and Moss, A. J. (2001). Altered atrial, atrioventricular, and ventricular conduction in patients with the long QT syndrome caused by the

DeltaKPQ SCN5A sodium channel gene mutation. *Am. J. Cardiol.* 88, 1311–1314.

Zaydman, M. A., Silva, J. R., Delaloye, K., Li, Y., Liang, H., Larsson, H. P., Shi, J., and Cui, J. (2013). Kv7.1 ion channels require a lipid to couple voltage sensing to pore opening. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 13180–13185.

Zaza, A., and Rocchetti, M. (2013). The late Na⁺ current--origin and pathophysiological relevance. *Cardiovasc Drugs Ther* 27, 61–68.

Zaza, A., Belardinelli, L., and Shryock, J. C. (2008). Pathophysiology and pharmacology of the cardiac "late sodium current.". *Pharmacol. Ther.* 119, 326–339.

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

Zhou, J., Yi, J., Hu, N., George, A. L., and Murray, K. T. (2000). Activation of protein kinase A modulates trafficking of the human cardiac sodium channel in *Xenopus* oocytes. *Circulation Research* 87, 33–38.

Zicha, S., Maltsev, V. A., Nattel, S., Sabbah, H. N., and Undrovinas, A. I. (2004). Post-transcriptional alterations in the expression of cardiac Na⁺ channel subunits in chronic heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 37, 91–100.

Zidovetzki, R., and Levitan, I. (2007). Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 1311–1324.

Zimmer, T., and Surber, R. (2008). SCN5A channelopathies--an update on mutations and mechanisms. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 98, 120–136.

Zimmer, T., Biskup, C., Dugarmaa, S., Vogel, F., Steinbis, M., Böhle, T., Wu, Y. S., Dumaine, R., and Benndorf, K. (2002). Functional expression of GFP-linked human heart sodium channel (hH1) and subcellular localization of the α subunit in HEK293 cells and dog cardiac myocytes. *J. Membr. Biol.* 186, 1–12.



Opposite effects of the S4–S5 linker and PIP₂ on voltage-gated channel function: KCNQ1/KCNE1 and other channels

Frank S. Choveau^{1,2,3†}, Fayal Abderemane-Ali^{1,2,3}, Fabien C. Coyan^{1,2,3}, Zeineb Es-Salah-Lamoureux^{1,2,3}, Isabelle Baró^{1,2,3} and Gildas Loussouarn^{1,2,3*}

¹ UMR 1087, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Nantes, France

² UMR 6291, Centre National de la Recherche Scientifique, Nantes, France

³ L'Institut du Thorax, L'UNAM Université, Université de Nantes, Nantes, France

Edited by:

Mounir Tarek, Centre National de la Recherche Scientifique, France

Reviewed by:

Nikita Gamper, University of Leeds, UK

David A. Brown, University College London, UK

*Correspondence:

Gildas Loussouarn, L'Institut du Thorax, UMR 1087/CNRS UMR 6291, IRT-UN, 8 Quai Moncousu, BP 70721, 44007 Nantes Cedex 1, France.
e-mail: gildas.loussouarn@univ-nantes.fr

†Present address:

Frank S. Choveau, UTHSCSA, San Antonio, TX, USA.

Voltage-gated potassium (Kv) channels are tetramers, each subunit presenting six transmembrane segments (S1–S6), with each S1–S4 segments forming a voltage-sensing domain (VSD) and the four S5–S6 forming both the conduction pathway and its gate. S4 segments control the opening of the intracellular activation gate in response to changes in membrane potential. Crystal structures of several voltage-gated ion channels in combination with biophysical and mutagenesis studies highlighted the critical role of the S4–S5 linker (S4S5_L) and of the S6 C-terminal part (S6_T) in the coupling between the VSD and the activation gate. Several mechanisms have been proposed to describe the coupling at a molecular scale. This review summarizes the mechanisms suggested for various voltage-gated ion channels, including a mechanism that we described for KCNQ1, in which S4S5_L is acting like a ligand binding to S6_T to stabilize the channel in a closed state. As discussed in this review, this mechanism may explain the reverse response to depolarization in HCN-like channels. As opposed to S4S5_L, the phosphoinositide, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂), stabilizes KCNQ1 channel in an open state. Many other ion channels (not only voltage-gated) require PIP₂ to function properly, confirming its crucial importance as an ion channel cofactor. This is highlighted in cases in which an altered regulation of ion channels by PIP₂ leads to channelopathies, as observed for KCNQ1. This review summarizes the state of the art on the two regulatory mechanisms that are critical for KCNQ1 and other voltage-gated channels function (PIP₂ and S4S5_L), and assesses their potential physiological and pathophysiological roles.

Keywords: voltage-gated potassium channels, S4–S5 linker, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, patch-clamp, channelopathies

PART 1: ROLE OF THE S4–S5 LINKER IN CHANNEL VOLTAGE DEPENDENCY

Voltage-gated ion channels are all designed according to a common pattern including six transmembrane segments (S1–S6), with S1–S4 forming the voltage-sensing domain (VSD), in which the positively charged S4 is the voltage sensor *per se*, and S5–S6 forming the pore. The N- and C-termini are cytosolic. Whereas voltage-gated K⁺ channels are tetrameric assemblies of identical or homologous subunits, eukaryotic Ca²⁺ and Na⁺ voltage-gated channels are the result of the fusion of four subunits.

If a general consensus started to emerge on the nature and the (nano-)metrics of the movement of the voltage sensor in voltage-gated channels, it is still not the case for the nature of the coupling between the voltage sensor movement and the gate opening. In this first part, we review most of the results obtained through various experimental approaches on various channels, that can give insights on the nature of the coupling, and we try to classify this coupling into two categories: a strong or a labile coupling between the main actors, namely, the S4–S5 linker (referred here as S4S5_L) and the C-terminal part of the S6 transmembrane segment (S6_T).

HOW DOES THE VOLTAGE SENSOR REGULATE PORE GATING?

Movement of the voltage sensor

The ability of K_v channels to sense the membrane potential is conferred via the VSD. The S4 segment moves across the plasma membrane in response to changes in membrane potential, allowing the transition of the channel between a closed conformation and an open conformation. Many studies have investigated the nature of the S4 movement, and came up with three different models, with major differences in this movement.

* According to the crystal structure of KvAP, S4 coupled to S3 form a helical hairpin, or “paddle,” moving 15–20 Å across the lipid bilayer, as confirmed by avidin accessibility to different-length tethered biotin reagents (Jiang et al., 2003; Ruta et al., 2005). However, a number of lines of evidence suggest that the KvAP structure does not correspond to a native conformation, such as the fact that the VSD is in a resting state and in contrast, the pore is in the open state. This non-native state is potentially due to the use of monoclonal antibody fragments in order

to stabilize the structure, but more likely due to the absence of membrane lipids (Lee et al., 2005).

* The “transporter” model, described in Shaker, involves a very small movement of S4 (2–3 Å) from a crevice in contact with the intracellular solution to another one in contact with the extracellular solution (Cha et al., 1999; Chanda et al., 2005).

* Finally, the helical screw model (Guy and Seetharamulu, 1986) and the similar sliding helix model (Catterall, 1986), originally proposed for sodium channels, have been then adapted to K_v channels (Durell and Guy, 1992). These models suggest that S4 rotates ~180°, and at the same time, translates ~13.5 Å along its axis (reviewed in Börjesson and Elinder, 2008). Strikingly, “embryonic” paddle and helical screw models were predicted as early as 1981 (Figures 2 and 9 of Armstrong, 1981).

The variety of these models, and the fact that they predict a magnitude of the S4 movement across the membrane ranging from 2 Å (Cha et al., 1999) to ~15 Å in Shaker (Larsson et al., 1996), most probably come from the variety of the techniques employed. Some of the techniques (such as FRET) underestimate the distances by capturing rare conformations when the donor and acceptor are nearby. On the contrary, cross-linking or tethered biotin may overestimate distances by capturing and covalently stabilizing rare and extreme conformations in which a cysteine is accessible intracellularly or extracellularly (Tombola et al., 2006).

A structural model of Shaker, based on the crystal structure of Kv1.2, predicts an axial rotation and a translation of S4 (Yarov-Yarovoy et al., 2006) as described in the “helical screw” model. In addition, a subsequent tilting motion of the S4 is also suggested. Very recently, disulfide-locking experiments and structural models of resting and activated state of the VSD in a sodium channel, NaChBac, propose an outward movement (~6–8 Å) of S4 relative to S1, S2, and S3 and a rotation (~30°) of the S4 coupled to a tilting motion relative to the S4S5_L (Yarov-Yarovoy et al., 2012). Studies of these different channels support the idea that a common S4 movement may be applied to various channels, including KCNQ channels. The next step will be to solve the crystal structure of KCNQ channels, in an attempt to gain insights on the structural conformation corresponding to gating of these channels. Presently, homology models (Smith et al., 2007) and molecular dynamics are valuable templates to better understand the physiological and pathophysiological mechanisms of voltage dependency (Delemotte et al., 2011).

Coupling between the voltage sensor and the gate: S4S5_L and S6_T play a major role

The S4S5_L interacts with S6_T in many voltage-gated channels.

Which part of the channel links the voltage sensor movement to the gate opening? The physical interaction between S4S5_L and S6_T and the role of this interaction in translating the voltage sensor movement to the gate opening have been investigated in many voltage-gated channels by diverse techniques. The results obtained will be detailed below and in other reviews of the present Frontiers Research Topic, but it is important to note that many works stress the major role of this S4S5_L–S6_T interaction. Mutagenesis associated to functional studies using chimeras of Shaker and KcsA (Lu et al., 2001, 2002), alanine-scanning of S4S5_L and S6_T

in Kv4.2 (Barghaan and Bähring, 2009), cross-linking studies of S4S5_L and S6_T in human ether-a-go-go related gene (hERG; Ferrer et al., 2006), but also in the hyperpolarization-activated channel, spHCN1 (Prole and Yellen, 2006), all converge to the notion that S4S5_L and S6_T play a major role in the coupling between the voltage sensor and the S6_T. This is further confirmed by the crystal structures of K_v and Na_v channels, which show that the distance between S4S5_L and S6_T fits with the hypothesis that these regions contact each other (Long et al., 2005; Payandeh et al., 2011).

These studies strongly indicate that the VSD-activation and gate coupling are associated through the S4S5_L–S6_T interaction. However, many questions remain to be elucidated. Are other regions of channels involved in this coupling? How exactly does this S4S5_L–S6_T interaction make the link between VSD-activation and gate coupling?

The N-terminus and the S1 segment are also involved in the VSD-pore coupling.

In addition to S4S5_L and S6_T interaction, other regions influence voltage-dependent channel activity. One of those regions is the N-terminus (Nter). In many signaling proteins, a PAS domain is present where it functions as a signal sensor and its name comes from the transcription factors in which it was first identified: period circadian protein (Per), aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein (Arnt), and single-minded protein (Sim). The PAS domain is also present in the N-terminus of three K_v channel families, Kv10, Kv11, and Kv12. An interaction between the PAS domain and S4S5_L has been postulated as underlying the slow deactivation process of hERG channels (Wang et al., 1998a; Chen et al., 1999). Long QT syndrome (LQT) is a cardiac disease characterized by prolonged ventricular repolarization, arrhythmias, and sudden death. In some LQT patients, a disruption of the presumed interaction between the PAS domain and S4S5_L would result in an acceleration of the deactivation rate, leading to a decrease in this critical repolarizing current (Chen et al., 1999). Alonso-Ron et al. (2008) showed that channels lacking Nter domain or bearing mutations in S4S5_L exhibited similar slowed deactivation and positive shift in the voltage dependence of activation, supporting the hypothesis of an interaction between these two regions. However, no experiment has unequivocally demonstrated a direct Nter–S4S5_L interaction although a recent study has demonstrated a close proximity between Nter and S4S5_L in hERG (de la Peña et al., 2011). To highlight such interaction, the authors introduced cysteines in the PAS domain and in the S4S5_L and then tested the effects of applying an oxidizing agent, *tert*-butyl hydroperoxide (TbHO₂), on channels expressing those cysteines. Formation of disulfide bonds, induced by TbHO₂, between cysteines introduced in Nter and S4S5_L, dramatically decreases the tail current. This effect is completely reversed by dithiothreitol, a reducing agent. Taken together, these data indicate that Nter can bind to S4S5_L, stabilizing the channel in the closed state. A more exhaustive review on the role of cytoplasmic domains (CTD) in voltage-gated potassium channels gating is available in another article of this Frontiers Research topic (Barros et al., 2012).

The coupling between the VSD and the pore may also occur through interactions between transmembrane domains (TMD). Cross-linking studies in Shaker channel showed the proximity between the S4 and S5 segments, and suggested that interactions

may be involved in the coupling between the VSD and the pore (Broomand et al., 2003; Gandhi et al., 2003). Also, statistical analysis of K_v channels sequences and mutagenesis studies suggest that an interface between the S1 domain and the pore helix, both highly conserved in K_v channels, is required for this coupling as well (Lee et al., 2009). Indeed, a tryptophan scanning of residues forming the interaction surface between S1 and the pore helix in Shaker has shown that mutations of those residues affect channels function. Finally, formation of a disulfide bond, forcing the S1-pore helix interaction, leads to an alteration of gating.

In summary, a network of interactions, including Nter, S1, S4S5_L, and S6_T, seems to be involved in the coupling between VSD and the pore.

INTERACTION BETWEEN S4S5_L AND S6_T: TWO MODELS

Model 1: Mechanical lever model (Figure 1A)

Shaker. The Shaker gene from *Drosophila melanogaster* was the first potassium channel to be cloned (Tempel et al., 1987), contributing to the identification of a family of homologous channels in vertebrates (the K_v superfamily) and to the understanding of the role of K_v channels in human diseases. This channel is one of the most extensively studied voltage-activated ion channels and often serves as a model in the study of voltage dependency. In this tetrameric voltage-gated K⁺ channel, the four VSDs are covalently connected to the S5 segments of the pore region by the S4–S5 linkers, as mentioned above. Kinetic models predicted that the gating mechanism of this channel involves several relatively independent movements of the four VSDs between resting and activated states, followed by a concerted opening transition where the S6 gate moves from a closed to an open state (Bezanilla et al., 1994; Hoshi et al., 1994; Stefani et al., 1994; Zagotta et al., 1994a,b). This model was further confirmed by using a triplet of mutations in the S4 that make the final concerted step rate limiting in the activation pathway, thus rendering it more detectable (Ledwell and Aldrich, 1999).

