



HAL
open science

Rôle de la protéine CASK dans l'organisation des sous populations de canaux ioniques dans le myocyte et dans l'électrophysiologie cardiaque in vivo

Adeline Beuriot

► To cite this version:

Adeline Beuriot. Rôle de la protéine CASK dans l'organisation des sous populations de canaux ioniques dans le myocyte et dans l'électrophysiologie cardiaque in vivo. Biochimie, Biologie Moléculaire. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS528 . tel-02947049

HAL Id: tel-02947049

<https://theses.hal.science/tel-02947049>

Submitted on 23 Sep 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE DE DOCTORAT DE SORBONNE UNIVERSITÉ

École Doctorale "*Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique*" (ED394)

Réalisée au sein de l'unité **INSERM UMRS 1166** dans l'équipe n°3
"Physiopathologie de l'excitabilité cellulaire"

Rôle de la protéine CASK dans l'organisation des sous
populations de canaux ioniques dans le myocyte et dans
l'électrophysiologie cardiaque *in vivo*

Présentée par

Melle Adeline BEURIOT

Dirigée par

Dr Élise BALSE

Présentée et soutenue publiquement le 12 Octobre 2018

Pr Isabelle LIMON

Pr Jean-François FAIVRE

Dr Sylvain RICHARD

Dr Isabelle BARÓ

Dr Catherine COIRAULT

Présidente du Jury

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examinatrice

Remerciements

Mes premiers remerciements vont à ma directrice de thèse, le Docteur Elise Balse qui m'a accompagnée sur ce projet durant un peu plus de quatre années. Merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir accordée suffisamment d'indépendance dans mon travail tout en étant toujours disponible et ce depuis n'importe quel pays. Merci pour ton soutien, et dieu seul sait à quel point il en fallut, face à cette petite protéine CASK qui nous a donné du fil à retordre par moment et qui t'a causé plusieurs insomnies. Tu as toujours su être à l'écoute tant sur un plan humain pendant les périodes difficiles que sur le plan professionnel afin de m'aiguiller et de trouver des solutions devant les problèmes rencontrés. J'ai beaucoup appris à tes côtés et tu as largement contribué à développer mon esprit scientifique sans lequel ce manuscrit n'aurait pas vu le jour. Quand je vois le chemin parcouru depuis mon arrivée dans l'équipe, je pense sans aucun doute que tes nombreux conseils m'ont permis de progresser au fil des années.

Je remercie le Professeur Stéphane Hatem de m'avoir accueillie dans son laboratoire, ainsi que dans son équipe, lorsqu'en 2014 je foulais pour la première fois le 3^{ème} étage du 91 au cours de mon stage de master.

Très honorée de leur présence, je tiens à remercier les membres du jury, le Professeur Isabelle Limon pour avoir accepté la présidence de ce jury, le Professeur Jean-François Faivre et le Docteur Sylvain Richard pour avoir évalué mon travail, le Docteur Isabelle Baró et le Docteur Catherine Coirault pour d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Cette thèse a été financée pendant trois ans grâce à une bourse d'Allocation à la recherche (MENRT) et je remercie l'AFM Téléthon pour m'avoir fourni le financement nécessaire à l'aboutissement de ce travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement les membres de l'unité U1166 qui ont contribué à rendre le quotidien du laboratoire riche de découvertes, de surprises, de rires, de sourires et surtout d'une sacrée dose de bonne humeur, j'ai croisé ici le chemin de personnes que je ne suis pas prête d'oublier !

Tout d'abord un immense merci à Nadine, Gilles, Nicolas et Jean-Pierre, mes colocataires de bureau que j'ai, un tout petit peu, mais alors vraiment un chouïa, embêtés. Tout le monde sait que je suis un petit ange ! Ceux qui parlent de « démon avec des cornes » ou de « petite peste », je ne vois pas du tout de quoi vous parlez...puis qui pourrait vous croire sans preuves ? Hein ?! Merci aussi aux autres membres de l'équipe 3.

Merci Nadine, enfin je devrais plutôt dire à Nadline, oui parce que Adeline/Nadine/trop de « ine » ça porte à confusion alors nous avons créé ce prénom, simple à retenir, qui marche pour l'une comme pour l'autre et qui évite aux gens de cafouiller. Ensemble, on aura bien cassé les oreilles des garçons avec nos heures de discussion dans le bureau, en manips, dans le couloir, entre deux portes, dehors, à table... de vraies pipelettes toutes les deux ! Je ne suis pas prête d'oublier nos crises de fous rires à en pleurer souvent à cause de ta maladresse ou plutôt de ton surplus de force, je regrette de ne pas

avoir été équipée d'une *gopro* pour filmer tout ça ! En tout cas, je sais que si on ouvre un *Food Truck*, tu ne seras pas missionnée pour emballer les tartelettes, quand je pense au résultat lorsque tu as voulu reproduire la petite pyramide que fait la boulangère... rien que d'y penser j'en ris encore ! Merci d'avoir contribué à rendre le quotidien aussi joyeux et agréable, au labo et en dehors. Je pense à nos départs en congrès, à mes bananes trop mûres écrasées dans ton sac, à nos batailles pour la climatisation et à notre retour épique de Vienne. Puis entre nous l'histoire est loin d'être finie, je te rappelle que le petit R m'est promis à sa majorité !!

Merci Gilles, j'ai eu beau fouillé dans mon vieux bottin, je n'ai pas encore trouvé les coordonnées d'un magicien vaudou spécialiste en exorcisme et magie noire qui pourrait démarabouter le Langendorff. Avec le temps, (va tout s'en va *-vengeance personnelle-*) j'ai bien compris que si le Langendorff a décidé dans les pires moments de ne plus marcher, il n'y malheureusement pas d'explications rationnelles. Peut-être faudrait-il l'immoler ? On dansera autour tout en criant *Burn Baby Burn* tu rigoleras avec ton rire tonitruant qui ameutera tout l'étage ! Puis quand le brasier sera fini, on ira *far faraway* chercher à manger tout en débattant sur les derniers films à l'affiche, de Jake Gyllenhaal et de Tom Hardy, de séries et autres films (que je n'ai pas encore vus mais je vais rattraper mon retard même si tu n'y crois plus) ensuite tu me mettras une superbe musique bien enquiquinante dans la tête parce que ton cerveau est branché sur Chant De France, RFM et je ne sais quelle autre station en permanence, pour notre plus grand désespoir ! Santé à Jojo la Caravane et Mr Marchand !

Merci Nicolas, avec ton franc-parler et tes petites piques souvent destinées à Nadine qui ont toujours fait mouche, l'obligeant à sortir de sa grotte pour riposter. Vos guéguerres vont me manquer ! Merci d'avoir toujours répondu à mes questions d'électrophys (même celles de dernière minute) et d'avoir contribué à mon engraissement avec les madeleines 24h et les kilos de cookies !

Merci Jean-Pierre, pour ta bonne humeur à toute heure de la journée, pour t'être aussi bien intégré dans notre bureau de joyeux lurons. Finalement, tu es aussi bavard que nous ! On pourra bientôt te décerner le trophée des 1001 *western blots* réalisés.

Merci Monique, pour votre gentillesse et pour toutes les discussions que l'on a pu avoir pendant que je réquisitionnais les paillasses de biochimie et de qPCR du labo. Même si ces derniers mois, vous m'avez taquinée en me demandant toutes les semaines si j'avais fini d'écrire ma thèse, je sais qu'au fond c'était une manière détournée pour savoir où j'en étais. Je vous souhaite beaucoup de courage pour les prochaines étapes de votre brevet, je suis impatiente d'en voir le résultat final.

Merci Alain, pour avoir initié des générations de *patcheurs* et avoir toujours résolu le moindre petit problème rencontré sur les installations. J'ai eu beau essayé, je ne comprends toujours pas le code qui fait tourner Elphy, tu es bien le seul à pouvoir le lire.

Merci Nathalie M. pour ta bonne humeur, ta gentillesse et pour toute l'aide que tu nous as apportée pour notre étude *in vivo*.

Je remercie aussi Malorie, encore un prénom avec un « i » qui a lui aussi apporté moult confusions. Les allers et venues entre nos bureaux complètement opposés ont contribué aux 10.000 pas journaliers recommandés par l'Organisation Mondiale de la Santé. Je suis tout de même entièrement d'accord pour l'installation d'un stand de trottinettes en libre-service dans le couloir. Je me rappelle comme si c'était hier du fameux « Mercure (love) Hotel » de Nantes, qu'est-ce qu'on a ri en découvrant la

chambre ! Après tout, pourquoi s'embêter à faire de vraies cloisons ? Le verre c'est plus tendance. On aura vécu notre fin de thèse en décalé mais on se sera mutuellement soutenues à base de longues discussions jusqu'au bout de la nuit et de nombreux petits délires. Sans compter les pauses bien méritées autour d'un couscous ultra light. Je n'oublie pas le CDI de câlineur de chats, je te jure que si je vois une offre passée, j'envoie nos CVs et puis sinon on ouvrira notre école pour chatons, on a déjà trouvé tellement d'idées pour la déco et les activités ! Courage pour la dernière ligne droite !

Mille mercis à toute la team de djeun's, mention spéciale au fraîchement diplômé Docteur Olivier tu as musclé mon cerveau quotidiennement entre 18h30 et 19h avec tes questions farfelues, à Tiphaine pour les noëls de l'unité toujours réussis et ton énergie débordante, à Marion tu t'es tellement vite intégrée qu'on pourrait croire que tu as toujours fait partie de l'unité, à Dorota qui continue à être partante pour toutes nos idées de sorties, pour ton soutien et ton oreille attentive quand tu étais encore au labo, à Maguelonne qui est descendue d'un étage chaque jour à l'heure du déjeuner et à ta folie lors des soirées, à Mathilde qui fait partie de la prochaine cuvée des soutenances, on va devoir t'abandonner mais on sera tous là pour le jour J, courage ! À Elodie, nouvellement arrivée, je te souhaite bonne chance pour la suite. J'oublie certainement des gens et je m'en excuse mais je remercie tous ceux qui ont participé à nos sorties. Encore merci pour tous ces bons moments passés ensemble autour des soirées de jeux de société, de *blind test* où avec Marion on a fait de la figuration (t'inquiète pas, un jour on sera meilleures qu'eux), d'heures de karaoké endiablées où les tympanes ont saigné jusqu'à la dernière note, de bonnes boustifailles sans fruits et sans légumes, de boissons pas du tout alcoolisées, d'escape games, de congrès, de fous rires, de longues discussions et pour tous ces petits riens qui boostent le moral.

Je n'oublie pas non plus l'ancienne équipe 3 qui m'a accueillie dans "la mangeoire" quand je suis arrivée. Merci à Camille, tu as été un véritable pilier pendant mes deux premières années de thèse, merci pour ton soutien, tes encouragements, toutes nos discussions, pour ces kilos de gâteaux ingurgités (pour la bonne cause). Ton départ aura laissé un grand vide, j'espère qu'on aura l'occasion de se revoir si je passe un jour par Montréal. Merci à Catherine pour m'avoir initiée au projet CASK et pour notre complémentarité lors des manips rocambolesques pour les révisions du papier. Merci à Florent pour avoir tenté de gouverner ce harem de filles, de nous avoir chouchoutées à coup de friandises sucrées et aidées dans nos manips. Je ne suis pas prête d'oublier la démolition de notre micro bureau alors que nous étions toujours dedans ! Merci à Céline pour ta grande gentillesse et ta discrétion, tu as toujours été disponible pour m'aider, sans compter tes démonstrations de yoga dans le bureau et j'espère te revoir très prochainement. Une pensée également pour Christine, notre ancienne secrétaire de choc qui a réussi par vents et marées à résoudre tous nos problèmes, merci pour votre dynamisme, c'est toujours un plaisir quand vous passez nous voir.

Merci également aux stagiaires, médecins et scientifiques qui sont venus gonfler nos rangs pour plusieurs mois, aux fous rires devant des manips totalement ratées, de la maladresse de certains, d'avoir animé la vie au laboratoire et m'avoir permis de transmettre un peu de mes connaissances.

Merci à ma Pauline et mon binôme tout terrain Yohan, qui sont allés comme moi jusqu'au doctorat et avec qui j'ai pu partager les bons et les mauvais côtés de cette aventure. On aura décompressé au cinéma, autour d'un verre, de petites collations (ah cette « boneuh racleteuh ») et passé des heures à parler de tout et de rien. Je suis désolée Yohan de t'avoir fait procrastiner sur CMD mais c'était bien mérité après les brochettes de thon ! Merci à tous les deux de toujours répondre présent, la suite est pour vous aussi.

Toutes les personnes concernées sauront se reconnaître dans ces quelques lignes, un million de mercis ne saurait suffire pour mes amis. Ceux qui écument avec moi les salles de concerts parisiennes depuis des années, qui sont curieux d'aller découvrir des expositions, qui font gonfler ma cagnotte LaFourchette, qui viennent *bruncher*, qui sont toujours partants pour l'apéro, qui savent que je ne deviendrai jamais végétarienne car la charcuterie c'est une base élémentaire de mon alimentation, qui me font tant rire, qui se moquent de mon bronzage blanc à blanc cassé, qui se servent de moi comme d'appât à moustiques, qui peuvent aussi avoir trois ans d'âge mental, qui ont grandi et qui grandissent encore avec moi, qui ne ratent jamais un rendez-vous raclette, qui ne me font jamais la tête très longtemps même si j'arrive toujours en retard, avec qui je peux passer des heures au téléphone, qui viennent en virée shopping avec moi, qui disent oui à une soirée Netflix, à ceux qui acceptent de me supporter des jours entiers pendant les vacances et les week-ends (pauvres fous !), ou ceux avec qui l'éloignement ne change rien, et ceux toujours en vadrouille, pour ces personnes que je connais depuis 17 ans, depuis 12 ans ou depuis le premier TP à la fac où tout a commencé avec un simple « Tu n'as personne toi aussi, tu veux qu'on se mette en binôme ? », juste merci d'être là !

Je garde le meilleur des remerciements pour la fin, mes dernières pensées vont à ma famille. À mon papa qui n'aura pas vu la fin de ce travail mais qui en aurait été fier, je le sais. À mon frère, qui n'a toujours pas retenu le sujet sur lequel travaille sa sœur ! Et enfin à ma maman, ma première fan, je me revois te présentant mon oral pour le concours de la bourse de thèse il y a quatre ans de cela, nous voici maintenant à l'aboutissement de tout ce travail. Merci d'avoir toujours cru en nous, pour tes encouragements et ton soutien sans faille.

Table des Matières

Introduction

A.	Activités électriques et mécaniques cardiaques	1
1.	Automatisme cardiaque	1
2.	Le potentiel d'action	3
3.	Le couplage excitation-contraction	5
4.	Le cardiomyocyte, unité fonctionnelle du cœur	7
5.	Trafic et répartition des canaux ioniques dans le cardiomyocyte.....	12
B.	Le canal sodique Nav1.5	18
1.	Structure protéique et localisation.....	19
2.	Activation et inactivation du canal Nav _v 1.5.....	21
a.	Activation du canal Nav _v 1.5	21
b.	Sélectivité du canal Nav _v 1.5	22
c.	Inactivation du canal Nav _v 1.5.....	23
3.	Canalopathies cardiaques liées au canal Nav _v 1.5	25
4.	Partenaires du canal Nav _v 1.5	26
C.	Les protéines MAGUKs.....	32
1.	La superfamille des MAGUKs	32
2.	Le rôle des MAGUKs dans le cœur	37
D.	La protéine CASK	40
1.	Description générale.....	40
2.	Les domaines fonctionnels de CASK : structures et fonctions.....	44
a.	Le domaine CAMKII.....	45
b.	Les domaines L27A et L27B.....	47
c.	Le domaine PDZ	49
d.	Le domaine SH3	51
e.	Le domaine HOOK.....	52
f.	Le domaine GUK.....	54
3.	Dysfonctions de la protéine CASK, quelles conséquences ?	58
a.	Chez le rongeur	58
b.	Chez l'Homme	60
E.	Objectifs de travail	62

Matériels et Méthodes

A.	Culture cellulaire	63
1.	Isolement et culture de cardiomyocytes de rats adultes.....	63
2.	Lignée cellulaire – HEK-293	64
B.	Transfections et infections adénovirales	64
1.	Infections adénovirales	65
2.	Transfection	65
C.	Traitements pharmacologiques	66
D.	Biochimie	67
1.	Extractions et dosages protéiques	67
a.	À partir de cellules en culture	67
b.	À partir de tissus.....	68
2.	Western Blot	68
3.	Biotinylation des protéines de surface.....	69
4.	Co-immunoprécipitation.....	70
5.	GST-pull down	71
E.	Imagerie	71
1.	Préparation des échantillons	71
2.	Immunofluorescence.....	72
3.	Acquisition des images	72
a.	Microscopie 3D à déconvolution.....	72
b.	Microscopie TIRF.....	74
F.	Anticorps	75
G.	Étude de l'expression des gènes	75
1.	Extraction des ARNs et dosage.....	75
2.	Reverse Transcriptase (RT) et PCR quantitative	76
H.	Électrophysiologie cellulaire	77
1.	Enregistrement des courants en configuration cellule entière.....	78
a.	Matériel	78
b.	Enregistrement des courants	78
2.	Solutions d'enregistrement.....	79
I.	Traitements des données et analyses statistiques	80

Résultats

A.	Projet 1	81
1.	Contexte et objectif.....	81
2.	Publication 1 : <i>“Lateral membrane-specific MAGUK CASK down-regulates Na_v1.5 channel in cardiac myocytes”</i>	81
3.	Résumé des résultats.....	109
4.	Résultats complémentaires	111
5.	Conclusion.....	115
B.	Projet 2	116
1.	Contexte et objectif.....	116
2.	Publication 2 : <i>“CASK couples sodium channel exocytosis to cell adhesions in cardiomyocytes via distinct functional domains”</i>	109
3.	Résumé des résultats.....	137
4.	Résultats complémentaires	138
5.	Conclusion.....	145
C.	Projet 3	146
1.	Contexte et objectif.....	146
2.	Résultats	148
3.	Conclusion.....	165

Discussion et Perspectives

A.	Résumé des travaux	166
B.	Discussion et perspectives	167

<u>Références Bibliographiques</u>	177
--	------------

Liste des Figures et Tableaux

Figure 1 : Système de conduction cardiaque	2
Figure 2 : Le potentiel d'action cardiaque.....	4
Figure 3 : Le couplage excitation-contraction dans le cardiomyocyte.....	6
Figure 4 : Domaines spécialisés du sarcolemme des cardiomyocytes.....	7
Figure 5 : Structures des deux complexes protéiques présents au costamère	10
Figure 6 : Structure du disque intercalaire des cardiomyocytes.....	12
Figure 7 : Trafic des canaux ioniques : voies antérograde et rétrograde	15
Figure 8 : Régulation différentielle du courant sodique dans les domaines spécialisés du cardiomyocyte	17
Figure 9 : Modèle des sous populations de canaux sodiques Nav1.5 au sein du sarcolemme du cardiomyocyte.....	17
Figure 10 : Structure du canal sodique Nav1.5.	19
Figure 11 : Passage des ions sodium à travers le filtre de sélectivité du canal Nav1.5.....	23
Figure 12 : Les trois états conformationnels d'un canal ionique dépendant du potentiel.....	25
Figure 13 : Partenaires identifiés du canal sodique Nav1.5.....	31
Figure 14 : La superfamille des protéines Membrane Associated Guanylate Kinases.....	33
Figure 15 : Agencement des domaines fonctionnels de la protéine CASK.....	45
Figure 16 : Les protéines partenaires du domaine CAMKII de CASK.....	47
Figure 17 : Les protéines partenaires des domaines L27A et L27B de CASK.....	49
Figure 18 : Les protéines partenaires du domaine PDZ de CASK.....	51
Figure 19 : Les interactions possibles entre les domaines SH3-GUK de la protéine CASK.....	52
Figure 20 : Les protéines partenaires du domaine GUK de CASK.....	56
Figure 21 : Rôle de la protéine CASK dans la formation et le maintien de l'architecture de la synapse.....	57
Figure 22 : Principe du traitement des images par la déconvolution.....	73
Figure 23 : Principe de la microscopie TIRF, comparaison avec l'épifluorescence.....	74
Figure 24 : Organisation des protéines MAGUKs dans le cardiomyocyte.....	82
Figure 15 : La destinée des canaux sodiques Nav1.5 vers la membrane est influencée par ses partenaires.....	110
Figure 26 : Les traitements aux inhibiteurs du protéasome, ALLN et MG-132 n'altèrent pas la morphologie des cardiomyocytes.....	112
Figure 27 : Distribution du canal Nav1.5 à la membrane du cardiomyocyte atrial en présence de CASK et d'inhibiteurs du protéasome.....	113

Figure 28 : La protéine CASK ne participe pas à la dégradation des canaux $Na_v1.5$	114
Figure 29 : Le courant sodique I_{Na} en présence de la protéine CASK surexprimée n'est pas restauré après un traitement au MG-132 dans les cellules atriales de rats adultes.....	115
Figure 30 : Représentation schématique du complexe macromoléculaire composé de la protéine CASK, du complexe Dystrophine-Glycoprotéines et du canal sodique $Na_v1.5$ à la membrane latérale des cardiomyocytes.....	138
Figure 31 : Le courant potassique I_{K1} est régulé négativement par la protéine CASK dans les cardiomyocytes ventriculaires de rats adultes.....	140
Figure 32 : Le courant potassique I_{to} n'est pas régulé par la protéine CASK dans les cardiomyocytes ventriculaires de rats adultes.....	141
Figure 33 : L'inhibition de la protéine CASK ne modifie pas l'expression protéique des canaux potassiques $Kir2.x$, $K_v4.x$ et $Kir3.1$	142
Figure 34 : Le courant potassique I_{Kur} n'est pas régulé par la protéine CASK dans les cellules atriales de rats adultes.....	143
Figure 35 : Le courant calcique I_{Ca} est régulé négativement par la protéine CASK dans les cardiomyocytes ventriculaires de rats adultes.....	144
Figure 36 : Représentation schématique de la propagation anisotrope du potentiel d'action.....	146
Figure 37 : Différence de morphologie entre des cardiomyocytes en culture et des cardiomyocytes fraîchement isolés.....	148
Figure 38 : Les ventricules sont plus infectés par le virus AAV-shCASK que les oreillettes.....	150
Figure 39 : Tropisme tissulaire de l'AAV2/9-shCASK à 3 mois post-infection.....	151
Figure 40 : Mesures des paramètres du ventricule gauche en échocardiographie selon le mode TM sur le cœur de rat adulte.....	152
Figure 41 : Représentation schématique du tracé d'un électrocardiogramme normal.....	156
Figure 42 : Diminution de la vitesse de dépolarisation et de l'amplitude du potentiel d'action à 5 Hz chez les rats AAV-shCASK.....	159
Figure 43 : Variation de la durée du potentiel d'action à 75 et 90% de repolarisation.....	161
Figure 44 : Les taux d'expression protéique et d'ARNm et de CASK restent inchangés chez les rats ayant reçus l'AAV-shCASK avec le tag GFP à 1 mois et 3 mois post injection.....	162
Figure 45 : L'AAV-shCASK sans tag GFP ne modifie pas le taux d'expression protéique de CASK à 3 mois post injection.....	163
Figure 46 : L'AAV-shCASK sans tag GFP ne modifie pas le taux d'ARNm de CASK à 3 mois post injection.....	164
Figure 47 : Profil d'expression protéique au cours du développement des protéines spécialisées du disque intercalaire et de la membrane latérale dans les cardiomyocytes de rats.....	170

Figure 48 : Les taux d'expression d'ARNm des protéines Syntrophines $\alpha 1$ et $\beta 1$ sont fortement diminués lorsque la protéine CASK est inhibée.....**174**

Figure 49 : Principe du système de *Retention Using Selective Hook*.....**175**

Figure 50 : Expression dans le plan membranaire des cardiomyocytes du canal Nav1.5-mCherry.....**176**

Tableau 1 : Liste des anticorps utilisés pour les expériences d'immunofluorescence et de western blot**75**

Tableau 2 : Liste des séquences des couples d'amorces utilisés pour les expériences de PCR quantitative.....**77**

Tableau 3 : Modifications des fonctions ventriculaires gauches chez les rats ayant reçu l'AAV-shCASK sans tag à 3 mois post injection.....**154**

Tableau 4 : Ralentissement de la conduction ventriculaire chez les rats ayant reçu l'AAV-shCASK sans tag à 3 mois post injection.....**157**

Liste des Abréviations

AAV : Adeno-associated virus

Ad : Adénovirus

ARNm: Acide ribonucléique messenger

BDM : 2,3-butanedione monoxime

BSA : Bovin serum albumin

BFA : Bréfeldine A

CACNB : Calcium channel β -subunit

CAMKII : Calcium calmodulin kinase II

CARMA : CARD and MAGUK protein

CASK : Calcium/calmodulin dependent serine/threonine kinase

Ca_v : Canaux calciques dépendant du potentiel

DLG : Disc large homolog

ECG : Electrocardiogramme

ECL : Chemiluminescence

FAK : Focal adhesion kinase

GFP : Green fluorescent protein

GPDL-1 : Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like

GST : Glutathione-sulfo-transferase

GUK : Guanylate kinase

HEK-293 : Human embryonic kidney 293

I_{Ca} : Courant calcique

I_{K1} : Courant potassique à rectification entrante

I_{Ks} : Courant potassique à rectification retardée lente

I_{Kur} : Courant potassique sortant rectifieur

I_{Na} : Courant sodique

I_{to} : Courant potassique transitoire

K_{ir} : Canaux potassiques à rectification entrante

K_v : Canaux potassiques dépendant du potentiel

L27 : Lin2-Lin7

MAGI : MAGUK with inverted orientation

MAGUK : Membrane-associated guanylate kinase

Na_v : Canaux sodiques dépendant du potentiel

PCR : polymerase chain reaction

PDZ : PSD95-DLG-ZO1

PKA : Protein kinase de type A

PKC : Protein kinase de type C

PSD-95 : Post-synaptic density 95

PSF : point spread function (fonction d'étalement du point)

RT-qPCR : reverse transcription quantitative polymerase chain reaction

RyR2 : Récepteur à la ryanodine de type 2

SAP-97 : Synapse-associated protein 97

SERCA : Sarco/endoplasmique réticulum calcium-ATPase

SH3 : Src homology 3

SICM : Scanning ion conductance microscopy

SUMO : Small ubiquitin-related modifier

SynCAM : Synaptic cell adhesion molecule

TIRF : Total internal reflection fluorescence

Tubule-T : Tubule transverse

WW : Tryptophane tryptophane

ZO : Zona occludens

Avant-Propos

L'organisation des canaux ioniques dépendants du potentiel dans des domaines spécialisés de la membrane du cardiomyocyte est déterminante pour la propagation du front de dépolarisation. Leur présence et leur fonctionnement font intervenir plusieurs composantes, telles que leur trafic intracellulaire, leur ancrage et leur stabilisation au sarcolemme des myocytes cardiaques ainsi que de leurs interactions avec différents partenaires. Répartis en sous populations dans les compartiments membranaires distincts, les canaux ioniques sont alors régulés différemment selon le complexe macromoléculaire auquel ils appartiennent. Cependant, les mécanismes régissant le trafic et l'organisation de ces sous populations de canaux ne sont aujourd'hui que partiellement identifiés. Les protéines MAGUKs (Membrane Associated GUanylate Kinase) spécialisées, entre autre, dans l'ancrage et la formation de complexes protéiques sont susceptibles d'être impliquées dans cette organisation spécifique des canaux ioniques.

Ce travail de thèse a ainsi été centré sur le rôle d'un des membres de la famille des MAGUKs : la protéine CASK (CALcium/CALmodulin-dependant Serine/threonine Kinase), dans la régulation et l'organisation macromoléculaire des canaux ioniques, principalement sodiques, à la membrane des cardiomyocytes.

Au cours d'une première étude, nous avons démontré que la protéine CASK est présente exclusivement à la membrane latérale des cardiomyocytes et appartient au complexe Dystrophine-Glycoprotéines. De plus, cette protéine est aussi un partenaire direct de la population de canaux sodiques $Na_v1.5$, également présente à la membrane latérale du myocyte cardiaque, dont elle régule négativement le courant I_{Na} associé. Ce travail a fait l'objet d'un article publié dans *Circulation Research* en 2016 intitulé : « *Lateral membrane-specific MAGUK CASK down-regulates $Na_v1.5$ channel in cardiac myocytes* » et pour lequel je suis deuxième auteur.

Suite à cette étude j'ai abordé un nouvel axe de travail portant sur la caractérisation plus approfondie du rôle de chaque domaine fonctionnel qui compose la protéine CASK. L'objectif étant ici d'identifier le ou les domaines d'interaction de CASK avec la Dystrophine ainsi que le ou les domaines responsables de la régulation du courant sodique. Les résultats obtenus ont permis la rédaction d'un article intitulé « *CASK couples sodium channel exocytosis to cell adhesions in cardiomyocytes via distinct functional domains* » actuellement en révision à *Circulation Research*.

Enfin, j'ai travaillé sur un troisième axe de recherche ciblant les conséquences fonctionnelles de l'inactivation de la protéine CASK *in vivo*. Afin de réaliser une inactivation de CASK, spécifiquement dans le cœur de rat adulte, j'ai eu recours à l'utilisation de petits virus à ADN non pathogènes (Adeno-Associated Virus, AAV). Le phénotype cardiaque des animaux a ensuite été évalué par électrocardiogrammes et échocardiographies.

Introduction

A. Activités électriques et mécaniques cardiaques

L'approvisionnement en oxygène et en nutriments de l'ensemble des tissus de l'organisme est réalisé par le biais du système cardiovasculaire. Celui-ci comprend le cœur (une pompe mécanique), le sang (un liquide circulant) et deux types de circulation (les circuits de transport). Ainsi, on distingue la circulation systémique où le sang chargé en oxygène est distribué dans tout l'organisme et la circulation pulmonaire qui permet de récupérer le sang appauvri en oxygène, de le réoxygéner en le renvoyant au contact des alvéoles pulmonaires et le débarrasser du dioxyde de carbone. Pour pouvoir être distribué, le sang est véhiculé au moyen de deux réseaux : le réseau artériel qui assure son transport du cœur vers les tissus et le réseau veineux qui assure son transport des tissus vers le cœur. Le cœur, qui est un organe musculaire creux, détient un rôle central dans le fonctionnement de ce système de circulation sanguine. En effet, il assure la propulsion du sang dans le système circulatoire à chacune de ses contractions. Divisé en deux par des cloisons appelées septums, chacune des deux parties du cœur est constituée d'une cavité supérieure (une oreillette) et d'une cavité inférieure (un ventricule) communiquant entre elles par des valves. La partie droite du cœur prend en charge la circulation pulmonaire et la partie gauche la circulation systémique. Grâce au cloisonnement, ces deux types de circulation ne se rencontrent jamais. Chaque battement du cœur correspond à un cycle cardiaque où le cœur se remplit de sang (oxygéné d'un côté et pauvre de l'autre) et l'expulse ensuite pour le distribuer en se contractant (Weinhaus et Roberts 2005).

Pour assurer cette fonction de pompe, l'activité contractile du cœur est dépendante d'une composante électrique. Celle-ci est générée de manière autonome et se propage à travers le tissu cardiaque pour permettre la contraction de l'ensemble des unités fonctionnelles du cœur : les cardiomyocytes.

1. Automatisme cardiaque

Le système de conduction cardiaque amorce et coordonne la propagation du signal électrique qui provoque les contractions rythmiques et synchronisées des oreillettes et des ventricules. Ce système est basé sur l'excitation en cascade de plusieurs éléments répartis dans le cœur, formant ainsi le tissu nodal. Ce dernier comprend le nœud sinusal et le nœud auriculoventriculaire à l'étage atrial, ainsi que le faisceau de His et les fibres de Purkinje à l'étage ventriculaire (Figure 1). La genèse du signal

électrique cardiaque est automatique et est réalisée par les cellules pacemakers présentes dans le nœud sinusal, situé dans l'oreillette droite. Ces cellules, hautement excitables, sont capables de produire spontanément des potentiels d'action qui vont se propager à travers l'ensemble du tissu nodal. Ce sont donc ces cellules pacemakers qui imposent le rythme cardiaque. Le signal électrique produit est conduit vers l'oreillette gauche par le faisceau de Bachmann afin de l'exciter. En parallèle, l'impulsion électrique traverse également l'oreillette droite en direction du nœud auriculoventriculaire en empruntant les voies internodales. Le nœud auriculoventriculaire est situé dans le septum interventriculaire et marque la limite entre les cavités supérieures du cœur (les oreillettes) et inférieures (les ventricules). Il fait office de passage obligé pour le potentiel d'action car il permet de relayer l'influx électrique qui provient du nœud sinusal vers le ventricule, *via* le faisceau de His. Celui-ci se divise en deux branches : la branche droite pour dépolariser le ventricule droit et la branche gauche pour dépolariser le ventricule gauche. Les extrémités de ces branches du faisceau de His sont ramifiées en millions de petites fibres : les fibres de Purkinje qui se projettent dans le myocarde ventriculaire (Figure 1). La conduction du signal électrique dans le faisceau de His et dans les fibres de Purkinje est rapide et déclenche la contraction des ventricules qui vont alors expulser le sang vers les organes (Mangoni et Nargeot 2008; Bartos, Grandi, et Ripplinger 2015).

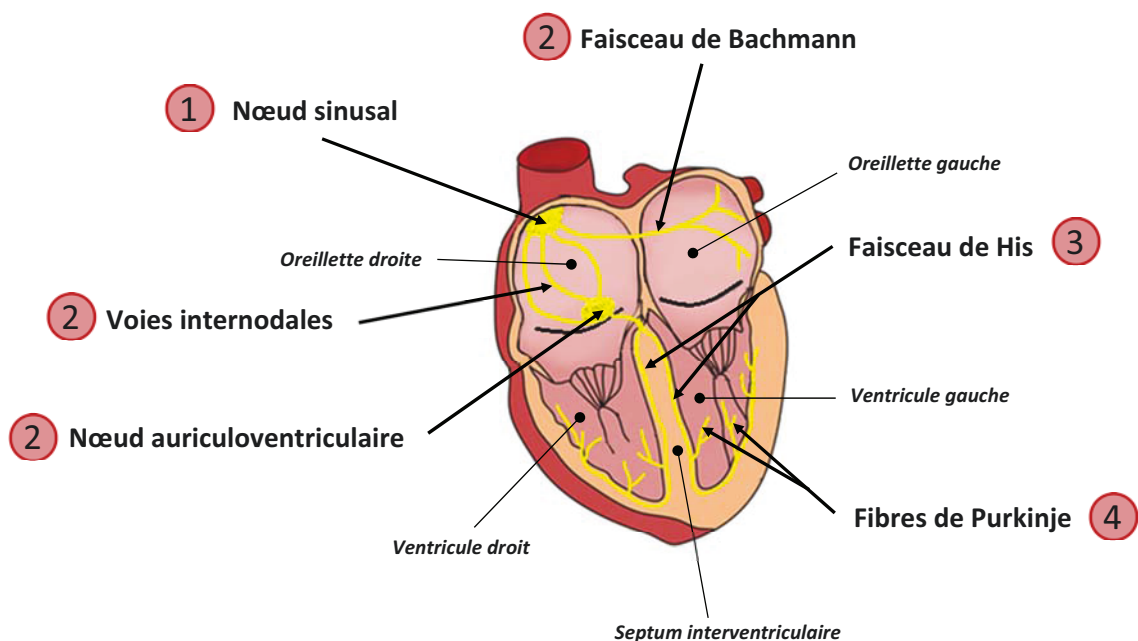


Figure 1 : Système de conduction cardiaque. L'influx électrique traverse le tissu nodal depuis le nœud sinusal (1) jusqu'aux fibres de Purkinje (4) en passant par le nœud auriculoventriculaire (2) et le faisceau de His (3) (modifié à partir de Bartos, Grandi et Ripplinger, 2016).

Ainsi, la contraction myocardique est dépendante de la propagation d'un signal électrique, le long d'un système de conduction spécialisé qui traverse le cœur, des oreillettes aux ventricules. Ce signal électrique ou potentiel d'action est généré lorsque les charges ioniques, qui sont situées de part et d'autre de la membrane des cellules excitables, se déplacent à travers elle. Ces mouvements sont permis par la présence de protéines transmembranaires, les canaux ioniques, qui ont pour fonction de laisser passer de manière plus ou moins sélective certains ions et de provoquer l'apparition de phénomènes de dépolarisation et de repolarisation.

2. Le potentiel d'action

Le potentiel d'action cardiaque est caractérisé par des variations du potentiel de membrane au cours du temps. En effet, au repos, les myocytes cardiaques présentent un potentiel de membrane qui est déterminé en fonction de la balance des espèces ioniques qui sont présentes de part et d'autre de la membrane de la cellule. Ainsi, durant la phase de repos, les différences de concentration ioniques de chaque côté de la membrane plasmique sont maintenues grâce à l'activité de pompes et du courant de base I_{K1} . Les pompes Na^+/K^+ ATPase sont dépendantes de l'ATP pour fonctionner et permettent de maintenir les gradients électrochimiques sodique et potassique. Au cours de cette phase de repos, la membrane est plus perméable aux ions potassium, le potentiel de repos correspond donc au potentiel d'électro-diffusion du potassium qui avoisine alors les -90mV .

Néanmoins, suite à la stimulation électrique initiée par les cellules pacemakers du nœud sinusal, cet équilibre n'est plus respecté et la perméabilité des canaux ioniques est modifiée. On distingue alors la phase de dépolarisation où il est observé une entrée massive d'ions sodium chargés positivement à l'intérieur de la cellule suivie d'une phase de repolarisation caractérisée, elle, par un flux sortant de charges positives potassiques (et calciques). Ces phases, contrôlées par les différents canaux ioniques, vont présenter des cinétiques et des conductances variables et ainsi déterminer l'aspect général du potentiel d'action.

Dans les tissus atriaux et ventriculaires, le potentiel d'action peut être dissocié en cinq phases (Figure 2). La première, appelée phase 0 ou phase de dépolarisation rapide, est amorcée par l'ouverture des canaux sodiques $\text{Na}_v1.5$. Le courant sodique (I_{Na}), généré par l'influx des ions sodium vers l'intérieur du myocyte cardiaque, dépolarise la cellule qui passe alors d'un potentiel de repos aux alentours de -90mV à des valeurs positives pouvant aller jusqu'à $+20\text{mV}$. Apparaît ensuite la phase 1 dite de repolarisation précoce caractérisée par l'inactivation du courant sodique et l'activation du courant potassique transitoire sortant (I_{t0}). Pendant la phase 2, le potentiel de membrane reste

relativement stable, c'est pourquoi elle est aussi appelée phase de plateau du potentiel d'action. Cette phase est due à l'activation du courant calcique de type L (I_{CaL}) qui provoque un courant entrant d'ions calcium, nécessaires au couplage excitation-contraction. Cependant, ce courant calcique entrant est compensé par la fuite simultanée d'ions potassium vers le milieu extracellulaire. Les deux courants, étant à la fois entrant et sortant, ils vont ainsi s'équilibrer et maintenir le potentiel de membrane à des valeurs proches de 0mV, ce qui crée la phase de plateau. La restauration d'un potentiel membranaire de repos est réalisée durant la phase 3 de repolarisation finale, où les différents courants potassiques s'activent et font sortir les ions potassium de la cellule. On trouve alors activés les courants potassiques sortants ultra rapide (I_{Kur}), rapide (I_{kr}) et lent (I_{Ks}). La dernière phase qui correspond au maintien du potentiel de repos est assurée en grande partie par le courant potassique I_{K1} et la pompe Na^+/K^+ ATPase. Les courants sodiques et calciques sont quant à eux totalement inactivés durant cette phase jusqu'à la prochaine vague de dépolarisation (Shih 1994; Nerbonne et Kass 2005).

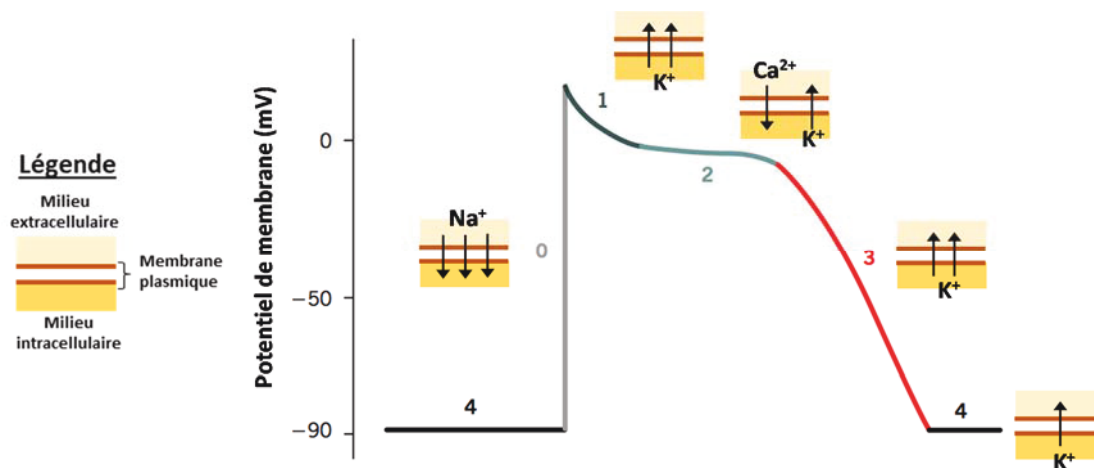


Figure 2 : Le potentiel d'action cardiaque. La forme générale du potentiel d'action cardiaque est déterminée par les ouvertures et fermetures des différents canaux ioniques qui sont à l'origine de courants dépolarisants et repolarisants. Cinq phases distinctes sont alors identifiables (numérotées de 0 à 4) (d'après Amin et al., 2010).

Cette activité électrique cardiaque est étroitement liée à une activité mécanique. En effet, lors de la phase de plateau du potentiel d'action, l'ouverture des canaux calciques provoque l'entrée d'ions calcium à l'intérieur du myocyte cardiaque. Ces ions sont indispensables pour activer les processus à l'origine du raccourcissement des sarcomères, les unités contractiles du cardiomyocyte. Ces derniers, en se raccourcissant, entraînent la contraction de la cellule cardiaque. Ainsi, le potentiel d'action s'accompagne d'un phénomène de contraction. On parle donc de couplage excitation-contraction.

3. Le couplage excitation-contraction

La contractilité cardiaque est régulée par les modifications de la concentration en calcium intracellulaire libre. Au cours de la phase de contraction du cœur, cette concentration intracellulaire en calcium est élevée et au contraire plus faible lorsque le cœur se relâche. La majeure partie du calcium nécessaire à la contraction du myocyte cardiaque provient du réticulum sarcoplasmique (spécialisé dans le stockage et la libération d'ions calcium) et est libérée par un processus lui-même dépendant du calcium (*calcium-induced calcium release*). L'apport primaire en calcium, qui va donc initier la contraction, est fourni lors de l'ouverture des canaux calciques de type L durant la phase 2 du potentiel d'action cardiaque (Eisner et al. 2017).

Ces canaux calciques sont localisés au niveau de la membrane latérale et des tubules-T (ou tubules transverses) du myocyte cardiaque. Les tubules-T correspondent à des invaginations du sarcolemme des cardiomyocytes, ils assurent une propagation rapide de l'influx électrique vers l'intérieur de la cellule cardiaque. L'emplacement des canaux calciques dans les tubules-T est stratégique car ils sont ainsi situés très près des récepteurs de la Ryanodine présents à la surface du réticulum sarcoplasmique. Ce faible écart qui les sépare est appelé la dyade, une région cruciale dans le couplage excitation-contraction (Scriven, Asghari, et Moore 2013) (Figure 3). En effet, il a été montré que la perte de contractilité des cellules cardiaques pouvait être associée à une désorganisation dans la structure des tubules-T ou des canaux calciques qui y sont présents. Ainsi, les récepteurs de la Ryanodine ne sont plus correctement activés, ce qui engendre un défaut dans le relargage intracellulaire en calcium par le réticulum sarcoplasmique (Bito et al. 2008; Louch, Sejersted, et Swift 2010; Poláková et Sobie 2013).

La dépolarisation produite par le potentiel d'action active donc les canaux calciques situés dans la membrane ainsi que dans les tubules-T. La concentration intracellulaire de calcium augmente et provoque l'ouverture des récepteurs de la Ryanodine, déversant ainsi dans le milieu intracellulaire une très grande quantité d'ions calcium, jusqu'alors stockée au sein du compartiment sarcoplasmique. Ce calcium va interagir avec le complexe de la Troponine C qui va changer de conformation et dégager un site de liaison sur le filament d'Actine, où va venir se fixer la tête de la Myosine. La Myosine entre ensuite en mouvement le long de l'Actine, selon un déplacement dépendant de l'ATP, ce qui entraîne le raccourcissement du sarcomère et donc la contraction du myocyte cardiaque. À la fin de la phase 2 du potentiel d'action, les canaux calciques s'inactivent, il n'y a donc plus d'entrée d'ions calcium dans la cellule. À leur tour les récepteurs de la Ryanodine se ferment et le calcium encore présent dans le milieu intracellulaire est pompé par la protéine SERCA (Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca-ATPase) afin d'être à nouveau stocké dans le réticulum sarcoplasmique pour un prochain cycle de contraction. Les

ions calcium restants sont expulsés hors de la cellule par l'échangeur sodium-calcium (NCX) (D. Bers 2001; Eisner et al. 2017) (Figure 3).

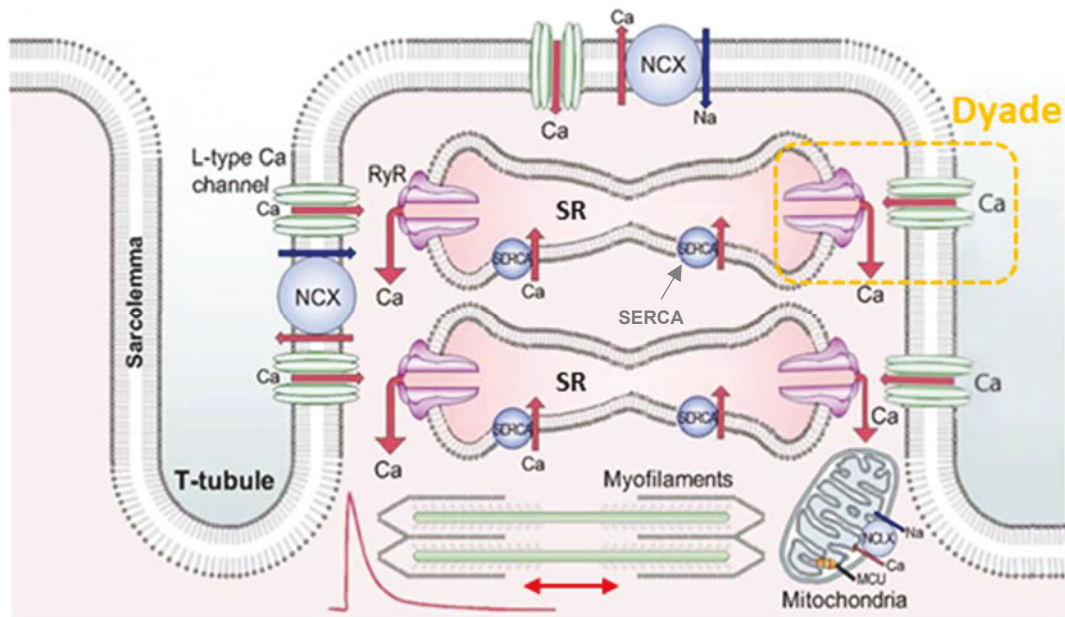


Figure 3 : Le couplage excitation-contraction dans le cardiomyocyte. Représentation schématique des tubules-T et du réticulum sarcoplasmique (SR=RS) étroitement liés. Cette proximité est appelée la dyade (jaune). Au niveau du sarcolemme, l'entrée du calcium (Ca) dans la cellule se fait par les canaux calciques de type L et leur sortie est assurée par l'échangeur sodium/calcium (NCX). Au niveau du RS, la libération du calcium est réalisée par les récepteurs de la Ryanodine (RyR) et son stockage par la pompe SERCA. L'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium entraîne la contraction du cardiomyocyte (modifié d'après Eisner et al., 2017).

La succession des évènements qui se produisent depuis l'excitation électrique des cardiomyocytes jusqu'à leur contraction ne dépend pas uniquement d'une combinaison entre les différents canaux ioniques. Leur présence est indispensable mais de façon toute aussi importante, l'emplacement précis que chacun d'entre eux occupe au sein du cardiomyocyte est crucial. En effet, le myocyte cardiaque est une cellule structurellement polarisée et présente des domaines membranaires spécialisés. Pour que la propagation du signal électrique puisse s'effectuer d'une cellule à une autre et ainsi assurer une contraction synchronisée et homogène de l'ensemble du tissu cardiaque, les canaux ioniques doivent être adressés, organisés et régulés de manière différentielle dans les domaines membranaires du cardiomyocyte.

4. Le cardiomyocyte, unité fonctionnelle du cœur

Les cardiomyocytes sont caractérisés par la présence de domaines structuraux et fonctionnels qui participent à la genèse et à la transmission du potentiel d'action ainsi qu'au couplage excitation-contraction. Cette spécificité électrique et mécanique des cardiomyocytes est rendue possible par la présence dans le sarcolemme de deux domaines distincts : d'une part la membrane latérale avec les tubules-T et le costamère et d'autre part, les disques intercalaires (Figure 4) (Balse et al. 2012).

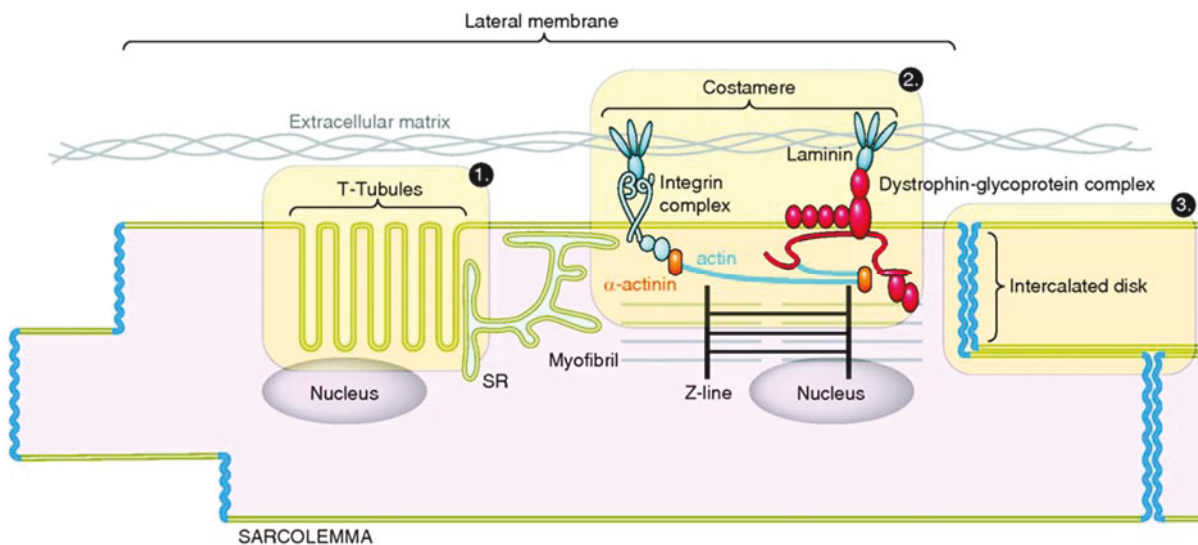


Figure 4 : Domaines spécialisés du sarcolemme des cardiomyocytes. Représentation schématique des domaines spécialisés qui constituent le sarcolemme des myocytes cardiaques avec (1) les tubules-T qui sont en lien étroit avec le réticulum sarcoplasmique (SR) permettant le couplage excitation-contraction, (2) le costamère (composé des complexes Dystrophine-Glycoprotéines et Intégrine-Vinculine-Taline) qui assure le lien entre le cytosquelette d'Actine et la matrice extracellulaire, et (3) le disque intercalaire impliqué dans la transmission des informations électriques et mécaniques entre deux myocytes adjacents (Balse et al., 2017).

Les tubules-T

Les tubules-T sont des invaginations du sarcolemme des cardiomyocytes riches en canaux calciques et orientés vers l'espace intracellulaire (Figure 3 et Figure 4). Les cardiomyocytes ventriculaires possèdent un réseau de tubules-T bien plus développé et mature que les myocytes atriaux, où la répartition des tubules-T est plus irrégulière du fait de leur faible présence (Smyrniak et al. 2010). Étroitement liés au réticulum sarcoplasmique, la fonction principale des tubules-T est de participer au couplage excitation-contraction, comme évoqué dans le paragraphe précédent. Grâce à leur forme allongée et leur étroitesse, les tubules-T servent de réservoir pour les ions calcium (T. Hong et Shaw 2016). En effet, les concentrations en calcium du tubule-T et du milieu extracellulaire qui borde le reste du myocyte sont équivalentes. Cependant, la différence réside dans la vitesse de diffusion des

ions calcium qui est réduite à l'intérieur du tubule-T. Ainsi, lorsque qu'un défaut en ions calcium survient, le milieu extracellulaire va s'appauvrir mais le cardiomyocyte est tout de même capable de se contracter, durant un temps, grâce aux ions calcium qui sont encore présents dans les tubules-T (Lederer, Niggli, et Hadley 1990; Shepherd et McDonough 1998). De plus, des études récentes suggèrent que la protéine d'échafaudage membranaire BIN1 (Bridging Integrator 1) induit la formation de petits replis en tête d'épingle (Hong et al. 2014) le long de la membrane des tubules-T. BIN1 permet également d'enrichir ces microdomaines en canaux calciques en participant à leur trafic et à leur stabilisation à la membrane (Hong et al. 2010). C'est donc par le biais de cette forme tortueuse du tubule-T, induite par BIN1, que les ions calcium ne diffusent pas de manière linéaire à travers le tubule-T mais sont au contraire répartis dans des microréservoirs. Par ailleurs la perte de BIN1 provoque la linéarisation et la dilatation du tubule-T, les ions calciums diffusent alors très rapidement ce qui augmente la contractilité du cardiomyocyte et favorise les arythmies (Hong et al. 2014). Une mutation faux sens du gène codant pour la protéine BIN1 a notamment été retrouvée chez un patient atteint d'une forme de myopathie congénitale rare et présentant de plus une arythmie ventriculaire (Böhm et al. 2010).

Le costamère

Le costamère, dans le cardiomyocyte, est une structure composée de deux complexes protéiques majeurs : le complexe Dystrophine-Glycoprotéines et le complexe Intégrine-Vinculine-Taline. Il permet de faire de lien entre les sarcomères de la cellule cardiaque et la matrice extracellulaire (Pardo, Siliciano, et Craig 1983) (Figure 5). Le costamère est souvent assimilé à une adhésion focale que l'on peut trouver dans d'autres types cellulaires. En effet, tous deux ont le même rôle et partagent des protéines communes comme la Vinculine, la Taline, l'Intégrine ou encore l'Actine (Ervasti 2003). Le costamère a pour rôle de relayer les signaux mécaniques de manière bidirectionnelle entre le sarcomère et la matrice extracellulaire, c'est à dire qu'il transmet à la fois des signaux provenant de l'environnement extracellulaire vers le milieu intracellulaire et inversement, il transmet des signaux vers l'environnement extracellulaire depuis l'intérieur de la cellule. Le costamère joue donc un rôle central dans la mécanotransduction, qui se caractérise par la transduction de forces physiques en signaux biochimiques pouvant ensuite conduire à des modifications dans la structure et la fonction de la cellule (Samarel 2005).

Le complexe Dystrophine-Glycoprotéines forme un large complexe comprenant entre autre les Sarcoglycanes et les Dystroglycanes. La Laminine de la matrice extracellulaire se lie à l' α -Dystroglycane, une protéine située sur la face extracellulaire du sarcolemme (Talts et al. 1999). L' α -Dystroglycane est stabilisée à la membrane par son interaction avec la β -Dystroglycane, qui est ancrée dans le

sarcolemme, et cette interaction est soutenue par le complexe transmembranaire formé par quatre glycoprotéines : les α , β , γ et δ -Sarcoglycanes (Lapidos, Kakkar, et McNally 2004). La Dystrophine, quant à elle, fait le lien entre le cytosquelette d'Actine et la β -Dystroglycane, en faisant intervenir les protéines cytoplasmiques Syntrophine et Dystrobrevine (Jung et al. 1995). Ainsi, le sarcomère se retrouve lié à la matrice extracellulaire par le biais de ce large complexe protéique. La perte de la Dystrophine déstabilise l'ensemble des composants du complexe Dystrophine-Glycoprotéines, altère l'intégrité structurale du sarcolemme et la contraction du myocyte (Ervasti 2007) (Figure 5). La dystrophie musculaire de Duchenne, caractérisée par une absence totale de protéine Dystrophine, est la pathologie qui illustre parfaitement l'importance du maintien des interactions stables entre les différentes protéines qui forment ce complexe (Hoffman, Brown, et Kunkel 1987; McNally et al. 1996).

Le second complexe présent au costamère est formé par les protéines Intégrine-Vinculine-Taline. La Vinculine et la Taline sont des protéines du cytosquelette qui sont attachées au sarcolemme par leur interaction avec la sous-unité β de l'Intégrine. Les Intégrines sont des protéines transmembranaires constituées de deux sous-unités α et β associées en hétérodimère. Chaque sous-unité possède un domaine extracellulaire qui lie des protéines de la matrice extracellulaire telles que la Laminine, le Collagène ou la Fibronectine (Peter et al. 2011) (Figure 5). Il a été montré que la Vinculine, première protéine du complexe à avoir été identifiée, détenait un rôle clé dans l'organisation des composants du sarcomère et dans la fonction cardiaque. En effet, une diminution de son niveau d'expression protéique, induite par des mutations chez la souris, provoque un désalignement des filaments d'Actine et une dysfonction cardiaque entraînant la mort des animaux (Zemljic-Harpe et al. 2004). Chez l'Homme, une mutation dans le gène codant pour la Vinculine a été retrouvée chez un patient présentant une cardiomyopathie dilatée (Olson et al. 2002). Le rôle de l'Intégrine a aussi été particulièrement étudié du fait de sa capacité à lier des protéines impliquées dans l'activation de voies de signalisation cellulaire en réponse à des phénomènes de stress mécanique, comme les protéines ILK (Integrin-Linked Kinase), la Paxilline ou la protéine kinase Src. Cette dernière participe à l'activation de la protéine FAK (Focal Adhesion Kinase) (Samarel 2005). En cas de surcharge hémodynamique, il a été constaté que la protéine FAK est activée et redistribuée, ce qui induit des réponses compensatoires des cardiomyocytes face au stress et notamment leur hypertrophie (DiMichele et al. 2006). Les Intégrines permettent donc de transmettre les signaux reçus depuis la matrice extracellulaire vers l'intérieur de la cellule, qui va ensuite adapter son fonctionnement en réponse à ce signal de stress. Par exemple, dans une zone bordante de l'infarctus, la matrice extracellulaire se rigidifie avec l'apparition d'un tissu fibrotique. Les cardiomyocytes associés à ce type de matrice vont alors présenter une réduction de leur contractilité (Engler et al. 2008).

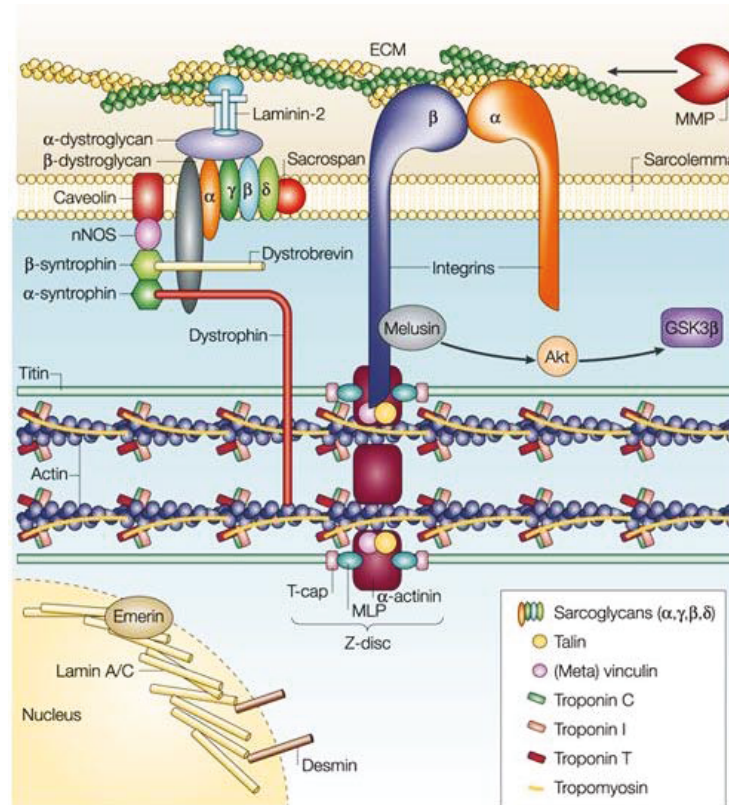


Figure 5 : Structures des deux complexes protéiques présents au costamère.

Le cytosquelette d'Actine du cardiomyocyte est relié à la matrice extracellulaire via les complexes Dystrophine-Glycoprotéines et Intégrine-Vinculine-Taline (Liew et Dzau, 2004)

Le disque intercalaire

La contraction synchronisée et homogène des cardiomyocytes dépend de la propagation du potentiel d'action d'une cellule à une autre. Cette propagation est réalisée dans un sens préférentiel *via* les jonctions communicantes, ou jonctions gap, présentes exclusivement aux disques intercalaires des cardiomyocytes. Cette transmission de l'influx électrique, plus rapide dans le sens longitudinal que dans le sens transversal, est appelée propagation anisotrope (M. S. Spach 1999) (Figure 6).

Les jonctions gap ne jouent pas un rôle structural mais assurent le couplage chimique et électrique entre les cardiomyocytes en permettant la diffusion non sélective d'une cellule à une autre d'ions et de petites molécules (dont le poids est généralement inférieur à 1 kDa) (Alexander et Goldberg 2003). Elles sont formées de douze Connexines : six d'entre elles s'associent pour former un connexon qui va lier le connexon enchâssé dans la membrane du cardiomyocyte voisin (Yeager 1998). L'isoforme 43 de la Connexine est majoritairement présente aux jonctions gap. Sa demie vie à la membrane n'excédant pas deux heures, le renouvellement des Connexines-43 est donc constant (Beardslee et al. 1998). L'importance de ces Connexines est soulignée par leurs implications dans des pathologies cardiaques telles que l'insuffisance cardiaque, des cas de mort subite ou encore d'arythmies, causées par une désorganisation des jonctions gap due à la perte de la Connexine-43 (Epifantseva et Shaw 2018). La

Connexine-43 présente plusieurs partenaires dont le canal sodique $\text{Na}_v1.5$ (pour revue voir Vermij et al. 2017). La présence au disque intercalaire du canal sodique est dépendante de la protéine EB1, elle-même localisée sur les extrémités des microtubules (Agullo-Pascual et al. 2014). La Connexine-43 permet aussi d'effectuer le rapprochement des autres structures du disque intercalaire en formant des complexes avec des protéines du desmosome (comme la Plakophiline 2) ou encore des jonctions adhérentes (avec la N-Cadhérine) (Vermij et al. 2017) (Figure 6).

Les jonctions adhérentes et les desmosomes assurent la cohésion intercellulaire. En effet, ils empêchent les cardiomyocytes de se séparer les uns des autres lors de la contraction du tissu cardiaque et assurent la cohésion intracellulaire, en maintenant l'architecture de la cellule *via* une association avec le cytosquelette d'Actine. La protéine transmembranaire N-Cadhérine est le principal constituant des jonctions adhérentes. Elle s'homodimérise avec la N-Cadhérine de la cellule adjacente dans l'espace extracellulaire et cette liaison se fait sous la dépendance des ions calcium (Zuppinger, Eppenberger-Eberhardt, et Eppenberger 2000). Le domaine intracellulaire de la N-Cadhérine se lie principalement au cytosquelette d'Actine *via* les protéines α et β -Caténine, Vinculine et la Plakoglobine. Cette liaison avec le cytosquelette permet à la N-Cadhérine de jouer également un rôle de mécanosenseur. En effet, lorsque les myocytes se contractent et se relâchent, les N-Cadhérines subissent respectivement des forces de pression et de traction. L'application de ces forces sur les N-Cadhérines provoque l'altération de la conformation de certaines protéines comme la Caténine ou promeut le recrutement de la Vinculine (Smutny et Yap 2010). Le desmosome forme un point d'ancrage intercellulaire robuste, particulièrement résilient aux contraintes mécaniques. La partie intercellulaire est composée de deux Cadhérines : la Desmogléine-2 et la Desmocolline-2 qui se lient symétriquement aux deux Cadhérines de la cellule voisine. Ces Cadhérines sont transmembranaires et leurs parties intracellulaires interagissent avec la Plakophiline-2, la Plakoglobine et la Desmoplakine. Cette dernière fait le lien entre le desmosome et la jonction adhérente *via* une protéine de filament intermédiaire : la Desmine (Harmon et Green 2013) (Figure 6). Des mutations affectant les gènes codant pour ces protéines sont par ailleurs retrouvées chez des patients présentant des arythmies ventriculaires (Elliott et al. 2010).

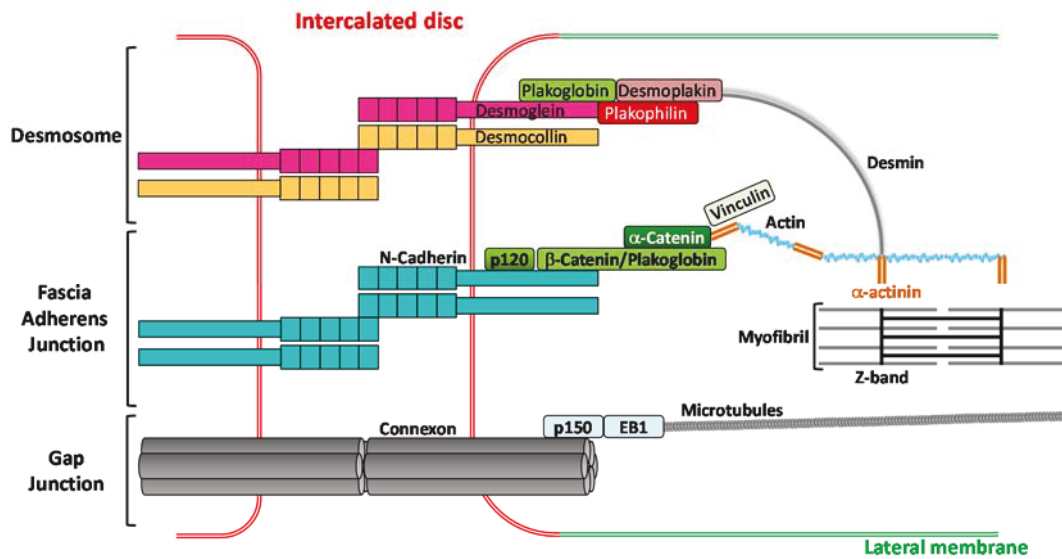


Figure 6 : Structure du disque intercalaire des cardiomyocytes. Représentation schématique du disque intercalaire formant la zone de contact entre deux cardiomyocytes. Les jonctions communicantes (jonctions gap) et les jonctions mécaniques (desmosomes et jonctions adhérentes) assurent la cohésion entre les cardiomyocytes (modifié à partir de Balse et al., 2012).

Chacun des domaines spécialisés du cardiomyocyte accueille des canaux ioniques. Leur répartition différentielle au sein de ces domaines est déterminante afin d'assurer les fonctions électriques et mécaniques de la cellule cardiaque. Des dysfonctionnements dans l'expression, le trafic ou encore l'adressage de ces canaux ioniques dans le cardiomyocyte peut conduire à des cardiopathies. Les processus déterminant le bon ciblage des canaux ioniques vers les domaines de la membrane plasmique sont complexes et n'ont pas encore été complètement caractérisés.

5. Trafic et répartition des canaux ioniques dans le cardiomyocyte

Le nombre de canaux ioniques fonctionnels présents dans des domaines membranaires spécifiques est un processus dynamique. En effet, il résulte d'un équilibre existant entre deux voies antagonistes de trafic, les voies antérograde (correspondant à l'exocytose et au recyclage) et rétrograde (correspondant à l'endocytose et à la dégradation) (Figure 7, page 15). L'adressage et la stabilisation de ces canaux ioniques par des partenaires dans les domaines spécialisés du sarcolemme régulent également l'activité électrique de la cellule.

Trafic du réticulum endoplasmique à l'appareil de Golgi

L'ARNm du canal ionique est traduit par le ribosome. La séquence peptidique qui se forme est dotée d'un signal de reconnaissance pour la bicouche lipidique du réticulum endoplasmique. Ainsi, le canal est directement traduit et intégré dans la membrane du réticulum. De plus, celui-ci est déjà orienté lors de son ancrage à la membrane. Ainsi, la partie du canal destinée à être extracellulaire est tournée vers la lumière du réticulum. Cette orientation sera ensuite conservée durant chaque étape du trafic du canal jusqu'à la membrane de la cellule, même lors du passage d'un compartiment de transport vésiculaire à un autre (Skach 2009).

Les nombreuses protéines chaperonnes spécifiques du réticulum endoplasmique vont participer au repliement et à la maturation du canal. Durant ces étapes, pour éviter toute fuite d'une protéine non mature, il a été observé l'existence de séquences consensus qui sont impliquées dans la rétention et la sortie des canaux du réticulum endoplasmique (Ma et al. 2001). Ainsi pour le canal sodique, il a été montré que le motif RXR (pour Arginine X Arginine), situé sur une boucle intracellulaire du canal, participe à sa rétention dans le réticulum tant que ce motif n'est pas masqué (Zhou et al. 2002). En plus des signaux de rétention, les canaux ioniques présentent également des séquences favorisant leur export vers l'appareil de Golgi (Li, Takimoto, et Levitan 2000).

Cette sortie du réticulum est soumise à un contrôle de qualité de la protéine formée. Cette étape obligatoire va déterminer si la protéine est correctement assemblée et mature pour pouvoir transiter vers l'appareil de Golgi. Dans le cas où le canal présente des anomalies, il va être directement envoyé au protéasome par une voie de dégradation associée au réticulum (Brodsky et McCracken 1999; Berner, Reutter, et Wolf 2018). Ainsi, des étapes de maturation comprenant l'assemblage des sous-unités et des modifications post-traductionnelles vont permettre d'inhiber les signaux de rétention et favoriser la libération des canaux du réticulum. Parmi ces processus, on retrouve la N-glycosylation qui consiste en l'ajout de glucides sur les acides aminés Asparagine qui font partie d'une séquence consensus Asparagine-X-Sérine/Thréonine. La présence de glucides est une preuve, pour la machinerie de contrôle de qualité du réticulum, que le canal est correctement replié et mature (Glick et Nakano 2009). Par ailleurs, la N-glycosylation se poursuit également une fois que le canal entre dans le Golgi durant la phase de maturation finale. Outre la N-glycosylation, il a été montré que la phosphorylation par la protéine kinase A (PKA) permet de masquer le site de rétention RXR et favorise la sortie du canal (Zhou et al. 2002). Par ailleurs, il a été observé que les canaux ioniques composés de leur sous-unité principale (α) vont s'associer à leur sous-unité auxiliaire (β) avant même de sortir du réticulum endoplasmique, ce qui contribuerait à leur maturation (Nagaya et Papazian 1997). Une fois le contrôle qualité validé, les canaux sont exportés en dehors du réticulum endoplasmique dans des vésicules de transport, qui sont recouvertes d'un manteau de protéines COPII (COat Protein type II), vers l'appareil

de Golgi en empruntant le réseau de microtubules (Sato et Nakano 2007). Une fois délivrés du côté *cis* de l'appareil de Golgi (face du Golgi tournée vers le réticulum), les canaux vont continuer leur maturation jusqu'à atteindre la face *trans* de l'appareil de Golgi (tournée vers le cytoplasme de la cellule) (Figure 7) (Glick et Nakano 2009).

Trafic intracellulaire

Dès que les canaux ioniques ont fini leur maturation, ils sont prêts à être transportés à la membrane plasmique, à s'y ancrer et à y exercer leurs fonctions. On parle alors de trafic antérograde (Figure 6). Pour ce faire, les vésicules de transport utilisent à nouveau le réseau de microtubules afin de se rendre au point de destination finale de leur protéine cargo (Hong et Shaw 2016). Les microtubules constituent donc des rails sur lesquels des moteurs moléculaires tels que la Kinésine vont se déplacer en entraînant avec eux les vésicules contenant les canaux (Figure 7). Ces moteurs moléculaires sont capables de passer d'un microtubule à un autre afin de conduire les vésicules jusqu'à la membrane (Ross, Ali, et Warshaw 2008). Ce déplacement est dépendant de l'ATP, les moteurs moléculaires convertissent donc une forme d'énergie chimique en énergie mécanique. Une fois arrivés à la périphérie de la membrane plasmique, les microtubules croisent le cytosquelette d'Actine. La vésicule de transport est alors transférée de la Kinésine à un autre moteur moléculaire spécialisé dans les déplacements le long des filaments d'Actine : la Myosine de type 5 (Figure 7). La dernière étape du trafic antérograde consiste en l'insertion des canaux ioniques à la membrane plasmique par le biais des protéines SNAREs (Soluble N-éthylmaleimide sensitive factor Attachment protein REceptor). Les vésicules de transport arborent sur leur surface des protéines v-SNAREs (pour *vesicular*) qui vont lier les protéines t-SNARE (pour *target*) présentes à la membrane de la cellule. La formation de ce complexe, appelé trans-SNARE, abouti à la fusion des bicouches lipidiques de la vésicule et de la membrane plasmique (Figure 7) (Bonifacino et Glick 2004).

En parallèle au mécanisme d'exocytose, on trouve l'endocytose qui correspond à l'internalisation des composants extracellulaires et des protéines transmembranaires (Figure 7). Cette voie de trafic rétrograde fait également intervenir le cytosquelette d'Actine, les microtubules, les moteurs moléculaires, des protéines Rab ainsi que les Cavéolines (qui tapissent les invaginations de la membrane appelées cavéoles) et la Clathrine (qui est le composant majeur des puits recouverts de Clathrine (*clathrin-coated pits*). On peut ainsi distinguer des voies d'endocytose qui vont être dépendantes des Cavéolines ou de la Clathrine. D'autres voies d'endocytose n'impliquant ni la Clathrine ni la Cavéoline ont également été rapportées mais sont moins bien documentées. L'internalisation a pour finalité de recycler les protéines ou de les envoyer dans les voies de dégradation.

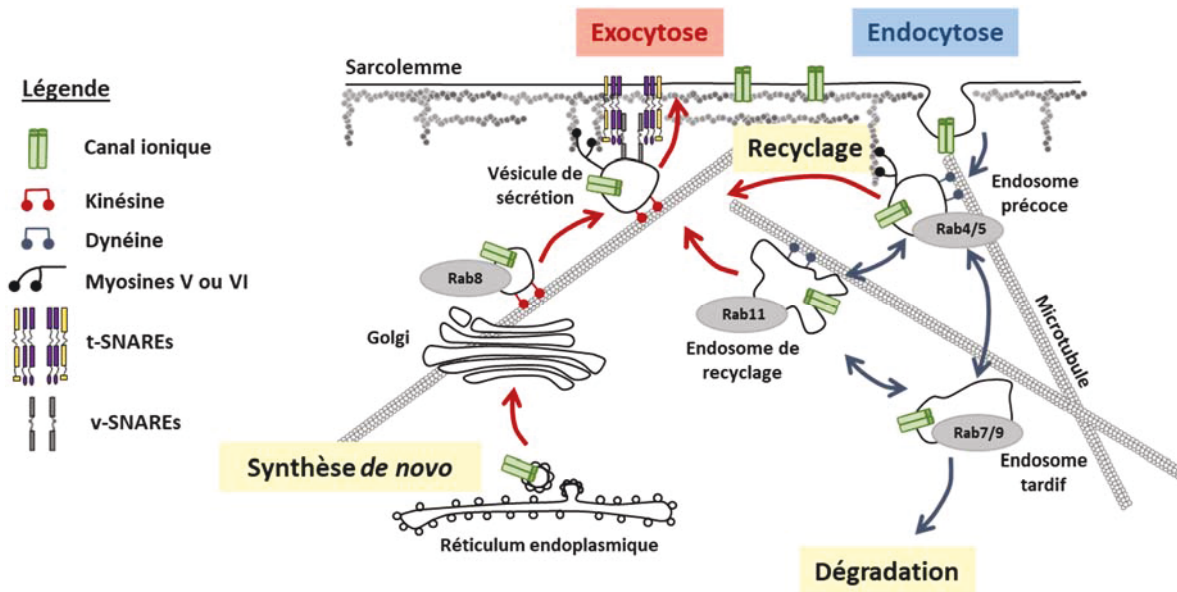


Figure 7 : Trafic des canaux ioniques : voies antérograde et rétrograde. Représentation schématique des voies de trafic des canaux ioniques dans le cardiomyocyte. Tout d'abord synthétisés dans le réticulum endoplasmique, les canaux sont ensuite envoyés dans l'appareil de Golgi pour finir leur maturation avant d'être transportés jusqu'à la membrane pour y être exprimés (flèches rouges). Une fois leur fonction remplie, ils sont internalisés afin d'être dégradés ou bien recyclés (flèches bleues) (d'après Balse et Boycott, 2017).

L'endocytose comme l'exocytose et le recyclage des canaux ioniques permettraient de réguler la densité des canaux ioniques à la membrane et ainsi de contrôler l'excitabilité cellulaire. Des altérations du trafic intracellulaire des canaux ont en effet été rapportées dans de nombreuses cardiopathies congénitales. Par exemple, il a été montré qu'une mutation sur le gène codant pour le canal cationique non sélectif TRPM4 (Transient Receptor Potential cation channel subfamily M member 4) présent dans les cellules du nœud sinusal et les fibres de Purkinje provoque un défaut d'internalisation, et entraîne des altérations de la conduction de l'influx électrique à travers le myocarde conduisant à un bloc de conduction (Kruse et al. 2009). De la même manière, des cardiopathies acquises associées à des troubles du rythme peuvent être liées à une altération du trafic antérograde. Par exemple, l'hypokaliémie favorise l'internalisation du canal hERG (human Ether-a-go-go-Related Gene) et la diminution du courant potassique qui lui est associé (I_{Kr}). Cette perte à la membrane de canaux hERG due à l'appauvrissement du milieu extracellulaire en potassium fait partie des facteurs arythmogènes associés au syndrome du QT long (de type 2) (Compton et al. 1996; Guo et al. 2009). De manière intéressante, une étude rapporte que l'internalisation des canaux potassiques $K_v1.5$ est sensible à un anti-arythmique : la quinidine. En plus de bloquer le pore du canal, la quinidine favorise l'internalisation réversible de $K_v1.5$. Cependant, une exposition à cet anti-arythmique sur plusieurs heures conduit à la dégradation définitive du canal (Schumacher et al. 2009). Ainsi, la densité des canaux fonctionnels à la membrane peut être modulée pharmacologiquement. Ces travaux suggèrent

donc qu'une meilleure connaissance des voies de trafic des canaux ioniques au sein du cardiomyocyte pourrait conduire à l'élaboration de nouvelles cibles médicamenteuses.