In an elegant work using chimeras in which Shaker pore module is replaced by the one of KcsA channel (Lu et al., 2001, 2002), Lu and co-workers showed that S4S5_L and S6_T play a key role in voltage dependency. Incomplete channel closures in Shaker-KcsA chimeras with modified S4S5_L and S6_T suggest that these regions interact in the closed state (Lu et al., 2002). Assuming that the voltage sensors S4 are coupled to the gate in Shaker channels via an obligatory (one S4 in the down state is enough to keep the channel closed) rather than an allosteric mechanism, they proposed a mechanical lever model in which S4S5_L are pushing the S6 gate in a closed conformation at negative voltages. The crystal structure corresponding to the open state of the related vertebrate Kv1.2 (below) is consistent with this mechanism in which all the S4 segments have to be in an “up” state to allow pore opening.

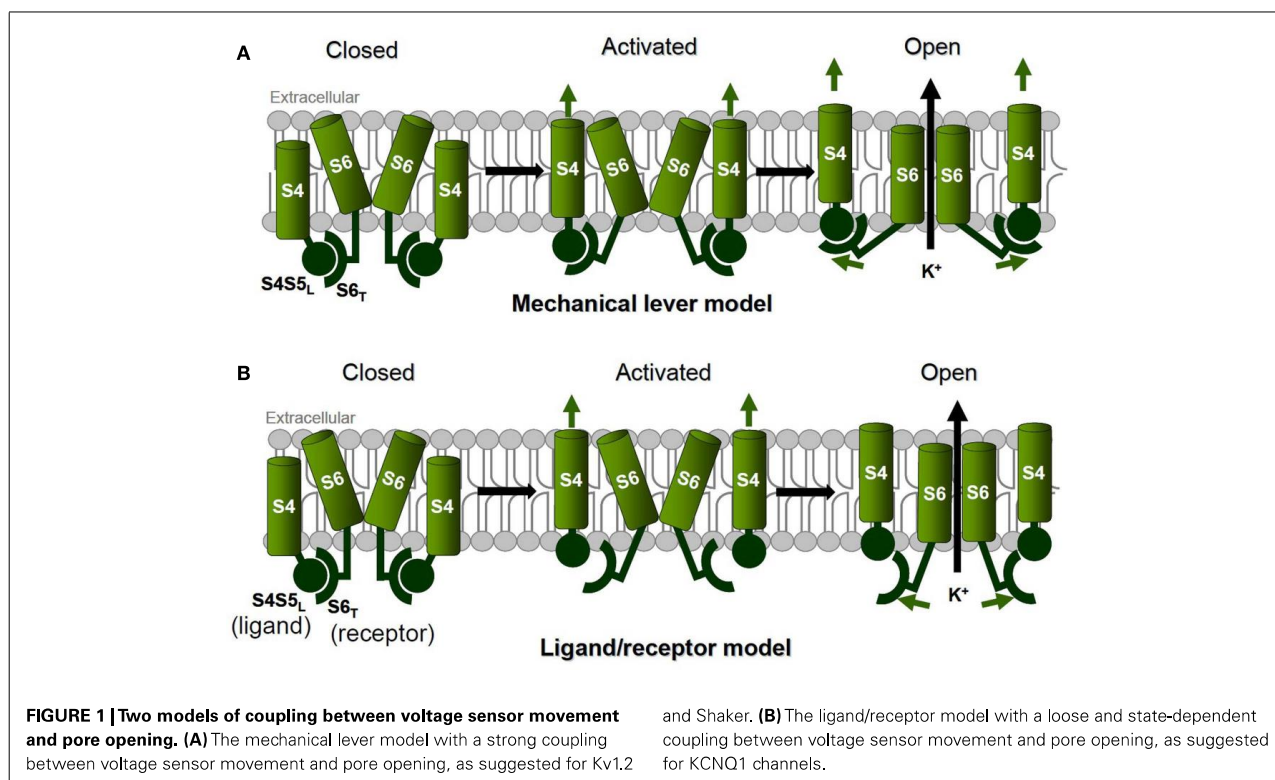
In other functional studies, Shaker mutations in S4S5_L and S6_T were shown to have a dramatic effect on the slow component of the off-gating current. Together with the fact that closing the gate impacts on gating charge return, this has been interpreted as the S4S5_L and S6_T interaction allosterically keeping S4 in the “up” position and stabilizing the open state (Batulan et al., 2010). The same group identified other Shaker mutations in S4S5_L and S6_T that completely uncouple S4 movement from pore opening. They

used the mutations to show that the pore domain exerts a mechanical load onto the voltage sensors. Indeed, these mutations lead the voltage sensors to be activated at more negative potentials (they are more free to move), and relieve the mode shift of the voltage sensor, that they interpret as a stabilization of the open state directly impacting the S4 movement (Haddad and Blunck, 2011).

Altogether, these data support both the specificity and the strength of interaction between S4S5_L and S6_T, consistent with the mechanical lever mechanism, but in a more complex manner, with potentially state-dependent S4S5_L and S6_T interactions stabilizing the closed (Lu et al., 2002) and the open (Batulan et al., 2010) states. Of note, the critical role of S4S5_L and S6_T interaction in channel open state stabilization has been recently illustrated using high speed molecular dynamics simulation (Jensen et al., 2012). Altogether these data, suggest a mechanism more complex than a pure electromechanical coupling.

Kv1.2. The Kv1.2 channel is a Shaker-like voltage-gated potassium channel expressed in mammalian neurons and involved in the regulation of pre- and post-synaptic membrane excitability. The interaction between the S4–S5 linker and the S6 segment was observed in the crystal structure of Kv1.2 in the open state (Long et al., 2005), confirming the electromechanical coupling between the voltage sensor movement and the pore, as suggested previously by Lu and co-workers in Shaker channels. The S4 were suggested to perform mechanical work on the pore of Kv1.2 through the S4–S5 linkers, which are positioned to constrict or dilate the S6 inner helices of the pore (Long et al., 2005). A prediction of the channel closed state was built based on the hypothesis of a permanent coupling. In this configuration where the S6 helix is presented as a “receptor” of S4–S5 linker, it is easy to understand why its sequence on K_v channels is quite conserved: Pro-X-Pro, where X is any amino-acid (Shaker-like K_v channels), or Gly (other K_v channels) in the corresponding region. This structure allows bending of the S6 helix in order to form the correct interaction with the S4–S5 linker helix. However, the absence of a structure of K_v channels in the closed state prevents from determining the exact molecular nature of the voltage-dependent gate closure. Moreover, the structure of Kv1.2 may not completely correspond to the functional open-activated state, especially for the position of S4 relative to the pore, since this structure is incompatible with the proximity of first S4 arginine R294 and a pore domain residue, A351 (Lewis et al., 2008). Such proximity between R294 and A351 was probed by the generation of a high affinity binding site of Zn²⁺ or Cd²⁺ when the residues were mutated to histidine. As discussed above for cross-linking experiments trying to estimate the S4 position and movement, introduction of the Zn²⁺ or Cd²⁺ high affinity binding site may also capture the channel in a non-native state.

Only the combination of experimental and *in silico* approaches, and the multiplication of channel structures will help understanding the molecular details of the channel voltage dependency. For instance, a recent crystal structure obtained from a prokaryotic voltage-gated sodium channel (structurally similar to eukaryotic voltage-gated K⁺ channels) supports the idea of a transient and quite labile coupling between S4S5_L and the S6_T (Figure 1B). Indeed, we can observe in this structure that the voltage sensors S4 are in their activated position even though the pore is closed



(Payandeh et al., 2011), and this corresponds to a decreased interaction of S4S5_L with S6_T .

Model 2: Ligand/receptor model (Figure 1B)

KCNQ1. It is now admitted that the VSD-pore coupling is mediated by the interaction between S4S5_L and S6_T . Several works on Shaker and Kv1.2 channels (above) suggest that the nature of this interaction is a strong coupling of the pore opening with voltage sensor movement. But in other channels, the interaction between S4S5_L and S6_T may be state-dependent, and leads to stabilization of the channel in the open or closed state. Forcing the interaction between S4S5_L and S6_T seems to stabilize hERG channels in a closed conformation (Ferrer et al., 2006). One interpretation can be that S4S5_L is the equivalent of a ligand, able to bind to S6_T and to stabilize the channel in a closed state. Upon depolarization, S4 drags the S4S5_L ligand away from its receptor, allowing the channel to open (Figure 1B). To test this hypothesis on KCNQ1, we designed peptides identical to S4S5_L (the “ligand”) and S6_T (the “receptor”) based on sequence alignment with Shaker, in which interacting areas in the S4S5_L and the S6_T were suggested (Lu et al., 2001, 2002). KCNQ1 coassembles with the β -subunit KCNE1 to form the channel responsible for the cardiac slowly activating delayed rectifier current, I_{Ks} . In COS-7 cells transfected with the cardiac KCNE1-KCNQ1 channel complex and the S4S5_L or S6_T mimicking peptides, we found that co-expression of S4S5_L peptides (“ligand” or inhibitory peptides) and the channel resulted in a reduction of the voltage-dependent potassium currents. In contrast, S6_T peptides (“receptor” or decoy peptides) up-regulated channels activity, by competing with the endogenous S6_T and

decreasing the inhibitory effect of the endogenous S4S5_L binding to the endogenous S6_T (Choveau et al., 2011). This confirms that S4S5_L can be compared to a ligand that locks channels in the closed state by interacting with its receptor, S6_T . The specificity of the $\text{S4S5}_L/\text{S6}_T$ interaction was confirmed by mutating the partners. Previous mutagenesis studies in KCNQ1 channels identified mutations in S4S5_L (V254A) and in S6_T (L353A) that prevent the channels from closing completely at hyperpolarizing potentials (Boulet et al., 2007; Labro et al., 2011), consistent with a decrease in the $\text{S4S5}_L\text{--S6}_T$ interaction. Based on these results, introduction of V254A in S4S5_L peptide or L353A mutations in S6_T peptide should disrupt the channel-peptide interaction and thus abolish their respective effect on the K^+ current. Mutant peptides have indeed no effect on KCNQ1 function (Choveau et al., 2011). To further demonstrate the specificity of the peptides-KCNQ1 interaction, a couple of mutations were tested both on the peptides and on the channel. In the KCNQ1 channel, introduction of L353A mutation located in S6_T leads to an instantaneous current component, that is abolished by the introduction of V254L mutation located in S4S5_L (Labro et al., 2011). The increased side chain volume induced by V254L substitution is probably compensating for the decreased side chain volume induced by the L353A one. We hypothesized (i) that the incomplete L353A channel closure was due to a low binding affinity of the endogenous WT ligand (S4S5_L) to its L353A mutated S6_T receptor and (ii) a restored binding affinity of the endogenous V254L mutated ligand (S4S5_L) to the mutated S6_T receptor. To confirm this, we showed that the WT S4S5_L peptide has indeed no effect on the L353A KCNQ1 channel, whereas the mutant S4S5_L peptide (V254L) has an effect

on this L353A KCNQ1 channel (Choveau et al., 2011). Altogether, our results are consistent with a ligand/receptor mechanism in which S4S5_L acts as a ligand that binds to its receptor, S6_T, stabilizing the pore in a closed conformation. May this ligand/receptor mechanism be applied to other voltage-gated channels?

Human ether-a-go-go related gene. The hERG encodes the voltage-gated potassium channel underlying the cardiac delayed rectifier current, I_{Kr} , participating in the repolarization phase of cardiac action potential (Curran et al., 1995; Sanguinetti et al., 1995; Trudeau et al., 1995). hERG channel structure is similar to that of Shaker-like voltage-gated channels (Warmke and Ganetzky, 1994), possessing six (S1–S6) TMDs that comprise voltage sensor (S1–S4) and ion conduction pore (S5–S6) region. Despite this similarity, hERG channels behave very differently from Shaker-like channels: hERG activation and deactivation gating kinetics are much slower, whereas inactivation and the recovery from inactivation are rapid and intrinsically voltage-dependent (Smith et al., 1996; Sanguinetti and Tristani-Firouzi, 2006). Similarly to KCNQ1, the proximity between the S4S5_L and S6_T in the closed state was suggested by mutagenesis of these regions (Tristani-Firouzi et al., 2002). Most importantly, introducing cysteines in both S4S5_L and S6_T led to a current decrease in an oxidizing environment, and predominantly at a negative holding potential. This potential-dependent channel locking in the closed state is consistent with the formation of a disulfide bond between the cysteines introduced in S4S5_L and S6_T (Ferrer et al., 2006), and suggest that S4S5_L binding to S6_T locks the channel closed. This is in accordance with the ligand-receptor model underlying the voltage dependency of hERG channel activity. In the WT channel, interaction between S4S5_L and S6_T occurs via specific amino-acids since a point mutation (D540K) located in S4S5_L (Sanguinetti and Xu, 1999) fundamentally alters the gating properties of hERG channels and these changes are prevented by additional point mutations (R665A, R665Q, or R665D) located in S6_T (Tristani-Firouzi et al., 2002). The demonstrated specificity of amino-acids interaction further supports the S4S5_L ligand and S6_T receptor model. A companion review (Cheng and Claydon, 2012) in the present Research Topic suggests that the sequence of the S4S5_L may be partly responsible for the slow activation kinetics of hERG channels.