Lors du remodelage tissulaire, avec l'installation d'une hypertrophie ou d'une dilation du tissu par exemple, l'activité électrique du cœur est également perturbée ce qui provoque l'apparition de troubles du rythme cardiaque. Les arythmies acquises telles que l'insuffisance cardiaque et la fibrillation auriculaire impliquant, entre autre le dysfonctionnement des canaux ioniques, sont souvent associés au remodelage tissulaire (Rucker-Martin et al. 2006). Dans ce contexte, le trafic anormal et le ciblage des canaux ioniques cardiaques apparaissent comme des facteurs pathogènes importants du remodelage électrique (Schotten et al. 2011).

Localisation des canaux ioniques dans les domaines spécialisés des cardiomyocytes

Il y a près de 30 ans, la répartition des canaux ioniques à la membrane du myocyte cardiaque était considérée comme homogène. Cependant, avec l'avancée des techniques d'imagerie et d'électrophysiologie, cette notion a été remise en cause. En effet, les canaux ioniques sont plutôt organisés en sous populations parmi les différents domaines spécialisés du cardiomyocyte (Balycheva et al. 2015). L'utilisation d'un système d'imagerie poussé comme le SICM (Scanning Ion Conductance Microscopy), qui scanne l'ensemble de la membrane de la cellule et réalise ainsi sa topographie, couplé à un système d'enregistrement des courants ioniques, a permis de mettre en évidence cette distribution hétérogène des canaux (Bhargava et al. 2013). Ainsi, une différence significative de l'amplitude du courant calcique, enregistré entre les tubules-T et les crêtes du sarcolemme dans les cardiomyocytes ventriculaires a pu être observée. Cette différence d'activité électrique confirme que les tubules-T forment un ensemble de microdomaines de la membrane riches en canaux calciques de type L, assurant le couplage excitation-contraction comme vu précédemment (Bhargava et al. 2013).

Cette dichotomie des populations de canaux ioniques peut s'élargir aux canaux sodiques. En effet, grâce à la technique de macro-patch permettant de n'enregistrer le courant que dans un domaine précis de la membrane (Figure 8 A), il a été observé que le courant sodique (I_{Na}) enregistré au disque intercalaire du cardiomyocyte est plus important que le courant enregistré à la membrane latérale (Figure 8 B) et que les propriétés d'inactivation des deux courants ne sont pas identiques. Cette dernière observation suggère que ces populations de canaux sodiques Nav1.5 évoluent dans un environnement différent et qu'ils ne sont donc pas régulés de la même manière par leurs partenaires respectifs (Lin et al. 2011).

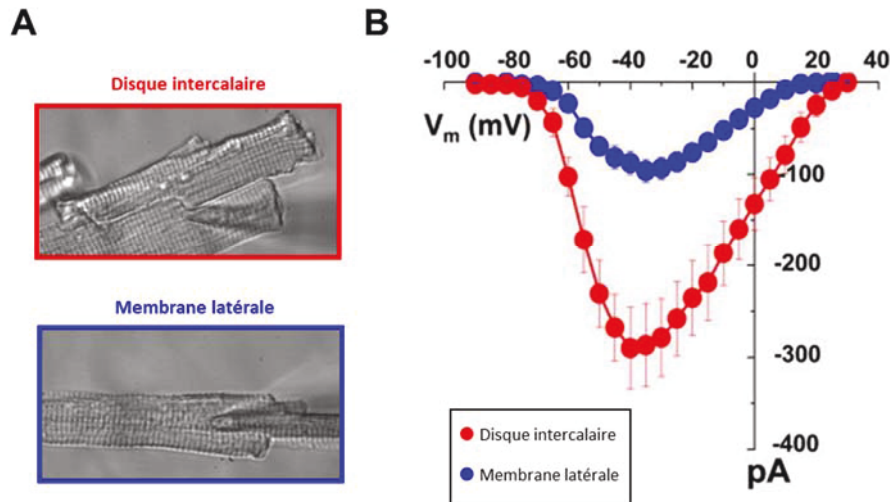


Figure 8 : Régulation différentielle du courant sodique dans les domaines spécialisés du cardiomyocyte. (A) Positionnement de la microélectrode de macro-patch (arrivant par la droite) sur le cardiomyocyte afin d'enregistrer spécifiquement le courant sodique au disque intercalaire (rouge) et à la membrane latérale (bleu) (Verkerk et al., 2007). (B) Relation courant-potentiel (I-V) montrant une différence significative du courant I_{Na} enregistré en macro-patch au disque intercalaire (trois fois plus grand) (rouge) par rapport à la membrane latérale (bleu) (Lin et al., 2011).

Une autre étude a démontré que c'était par le biais de l'interaction avec ses différents partenaires que la localisation des canaux $Na_v1.5$ était définie. On trouve alors une sous population localisée au disque intercalaire avec la protéine SAP-97 (Synapse Associated 97) et une population localisée à la membrane latérale en interaction avec le complexe Dystrophine-Glycoprotéines (Gavillet et al. 2006; Petitprez et al. 2011) (Figure 9). Ces deux populations de canaux sont régulées positivement par leur partenaire respectif. L'existence d'une troisième sous population de canaux sodiques présente aux tubules-T a récemment été proposée (Shy, Gillet, et Abriel 2013).

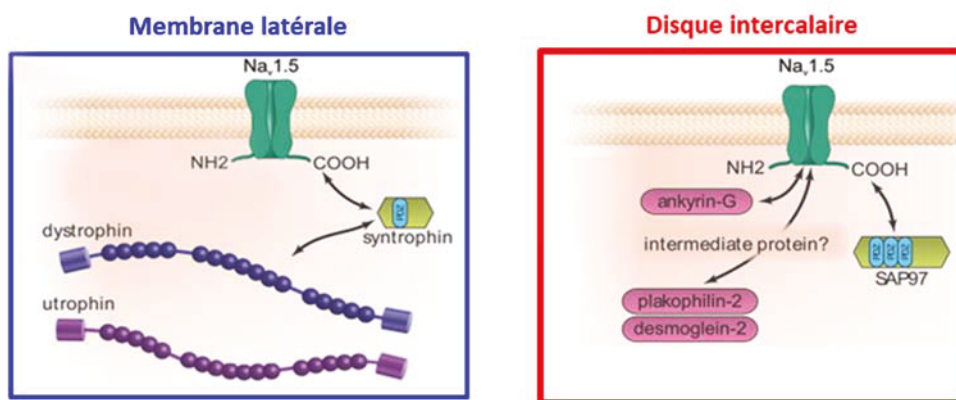


Figure 9 : Modèle des sous populations de canaux sodiques $Na_v1.5$ au sein du sarcolemme du cardiomyocyte. Les canaux $Na_v1.5$ sont répartis en complexes macromoléculaires dans des compartiments distincts de la membrane du cardiomyocyte. On trouve une première sous population à la membrane latérale associée au complexe Dystrophine-Glycoprotéines (gauche) et une seconde sous population au disque intercalaire associée (rouge) à la protéine SAP-97 (droite) ainsi qu'à d'autres protéines régulatrices impliquées dans la stabilisation et l'adressage du canal (Ankyrine-G) ou l'adhésion cellulaire (Plakophiline-2/Desmogléine) (Shy et al., 2013).

L'architecture des cellules cardiaques et la répartition spécifique des canaux ioniques, dans les domaines spécialisés du sarcolemme de ces cellules, sont indispensables pour garantir l'intégrité de la fonction cardiaque. Une altération de la distribution des canaux ioniques, associée à une perte d'interaction avec leurs partenaires, contribue à la physiopathologie de diverses pathologies cardiaques marquées notamment par l'apparition de phénomènes arythmogènes comme cela est le cas pour le canal sodique $Na_v1.5$ (Nattel et al. 2007). Ainsi, la perte d'interaction avec un de ses partenaires, l'Ankyrine-G, provoque spécifiquement au disque intercalaire une diminution de l'expression et de la localisation de $Na_v1.5$ ainsi qu'une réduction de l'amplitude du courant sodique *in vivo* (Makara et al. 2014). Il a aussi été observé qu'une mutation faux-sens, codant pour un autre partenaire du canal $Na_v1.5$, l'isoforme 3 de la sous-unité auxiliaire β , a été identifiée chez un sujet atteint du syndrome de Brugada. Cette mutation, qui empêche l'association entre la sous-unité β et le canal sodique, est à l'origine d'une perturbation dans le trafic antérograde de $Na_v1.5$ entraînant une diminution du courant sodique ainsi que son inactivation précoce. Toutefois, l'implication de la sous-unité β dans la localisation précise du canal au sein des sous domaines membranaires n'est pas encore connue (D. Hu et al. 2009).

B. Le canal sodique $Na_v1.5$

Les canaux ioniques sont des protéines transmembranaires qui contrôlent et facilitent le passage des ions à travers la membrane plasmique des cellules. Les sous-unités α des canaux sodiques voltage-dépendants assurent la genèse du potentiel d'action. Celui-ci est indispensable à la propagation du front de dépolarisation au sein des tissus excitables afin d'amorcer leur contraction. Ces sous-unités α sont codées par une famille de dix gènes répartis dans différents tissus. Ainsi, les isoformes $Na_v1.1$ (*SCN1A*), $Na_v1.2$ (*SCN2A*), $Na_v1.3$ (*SCN3A*) et $Na_v1.6$ (*SCN8A*) sont les canaux sodiques majoritairement retrouvés dans le système nerveux central. Les isoformes $Na_v1.7$ (*SCN9A*), $Na_v1.8$ (*SCN10A*) et $Na_v1.9$ (*SCN11A*) sont-elles exprimées dans le système nerveux périphérique. Dans le muscle squelettique, c'est l'isoforme $Na_v1.4$ (*SCN4A*) qui est présente. Enfin, le principal canal sodique cardiaque correspond à l'isoforme $Na_v1.5$ (*SCN5A*) (Goldin 2001). Le dernier gène (*SCN6A* chez la souris et *SCN7A* chez l'Homme) code pour une isoforme appelée Na_x , seul canal de la famille qui n'est pas voltage-dépendant. Présent dans le cerveau au niveau de structures où la barrière hémato-encéphalique est réduite (tels que l'organe vasculaire de la lame terminale et l'organe subfornical), il joue le rôle de senseur de l'homéostasie sodique. En effet, ce canal est particulièrement sensible à une augmentation de la concentration en sodium extracellulaire. Il a d'ailleurs été montré que les animaux qui ne

possèdent plus ce canal, même s'ils sont fortement déshydratés, ne cessent d'ingérer du sel (Hiyama et al. 2002; Matsumoto et al. 2015).

1. Structure protéique et localisation

Dans le cœur, le courant sodique qui initie le potentiel d'action est généré par les canaux voltage-dépendants $Na_v1.5$ codés par le gène *SCN5A* (Gellens et al. 1992). La sous-unité α est divisée en quatre domaines homologues (DI à DIV), comprenant chacun six segments transmembranaires (S1 à S6). Ces domaines sont reliés entre eux *via* des boucles cytoplasmiques et les extrémités N et C terminales sont elles aussi cytoplasmiques (Figure 10 A). Parmi les six segments de chaque domaine, on peut en distinguer trois qui présentent un rôle bien précis. Ainsi, le segment S4 sert de senseur au canal, et est responsable de l'ouverture du canal lors de la dépolarisation de la membrane plasmique. Les segments S5 et S6 de chaque domaine s'assemblent pour former le pore du canal. Les boucles qui relient ces deux segments, appelées boucles P, interviennent dans la sélectivité du canal (Catterall 2000, 2014) (Figure 10 B).

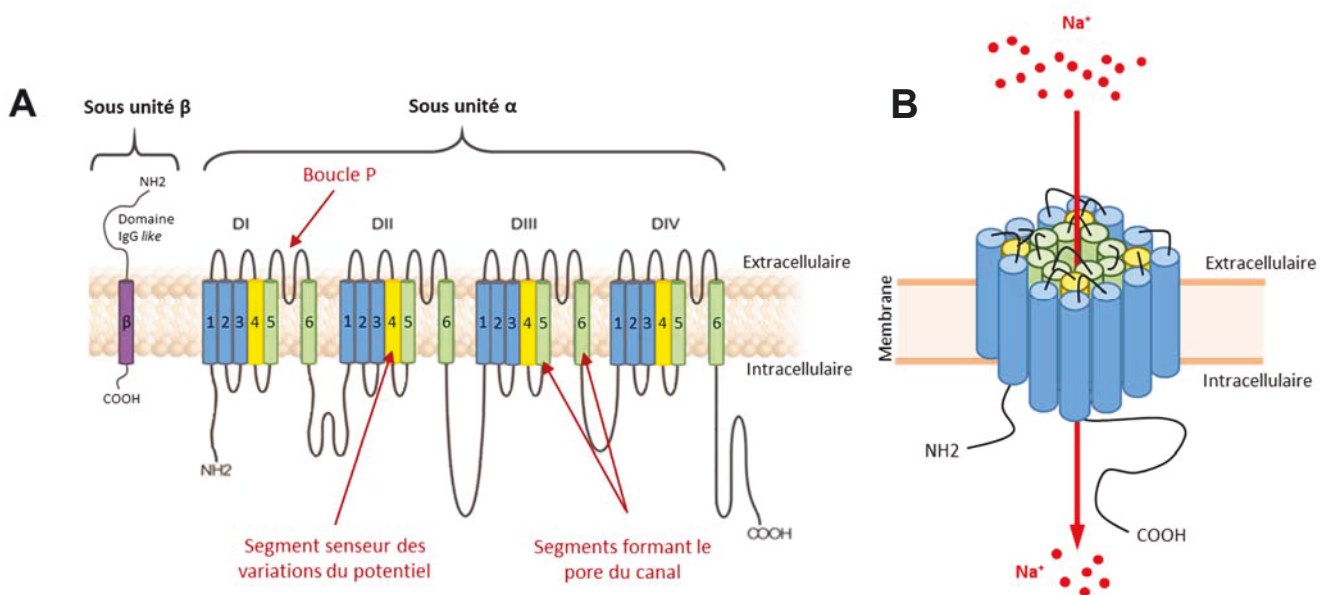


Figure 10 : Structure du canal sodique $Na_v1.5$. (A) Représentation schématique de la structure du canal sodique en 2D. Les domaines I à IV composés chacun de six segments transmembranaires forment la sous-unité α du canal. La sous-unité auxiliaire β (en violet) est repérable grâce à sa boucle extracellulaire IgG « like » (Modifié à partir de Shy et al., 2013). (B) Représentation schématique de la structure du canal sodique en 3D. Les segments S5 et S6 de chaque domaine s'assemblent pour former le pore du canal (vert), les segments S4 (jaune) interviennent dans l'ouverture du canal suite à une variation du potentiel de membrane et les segments S1, S2 et S3 permettent de stabiliser l'ensemble dans la membrane. Les boucles P extracellulaires vont participer à la sélectivité du canal.

Au cours du développement embryonnaire, le premier organe fonctionnel qui se forme est le cœur. Dès le 8^{ème} jour de développement, cette première ébauche du cœur commence à battre en dépit du fait qu'elle ne présente ni valves ni système de conduction mature (Moorman et Lamers 1994). Chez la souris, il a été montré par immunofluorescence que le canal sodique $Na_v1.5$ était localisé uniformément dans le tissu atrial et le tissu ventriculaire jusqu'au 12^{ème} jour de développement. Au 13^{ème} jour, sa présence devient plus marquée dans les branches du faisceau de His et dans les trabécules ventriculaires lorsque la phase de séparation des ventricules est terminée. À partir du 17^{ème} jour de développement embryonnaire, le canal sodique se concentre à la périphérie des nœuds sinusal et auriculoventriculaire. Après la naissance et jusqu'à l'âge adulte, $Na_v1.5$ est plus exprimé dans les oreillettes que dans les ventricules (Domínguez et al. 2008). Par ailleurs, la délétion du gène *SCN5A* est létale dès le 11^{ème} jour de développement embryonnaire. Les embryons présentent alors de futures cavités ventriculaires sous développées et une absence de trabécules (Papadatos et al. 2002). Ainsi, le canal $Na_v1.5$, présente un *pattern* d'expression dynamique au cours du développement embryonnaire démontrant son rôle central dans l'acquisition d'un système de conduction et de contraction mature.

Bien qu'il soit considéré comme principalement cardiaque, le canal $Na_v1.5$ est pourtant présent dans d'autres organes. En effet, on le retrouve dans une partie de l'intestin grêle (le jéjunum) chez le rat où il est impliqué dans l'excitabilité des cellules musculaires lisses et la motricité intestinale (A. Beyder et al. 2016). Chez l'Homme, une perte de fonction des canaux sodiques $Na_v1.5$ (souvent causée par une mutation dans le gène *SCN5A*) a d'ailleurs été associée au syndrome de l'intestin irritable (Arthur Beyder et al. 2014). Ce canal est aussi exprimé à la surface des endosomes tardifs des macrophages. Dans ce type cellulaire non excitable, $Na_v1.5$ servirait de transporteur de charges positives. En laissant entrer ou sortir les ions sodium à l'intérieur de l'organelle, le canal permet alors de moduler la concentration intracellulaire en sodium. Ces variations seraient ensuite perçues par des pompes à protons dépendantes de l'ATP qui s'activeraient et contribueraient à faire baisser le pH à l'intérieur de l'endosome. Ainsi, le canal $Na_v1.5$ participe à l'acidification du milieu intra-endosomal et favorise la digestion des molécules contenues dans l'endosome (Carrithers et al. 2007). Dans un modèle de souris pour la sclérose en plaque (destruction progressive des gaines de myéline qui recouvrent les neurones et favorisent la propagation de l'influx nerveux), il a été montré que le canal $Na_v1.5$ était fortement présent dans les astrocytes du système nerveux central à des stades avancés de la maladie et que sa présence était atténuée lors des phases de rémission. $Na_v1.5$ interviendrait alors dans la réponse des astrocytes face à la dégradation de la myéline (Pappalardo et al. 2014). Le canal $Na_v1.5$ est également exprimé dans des cellules cancéreuses où il favorise la croissance anormale des cellules ainsi que la dissémination des métastases. Cependant les mécanismes d'action ne sont pas encore complètement décrits (Brackenbury 2012).

Dans le cœur, tissu dans lequel les canaux sodiques $Na_v1.5$ restent plus largement étudiés, la propagation de l'influx électrique du nœud sinusal jusqu'à l'ensemble du myocarde (en passant par le nœud auriculoventriculaire, le faisceau de His et les fibres de Purkinje) requière la présence des canaux $Na_v1.5$. Ces derniers, voltage-dépendants, s'ouvrent et se ferment en fonction du potentiel de membrane de la cellule ce qui génère un courant sodique I_{Na} . À l'échelle cellulaire, dans le cardiomyocyte, $Na_v1.5$ est localisé au niveau de la membrane latérale, des disques intercalaires et des tubules-T (Shy, Gillet, et Abriel 2013). Dans le perinexus, région qui borde les jonctions gap du disque intercalaire, on retrouve également des canaux sodiques $Na_v1.5$ (Rhett et al. 2012). Ainsi, dans le myocyte cardiaque, $Na_v1.5$ est présent dans les différents domaines du sarcolemme.

2. Activation et inactivation du canal $Na_v1.5$

a. Activation du canal $Na_v1.5$

L'activation des canaux sodiques dépend de la répartition des charges électriques de part et d'autre de la membrane. Lorsque celle-ci se dépolarise, le canal change de conformation et passe d'un état fermé à un état ouvert, laissant alors entrer un flux d'ions sodium à l'intérieur de la cellule (Hodgkin et Huxley 1952).

A l'origine de cette ouverture, on retrouve les segments S4 de chaque domaine du canal sodique. Ces segments contiennent des répétitions de motifs composés d'acides aminés chargés positivement (arginine et lysine) entourés d'acides aminés apolaires. Ces répétitions font que les segments S4 sont les segments les plus chargés du canal (Noda et al. 1984). Ces charges positives sont indispensables pour que le canal sodique puisse s'ouvrir afin de générer un courant ionique entrant. En effet, la délétion de seulement quelques acides aminés chargés positivement sur le segment S4 provoque une dysfonction du canal sodique et le courant enregistré est alors très faible voir nul (Stühmer et al. 1989). Lors de la dépolarisation de la membrane, les segments S4 changent de conformation et se déplacent dans la membrane plasmique, ce qui permet l'ouverture du canal. Le mécanisme qui sous-tend le changement de conformation des segments S4 est encore controversé. Trois modèles ont en effet été proposés. Le tout premier modèle dit de la « vis hélicoïdale » suggère que, en réponse à une variation du potentiel de membrane, le segment S4 subit à la fois une rotation de 180° et une translation à travers la membrane plasmique (Guy et Seetharamulu 1986; Gandhi et Isacoff 2002). Le second modèle est le modèle de « *voltage-sensor paddle* » proposé en 2003. Celui-ci repose sur la

collaboration entre une des deux hélices composant le segment S3 (S3a et S3b) et le segment S4. Ici l'hélice S3b directement associée au segment S4 forme une « pagaie » qui va se déplacer dans la membrane plasmique lors de la dépolarisation, le segment S4 est donc écarté ce qui permet l'ouverture du canal (Y. Jiang et al. 2003). Le dernier modèle suggère que le segment S4 ne se déplacerait que très légèrement à travers la membrane. Ce léger déplacement serait alors suffisant pour assurer l'ouverture du canal et le passage des ions (Chanda et al. 2005).

b. Sélectivité du canal $Na_v1.5$

Une fois ouverts, les canaux sodiques ne doivent laisser passer que les ions sodium et exclure l'entrée d'autres ions. Ainsi, le passage des ions à travers le pore du canal est sélectif. Cette perméabilité du canal, réservée uniquement aux ions sodium, est rendue possible grâce à la présence d'un filtre de sélectivité à l'entrée du pore. Celui-ci est situé sur les boucles P extracellulaires qui relient les segments S5 et S6 de chaque domaine.

Ce filtre de sélectivité, hautement conservé, se présente sous la forme d'un motif DEKA (pour Aspartate (D), Glutamate (E), Lysine (K) et Alanine (A)) où chaque acide aminé est retrouvé sur la boucle P des domaines I à IV respectivement (Terlau et al. 1991). Ces acides aminés sont extrêmement importants car ils déterminent à eux seuls la sélectivité du canal. Par exemple, si la Lysine est absente ou substituée par un autre acide aminé, la sélectivité du canal pour les ions sodium est fortement réduite et le canal devient perméable aux ions calcium (Heinemann et al. 1992). Le mécanisme de sélectivité et de passage d'ions sodium à travers le canal est un sujet de recherche qui nécessite de recréer des structures atomiques détaillées du canal. Les canaux sodiques eucaryotes sont de grandes protéines membranaires complexes, fragiles et difficiles à purifier en vue des étapes de cristallographie (Kühlbrandt 2016). Il a été découvert depuis les années 2000, dans certaines bactéries, la présence de canaux sodiques. Plus simples en termes de structure, ils fonctionnent cependant de la même manière et présentent également un filtre de sélectivité en tout point semblable à celui présent chez les eucaryotes. De plus, ces canaux sodiques bactériens sont plus robustes et peuvent être cristallisés et analysés en rayons X (Ren et al. 2001). L'analyse cristallographique des domaines formant le pore et le filtre de sélectivité du canal sodique Na_vMs (pour la souche bactérienne *Magnetococcus marinus*) a montré que seulement des ions sodium partiellement hydratés pouvaient franchir le filtre de sélectivité et le traverser en ligne droite rapidement. L'absence de liaisons entre le filtre et les ions résulterait d'un équilibre électrostatique entre les charges des acides aminés du filtre et les charges portées par les ions sodium (Figure 11). Cependant, pour aller plus loin dans la compréhension du

fonctionnement de ce filtre de sélectivité, il faut avant tout pouvoir améliorer la résolution, pourtant déjà très élevée, des microscopes à rayon-X et optimiser encore la technique de cristallographie (Naylor et al. 2016).

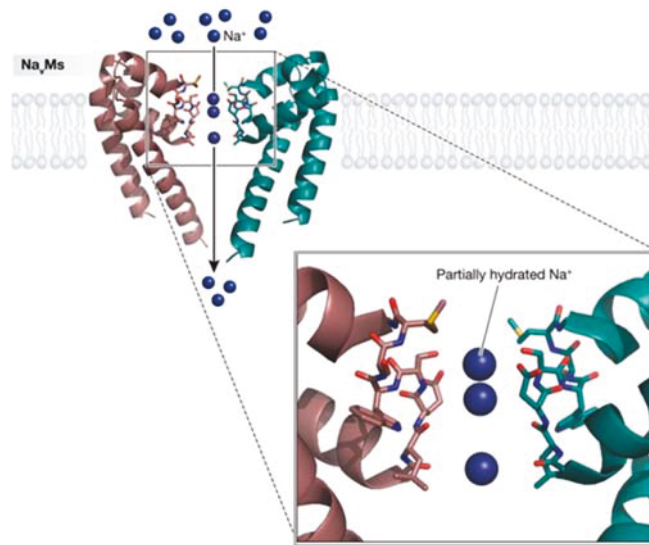


Figure 21 : Passage des ions sodium à travers le filtre de sélectivité du canal $Na_v1.5$. Représentation 3D de la diffusion des ions sodium à l'intérieur du pore du canal sodique obtenue par cristallographie. Par soucis de clarté, seuls les segments S5 et S6 de deux domaines et leurs boucles P sont représentés (en vert et rose). Les ions sodium partiellement hydratés pénètrent dans le pore les uns à la suite des autres. Cette traversée linéaire est rendue possible par les charges négatives portées par le filtre de sélectivité qui attirent les ions sodium vers le pore et les autorisent à passer. Les charges positives du filtre de sélectivité repoussent les ions sodium une fois dans le pore. Ainsi, les ions ne se fixent pas directement aux éléments du pore et diffusent rapidement (Kühlbrandt, 2016).

c. Inactivation du canal $Na_v1.5$

L'inactivation du canal sodique correspond au basculement de l'état ouvert du canal vers un état inactivé où le passage d'ions sodium est bloqué. Le canal est dit inactif car il ne peut se rouvrir qu'après une période réfractaire, ce qui permet de limiter la fréquence des décharges des cellules excitables. Cette étape d'inactivation peut être divisée en deux catégories selon leur cinétique. On distingue alors l'inactivation rapide (Rudy 1978) et l'inactivation lente (Hodgkin et Huxley 1952).

L'inactivation rapide

L'inactivation rapide a lieu dans les millisecondes suivant l'activation et est régie par l'intermédiaire de la boucle intracellulaire qui relie les domaines III et IV. Ce mécanisme de fermeture est réalisé selon un modèle de « *ball and chain* » où la « boule » qui va venir obstruer le pore du canal

correspond à la boucle de liaison inter-domaines III et IV. En effet, celle-ci se replie vers l'intérieur du pore du côté intracellulaire, prévenant ainsi le passage des ions sodium et rendant le canal inactif (Vassilev, Scheuer, et Catterall 1988). Pour assurer l'inactivation du canal, il a été identifié sur cette boucle, un motif essentiel appelé IFM pour Isoleucine (I), Phénylalanine (F) et Méthionine (M) (West et al. 1992). Ces trois acides aminés sont capables de se lier à la partie intracellulaire du pore, ce qui amène la boucle à venir se loger à l'entrée du pore du canal. L'importance de ce motif avait été montré en remplaçant les trois acides aminés clés par trois résidus Glutamine (IFM devenant alors QQQ), ce qui engendre l'abolition de l'inactivation du canal (Grant et al. 2000). Après cette phase d'inactivation, le canal retourne à un état dit de repos durant le processus de repolarisation. Simplement fermé, il est à nouveau opérationnel pour une nouvelle activation. De manière intéressante, il a été observé que l'inactivation rapide des canaux sodiques peut être modulée par la partie C-terminale du canal. En effet, cette partie du canal interagit directement avec la boucle d'inactivation, reliant les domaines III et IV, afin de la stabiliser pendant la phase d'inactivation. Dès lors que cette interaction est perturbée, le canal ne s'inactive pas et tend à se rouvrir ce qui empêche la membrane plasmique de se repolariser (Motoike et al. 2004). Cette coopération a pu être également montrée en tronquant une portion de l'extrémité C-terminale du canal sodique qui le rend alors incapable de s'inactiver (Cormier et al. 2002).

L'inactivation lente

L'inactivation lente est un processus moins bien étudié que l'inactivation rapide. Elle n'est pas couplée à l'activation du canal et peut durer jusqu'à quelques secondes (Hodgkin et Huxley 1952). Le canal sodique entre dans cette phase d'inactivation lente lorsque la dépolarisation est prolongée et correspond alors à un long processus de récupération. Les mécanismes impliqués dans ce type d'inactivation ne sont pas très bien décrits mais contrairement à l'inactivation rapide, elle ne nécessiterait pas la présence d'une « boule » pour bloquer le pore. Seules des modifications dans la conformation du pore du canal et le rôle de certains résidus au sein des différents segments ou boucles initieraient l'entrée du canal dans une phase d'inactivation lente. Ainsi, il a été montré que des substitutions d'acides aminés dans le segment S4 du domaine IV, dans la boucle entre les segments S5 et S6 ainsi que dans le sixième segment du domaine II provoqueraient l'entrée du canal sodique dans une phase d'inactivation lente (Goldin 2003; Detta, Frisso, et Salvatore 2015).

En fonction du potentiel de membrane, le canal sodique va donc présenter trois états conformationnels distincts : un état fermé où le canal est activable à tout moment, un état ouvert où le passage des ions du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire est possible et enfin un état inactivé où le canal ne peut être ouvert immédiatement, correspondant à la période réfractaire qui le prépare à une nouvelle activation (Figure 12).

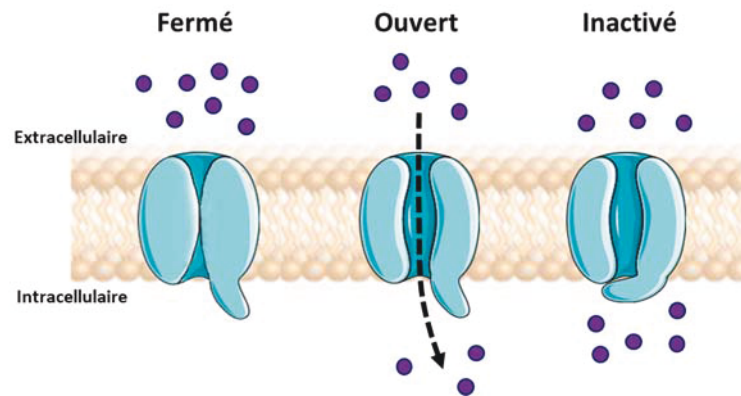


Figure 12 : Les trois états conformationnels d'un canal ionique dépendant du potentiel. Représentation schématique d'un canal ionique transmembranaire qui adopte successivement trois conformations possibles. Un état fermé, où le pore du canal n'est pas accessible pour les ions mais il peut s'ouvrir à tout moment. Un état ouvert, où le passage des ions est autorisé. Enfin, le canal peut entrer en inactivation, lorsque seule la porte d'inactivation se referme. Cette fermeture a lieu immédiatement après l'ouverture du canal. Celui-ci ne peut s'activer tant que la porte d'inactivation est maintenue fermée, c'est la période réfractaire.

3. Canalopathies cardiaques liées au canal Nav1.5

Des perturbations dans les propriétés d'activation ou d'inactivation des canaux sodiques peuvent moduler l'apparition, la durée et aussi la fréquence des potentiels d'action. L'importance physiologique des canaux sodiques Nav1.5 est démontrée par leurs implications dans de nombreuses pathologies cardiaques. Des mutations dans le gène *SCN5A* (codant pour le canal sodique Nav1.5) qui altèrent les propriétés biophysiques du canal sont retrouvées dans plusieurs canalopathies cardiaques. On dénombre plus de 450 variants génétiques rares sur le gène *SCN5A* qui peuvent survenir à la fois dans les différents segments des quatre domaines qui composent le canal, mais aussi dans les boucles intracellulaires et extracellulaires. Cependant, sur plus de 20 mutations décrites, un tiers affecte les segments S4 (segments indispensables à l'activation du canal) mais aucune d'entre elles n'aboutit aux mêmes conséquences sur le canal. De plus, certains variants donnent lieu à l'expression d'un phénotype dit mixte chez des patients qui cumulent alors plusieurs pathologies. Les manifestations cliniques des patients atteints de canalopathies cardiaques liées au canal Nav1.5 comprennent un large éventail d'arythmies cardiaques et de troubles de la conduction. Parmi elles, on retrouve le syndrome

de QT long, le syndrome de Brugada mais aussi des cas de cardiomyopathie dilatée, de fibrillation atriale, de dysfonction sinusale et de mort subite du nourrisson.

Les patients atteints du syndrome de QT long présentent un allongement de l'intervalle QT sur un électrocardiogramme correspondant à un défaut de repolarisation du ventricule. Le tableau clinique des patients fait alors état de cas de torsades de pointes suite aux troubles du rythme ventriculaire, de syncopes et de cas de mort subite. Le QT long de type 3 (LQT3) est une pathologie associée à des mutations sur le gène *SCN5A* provoquant un gain de fonction du canal $\text{Na}_v1.5$. La phase d'inactivation du canal est altérée ce qui génère un courant sodique persistant à l'origine de l'allongement de l'intervalle QT. À l'image du syndrome de QT long, d'autres pathologies peuvent survenir dans le cas d'un gain de fonction du canal $\text{Na}_v1.5$ comme le syndrome de la mort subite du nourrisson, la fibrillation atriale ou la cardiomyopathie dilatée.

Le syndrome de Brugada se manifeste lui aussi par une arythmie ventriculaire mais qui est accompagnée d'une prédisposition à des épisodes de syncopes, voire de mort subite en période de repos chez des individus jeunes (moins de 40 ans). Les mutations sur le gène *SCN5A* associées au syndrome de Brugada entraînent une perte de fonction du canal $\text{Na}_v1.5$ causant, entre autre, la synthèse d'un canal aux propriétés d'ouverture altérées ou bien une disponibilité des canaux à la membrane réduite due à des rétentions du canal dans des compartiments intracellulaires. (Remme 2013; Datta, Frisso, et Salvatore 2015; Zaklyzminskaya et Dzemeshevich 2016; Veerman, Wilde, et Lodder 2015).

Ces canalopathies peuvent aussi être la conséquence de mutations affectant les partenaires du canal $\text{Na}_v1.5$. En effet, les canaux $\text{Na}_v1.5$ sont capables d'interagir avec de nombreuses protéines partenaires qui peuvent modifier elles aussi ses propriétés biophysiques ou sa localisation. On retrouve parmi ces partenaires : des protéines, des enzymes mais aussi des protéines d'ancrage ou encore la sous-unité régulatrice β (Shy, Gillet, et Abriel 2013).

4. Partenaires du canal $\text{Na}_v1.5$

Les partenaires du canal $\text{Na}_v1.5$ peuvent être organisés en trois groupes selon leur activité et leur effet sur le fonctionnement du canal. On peut ainsi distinguer : les protéines capables de réguler les propriétés biophysiques du canal, les enzymes qui vont moduler l'activité du canal par des modifications post-traductionnelles et enfin les protéines adaptatrices et d'ancrage qui vont influencer le transport et la localisation subcellulaire du canal. Dans cette partie, seuls les partenaires illustrant

l'importance du complexe canalaire qui entoure Nav1.5 seront décrits. En effet, le réseau de partenaires qui se crée autour de Nav1.5 va influencer chaque étape depuis la synthèse du canal jusqu'à son activité une fois ancré à la membrane plasmique. Un schéma récapitulatif plus exhaustif de l'ensemble des partenaires identifiés sera présenté à la fin de cette partie (Figure 13 voir page 31).

Les sous-unités β

Les sous-unités régulatrices β sont des protéines monomériques composées d'un unique segment transmembranaire entouré d'une courte partie C-terminale intracellulaire ainsi que d'une large partie N-terminale extracellulaire. Cette dernière contient un domaine « *immunoglobulin-like* » impliqué dans des processus d'adhésion cellulaire (Figure 13 voir page 31). On dénombre quatre isoformes de sous-unités β dans le cœur, $\beta 1$ à $\beta 4$, codées respectivement par les gènes *SCN1B* à *SCN4B* (Brackenbury et Isom 2011). La liaison entre Nav1.5 et les sous-unités β peut être non covalente comme pour $\beta 1$ et $\beta 3$ ou covalente *via* un pont disulfure pour $\beta 2$ et $\beta 4$ (Namadurai et al. 2015). Les travaux réalisés sur le rôle de ces sous-unités β dans la régulation des cinétiques d'activation et d'inactivation du canal Nav1.5 ont rapporté l'existence d'un décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels hyperpolarisants (gain de fonction) entraînant l'installation d'un courant sodique persistant (Watanabe et al. 2008). Par ailleurs, des souris déficientes pour la sous-unité $\beta 1$ présentent un allongement de la durée du potentiel d'action avec un intervalle QT plus long. Il a également été enregistré dans les myocytes ventriculaires de ces souris une augmentation de l'expression protéique du canal Nav1.5 corrélée à une augmentation du courant sodique I_{Na} (Lopez-Santiago et al. 2007). D'un point de vue physiopathologique, des mutations dans les gènes codant pour les sous-unités β sont associées au syndrome de Brugada, à des cas de mort subite, de fibrillation atriale mais aussi à des cas de QT long (LQT-3) (O'Malley et Isom 2015). Les sous-unités régulatrices β semblent donc impliquées dans la régulation de l'expression à la surface cellulaire de Nav1.5 ainsi que dans des modifications des propriétés biophysiques du canal.

Les enzymes

Le canal Nav1.5 peut subir plusieurs modifications post-traductionnelles. Celles-ci vont avoir des conséquences sur le fonctionnement du canal, en modifiant ses cinétiques d'activation et d'inactivation, mais aussi avoir des conséquences sur l'adressage du canal au sarcolemme. Nav1.5, comme d'autres canaux ioniques, est une protéine hautement glycosylée (Waechter, Schmidt, et Catterall 1983). En effet, elle héberge dans ses parties extracellulaires plusieurs motifs conservés de N-glycosylation, notamment dans la boucle P reliant les segments S5 et S6 du domaine I (Bennett 2002). Bien que la composition moléculaire exacte des N-glycanes dans les cardiomyocytes et leurs

sites d'attachement n'aient pas encore été précisément déterminés, leur présence sur Nav1.5 et leur impact sur le trafic et le fonctionnement de ce canal ont, eux, été bien établis (Stocker et Bennett 2006). Par exemple, il a été montré que certaines mutations sur *SCN5A*, identifiées dans des patients atteints du syndrome de Brugada, entraînaient l'accumulation à la membrane de canaux immatures. Faiblement glycosylés, ces canaux mutants contourneraient la voie traditionnelle de maturation par l'appareil de Golgi et quitteraient le réticulum endoplasmique pour être envoyés à la membrane. Ces canaux immatures seraient donc présents dans la membrane mais non complètement fonctionnels (Mercier et al. 2015).

Parmi les modifications post-traductionnelles, on retrouve également les phosphorylations par les protéines kinases A et C (respectivement PKA et PKC) ainsi que par la CAMKII (CALcium/CALmoduline Kinase II) (Figure 13 voir page 31). La majeure partie des sites de phosphorylation identifiés sont présents dans la première boucle de liaison intracellulaire entre les domaines I et II du canal. Ainsi, cette région semble critique dans la régulation du canal Nav1.5 par des modifications post-traductionnelles de type phosphorylation (Marionneau et al. 2012). Il a été observé que des mutations des sites de phosphorylation sur le canal pour la PKA induisent une diminution du courant sodique (Aiba et al. 2014). De plus, il a été proposé que la phosphorylation du canal par la PKA permettait de masquer le site de rétention des canaux dans le réticulum endoplasmique (motif RXR situé dans la boucle intracellulaire entre les domaines I et II du canal) (Zhou et al. 2002). Ainsi, la PKA joue un rôle dans l'adressage des canaux Nav1.5 à la membrane plasmique en facilitant leur sortie du compartiment de stockage, où ils sont retenus, provoquant alors une augmentation du courant sodique I_{Na} . À l'inverse des effets observés à la suite de la phosphorylation par la PKA, la phosphorylation du canal par la PKC entraîne une diminution de la densité de courant I_{Na} ainsi qu'un déplacement de la courbe d'inactivation vers des potentiels hyperpolarisants (perte de fonction) (Qu et al. 1994; Murray et al. 1997). Le site de phosphorylation de la PKC est situé sur la boucle intracellulaire reliant les domaines III et IV du canal Nav1.5. Une mutation dans ce site de phosphorylation abolit les effets de la PKC. En effet, aucune perte de la densité du courant sodique et aucun déplacement de la courbe d'inactivation ne sont enregistrés (Qu et al. 1996). Il a été également suggéré que la PKC aurait un impact sur le trafic des canaux sodiques qui, une fois phosphorylés, sont redistribués et moins exprimés à la membrane plasmique (Hallaq et al. 2011). De manière intéressante, deux autres études ont fait le lien entre la PKC et la protéine GPD1L (Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase 1 Like) dont des mutations ont été corrélées à une diminution du courant I_{Na} et associées au syndrome de Brugada et à la mort subite du nourrisson. Les effets de GPD1L sur le courant sodique sont abolis en présence d'un inhibiteur de la PKC ou bien d'un canal sodique muté pour son site de phosphorylation pour la PKC (Q. Liu et al. 2009; Valdivia et al. 2009). Ainsi, la voie de régulation du canal Nav1.5 par la protéine GPD1L serait dépendante de la PKC.

Hormis les protéines PKA et PKC, des sites de phosphorylation par la CAMKII ont été identifiés dans la boucle intracellulaire entre les domaines I et II ainsi que dans la partie C-terminale du canal Nav1.5. Une étude récente de phosphoprotéomique évoque même l'existence de 23 sites potentiels de phosphorylation par la CAMKII (Herren et al. 2015). Il a été montré par des expériences de co-immunoprécipitation que le canal Nav1.5 et la protéine CAMKII interagissaient ensemble (Tan et al. 2002). De plus, l'inhibition de la CAMKII provoque un décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels négatifs (gain de fonction) et la surexpression de la CAMKII provoque l'installation d'un courant sodique persistant (Wagner et al. 2006; Yoon et al. 2009). Ces observations ont également été validées *in vivo*. En effet, il a été montré dans des cardiomyocytes provenant de souris dont le canal sodique n'est pas phosphorylé par la CAMKII, l'absence de courant sodique persistant. Toutefois, les mécanismes d'action restent à être définis (Glynn et al. 2015).

Les protéines adaptatrices et d'ancrage

Il a été constaté que les canaux sodiques étaient aussi capables d'interagir avec des protéines du cytosquelette d'Actine, du desmosome, des jonctions gap, avec le complexe Dystrophine-Glycoprotéines mais également avec des protéines MAGUKs (Membrane Associated GUanylate Kinase). Chacune de ces interactions va avoir des conséquences sur la localisation du canal sodique dans le cardiomyocyte (Abriel 2010) (Figure 13 voir page 31).

L'Ankyrine-G est une protéine dite adaptatrice qui permet principalement de faire le lien entre les canaux ioniques et le cytosquelette d'Actine. On la trouve au niveau des disques intercalaires et des tubules-T dans le myocyte cardiaque. Il a été montré qu'elle interagit directement avec le canal Nav1.5 *via* un site de fixation situé sur la boucle intracellulaire entre les domaines II et III du canal. Une mutation de ce site de fixation est notamment retrouvée associée au syndrome de Brugada où la perte d'interaction entre l'Ankyrine-G et Nav1.5 empêche l'accumulation des canaux sodiques à la surface cellulaire des cardiomyocytes (Mohler et al. 2004). De plus, une réduction de l'expression de l'Ankyrine-G dans les cardiomyocytes entraîne une diminution de l'expression de Nav1.5 et une rétention des canaux dans la zone périnucléaire, aboutissant à la diminution du courant I_{Na} enregistré (Lowe et al. 2008). Ainsi, l'Ankyrine-G peut réguler, à la fois, l'ancrage dans des régions spécialisées du sarcolemme (disques intercalaires et tubules-T) et le trafic des canaux Nav1.5 dans les cardiomyocytes. Au niveau de la zone de jonction entre deux myocytes cardiaques adjacents, aussi appelée desmosome, on retrouve la Plakophiline et la Desmogléine qui sont toutes deux des partenaires de Nav1.5 (Sato et al. 2009; Rizzo et al. 2012). Une mutation dans le gène codant pour la Desmogléine est associée à des cas d'arythmie ventriculaire droite. La surexpression de ce mutant dans un modèle murin provoque une diminution de la vitesse de dépolarisation et une diminution du courant I_{Na} ainsi

qu'un ralentissement de la conduction cardiaque (Rizzo et al. 2012). Il a également été observé une diminution de I_{Na} ainsi qu'un déplacement de la courbe d'inactivation vers des potentiels négatifs (gain de fonction) en l'absence de Plakophiline (P. Y. Sato et al. 2009). De plus, la perte de la Plakophiline modifie la localisation d'une protéine des jonctions gap, la Connexine-43, qui est redistribuée dans le cytoplasme de la cellule (Oxford et al. 2007). Ces deux protéines appartiendraient alors à un large complexe macromoléculaire qui ferait le lien entre les jonctions gap et les desmosomes et dont le canal sodique ferait aussi partie.

La Connexine-43 est l'isoforme majoritaire des jonctions communicantes et est essentielle pour la propagation de l'influx électrique cardiaque de cellule en cellule. Il a été montré, dans un modèle de souris invalidées pour la Connexine-43, que le canal $Na_v1.5$ n'était plus présent au disque intercalaire et que le courant sodique était diminué dans les myocytes cardiaques (Jansen et al. 2012). De plus, il a été observé, dans la zone qui borde les jonctions gap ou perinexus, que la Connexine-43, qui n'est pas encore incorporée aux plaques jonctionnelles, co-localise avec le canal sodique (Rhett et al. 2012). De manière intéressante, il avait été mis en évidence que la protéine EB1 (End Binding-1), impliquée dans la polarisation du réseau de microtubules, permet d'adresser la Connexine-43 jusqu'à la zone de contact cellule-cellule (Shaw et al. 2007) et que le canal $Na_v1.5$ était lui aussi transporté *via* le réseau de microtubules jusqu'à la membrane (Casini et al. 2010). Ces deux notions ont pu être mises en relation et montrent que la localisation, au disque intercalaire, de $Na_v1.5$ et d'EB1 est dépendante de la Connexine-43. En effet, si cette dernière est mutée et n'interagit plus avec EB1, le nombre de canaux $Na_v1.5$ fonctionnels au disque intercalaire et le courant sodique qui y est enregistré (par macro-patch) sont réduits. Ainsi, pour que le canal sodique puisse être amené au disque intercalaire, l'extrémité du microtubule qui le transporte, représenté par la protéine EB1, va se lier à la Connexine-43 délivrant alors le canal précisément dans ce domaine du sarcolemme (Agullo-Pascual et al. 2014).

Le canal sodique $Na_v1.5$ possède en partie C-terminale, un motif de liaison aux domaines PDZ, nommé SIV (Sérine-Isoleucine Valine). Ce motif permet à la protéine Syntrophine de se lier à $Na_v1.5$ et c'est par le biais de cette liaison intermédiaire, que le canal se retrouve associé à la Dystrophine. En effet, il a été rapporté que chez des souris mdx (modèle de la myopathie de Duchenne), déficientes pour la Dystrophine, l'expression protéique de $Na_v1.5$ était réduite entraînant une diminution du courant sodique I_{Na} ainsi que des troubles de la conduction cardiaque. De plus, cette interaction avec le complexe Dystrophine-Glycoprotéines a lieu spécifiquement à la membrane latérale du cardiomyocyte (Gavillet et al. 2006). Cependant, le mécanisme par lequel ce complexe pourrait réguler l'expression protéique de $Na_v1.5$ n'est pas connu. Pour comprendre le rôle du motif SIV dans cette régulation, sa délétion a été réalisée chez la souris. Il a été montré, dans les cardiomyocytes fraîchement isolés, que le courant sodique enregistré par la méthode du macro-patch était plus faible à la membrane latérale par rapport au courant sodique enregistré au disque intercalaire. Cette

diminution du courant, restreinte à la membrane latérale, s'accompagne également d'une diminution de l'expression protéique de $Na_v1.5$ (Shy et al. 2014). De plus, une mutation faux-sens touchant le domaine SIV est associée au syndrome de Brugada, ce qui souligne l'importance de ce motif dans la régulation de l'expression et du fonctionnement de $Na_v1.5$ (Shy et al. 2014). Il avait précédemment été observé que ce motif d'interaction avec les domaines PDZ intervenait également dans la fixation d'un autre partenaire de $Na_v1.5$: la protéine MAGUK SAP-97. Cette liaison, qui a lieu au disque intercalaire, entraîne une augmentation de la densité de canaux fonctionnels à la membrane et une augmentation du courant I_{Na} (Petitprez et al. 2011). Ainsi, la protéine SAP-97 et la Syntrophine partagent le même motif de liaison pour le canal mais ne sont pas localisées dans les mêmes domaines du sarcolemme. De cette observation est née la notion de sous-population de canaux sodiques (Petitprez et al. 2011; Shy, Gillet, et Abriel 2013). Ces dernières s'organisent en complexes macromoléculaires distincts et localisés dans des compartiments membranaires différents. Ainsi, cette spécificité de localisation des canaux sodiques pourrait être à l'origine de la polarisation électrique du cardiomyocyte.

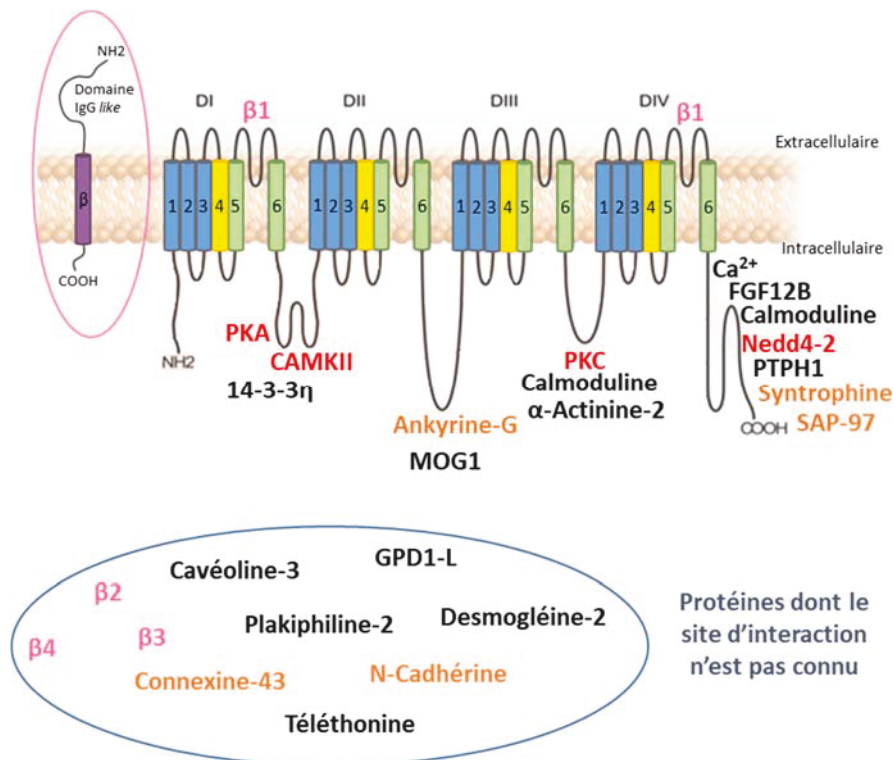


Figure 13 : Partenaires identifiés du canal sodique $Na_v1.5$. Les partenaires du canal sodiques sont répartis en trois groupes : les protéines modifiant les propriétés biophysiques du canal (en rose), les enzymes (en rouge) et les protéines d'ancrage (en orange). À ce jour, près de la moitié des partenaires connus pour $Na_v1.5$ n'ont pas encore de site d'interaction identifié. Pour ceux déjà identifiés, ils se concentrent principalement dans les boucles interdomaines ou C-terminale (d'après Detta, Frisso et Salvatore 2015 ; Shy et al., 2014).

Les mécanismes régissant le trafic et l'organisation de ces sous populations de canaux dans des domaines spécialisés de la cellule cardiaque ne sont aujourd'hui que partiellement identifiés et ouvrent la voie à de nouvelles pistes de recherche intégrant notamment les protéines MAGUK (Membrane Associated Guanylate Kinases), désignées comme de potentielles actrices de cette machinerie.

C. Les protéines MAGUKs

C'est en grande partie suite à l'analyse des MAGUKs et de leur véritable collection de protéines partenaires que l'assemblage de complexes protéiques et leurs fonctionnements ont pu être décortiqués dans plusieurs types cellulaires (neurones, cellules épithéliales ou encore cardiomyocytes).

1. La superfamille des MAGUKs

Les MAGUKs forment une large famille de protéines d'échafaudage fortement concentrée aux synapses mais aussi dans d'autres jonctions cellulaires (serrées, communicantes ou d'adhérence) (Anderson 1996; Dimitratos et al. 1999; González-Mariscal, Betanzos, et Avila-Flores 2000). Elles interviennent dans différents grands processus au sein de la cellule, tels que la communication intercellulaire et l'établissement de la polarité de la cellule et sont également actrices de certaines voies de signalisation. Elles prennent en charge des partenaires variés, aussi bien des molécules d'adhésion cellulaire, que des protéines du cytosquelette, des récepteurs ou encore des canaux ioniques et leurs partenaires. Cette prise en charge peut se faire dès la sortie du Golgi et jusqu'à la membrane plasmique. Elles interviennent ensuite pour maintenir ces partenaires dans des domaines spécialisés du sarcolemme où ils pourront être fonctionnels. Toutes ces actions sont rendues possibles grâce à l'association de plusieurs domaines d'interaction qui composent les MAGUKs (Funke, Dakoji, et Bredt 2005; J. Zhu, Shang, et Zhang 2016).

Les MAGUKs ont une structure de base comprenant un ou plusieurs domaine PDZ (dont le nom est un acronyme désignant les trois premières protéines à domaine PDZ découvertes : PSD-95 ((PostSynaptic Density-95), Dlg (Disc LarGe), et ZO (Zonula Occludens)), un domaine SH3 (Src Homolog 3), et comme leur nom l'indique, un domaine GUK (GUanylate Kinase). Selon le nombre de domaines

PDZ qu'elles contiennent et la présence ou non de domaines additionnels (comme CAMKII ((CALcium/CAIModulin-dependent protein Kinase II) ou CARD (CAspase Recruitment Domain)) elles peuvent être classées en six sous familles (Figure 14). Ainsi peut-on distinguer : les DLGs (pour Discs LarGe), les MPPs (pour Membrane Palmitoylated Protein), CASK, les ZO, CARMA (CAspase Recruitment domain containing MAGUK protein), MAGIs (MAGUK with an Inverted orientation) et enfin CACNB (Voltage-dependent L-type calcium channel β subunit) (Funke, Dakoji, et Bredt 2005; Montgomery, Zamorano, et Garner 2004; Oliva et al. 2012) (Figure 14).

A l'origine, toutes les MAGUKs dériveraient de la même protéine qui serait apparue très tôt dans l'évolution des organismes, au moment de l'embranchement des métazoaires et des protistes. Les MAGUKs ne sont donc pas présentes dans les plantes ou dans les champignons. Au fil des événements évolutifs, la structure de base formée par les domaines PDZ, SH3 et GUK est restée conservée mais des modifications sont apparues, notamment un changement dans le nombre de domaines PDZ. La présence de plusieurs copies de ce domaine chez certaines MAGUKs pourrait être la conséquence de duplications issues, au commencement, d'un seul domaine PDZ. Les premières divisions auraient alors formé les trois domaines PDZ des DLGs et d'autres divisions auraient donné en parallèle les domaines supplémentaires des MAGIs (te Velthuis, Admiraal, et Bagowski 2007; de Mendoza, Suga, et Ruiz-Trillo 2010).

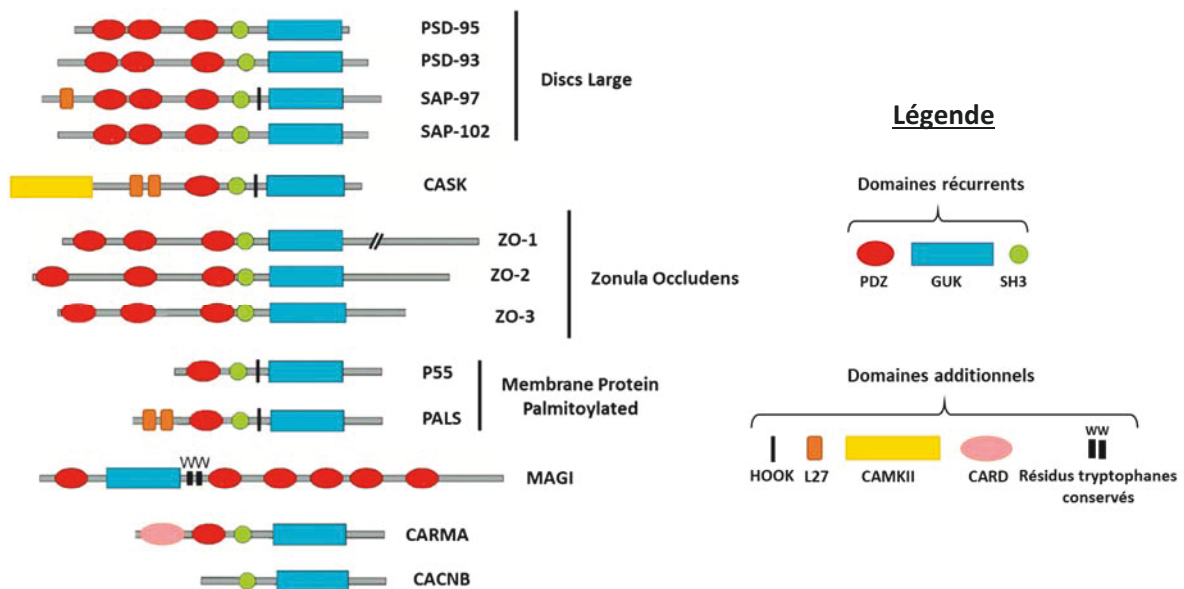


Figure 14 : La superfamille des protéines Membrane Associated Guanylate Kinases. Réparties en sept sous familles, les protéines MAGUKs sont classées sur la base de leur architecture protéique. Elles possèdent toutes des domaines récurrents, qui forment le squelette propre à toutes les MAGUKs (comme les domaines GUK et PDZ), ainsi que des domaines additionnels qui permettent alors de les différencier (comme les domaines L27 ou encore CAMKII) (modifié à partir de Sheng et Sala, 2001)

Parmi ces MAGUKs, certaines se distinguent en affichant des domaines additionnels qui leurs sont propres ou bien un alignement N-terminal/C-terminal de domaines moins conventionnel. Les protéines MAGIs présentent ainsi trois caractéristiques : le domaine GUK est placé à l'extrémité N-terminale (au lieu de l'extrémité C-terminale comme pour toutes les autres MAGUKs), le domaine SH3 classique est remplacé par deux domaines WW (résidus tryptophanes) et enfin, elles contiennent six domaines PDZ (seules MAGUKs à en posséder autant) (Figure 14). Leur nom de «*MAGUK with an Inverted orientation*» découle ainsi de la disposition inversée de leurs domaines d'interaction (Dobrosotskaya, Guy, et James 1997). De plus, il a été observé que leurs domaines WW peuvent lier des motifs riches en proline et donner lieu à des interactions protéine-protéine comme le ferait un domaine SH3 (Staub et Rotin 1996). Si les domaines WW et SH3, malgré leur différence de structure, peuvent reconnaître les mêmes motifs de fixation, l'hypothèse d'un phénomène de compétition entre MAGIs et d'autres MAGUKs lorsqu'elles sont co-exprimées dans la cellule n'est pas à écarter (Sudol 1996). La protéine CARMA se distingue également en affichant en N-terminal un domaine CARD suivit des domaines PDZ, SH3 et GUK (Figure 14). Les domaines CARD possèdent des motifs d'interaction avec des protéines typiquement liées aux processus d'inflammation et d'apoptose (Hofmann 1999) comme c'est le cas pour la voie de signalisation NF- κ B (Bertin et al. 2001). La protéine MAGUK CACNB ou sous-unité β est la sous-unité régulatrice la plus importante des canaux calciques. Ces derniers représentent la voie d'entrée privilégiée des ions calcium à travers la membrane. Cette sous-unité peut donc influencer l'adressage à la membrane du canal calcique, réguler son activité et modifier ses propriétés biophysiques (Rousset, Charnet, et Cens 2005). La protéine CACNB, n'est généralement pas considérée comme étant un membre des MAGUKs étant donné qu'elle ne présente pas de domaine PDZ mais arbore seulement un domaine SH3 et un domaine GUK (Figure 14). Cependant, suite à l'analyse phylogénétique, il a été montré que cette protéine était bel et bien apparentée aux MAGUKs. En effet, elle serait le fruit d'une division d'une MAGUK appartenant à la sous famille MPP où la partie N-terminale aurait été coupée laissant seulement les domaines SH3 et GUK (de Velthuis, Admiraal, et Bagowski 2007). Une autre MAGUK particulière est la protéine CASK qui est la seule MAGUK à présenter en N-terminal un domaine CAMKII et sera décrite en détail dans le chapitre suivant.

Les protéines MAGUKs les plus étudiées appartiennent à la sous famille DLG dont la toute première a été identifiée il y a plus de 25 ans (Woods et Bryant 1991). Depuis quatre isoformes ont été identifiées chez les vertébrés : les protéines SAP-97, PSD-93, SAP-102 et PSD-95. Elles possèdent toutes quatre domaines PDZ, un domaine SH3 et un domaine GUK (Figure 14). Ces MAGUKs sont les plus connues car elles participent à la régulation des récepteurs glutamatergiques de la synapse. Par immunofluorescence, on les trouve localisées et associées à ces récepteurs dans le cytoplasme et à la membrane plasmique neuronale (Aoki et al. 2001). Ces protéines sont donc présentes à la fois pour

maintenir les récepteurs glutamatergiques au niveau des membranes des synapses mais aussi pour réguler leur transfert entre un site non synaptique vers un site synaptique. La perte d'une de ces MAGUKs ou même de plusieurs d'entre elles, entraîne la formation accrue de synapses silencieuses dont la transmission glutamatergique est réduite de près de 80% (Chen et al. 2015; Levy et Nicoll 2017). Les DLGs sont également connues pour leur implication dans l'établissement de la polarité apico-basale des cellules épithéliales en s'associant aux protéines Scr (SCRibble) et Lgl (Lethal Giant Larvae) (Yamanaka et Ohno 2008).

Dans les années 1990, les protéines de la sous famille des MPPs ont été caractérisées pour la première fois dans les érythrocytes, du fait de leur capacité à lier le cytosquelette d'Actine *via* le complexe Protéine 4.1/Spectrine (Ruff, Speicher, et Husain-Chishti 1991). Il a ensuite été montré, quelques années plus tard, que l'élasticité et la stabilité de la membrane plasmique des érythrocytes était dépendante de la présence d'un complexe tripartite composé de la Protéine 4.1, de la protéine MPP et de la protéine transmembranaire Glycophorine-C (Marfatia et al. 1994; Nunomura et al. 2000). Par ailleurs un défaut dans ce lien unissant la membrane plasmique et le cytosquelette peut engendrer des cas d'anémie hémolytique (Gallagher 2013). Dans des cellules épithéliales, les protéines MPPs interviennent dans l'établissement de la polarité en s'associant à la fois à la E-Cadhérine, afin de permettre son transport jusqu'aux jonctions serrées (Wang, Chen, et Margolis 2007), et au complexe apical Crumb (Roh et al. 2003; Youjun Li et al. 2014). Ce n'est que plus récemment que la présence des MPPs a été mise en évidence dans le tissu nerveux. Ces protéines MAGUKs, quand elles s'associent à la voie de signalisation mTOR ou encore au facteur de transcription E2F, provoquent la sortie prématurée des neurones du cycle cellulaire et leur apoptose (Kim et al. 2010; Park et al. 2016). Ainsi cette sous famille de MAGUKs intervient à un stade précoce lors du développement des structures cérébrales et est essentielle pour la formation des futurs neurones. Il a également été montré que les MPPs favorisent la myélinisation des axones par les cellules de Schwann (Zollinger et al. 2015).

Les protéines MAGUKs ZO comprennent trois isoformes et sont localisées aux sites de jonction intercellulaire. Elles sont composées de trois domaines PDZ, un domaine SH3 et un domaine GUK (Figure 14). À l'aide de leurs domaines PDZ, les protéines ZOs lient directement divers types de protéines au niveau de la jonction cellulaire et peuvent permettre de connecter (directement ou indirectement) des protéines jonctionnelles transmembranaires au cytosquelette d'Actine. Parmi les jonctions cellulaires associées aux protéines ZOs, on retrouve les jonctions gap avec les Connexines dont un grand nombre d'isoformes peuvent interagir avec les protéines ZOs *via* leurs domaines PDZ (Hervé et al. 2014). Il a aussi été montré que ces MAGUKs se liaient à des canaux ioniques comme les TRP (Transient Receptor Potential) perméables aux cations dans les astrocytes (Song et al. 2005) ou les canaux calciques $Ca_v1.2$ dans une lignée de cellules endothéliales immortalisées à partir de la veine du cordon ombilical humain (ECV) (Korb et al. 2013). Des travaux ont également rapporté que les

protéines ZO pouvaient être présentes au noyau des cellules épithéliales (Gardoni 2008) afin de réguler l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire ou la prolifération cellulaire et s'associer à des facteurs de transcription (Bauer et al. 2010). De plus, cette localisation nucléaire serait dépendante de l'état de confluence des cellules et donc de la maturation des contacts cellulaires. Ainsi, moins les cellules sont confluentes et moins elles forment de contacts, ce qui amène les protéines ZO à être concentrées dans le noyau des cellules. Au fur et à mesure que les cellules prolifèrent et établissent de nouveaux contacts, les protéines ZO sont relocalisées aux jonctions (Islas et al. 2002).

La sous famille MAGI, moins bien décrite que les autres MAGUKs, comprend trois isoformes qui peuvent avoir comme partenaires aussi bien des récepteurs, des protéines d'adhésion cellulaire ou des composants de voies de signalisation. Ses isoformes sont trouvées dans des tissus non neuronaux comme les intestins ou les reins mais participent également à l'organisation des synapses. Au niveau cérébral, la protéine MAGI-1 est associée aux récepteurs du glutamate AMPA et aux transporteurs du glutamate de type 1 (GLT-1) (Zou, Pita-Almenar, et Eskin 2011; Danielson et al. 2012). Les interactions établies avec MAGI-1 impactent directement la localisation et la fonction de ces partenaires, ce qui a pour conséquence de moduler les voies de signalisation dont ils font partie. Chez l'Homme, des troubles du comportements et des cas de schizophrénie seraient associés à des mutations dans le gène codant pour la protéine MAGI-1 entraînant des défauts de transmission synaptique (Karlsson et al. 2012). Dans les cellules rénales, MAGI-1 va adresser les canaux potassiques Kir4.1 à la membrane basolatérale, contrôlant alors leur trafic dans la cellule (Tanemoto et al. 2008). Dans des cellules cancéreuses provenant du colon, les protéines MAGI-1 et MAGI-2 présentent un rôle de suppresseur de tumeur en limitant la prolifération cellulaire *via* les voies Wnt et PTEN (Phosphatase and TENSin homolog) respectivement (Zaric et al. 2012; Nagashima et al. 2015). Enfin, MAGI-1 est également présente au niveau des jonctions serrées des cellules épithéliales (Laura et al. 2002).

La protéine CARMA, avec son domaine CARD, se décline en trois isoformes présentes dans différents tissus comme la rate, le thymus, le placenta, les reins et le cœur. CARMA est également exprimée dans les leucocytes où elle est fortement associée aux voies de signalisation responsables de la formation de métastases, d'inflammation ou d'apoptose en jouant le rôle de co-activateur de ces voies (Wang et al. 2014, 2014; Li et al. 2017). Une hausse de l'expression de CARMA a été observée dans plusieurs types de cancer comme le cancer de la prostate, du côlon ou des ovaires et avec des taux encore plus importants dans le cancer du sein métastatique. Cependant, outre des phénomènes de méthylation, les mécanismes d'action de CARMA restent encore peu connus (Bedford et Clarke 2009).

Les protéines MAGUKs, toutes sous familles confondues, peuvent endosser plusieurs rôles, allant du trafic de leurs partenaires jusqu'à leur ancrage à la membrane, au maintien de l'architecture de la cellule et à la régulation de certaines voies de signalisation. Cette polyvalence les rend particulièrement indispensables pour assurer la mise en place de la morphologie de la cellule et son fonctionnement dans un tissu donné.

2. Le rôle des MAGUKs dans le cœur

Malgré leur expression ubiquitaire, une grande partie des travaux se sont concentrés sur le rôle des MAGUKs dans les cellules épithéliales et neuronales. Ainsi, seulement deux d'entre elles ont été identifiées et caractérisées dans le cœur. Il s'agit des protéines SAP-97 (appartenant à la sous famille DLG) et la protéine ZO-1 (première isoforme de la sous famille Zonula Occludens) qui sont toutes deux exprimées au niveau des disques intercalaires.

La protéine SAP-97

C'est à partir des années 2000 que la protéine SAP-97 a été décrite dans le cœur où elle est abondamment exprimée. Cette MAGUK est alors trouvée au niveau du disque intercalaire des myocytes atriaux et ventriculaires (Godreau et al. 2002). Toutefois, la présence de SAP-97 à la membrane latérale et aux tubules-T des cardiomyocytes a aussi été rapportée (Murata et al. 2001; D Leonoudakis et al. 2001). Dans le cœur, cette MAGUK semble s'associer préférentiellement aux canaux ioniques. En effet, SAP-97 est un partenaire des canaux Kir2.2 (Leonoudakis et al. 2001), Kir2.1 (Vaidyanathan et al. 2010), $K_v4.2$ et $K_v4.3$ (association médiée par un motif de liaison au domaine PDZ : SAL pour Ser-Ala-Leu) (El-Haou et al. 2009), ainsi que des canaux à cations HCN (C. J. Peters et al. 2009) et du canal sodique $Na_v1.5$ (via le motif de liaison au domaine PDZ SIV pour : Ser-Ile-Val) (Petitprez et al. 2011). Cette interaction avec les canaux ioniques engendre des modifications de la densité des courants enregistrés lors d'expériences de patch-clamp quand la protéine SAP-97 est surexprimée par un vecteur viral. En effet, lorsque SAP-97 est surexprimée, il a été constaté une augmentation du courant potassique repolarisant I_{Kur} (porté par les canaux $K_v1.5$) (Godreau et al. 2002; Eldstrom et al. 2003; Abi-Char et al. 2008), une augmentation du courant potassique transitoire sortant I_{to} (porté par les canaux $K_v4.2$ et $K_v4.3$) (El-Haou et al. 2009) et une augmentation du courant rectifiant entrant I_{K1} (porté par les canaux Kir 2.1) (Vaidyanathan et al. 2010). Cependant, dans le cœur, les mécanismes de régulation des canaux ioniques par les protéines MAGUKs sont encore trop peu étudiés

en comparaison des travaux menés dans les neurones. Néanmoins, plusieurs observations ont permis de comprendre comment l'interaction entre la protéine SAP-97 et ces canaux ioniques pouvait avoir une répercussion sur la densité de courant qu'ils initient. Ainsi, lorsque les canaux $K_v1.5$ sont associés à la protéine SAP-97, ils se retrouvent agrégés et immobilisés à la membrane plasmique sous forme de *clusters* ce qui entraîne une régulation positive du courant potassique I_{Kur} (Abi-Char et al. 2008). La surexpression de SAP-97 induit également la clusterisation des canaux potassiques $K_v4.3$ et une augmentation de la densité de courant I_{to} dans les cardiomyocytes. De plus, l'inactivation du courant I_{to} , médiée par la phosphorylation du canal par la CAMKII, est dépendante de la présence de la SAP-97. En effet, la SAP-97 permet l'interaction entre le canal et la kinase (El-Haou et al. 2009). La liaison de SAP-97 avec le canal $Na_v1.5$ permet de réguler positivement le courant sodique I_{Na} et les deux protéines co-localisent uniquement au niveau du disque intercalaire, ce qui pourrait suggérer que la protéine SAP-97 assure un adressage ciblé des canaux ioniques dans des compartiments membranaires. La SAP-97 est également été impliquée dans la formation et la régulation d'un complexe macromoléculaire associant deux populations de canaux dans les cardiomyocytes : les canaux $Na_v1.5$ et $Kir2.1$. Au sein de ce complexe, l'expression fonctionnelle d'un canal régule l'expression fonctionnelle de l'autre : si la densité du courant I_{Na} (médié par les canaux $Na_v1.5$) est augmentée, celle du courant I_{K1} (médié par les canaux $Kir2.1$) est augmentée, et inversement (notion de réciprocité dynamique) (Milstein et al. 2012).

Ainsi, la protéine SAP-97, dans les cellules cardiaques, s'associe aux canaux ioniques et favorise leur expression fonctionnelle dans des compartiments de la membrane plasmique notamment en les organisant en complexes macromoléculaires et en les stabilisant à la membrane.

La protéine ZO-1

C'est grâce à des expériences d'immunofluorescence et de biochimie qu'en 1998 la présence de ZO-1 a été caractérisée, au disque intercalaire du cardiomyocyte, en association avec la Connexine-43 et la Spectrine *via* son domaine PDZ (Toshihiko Toyofuku et al. 1998). Dans cette étude, il avait été montré que ZO-1 fonctionnait comme un transporteur pour la Connexine-43 afin de lui permettre de rejoindre l'interface cellule-cellule du myocyte cardiaque. L'association entre ZO-1 et la Connexine-43 a aussi été détectée dans la région qui borde la plaque jonctionnelle, appelée périnexus. Cette région fonctionnerait comme une zone de transit pour les Connexines-43 qui ne sont pas encore ancrées aux jonctions gap. ZO-1 interviendrait donc pour réguler le trafic des Connexines-43 vers la jonction gap en les faisant « patienter » dans le périnexus (Rhett, Jourdan, et Gourdie 2011). L'interaction entre la Connexine-43 et ZO-1 serait également sous la dépendance de la kinase Src (tyrosine kinase c). Dès

lors que cette kinase phosphoryle la Connexine-43, celle-ci perd sa capacité à lier la protéine ZO-1 et se fixe préférentiellement au domaine SH2 de Src (Toyofuku et al. 2001). Lorsque le myocarde subit un remodelage et que les cellules perdent leurs interactions (comme c'est le cas lors dans un modèle de dissociation enzymatique du tissu cardiaque), la formation du complexe ZO-1/Connexine-43 est renforcée au disque intercalaire. Ceci suggère donc un autre rôle pour la protéine ZO-1 qui serait de rétablir les connexions intercellulaires lors de processus pathologiques (Barker, Price, et Gourdie 2002). En effet, ce phénomène a été constaté dans des échantillons de ventricule gauche provenant de patients atteints d'insuffisance cardiaque (Bruce et al. 2008) dans lesquels l'association ZO-1/Connexine-43 était plus importante. Le phénomène inverse a été observé dans un modèle de souris déficientes en protéine AKT, protéine kinase impliquée dans l'activation du remodelage hypertrophique cardiaque. Suite à l'induction d'une insuffisance cardiaque chez ces souris, l'interaction entre ZO-1 et la Connexine-43 est fortement diminuée (Ock et al. 2018). Par ailleurs, la perte de la protéine ZO-1 induit une relocalisation de la Connexine-43 qui se retrouve alors dans le cytoplasme et à la membrane latérale (Palatinus et al. 2011). Ainsi, l'organisation des jonctions gap est dépendante de la présence de ZO-1 qui contrôle le niveau d'agrégation des Connexines-43 (Hunter et al. 2005). De manière intéressante, il a été montré que ZO-1 est aussi un partenaire de la N-Cadhérine trouvée dans les jonctions adhérentes (Barker, Price, et Gourdie 2002). La perte de la N-Cadhérine entraîne le démantèlement de la jonction gap et des Connexines-43 qui lui sont associées (Li et al. 2008). Ainsi, les jonctions adhérentes, et notamment l'association entre ZO-1 et la N-Cadhérine pourraient réguler la formation des jonctions gap au niveau des disques intercalaires.

La protéine ZO-1 participerait donc dans le cardiomyocyte à la formation et à la localisation des jonctions gap et serait aussi impliquée dans des processus d'internalisation des Connexines-43 en réponse à un remodelage du tissu cardiaque.

D. La protéine CASK

1. Description générale

La protéine CASK (CALcium/Calmodulin-dependant Serine protein Kinase) a été simultanément découverte en 1996 dans trois modèles d'étude (vertébré et invertébrés) que sont : le rat (Hata, Butz, et Südhof 1996), le nématode (*Caenorhabditis elegans*) et l'arthropode (*Drosophila Melanogaster*). Pour ces deux derniers modèles, la protéine CASK est plus connue, respectivement, sous les noms de LIN-2 et CamGUK (ou Caki) (Hoskins et al. 1996; Martin et Ollo 1996). Ces premiers travaux ont dès lors mis en évidence la capacité de CASK, commune aux MAGUKs, d'assurer diverses fonctions selon l'organisme et le type cellulaire où elle est exprimée.

Historiquement, chez *C.elegans*, la présence de CASK est requise pour ancrer le récepteur tyrosine kinase LET-23 EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) à la membrane baso-latérale des cellules épithéliales (aussi appelées cellules précurseurs) destinées à former le futur organe de ponte. La position baso-latérale du récepteur tyrosine kinase LET-23 est indispensable car elle lui permet de faire face à la cellule ancre de la gonade. Cette dernière initie le processus de différenciation de la cellule précurseur en cellule d'organe de ponte, *via* un premier signal d'activation. Ce signal entraîne la liaison du ligand LIN-3 au récepteur LET-23. Une fois le récepteur LET-23 activé, une nouvelle voie de signalisation est activée. La libération de nouveaux signaux provoque la levée de l'inactivation de la voie de signalisation (LET-23/LET-60 Ras) de la cellule précurseur voisine et ainsi de suite. La formation de cet organe est donc basée uniquement sur un réseau en cascade de voies de signalisation intercellulaires, elle est d'ailleurs considérée comme un système modèle de développement (Hoskins et al. 1996). Chez *D.melanogaster*, il a été montré par hybridation *in situ* aux différents stades du développement (embryogénèse, stades larvaire et nymphal), que l'expression de CASK était restreinte au système nerveux central. Cette localisation très spécifique n'est pas sans conséquences. En effet, lorsque CASK est absente, le développement n'est pas affecté mais la locomotion des mouches adultes est impactée. Plus enclines à faire des pauses et à se déplacer sur de courtes distances, ces dernières montrent les mêmes caractéristiques motrices que des mouches ayant une déficience visuelle génétique. Cependant, malgré le fait que CASK soit également retrouvée dans les lobes optiques, sa perte n'engendre pas de déficits visuels majeurs et n'influence donc pas par ce biais la locomotion. Seul un défaut d'apprentissage induit par la perte de CASK semble en être la cause (Martin et Ollo 1996).