HCN and KAT1. The hyperpolarization-activated, cyclic-nucleotide-gated (HCN) channels represent a family of four members (HCN1–4) that carry I_f (“f” for “funny”) or I_h (“h” for “hyperpolarization”) currents (DiFrancesco, 1981). Sequence analysis revealed that the primary structure of HCN channels is similar to that of voltage-gated potassium channels, i.e., six TMDs (S1–S6), including the positively charged voltage sensor S4 and the ion-conducting pore between S5 and S6. Ionic currents through HCN channels modulate the intrinsic electrical activity in the heart (DiFrancesco et al., 1979; DiFrancesco, 1993) and in a variety of neurons (Pape, 1996). Intriguingly, these non-specific cation channels are activated upon cell membrane hyperpolarization, contrarily to the classical depolarization-activated ion channels.

How can this difference in the gating behavior be explained? Two competing models have been proposed. The first model proposes that HCN channels are in an inactivated state when the membrane is depolarized and that its hyperpolarization induces channels to recover from inactivation and enter into an open state (Miller and Aldrich, 1996; Gauss et al., 1998). The second suggests that HCN channels gating is opposite to the one of K_v channels. In other words, membrane depolarization induces HCN channels deactivation whereas membrane hyperpolarization results in channel activation. Uncovering hyperpolarization-induced inactivation in KAT1, a six-segment potassium channel cloned from the higher plant *Arabidopsis* and having similar gating characteristics as HCN, has provided an argument that favors the second model for hyperpolarization-dependent activation of HCN channels (Moroni et al., 2000).

Alanine-scanning mutagenesis in HCN2 channel identified three S4S5_L residues playing a major role in the S6 gate stabilization in the closed state (Chen et al., 2001), consistent with the “ligand/receptor” model of voltage dependency described in KCNQ1 and hERG. However, this does not explain in a straightforward way the reversed voltage dependency of the channel compared to other voltage-gated channels. A possible explanation would be that a specific S4S5_L–S6_T interaction also favors an open state (in mirror to such interaction favoring a closed state in KCNQ1 or hERG channels). Using a cysteine cross-linking approach, a study showed that forced interaction between the S4S5_L (F359C) and the C-terminus, downstream to S6 (K482C), leads to a constrained and unnatural opening of spHCN1 channel (Prole and Yellen, 2006). Using a homology modeling approach, another study on KAT1 suggested that channel closure occurs via an electrostatic repulsion between S4S5_L (R190 and R197) and S6_T (R307 and R310) while the channel opening occurs when S4S5_L is rotating, allowing an electrostatic interaction between D188 in S4S5_L and R307, R310 in S6_T (Grabe et al., 2007). Again, all these studies are in good agreement with a ligand/receptor model of voltage dependency.

Kv4.2. Kv4.2 channel belongs to the family of voltage-gated potassium channels related to the *Shal* gene of *Drosophila* (Kv4 channels). These channels mediate a subthreshold-activating current (I_{SA}) that controls dendritic excitation and the backpropagation of neuronal action potentials (Hoffman et al., 1997). These Kv4 channels share structural motifs that are conserved in Shaker-like K_v channels, including the positively charged S4 voltage sensor, the TTXGYGD signature sequence in the selectivity filter, and the Pro-X-Pro motif in the S6 segment. One specificity of these channels, as compared to Shaker-like channels, is their significant closed-state inactivation induced by small depolarization (Jerng et al., 2004) and a fast voltage-dependent recovery from inactivation (tens to hundreds of milliseconds). Using functional and modeling approaches, it was demonstrated that this closed-state inactivation is strongly linked to the S4-charge immobilization in Kv4.2 channels, suggesting that the functional availability of Kv4.2 channels is directly regulated by the voltage sensors (Dougherty et al., 2008). Another study based on structural modeling and alanine-scanning, demonstrated that this voltage-dependent regulation involves a dynamic coupling between the S4S5_L and S6_T. This

dynamic coupling mediates both transient activation and closed-state inactivation in Kv4.2 channels (Barghaan and Bähring, 2009). While interaction between S4S5_L and S6_T is necessary for channel activation, the Kv4 inactivation process would result from a destabilization of this interaction. This is detailed in another review (Bähring, 2012) of the present Research Topic. A model of labile coupling might thus be applied to Kv4.2 channels the same way as for KCNQ1, hERG, HCN, or KAT1 channels.

Na_v and Ca_v channels. Voltage-gated Na⁺ and Ca²⁺ channels (Na_v and Ca_v, respectively), are fused tetrameric subunits with the same structural organization as proper tetrameric K_v channels. Indeed, Na_v and Ca_v subunits contain four homologous but not identical domains, each including six transmembrane segments (S1–S6), a voltage sensor domain with a positively charged S4 segment and a pore region formed by the association of S5 and S6 segments.

Since the voltage-dependent activity of Na⁺ and Ca²⁺ channels is mediated by the S4 movements in response to membrane potential variation (Yang and Horn, 1995; Hu et al., 2003) like voltage-gated potassium channels, we hypothesize that the ligand-receptor mechanism we demonstrated for KCNQ1 (Choveau et al., 2011; Labro et al., 2011) may be applied to Na⁺ and Ca²⁺ channels. The recent crystal structure of the prokaryotic one-domain voltage-gated sodium channel is consistent with our hypothesis since it can be observed that the channel gate (S6) is closed while the S4 segments are in the “up” position (Payandeh et al., 2011). Moreover, in this pre-open configuration (or pre-locked configuration if we consider the open to close pathway), the interaction surface between S4S5_L and S6_T is reduced as compared to the Kv1.2 channels structure (Payandeh et al., 2011). These observations support the model of a spontaneously opening and closing pore (McCusker et al., 2011; Shaya et al., 2011) with S4S5_L locking the channel in a closed state when the membrane is polarized (Figure 1B). It will be interesting to confirm if this model also applies to Na⁺ and Ca²⁺ channels, using the approach of exogenous peptides mimicking S4S5_L or S6_T, as used in Choveau et al. (2011).

IMPAIRED S4–S5 AND S6 INTERACTION UNDERLIES HUMAN DISEASES

As developed earlier, it is broadly accepted that the interaction between S4S5_L and S6_T is extremely important for voltage-gated ion channels function (activation, deactivation, and inactivation). For that reason, disruption of such interaction may have dramatic physiological effects, and lead to certain forms of disease.

Both cardiac and neurological disorders have been linked to impaired S4–S5_L and S6_T interactions in K_v channels. For instance, many mutations of the KCNQ1 channels lead to the LQT, a cardiac disease characterized by prolonged ventricular repolarization, arrhythmias, and sudden death. Interestingly, looking specifically at the S4S5_L, it was shown that LQT1 mutations (type 1 LQT, associated with mutations in KCNQ1) are clustered on the one side of the S4S5_L α-helix structure, that is putatively responsible for interactions with the S6_T region (Boulet et al., 2007; Labro et al., 2011), while several LQT1 mutations are also localized in the interacting S6_T region (<http://www.fsm.it/cardmoc/>), comforting in the opinion that the interaction of S4S5_L with S6_T is physiologically

crucial for a proper heart function. Unfortunately, specific studies that would directly relate the importance of this interaction with disease are still lacking. However, in order to confirm that the ligand/receptor model (Figure 1B) fits well with the KCNQ1-E1 complex behavior, we used an atrial fibrillation mutant, S140G, that was shown to deactivate extremely slowly, and thus that presents almost no voltage dependence in the –80 to +80 mV range (Chen et al., 2003; Restier et al., 2008). Interestingly, while “S6_T/activator peptides” clearly affect WT KCNQ1-KCNE1 channels, no effect was observed on the S140G-E1 complex. Conversely, “S4S5_L/inhibitory peptides” did have a dramatic blocking effect, suggesting that the endogenous S4S5_L of the S140G mutant channel does not reach S6_T. Although speculative, these data suggest that in this mutant, the gain-of-function effect might be somehow related to an impaired interaction between S4S5_L and S6_T (Choveau et al., 2011) due to a stabilization of S4 in the “up” state (Restier et al., 2008).

On the other hand, the pathological effect of a Kv1.1 channel mutation is consistent with the mechanical lever model of Kv1 channels (Figure 1A): the observation that a mutation located in the S4S5_L prevents Kv1.1 open state stabilization led to the conclusion that disrupted S4S5_L and S6 interactions underlie one type of episodic ataxia disease, in direct support of the mechanical lever model (Batulan et al., 2010).

Recently, it was proven that S4S5_L and S6 regions of the voltage-gated calcium channel Cav2.3 are coupled during the activation process (Wall-Lacelle et al., 2011). Since Ca_v channels are involved in several pathologies, including episodic ataxia, familial hemiplegic migraine, idiopathic generalized epilepsy (Adams and Snutch, 2007), one can easily imagine that an impaired S4S5_L–S6_T interaction in these channels might also underlie diseases, knowing that mutations in patients have been found in those critical regions (Adams and Snutch, 2007; Pietrobon, 2007).

PART 2: MODULATION OF VOLTAGE-GATED CHANNELS BY PIP₂

PIP₂ REGULATES SEVERAL VOLTAGE-GATED CHANNELS

KCNQ1 channels

Effect of PIP₂ on I_{Ks} currents. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) is a minor acidic membrane lipid found primarily in the inner leaflet of the plasma membrane. PIP₂ was first described as the precursor of the second messengers inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) and diacylglycerol (DAG) when cleaved by receptor-activated phospholipase C (PLC; Berridge, 1981). It was realized much later that plasma membrane PIP₂ is not simply a precursor, but also a signaling molecule in its own right (reviewed in Logothetis et al., 2010). As also demonstrated for a wide variety of ion channels and transporters (Gamper and Shapiro, 2007; Suh and Hille, 2008; Logothetis et al., 2010), we showed that PIP₂ is a necessary cofactor for KCNQ1 channel activity (Loussouarn et al., 2003). It regulates KCNQ1 channel function by stabilizing its open conformation, leading to increased current amplitude, slower deactivation kinetics, and a negative shift in the steady-state activation curve. Such PIP₂ effect was described by a kinetic model in which only the final concerted step toward opening was affected by PIP₂ levels (Figure 2). In this model, when the membrane is depolarized, the movement of the four voltage sensors

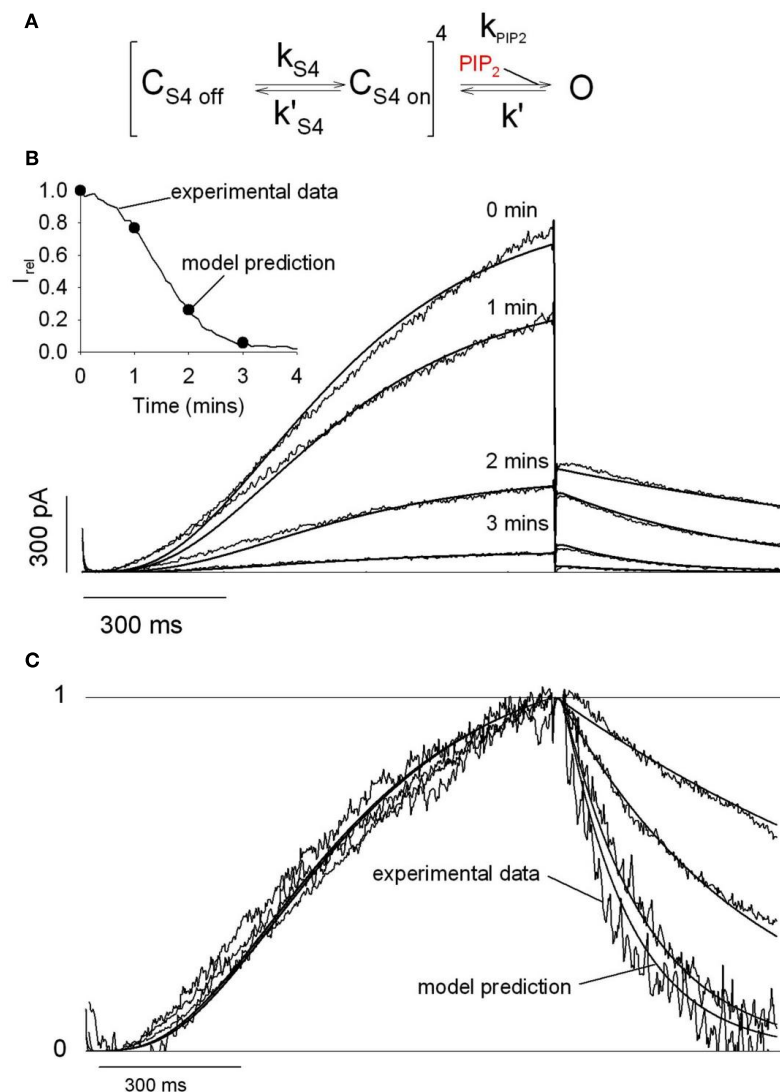


FIGURE 2 | A model based on the stabilization of the open state by PIP₂ recapitulates the characteristics of the KCNQ1/KCNE1 currents. (A)

During activation, k'_{S4} is negligible whereas $k_{S4} = 3.56/s$, and during deactivation $k'_{S4} = 7.47/s$ whereas k_{S4} is negligible. In this model, PIP₂ only affects the transition from a closed state to an open state when the four voltage sensors are in the permissive state ($C_{S4 \text{ on}}$). Thus, during simulated rundown, only k_{PIP_2} varies ($k' = 87.3/s$). (B) Experimental traces were

superimposed with the simulated current (solid lines). k_{PIP_2} was fixed to 592.74, 176.43, 25.84, and 4.53/s (simulating PIP₂ level decrease) to best fit the decrease in current amplitude during rundown, as shown in the inset.

Inset: simulated (circles) and observed current (solid line) amplitudes as a function of time after patch excision. (C) Traces in (B) were normalized to compare the observed and simulated kinetics of activation and deactivation. From Loussouarn et al. (2003).

in the upward direction is rate limiting, making activation kinetics PIP₂-independent. But, when the membrane is repolarized, the transition of the concerted pore closing becomes rate limiting, making deactivation kinetics PIP₂-dependent. Other KCNQ channels are also PIP₂ sensitive, like the KCNQ2/KCNQ3 complex responsible for the neuronal M-current (cf. below). It is interesting to note that for this channel complex, the biophysical parameters do not seem to vary as PIP₂ levels vary (Shapiro et al., 2000), and more specifically the deactivation kinetics (Zhang et al., 2010). It is possible for those channels, that the concerted pore closing is

not rate limiting, making deactivation kinetics PIP₂-independent. In KCNQ4, similar kinetics of “OFF” gating current and ion current deactivation are consistent with this hypothesis (Miceli et al., 2012).