Initialement, chez les vertébrés, CASK a été identifiée grâce à une approche de double hybride utilisant des neurones de rat, comme étant un nouveau partenaire de la Neurexine (protéine présynaptique participant à la synaptogénèse). Dans ce contexte, CASK se fixe directement à la partie C-terminale de la Neurexine (Hata, Butz, et Südhof 1996). Le complexe CASK/Neurexine formé est alors capable d'interagir avec les protéines Liprine- α (liaison dépendante de la phosphorylation de CASK par la protéine Cdk5 (Cyclin-Dependent Kinase 5)) (Samuels et al. 2007) et Mint1 (Munc-18 INTERacting protein 1) (Butz, Okamoto, et Südhof 1998) entrant en compétition pour la liaison à CASK avec Caskin1 (CASK INTERacting protein 1) (Stafford et al. 2011). La création du complexe de quatre protéines (CASK/Neurexine/Liprine- α /Mint1) est nécessaire à la formation de la synapse. Dans une récente étude, les auteurs ont suggéré, après modulation de l'expression de CASK, que cette MAGUK était essentielle à la stabilité de la Neurexine et servait à consolider les futures interactions protéiques notamment avec la Liprine- α (LaConte et al. 2016).

Dans les paragraphes suivants, une liste non exhaustive des grands rôles de CASK dans le neurone et dans la cellule épithéliale, sera présentée ; le neurone étant une des premières cellules excitables de mammifère où a été mis en évidence le rôle primordial des protéines MAGUKs, dont CASK dans l'organisation des synapses, et la cellule épithéliale car elle est issue d'un évènement de différenciation au cours du développement embryonnaire donnant naissance à des cellules dont la polarité est fortement marquée. Notons, qu'étant donné la structure de la protéine CASK, et le nombre impressionnant de combinaisons potentielles qu'elle peut établir avec des partenaires protéiques variés, la partie suivante de cette introduction exposera en détail les rôles connus de chaque domaine et les partenaires qui leurs sont associés, tous types cellulaires confondus.

CASK dans les neurones

L'expression de la protéine CASK dans le cerveau a tout d'abord été étudiée grâce à des expériences de biochimie. Les résultats ont ainsi permis de constater que CASK était présente dans plusieurs régions du cerveau comme le cortex cérébral, l'hippocampe, le cervelet et le tronc cérébral. Ces résultats suggèrent donc que l'action de CASK ne se limite pas à une structure cérébrale en particulier, ce qui lui confère un champ d'action très large, propriété commune aux MAGUKs (Hsueh et al. 1998a, 2000; Wang et al. 2004). Par immunofluorescence, sur des coupes de tissu cérébral, la localisation de CASK a pu être affinée. Cette protéine est présente au niveau des neurones et plus précisément au niveau des synapses (Hsueh et al. 1998b). La synapse est la jonction existante entre deux cellules neuronales. Cette jonction intercellulaire est hautement régulée et organisée notamment *via* des protéines d'échafaudage cytoplasmiques qui permettent de stabiliser à la

membrane des canaux ioniques, des récepteurs et leurs ligands ou encore des protéines d'adhésion cellulaire. Au sein de la synapse, CASK est à la fois présente dans l'élément présynaptique et l'élément postsynaptique (Hsueh 2009; Zheng et al. 2011). Cette localisation de CASK lui confère trois rôles principaux associés à la formation des synapses et à la régulation de leurs activités : 1) la mise à disposition dans les domaines membranaires des protéines d'adhésion pour structurer la synapse, 2) réguler le trafic des composants de la synapse par le biais des voies d'exocytose et 3) agir comme co-activateur de facteurs de transcription (Figure 21, page 57).

Ainsi, l'association de CASK à des protéines clés comme la Neurexine présynaptique (Hata, Butz, et Südhof 1996) ou les Syndecans et SynCAM, protéines d'adhésion présentes sur l'élément postsynaptique (Hsueh et al. 1998a; Thomas Biederer et al. 2002), assure une stabilité à la synapse et la capacité à chaque neurone, de part et d'autre, de recevoir et traiter les informations correctement et en synergie. En formant des complexes avec des acteurs de l'exocytose synaptique, CASK peut alors prendre part au trafic des composants de la synapse, tels que les récepteurs NMDA (N-Methyl-D-Aspartate), du noyau jusqu'à la membrane (Wong-Riley et Besharse 2012). Enfin, CASK peut transloquer au noyau du neurone et former un complexe avec un facteur de transcription de type « T-box », Tbr-1 (T-box BRain 1, homologue de la protéine Brachyuri) (ou « E-box ») et agir comme co-activateur pour induire la transcription de gènes contenant un élément T (ou E). C'est le cas du gène codant pour la protéine Reelin (impliquée dans l'organisation des neurones les uns par rapport aux autres et dans le développement des dendrites) ou encore *NR1* et *NR2b* (codant pour les sous-unités de récepteurs glutamatergiques NMDA) (Hsueh et al. 2000). Cette dernière fonction de CASK est tout à fait singulière car jusqu'alors, aucune MAGUK n'avait encore été décrite comme pouvant jouer un rôle dans la transcription.

Bien que la plus grande partie des études menées sur CASK se concentre autour de son rôle clé dans l'agencement des synapses des neurones, cette protéine n'est pas uniquement restreinte au cerveau. En effet, CASK est exprimée de façon ubiquitaire et ses multiples fonctions ne sont pas encore toutes connues. Plusieurs études, notamment dans les cellules épithéliales, ont déjà identifié CASK comme un acteur de la distribution asymétrique des complexes protéiques selon l'axe apico-basal.

CASK dans les cellules épithéliales

La mise en place de la polarité des cellules épithéliales, définie comme une absence de symétrie morphologique et fonctionnelle de la cellule, repose sur un équilibre dynamique entre des complexes protéiques exclusivement apicaux ou baso-latéraux. De cet équilibre résulte donc deux pôles

membranaires, structurellement et fonctionnellement distincts, à savoir les pôles apical et baso-latéral des cellules épithéliales. L'intervention de protéines d'échafaudage, telles que la MAGUKs, a été mise en évidence dans le maintien de cet équilibre.

Ainsi, dans un modèle de cellules rénales de chien MDCK (Madin-Darby Canine Kidney), CASK participe à la localisation baso-latérale des canaux potassiques Kir2.3 (Alewine et al. 2007), Kir2.2 (Leonoudakis, Conti, Radeke, et al. 2004) et de la protéine MAGUK PALS1 (essentielle pour la formation des jonctions serrées) (Straight et al. 2006). La MAGUK DLG1 ou SAP-97 (impliquée dans la polarité de l'épithélium intestinal dès le stade embryonnaire mais aussi dans la balance des voies pro et anti-oncogéniques (Lee et al. 2002)), requière également la présence de CASK, afin d'assurer son rôle dans l'organisation baso-latérale des cellules épithéliales intestinales de souris (Lozovatsky et al. 2009). Dans une lignée cellulaire tumorale humaine d'origine intestinale (Caco-2), CASK se lie à des protéines d'adhésion cellulaire : les JAM (Junctional Adhesion Molecule) essentielles pour la mise en place des interactions cellulaires lors du processus de morphogenèse de l'épithélium (Martínez-Estrada et al. 2001). Dans les cellules pancréatiques de type β , CASK stabilise les vésicules de sécrétion contenant l'insuline à la membrane des cellules afin de faciliter leur exocytose (Zhu et al. 2014). Une dysfonction du relargage de l'insuline et une glucotoxicité peuvent alors être associées à une diminution de CASK dans les cellules β pancréatiques (Wang et al. 2018). Une diminution de CASK dans des kératinocytes humains en culture accentue leur prolifération et leur adhésion à la matrice de collagène (Ojeh et al. 2008). Dans ces cellules de l'épiderme, le taux d'expression de CASK est déterminé en fonction de celui de la protéine d'adhésion cellulaire Necl2 (NEctin-Like molecule 2, aussi appelée CADM1, Cell Adhesion Molecule 1) (Giangreco et al. 2009; Márquez-Rosado et al. 2012). Lors des processus de cicatrisation, CASK crée une liaison dynamique, en C-terminal, avec la Connexine-43 afin de la diriger vers les domaines de la membrane qui formeront les futures connexions entre les cellules et assurer la bonne cohésion intercellulaire dans le tissu épidermique (Márquez-Rosado et al. 2012).

Des expériences d'immunofluorescence ont par ailleurs mis en évidence que la protéine CASK, parmi ces différents types de cellules épithéliales (rénales, intestinales, pancréatiques...), était toujours présente au niveau baso-latéral des cellules et ne montrait jamais de localisation apicale (Cohen et al. 1998). Bien que ce point commun quant à la localisation de CASK ait été observé, celui-ci demeure mystérieux et aucune étude n'a pour le moment identifié le ou les mécanisme(s) poussant CASK à ne se diriger, spécifiquement, qu'en direction de la membrane baso-latérale. Néanmoins, il semblerait que le trafic de CASK, au sein des cellules épithéliales, fasse appel à ses nombreuses protéines partenaires, qui elles, présentent une identité baso-latérale (Kamberov et al. 2000). Ainsi, la présence de CASK à la membrane baso-latérale serait induite *via* un véritable réseau d'interactions interprotéiques restreintes au pôle basal qui amène donc progressivement CASK à adopter cette localisation spécifique. De plus, la modulation de l'expression génique de CASK, par extinction, n'induit

pas de perte de polarité de la cellule épithéliale (Lozovatsky et al. 2009). Seule la localisation des partenaires identifiés de CASK est touchée. Une explication plausible est que CASK participerait uniquement à l'ancrage de protéines membranaires (Straight et al. 2000; Caruana 2002), ainsi qu'à l'activation de voies de signalisation intracellulaires en permettant le recrutement de facteurs de transcription et de leurs ligands à la membrane baso-latérale. Par opposition, la protéine MAGUK SAP-97/DLG1 adopte une localisation cytoplasmique ou latérale lorsqu'elle est mutée, entraînant une perte de polarité des cellules ou l'activation anormale des facteurs de prolifération cellulaire. En outre, la diminution de l'expression de la protéine SAP-97/DLG1 a été corrélée, par exemple, à la perte de polarité et l'altération de la néphrogénèse (Naim et al. 2005) et plus récemment, à l'état d'avancement du carcinome endométrial (Sugihara et al. 2016).

Dans les cellules épithéliales, la protéine CASK, par l'intermédiaire de ses domaines d'interaction protéiques, associe et organise les différents composants des complexes protéiques retrouvés spécifiquement au pôle baso-latéral conférant ainsi une nouvelle identité à la cellule, celle de cellule polarisée.

Que ce soit dans les neurones ou les cellules épithéliales, la protéine CASK, comme bien d'autres MAGUKs, est capable d'être multifonctionnelle et d'assurer des rôles très diverses incluant l'activation de facteurs de transcription et de voies de signalisation, le trafic et l'exocytose de molécules, l'ancrage de canaux ou encore l'échafaudage de complexes multi-protéiques.

2. Les domaines fonctionnels de CASK : structures et fonctions

La protéine CASK est composée de sept domaines distincts permettant de nombreuses associations protéine-protéine. CASK possède une structure très singulière et un domaine en particulier permet de la différencier des autres MAGUKs, le domaine situé à l'extrémité N-terminale dont la séquence est homologue à la CAMKII (CALcium/CAIModulin-dependent protein Kinase II). Une paire de domaines L27 (région Lin-2-lin-7) est présente juste en aval. En position presque centrale, on retrouve un domaine PDZ. En approchant de la partie C-terminale, CASK présente un domaine SH3, un tout petit domaine d'accrochage au cytosquelette nommé HOOK et enfin un domaine homologue à la GUanylate Kinase appelé GUK (Figure 15).



Figure 15 : Agencement des domaines fonctionnels de la protéine CASK.
La protéine CASK est composée de sept domaines. Elle se distingue des autres MAGUKs par la présence du domaine CAMKII en N-terminal.

Au cours de l'évolution, une différence considérable de la taille du gène *CASK* s'est installée entre invertébrés et vertébrés principalement due à une augmentation de la taille des introns (LaConte et Mukherjee 2013). Chez l'Homme comme chez la souris (dont le gène *CASK* chez les mammifères est 10 fois plus long que celui de *C.elegans* ou *D.melanogaster*) il a d'ailleurs été proposé que la longueur des introns puisse coïncider avec une notion de timing à mettre en relation avec l'expression des gènes au cours du développement, dans un type cellulaire et selon le contexte dans lequel le gène est activé. Par exemple, s'il s'agit de gènes participant à la mise en place d'un tissu, la longueur des introns serait déterminante pour établir un ordre d'arrivée des différents produits finaux dans les voies de signalisation (Heyn et al. 2015; Oswald et Oates 2011).

Néanmoins, la combinaison des domaines de CASK est restée inchangée chez les différentes espèces. Ainsi l'association d'un domaine CAMKII à des domaines de liaisons protéiques (impliquant des protéines de jonctions intercellulaires ou encore du cytosquelette) permet de démultiplier les possibilités d'interaction plaçant ainsi CASK, quel que soit l'organisme, au cœur de plusieurs voies de signalisation essentielles.

a. Le domaine CAMKII

Le premier et plus gros domaine de la protéine CASK, situé en N-terminal, présente une séquence très similaire à celle de la famille des protéines kinases Ca^{2+} /calmodulin (CaM)-dépendentes (Martin et Ollo 1996). Néanmoins, ce domaine a longtemps été considéré comme inactif jusqu'à ce qu'une étude révèle sa capacité à phosphoryler en dépit de sa structure. En effet, le domaine CAMKII ne présente pas le motif classique de liaison au Mg^{2+} (co-activateur requis pour le phosphotransfert chez les protéines kinases CaM-dépendantes). Cependant, le site catalytique reste fonctionnel et se passe de la présence de Mg^{2+} pour phosphoryler un partenaire connu de CASK dans le neurone : la Neurexine (Mukherjee et al. 2008). Il a été avancé que l'activité de phosphorylation de CASK était inhibée en présence d'ions divalents lorsque le neurone est actif et que les pompes sont fonctionnelles. Au contraire, en absence d'ions divalents, CASK retrouverait son rôle d'enzyme (lorsque le neurone est en

phase de repos) (Mukherjee et al. 2010). Toutefois, le rôle réel de cette phosphorylation dans la transmission synaptique n'a pour le moment pas encore été décrit.

Comme évoqué précédemment, plusieurs travaux ont décortiqué l'environnement qui entoure la protéine Neurexine dont ses partenaires potentiels et leur agencement les uns par rapport aux autres dans le neurone présynaptique. C'est ainsi qu'un complexe réunissant Mint1 (protéine impliquée dans l'exocytose synaptique), CASK et Veli (V_{ER}tebrate LIN-7) a été identifié. Mint1 se fixe à CASK *via* le domaine CAMKII (Figure 16) et Veli grâce au domaine L27B (Butz, Okamoto, et Südhof 1998; Borg et al. 1999). Ces deux protéines ne s'associent donc pas par leurs domaines PDZ respectifs (qui interviennent plus classiquement dans des liaisons protéine-protéine) ce qui libère le domaine PDZ de CASK pour d'autres interactions, notamment avec la Neurexine (Hata, Butz, et Südhof 1996). Dans les cellules précurseurs chez *C.elegans*, les équivalents de Mint1 (Lin-10) et Veli (Lin-7) forment également un complexe avec CASK (Lin-2). Ainsi, ce n'est pas seulement CASK mais bien le complexe formé par ces trois protéines qui est indispensable pour positionner le récepteur LET-23 en position baso-latérale et initier la différenciation de la cellule précurseur (Kaech, Whitfield, et Kim 1998). Dans le neurone présynaptique, le complexe Mint1/CASK/Veli serait alors nécessaire pour stabiliser la Neurexine contribuant ainsi à l'organisation de la synapse et à la bonne transmission synaptique. De plus, Mint1 conserve la possibilité de lier Munc18-1, un composant essentiel de l'exocytose synaptique (Han et al. 2010) (Figure 21, page 57). Le complexe aurait donc la capacité à la fois d'intervenir dans l'exocytose de vésicules synaptiques et dans l'ancrage de protéines à la membrane. Toutefois, ce complexe peut s'agrandir encore en accueillant la protéine Liprine- α qui participe également à l'exocytose des neurotransmetteurs et à l'organisation de la synapse (Olsen et al. 2005). La Liprine- α se fixe aussi majoritairement au domaine CAMKII de CASK et présente un second site de fixation pour le domaine L27A de CASK (LaConte et al. 2016) (Figure 16). Néanmoins, il a été montré que la protéine Cdk5 pouvait venir phosphoryler et bloquer le site de liaison de la Liprine- α sur le domaine CAMKII. Ce mécanisme permettrait d'éviter que la protéine CASK ne soit saturée et ne puisse plus être disponible pour d'autres interactions (Samuels et al. 2007). Toujours associé au complexe Mint1/CASK/Veli, un autre membre a été identifié, il s'agit de la protéine Caskin. Cette dernière est capable elle aussi de fixer le domaine CAMKII de CASK mais surtout, son site de liaison est le même que celui de Mint1 (Figure 16). Les deux protéines entrent alors en compétition pour la liaison au domaine CAMKII (Tabuchi et al. 2002; Stafford et al. 2011). Récemment, la cristallographie a apporté un nouveau regard sur ces interactions où il semblerait que les protéines s'adaptent pour la liaison au domaine CAMKII. Par exemple, CASK pourrait ne lier que la Liprine- α , bloquant l'accès à Mint1 ou bien, la Liprine- α se lie à CASK et CASK à la Neurexine ce qui permet à Mint1 de s'accommoder en se fixant sur de nouveaux sites de liaison s'étalant sur la surface offerte par le complexe CASK/Neurexine (LaConte et al. 2016).

Dans l'élément postsynaptique le complexe Mint1/CASK/Veli permet la prise en charge des vésicules contenant les sous-unités des récepteurs NMDA en formant un pont entre les vésicules et une Kinésine, KIF-17, le long des microtubules (Wong-Riley et Besharse 2012) (Figure 21, page 57).

Dans les cellules épithéliales, une autre protéine pouvant lier le domaine CAMKII a été identifiée. Du nom de Carom (de la famille des protéines F-BAR) celle-ci serait présente aux jonctions cellulaires et son domaine de liaison à CASK serait le même que celui de la MAGUK MAGI. CASK entrerait donc en compétition avec MAGI pour lier Carom (Ohno et al. 2003; Liu et al. 2016). Bien que le rôle de cette protéine ne soit pas précisément connu, elle pourrait néanmoins être impliquée dans des phénomènes d'exocytose (Xu et al. 2017) (Figure 16).

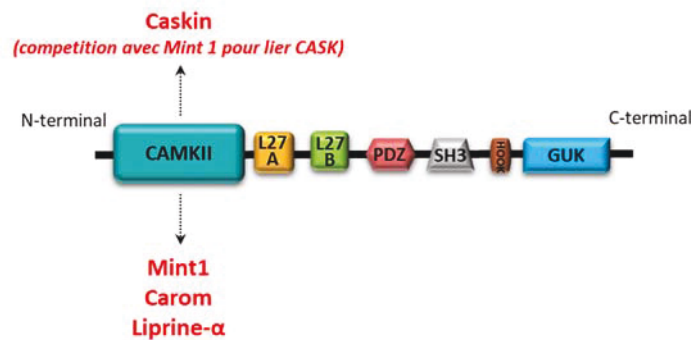


Figure 16 : Les protéines partenaires du domaine CAMKII de CASK.
Schéma récapitulatif des différents partenaires identifiés et interagissant directement avec le domaine CAMKII de la protéine CASK.

b. Les domaines L27A et L27B

Nous venons de voir que la protéine CASK formait, dans l'élément présynaptique, un complexe comprenant Mint1/CASK/Veli (Butz, Okamoto, et Südhof 1998). La protéine Veli ne présente que deux domaines d'interaction dont un domaine PDZ qui ne correspond pas au domaine de liaison à CASK. Par alignement de séquence entre CASK (homologue Lin-2) et Veli (homologue Lin-7), il a été montré que les deux protéines présentent deux domaines communs. Ces domaines ont donc été nommés L27 (pour Lin-2 et Lin-7) (Doerks et al. 2000). Pour ce doublet de domaines L27 situé entre les domaines CAMKII et PDZ chez CASK, il existe très peu de partenaires identifiés.

Néanmoins, le premier domaine L27 de CASK, appelé L27A (ou L27N (terminal)) a été décrit comme le domaine d'interaction entre la protéine MAGUK SAP-97 et la protéine CASK, à la fois dans les neurones et dans les cellules épithéliales (Figure 17). Ce serait d'ailleurs de cette interaction entre les deux MAGUK que dépendrait la localisation baso-latérale de SAP-97 dans les cellules épithéliales. En effet, lorsque la protéine CASK est mutée dans le domaine L27A, la protéine SAP-97 adopte une position cytoplasmique (Lee et al. 2002). Dans les neurones, il a été observé que la protéine SAP-97

était impliquée dans le transport des récepteurs AMPA (α -Amino-3-hydroxy-5-Methylisoxazole-4-Propionate) ou NMDA dès la sortie du Golgi afin de les conduire jusqu'à la membrane synaptique. La liaison aux récepteurs AMPA *versus* récepteurs NMDA est en fait déterminée par la liaison de SAP-97 à CASK. Dès lors que SAP-97 s'associe à une protéine CASK, sa conformation change (passant d'une conformation compacte en forme de « C » à une conformation où la protéine se « déplie ») ce qui influence SAP-97 à prendre en charge les récepteurs NMDA. Lorsque la liaison entre SAP-97 et CASK ne se fait pas, ce sont préférentiellement les récepteurs AMPA qui sont escortés par SAP-97 (Nakagawa et al. 2004; Dong Li et al. 2011; Lin, Jeyifous, et Green 2013) (Figure 21, page 57). De plus, il a été constaté que le transport des récepteurs NMDA pris en charge par le complexe SAP-97/CASK empruntait une voie de sécrétion non conventionnelle passant par des « *outposts dendritiques* » du Golgi plutôt que par le Golgi somatique (Jeyifous et al. 2009). SAP-97 et CASK pourraient également former un complexe avec une pompe calcique, la pompe PMCA4b (Plasma Membrane Calcium/Calmodulin-dependent ATPase 4b), dont l'activité pourrait influencer la capacité de CASK à transloquer au noyau et activer des facteurs de transcription (cette notion de translocation sera abordée dans la partie « f. Le domaine GUK ») (Schuh et al. 2003).

Le domaine L27B est quant à lui impliqué dans la liaison à la protéine Veli (Figure 17), l'intégrant alors dans le complexe Mint1/CASK présenté dans la partie précédente (« a. Le domaine CAMKII »). Malgré le fait que les domaines L27A et L27B de CASK soient identiques, L27A et Veli n'interagissent jamais ensemble, tout comme L27B et SAP-97. En outre, une étude de cristallographie suggère que les domaines tandems L27A et L27B adoptent des conformations qui leur sont propres et que chaque domaine peut avoir sa spécificité en termes de partenaires protéiques (Zhang et al. 2012). Cette différence de conformation est alors à l'origine de la formation de complexes macromoléculaires comprenant SAP-97/CASK/Veli/Mint1 et des canaux potassiques Kir2.2 par exemple (Leonoudakis, Conti, Radeke, et al. 2004). Si l'ordre de recrutement de ces différents partenaires n'est pas connu, CASK conserve son rôle central pour initier le trafic de ces canaux potassiques à la membrane baso-latérale de la cellule épithéliale. De la même façon, la localisation baso-latérale des canaux potassiques Kir2.3 dépendra de la liaison de Veli au domaine L27B de CASK (Alewine et al. 2007).

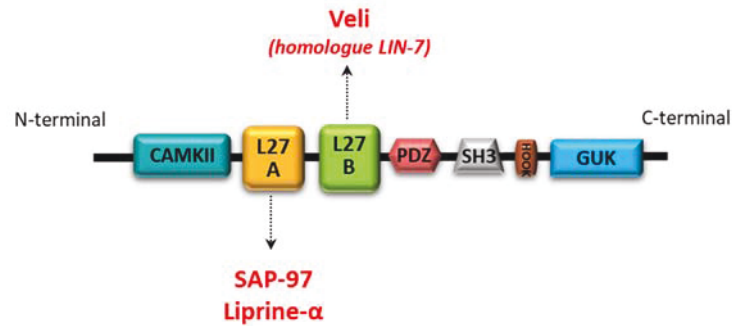


Figure 17 : Les protéines partenaires des domaines L27A et L27B de CASK. Représentation schématique des différents partenaires connus et interagissant directement avec les domaines L27A et L27B de la protéine CASK.

c. Le domaine PDZ

De manière générale, les domaines PDZ sont des domaines d'interaction protéique bien connus qui lient préférentiellement la partie C-terminale de leurs partenaires, bien que d'autres modes d'interaction puissent également exister. Ordinairement arrangés au minimum en tandem ou associés à d'autres domaines d'interaction, les domaines PDZ forment le noyau structural de plusieurs protéines d'échafaudage et notamment celui des MAGUKs (Kim et Sheng 2004). Retrouvés dans plus de 400 protéines, aussi bien chez l'Homme que chez la souris, les domaines PDZ sont impliqués dans la formation de vastes complexes moléculaires (Sheng et Sala 2001). L'exemple de la Neurexine illustre parfaitement ce phénomène. En effet, dans l'élément présynaptique, la Neurexine se lie au domaine PDZ de CASK et s'ajoute au complexe Mint1/CASK/Veli/Liprine- α et peut également être phosphorylée par le domaine CAMKII de CASK (Hata, Butz, et Südhof 1996; Mukherjee et al. 2008) (Figure 21, page 57). La Neurexine est une protéine transmembranaire dont la partie extracellulaire est située dans la fente synaptique. En miroir, dans l'élément postsynaptique, se trouve un de ses partenaires, aussi transmembranaire, la Neuroligine (Araç et al. 2007). La Neurexine est un élément essentiel de la synapse car elle participe à la libération des neurotransmetteurs en assurant un couplage fonctionnel des canaux calciques à la machinerie d'exocytose des vésicules présynaptiques (Missler et al. 2003). De manière intéressante, la Neuroligine est quant à elle associée au domaine PDZ d'une autre MAGUK, la PSD-95 qui est aussi un partenaire des récepteurs NMDA (Futai et al. 2007). Ainsi, au sein de la synapse, tous les composants semblent être interconnectés et stabilisés à la membrane *via* les MAGUKs. Si le domaine PDZ de CASK ne peut assurer de liaison avec la Neurexine, celle-ci n'est plus adressée ni ancrée à la membrane, ce qui altère considérablement les étapes de formation de la synapse (Gokce et Südhof 2013).

Outre la Neurexine, le domaine PDZ de CASK interagit avec les protéines Syndecans-2 qui appartiennent à la famille des HSPG (Heparan Sulfate ProteoGlycan) (Hsueh et al. 1998b) (Figure 18). Cette liaison a été caractérisée pour la première fois dans l'élément postsynaptique. Les Syndecans sont des protéines transmembranaires qui font le lien entre l'interface cellule/matrice extracellulaire en s'associant à la Laminine, la Fibronectine ou encore le Collagène. Les Syndecans-2 sont connus pour participer à la croissance des filopodes des dendrites. Cette étape est indispensable car sans elle, ni la spinogénèse (formation de l'épine dendritique) et ni la synaptogénèse n'auraient lieu. La liaison des Syndecans-2 à la Neurofibromine va activer la PKA qui va ensuite phosphoryler le complexe Ena/VASP (ENabled/VASodilatator Stimulated Phospho-protein) (Figure 21, page 57) et ainsi promouvoir la formation des filopodes et des épines dendritiques. Une fois matures, ses dernières pourront à leur tour créer de nouvelles synapses (Lin et al. 2007; Hu et al. 2016). Si CASK n'induit pas directement l'initiation de la spinogénèse, elle aurait en revanche un rôle de soutien en stabilisant l'architecture générale de l'épine dendritique en formation. Pour permettre à leurs partenaires protéiques de se fixer, les Syndecans-2 s'homodimérisent. La Neurofibromine peut alors se lier sur leur partie cytosolique la plus proche de la membrane, laissant ainsi libre d'accès la partie C-terminale pour une fixation au domaine PDZ de CASK (Volta et al. 2010). Une autre étude a montré que le peptide Y-P30, qui exerce une fonction neuroprotectrice en stimulant la croissance des axones et des dendrites lorsqu'il est associé à la Pléiotrophine et aux Syndecans-2, influence la localisation de CASK. Dès lors que ce peptide est exprimé, CASK adopte une localisation majoritairement cytoplasmique et donc moins nucléaire, favorisant ainsi la synaptogénèse par sa liaison avec les Syndecans-2 (Landgraf et al. 2014) (Figure 21, page 57).

Un autre exemple d'interaction *via* le domaine PDZ de CASK implique des protéines d'adhésion des jonctions cellulaires, les protéines JAM (Junctional Adhesion Molecule) (Figure 18). Celles-ci sont localisées en position baso-latérale dans les cellules épithéliales avec la protéine CASK. Cependant, il a été mis en évidence que cette association entre JAM et CASK se faisait tardivement, c'est-à-dire une fois que la protéine JAM ait été déjà recrutée à la membrane (Márquez-Rosado et al. 2012). Dans les flagelles des spermatozoïdes, la protéine CASK entre en interaction avec la pompe à calcium (Ca^{2+} -ATPase) PMCA4b ce qui a pour conséquence de freiner son activité. Lorsque CASK n'est pas liée à cette pompe, elle se fixe aux protéines JAM. Cette liaison se fait alternativement, soit avec PMCA4b soit avec JAM, régulant ainsi l'homéostasie calcique du gamète (Aravindan et al. 2012). Une autre protéine d'adhésion cellulaire s'associe également au domaine PDZ de CASK, la protéine SynCAM (SYNaptic Cell Adhesion Molecule) (Biederer et al. 2002) (Figure 18). Cette protéine est impliquée dans les processus de synaptogénèse et de myélinisation des axones (Frei et Stoeckli 2017). Dans l'élément postsynaptique, SynCAM interagit avec CASK mais aussi avec la protéine 4.1. Par le biais de ces interactions, SynCAM se trouve connectée au cytosquelette et participe également au recrutement et

au positionnement à la membrane des récepteurs NMDA formant alors un complexe comprenant quatre partenaires : 4.1/NMDA/CASK/SynCAM1 (Hoy et al. 2009).

Enfin, une autre protéine de type ubiquitine ligase, Parkine, a été identifiée comme partenaire directe de la protéine CASK toujours *via* le domaine PDZ (Figure 18). Bien que le rôle d'une telle interaction n'a pour le moment pas été identifié, il semblerait que CASK ne subisse aucune modification de type ubiquitinylation *via* Parkine. Ainsi, cette liaison serait de l'ordre du trafic, CASK prenant en charge Parkine pour la conduire vers sa cible (Fallon et al. 2002). Des défauts d'adressage de la Parkine par CASK et donc une altération de la voie dégradation par le protéasome pourraient être mis en lien avec des phénomènes de neurodégénérescence observés dans la maladie de Parkinson. CASK a d'ailleurs tout récemment été identifié comme un gène candidat de cette pathologie (George et al. 2018).

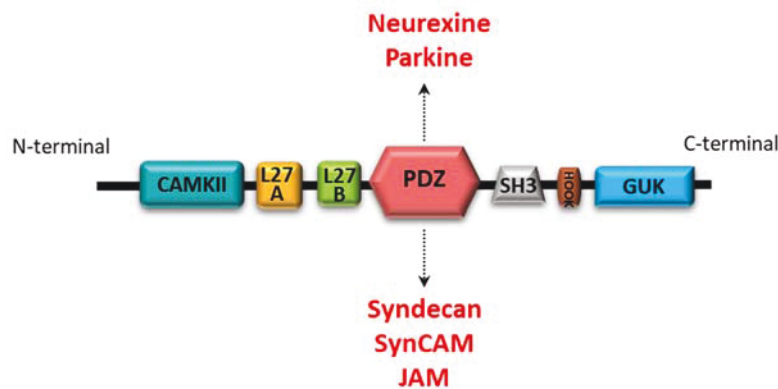


Figure 18 : Les protéines partenaires du domaine PDZ de CASK.
Représentation schématique des différents partenaires connus et interagissant directement avec le domaine PDZ de la protéine CASK.

d. Le domaine SH3

Le domaine SH3 de CASK possède une fonction, retrouvée chez presque toutes les MAGUKs, qui est de lier le domaine GUK. Ainsi, lorsque SH3 et GUK entrent en interaction, la partie C-terminale de la protéine se replie sur elle-même, formant alors une boucle (McGee et Bredt 1999; Nix et al. 2000; McGee et Bredt 1999). Cette interaction intra-domaine n'est pas sans conséquences, en particulier pour les partenaires de CASK qui n'ont ainsi plus accès à certains motifs de liaison. Cependant ce type de repliement et ses circonstances n'ont pour le moment pas d'explication. Comme SH3 peut reconnaître un domaine GUK, cela provoque la formation d'hétérodimères de MAGUK où CASK fixe une autre MAGUK, mais aussi d'homodimères, où CASK se lie à une autre CASK *via* leurs domaines SH3 et GUK respectifs (Nix et al. 2000) (Figure 19).

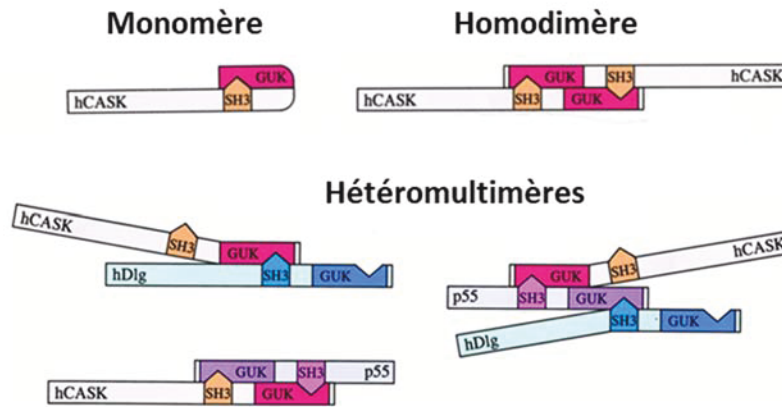


Figure 19 : Les interactions possibles entre les domaines SH3-GUK de la protéine CASK.

Les deux domaines SH3 et GUK peuvent interagir au sein même de la protéine, la partie C-terminale de CASK est alors repliée, on parle de monomère. Le domaine SH3 de CASK peut interagir avec le domaine GUK d'une autre CASK (et vice versa) formant alors un homodimère. Enfin, les domaines SH3 et GUK de CASK peuvent lier les domaines SH3 et GUK d'autres MAGUKs et échauffer des complexes (hétéromultimères) (adapté de Nix et al., 2000).

Les domaines SH3 ont été initialement caractérisés par leur capacité à reconnaître et fixer des motifs riches en proline. Dans l'élément présynaptique du neurone, ce type de motif est retrouvé sur la partie C-terminale de la sous-unité fonctionnelle (α_{1B}) du canal calcique. Un nouveau complexe, impliquant cette fois-ci CASK (via son domaine SH3) et un canal ionique est ainsi formé (Figure 21, page 57). Cependant, CASK n'est pas le seul partenaire à pouvoir lier le canal calcique. En effet, la protéine Mint1 que nous avons vu précédemment se fixe également sur la partie C-terminale du canal (Maximov, Südhof, et Bezprozvanny 1999). L'entrée de calcium, médiée par les canaux calciques, dans l'élément présynaptique provoque la fusion des vésicules déjà amarrées à la membrane et la mise en mouvement de celles qui sont dans le cytoplasme. Indispensables donc, pour permettre l'exocytose et la libération du contenu des vésicules dans la fente synaptique, les canaux calciques doivent pouvoir être adressés à la membrane présynaptique rapidement afin d'assurer la transmission synaptique (Su et al. 2012). Dans ce contexte, CASK (via son domaine SH3) ainsi que Mint1 participeraient au trafic du canal calcique jusqu'à la membrane (Maximov et Bezprozvanny 2002).

e. Le domaine HOOK

Le domaine HOOK, composé d'une dizaine d'acides aminés, est le plus petit domaine de la protéine CASK. Il correspond à un motif de liaison aux protéines 4.1. Ce domaine n'est pas commun à toutes les MAGUKs mais certaines d'entre elles le possèdent comme p53 ou SAP-97. La protéine 4.1 a été découverte pour la première fois dans les érythrocytes. Il s'agit d'une protéine du cytosquelette essentielle aux propriétés mécano-chimiques des membranes car elle favorise l'interaction entre la

Spectrine et l'Actine dans le cytosquelette membranaire (Hanada et al. 2003; Baines, Lu, et Bennett 2014). La protéine 4.1 joue donc le rôle de protéine adaptatrice en assurant la stabilité mécanique de la membrane tout en contrôlant également la répartition/accumulation à la surface cellulaire des protéines membranaires. Dans des cellules épithéliales rénales, il a été montré que CASK pouvait servir de « pont » entre la protéine Néphrine (protéine transmembranaire des podocytes) et le complexe Actine/Spectrine, ce complexe étant impliqué dans la formation des diaphragmes de fente des cellules épithéliales (Lehtonen et al. 2005). Dans le neurone, la protéine 4.1 (qui se lie à la Spectrine) fait le lien entre CASK et le cytosquelette d'Actine par le biais du domaine HOOK de CASK (Figure 19). Il a été montré au niveau présynaptique, qu'il s'agissait même d'un très large complexe formé par CASK/Neurexine/Mint1/Liprine- α /Veli/protéine 4.1/Spectrine et enfin l'Actine (Figure 21, page 57). Dans cette configuration, presque tous les domaines de CASK seraient alors saturés de protéines partenaires (Biederer et Sudhof 2001). Ainsi, la Neurexine qui est en contact avec la matrice extracellulaire, se retrouve liée au cytosquelette d'Actine *via* CASK et sa liaison au complexe protéine 4.1/Spectrine. De plus, il a aussi été observé, dans l'élément postsynaptique, que le complexe Syndecans-2/CASK était élargi avec la fixation de la protéine 4.1 (par le domaine HOOK) elle-même reliée au filament d'actine par la Spectrine (Figure 21, page 57) (Chao et al. 2008). Les Syndecans étant transmembranaires, la membrane plasmique se trouve alors liée au cytosquelette d'Actine grâce au pont que forme la protéine CASK entre les Syndecans et l'Actine *via* les protéines 4.1 et la Spectrine. Lorsque la protéine CASK est absente ou que son domaine HOOK est muté, la spinogénèse initiée par la voie des Syndecans n'a pas lieu. La liaison entre les protéines CASK et 4.1 est donc indispensable à la maturation de l'épine dendritique. Un phénomène de SUMOylation (Small Ubiquitin-like MODifier) de CASK qui dissocie la protéine CASK du complexe 4.1/Spectrine/Actine a également été mis en évidence. Cette modification post-traductionnelle libère CASK de son rôle de pont entre la membrane plasmique et le cytosquelette, ce qui réduit le nombre et la taille des épines dendritiques (Chao et al. 2008). Ceci suggère donc que ce mécanisme de SUMOylation affecte très probablement la formation de l'épine dendritique en déstabilisant le complexe protéique CASK/protéine 4.1/Spectrine/Actine qui à son tour pourrait perturber la localisation ou la fonction des protéines membranaires postsynaptiques telles que Syndecan-2 et SynCAM.

De manière intéressante, il a été montré par résonance plasmonique de surface (technique optique permettant la détection de l'interaction entre un ligand et son récepteur immobilisé sur une surface métallique) que le domaine HOOK pouvait également effectuer une liaison avec la Calmoduline (Paarmann et al. 2002) (Figure 19). Lorsqu'elle est fixée à CASK, la Calmoduline, de par sa taille, recouvre les domaines SH3 et GUK en partie C-terminale. La Calmoduline interviendrait alors pour moduler les interactions de CASK avec ses partenaires, si la partie C-terminale est bloquée par la

Calmoduline alors CASK serait plus disponible pour effectuer des interactions avec des partenaires liant sa partie N-terminale (Paarmann et al. 2008).