The KCNQ1/KCNE1 kinetic model shares similarities with the one of Kir6.2/SUR1 channel (Enkvetchakul et al., 2000) suggesting similar effects of PIP₂ on six-domain and on two-domain channels. Furthermore, similarly to several inwardly rectifying K⁺ (K_{ir}) channels, ROMK, GIRK, and IRK (Huang et al., 1998), direct interaction of PIP₂ with a cluster of basic residues located in the

C-terminus close to S6 was recently shown in KCNQ1 channel (Thomas et al., 2011). This functional homology may give some insights on the nature of PIP₂ regulation of KCNQ1/KCNE1 channels. From the crystal structure of a GIRK channel, Whorton and Mackinnon showed that PIP₂ molecules lie at the interface between the TMD and the CTD (TMD-CTD) and are coordinated by several positively charged residues Lys64, Lys194, Lys199, and Lys200 (Whorton and Mackinnon, 2011). PIP₂ is suggested to couple the G-loop gate (open by GTP binding) and the inner helix gate. But even in the absence of GTP, it allows the outer and interfacial helices to slightly shift downward and outward, and the inner helices to slightly rotate. Even if the motion of the inner helices is not sufficient to open the pore by itself, it shows that PIP₂ binding can lead to the inner helices rearrangements. For KCNQ1, PIP₂ binding to the cluster of basic residues located just after S6 (Thomas et al., 2011) may lead to the stabilization of the inner helices in an open state. In another recent crystallographic study, Hansen et al. (2011) showed that PIP₂ mediates docking of the whole CTD to the TMD and subsequent opening of the inner helix gate of Kir2.2. Thereby, we can speculate that KCNQ1 CTD could interact with the membrane, via interactions with PIP₂. This idea is supported by our previous work showing that substitutions of arginines located at the C-terminus of KCNQ1 channels (R539 and R555, cf. below) decrease the channel-PIP₂ sensitivity. However, crystallographic studies must be done to confirm this hypothesis.

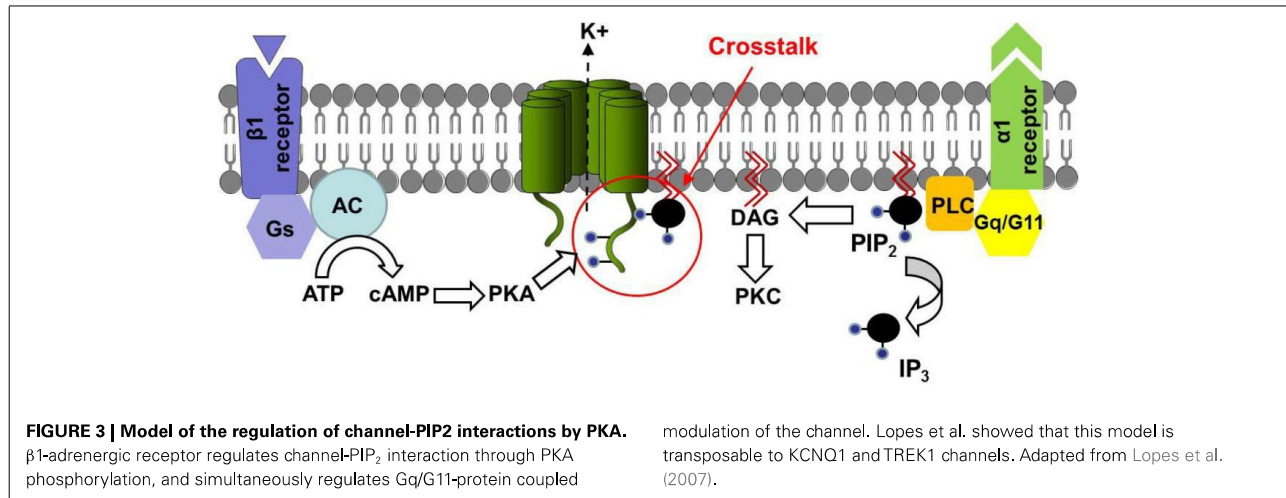
Impact of KCNE1 subunits on PIP₂ sensitivity of I_{Ks}. Although KCNQ1 is a voltage-gated channel on its own, KCNE1 leads to changes in the current properties: it increases the amplitude, shifts the voltage dependence of activation toward more positive potentials, slows activation and deactivation kinetics, and suppresses inactivation (Barhanin et al., 1996; Sanguinetti et al., 1996). More recently, it was shown that KCNE1 alters the function of I_{Ks} by modulating the interaction between PIP₂ and the KCNQ1/KCNE1 complex (Li et al., 2011). It is established that the interaction between proteins and PIP₂ is often based on interaction between basic residues with the negative charges of PIP₂ (Suh and Hille, 2008). In light of this, Li et al. (2011) individually mutated 11 basic residues located in the cytosolic C-terminus of KCNE1 to identify key structural determinants contributing to I_{Ks} regulation by PIP₂. To do this, they studied for each mutant the gradual decrease of KCNQ1/KCNE1 channel activity (“rundown”) observed right after excision in the inside-out configuration of the patch-clamp technique, patch excision provoking a decrease in membrane PIP₂ levels. In their study, Li et al. (2011) demonstrated that KCNE1 increases the PIP₂ sensitivity of I_{Ks}. More specifically, they identified 4 basic residues (R67, K69, K70, and H73) in KCNE1 that seem to play a critical role in this PIP₂ sensitivity. They showed that neutralization of these basic residues abolished the delay before rundown that is specifically observed when KCNE1 is co-expressed with KCNQ1, and significantly reduced the time constant of rundown. From a structure obtained by a NMR approach, it appears that these four residues are located on an α -helix, following the TMD (Kang et al., 2008). Kang et al. suggested that the C-terminal end of KCNE1 sits near S4S5_L and S6_T, which may explain the changes exerted by KCNE1 on the gating of KCNQ1 (see Part 1:

Role of the S4–S5 Linker in Channel Voltage Dependency). Moreover, basic residues in the S4S5_L and in the proximal C-terminus of KCNQ1 have been shown to interact with PIP₂ (Park et al., 2005; Thomas et al., 2011), suggesting that PIP₂ and KCNE1 modulate I_{Ks} through interaction with the same region of KCNQ1. Thus, PIP₂ interacts with amino-acids in the KCNQ1/KCNE1 channel complex, and its capacity to modulate I_{Ks} is regulated by KCNE1, through mechanisms that remain to be clearly identified by crystallographic approach.

Impact of PKA and PKC on PIP₂ sensitivity of I_{Ks}. Neurotransmitter and hormone receptor stimulations activate different signaling pathways that adjust the protein phosphorylation status. Among others, Gq/G11-protein coupled receptors, like muscarinic acetylcholine (ACh) receptors (M1), stimulate the PLC which hydrolyzes PIP₂ (Berridge, 1981) as explained above. The DAG produced by PIP₂ hydrolysis activates protein kinase C (PKC), which has been suggested to regulate I_{Ks} channels. Matavel and Lopes (2009) showed that Gq-coupled receptors regulate I_{Ks} in a biphasic manner: (i) downstream activation of PLC leads to PIP₂ depletion and underlines channel inhibition and (ii) PKC-mediated phosphorylation is responsible for the activation phase.

Protein kinase A (PKA) is another well-characterized kinase that regulates I_{Ks} through receptor-activated signaling pathways (Walsh and Kass, 1988; Marx et al., 2002). Stimulation of the β 1-adrenergic receptor leads to activation of adenylyl cyclase (AC) that catalyzes the conversion of ATP to cAMP and activates PKA. This β -adrenergic stimulation activates KCNQ1 via direct phosphorylation by PKA. More recently, Lopes et al. (2007) showed a crosstalk between KCNQ1 phosphorylation by PKA and its regulation by G-proteins of the Gq/G11 family. This study demonstrated that ACh inhibition of KCNQ1/KCNE1 currents in injected *Xenopus laevis* oocytes was lower in activated-PKA conditions and higher in inhibited-PKA conditions as compared to control. Furthermore, invalidation of the KCNQ1 S92 consensus phosphorylation site completely abolished the PKA effect on M1 inhibition of KCNQ1/KCNE1 currents. These results suggest that direct PKA phosphorylation of KCNQ1 is responsible for the PKA modulation of the observed PLC-dependent inhibition. A direct effect of PKA phosphorylation on channel regulation by PIP₂ was suggested by the use of wortmannin, which blocks the PI4-kinase intervening in the PIP₂ synthesis. PKA modulation of wortmannin inhibition was similar to the PKA modulation of M1 inhibition of KCNQ1. All these results suggest that the KCNQ1 sensitivity to PIP₂ is modulated by PKA (Figure 3).

More recently, Matavel et al. (2010) gave some new insights on KCNQ1 regulation by PKA and PKC. They tested four point mutations of putative PIP₂ interaction sites of the channel (R174C, R243C, R366Q, and R555C) and observed that mutations located in the proximal and distal C-terminus (R366Q and R555C, respectively), enhance the channel sensitivity to variations of membrane PIP₂ level, suggesting a decrease in the apparent affinity of these mutant channels to PIP₂. This was not the case for two mutations located in the S2–S3 loop (R174C) and in the S4S5_L (R243C). For the latter, this is in contradiction with the enhanced sensitivity to PIP₂ level variation observed by Park et al. (2005) for the R243H



mutant. Such discrepancy can be explained by the difference in the nature of the substituted amino-acid (cysteine in one case and histidine in the other) or by differences in experimental conditions (whole-cell configuration on oocytes and giant-patch configuration on COS-7 cells, respectively). Furthermore, Matavel et al. showed that R174C and R243C mutants exhibited an impaired activation by both PKA and PKC, whereas C-terminal KCNQ1 mutants presented an increased activation. Thus, for R366Q and R555C mutant channels, regulation of the channel by PIP₂ was potentiated, suggesting that PKA and PKC activate the channel by strengthening KCNQ1 interactions with PIP₂.

Other KCNQ channels

Five members have been identified in the KCNQ channel family (KCNQ1–5), each with a specific tissue distribution. In the heart, intestine, and inner ear, KCNQ1 subunits, assembling with auxiliary KCNE subunits, are important for repolarization and K⁺ transport (Barhanin et al., 1996; Sanguinetti et al., 1996; Neyroud et al., 1997; Wang et al., 1998b). KCNQ2, KCNQ3, and KCNQ5 participate to “M-type” K⁺ currents in a variety of neurons (Lerche et al., 2000; Schroeder et al., 2000; Cooper et al., 2001; Roche et al., 2002; Shah et al., 2002) and play a dominant role in regulating neuronal excitability (Jones et al., 1995; Cooper et al., 2001). KCNQ4 primarily localizes to the inner ear (Kubisch et al., 1999). Zhang et al. (2003) studied the PIP₂ dependency of all KCNQ family members. They used various approaches for homomeric KCNQ2 and heteromeric KCNQ2/KCNQ3 channels and showed that PIP₂ application in inside-out macropatches leads to an increase in channel activity, even after an almost complete rundown. Following channel reactivation by PIP₂, they observed that application of polylysine, which was described to act as a PIP₂ scavenger (Lopes et al., 2002; Rohács et al., 2002), results in fast and complete block of the current. Application of PIP₂ antibody to the internal surface of inside-out macropatches also suppresses the current. KCNQ1/KCNE1, KCNQ4, and KCNQ5 channels are also reactivated by PIP₂ after inhibition by polylysine, showing that all KCNQ family members are PIP₂ sensitive.

Similar to KCNQ1 (Loussouarn et al., 2003), PIP₂ may increase the current via a stabilization of the open state of KCNQ2–4

channels (Li et al., 2005). In their study, Li et al. (2011) showed that the maximal single-channel open probability (P_o) of KCNQ2–KCNQ4 and specifically KCNQ2/3 channels is highly governed by diC8-PIP₂ concentration. Furthermore, they observed a strong increase in maximal channel open probability (P_o) of KCNQ2/3 and KCNQ2 in cell-attached patches from cells overexpressing PI5-kinase, which has been shown to increase membrane PIP₂ (Bender et al., 2002; Winks et al., 2005). Conversely, a decrease in free membrane PIP₂ induced by muscarinic stimulation strongly lowers channel P_o . The apparent affinity of the channels for diC8-PIP₂ is strongly different and parallels the differential maximal P_o in cell-attached patches, suggesting that P_o of channels is mainly governed by their sensitivity to membrane PIP₂ (Li et al., 2005). Although not sufficient to nail down the point, these experiments are consistent with PIP₂ stabilizing the open state of all KCNQ channels.

In addition to PIP₂, several kinds of phosphoinositides but also other phospholipids are present in the plasma membrane and are capable of regulating the “M-type” K⁺ current (Telezhkin et al., 2012). However, the fact that the current decreases when using tools that specifically decrease PIP₂ (Suh et al., 2006; Lindner et al., 2011) plus consideration of the concentration for half activation for the different phospholipids and their abundance in the membrane suggest a predominant role of PIP₂ for the regulation of KCNQ channels (Telezhkin et al., 2012).

Human ether-a-go-go related gene

The hERG or KCNH2 encodes the pore-forming subunit of the channel that is responsible for the rapid delayed rectifier K⁺ current, I_{Kr} , in cardiac cells and several other cell types (cf. Part 1: Role of the S4–S5 Linker in Channel Voltage Dependency). This was the first voltage-gated ion channel described to be sensitive to PIP₂ (Bian et al., 2001). Consistent with this PIP₂ sensitivity, the muscarinic receptor M1, which stimulates enzymatic hydrolysis of PIP₂ by PLC, has been shown to suppress rat ERG currents in a heterologous system (Hirdes et al., 2004). As opposed to KCNQ1/KCNE1 (Loussouarn et al., 2003), Bian et al. (2001) showed that PIP₂ addition on hERG channel led to an accelerated activation with no effect on deactivation. But more recently, we

observed that PIP₂ effects on hERG are very close to those observed on KCNQ1/KCNE1: increased current, slowed deactivation, and no effect on activation kinetics (Rodriguez et al., 2010). This difference could be due to the use of divergent patch-clamp configurations in these studies: whole-cell in Bian et al. versus inside-out in our study. Furthermore, as for KCNQ1/KCNE1 channel complex, a kinetic model showed that PIP₂ effects on hERG can be explained by modifying the late transition rates only, corresponding to pore opening. In addition, we observed that hERG channels present a PIP₂ sensitivity similar to KCNQ1/KCNE1, estimated by (i) polylysine-induced rundown kinetics, (ii) PIP₂ induced run-up kinetics, and (iii) sensitivity to intracellular Mg²⁺, which is known to screen the PIP₂ negative charges. All these data support the idea that hERG and KCNQ1/KCNE1 channels have a similar affinity to PIP₂. However, the experiments we performed also showed the persistence of a fraction of hERG current at low PIP₂ levels, which may underlie differences in response to physiological decrease in membrane PIP₂ levels.

Other voltage-sensitive channels

In addition to the delayed rectifiers KCNQ1 and hERG, other voltage-gated channels are regulated by PIP₂: the voltage-gated Ca²⁺ channels (Ca_v) channels (Wu et al., 2002), HCN channels (Pian et al., 2006), and also K_v channels (Oliver et al., 2004). At least for Ca_v channels, accessory subunits can regulate the modulation of the current by PIP₂, similar as the β-subunit KCNE1 modulating the PIP₂ sensitivity of KCNQ1 (Suh et al., 2012). Another article of this Frontiers Research topic is focusing on the effect of PIP₂ on these channels (Menchaca et al., under revision).

IMPLICATION OF PIP₂ IN SIGNALING PATHWAYS

Depletion of PIP₂ by activation of the Gq signaling pathway

Many studies have investigated the role of PIP₂ in the regulation of voltage-gated KCNQ channels activity. Recovery of KCNQ2/KCNQ3 current following muscarinic stimulation requires re-synthesis of PIP₂ (Suh and Hille, 2002) and channels activity decreases quickly upon patch excision but is restored upon cytoplasmic addition of PIP₂ (Zhang et al., 2003). In addition, fluorescent PIP₂-sensitive probes showed close correlation between PIP₂ hydrolysis and channel current suppression by muscarinic agonists (Winks et al., 2005). Similar effects of PIP₂ were found for KCNQ1 channels, in recombinant systems (Loussouarn et al., 2003; Zhang et al., 2003; Matavel and Lopes, 2009). Surprisingly, one study shows the opposite effect of PIP₂ on I_{Ks} in guinea-pig cardiomyocytes which would deserve a closer look (Ding et al., 2004).

A decrease in PIP₂ may be the major determinant for a decrease in a KCNQ current upon activation of some Gq/11-coupled receptors, but the mechanism may also be more complex for other Gq/11-coupled receptors. Regarding regulation of the M-current, two distinct pathways following PLC activation and IP₃ and DAG production have been described (Figure 4).

The first pathway, for which the decrease in PIP₂ is the major determinant of M-current depression, is induced by the activation of M1 muscarinic ACh and AT1 angiotensin II receptors (Zaika et al., 2006; Suh and Hille, 2007; Matavel and Lopes, 2009; Figure 4A).

The second pathway, activated by bradykinin B2 and purinergic P2Y receptors (Figure 4B), induces PIP₂ hydrolysis, but also PIP₂ re-synthesis preventing a decrease in PIP₂ abundance. PIP₂ re-synthesis is triggered by the increase of IP₃ concentration leading to calcium release from intracellular stores (Cruzblanca et al., 1998; Bofill-Cardona et al., 2000; Delmas et al., 2002; Zaika et al., 2007). This release is modulated by a IP₃ receptor-binding protein, IRBIT, which leaves and unmasks some IP₃ binding sites at a high enough IP₃ concentration, and increases the IP₃ receptor sensitivity (Zaika et al., 2011). The released Ca²⁺ binds to the calcium sensitive neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) that activates PI4-kinase, leading to PIP₂ re-synthesis compensating the hydrolysis of PIP₂ by PLC (Zaika et al., 2007). Ca²⁺ also binds to calmodulin (CaM; Gamper et al., 2005) and Ca²⁺-CaM binding to the channel might decrease the affinity of channels for PIP₂ (Kwon et al., 2007; Sarria et al., 2011) as their putative binding modules seem to overlap (Hernandez et al., 2008). This decrease in the affinity for PIP₂ may be the cause for current depression in the second pathway (Figure 4B).

Binding/unbinding of PIP₂

Localization of PIP₂-binding sites. The location of presumed PIP₂-binding sites and the characteristic of their motifs have been investigated in several channels. For KCNQ channels, evidence support the idea that the PIP₂-binding site(s) is (are) located mainly within the C-terminus. For instance, the H328C mutation in helix A within the C-terminus of KCNQ2 (residue in green in Figure 5) renders channels less sensitive to PIP₂ (Zhang et al., 2003). In addition, Shapiro and co-workers localized a cluster of basic residues within the linker connecting helices A and B in the C-terminus of KCNQ2–4 as the primary site of PIP₂ action (Hernandez et al., 2008). Based on the crystal structure of Kir2.1, homology modeling of KCNQ2 has suggested three residues (R459, R461, and R463) to form hydrogen bonds with phosphates of the PIP₂ head group (Hernandez et al., 2008).

Because all KCNQ channels share a common structure and are up-regulated by PIP₂ (Loussouarn et al., 2003; Zhang et al., 2003), PIP₂-binding site may be located at the analogous position in KCNQ1. However, a sequence alignment shows that the putative amino-acids binding to PIP₂ identified by Shapiro and co-workers (blue frame in Figure 5) are highly conserved in KCNQ2–5 but not in KCNQ1, suggesting different PIP₂-binding site(s) in this latter. A recent study has identified a cluster of basic residues (K354, K358, R360, and K362) in helix A of KCNQ1 as being involved in PIP₂-binding (Thomas et al., 2011). Three of these residues are conserved in other KCNQ channels (red frame in Figure 5), suggesting a potential role of those amino-acids in PIP₂-channel interactions in KCNQ2–4. Other residues, that are located in the S4–S5 linker (R243), downstream of the CaM binding domain (R539) and in helix C of KCNQ1 C-terminus (R555), have also been proposed to interact with PIP₂ (Park et al., 2005). As a result, and especially for KCNQ1, PIP₂ seems to interact with multiple parts of the channel. The crystal structures of Kir2.2 and GIRK 2, corresponding to S4–S5 linker + S5–S6 + C-terminus in KCNQ channels, illustrate such networks of interaction, and may give insights on the nature of PIP₂ regulation of KCNQ channels, as exposed above (Hansen et al., 2011; Whorton and Mackinnon,

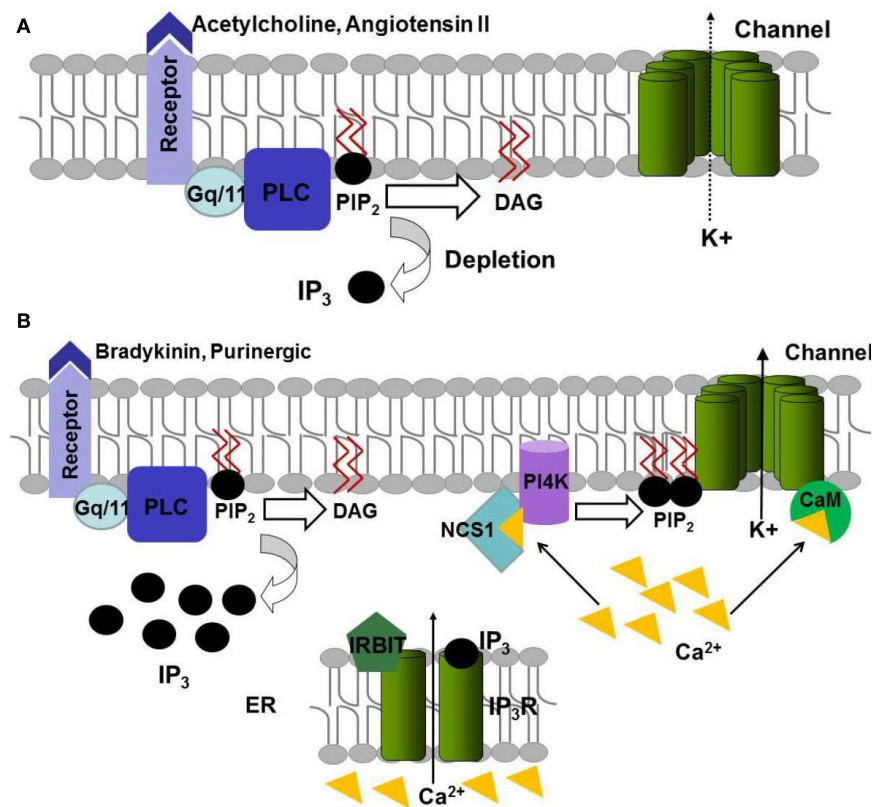


FIGURE 4 | Model of regulation of KCNQ channels function by the Gq signaling pathway. (A) Activation of the PLC by ACh and angiotensin II induces the hydrolysis of PIP_2 to DAG and IP_3 . **(B)** Activation of bradykinin and purinergic receptors leads to depletion of PIP_2 by PLC but also its

re-synthesis. IP_3 allows releasing Ca^{2+} from endoplasmic reticulum via IP_3R . The released Ca^{2+} can bind to NCS-1 that induces the synthesis of PIP_2 via PI4K or bind to CaM and modulate the channel sensitivity to PIP_2 .

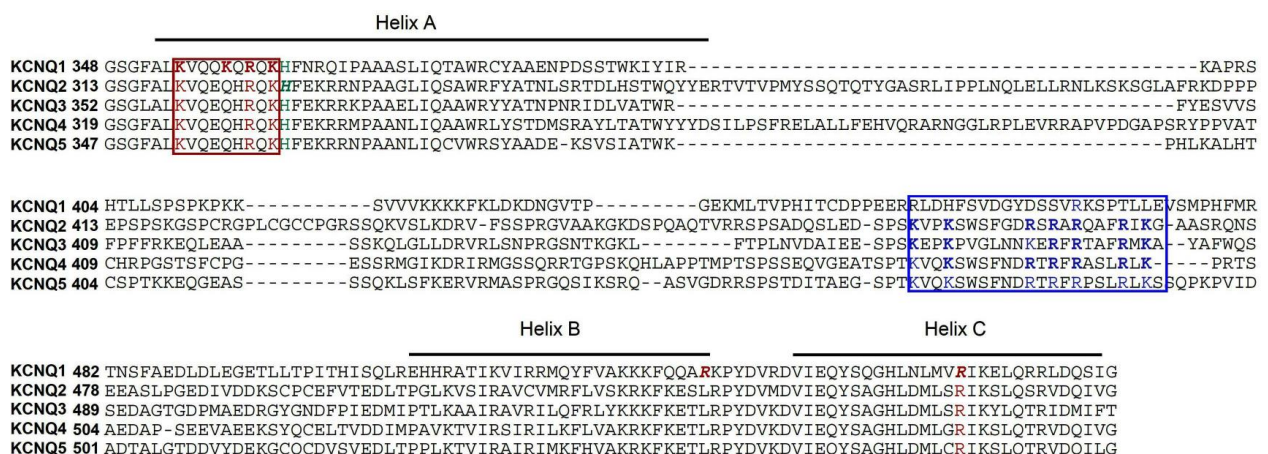


FIGURE 5 | Alignment of human KCNQ C-terminus and potential PIP_2 interacting residues. The residues in KCNQ1, framed in red and indicated in red and italic, are those identified by Thomas et al. (2011) and Park et al.

(2005), respectively. The H328 residue identified in KCNQ2 is indicated in green and in italic (Zhang et al., 2003). The region identified in KCNQ2–4 by Shapiro and co-workers is framed in blue (Hernandez et al., 2008).

2011). A more precise mapping and robust structural data remain to be established in KCNQ channels to understand the underlying mechanism.

In hERG also, a PIP₂-binding site seems to be located in the C-terminus. Deletion of a segment (883–894) in the C-terminus of hERG abolished the effects of PIP₂ on channel amplitude and voltage dependence of activation (Bian et al., 2004). However, the exact position remains elusive.

Role of Ca²⁺-CaM. We described above that activation of Gq/11 signaling pathways leads to PIP₂ depletion and consequently to decreased channel current. However, several works suggest that unbinding of PIP₂ due to decreased affinity for KCNQ channels, rather than PIP₂ depletion, can underlie Gq/11-mediated depression of KCNQ current (Delmas and Brown, 2005). In agreement with this, Ca²⁺-CaM binding site is very close to the putative binding site for PIP₂: helix A and B for Ca²⁺-CaM and the A-B helix linker for PIP₂ (Wen and Levitan, 2002; Gamper and Shapiro, 2003; Hernandez et al., 2008). This proximity indicates that occupation of this site by Ca²⁺-CaM might reduce the binding of PIP₂ to the channel, leading to a down-regulation of channels. Consistent with this, a recent study (Sarria et al., 2011) showed an increase of the open probability by PIP₂ of another six-segment channel, TRPM8, to be reversed by Ca²⁺-CaM. Conversely, Kwon and co-workers have found that PIP₂ reduced Ca²⁺-CaM binding to several channels including TRPC1, TRPC5–7, and TRPV1 (Kwon et al., 2007). Interestingly, similar effects are observed in KCNQ1 and Cav1.2, supporting the idea that PIP₂- and Ca²⁺-CaM binding sites overlap in these channels (Kwon et al., 2007). However, mechanisms by which Ca²⁺-CaM and PIP₂ antagonize each other effects remain unclear. Does this reduction result from a direct competition or from allosteric conformational changes?