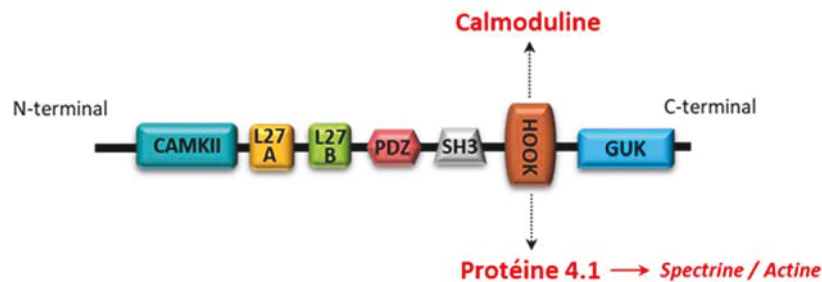


Figure 19 : Les protéines partenaires du domaine HOOK de CASK.
Représentation schématique des différents partenaires connus et interagissant directement avec le domaine HOOK de la protéine CASK.

f. Le domaine GUK

Dernier domaine de la protéine situé en C-terminal, le domaine GUK ne partage en réalité que 40% d'homologie avec une véritable guanylate kinase. La différence majeure réside dans l'incapacité de ce domaine à catalyser la réaction ATP/GMP. Une perte de deux acides aminés dans le site catalytique du domaine GUK peut expliquer ce défaut d'activité par l'incapacité à fixer convenablement une molécule de GMP, diminuant alors drastiquement l'affinité de cette liaison (Woods et Bryant 1991; Olsen et Bredt 2003; Lye et al. 2010). De plus, le repliement intramoléculaire de la protéine (le domaine SH3 pouvant lier le domaine GUK de la même MAGUK) ainsi que les interactions intermoléculaires du domaine GUK ne facilitent pas une liaison avec la GMP. Bien que les motifs de fixation semblent différents, l'encombrement stérique autour du domaine GUK est une autre explication quant à sa perte d'activité catalytique (Olsen et Bredt 2003). Cependant certaines études employant la cristallographie, des tests d'affinité et d'activité enzymatique ont affirmé que ce domaine était bien capable de fonctionner comme une véritable kinase (Kistner, Garner, et Linial 1995; Yuanhe Li et al. 2002). Cependant, ces résultats restent controversés.

En fonction des partenaires avec lesquels elle s'associe *via* son domaine GUK, la protéine CASK adopte des localisations subcellulaires différentes. Il a ainsi été observé que CASK pouvait transloquer dans le noyau des neurones en s'associant à un motif de liaison situé sur la partie C-terminale du facteur de transcription Tbr-1 (Figure 20). On dénombre que dans le cerveau, environ 80% des protéines CASK sont cytoplasmiques et seulement 20% transloquent au noyau soulignant non seulement l'importance des différents partenaires mais aussi les phénomènes de compétition entre

partenaires, qui peuvent influencer la localisation de CASK. Par exemple, la surexpression de Syndecan (liant CASK par le domaine PDZ) dans le neurone a pour conséquence de restreindre CASK au cytoplasme (malgré la présence de Tbr-1 dans le noyau). De plus, si le domaine GUK de CASK présente une mutation localisée dans le motif de liaison à Tbr-1 ou si Tbr-1 est dépourvu du motif de liaison à GUK, CASK sera confinée au cytoplasme. Cependant, le mécanisme par lequel CASK peut agir comme co-activateur de la transcription reste encore méconnu (Hsueh et al. 2000; Wang et al. 2004) (Figure 21, page 57).

Le complexe formé par Tbr-1/CASK va agir sur des gènes cibles pour activer leur transcription et ainsi augmenter le taux d'expression de leurs protéines codantes, *via* leur séquence palindromique qui forme l'élément T. Parmi ces gènes cibles, on retrouve les gènes *NR1* et *NR2b* (Wang et al. 2004). Ces gènes codent respectivement les sous-unités fonctionnelles de la famille de récepteurs glutamatergiques NMDA : NR1 et NR2 (aussi connus sous les noms GluN1 et GluN2A) et dont l'implication lors du développement du cortex cérébral et notamment la migration des neurones a été montrée (Paoletti, Bellone, et Zhou 2013). La PKA, en phosphorylant un motif situé sur le domaine GUK de CASK favoriserait également sa liaison à Tbr-1 (Huang, Chang, et Hsueh 2010). Toujours grâce à son domaine GUK, CASK peut lier un autre facteur de transcription présent dans le noyau, CINAP (Cask Interacting Nucleosome Assembly Protein) (Figure 20), avec laquelle elle va former un complexe comprenant Tbr-1/CASK/CINAP (Figure 21, page 57). Lorsque que les trois partenaires sont associés, les gènes codant pour les sous-unités de NMDA sont encore plus activés. Si au contraire la synapse est excitée et les récepteurs NMDA sollicités, CINAP est dégradée par le protéasome (Wang et al. 2004). Ainsi, en fonction de l'activité synaptique et des facteurs liés à CASK, certains gènes sont activés ou bien éteints. L'expression de la Reelin est elle aussi dépendante du facteur de transcription Tbr-1 (son gène contenant un élément T) et sera d'autant plus élevée si CASK et Tbr-1 sont associés (Bredt 2000). En plus des gènes contenant un élément T, il a été montré que CASK interagit avec des inhibiteurs comme p21 (protéine inhibitrice des CDK, Cycling Dependent Kinase du cycle cellulaire) *via* une interaction avec un facteur de transcription E2A qui reconnaît les gènes possédant un élément E (E-Box) dans le noyau des cellules épithéliales (Sun et al. 2009). Par ailleurs, le domaine GUK peut également fixer un inhibiteur de la différenciation cellulaire, ID1 (Qi et al. 2005) (Figure 20). Ainsi, CASK pourrait moduler la prolifération et la différenciation cellulaire. Dans l'élément présynaptique, le domaine GUK de CASK interagit avec un des deux domaines C2 de la protéine Rabphilin3a, impliquée dans l'exocytose des vésicules synaptiques en liant la protéine Rab3a (appartenant à la famille des protéines G monomériques impliquée dans le transport intracellulaire). Cette interaction pourrait ainsi participer à la libération de glutamate de l'élément présynaptique vers les récepteurs postsynaptiques NMDA (Zhang et al. 2001) (Figure 21, page 57). Dans le système nerveux central, c'est par une approche de double-hybride utilisant CIP98 (CASK-interacting protein 98 kDa) comme proie, qu'a été découverte

l'interaction existant entre CASK et CIP98 (Yap et al. 2003). CIP98 est composée de trois domaines PDZ et d'une région riche en proline qui peut lier le domaine GUK de CASK. Cette protéine, encore appelée Whirlin, participe à la croissance des stéréocils des cellules sensorielles de l'oreille interne en favorisant la polymérisation de l'Actine. Une déficience en CIP98 a été mise en évidence dans la souris *whirler*, un modèle murin du syndrome de Usher (Mburu et al. 2003, 2006).

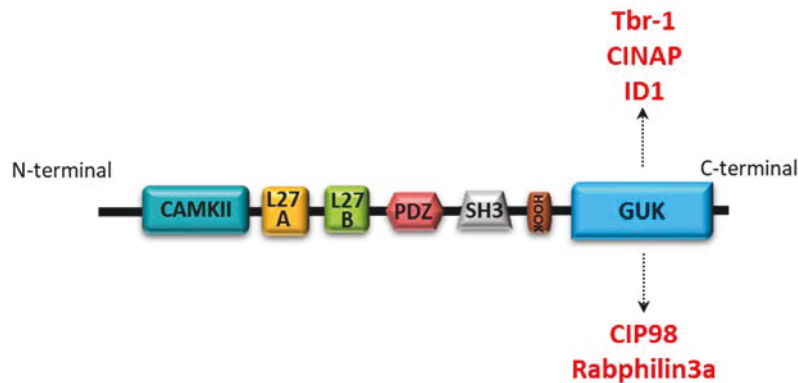
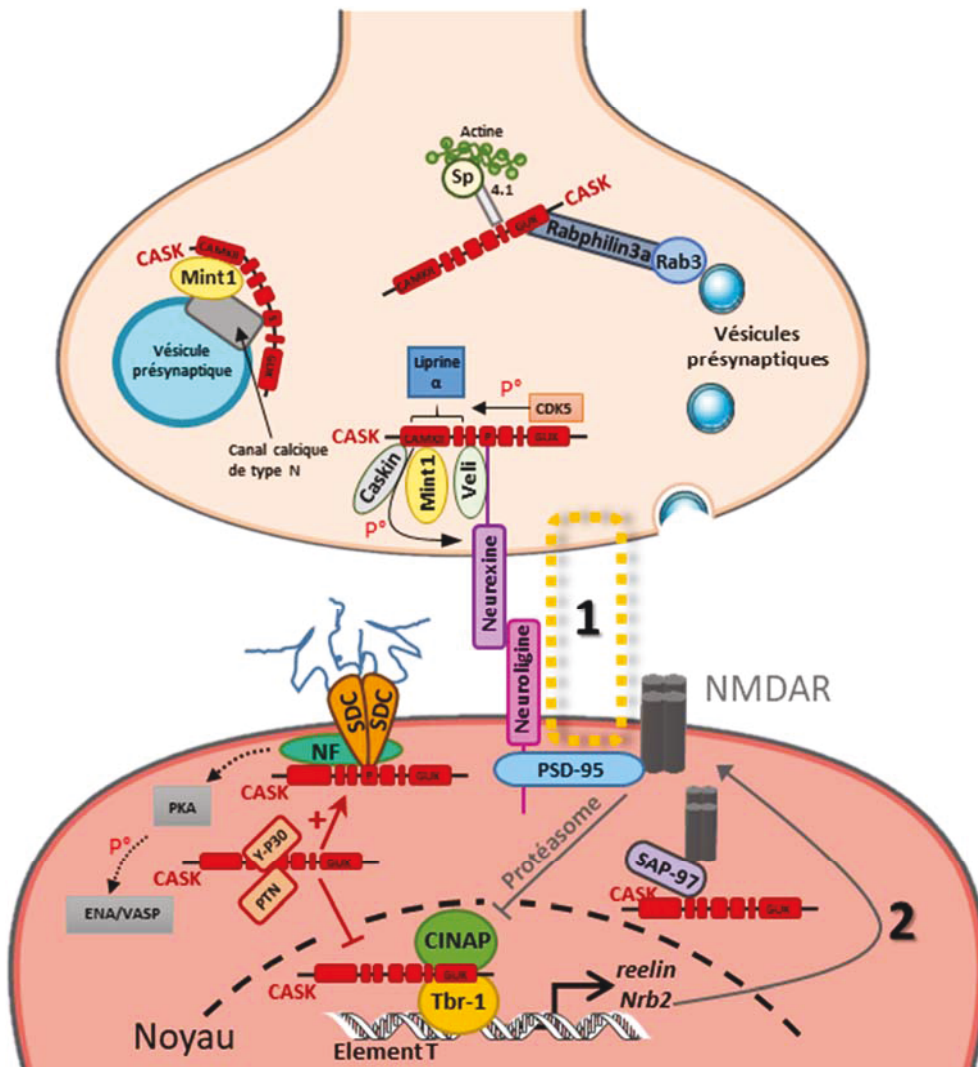


Figure 20 : Les protéines partenaires du domaine GUK de CASK.
Représentation schématique des différents partenaires connus et interagissant directement avec le domaine GUK de la protéine CASK.

C'est donc par le biais de ses sept domaines que la protéine CASK peut entrer en interaction avec différents partenaires. Ces interactions ne sont pas sans conséquences et vont impacter directement le comportement de CASK, et ainsi déterminer le rôle qu'elle va jouer. En effet, CASK selon son partenaire va avoir une localisation différente (cytoplasmique ou nucléaire), va participer au trafic et à l'exocytose de molécules et on la trouve également impliquée dans la formation de complexes multi-protéiques (en faisant le lien entre différentes protéines ou simplement présente afin de soutenir la structure globale du complexe). C'est notamment, avec l'exemple de la synapse, que l'on peut se rendre compte de l'importance de la protéine CASK. Cette dernière, comme évoqué dans les parties précédentes, est présente à la fois dans les éléments pré et post synaptiques et est multifonctionnelle. Elle permet ainsi d'assurer la formation de la synapse mais aussi de maintenir son architecture. C'est en compilant l'ensemble des interactions connues avec ses partenaires, dans la synapse, que l'on peut mieux appréhender la complexité d'une protéine MAGUK telle que la protéine CASK (Figure 21).

Élément présynaptique



Élément postsynaptique

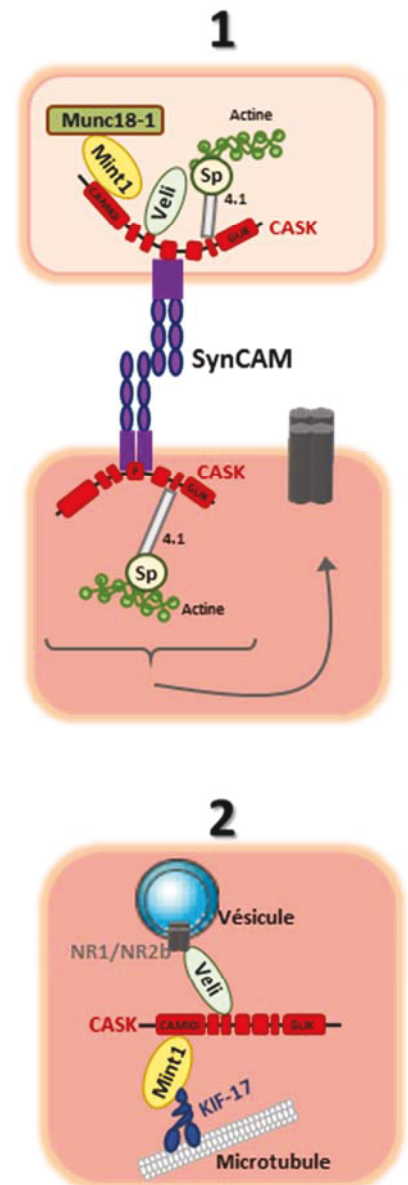


Figure 21: Rôle de la protéine CASK dans la formation et le maintien de l'architecture de la synapse. La protéine CASK est présente à la fois dans l'élément présynaptique ainsi que dans l'élément postsynaptique. CASK façonne de larges complexes macromoléculaires qui permettent de lier des protéines transmembranaires au cytosquelette d'Actine mais aussi participer au trafic des canaux calciques ou des récepteurs NMDA. Grâce à son domaine GUK, CASK peut aussi influencer la transcription de certains gènes. SDC = Syndecan, NF = Neurofibromine, PTN = Pléiotrophine, Sp = Spectrine, P = PDZ, S = SH3, P°=Phosphorylation

3. Dysfonctions de la protéine CASK, quelles conséquences ?

a. Chez le rongeur

Les MAGUKs constituent l'une des plus grosses familles de protéines d'échafaudage associées aux jonctions intercellulaires. Afin de caractériser leurs rôles *in vivo*, des modèles de lignées *knockout* ont été développés et ont mis en évidence les rôles critiques des MAGUKs dans le développement embryonnaire.

Ainsi, des souris doublement invalidées pour les gènes codant pour les protéines MAGUKs PSD-95 et PSD-93 sont caractérisées par une hypokinésie des membres locomoteurs et sont de plus petite taille que des souris sauvages. Elles présentent également un déficit de transmission synaptique (Elias et al. 2006). La perte de ZO-1 est quant à elle létale au stade embryonnaire dès le 8^{ème} jour de développement. Les embryons n'amorcent pas la phase de retournement (torsion qui est propre au développement des rongeurs et qui amène la face dorsale de l'embryon à se tourner vers l'extérieur et la face ventrale à se tourner vers l'intérieur). Par immunomarquages, il a également été constaté une apoptose et une nécrose du tube neural, de la notochorde, de l'aorte et de l'intestin au 9^{ème} jour de développement embryonnaire. Un défaut de vascularisation du sac vitellin a lui aussi été observé (Katsuno et al. 2008). Les souris homozygotes pour une mutation de la protéine SAP-97 (entraînant la synthèse d'une protéine tronquée et non fonctionnelle) présentent un retard de croissance *in utero*, une déformation faciale avec la présence d'une fente palatine mineure, une hydronéphrose (augmentation du volume des reins consécutive à une obstruction des voies urinaires) et des détresses respiratoires. Les souriceaux naissent mort-nés ou décèdent dans les jours suivant la naissance (Caruana et Bernstein 2001; Mahoney et al. 2006).

Ces conséquences sur le développement des embryons sont similaires dans la lignée de souris invalidées pour le gène CASK. En effet, comme pour les autres MAGUKs, la perte de CASK est létale et les souriceaux qui arrivent à terme ne sont pas viables et décèdent quelques heures après la naissance. Ces derniers présentent une fente palatine importante, un dysfonctionnement de la transmission synaptique sans altération de l'intégrité des membranes des neurones, et une apoptose neuronale importante. La perte de CASK semble être également à l'origine de malformations postnatales de l'appareil respiratoire (vraisemblablement la cause de mortalité) (Atasoy et al. 2007). De plus, l'utilisation de souris femelles hétérozygotes (*CASK^{+/-}*), ayant une expression de CASK dite en mosaïque dans l'ensemble des tissus (le gène de *CASK* étant présent sur le chromosome X), a révélé que la protéine CASK pouvait également influencer, durant le développement embryonnaire, le devenir de

certaines cellules. Cette hypothèse a été suggérée après l'observation morphologique de l'intestin de ces souris. Comparable à celui d'une souris sauvage, il possède néanmoins un nombre de crêtes intestinales considérablement réduit chez les souris hétérozygotes. Ce résultat suggère que CASK pourrait alors être impliquée dans des étapes de différenciation des cellules épithéliales au cours du développement embryonnaire (Lozovatsky et al. 2009). La morphogénèse cranio-faciale chez l'embryon de souris s'établit entre les jours 11 et 15. De manière intéressante, il a été montré que jusqu'au 13^e jour, les embryons de souris présentent un *pattern* d'expression de l'ARNm de CASK restreint à la région correspondant à la future tête avant de s'élargir à l'ensemble du corps (Laverty et Wilson 1998).

Nous avons vu précédemment que CASK a la faculté de transloquer au noyau des neurones pour influencer l'activité d'un facteur de transcription Tbr-1 lui-même impliqué dans la régulation de l'expression de la protéine de la matrice extracellulaire Reelin (Hsueh et al. 2000; Bredt 2000). Les souris *knockout* pour Tbr-1 (*Tbr-1*^{-/-}) montrent d'importantes anomalies de développement du cortex cérébral et ont une espérance de vie limitée à quelques jours (Hevner et al. 2001). Les souris issues de la lignée appelée *reeler* qui ont développé spontanément une mutation dans le gène codant pour la protéine Reelin (le rendant inactif), sont caractérisées par une hypoplasie du cervelet ainsi qu'un phénotype ataxique (tremblements, dystonie et démarche titubante) (D'Arcangelo 2006). Ainsi, bien que cette hypothèse n'ait encore jamais été démontrée, il est possible d'envisager que l'invalidation de CASK provoquerait dans un premier temps une désorganisation dans la partie supérieure de l'embryon due notamment à la perte du complexe formé par Tbr-1 et CASK. Si Tbr-1 n'est pas activé, il ne pourra pas influencer la transcription de Reelin, conduisant à l'apparition d'un tissu cérébral organisé de manière anarchique et fonctionnellement limité. Le phénotype sévère observé chez les souris invalidées pour CASK serait alors la conséquence d'une perte successive de différentes voies de signalisation dont le point commun, pour être normalement initiées, serait la protéine CASK. Ce phénomène serait ensuite retrouvé dans le reste de l'embryon où la perte de CASK bloquerait l'activation de voies de différenciation. Il peut donc être envisagé que les organes seront alors incomplètement formés engendrant la mort périnatale des souriceaux qui ne seront pas aptes, entre autre, à s'alimenter ou à respirer par eux-mêmes.

Si la perte de CASK a de telles conséquences dans un modèle murin, il est aisé d'en imaginer les répercussions possibles chez l'Homme, notamment pour tout ce qui a trait à des défauts lors du développement de l'embryon et particulièrement aux atteintes cérébrales irréversibles que présentera alors le futur individu.

b. Chez l'Homme

De nombreuses études ont recours à la technique d'hybridation génomique comparative qui permet d'analyser, sur puce, l'ADN d'un patient malade et de le comparer à celui d'un patient sain. L'alignement des résultats met alors en évidence la présence d'anomalies génétiques sur un segment chromosomique donné. Cette comparaison quantitative donne donc des indications sur la présence ou l'absence de matériel génétique (Béri-Dexheimer et al. 2007). Par ailleurs, les anomalies chromosomiques représentent la première cause de retard mental d'origine génétique et n'impliquent pas moins de 300 gènes (Chiurazzi et al. 2008; Chelly et al. 2006). Dans ce contexte, il a été constaté que des mutations dans le gène codant pour la protéine CASK étaient retrouvées dans des formes de retard mental lié au chromosome sexuel X. En effet, chez l'Homme, le gène codant pour la protéine CASK est situé sur le bras court du chromosome X (position Xp11.4) (Dimitratos et al. 1998; Stevenson et al. 2000). Les individus de sexe masculin présentent alors une microcéphalie ainsi qu'une hypoplasie ponto-cérébelleuse (atrophie du cervelet) caractérisée par un profond retard psychomoteur et un déficit intellectuel lourd. Ces pathologies sont également associées à une dégénérescence neuronale (Najm et al. 2008; Moog et al. 2015; Hayashi et al. 2017).

Les mutations de CASK sont à l'origine de la synthèse d'une protéine non fonctionnelle car tronquée d'un ou de plusieurs de ses domaines, entraînant alors une perte d'interaction avec ses multiples partenaires. Par exemple, si la protéine CASK présente une mutation dans son site de liaison à la Neurexine, cette dernière ne sera pas ancrée à la membrane et les liaisons au niveau de la synapse qui en découlent n'auront pas lieu et conduiront à une altération du développement neuronal. Cette perte d'interaction pourrait expliquer les troubles mentaux, comme l'autisme à des degrés différents et la schizophrénie, présentés par des patients déficients en protéine Neurexine (Reichelt, Rodgers, et Clapcote 2012). Ces délétions, variant d'un patient à l'autre, pourraient alors expliquer les degrés de sévérité des symptômes retrouvés dans les profils cliniques. Selon les domaines de la protéine CASK touchés, les impacts et leurs conséquences sur le développement du cerveau ne sont pas les mêmes (Hsueh 2009). Par exemple, des mutations dans la partie C-terminale de CASK (domaines HOOK et GUK) ont été rapportées dans deux patients présentant, en plus des symptômes déjà énumérés plus haut, un nystagmus (mouvements saccadés, rapides et involontaires des yeux) (Hackett et al. 2010). Une mutation affectant le site de liaison à la Neurexine dans le domaine PDZ de CASK a également été rapportée. Cette mutation serait à l'origine de la microcéphalie observée chez deux patients (LaConte et al. 2018).

Les sujets de sexe féminin, ordinairement porteuses saines des mutations de CASK, peuvent néanmoins être atteintes, de manière plus modérée, des mêmes symptômes que les patients de sexe

masculin. Ces dernières présentent une expression dite en mosaïque pour le gène codant pour la protéine CASK induite par l'inactivation aléatoire du chromosome X (Froyen et al. 2007; Seto et al. 2017). Cette inactivation entraîne l'expression dans les tissus à la fois d'une protéine saine (issue de l'allèle sain conservé) et d'une protéine non fonctionnelle (issue de l'allèle muté) en fonction du chromosome X inactivé. L'expression de la protéine saine n'est alors pas suffisante pour contrebalancer complètement la perte de la protéine induite par l'allèle pathologique. Certaines patientes peuvent également présenter une mutation *de novo* pour le gène *CASK* (Valayannopoulos et al. 2012).

Les avancées faites dans le domaine de l'identification des mutations chez des patients souffrant de pathologies généralement isolées a permis de mettre en lumière de nombreux gènes présentant souvent plusieurs sites de mutation possibles pour une même maladie, comme c'est ici le cas pour le gène codant pour la protéine CASK. Le tableau clinique des patients fait état de l'importance de la protéine CASK au cours du développement embryonnaire et particulièrement pendant les phases de formation du cerveau. Comme pour les modèles murins, des mutations dans les différents domaines de la protéine CASK peuvent modifier les interactions établies en temps normal avec ses partenaires, empêcher des voies de signalisation de s'activer et ainsi aggraver le phénotype des patients. Une baisse du taux d'expression de la protéine Reelin avait d'ailleurs déjà été observée dans l'analyse de tissu cérébral post-mortem de patients atteints de schizophrénie suggérant un lien possible avec d'autres pathologies liées aux troubles du comportement (D'Arcangelo 2006).

Au cours des dernières années, le spectre des maladies impliquant CASK s'est élargi comprenant également le syndrome d'Ohtahara (forme d'épilepsie très rare touchant le nouveau-né) (Saito et al. 2012), le syndrome de Feingold (associant une combinaison variables de symptômes tels que des microcéphalies, des retards mentaux, des déformations des mains et des pieds et des obstructions de l'œsophage et/ou de l'intestin) (Piluso et al. 2009; Dunn et al. 2017) et la tétralogie de Fallot (cardiopathie congénitale caractérisée par une communication interventriculaire, un déplacement de l'aorte, une sténose pulmonaire et une hypertrophie ventriculaire droite) (Nakamura et al. 2014).

L'identification des mécanismes qui régulent la distribution et la densité des canaux ioniques dans les domaines spécialisés du sarcolemme du cardiomyocyte (disque intercalaire *versus* membrane latérale comprenant le costamère et les tubules-T) est un domaine de recherche très actif. En effet, cette organisation très spécifique des canaux ioniques est cruciale pour le maintien de la polarité électrique du cardiomyocyte. L'onde de dépolarisation, à l'origine de la contraction du tissu cardiaque, est très rapidement transmise de cellules en cellules préférentiellement *via* leurs disques intercalaires, on parle de propagation anisotrope. La désorganisation des canaux ioniques, dans les microdomaines de la membrane, perturbe la conduction de l'influx électrique et est alors considérée comme un facteur arythmogène (pouvant être associée par exemple à des cas de fibrillation atriale ou de QT long). Notre hypothèse de travail est que le devenir des canaux ioniques au sein du cardiomyocyte est en grande partie déterminé par les interactions qu'ils établissent avec leurs différents partenaires. Ce concept est particulièrement bien illustré avec la distribution différentielle du canal sodique Nav1.5 entre le disque intercalaire et la membrane latérale (Lin et al. 2011). Ces derniers sont hautement concentrés au disque intercalaire où ils sont associés à des protéines des jonctions gap, des desmosomes ou encore à la protéine MAGUK SAP-97 (Sato et al. 2009; Petitprez et al. 2011; Agullo-Pascual et al. 2014). Cependant, très peu de données concernent la portion de canaux sodiques présente à la membrane latérale dont les mécanismes de régulation restent peu documentés, hormis le fait qu'ils présentent une densité de courant I_{Na} plus faible et interagissent avec le complexe Dystrophine-Glycoprotéines (Gavillet et al. 2006). On parle alors de sous populations de canaux sodiques, étant donné qu'ils sont associés à des partenaires spécifiques et localisés dans des compartiments distincts de la membrane des cardiomyocytes.

Dans ce contexte, mon travail de thèse s'est principalement concentré sur l'étude du rôle d'une protéine MAGUK, CASK dans la régulation et l'organisation de canaux ioniques, principalement sodiques, dans le cardiomyocyte.

(1) C'est au cours d'une première étude que j'ai eu l'opportunité de participer à la caractérisation de la protéine CASK dans le cœur, en terme d'expression, de localisation mais aussi en approfondissant son rôle fonctionnel dans le myocyte cardiaque. (2) La partie centrale de mon travail a ensuite consisté à caractériser l'implication de chacun des sept domaines qui compose la protéine CASK dans l'établissement de la polarité structurale et électrique du cardiomyocyte. (3) Enfin, j'ai également pu m'intéresser à l'impact de l'extinction de CASK, dans le cœur de rats adultes, afin d'explorer le rôle de cette protéine dans la conduction et la propagation du potentiel d'action cardiaque mais aussi dans le maintien d'une architecture tridimensionnelle correcte du myocarde.

Matériels et Méthodes

A. Culture cellulaire

La majeure partie de ce travail a reposé sur l'utilisation de cellules cardiaques de rats adultes (souche Wistar, Janvier Labs). Qu'ils soient atriaux ou ventriculaires, les cardiomyocytes ont été utilisés quelques heures après leur isolement, on parle alors de cellules cardiaques fraîchement isolées (J0), ou bien mis en culture sur une période de 4 à 7 jours. Nous avons également complété notre première étude en comparant nos résultats avec ceux obtenus dans un autre type cellulaire, à savoir, la lignée cellulaire HEK-293.

1. Isolement et culture de cardiomyocytes de rats adultes

Les cardiomyocytes ont été isolés par une technique de digestion enzymatique appelée « Langendorff » à partir de cœurs de rats Wistar âgés de 2 mois (~200 g). Ces derniers reçoivent au préalable une première injection intrapéritonéale d'anticoagulant (héparine, dose 250 UI/kg) puis sont anesthésiés avec une dose létale de pentobarbital sodique (dose 110 mg/kg). Après l'ouverture de la cage thoracique de l'animal, l'aorte est clampée et le cœur, encore battant, est rapidement prélevé. Il est alors nettoyé des tissus (pulmonaires ou du thymus) entraînés lors du prélèvement et l'aorte est soigneusement déroulée afin de permettre sa canulation sur un système de rétro-perfusion Langendorff. Celui-ci assure la perfusion des coronaires et la digestion de l'ensemble du tissu cardiaque. Dans un premier temps, le sang est éliminé à l'aide d'un tampon Krebs-Henseleit carbogéné (en mM : 100 NaCl ; 4 KCl ; 1,7 MgCl₂ ; 10 glucose ; 55 NaHCO₃ ; 1 KH₂PO₄ ; 22 HEPES ; pH = 7,4 avec du NaOH, Sigma Aldrich) supplémenté de 15 mM de BDM (2,3-ButaneDione Monoxime, Sigma Aldrich) et 10 mM de Taurine (Sigma Aldrich) à 37°C. Puis vient l'étape de digestion qui est assurée par le même tampon Krebs-Henseleit supplémenté de 15 mM de BDM ; de 7,5 mM de BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma Aldrich) et d'une enzyme de digestion, la Collagénase A (200U/mL, Roche Life Science). Après environ 20 minutes de digestion à un débit fixe de 5,5 mL/min, les oreillettes et les ventricules sont prélevés séparément et sont placés dans un tampon Kraft-Brühe (en mM : 70 Potassium L-Glutamate ; 25 KCl ; 20 Taurine ; 10 KH₂PO₄ ; 3 MgCl₂ ; 0,5 EGTA ; 10 Glucose ; 10 HEPES ; pH = 7,4 avec du KOH, Sigma Aldrich). Les oreillettes sont découpées en morceaux et les ventricules sont triturés à l'aide de pinces fines. Les fragments de tissus subissent ensuite des allers retours à la pipette afin d'en extraire mécaniquement les cellules atriales ou ventriculaires. Après cette étape, les cardiomyocytes sontensemencés, dans des conditions standard de culture (37°C, 5% CO₂), sur des lamelles de verre ou des

boîtes de culture doublement cotées avec de la Poly-D-Lysine (5 µg/mL, Sigma Aldrich) et de la Laminine (5 µg/mL, Roche Life Science) afin d'optimiser l'adhérence des cellules. 1h30 après l'isolement, le tampon Kraft-Brühe est remplacé par un milieu de culture comprenant du M199 (Life Technologies), 1% de SVF (Sérum de Veau Fœtal, Sigma Aldrich), 1% de P/S (Pénicilline/Streptomycine, Life Technologies), et 1‰ ITS (Insuline Transferrin Selenium, Life Technologies).

2. Lignée cellulaire – HEK-293

La lignée cellulaire HEK-293 (Human Embryonic Kidney 293) est issue de cellules rénales embryonnaires humaines et immortalisées par transformation virale avec un adénovirus de type 5. Cette lignée est facile à maintenir en culture et est d'autant plus intéressante car elle peut être aisément transfectée. Pour l'étude portant sur la régulation du courant sodique par la protéine CASK, une lignée de HEK-293 surexprimant de façon stable les canaux $\text{Na}_v1.5$, qui sont associés à un gène de résistance à la Zéocine, a été utilisée. Les cellules sont alors cultivées à 37°C et 5% CO_2 dans un milieu de sélection se composant de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Life Technologies) supplémenté de 5% SVF, de 1% de P/S et de 120 ng/mL de Zéocine (Life Technologies). Lorsqu'elles atteignent 80-90% de confluence, elles sont repiquées après action de la trypsine (Life Technologies). Ces cellules nous ont été gracieusement fournies par le Pr Hugues Abriel (Berne, Suisse).

B. Transfections et infections adénovirales

Afin d'étudier le rôle de la protéine CASK dans la régulation des canaux ioniques et des courants qui leurs sont associés, nous avons modulé son expression. Ainsi, par l'intermédiaire de vecteurs viraux (adénovirus) ou plasmidiques, la surexpression de la protéine CASK, son extinction ou encore la délétion de ses domaines ont pu être étudiées dans les cellules primaires cardiaques ou dans la lignée de HEK-293. Toutes nos constructions comportent des tags GFP ou RFP, les cellules infectées ou transfectées sont donc facilement reconnaissables en microscopie.

1. Infections adénovirales

Les adénovirus permettant la surexpression de la protéine CASK et de ses formes tronquées (couplées à la GFP) ont été obtenus par clonage. Suite à des coupures enzymatiques (enzymes de restriction XhoI et HindIII), l'insert CASK (provenant d'un plasmide PUC) a été inséré dans un plasmide Pshuttle comportant un promoteur CMV. Une coupure *via* PmeI a ensuite permis la linéarisation du vecteur, afin de l'introduire dans des bactéries électrocompétantes contenant le vecteur viral (pAdEasy). Ce dernier, par recombinaison homologue, est alors associé à notre gène d'intérêt. La production du virus est assurée par des HEK-293 qui reçoivent le vecteur viral (préalablement linéarisé grâce à l'enzyme PacI). Cette étape ainsi que l'amplification et la purification du virus ont été réalisées dans un laboratoire spécialisé, la Plate-Forme de Production de Vecteurs Viraux (Institut de Recherche Thérapeutique, INSERM U1089, IRT-1), basé à Nantes. 24 heures après leur mise en culture, les cardiomyocytes sont mis en contact avec les adénovirus à hauteur de 5.10^7 particules infectieuses/mL de milieu de culture. 1 heure après l'infection, le milieu est changé pour du milieu standard de culture dépourvu d'adénovirus. L'efficacité de l'infection adénovirale est proche de 100% et les cellules infectées sont identifiées facilement *via* le tag GFP par microscopie à épifluorescence.

Ainsi, dans ce travail, nous avons surexprimé la protéine CASK (Ad-CASK) ainsi que ses formes tronquées pour un domaine à la fois (Ad-CASK^{ΔCAMKII}, CASK^{ΔL27A}, CASK^{ΔL27B}, CASK^{ΔPDZ}, CASK^{ΔSH3}, CASK^{ΔHOOK} et CASK^{ΔGUK}), les résultats ont ensuite été comparés à ceux obtenus avec un contrôle positif de surexpression comprenant le tag GFP seul (Ad-GFP) et la protéine CASK totale. Nous avons aussi testé les conséquences de l'inhibition de la protéine CASK (Ad-shCASK) en utilisant comme contrôle d'extinction, une séquence non spécifique et sans conséquences pour le fonctionnement cellulaire, appelé « scramble » (Ad-shSCR).

2. Transfection

Les transfections ont été réalisées sur la lignée cellulaire de HEK-293 surexprimant de façon stable le canal Na_v1.5 lorsque les cellules avaient atteint entre 60 et 80% de confluence. La Lipofectamine (Lipofectamine 2000®, Life Technologies) a été utilisée comme agent transfectant. Celle-ci assure le passage de l'ADN (chargé négativement) à travers la bicouche lipidique membranaire, qu'il ne peut traverser seul étant donné l'existence d'une répulsion électrostatique de la membrane cellulaire. L'endocytose est ainsi rendue possible grâce aux lipides cationiques de la Lipofectamine qui vont former une enveloppe autour de l'ADN. Cette transfection est transitoire, ce qui signifie que le plasmide ne s'intègre pas à l'ADN cellulaire et est éliminé au bout de quelques passages. Pour le

protocole suivant, les différents volumes et les quantités d'ADN indiquées correspondent à ceux d'une transfection pour une boîte de pétri de 60 mm. Le jour de la transfection, le milieu de culture standard (4 mL/boîte) est remplacé par un milieu contenant 5% de SVF mais aucun antibiotique (2 mL/boîte). 20 µl de Lipofectamine et 4 µg d'ADN sont dilués séparément dans 1 mL de milieu OPTI-MEM® (Life Technologies). Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, les deux préparations sont mélangées, volume à volume, et à nouveau incubées 20 minutes à température ambiante. Le mélange ADN/Lipofectamine est ajouté au milieu sans antibiotique et sans sérum sur les cellules. Après 4 heures d'incubation, le milieu des cellules est changé pour du milieu standard de culture (DMEM, 5 % SVF, 1% P/S et 120 ng/mL Zéocine).

Pour les expériences de surexpression de la protéine CASK, la séquence d'ADNc a été synthétisée et clonée dans un plasmide pIRES-GFP (pIRES-GFP-CASK) et le plasmide pIRES-GFP seul a servi de contrôle. L'expression de la protéine CASK a été inhibée par la méthode des ARNs interférents. La séquence du shRNA dirigé contre la séquence de CASK a été livrée dans un plasmide pRFP-C-RS (RFP-shCASK) et comparé à un shRNA contrôle (RFP-shSCR) (Origene).

C. Traitements pharmacologiques

Afin d'identifier quelles voies du trafic du canal $Na_v1.5$ sont impactées par la présence ou l'absence de la protéine CASK, des agents pharmacologiques ont été utilisés afin de moduler les voies protéolytiques ou bien bloquer le trafic antérograde. Trois modulateurs ont été testés : l'ALLN, le MG132 et la Bréfeldine A.

ALLN

L'ALLN (Acetyl-Leu-Leu-Norleucinal) fait partie de la famille des peptides aldéhydes. Avant d'être utilisé comme inhibiteur du protéasome, il a été décrit pour la première fois comme étant un inhibiteur de la Calpaïne I. En effet, on considère que son action inhibitrice est plus de 20 fois plus puissante sur les protéases à cystéines telles que les calpaïnes ou les cathepsines (Wang et Po-Wai 1994). Son effet est réversible car les inhibiteurs de type peptide aldehyde rentrent aisément dans la cellule mais sont facilement oxydés et relargués à l'extérieur de la cellule. Les effets de l'ALLN ont été testés sur des cellules atriales de rats à 4 jours post-infection, en présence de 10µM de cet inhibiteur durant 2h, 3h et 6h. Puis des immunomarquages du canal sodique ont été réalisés.

MG132

Le MG-132 (Carbobenzoxy-Leu-Leu-Leucinal) est un peptide aldéhyde qui bloque, efficacement et de manière sélective, l'activité protéolytique du complexe 26S du protéasome. Ainsi, contrairement à l'ALLN, le MG-132 est plus sélectif et son action est plus importante du fait qu'il cible directement le protéasome. La dégradation des protéines ubiquitinylées est alors inhibée par la présence du MG-132 dont l'activité est néanmoins réversible, tout comme l'ALLN (Mroczkiewicz et al. 2010). Les effets du MG-132 ont été testés sur des cellules atriales de rats à 4 jours post-infection, en présence de 10 μ M de cet inhibiteur durant 2h, 3h, 4h ou 6h de traitement. Des immunomarquages du canal Na v 1.5 ont ensuite été réalisés et le courant sodique de ces cellules traitées a été enregistré par patch-clamp.

BFA

La BFA (Bréfeldine A) est un composé lipidique d'origine fongique qui bloque le trafic des protéines entre le réticulum sarcoplasmique et l'appareil de Golgi. La BFA empêche la protéine Arf1 (appartenant à la famille des GTPase) d'assurer la formation du manteau de protéines COP, qui recouvre les vésicules chargées de transporter les protéines d'un compartiment à l'autre. La morphologie des saccules formant l'appareil de Golgi est aussi affectée, ce qui ne lui permet plus de recevoir de nouvelles vésicules sur sa face *cis*. On observe donc un arrêt du trafic antérograde médié par la BFA. Toutefois, l'action de la BFA est réversible (Ktistakis, Linden, et Roth 1992; Peyroche et Jackson 2000). Les effets de la BFA ont été testés sur des cellules atriales de rats, celles-ci ont reçu 12h après l'infection, 5 μ M de cet inhibiteur durant 48h. Le courant sodique de ces cellules traitées a ensuite été enregistré par patch-clamp.

D. Biochimie

1. Extractions et dosages protéiques

a. À partir de cellules en culture

Les cellules atriales, ventriculaires ou les HEK-293 sont placées sur glace et rincées dans un premier temps avec du PBS (Phosphate Buffer Saline, Life Technologies) afin d'enlever toutes traces de milieu de culture. Puis elles sont incubées avec un tampon de lyse cellulaire hypo-osmotique contenant en mM : 50 Tris (pH=7,5) ; 150 NaCl ; 2 EDTA ; 1% de Triton X-100 et 1‰ de cocktail inhibiteur de protéases (Sigma Aldrich) avant d'être décollées et broyées manuellement à l'aide d'un grattoir. Les

extraits obtenus sont placés sous agitation rotative pendant 1 heure avant d'être centrifugés à 10000 rpm durant 15 minutes, toutes les étapes d'extraction sont réalisées à 4°C. Le surnageant est ensuite récupéré et dosé selon la méthode colorimétrique de BCA (Thermo Scientific) compatible avec de nombreux détergents (dont l'Igepal ou l'EDTA). La concentration en protéines est alors estimée en fonction d'une gamme de concentration de BSA (Thermo Scientific).

b. À partir de tissus

Au cours de notre première étude, une collaboration a été mise en place avec le Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de la Pitié Salpêtrière (75013, Paris), et plus particulièrement avec le Dr Julien Amour (Service Anesthésie et Réanimation – Chirurgie Cardiaque). Ainsi, lorsque les patients subissent une chirurgie cardiaque, telle qu'un pontage, les fragments d'oreillette sont récupérés. Nous avons classé ces échantillons en deux groupes selon le tableau clinique des patients au moment de la chirurgie. Ainsi, le groupe contrôle correspond aux patients possédant un rythme sinusal et une fonction ventriculaire gauche conservée. Le groupe malade a été constitué de patients présentant une dilatation de l'oreillette droite associée à une fibrillation atriale chronique (depuis plus de 6 mois) ainsi que des régurgitations sévères des valves mitrale et tricuspide (séparant respectivement l'oreillette gauche du ventricule gauche et l'oreillette droite du ventricule droit). Le tissu est ensuite transféré rapidement au laboratoire. Selon les besoins, il est ensuite coupé et inclus en prévision de réaliser des immunomarquages ou bien transféré dans un tube contenant du tampon de lyse (cité précédemment) puis désagrégé à l'aide d'un homogénéiseur de laboratoire (Ultra Turrax, IKA). Les surnageants sont récupérés, centrifugés et dosés selon la méthode décrite pour les extractions protéiques de cellules en culture.

Les tissus provenant des animaux sacrifiés sont rincés au PBS plusieurs fois pour éliminer un maximum de sang puis subissent le même procédé que les tissus humains.

2. Western Blot

Les protéines sont diluées dans du tampon Laemmli (Life Technologies). Avant d'être déposés sur gels, les échantillons protéiques sont dénaturés au bain-marie 5 minutes à 95°, 10 minutes à 60°C ou 20 minutes à 37°C en fonction de la taille et du type de protéine que l'on souhaite révéler. Le choix du gel, pour une migration optimale des protéines étudiées s'est fait en fonction de la taille de chacune. Ainsi, pour des protéines dont le poids moléculaire ne dépassait pas 250 kDa, des gels NuPAGE®

Novex® 10 % Bis-Tris (Life Technologies) ont été utilisés et pour celles de haut poids moléculaire, des gels NuPAGE® Novex® 3-8 % Tris acétate (Life Technologies) ont été privilégiés. En fin de migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (BioRad) par transfert liquide (en mM : 25 Tris Base, 192 Glycine, 20% d'éthanol) pendant 120 minutes à 30V ou en utilisant l'appareil de transfert de gel sec iBlot® 2 (Thermo Fisher Scientific) à 20V pendant 10 minutes. Le transfert des protéines est vérifié par une coloration réversible au rouge Ponceau (Sigma Aldrich). La membrane est rincée à l'eau puis incubée 1 heure sous agitation à température ambiante dans un tampon TBS-T (en mM : 150 NaCl ; 20 Tris-Base ; pH=7,6 avec du HCL 37% fumant ; 0,1% de Tween20) supplémenté de 5% de lait écrémé (BioRad). Après cette étape de saturation des sites aspécifiques, la membrane est incubée sur la nuit à 4°C avec le ou les anticorps primaire(s) dilué(s) dans du TBS-T + 5% de lait (la liste des anticorps et leurs concentrations d'utilisation sont listés sous forme de tableau page 75). Le lendemain, la membrane est rincée trois fois pendant 10 minutes avec du TBS-T puis incubée une heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire (anti-IgG de souris et anti-IgG de lapin au 1/5000^{ème}, Cell Signaling) couplé à la HRP (Horse Radish Peroxidase) dilué dans du TBS-T + 5% de lait. La membrane est rincée 6 fois pendant 5 minutes avant l'étape de révélation par chimiluminescence grâce au kit ECLPlus (GE Healthcare) sur la caméra ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare).

3. Biotinylation des protéines de surface

Pour étudier les protéines présentes dans la fraction membranaire des cellules, la biotinylation se révèle être une technique privilégiée. En effet, les protéines exposées à la surface des cellules sont isolées du reste des protéines cellulaires grâce à l'interaction existante entre la Biotine (on parle alors de protéines biotinylées) et la Streptavidine. Afin de ralentir les voies d'endocytose et d'exocytose, toute l'expérience est réalisée à 4°C. Les cellules sont rincées doucement deux fois au DPBS (contenant du calcium et magnésium) froid (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, pH=8) avant d'être incubées avec de la Biotine à 2 mg/mL (EZLink® Sulfo-NHS-SS-Biotin, Thermo Scientific) pendant 30 minutes. La solution de Biotine est retirée et les cellules sont rincées au DPBS. La réaction de biotinylation est stoppée par l'ajout d'une solution de Glycine à 100 mM pendant 10 minutes. Les cellules sont à nouveau rincées au PBSCM, puis lysées dans un tampon RIPA 150 (RadioImmunoPrecipitation Assay buffer, en mM : 150 NaCl ; 50 Tris-HCl (pH=7,5) ; 1 % Igepal (NP-40) ; 0,5 % Na-deoxycholate ; 0,1 % SDS) supplémenté d'1‰ de cocktail inhibiteur de protéases durant 10 minutes. Les lysats totaux obtenus sont dosés (comme décrit précédemment) et ajustés à la même concentration. Ils sont ensuite incubés avec des billes de Streptavidine (Thermo Fisher Scientific) toute la nuit à 4°C sous rotation. Ces

billes vont ainsi reconnaître les protéines biotinylées et s'y fixer. Le lendemain, les échantillons sont centrifugés 1 minute à 1000 g afin de faire précipiter les billes, le surnageant est retiré puis les billes sont lavées alternativement avec les tampons RIPA 500 (en mM : 500 NaCl ; 50 Tris-HCl pH 7,5 ; 1 % Igepal (NP-40) ; 0,5 % Na-deoxycholate ; 0,1 % SDS) et RIPA 150. Les protéines ayant interagi avec les billes sont éluées dans du tampon Laemmli puis dénaturées 20 min à 37°C. Les protéines sont ensuite séparées et étudiées par western blot.

4. Co-immunoprécipitation

La méthode de co-immunoprécipitation a été utilisée pour étudier l'interaction entre la protéine CASK et le canal $Na_v1.5$ ainsi que pour identifier le ou les domaine(s) impliqués dans l'interaction de la protéine CASK avec la Dystrophine. Cette technique repose sur la reconnaissance d'un anticorps contre une protéine d'intérêt du complexe formé au sein des cellules. Le complexe immun en solution est alors capturé sur un support solide (billes de sépharose) sur lequel des protéines A ou G sont fixées de manière covalente. Après lavages pour éliminer les interactions non spécifiques, les protéines fixées (appartenant au complexe) sont séparées des billes et peuvent être étudiées. Les expériences de co-IP sont réalisées sur des lysats de cellules cardiaques en culture et ayant été infectées par l'un de nos adénovirus. Le protocole d'extraction protéique ne diffère pas de celui décrit précédemment. Le lysat protéique de chaque condition est incubé sur la nuit à 4°C sous agitation rotative en présence de l'anticorps dirigé spécifiquement contre la protéine d'intérêt (sur une moyenne d'environ 2 à 10 µg d'anticorps selon les recommandations des fournisseurs) ou en présence d'un anti-IgG à 0,1 µg/mL (provenant de la même espèce que l'anticorps servant à réaliser l'immunoprécipitation) afin de servir de contrôle de spécificité. Le lendemain, 50 µL de billes G-sépharose (Sigma) sont incubés dans 2 mg de protéines totales pendant 1 heure à 4°C toujours sous rotation. Les mélanges billes + anticorps + lysats protéiques sont centrifugés 2 minutes à 1000 g afin de faire précipiter les billes et ainsi les complexes qui y sont accrochés. Les surnageants correspondant aux protéines non liées aux billes sont mis de côté. Les billes sont lavées au tampon de lyse 3 fois de suite afin de ne récupérer que la protéine d'intérêt et les protéines qui lui sont liées. Les protéines ayant interagi avec les billes sont éluées dans du tampon Laemmli 2X puis dénaturées 5 minutes à 95°C ou 20 minutes à 37°C. Les protéines sont ensuite séparées et analysées par western blot.

5. GST-pull down

La GST pull down est une autre technique permettant l'étude des interactions protéine-protéine. Néanmoins, celle-ci est légèrement différente car elle permet de cibler la séquence responsable de l'interaction entre deux protéines. Dans notre première étude, nous avons testé l'interaction de la protéine CASK avec la séquence C-terminal du canal sodique $Na_v1.5$ et plus précisément du domaine SIV (Sérine – Isoleucine – Valine). La GST pull down consiste à fusionner à des billes de GST (Glutathione-Sulfo-Transferase), une partie de la protéine que l'on souhaite étudier. Ainsi, les billes associées à la séquence d'intérêt vont pouvoir interagir avec les protéines présentes dans un lysat cellulaire qui seront ensuite révélées par western blot. Les expériences de pull down sont réalisées sur des lysats de cellules cardiaques de rats adultes infectées par l'un de nos adénovirus ou mis en présence de protéine totale purifiée (NM_003688, OriGene). Le lysat protéique obtenu après extraction (décrit précédemment) est incubé 2 heures avec des billes GST seules sous agitation rotative afin d'éliminer les interactions aspécifiques dues aux billes. 50 à 100 μ L de protéines de fusion GST (fournies par le Pr Hugues Abriel (Berne, Suisse)) sont ensuite incubés avec 1 à 2 mg de lysat total une nuit à 4°C sous rotation. Le jour suivant, les billes sont lavées trois fois afin d'éliminer tout le lysat protéique, puis récupérées dans du tampon Laemmli à volume égal. Les protéines sont dénaturées à 37°C pendant 20 minutes ou à 60°C pendant 10 minutes puis séparées et étudiées par western blot.

E. Imagerie

1. Préparation des échantillons

Les cellulesensemencées sur des lamelles de verre sont fixées pendant 10 minutes au paraformaldéhyde (PFA, Sigma Aldrich) 4 % puis rincées trois fois au tampon phosphate salin (PBS, Life Technologies). Les tissus sont également fixés pendant 10 minutes au PFA puis rincés à trois reprises avec du PBS. Ils sont ensuite inclus dans du gel Cryomatrix® (Thermo Scientific) et progressivement refroidis à l'azote liquide. L'immunohistochimie est réalisée sur des coupes de 8 μ m d'épaisseur obtenues à l'aide d'un cryotome.

2. Immunofluorescence

L'immunofluorescence permet de détecter la présence et la distribution d'une protéine au sein des différentes structures d'une cellule (immunocytochimie) ou d'un tissu (immunohistochimie). Pour notre étude, nous avons réalisé des expériences d'immunofluorescence dite indirecte. En effet, celle-ci se fait en deux étapes. La première repose sur la reconnaissance d'un épitope de la protéine cible par un anticorps dirigé contre cette dernière, on parle d'anticorps primaire. La deuxième permet de diriger un anticorps couplé à un fluorochrome (on parle d'anticorps secondaire) contre les immunoglobulines de l'espèce, où a été produit le premier anticorps, pour ainsi révéler sa localisation dans l'échantillon. Les tissus ou cellules sont incubés pendant 1 heure dans un tampon de perméabilisation/saturation (PBS ; 0,5 % Triton ; 1 % BSA ; 10 % du sérum des espèces chez lesquelles ont été produits les anticorps secondaires) qui va favoriser l'entrée des anticorps au travers des membranes mais également limiter les interactions aspécifiques dues aux anticorps secondaires. Les échantillons sont ensuite incubés une nuit à 4°C en présence des anticorps primaires (voir tableau 1 page 75) préparés dans un tampon de perméabilisation/saturation (PBS, 0,5 % Triton, 1 % BSA, 3 % des sérums). Après 3 rinçages au PBS, les cellules ou tissus sont mis en présence pendant 1 heure, à température ambiante et à l'abri de la lumière, d'un tampon (PBS ; 1 % BSA ; 3 % sérum) contenant les anticorps secondaires couplés à des fluorochromes Alexa 488 ou 594 (2,5 µg/mL à 5 µg/mL, Life Technologies) ainsi que le marqueur nucléaire DAPI (0,2 µg/mL, Sigma Aldrich). Le montage entre lame et lamelle des échantillons préalablement rincés au PBS s'effectue avec du liquide de montage pour immunofluorescence Dako.

3. Acquisition des images

a. Microscopie 3D à déconvolution

En optique, la déconvolution fait référence aux procédés de correction des distorsions optiques (diffraction et aberrations des lentilles) liées à l'utilisation des microscopes. Cette correction permet ainsi d'obtenir des images de meilleure résolution et plus proches de la réalité avec notamment une réduction du bruit de fond. À l'aide d'un élément piezo-électrique placé sur l'objectif ou la platine du microscope, il est possible de réaliser un balayage selon l'axe Z de l'échantillon observé et d'obtenir une pile d'images en 3D (Figure 22 A). Néanmoins, chaque image acquise présente un aspect flouté car elle contient des informations attribuables aux plans supérieurs et inférieurs au plan de focal, c'est-

à-dire que chaque image s'accompagne de l'étalement de l'intensité lumineuse des plans voisins. Afin d'éliminer ces informations par déconvolution, il faut tout d'abord caractériser les propriétés optiques de formation des images en mesurant la fonction d'étalement du point (*point spread function*, PSF) qui décrit la répartition spatiale de l'intensité lumineuse formée à partir d'un point source au travers du dispositif optique (Figure 22 B). Les PSF sont acquises grâce à des billes de fluorochromes de taille inférieure à la limite de résolution du microscope et dans nos conditions expérimentales (milieu de montage et propriétés du verre lame/lamelle). Elles permettent ainsi de modéliser la façon dont notre équipement transfère un point du plan objet au plan image. Les images sont ensuite déconvoluées mathématiquement sur la base des PSF acquises afin de réaffecter la fluorescence à son point d'émission améliorant à la fois le contraste et la résolution finale (Figure 22 C).

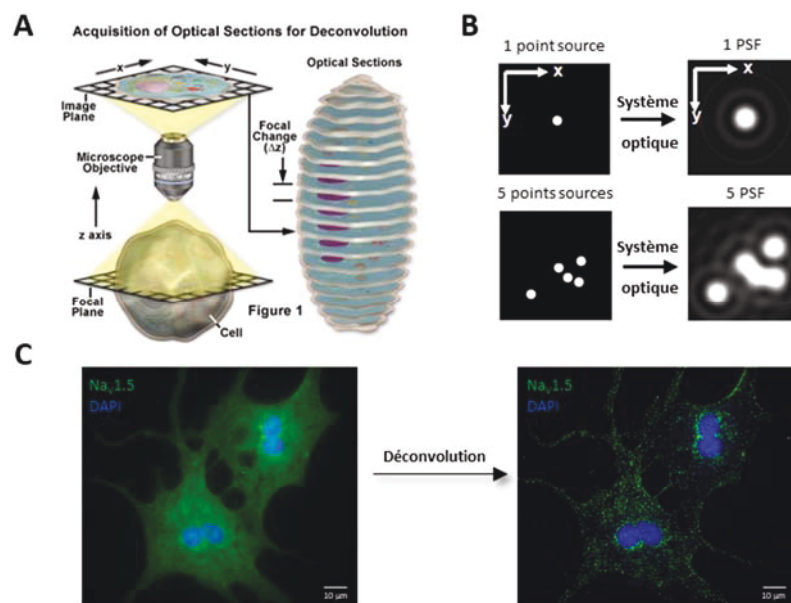


Figure 22 : Principe du traitement des images par la déconvolution. (A) Représentation schématique de l'acquisition de sections optiques (<http://www.olympusmicro.com/primer/digitalimaging/deconvolution/deconintro.html>) **(B)** Déformations optiques observées lors de l'acquisition de billes PSF dans les plans latéral et axial. L'acquisition de billes PSF permet de se rendre compte des déformations optiques subies par les échantillons (<http://www.trop.uha.fr/master/downloads/6deconvolution.pdf>). **(C)** Exemple d'application du procédé de déconvolution. Immunomarquage de la protéine Na_v1.5 dans des cardiomyocytes atriaux de rat adulte avant et après déconvolution. Le bruit de fond est considérablement réduit ce qui accentue la netteté du marquage et assure une meilleure observation de la localisation de la protéine d'intérêt au sein des différentes structures de la cellule.

Deux microscopes ont servi pour l'acquisition des images. D'une part un microscope à épifluorescence Olympus doté d'un objectif 60X (UPlanApo) et d'une caméra CoolSnap (Roper Scientific). Les acquisitions sont réalisées tous les 0,2 μm selon l'axe Z par l'intermédiaire d'un système de nanositionnement de l'objectif par piezo (PIFOC, PI, Karlsruhe, Allemagne) puis déconvoluées grâce au logiciel Metamorph (Molecular Devices). D'autre part, le microscope DeltaVision™ Elite (GE Healthcare) doté d'une caméra CoolSnap HQ² EMCCD, d'objectifs 60X/1,42 Oil Plan APO et 10X/0,25 Plan et d'un logiciel softWoRx de déconvolution rapide a également été utilisé pour acquérir

également tous les $2\mu\text{m}$ des images selon l'axe Z. Le traitement et l'analyse des images ont été réalisés avec le logiciel ImageJ (National Institutes of Health).

b. Microscopie TIRF

La microscopie TIRF (*Total Internal Reflection Fluorescence*), ou microscopie à champ évanescent, est une technique de microscopie qui permet d'étudier les phénomènes se produisant à l'interface verre/échantillon (pour notre cas, une cellule), sur une épaisseur comprise entre 70 et 100 nm. Cette fine zone d'analyse correspond au plan membranaire des cellules lorsque celles-ci ont été mises en culture après leur isolement sur des boîtes de pétri adaptées à ce type de microscopie (Ibidi). Cette technique peut être appliquée à des cellules vivantes ou fixées immunomarquées pour visualiser par exemple la dynamique de certaines protéines ou leur localisation dans le plan membranaire. À l'inverse de la microscopie à épifluorescence où le faisceau d'excitation traverse l'intégralité de l'échantillon et excite l'ensemble des fluorochromes (Figure 23 A), la microscopie TIRF repose sur l'existence d'un angle critique au-dessus duquel la lumière incidente est complètement réfléchi lorsqu'elle arrive à l'interface verre/échantillon où une onde évanescente se crée. Cette onde ne pénètre donc pas l'échantillon, et n'excite ainsi que les fluorochromes présents dans le plan membranaire des cellules. En confinant l'énergie d'excitation dans cette fine section, le rapport signal/bruit est nettement amélioré, permettant ainsi l'observation de molécules individuelles (Figure 23 B). Les images ont été acquises grâce à une caméra CCD ORCA-ER (Hamamatsu) sur un microscope inversé Olympus IX81-ZDC2 équipé du système Olympus Cell^{tirf} (objectif à immersion 60X/1,49 APON OTIRF). Le traitement final des images a été réalisé avec le logiciel ImageJ.

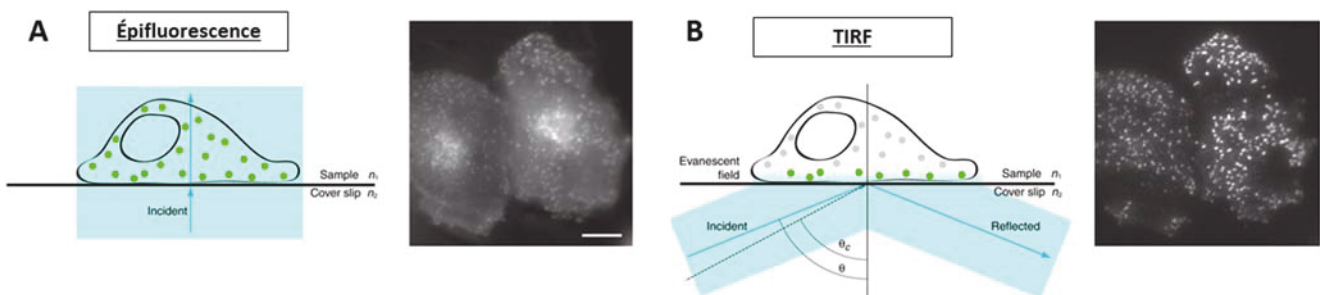


Figure 23 : Principe de la microscopie TIRF, comparaison avec l'épifluorescence. **(A)** Schéma représentant les bases physiques de l'illumination en épifluorescence et un exemple d'image acquise de la clathrine-GFP dans des cellules HeLa où la totalité des fluorochromes est excitée. **(B)** Schéma représentant le principe de la microscopie TIRF : le rayon incident a un angle ϑ supérieur à l'angle critique ϑ_c , il est totalement réfléchi à l'interface verre/échantillon et une onde évanescente est générée et n'excite que les fluorochromes présents entre 70 et 100nm. La même image clathrine-GFP dans des cellules HeLa mais acquise en microscopie TIRF, où ne sont révélés que les détails présents à la membrane des cellules (Mattheyses et al., 2010).

F. Anticorps

Protéine cible	Type d'anticorps et espèce de production	Référence	Concentration d'utilisation en immunofluorescence	Concentration d'utilisation en western blot
Dystrophine	Monoclonal de souris	Clone MANDYS8 D8168 (Sigma)	-	5,40 µg/mL
Syntrophine	Monoclonal de souris	Clone 1351 ab11425 (Abcam)	-	3,3 µg/mL
Syntrophine	Polyclonal de lapin	Clone 1351 ab11425 (Abcam)	-	3,3µg/mL
CASK	Monoclonal de souris	Clone S56A-50 TA326522 (Origene)	-	1,5-5 µg/mL
CASK	Monoclonal de souris	Clone 2G5.1 MABN1547 (Merck Millipore)	-	0,6 µg/mL
CASK	Polyclonal de lapin	Ab3383 (Abcam)	10µg/mL	-
Nav1.5	Polyclonal de lapin	ASC-005 (Alomone)	8 µg/mL	0,8 µg/mL
Kir 2.1	Polyclonal de lapin	APC-026 (Alomone)	6 µg/mL	6 µg/mL
Kir 2.2	Polyclonal de lapin	APC-042 (Alomone)	3,9 µg/mL	3,9 µg/mL
Kir 2.3	Polyclonal de lapin	APC-032 (Alomone)	3 µg/mL	3 µg/mL
Kir 3.1	Polyclonal de lapin	APC-005 (Alomone)	6 µg/mL	6 µg/mL
Kv 4.2	Polyclonal de lapin	APC-023 (Alomone)	8 µg/mL	8 µg/mL
Kv 4.3	Polyclonal de lapin	Ab65794 (AbCam)	1/100 ^{ème}	1/100 ^{ème}
GFP	Polyclonal de lapin	TP401	0,3 µg/mL	2 µg/mL
GAPDH	Monoclonal de lapin	Clone 14C10 2118 (Cell signaling)	-	1/40 000

Tableau 2 : Liste des anticorps utilisés pour les expériences d'immunofluorescence et de western blot.
 Pour certains anticorps, la concentration stock n'est pas renseignée par le fournisseur et seule la concentration d'utilisation est indiquée en rapport.

G. Étude de l'expression des gènes

1. Extraction des ARNs et dosage

Les extractions d'ARN de cellules en culture ont été réalisées avec le PureLink® RNA Mini Kit (Life Technologies) comprenant des étapes de lyse et d'homogénéisation avec du tampon de lyse, fourni dans le kit, supplémenté en 2-Mercaptoethanol (0,1%) et éthanol 70% (volume à volume) suivi d'une

purification sur colonne. L'élution de l'ARN se fait par ajout d'eau RNase-free. Les morceaux de tissus congelés, quant à eux, ont été broyés dans du TRIzol® (Life Technologies), auquel est ajouté du chloroforme (20% du volume de TRIzol, Sigma). Le mélange est ensuite vortexé et centrifugé 10 minutes à 15000g. La phase aqueuse est récupérée et transférée dans un tube contenant de l'isopropanol (500µL, Sigma) pour précipiter les ARNs. 30 minutes après décantation et une centrifugation 20 minutes à 15000g à 4°C, l'isopropanol est ôté et le culot d'ARN est rincé avec de l'éthanol 80%. Après une nouvelle étape de centrifugation, le culot est séché et dissout dans de l'eau RNase-free. Les concentrations d'ARN sont évaluées au Nanodrop (Thermo Scientific).

2. Reverse Transcriptase (RT) et PCR quantitative

La synthèse d'ADN complémentaire à partir d'ARNs totaux est réalisée après ajout en excès de nucléotides (dNTP), d'amorces aléatoires (ou *random primers*, Life Technologies), d'oligo DT (12-18 primer, Life Technologies), et d'eau milliQ, le mélange est chauffé 5 minutes à 65°C puis immédiatement refroidi 1 minute à 4°C. Est ensuite ajouté un mix comprenant du First Strand Buffer 5X ; 0,1M de DTT (Dithiothreitol) et de 200 unités/µL de Superscript III (Life Technologies). L'élongation de brins d'ADNc se fait à 50°C pendant 1 heure puis l'enzyme est inactivée à 70°C durant 15 minutes sur thermocycler SureCycler 8800 (Agilent). L'ADNc est ensuite dilué en fonction des concentrations souhaitées pour réaliser la PCR quantitative. Celle-ci est réalisée dans un volume final de 10µL comprenant par condition : 5 µL de réactif contenant la polymérase (SensiFAST™ SYBR No-ROX, 2X, Bioline) ; 0,8 µL d'un mélange d'amorces spécifiques des gènes d'intérêt sens et antisens à 10 µM chacun (Tableau 2) ; 4 µL d'ADNc et 0,2 µL d'eau ultra pure. Chaque condition est testée en duplicat. Les gènes d'intérêt sont normalisés à l'aide de trois gènes de contrôle interne : RPL32, RPLPO et PolR2a. Les séquences des amorces utilisées sont listées dans le tableau ci-dessous (Eurogentec et Integrated DNA Technologies). Les qPCR ont été réalisées grâce à l'appareil LightCycler® 480 et son logiciel (Roche). Les données ensuite extraites ont été analysées grâce à la méthode des *delta-delta-Ct* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

Protéine	Gène	Séquence amorce sens	Séquence amorce antisens
CASK	<i>cask</i>	CCAGGATCAGCATCTTCAC	TGGCTCTGTACTGCATCG
CASK	<i>cask</i>	GTGAAGCCCCACTGTGTTCT	TTCTGGGGCCATAAAGTGAG
CASK	<i>cask</i>	GTGAAGCCCCACTGTGTTCT	AGGTGTTCCAACACGTCCTC
Na _v 1.5	<i>scn5a</i>	TATGTCCTCAGCCCCTTCC	GAACACGCAGTTGGTCAGG
Syntrophin α1	<i>snta1</i>	GGCATCAGCATCAAGGGA	GGGTGGCAGAGGACAAATC
Syntrophin β1	<i>sntb1</i>	TCGTGAGATCAGGCATCTTG	CTAAGCCAGGCCTCTTTCCT
RPL32	<i>rpl32</i>	CCAGAGGCATCGACAACA	GCACTTCCAGCTCCTTGA
RPLP0	<i>polr2a</i>	CGACCTGGAAGTCCAACACTAC	GTCTGCTCCCACAATGAAG
PolR2a	<i>rplp0</i>	CGTATCCGCATCATGAACAGTGA	TCATCCATCTTATCCACCACCTCTT

Tableau 2 : Liste des séquences des couples d'amorces utilisés pour les expériences de PCR quantitative

H. Électrophysiologie cellulaire

La technique du patch-clamp permet l'enregistrement de courants électriques générés par l'ouverture de canaux ioniques présents à la membrane cellulaire. Ces enregistrements sont rendus possibles grâce à l'accolement d'une micropipette de verre, contenant une solution conductrice, à la membrane d'une cellule vivante. Ce contact très étroit est également appelé le *seal*. Grâce à de légères succions, la résistance caractérisant l'interface verre-cellule est augmentée jusqu'à atteindre une valeur de l'ordre du *gigaseal* (GΩ). Cette valeur reflète alors une grande stabilité entre la micropipette de verre et la membrane de la cellule empêchant ainsi que les ions ne diffusent librement entre la solution de bain et le milieu intrapipette. Dans cette étude, nous avons réalisé nos enregistrements dans la configuration cellule entière ou *whole-cell*. Celle-ci est obtenue par la rupture de la portion de membrane plasmique de la cellule localisée sous la micropipette suite à une succion supplémentaire. Le milieu conducteur présent dans la pipette va alors diffuser à l'intérieur de la cellule, permettant dans ce cas le contrôle du milieu intracellulaire. Ainsi, il est possible de mesurer les propriétés électriques globales de toute la membrane cellulaire.

1. Enregistrement des courants en configuration cellule entière

a. Matériel

Les pipettes sont étirées à partir de capillaires de verre borosilicate (Corning® Kovar, WPI) à l'aide d'une étireuse horizontale (DMZ Universal Puller, Zeitz Instruments). Les réglages de l'étireuse sont tels que la résistance des pipettes est comprise entre 1,2 et 1,5 M Ω . Les cellules sont stimulées électriquement grâce à un amplificateur (Axopatch 200B, Molecular Devices). Les courants sont alors enregistrés et analysés *via* le programme d'acquisition Elphy 2.0 (G. Sadoc, CNRS).

b. Enregistrement des courants

Les courbes courant-potentiel sont la représentation des courants (I) obtenus lors de variations de potentiel (E_m). Les courbes courant-potentiel et courbes d'activation sont réalisées en stimulant les cellules par des échelons depuis un potentiel de maintien. Le courant obtenu pour chaque potentiel (pA) est rapporté à la capacitance membranaire (pF) reflète de la taille des cellules. La densité du courant (pA/pF) ainsi calculée reflète le nombre de canaux fonctionnels par unité de surface membranaire. La courbe d'activation peut être tracée en représentant la conductance g ($g=I/(E_m-E_{rev})$). La courbe d'inactivation est réalisée en appliquant une première stimulation (échelons dépolarisants) suivie d'une seconde stimulation (potentiel constant). Ce protocole permet de rendre compte du nombre de canaux activables par rapport au nombre de canaux inactivés pour chaque potentiel. Les courbes d'activation et d'inactivation sont ajustées par la fonction de Boltzmann.

Protocole d'enregistrement des courants potassiques

Les courbes courant-potentiel et courbes d'activation sont réalisées en stimulant les cellules par des échelons dépolarisants (en incréments de 10 mV) d'une durée de 750 ms allant de -130 mV à +60 mV depuis un potentiel de maintien de -80 mV.

Protocoles d'enregistrement des courants calciques

Les courbes courant-potentiel et courbes d'activation sont réalisées en stimulant les cellules par un pré-pulse à -50 mV pendant 100 ms (afin d'inactiver le courant sodique) puis en appliquant des échelons dépolarisants (en incrémentant de 5 ou 10 mV) d'une durée de 400 ms allant de -80 mV à +70 mV depuis un potentiel de maintien de -80 mV.

Protocoles d'enregistrement des courants sodiques

Les courbes courant-potentiel et courbes d'activation sont réalisées en stimulant les cellules par des échelons dépolarisants (5 ou 10 mV) d'une durée de 50 ms allant de -120 mV à +60 mV depuis un potentiel de maintien de -80 mV.

La courbe d'inactivation est réalisée en appliquant un pré-pulse (par échelons dépolarisants de 5 ou 10 mV), d'une durée d'une seconde, allant de -140 mV à -0 mV suivi d'un test pulse à -20 mV d'une durée de 50 ms.

2. Solutions d'enregistrement

Avant tout enregistrement, les cellules sont placées dans une solution de Tyrode (en mM : 135 NaCl ; 4 KCl ; 2 MgCl₂ ; 2,5 sodium pyruvate ; 1 NaH₂PO₄ ; 20 glucose ; 10 HEPES ; pH=7,4 avec du NaOH) supplémenté de 2 mM de CaCl₂ et 1 µM de ryanodine afin d'empêcher la contraction des cellules cardiaques.

Pour les courants potassiques

La solution de Tyrode est supplémentée de 2 mM de Chlorure de Manganèse (MnCl²⁺) pour bloquer le courant calcique I_{CaL} . La solution intrapipette contient en mM : 10 KCl ; 3 MgCl₂ ; 10 HEPES ; 5 EGTA ; 10 Glucose ; 5 MgATP ; 115 K-Aspartate ; pH 7,2 ajusté avec une solution de KOH.

Pour les courants sodiques

Le milieu de perfusion permettant l'enregistrement des courants sodiques est composé en mM : 25 NaCl ; 108,5 CsCl ; 10 HEPES ; 10 Glucose ; 2,5 MgCl₂ ; 2,5 CoCl₂ ; 0,5 CaCl₂ et supplémenté avec 1 µM de Ryanodine et le pH est ajusté à 7,4 avec une solution de CsOH. Le milieu conducteur intrapipette est composé, en mM, de 5 NaCl ; 2 MgCl₂ ; 1 CaCl₂ ; 15 EGTA ; 10 HEPES ; 4 MgATP ; 130 CsCl et le pH est ajusté à 7,2 avec du CsOH.

Pour les courants calciques

Le milieu de perfusion permettant l'enregistrement des courants calciques est composé, en mM, de 140 TEACl ; 5 4-AP ; 10 HEPES ; 10 Glucose ; 1,5 MgCl₂ ; 2 CaCl₂ et supplémenté avec 4 mM de CsCl, 30 µM de TTX (Tetrodotoxine, Interchim) et 1 µM de ryanodine et le pH est ajusté à 7,4 avec une solution de CsOH. Le milieu conducteur intrapipette est composé, en mM, de 140 CsCl ; 2 MgCl₂ ; 15 EGTA ; 10 HEPES ; 3 MgATP ; 10 glucose et le pH est ajusté à 7,2 avec du CsOH.

I. Traitements des données et analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm erreur standard. Les analyses statistiques ont été réalisées avec les logiciels SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc.) et GraphPad Prism6 (GraphPad Inc.) en utilisant les tests de comparaison de variances (ANOVA) ou comparaison de moyennes de deux échantillons (*test T* de Student). Les différences sont considérées comme étant non significatives quand $P > 0,05$ (ns) et significatives quand $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**) et $P < 0,001$ (***)

Résultats

A. Projet 1

Identification de la protéine CASK et son rôle dans la régulation des canaux sodiques $Na_v1.5$ dans les cardiomyocytes

1. Contexte et objectif

Dans le cardiomyocyte, les canaux ioniques ne s'agencent pas de manière anarchique, ils sont au contraire répartis spécifiquement dans des sous compartiments de la membrane plasmique des cellules (Balycheva et al. 2015). Néanmoins, l'organisation précise et complexe des canaux ioniques à l'échelle du myocyte cardiaque n'est à ce jour pas clairement élucidée. Les deux protéines MAGUKs ZO-1 et SAP-97, jusque-là identifiées dans le cœur, sont localisées aux disques intercalaires où elles participent respectivement à la formation des jonctions gap en interagissant avec la Connexine-43 et à l'adressage de canaux ioniques $Na_v1.5$, $K_v1.5$, $K_v4.2$ et $K_v4.3$ (Abi-Char et al. 2008; El-Haou et al. 2009; Palatinus et al. 2011; Petitprez et al. 2011) (Figure 24).

En 2011, des travaux menés sur la SAP-97 ont montré que deux sous populations de canaux sodiques coexistaient au sein de la cellule cardiaque. La première sous population est localisée au niveau de la membrane latérale en association avec le complexe Dystrophine-Glycoprotéines (Gavillet et al. 2006) (Figure 24), tandis que la seconde sous population est située au disque intercalaire et est associée à une protéine MAGUK, la SAP-97 (Petitprez et al. 2011) (Figure 24). De plus, il a été montré que la densité du courant sodique I_{Na} , porté par ces canaux $Na_v1.5$, était plus importante au disque intercalaire qu'à la membrane latérale (Lin et al. 2011). Quelques années plus tard, l'utilisation de la microscopie haute résolution couplée à des enregistrements d'électrophysiologie, a permis d'étudier précisément la répartition des canaux sodiques $Na_v1.5$ dans la membrane latérale. En effet, il a été observé que les canaux $Na_v1.5$ sont présents à la fois dans les crêtes (structures costamériques) où ils s'y agrègent spécifiquement en clusters et dans les tubules-T (Bhargava et al. 2013). Ainsi, les canaux sodiques $Na_v1.5$, peuvent être organisés et régulés différemment selon leur distribution au sein de complexes macromoléculaires distincts situés dans des compartiments membranaires différents.

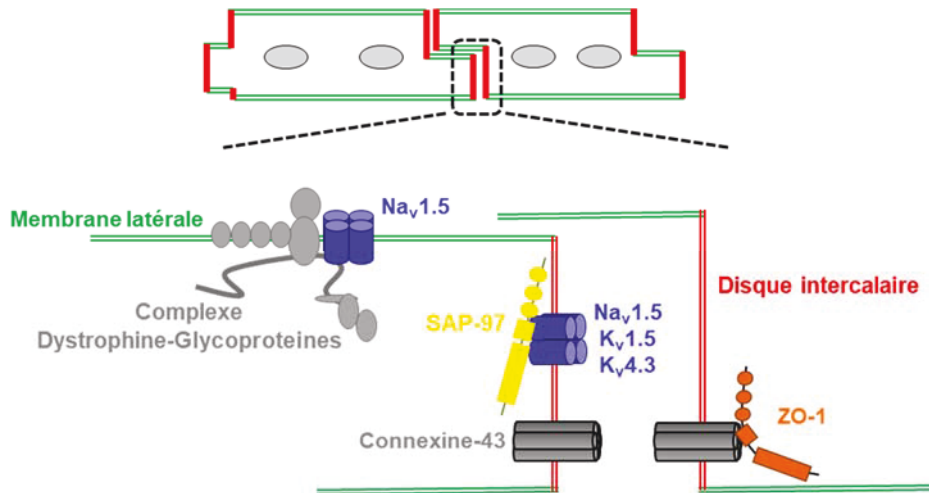


Figure 24 : Organisation des protéines MAGUKs dans le cardiomyocyte.

Représentation schématique de l'agencement des MAGUKs ZO-1 et SAP-97 dans le myocyte cardiaque. Ces deux MAGUKs sont présentes au disque intercalaire et interagissent avec les Connexines-43 (pour ZO-1) et des canaux ioniques sodiques et potassiques (pour SAP-97).