Do phospholipids affect the voltage sensor S4 movement? As previously described in this review, mutagenesis studies have identified clusters of positively charged residues, mainly located in the cytosolic C-terminus of channels that may interact with the negatively charged PIP₂. The S4 segment possesses several positively charged residues, suggesting that PIP₂ might also affect its movement by interacting with some of these residues.

Several studies are consistent with the idea that lipids can interact with the voltage sensor and modulate its motion; although most of these studies focus on interactions in the outer leaflet (PIP₂ is situated in the inner leaflet). Structural studies on KvAP and on a Kv1.2-Kv2.1 chimeric channel show that some residues of S4 are exposed to lipids (Lee et al., 2005; Long et al., 2007). Chimeric Kv2.1 in which the “paddle” motif (S3b and S4) is replaced by one of the paddle motifs of Nav1.4 or of the voltage-dependent phosphatase, Ci-VSP, can be used to evaluate the contribution of the paddle motif to a specific property of the voltage sensor. Hydrolysis of the outer-leaflet lipid sphingomyelin to ceramide-1-phosphate by sphingomyelinase D alters the S4 movement differently in the different chimeric channels, suggesting an interaction between outer-leaf lipids and the paddle motif (Milescu et al., 2009). The sphingomyelin phosphate that persists in ceramide-1-phosphate is critical for their interaction with S4 since sphingomyelinase C, an enzyme which removes this phosphate group, strongly reduced the

gating current of Shaker and Kv1.3 (Xu et al., 2008). The importance of the phosphate group of lipids in the S4 movement has also been highlighted in KvAP channels (Schmidt et al., 2006; Zheng et al., 2011). Expression of KvAP in membranes, in which lipids have a positively charged group instead of a phosphate group, renders the channels not functional (Schmidt et al., 2006). This effect would arise from a disruption of the interaction between the arginines of the S4 segment and the phosphate groups of the membrane lipids. Consistent with this, Zheng et al., 2011) showed that the switch of the S4 from the resting to the activated conformation requires more energy in a membrane without phospholipids.

According to those studies, S4 is stabilized in the activated position by interaction with outer-leaflet phospholipids. The structure of the Kv1.2-Kv2.1 chimeric channel suggests that an inner-leaflet phospholipid may also interact with the S4–S5 linker (Long et al., 2007). We suppose that the negatively charged phosphate groups of PIP₂ may bind to positively charged residues at the bottom of S4 or in S4–S5 linker and regulate S4 motions. However, no direct evidence exists for such an interaction.

IMPAIRED CHANNEL-PIP₂ INTERACTION UNDERLIES HUMAN DISEASES

As mentioned above, the importance of PIP₂ regulation of voltage-gated ion channels is now proven and clear. Thus, one might ask how far this crucial factor affects the physiological functions of these channels. Is it limited to a biophysical/regulatory effect, or does it have major impact; for instance, can an impaired interaction with PIP₂ lead to human disease? While this issue was partly answered for non-voltage-gated ion channels (Logothetis et al., 2010), the relationship between PIP₂ and channelopathies implying voltage-gated ion channels is less clear, probably since the study of their regulation is more recent and less developed.

The KCNQ1-KCNE1 potassium channel complex underlies the I_{Ks} repolarizing cardiac current. We showed that this channel function is dependent on PIP₂ regulation, which allows stabilization of the open state (Loussouarn et al., 2003). Importantly, we also demonstrated that residues in intracellular part of KCNQ1 channels (S4S5_L and C-terminus) are important for PIP₂ regulation, and that their substitution, occurring in some LQT1 patients, leads to channel with decreased PIP₂ sensitivity, suggesting a direct connection between channels-PIP₂ interactions and the LQT syndrome (Park et al., 2005).

The KCNE1 beta-subunit is critical for a proper activity of KCNQ1 in the heart, and KCNE1 mutations are also associated with a LQT (type 5 LQT syndrome, LQT5). It was shown that neutralization of positive charges located in KCNE1 C-terminus is associated with LQT5 (Lai et al., 2005; Hedley et al., 2009; Kapplinger et al., 2009). A recent study highlighted the importance of PIP₂ interaction with KCNE1 and suggested that such interaction is critical for a proper function of KCNQ1/KCNE1 in the heart. This study went further by reporting that LQT5 syndrome is directly related to PIP₂-KCNE1 association, since WT channel complex properties were restored by using higher than normal doses of PIP₂, thus also confirming the PIP₂-dependence of LQT5 disease (Li et al., 2011).

Regulation of hERG channels by PIP₂ has been described in Section “Part 2: Human Ether-a-go-go Related Gene.” PIP₂

stabilizes hERG open state changing the amplitude and deactivation kinetics (Bian et al., 2001; Rodriguez et al., 2010). In the putative PIP₂-binding sites, phospholipid anionic heads may interact with intracellular positively charged residues separated by, at least, one aromatic residue (Rosenhouse-Dantsker and Logothetis, 2007; Hernandez et al., 2008). One PIP₂ interacting site of hERG is localized to the C-terminal part of S6 (residues 883–864; Bian et al., 2004). Interestingly, three type 2 (hERG-related) LQT mutations that lead to substitution or deletion of arginines (at positions 885, 887, and 892) are localized in this area (Napolitano et al., 2005; Tester et al., 2005; Arnestad et al., 2007). It would thus be informative to investigate the activity of these LQT mutant channels to determine a potential PIP₂ involvement with the LQT2 syndrome.

The importance of PIP₂ regulation for proper voltage-gated ion channels function deserves thus all our attention. Although no direct connection between the phospholipid and channelopathies has been proven, apart from the LQT studies, the data obtained

so far open a wide range of possibilities. An impressive list of phosphoinositide-sensitive channels has been presented in a recent review (Logothetis et al., 2010), and many of them are involved in pathologies (Lehmann-Horn and Jurkat-Rott, 1999). Following the example of hERG above, and knowing that several studies brought further details into the PIP₂-binding sites on voltage-gated ion channels (Zhang et al., 2003; Oliver et al., 2004; Hernandez et al., 2008; Flynn and Zagotta, 2011; Thomas et al., 2011), we can certainly imagine that other mutations lead to impaired channels-PIP₂ interaction and thus lead to disease.

ACKNOWLEDGMENTS

Fayal Abderemane-Ali and Fabien C. Cayan are recipients of a grant from the French Ministère de la Recherche. Zeineb Es-Salah-Lamoureux is supported by fellowships from the Lefoulon Delalande foundation and the French Foundation for Medical Research (FRM).

REFERENCES

- Adams, P. J., and Snutch, T. P. (2007). Calcium channelopathies: voltage-gated calcium channels. *Subcell. Biochem.* 45, 215–251.
- Alonso-Ron, C., de la Peña, P., Miranda, P., Domínguez, P., and Barros, F. (2008). Thermodynamic and kinetic properties of amino-terminal and S4-S5 loop hERG channel mutants under steady-state conditions. *Biophys. J.* 94, 3893–3911.
- Armstrong, C. M. (1981). Sodium channels and gating currents. *Physiol. Rev.* 61, 644–683.
- Arnestad, M., Crotti, L., Rognum, T. O., Insolia, R., Pedrazzini, M., Ferrandi, C., Vege, A., Wang, D. W., Rhodes, T. E., George, A. L. Jr., Schwartz, P. J. (2007). Prevalence of long-QT syndrome gene variants in sudden infant death syndrome. *Circulation* 115, 361–367.
- Bähring, R. (2012). Voltage sensor inactivation in potassium channels. *Front. Pharmacol.* 3:100. doi:10.3389/fphar.2012.00100
- Barghaan, J., and Bähring, R. (2009). Dynamic coupling of voltage sensor and gate involved in closed-state inactivation of kv4.2 channels. *J. Gen. Physiol.* 133, 205–224.
- 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.
- Barros, F., Domínguez, P., and de la Peña, P. (2012). Cytoplasmic domains and voltage-dependent potassium channel gating. *Front. Pharmacol.* 3:49. doi:10.3389/fphar.2012.00049
- Batulan, Z., Haddad, G. A., and Blunck, R. (2010). An intersubunit interaction between S4–S5 linker and S6 is responsible for the slow off-gating component in shaker K⁺ channels. *J. Biol. Chem.* 285, 14005–14019.
- Bender, K., Wellner-Kienitz, M.-C., and Pott, L. (2002). Transfection of a phosphatidyl-4-phosphate 5-kinase gene into rat atrial myocytes removes inhibition of GIRK current by endothelin and alpha-adrenergic agonists. *FEBS Lett.* 529, 356–360.
- Berridge, M. J. (1981). Phosphatidylinositol hydrolysis: a multifunctional transducing mechanism. *Mol. Cell. Endocrinol.* 24, 115–140.
- Bezanilla, F., Perozo, E., and Stefani, E. (1994). Gating of shaker K⁺ channels: II. The components of gating currents and a model of channel activation. *Biophys. J.* 66, 1011–1021.
- Bian, J., Cui, J., and McDonald, T. V. (2001). hERG K(+) channel activity is regulated by changes in phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate. *Circ. Res.* 89, 1168–1176.
- Bian, J.-S., Kagan, A., and McDonald, T. V. (2004). Molecular analysis of PIP₂ regulation of hERG and IKr. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287, H2154–H2163.
- Bofill-Cardona, E., Vartian, N., Nanoff, C., Freissmuth, M., and Boehm, S. (2000). Two different signaling mechanisms involved in the excitation of rat sympathetic neurons by uridine nucleotides. *Mol. Pharmacol.* 57, 1165–1172.
- Börjesson, S. I., and Elinder, F. (2008). Structure, function, and modification of the voltage sensor in voltage-gated ion channels. *Cell Biochem. Biophys.* 52, 149–174.
- Boulet, I. R., Labro, A. J., Raes, A. L., and Snyders, D. J. (2007). Role of the S6 C-terminus in KCNQ1 channel gating. *J. Physiol. (Lond.)* 585, 325–337.
- Broomand, A., Männikkö, R., Larsson, H. P., and Elinder, F. (2003). Molecular movement of the voltage sensor in a K channel. *J. Gen. Physiol.* 122, 741–748.
- Catterall, W. A. (1986). Voltage-dependent gating of sodium channels: correlating structure and function. *Trends Neurosci.* 9, 7–10.
- Cha, A., Snyder, G. E., Selvin, P. R., and Bezanilla, F. (1999). Atomic scale movement of the voltage-sensing region in a potassium channel measured via spectroscopy. *Nature* 402, 809–813.
- Chanda, B., Asamoah, O. K., Blunck, R., Roux, B., and Bezanilla, F. (2005). Gating charge displacement in voltage-gated ion channels involves limited transmembrane movement. *Nature* 436, 852–856.
- Chen, J., Mitcheson, J. S., Tristani-Firouzi, M., Lin, M., and Sanguinetti, M. C. (2001). The S4–S5 linker couples voltage sensing and activation of pacemaker channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 11277–11282.
- Chen, J., Zou, A., Splawski, I., Keating, M. T., and Sanguinetti, M. C. (1999). Long QT syndrome-associated mutations in the Per-Arnt-Sim (PAS) domain of hERG potassium channels accelerate channel deactivation. *J. Biol. Chem.* 274, 10113–10118.
- 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.
- Cheng, Y. M., and Claydon, T. W. (2012). Voltage-dependent gating of hERG potassium channels. *Front. Pharmacol.* 3:83. doi:10.3389/fphar.2012.00088
- Choveau, F. S., Rodriguez, N., Abderemane-Ali, F., Labro, A. J., Rose, T., Dahimène, S., Boudin, H., Le Hénaff, C., Escande, D., Snyders, D. J., Charpentier, F., Mérot, J., Baró, I., and Loussouarn, G. (2011). KCNQ1 channels voltage dependence through a voltage-dependent binding of the S4–S5 linker to the pore domain. *J. Biol. Chem.* 286, 707–716.
- Cooper, E. C., Harrington, E., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (2001). M channel KCNQ2 subunits are localized to key sites for control of neuronal network oscillations and synchronization in mouse brain. *J. Neurosci.* 21, 9529–9540.
- Cruzblanca, H., Koh, D. S., and Hille, B. (1998). Bradykinin inhibits M current via phospholipase C and Ca²⁺ release from IP₃-sensitive Ca²⁺ stores in rat sympathetic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 7151–7156.
- 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.
- de la Peña, P., Alonso-Ron, C., Machín, A., Fernández-Trillo, J., Carretero, L., Domínguez, P., and Barros, F. (2011). Demonstration of physical proximity between the N terminus and the S4–S5 linker of the human ether-a-go-go-related gene (hERG) potassium channel. *J. Biol. Chem.* 286, 19065–19075.

- Delemotte, L., Tarek, M., Klein, M. L., Amaral, C., and Treptow, W. (2011). Intermediate states of the Kv1.2 voltage sensor from atomistic molecular dynamics simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 6109–6114.
- Delmas, P., and Brown, D. A. (2005). Pathways modulating neural KCNQ/M (Kv7) potassium channels. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 850–862.
- Delmas, P., Wanaverbecq, N., Abogadie, F. C., Mistry, M., and Brown, D. A. (2002). Signaling microdomains define the specificity of receptor-mediated InsP(3) pathways in neurons. *Neuron* 34, 209–220.
- DiFrancesco, D. (1981). A new interpretation of the pace-maker current in calf Purkinje fibres. *J. Physiol. (Lond.)* 314, 359–376.
- DiFrancesco, D. (1993). Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu. Rev. Physiol.* 55, 455–472.
- DiFrancesco, D., Noma, A., and Trautwein, W. (1979). Kinetics and magnitude of the time-dependent potassium current in the rabbit sinoatrial node: effect of external potassium. *Pflugers Arch.* 381, 271–279.
- Ding, W.-G., Toyoda, F., and Matsura, H. (2004). Regulation of cardiac IKs potassium current by membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* 279, 50726–50734.
- Dougherty, K., De Santiago-Castillo, J. A., and Covarrubias, M. (2008). Gating charge immobilization in Kv4.2 channels: the basis of closed-state inactivation. *J. Gen. Physiol.* 131, 257–273.
- Durell, S. R., and Guy, H. R. (1992). Atomic scale structure and functional models of voltage-gated potassium channels. *Biophys. J.* 62, 238–247; discussion 247–250.
- Enkvetchakul, D., Loussouarn, G., Makhina, E., Shyng, S. L., and Nichols, C. G. (2000). The kinetic and physical basis of K(ATP) channel gating: toward a unified molecular understanding. *Biophys. J.* 78, 2334–2348.
- Ferrer, T., Rupp, J., Piper, D. R., and Tristani-Firouzi, M. (2006). The S4–S5 linker directly couples voltage sensor movement to the activation gate in the human ether-a'-go-go-related gene (hERG) K⁺ channel. *J. Biol. Chem.* 281, 12858–12864.
- Flynn, G. E., and Zagotta, W. N. (2011). Molecular mechanism underlying phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-induced inhibition of SpIH channels. *J. Biol. Chem.* 286, 15535–15542.
- 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.
- Gamper, N., and Shapiro, M. S. (2003). Calmodulin mediates Ca²⁺-dependent modulation of M-type K⁺ channels. *J. Gen. Physiol.* 122, 17–31.
- Gamper, N., and Shapiro, M. S. (2007). Regulation of ion transport proteins by membrane phosphoinositides. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 921–934.
- Gandhi, C. S., Clark, E., Loots, E., Pralle, A., and Isacoff, E. Y. (2003). The orientation and molecular movement of a k(+) channel voltage-sensing domain. *Neuron* 40, 515–525.
- Gauss, R., Seifert, R., and Kaupp, U. B. (1998). Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature* 393, 583–587.
- Grabe, M., Lai, H. C., Jain, M., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (2007). Structure prediction for the down state of a potassium channel voltage sensor. *Nature* 445, 550–553.
- Guy, H. R., and Seetharamulu, P. (1986). Molecular model of the action potential sodium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 508–512.
- Haddad, G. A., and Blunck, R. (2011). Mode shift of the voltage sensors in shaker K⁺ channels is caused by energetic coupling to the pore domain. *J. Gen. Physiol.* 137, 455–472.
- Hansen, S. B., Tao, X., and MacKinnon, R. (2011). Structural basis of PIP₂ activation of the classical inward rectifier K⁺ channel Kir2.2. *Nature* 477, 495–498.
- Hedley, P. L., Jørgensen, P., Schlamowitz, S., Wangari, R., Moolman-Smook, J., Brink, P. A., Kanters, J. K., Corfield, V. A., and Christiansen, M. (2009). The genetic basis of long QT and short QT syndromes: a mutation update. *Hum. Mutat.* 30, 1486–1511.
- Hernandez, C. C., Zaika, O., and Shapiro, M. S. (2008). A carboxy-terminal inter-helix linker as the site of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate action on Kv7 (M-type) K⁺ channels. *J. Gen. Physiol.* 132, 361–381.
- Hirdes, W., Horowitz, L. F., and Hille, B. (2004). Muscarinic modulation of erg potassium current. *J. Physiol. (Lond.)* 559, 67–84.
- Hoffman, D. A., Magee, J. C., Colbert, C. M., and Johnston, D. (1997). K⁺ channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Nature* 387, 869–875.
- Hoshi, T., Zagotta, W. N., and Aldrich, R. W. (1994). Shaker potassium channel gating. I: transitions near the open state. *J. Gen. Physiol.* 103, 249–278.
- Hu, L., Shi, J., Ma, Z., Krishnamoorthy, G., Sieling, F., Zhang, G., Horigan, F. T., and Cui, J. (2003). Participation of the S4 voltage sensor in the Mg²⁺-dependent activation of large conductance (BK) K⁺ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 10488–10493.
- 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.
- Jensen, M. Ø., Jogini, V., Borhani, D. W., Leffler, A. E., Dror, R. O., and Shaw, D. E. (2012). Mechanism of voltage gating in potassium channels. *Science* 336, 229–233.
- Jerng, H. H., Pfaffinger, P. J., and Covarrubias, M. (2004). Molecular physiology and modulation of somatodendritic A-type potassium channels. *Mol. Cell. Neurosci.* 27, 343–369.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (2003). X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 423, 33–41.
- Jones, S., Brown, D. A., Milligan, G., Willer, E., Buckley, N. J., and Caulfield, M. P. (1995). Bradykinin excites rat sympathetic neurons by inhibition of M current through a mechanism involving B2 receptors and G alpha q/11. *Neuron* 14, 399–405.
- Kang, C., Tian, C., Sönnichsen, F. D., Smith, J. A., Meiler, J., George, A. L. Jr, Vanoye, C. G., Kim, H. J., and Sanders, C. R. (2008). Structure of KCNE1 and implications for how it modulates the KCNQ1 potassium channel. *Biochemistry* 47, 7999–8006.
- Kapplinger, J. D., Tester, D. J., Salisbury, B. A., Carr, J. L., Harris-Kerr, C., Pollevick, G. D., Wilde, A. A. M., and Ackerman, M. J. (2009). Spectrum and prevalence of mutations from the first 2,500 consecutive unrelated patients referred for the FAMILION long QT syndrome genetic test. *Heart Rhythm* 6, 1297–1303.
- Kubisch, C., Schroeder, B. C., Friedrich, T., Lütjohann, B., El-Amraoui, A., Marlin, S., Petit, C., and Jentsch, T. J. (1999). KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell* 96, 437–446.
- Kwon, Y., Hofmann, T., and Montell, C. (2007). Integration of phosphoinositide- and calmodulin-mediated regulation of TRPC6. *Mol. Cell* 25, 491–503.
- Labro, A. J., Boulet, I. R., Choveau, F. S., Mayeur, E., Bruyns, T., Loussouarn, G., Raes, A. L., and Snyders, D. J. (2011). The S4–S5 linker of KCNQ1 channels forms a structural scaffold with the S6 segment controlling gate closure. *J. Biol. Chem.* 286, 717–725.
- Lai, L.-P., Su, Y.-N., Hsieh, F.-J., Chiang, F.-T., Juang, J.-M., Liu, Y.-B., Ho, Y.-L., Chen, W.-J., Yeh, S.-J., Wang, C.-C., Ko, Y. L., Wu, T. J., Ueng, K. C., Lei, M. H., Tsao, H. M., Chen, S. A., Lin, T. K., Wu, M. H., Lo, H. M., Huang, S. K., and Lin, J. L. (2005). Denaturing high-performance liquid chromatography screening of the long QT syndrome-related cardiac sodium and potassium channel genes and identification of novel mutations and single nucleotide polymorphisms. *J. Hum. Genet.* 50, 490–496.
- Larsson, H. P., Baker, O. S., Dhillon, D. S., and Isacoff, E. Y. (1996). Transmembrane movement of the shaker K⁺ channel S4. *Neuron* 16, 387–397.
- Ledwell, J. L., and Aldrich, R. W. (1999). Mutations in the S4 region isolate the final voltage-dependent cooperative step in potassium channel activation. *J. Gen. Physiol.* 113, 389–414.
- Lee, S.-Y., Banerjee, A., and MacKinnon, R. (2009). Two separate interfaces between the voltage sensor and pore are required for the function of voltage-dependent K(+) channels. *PLoS Biol.* 7, e47. doi:10.1371/journal.pbio.1000047
- Lee, S.-Y., Lee, A., Chen, J., and MacKinnon, R. (2005). Structure of the KvAP voltage-dependent K⁺ channel and its dependence on the lipid membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 15441–15446.
- Lehmann-Horn, F., and Jurkat-Rott, K. (1999). Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiol. Rev.* 79, 1317–1372.
- Lerche, C., Scherer, C. R., Seeböhm, G., Derst, C., Wei, A. D., Busch, A. E., and Steinmeyer, K. (2000). Molecular cloning and functional expression of KCNQ5, a potassium channel subunit that may contribute to neuronal M-current diversity. *J. Biol. Chem.* 275, 22395–22400.
- Lewis, A., Jogini, V., Blachowicz, L., Lainé, M., and Roux, B. (2008). Atomic constraints between the voltage sensor and the pore domain in a voltage-gated K⁺ channel of

- known structure. *J. Gen. Physiol.* 131, 549–561.
- Li, Y., Gamber, N., Hilgemann, D. W., and Shapiro, M. S. (2005). Regulation of Kv7 (KCNQ) K⁺ channel open probability by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Neurosci.* 25, 9825–9835.
- Li, Y., Zaydman, M. A., Wu, D., Shi, J., Guan, M., Virgin-Downey, B., and Cui, J. (2011). KCNE1 enhances phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) sensitivity of IKs to modulate channel activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 9095–9100.
- Lindner, M., Leitner, M. G., Halaszovich, C. R., Hammond, G. R. V., and Oliver, D. (2011). Probing the regulation of TASK potassium channels by PI4,5P with switchable phosphoinositide phosphatases. *J. Physiol. (Lond.)* 589, 3149–3162.
- Logothetis, D. E., Petrou, V. I., Adney, S. K., and Mahajan, R. (2010). Channelopathies linked to plasma membrane phosphoinositides. *Pflügers Arch.* 460, 321–341.
- Long, S. B., Campbell, E. B., and Mackinnon, R. (2005). Crystal structure of a mammalian voltage-dependent shaker family K⁺ channel. *Science* 309, 897–903.
- Long, S. B., Tao, X., Campbell, E. B., and MacKinnon, R. (2007). Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature* 450, 376–382.
- Lopes, C. M. B., Remon, J. I., Matavel, A., Sui, J. L., Keselman, I., Medei, E., Shen, Y., Rosenhouse-Dantsker, A., Rohacs, T., and Logothetis, D. E. (2007). Protein kinase A modulates PLC-dependent regulation and PIP₂-sensitivity of K⁺ channels. *Channels (Austin)* 1, 124–134.
- Lopes, C. M. B., Zhang, H., Rohacs, T., Jin, T., Yang, J., and Logothetis, D. E. (2002). Alterations in conserved Kir channel-PIP₂ interactions underlie channelopathies. *Neuron* 34, 933–944.
- Loussouarn, G., Park, K.-H., Bellocq, C., Baró, 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, Z., Klem, A. M., and Ramu, Y. (2001). Ion conduction pore is conserved among potassium channels. *Nature* 413, 809–813.
- Lu, Z., Klem, A. M., and Ramu, Y. (2002). Coupling between voltage sensors and activation gate in voltage-gated K⁺ channels. *J. Gen. Physiol.* 120, 663–676.
- 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.
- Matavel, A., and Lopes, C. M. B. (2009). PKC activation and PIP₂ depletion underlie biphasic regulation of IKs by Gq-coupled receptors. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 46, 704–712.
- Matavel, A., Medei, E., and Lopes, C. M. B. (2010). PKA and PKC partially rescue long QT type 1 phenotype by restoring channel-PIP₂ interactions. *Channels (Austin)* 4, 3–11.
- McCusker, E. C., D'Avanzo, N., Nichols, C. G., and Wallace, B. A. (2011). Simplified bacterial “pore” channel provides insight into the assembly, stability, and structure of sodium channels. *J. Biol. Chem.* 286, 16386–16391.
- Miceli, F., Vargas, E., Bezanilla, F., and Taglialetela, M. (2012). Gating currents from Kv7 channels carrying neuronal hyperexcitability mutations in the voltage-sensing domain. *Biophys. J.* 102, 1372–1382.
- Milescu, M., Bosmans, F., Lee, S., Alabi, A. A., Kim, J. I., and Swartz, K. J. (2009). Interactions between lipids and voltage sensor paddles detected with tarantula toxins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 1080–1085.
- Miller, A. G., and Aldrich, R. W. (1996). Conversion of a delayed rectifier K⁺ channel to a voltage-gated inward rectifier K⁺ channel by three amino acid substitutions. *Neuron* 16, 853–858.
- Moroni, A., Gazzarrini, S., Cerana, R., Colombo, R., Sutter, J. U., DiFrancesco, D., Gradmann, D., and Thiel, G. (2000). Mutation in pore domain uncovers cation- and voltage-sensitive recovery from inactivation in KAT1 channel. *Biophys. J.* 78, 1862–1871.
- Napolitano, C., Priori, S. G., Schwartz, P. J., Bloise, R., Ronchetti, E., Nastoli, J., Bottelli, G., Cerrone, M., and Leonardi, S. (2005). Genetic testing in the long QT syndrome: development and validation of an efficient approach to genotyping in clinical practice. *JAMA* 294, 2975–2980.
- Neyroud, N., Tesson, F., Denjoy, I., Leïbovici, M., Donger, C., Barhanin, J., Fauré, 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.
- Oliver, D., Lien, C.-C., Soom, M., Baukrowitz, T., Jonas, P., and Fakler, B. (2004). Functional conversion between A-type and delayed rectifier K⁺ channels by membrane lipids. *Science* 304, 265–270.
- Pape, H. C. (1996). Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 58, 299–327.
- Park, K.-H., Piron, J., Dahimene, S., Mérot, J., Baró, 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.
- Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N., and Catterall, W. A. (2011). The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* 475, 353–358.
- Pian, P., Bucchini, A., Robinson, R. B., and Siegelbaum, S. A. (2006). Regulation of gating and rundown of HCN hyperpolarization-activated channels by exogenous and endogenous PIP₂. *J. Gen. Physiol.* 128, 593–604.
- Pietrobon, D. (2007). Familial hemiplegic migraine. *Neurotherapeutics* 4, 274–284.
- Prole, D. L., and Yellen, G. (2006). Reversal of HCN channel voltage dependence via bridging of the S4–S5 linker and Post-S6. *J. Gen. Physiol.* 128, 273–282.
- Restier, L., Cheng, L., and Sanguinetti, M. C. (2008). Mechanisms by which atrial fibrillation-associated mutations in the S1 domain of KCNQ1 slow deactivation of IKs channels. *J. Physiol. (Lond.)* 586, 4179–4191.
- Roche, J. P., Westenbroek, R., Sorom, A. J., Hille, B., Mackie, K., and Shapiro, M. S. (2002). Antibodies and a cysteine-modifying reagent show correspondence of M current in neurons to KCNQ2 and KCNQ3 K⁺ channels. *Br. J. Pharmacol.* 137, 1173–1186.
- Rodriguez, N., Amarouch, M. Y., Montnach, J., Piron, J., Labro, A. J., Charpentier, F., Mérot, J., Baró, I., and Loussouarn, G. (2010). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) stabilizes the open pore conformation of the Kv11.1 (hERG) channel. *Biophys. J.* 99, 1110–1118.
- Rohács, T., Lopes, C., Mirshahi, T., Jin, T., Zhang, H., and Logothetis, D. E. (2002). Assaying phosphatidylinositol bisphosphate regulation of potassium channels. *Meth. Enzymol.* 345, 71–92.
- Rosenhouse-Dantsker, A., and Logothetis, D. E. (2007). Molecular characteristics of phosphoinositide binding. *Pflügers Arch.* 455, 45–53.
- Ruta, V., Chen, J., and MacKinnon, R. (2005). Calibrated measurement of gating-charge arginine displacement in the KvAP voltage-dependent K⁺ channel. *Cell* 123, 463–475.
- 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 IKs 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.
- Sanguinetti, M. C., and Tristani-Firouzi, M. (2006). hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature* 440, 463–469.
- Sanguinetti, M. C., and Xu, Q. P. (1999). Mutations of the S4–S5 linker alter activation properties of HERG potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol. (Lond.)* 514(Pt 3), 667–675.
- Sarria, I., Ling, J., Zhu, M. X., and Gu, J. G. (2011). TRPM8 acute desensitization is mediated by calmodulin and requires PIP₂: distinction from tachyphylaxis. *J. Neurophysiol.* 106, 3056–3066.
- Schmidt, D., Jiang, Q.-X., and MacKinnon, R. (2006). Phospholipids and the origin of cationic gating charges in voltage sensors. *Nature* 444, 775–779.
- Schroeder, B. C., Hechenberger, M., Weinreich, F., Kubisch, C., and Jentsch, T. J. (2000). KCNQ5, a novel potassium channel broadly expressed in brain, mediates M-type currents. *J. Biol. Chem.* 275, 24089–24095.
- Shah, M. M., Mistry, M., Marsh, S. J., Brown, D. A., and Delmas, P. (2002). Molecular correlates of the M-current in cultured rat hippocampal neurons. *J. Physiol. (Lond.)* 544, 29–37.
- Shapiro, M. S., Roche, J. P., Kaftan, E. J., Cruzblanca, H., Mackie, K., and Hille, B. (2000). Reconstitution of the KCNQ2/KCNQ3 K(+) channels that underlie the neuronal M current. *J. Neurosci.* 20, 1710–1721.
- Shaya, D., Kreir, M., Robbins, R. A., Wong, S., Hammon, J., Brüggemann,

- A., and Minor, D. L. Jr. (2011). Voltage-gated sodium channel (NaV) protein dissection creates a set of functional pore-only proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 12313–12318.
- Smith, J. A., Vanoye, C. G., George, A. L. Jr., Meiler, J., and Sanders, C. R. (2007). Structural models for the KCNQ1 voltage-gated potassium channel. *Biochemistry* 46, 14141–14152.
- Smith, P. L., Baukowitz, T., and Yellen, G. (1996). The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature* 379, 833–836.
- Stefani, E., Toro, L., Perozo, E., and Bezanilla, F. (1994). Gating of shaker K⁺ channels: I. Ionic and gating currents. *Biophys. J.* 66, 996–1010.
- Suh, B.-C., and Hille, B. (2002). Recovery from muscarinic modulation of M current channels requires phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis. *Neuron* 35, 507–520.
- Suh, B.-C., and Hille, B. (2007). Regulation of KCNQ channels by manipulation of phosphoinositides. *J. Physiol. (Lond.)* 582, 911–916.
- Suh, B.-C., and Hille, B. (2008). PIP₂ is a necessary cofactor for ion channel function: how and why? *Annu. Rev. Biophys.* 37, 175–195.
- Suh, B.-C., Inoue, T., Meyer, T., and Hille, B. (2006). Rapid chemically induced changes of PtdIns(4,5)P₂ gate KCNQ ion channels. *Science* 314, 1454–1457.
- Suh, B.-C., Kim, D.-I., Falkenburger, B. H., and Hille, B. (2012). Membrane-localized β -subunits alter the PIP₂ regulation of high-voltage activated Ca²⁺ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 3161–3166.
- Telezhkin, V., Reilly, J. M., Thomas, A. M., Tinker, A., and Brown, D. A. (2012). Structural requirements of membrane phospholipids for M-type potassium channel activation and binding. *J. Biol. Chem.* 287, 10001–10012.
- Tempel, B. L., Papazian, D. M., Schwarz, T. L., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (1987). Sequence of a probable potassium channel component encoded at shaker locus of *Drosophila*. *Science* 237, 770–775.
- Tester, D. J., Will, M. L., Haglund, C. M., and Ackerman, M. J. (2005). Compendium of cardiac channel mutations in 541 consecutive unrelated patients referred for long QT syndrome genetic testing. *Heart Rhythm* 2, 507–517.
- Thomas, A. M., Harmer, S. C., Khambra, T., and Tinker, A. (2011). Characterization of a binding site for anionic phospholipids on KCNQ1. *J. Biol. Chem.* 286, 2088–2100.
- Tombola, F., Pathak, M. M., and Isacoff, E. Y. (2006). How does voltage open an ion channel? *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 23–52.
- Tristani-Firouzi, M., Chen, J., and Sanguinetti, M. C. (2002). Interactions between S4–S5 linker and S6 transmembrane domain modulate gating of HERG K⁺ channels. *J. Biol. Chem.* 277, 18994–19000.
- 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.
- Wall-Lacelle, S., Hossain, M. I., Sauvé, R., Blunck, R., and Parent, L. (2011). Double mutant cycle analysis identified a critical leucine residue in the IIS4S5 linker for the activation of the Ca(V)₂.3 calcium channel. *J. Biol. Chem.* 286, 27197–27205.
- Walsh, K. B., and Kass, R. S. (1988). Regulation of a heart potassium channel by protein kinase A and C. *Science* 242, 67–69.
- Wang, J., Trudeau, M. C., Zappia, A. M., and Robertson, G. A. (1998a). Regulation of deactivation by an amino terminal domain in human ether-à-go-go-related gene potassium channels. *J. Gen. Physiol.* 112, 637–647.
- 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.
- Warmke, J. W., and Ganetzky, B. (1994). A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 3438–3442.
- Wen, H., and Levitan, I. B. (2002). Calmodulin is an auxiliary subunit of KCNQ2/3 potassium channels. *J. Neurosci.* 22, 7991–8001.
- Whorton, M. R., and Mackinnon, R. (2011). Crystal structure of the mammalian GIRK2 K(+) channel and gating regulation by G proteins, PIP(2), and sodium. *Cell* 147, 199–208.
- Winks, J. S., Hughes, S., Filippov, A. K., Tatulian, L., Abogadie, F. C., Brown, D. A., and Marsh, S. J. (2005). Relationship between membrane phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and receptor-mediated inhibition of native neuronal M channels. *J. Neurosci.* 25, 3400–3413.
- Wu, L., Bauer, C. S., Zhen, X., Xie, C., and Yang, J. (2002). Dual regulation of voltage-gated calcium channels by PtdIns(4,5)P₂. *Nature* 419, 947–952.
- Xu, Y., Ramu, Y., and Lu, Z. (2008). Removal of phospho-head groups of membrane lipids immobilizes voltage sensors of K⁺ channels. *Nature* 451, 826–829.
- Yang, N., and Horn, R. (1995). Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channels. *Neuron* 15, 213–218.
- Yarov-Yarovoy, V., Baker, D., and Catterall, W. A. (2006). Voltage sensor conformations in the open and closed states in ROSETTA structural models of K(+) channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 7292–7297.
- Yarov-Yarovoy, V., DeCaen, P. G., Westbroek, R. E., Pan, C.-Y., Scheuer, T., Baker, D., and Catterall, W. A. (2012). Structural basis for gating charge movement in the voltage sensor of a sodium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, E93–E102.
- Zagotta, W. N., Hoshi, T., and Aldrich, R. W. (1994a). Shaker potassium channel gating. III: Evaluation of kinetic models for activation. *J. Gen. Physiol.* 103, 321–362.
- Zagotta, W. N., Hoshi, T., Dittman, J., and Aldrich, R. W. (1994b). Shaker potassium channel gating. II: Transitions in the activation pathway. *J. Gen. Physiol.* 103, 279–319.
- Zaika, O., Lara, L. S., Gamper, N., Hilgemann, D. W., Jaffe, D. B., and Shapiro, M. S. (2006). Angiotensin II regulates neuronal excitability via phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent modulation of Kv7 (M-type) K⁺ channels. *J. Physiol. (Lond.)* 575, 49–67.
- Zaika, O., Tolstykh, G. P., Jaffe, D. B., and Shapiro, M. S. (2007). Inositol triphosphate-mediated Ca²⁺ signals direct purinergic P2Y receptor regulation of neuronal ion channels. *J. Neurosci.* 27, 8914–8926.
- Zaika, O., Zhang, J., and Shapiro, M. S. (2011). Combined phosphoinositide and Ca²⁺ signals mediating receptor specificity toward neuronal Ca²⁺ channels. *J. Biol. Chem.* 286, 830–841.
- Zhang, H., Craciun, L. C., Mirshahi, T., Rohács, T., Lopes, C. M. B., Jin, T., and Logothetis, D. E. (2003). PIP(2) activates KCNQ channels, and its hydrolysis underlies receptor-mediated inhibition of M currents. *Neuron* 37, 963–975.
- Zhang, X., Chen, X., Jia, C., Geng, X., Du, X., and Zhang, H. (2010). Depolarization increases phosphatidylinositol (PI) 4,5-bisphosphate level and KCNQ currents through PI 4-kinase mechanisms. *J. Biol. Chem.* 285, 9402–9409.
- Zheng, H., Liu, W., Anderson, L. Y., and Jiang, Q.-X. (2011). Lipid-dependent gating of a voltage-gated potassium channel. *Nat. Commun.* 2, 250.

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 23 April 2012; accepted: 14 June 2012; published online: 05 July 2012.

Citation: Choveau FS, Abderemane-Ali F, Cayan FC, Es-Salah-Lamoureux Z, Baró I and Loussouarn G (2012) Opposite effects of the S4–S5 linker and PIP₂ on voltage-gated channel function: KCNQ1/KCNE1 and other channels. *Front. Pharmacol.* 3:125. doi: 10.3389/fphar.2012.00125

This article was submitted to *Frontiers in Pharmacology of Ion Channels and Channelopathies*, a specialty of *Frontiers in Pharmacology*.

Copyright © 2012 Choveau, Abderemane-Ali, Cayan, Es-Salah-Lamoureux, Baró and Loussouarn. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in other forums, provided the original authors and source are credited and subject to any copyright notices concerning any third-party graphics etc.

Résumé

Les canaux ioniques voltage-dépendants appartiennent généralement à un complexe canalaire multi-protéique composé d'une sous-unité canalaire α qui constitue le pore, et de sous-unités auxiliaires ou régulatrices. En plus du potentiel membranaire et des protéines partenaires, l'activité des canaux ioniques cardiaques est également modulée par la phosphorylation, mais aussi par les lipides membranaires. Un défaut de modulation de l'activité des canaux par ces régulateurs entraîne des pathologies cardiaques appelées canalopathies. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de régulation des canaux ioniques cardiaques est une étape indispensable pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques contre les canalopathies cardiaques. Dans ce contexte, mes travaux de recherche de thèse ont porté sur l'étude des mécanismes de régulation physiologiques et pathologiques des canaux ioniques cardiaques KCNQ1 et $\text{Na}_v1.5$. Mon premier projet de thèse a consisté à déterminer les mécanismes moléculaires responsables de la stabilisation du canal KCNQ1 à l'état ouvert lorsqu'il porte la mutation R539W, retrouvé chez des patients atteints d'une forme sévère du syndrome du QT long. Nous montrons dans cette étude que la mutation R539W provoque une interaction nouvelle entre le canal KCNQ1 et le cholestérol membranaire. Mon deuxième projet de thèse a porté sur l'identification des résidus sérines/thréonines phosphorylés du canal $\text{Na}_v1.5$ et les conséquences fonctionnelles dans l'insuffisance cardiaque. Nous montrons que les sérines S1933 et S1984, qui sont phosphorylées dans un modèle de souris surexprimant la CaMKII, sont impliquées dans la régulation des propriétés d'inactivation du canal.

Mots clés : Canaux ioniques, KCNQ1, PIP_2 , Cholestérol, $\text{Na}_v1.5$, Phosphorylation, I_{NaL} .

Abstract

Voltage-dependent ion channels usually belong to a multiproteic complex composed of a subunit forming the pore, and auxiliary or regulating subunits. As well as membrane potential and associated proteins, cardiac ionic channels activity is regulated by phosphorylation, but also by membrane lipids. Alteration in modulation of channel activity by those regulators leads to cardiac pathologies named channelopathies. A better understanding in molecular mechanisms of cardiac ionic channels is an essential step in the development of new therapeutic approaches for cardiac channelopathies. In light of this, my thesis researches entailed to study physiologic and pathologic regulation mechanisms of the ionic cardiac channels KCNQ1 and $\text{Na}_v1.5$. My first thesis project was focused on the study of the molecular mechanisms underlying stabilization of KCNQ1 in the open state when carrying the R539W mutation, found in patients with severe form of long QT syndrome. We show in this study that the R539W mutation causes a new interaction between KCNQ1 channel and membrane cholesterol. My second thesis project was about the identification of phosphorylated serines/threonines residues of $\text{Na}_v1.5$ channel and functional consequences in heart failure. We show that serines S1933 and S1984, which are phosphorylated in mouse model of CaMKII overexpression, are involved in regulation of channel inactivation properties.

Keywords : Ion channels, KCNQ1, PIP_2 , Cholesterol, $\text{Na}_v1.5$, Phosphorylation, I_{NaL} .