L'ensemble de ces résultats a donc grandement contribué à intégrer un facteur de régulation spatiale spécifique des canaux ioniques et notamment des canaux sodiques $Na_v1.5$ dans le cardiomyocyte. Cette organisation et cette régulation différentielle, en fonction des partenaires, contribuerait ainsi à polariser électriquement le myocyte cardiaque et à plus large échelle de participer à la genèse d'une conduction préférentielle du potentiel d'action selon un axe longitudinal dans le tissu cardiaque.

Néanmoins, les mécanismes régissant le trafic et l'organisation de ces sous populations de canaux dans des domaines spécialisés du cardiomyocyte ne sont aujourd'hui que partiellement identifiés et ouvrent la voie à de nouvelles pistes de recherche. Parmi les acteurs potentiels, on trouve les protéines MAGUKs. Cette première étude révèle ainsi l'existence d'une nouvelle MAGUK cardiaque, la protéine CASK et contribue à la compréhension du devenir de la sous population des canaux $Na_v1.5$ à la membrane latérale.

Lateral Membrane-Specific MAGUK CASK Down-Regulates $\text{Na}_v1.5$ Channel in Cardiac Myocytes

Catherine A. Eichel, Adeline Beuriot, Morgan Y.E. Chevalier, Jean-Sébastien Rougier, Florent Louault, Gilles Dilanian, Julien Amour, Alain Coulombe, Hugues Abriel, Stéphane N. Hatem, Elise Balse

Rationale: Mechanisms underlying membrane protein localization are crucial in the proper function of cardiac myocytes. The main cardiac sodium channel, $\text{Na}_v1.5$, carries the sodium current (I_{Na}) that provides a rapid depolarizing current during the upstroke of the action potential. Although enriched in the intercalated disc, $\text{Na}_v1.5$ is present in different membrane domains in myocytes and interacts with several partners.

Objective: To test the hypothesis that the MAGUK (membrane-associated guanylate kinase) protein CASK (calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase) interacts with and regulates $\text{Na}_v1.5$ in cardiac myocytes.

Methods and Results: Immunostaining experiments showed that CASK localizes at lateral membranes of cardiac myocytes, in association with dystrophin. Whole-cell patch clamp showed that CASK-silencing increases I_{Na} in vitro. In vivo CASK knockdown similarly increased I_{Na} recorded in freshly isolated myocytes. Pull-down experiments revealed that CASK directly interacts with the C-terminus of $\text{Na}_v1.5$. CASK silencing reduces syntrophin expression without affecting $\text{Na}_v1.5$ and dystrophin expression levels. Total Internal Reflection Fluorescence microscopy and biotinylation assays showed that CASK silencing increased the surface expression of $\text{Na}_v1.5$ without changing mRNA levels. Quantification of $\text{Na}_v1.5$ expression at the lateral membrane and intercalated disc revealed that the lateral membrane pool only was increased upon CASK silencing. The protein transport inhibitor brefeldin-A prevented I_{Na} increase in CASK-silenced myocytes. During atrial dilation/remodeling, CASK expression was reduced but its localization remained unchanged.

Conclusion: This study constitutes the first description of an unconventional MAGUK protein, CASK, which directly interacts with $\text{Na}_v1.5$ channel and controls its surface expression at the lateral membrane by regulating ion channel traffickin . (*Circ Res.* 2016;119:544-556. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309254.)

Key Words: calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase ■ cardiac myocytes ■ dystrophin ■ ion channels ■ membrane-associated guanylate kinase ■ sodium channels ■ syntrophin

Cardiac myocytes are highly differentiated striated muscle cells possessing well-organized membrane domains with specialized roles in their electric and mechanical functions. The T-tubule system and intercalated discs (IDs) are the best characterized membrane domains and are crucial for the excitation–contraction coupling process and the propagation of action potentials (APs) from one myocyte to the other. Specialized membrane domains contain distinct populations of ion channels, pumps, exchangers, and receptors such as the voltage-gated L-type calcium channel and gap-junction protein connexin-43, for T-tubules and ID, respectively.¹

The main cardiac $\text{Na}_v1.5$ sodium channel is responsible for the sodium current I_{Na} , which provides a rapid depolarizing current during the upstroke of the AP. Recent studies suggest the presence of distinct populations of $\text{Na}_v1.5$ channel located in different specialized membrane domains of cardiac myocytes, as well as their association with specific partners. At the ID, $\text{Na}_v1.5$ has been shown to be associated with gap junctional (connexin-43),² desmosomal (plakophilin-2),^{3,4} actin cytoskeleton binding (ankyrin-G),^{5,6} and MAGUK (membrane-associated guanylate kinase), SAP97 proteins.^{7,8}

The mechanisms regulating the spatial organization of ion channels are still poorly understood. Targeting and clustering of transmembrane proteins to cell junctions are critical for the

In This Issue, see p 501

Original received June 6, 2016; revision received June 25, 2016; accepted June 30, 2016. In May 2016, the average time from submission to first decision for all original research papers submitted to *Circulation Research* was 14.93 days.

From the Sorbonne Universités, UPMC University Paris 06, Inserm, UMR S 1166, Unité de Recherche sur les Maladies Cardiovasculaires, le Métabolisme et la Nutrition, Faculté de Médecine, Site Pitié-Salpêtrière, France (C.A.E., A.B., F.L., G.D., J.A., A.C., S.N.H., E.B.); Département de Cardiologie, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Pitié-Salpêtrière, France (J.A., S.N.H.); and Department of Clinical Research, University of Bern, Switzerland (M.Y.E.C., J.-S.R., H.A.).

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://circres.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309254/-/DC1>.

Correspondence to Elise Balse, PhD, INSERM UMRS1166, Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière, 91, Blvd de l'Hôpital 75013 Paris, France. E-mail elise.balse@upmc.fr

© 2016 American Heart Association, Inc.

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

DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309254

Nonstandard Abbreviations and Acronyms

Ad	adenovirus
APs	action potentials
BFA	brefeldin-A
CASK	calcium/calmodulin-dependent serine kinase
DIV	day in vitro
ER	endoplasmic reticulum
LM	lateral membrane
MAGUK	membrane-associated guanylate kinase
MHC	myosin heavy chain
TIRFm	Total Internal Reflection Fluorescence microscopy
WT	wild-type

organization of specialized membrane domains in structurally polarized cells such as neurons, epithelial cells, or cardiac myocytes. MAGUK proteins have emerged as key partners participating in this organization.⁹ For instance, in the central nervous system, MAGUK proteins organize synapses through their ability to establish specific macromolecular complexes. In cardiac myocytes, SAP97 is a key regulator of ion channel function and organization,^{7,8,10–13} whereas zonula occludens-1 (ZO-1) organizes the gap-junction protein connexin-43 at the ID.¹⁴ Similar to other MAGUK proteins, CASK (calcium/calmodulin-dependent serine kinase) displays a multidomain structure enabling interaction with multiple proteins including ion channels and receptors, cell-adhesion proteins, and the actin cytoskeleton.⁹ However, among MAGUK proteins, CASK differs because of the possession of an active CaMKII (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II) homolog domain in the N-terminal and a guanylate kinase domain in its C-terminus, which is involved in CASK translocation to the nucleus and subsequent regulation of gene expression.¹⁵ Despite previous works reporting the expression of CASK in the myocardium,^{16,17} its function has not been investigated. Therefore, we investigated the potential role of CASK in the regulation of Na_v1.5 channels in cardiac myocytes.

Here, we present the first detailed characterization of the localization and function of CASK in the heart. CASK was detected specifically in costameric structures of the lateral membrane (LM) of cardiac myocytes, in association with dystrophin. Using a combination of whole-cell patch-clamp, high-resolution 3-dimensional (3D) deconvolution microscopy and biochemistry, we showed that CASK interacts with Na_v1.5 and negatively regulates the corresponding current in cultured adult atrial myocytes. CASK knockdown in vivo revealed that CASK exerted the same regulatory function in freshly isolated ventricular myocytes. Pull-down assays showed that CASK directly interacts with the C-terminus of Na_v1.5. Biotinylation and Total Internal Reflection Fluorescence microscopy (TIRFm) revealed that CASK silencing increased Na_v1.5 expression at the cell surface without changing Na_v1.5 mRNA and protein levels. However, CASK silencing reduced the expression of syntrophin. The I_{Na} increase induced by CASK silencing was completely prevented by the protein transport inhibitor brefeldin-A, suggesting the involvement of CASK in traffickin processes. Finally, we showed that CASK expression is reduced in remodeled/dilated atrial biopsies without changes in localization. These results not only strengthen the concept of differentially regulated pools of Na_v1.5 channels within the cardiac myocyte playing

distinct roles in cardiac physiology but also suggest that CASK could participate in maintaining low levels of Na_v1.5 at the LM and consequently contribute to anisotropic conduction.

Methods

An expanded Methods section is available in the [Online Data Supplement](#).

Cell Preparations, Transfections, and Adenoviral Infections

Adult atrial or ventricular myocytes were obtained by enzymatic dissociation on a Langendorff column as previously described.¹⁸ Adult rat atrial myocytes were infected with adenovirus-scramble short hairpin RNA (Ad-shscr), adenoviral construct containing a short hairpin RNA for CASK (Ad-shCASK), Ad-green fluorescent protein (GFP), or Ad-CASK. Human embryonic kidney 293 (HEK293) cells stably expressing Na_v1.5 were transiently transfected with either shscr or shCASK and plasmid internal ribosome entry site (pIRES)-GFP or pIRES-GFP-CASK.

Cardiac-Specific CASK Knockdown Mouse

Mice were generated by Cre/loxP-mediated gene targeting through homologous recombination. The homozygous floxed CASK^{tm15Sud} mouse was bred with a cardiac myocyte-specific Cre-recombinase mouse, α myosin heavy chain (α MHC)-Cre.

Semiquantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction

Details of specific primers designed to amplify *cas*k, *scn5a*, and housekeeping genes are described in the [Online Data Supplement](#).

Protein Extraction, Western Blot, and Pull-Down Assays

These procedures were performed as previously reported.^{8,18} See [Online Data Supplement](#) for other details.

Deconvolution Microscopy, Evanescent Field Microscopy and Image Analysis

Three-dimensional deconvolution epifluorescence and TIRFm images were acquired as described previously.¹⁸ Analysis was performed using ImageJ software (National Institutes of Health). Details are given in the [Online Data Supplement](#).

Electrophysiological Measurements

Patch-clamp recordings were performed in the whole-cell configuration at room temperature. Detailed solutions and protocols are available in the [Online Data Supplement](#).

Human Samples

In accordance with approval of Institution Ethic Committee, biopsies of right atrial appendages were obtained from patients undergoing cardiac surgery ([Online Data Supplement](#)).

Statistics

Data are represented as mean \pm SEM; * P <0.05, ** P <0.01, and *** P <0.001; ns: not significant

Results**MAGUK CASK Is Expressed at the LM and Excluded From the ID**

We first looked at the expression of CASK in adult myocardium by Western blot. CASK was expressed both in rat atria and ventricle lysates, with a \approx 2-fold larger expression in atria. CASK was also expressed in myocyte- and fibroblast-enriched fractions (Figure 1A and 1B). Second, we examined the localization of CASK in rat atrial and ventricular myocardial cryosections using high-resolution 3D deconvolution microscopy.

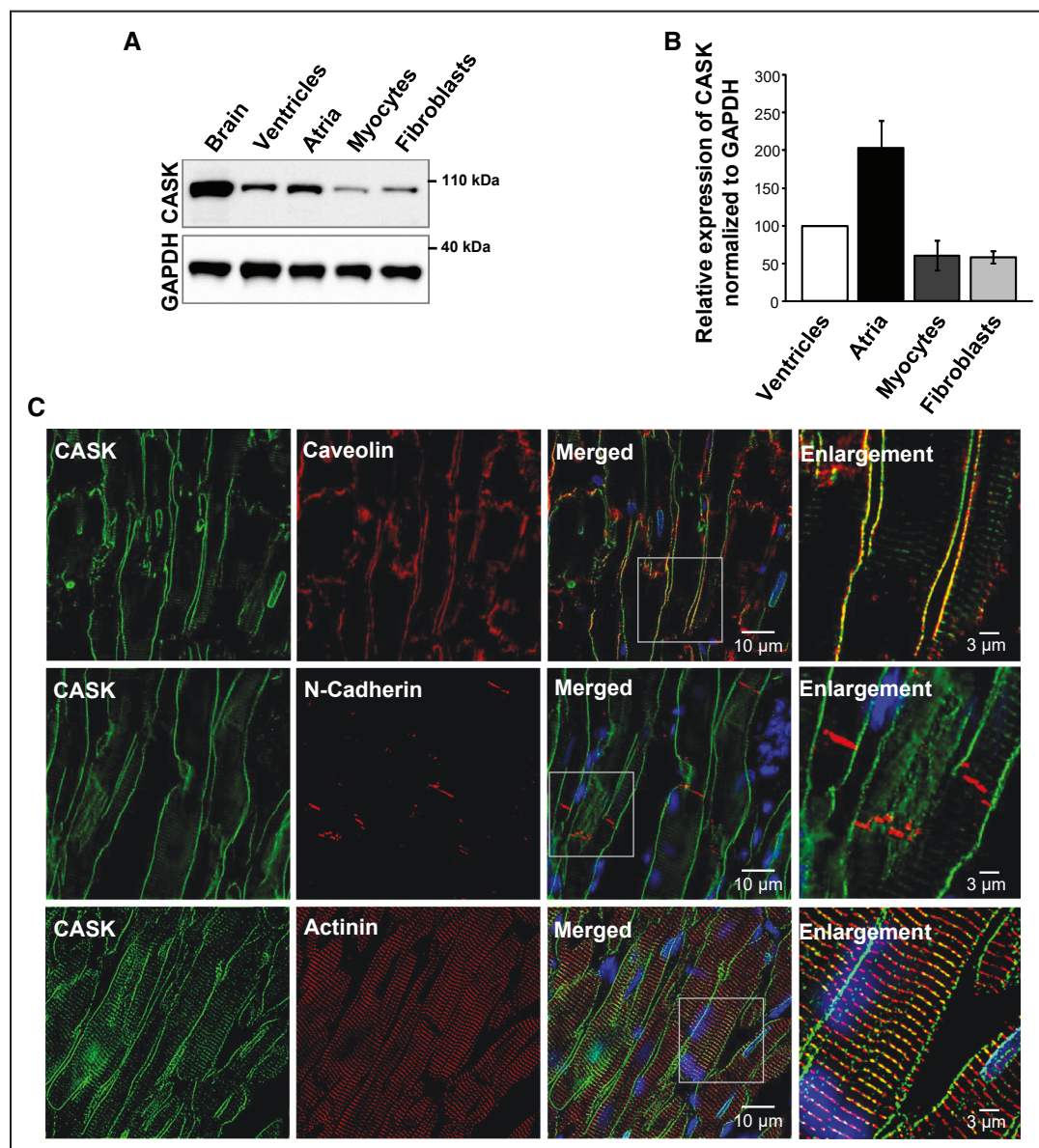


Figure 1. CASK (calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase) is expressed at the lateral membrane of cardiac myocytes and excluded from the intercalated disc. A, Representative Western blot showing the expression of CASK in brain, atria, and ventricle lysates and in myocyte and fibroblast-enriched fractions. GAPDH served as loading control ($n=2$). **B,** Histogram showing the relative ratio of CASK normalized to GAPDH in the different extracts. **C,** High-resolution 3-dimensional deconvolution microscopy images and enlargements of outlined squares (**right**) obtained from ventricular tissue sections stained with CASK and caveolin3 (**top**), N-cadherin (**middle**), and α -actinin (**bottom**).

In ventricle, CASK was expressed along the LM stained with caveolin3 (Figure 1C, top), whereas no signal was detectable at the ID stained with N-cadherin (Figure 1C, middle). CASK also exhibited a striated pattern, facing the sarcomeric α -actinin corresponding to z-line (Figure 1C, bottom), suggesting either a T-tubular or a costameric localization. The distribution of CASK about the different compartments of cardiac myocytes was similar in the atrial myocardium (Online Figure I).

CASK Is a New Member of the Dystrophin–Glycoprotein Complex at the LM of Cardiac Myocytes

In freshly isolated myocytes, CASK staining was apparent along the LM and exhibited the z-line superposition reported above.

To investigate whether CASK was located at the T-tubule, co-immunofluorescence experiments were conducted with $Ca_v1.2$ or ryanodine receptor 2 (RyR2). However, little colocalization was observed in myocytes (Online Figure IIA). In addition, after detubulation by formamide treatment, the striated pattern was still observed in live ventricular myocytes stained with the voltage-sensitive dye Di-8-ANEPS (di-8-aminonaphthylethylpyridinium; Online Figure IIB).

Next, the association of CASK with either vinculin or dystrophin costameric complexes was investigated in freshly isolated adult atrial myocytes (Figure 2A and 2B). CASK more closely associated with dystrophin ($R=0.68$) than with vinculin ($R=0.31$; Figure 2A). In contrast with vinculin, which is organized in

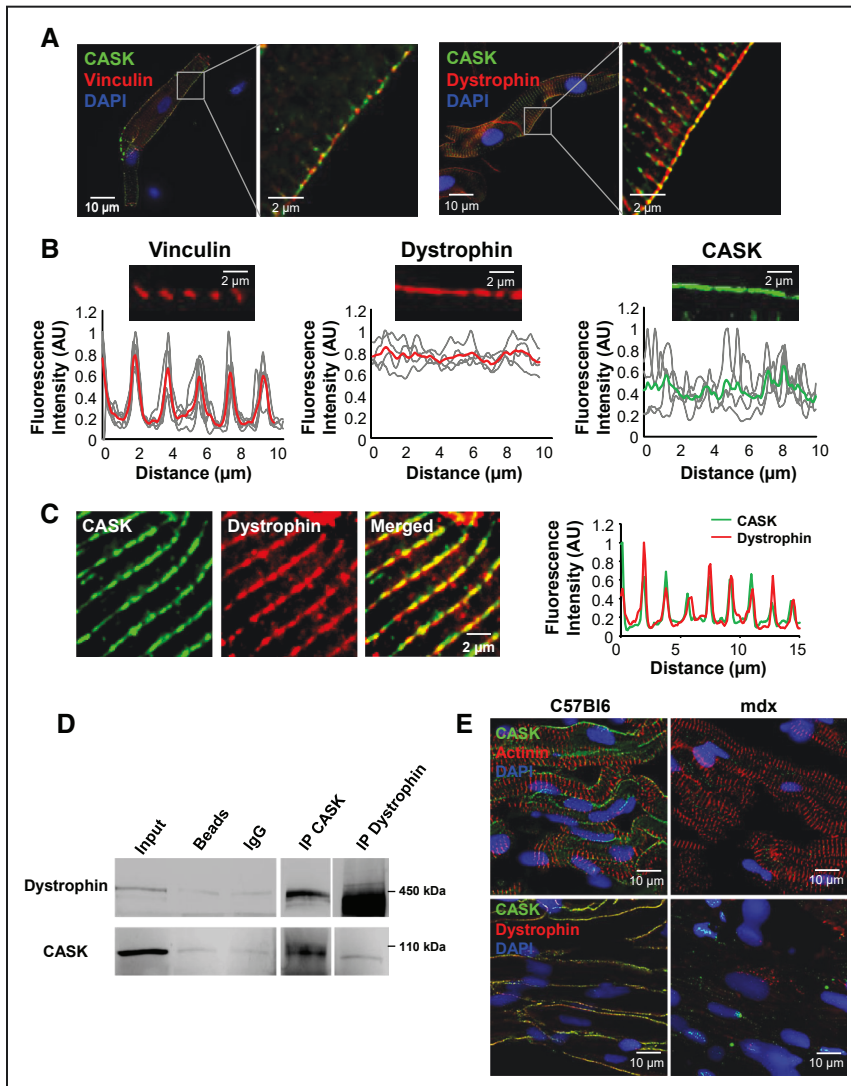


Figure 2. CASK (calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase) is a new member of the dystrophin-glycoprotein complex. **A**, High-resolution 3-dimensional deconvolution microscopy images of CASK with vinculin and dystrophin in freshly isolated ventricular myocytes and enlargement of outlined squares (**right**). **B**, Intensity plots for vinculin ($n=6$), dystrophin ($n=4$), and CASK ($n=6$) drawn from 10- μm lines along the lateral membrane. **C**, Coimmunostaining images of CASK and dystrophin taken in the midsection of cardiac myocytes and corresponding intensity plots drawn from 15- μm lines ($n=3$). **D**, Representative coimmunoprecipitation assays performed on whole-heart lysates ($n=4$). **E**, Coimmunostaining images of CASK and α -actinin (**top**) or dystrophin (**bottom**) in control (C57Bl6) and mdx mouse ventricular cryosections ($n=6$).

rib-like structures at the sarcolemma, CASK showed a continuous layering of the sarcolemma, similar to dystrophin (Figure 2B). In addition, CASK and dystrophin displayed a regular interval alignment of $\approx 2 \mu\text{m}$, the interval between 2 z-lines, in the midsection of cardiac myocytes (Figure 2C). The association between CASK and dystrophin was further supported by coimmunoprecipitation experiments performed on whole-heart lysates (Figure 2D). Finally, immunostainings performed on dystrophin-deficient mdx mouse ventricular cryosections showed a loss of CASK staining, suggesting that CASK expression at the LM of cardiac myocytes depends on dystrophin expression (Figure 2E). Note that the striated distribution of CASK was not observed in mouse myocardium, suggesting distinct costameric organization between species.

Altogether, these results indicate that CASK is poorly expressed at the T-tubule under normal conditions and is a new member of the dystrophin-glycoprotein complex.

CASK Directly Interacts With Na_v1.5

Because Na_v1.5 associates with the dystrophin-glycoprotein complex at the LM,¹⁹ we explored the interaction of CASK with Na_v1.5. In freshly isolated atrial myocytes, CASK and

Na_v1.5 exhibited both a sarcolemmal and striated expression and partially overlapped ($R=0.31$; Figure 3A and 3B). This partial overlap is likely because of high expression of Na_v1.5 channels at the ID where CASK is not present. Periodic intervals between 2 striations calculated using Fast Fourier Transform revealed a coherent distance of $\approx 2 \mu\text{m}$ (Figure 3A). Of note, in this selected focal plane, the ID was not visible. The interaction between CASK and Na_v1.5 in the rat myocardium was supported by coimmunoprecipitation experiments (Figure 3C).

To investigate whether CASK could specifically interact with Na_v1.5, pull-down experiments were performed using the wild-type (WT) Na_v1.5 C-terminus (Ct) or deleted for the PDZ-binding motif corresponding to the 3 last SIV residues (ΔSIV ; Figure 3D). Western blot experiments performed using anti-CASK and anti pan-syntrophin antibody revealed that the Na_v1.5 WT Ct precipitated the 2 proteins from rat ventricle lysates. This interaction was dependent on the SIV motif of Na_v1.5 since interactions with CASK and syntrophin were, respectively, reduced by 94% and 61% with the truncated construct (Figure 3E). Finally, direct interaction between CASK and the Na_v1.5 Ct was investigated by performing pull-down

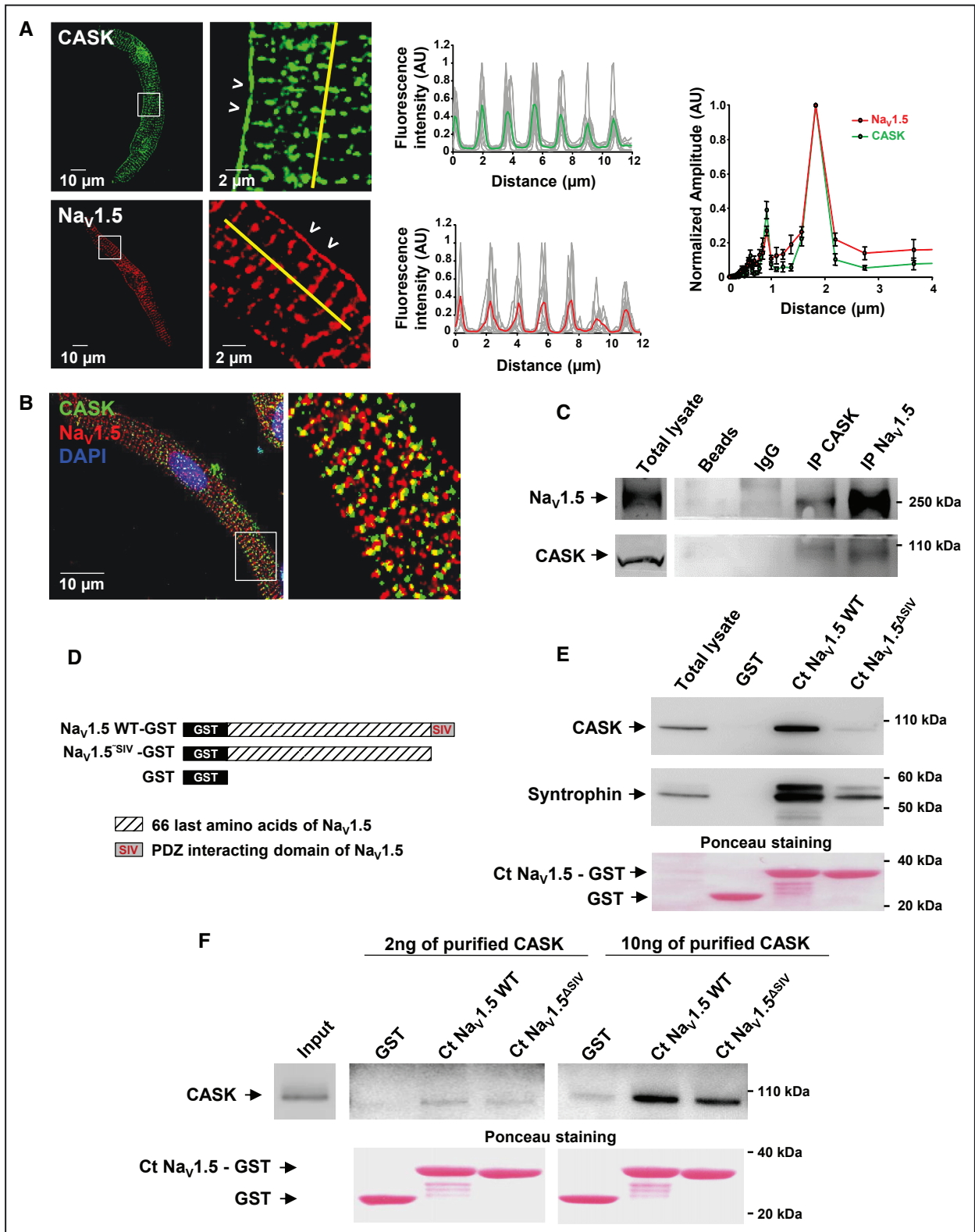


Figure 3. CASK (calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase) is associated with and interacts with Na_v1.5 channels. **A**, High-resolution 3-dimensional deconvolution microscopy images of CASK (top) and Na_v1.5 (bottom) taken from freshly isolated atrial myocytes and enlargement of outlined squares. Intensity plots for CASK and Na_v1.5 drawn from 12-μm lines in the midsection of the cell and interval distribution (middle; n=8). **B**, Coimmunostaining of CASK and Na_v1.5 performed with another pair of antibodies and enlargement of outlined square. **C**, Representative coimmunoprecipitation assay of CASK and Na_v1.5 performed on whole-heart lysates (n=4). **D**, Scheme of GST fusion proteins used to perform pull-down experiments. The 66 last amino acids (Ct) of wild-type (WT) Na_v1.5 or deleted for the PDZ-interacting motif (SIV) were compared with GST alone. **E** and **F**, Representative Western blots after GST pull-downs performed with cardiac myocyte-enriched lysates (**E**, n=3) or purified protein CASK (**F**, n=3). CASK and syntrophin both interact with Na_v1.5 C-terminus, and a part of this interaction is mediated by the SIV motif. Ponceau stainings served as loading controls.

experiments with the purified CASK protein (Figure 3F). At 10 ng of purified CASK protein, the interaction was reduced by 21% but not abolished in ΔSIV .

These results support that CASK interacts directly with $\text{Na}_v1.5$ Ct, regardless of the presence of syntrophin, and that other residues than SIV are likely involved in this interaction.

CASK Regulates the Sodium Current In Vitro

To assess the functional consequence of the interaction between CASK and $\text{Na}_v1.5$, I_{Na} was recorded in adult atrial myocytes using whole-cell patch-clamp after modulating the expression of CASK. Representative images of adenoviral infection efficiency in cultured rat atrial myocytes are presented Online Figure IIIA. CASK was overexpressed using an adenoviral construct containing the GFP reporter (Ad-CASK) and compared with GFP alone (Ad-GFP). CASK mRNA was increased by 120% and protein level by 200% in Ad-CASK after 3 days in vitro (DIV; Online Figure IIIB through IIID). Average current–voltage (I – V) plots from voltage-clamp experiments showed a significant decrease in I_{Na} density at different tested voltages in Ad-CASK (Figure 4A through 4C). CASK overexpression shifted the steady-state inactivation curve leftward by ≈ 8 mV ($P < 0.001$; Figure 4E), whereas no difference was found for activation properties between Ad-CASK– and Ad-GFP–infected cells (Figure 4D). Next, we used adenoviral transfer technology to knockdown CASK in adult rat atrial myocytes. Silencing experiments were performed using GFP Ad-shCASK and compared with Ad-shscr. CASK mRNA was decreased by 60% and protein level by 40% in Ad-shCASK at 5 DIV (Online Figure IIIB through IIID). Voltage-clamp experiments showed a significant increase in I_{Na} at several tested voltages in Ad-shCASK (Figure 4B through 4F). No difference was found for activation properties between Ad-shCASK and Ad-shscr cells, whereas steady-state inactivation was ≈ 8 mV more positive in Ad-shCASK cells ($P < 0.05$; Figure 4G and 4H). It is worth noting that the CASK-dependent shift in steady-state inactivation cannot explain the 2-fold change in I_{Na} density. These experiments clearly demonstrate that CASK exerted a repressive function on I_{Na} .

Regulatory Function of CASK on I_{Na} Is Conserved In Vitro From Polarized Cardiac Myocytes to Nonpolarized HEK293 Cells

As CASK expression was restricted to the LM of cardiac myocytes, we investigated whether the regulatory function of I_{Na} by CASK could be dependent on the loss of structural polarity and dedifferentiation under culture conditions.

We followed the distribution of CASK in cardiac myocytes in vitro in accordance with the distribution of the adherens junction protein N-cadherin. Immediately after dissociation, CASK was absent from the ID where N-cadherin was confined. At DIV1, N-cadherin started to be internalized and at DIV2, was randomly distributed in the cytoplasm. At the same stage, CASK was located at the cell membrane. After 1 week in culture (DIV7), cardiac myocytes had re-established contacts (ID-like structures) in which N-cadherin was located and CASK excluded (Online Figure IV). Therefore, CASK localization seemed related to the architecture/polarity of cardiac myocytes.

Thus, to investigate whether the regulation of I_{Na} by CASK could be polarity dependent, we induced the formation of adherens junctions in vitro. Adult atrial myocytes infected with Ad-shscr or Ad-shCASK were seeded on Fc fragment plus N-cadherin (N-cadh) or Fc fragment alone, used as a control (Fc; Online Figure VA). Atrial myocytes seeded on N-cadh showed both increased spreading and increased N-cadherin staining as shown by TIRFm (Online Figure VA). Average I – V plots from voltage-clamp experiments showed a significant increase in I_{Na} density at several tested voltages in the 2 coating conditions (Fc and N-cadh) in Ad-shCASK–infected myocytes (Online Figure VB). No difference was found between Ad-shCASK myocytes cultured on N-cadh or Fc for activation properties, whereas the steady-state inactivation curve was significantly shifted rightward in Ad-shCASK myocytes in the 2 coating conditions (≈ 12 and 10 mV, respectively, $P < 0.05$; Online Figure VC and VD).

Next, I_{Na} was recorded in the nonpolarized HEK293 cell line stably expressing cardiac $\text{Na}_v1.5$ α subunits (HEK293- $\text{Na}_v1.5$; Online Figure VIA). We first overexpressed CASK using a GFP plasmid construct (CASK), and control HEK293- $\text{Na}_v1.5$ were transfected with GFP alone (GFP). CASK expression was 2-fold increased in CASK at 3DIV (Online Figure VIB and VIC). Average I – V plots from voltage-clamp experiments showed a significant decrease in I_{Na} density in CASK compared with control cells (Online Figure VID). CASK overexpression shifted the steady-state inactivation curve by ≈ 6 mV ($P < 0.05$; Online Figure VIE), whereas activation properties were unchanged (Online Figure VIE and VIF). We next used CASK sh-RNA plasmid with the red fluorescent protein (RFP) reporter (shCASK) to transfect HEK293- $\text{Na}_v1.5$; scramble short hairpin RNA with RFP was used as control (shscr). CASK protein level was decreased by 45% in shCASK at 5 DIV (Online Figure VIB and VIC). Voltage-clamp experiments showed a significant increase in I_{Na} density at several tested voltages in shCASK-transfected cells (Online Figure VIG). Steady-state inactivation was ≈ 6 mV more positive in shCASK cells ($P < 0.01$), whereas no difference was found for activation properties between groups (Online Figure VIH and VII).

These results confirmed that CASK is excluded from ID structures and established that the negative regulatory function of CASK is a conserved mechanism.

Regulatory Function of CASK Is Conserved in Myocytes From CASK Knockdown Mouse

To assess the functional regulation of sodium channels by CASK in vivo, I_{Na} was recorded in freshly isolated ventricular myocytes from $\alpha\text{MHC-Cre/CASK}$ and $\alpha\text{MHC-Cre/WT}$ mice. The homozygous floxed $\text{CASK}^{\text{tm1Sud}}$ mouse was bred with an α -myosin heavy chain (αMHC)-Cre mouse to target cardiac myocytes. Recombination with $\alpha\text{MHC-Cre}$ leads to 68% CASK knockdown in cardiac myocytes ($P < 0.01$; $n = 3$; Figure 5A). The incomplete extinction of CASK is likely because of contamination by nonmyocyte cells. Average I – V plots from voltage-clamp experiments showed a significant increase in I_{Na} density at several tested voltages in CASK knockdown compared with WT Cre myocytes (Figure 5B and 5C). No significant differences were found for activation properties

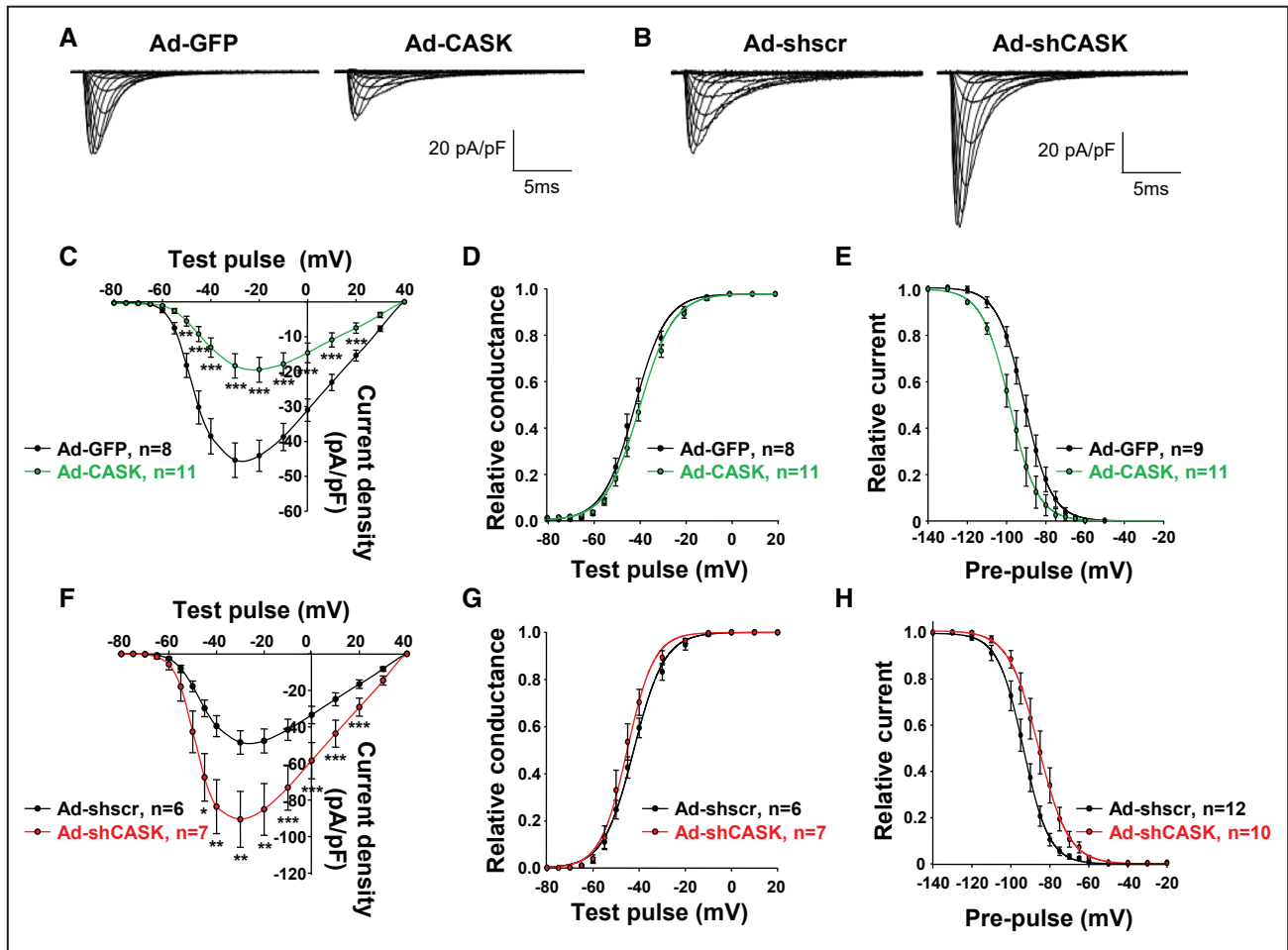


Figure 4. CASK (calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase) regulates the cardiac sodium current I_{Na} in cultured adult atrial myocytes. **A**, Family traces of whole-cell I_{Na} recorded in cardiac myocytes infected with Ad-GFP or Ad-CASK adenoviruses. **B**, Family traces of whole-cell I_{Na} recorded in cardiac myocytes infected with Ad-scramble short hairpin RNA (Ad-shscr) or Ad-short hairpin RNA for CASK (Ad-shCASK). **C**, Current density–voltage relationships (25 mmol/L $[Na^+]_o$) of I_{Na} obtained from Ad-GFP (black)– and Ad-CASK (green)–infected myocytes. **D** and **E**, Voltage-dependent activation and steady-state inactivation curves from Ad-GFP and Ad-CASK atrial myocytes (N=3). **F**, Current density–voltage relationships (25 mmol/L $[Na^+]_o$) of I_{Na} obtained from Ad-shscr (black)– and Ad-shCASK (red)–infected myocytes. **G** and **H**, Activation and steady-state inactivation curves from Ad-shscr– and Ad-shCASK–infected myocytes (N=3). * $P<0.05$, ** $P<0.01$, and *** $P<0.001$.

and steady-state inactivation between CASK knockdown and WT Cre mouse myocytes (Figure 5D and 5E).

The results obtained in CASK knockdown ventricular myocytes together with the results obtained in HEK293- $Na_v1.5$ and cultured atrial myocytes support that CASK-induced effect is not dependent on the experimental model used or on atrial versus ventricular myocytes.

CASK Affects Trafficking of $Na_v1.5$

Because I_{Na} was regulated by CASK expression level, we dissected out the mechanisms of $Na_v1.5$ regulation.

Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction experiments were performed to investigate whether CASK influenced the expression level of *scn5a*. However, the copy number of *scn5a* was not different between controls and CASK-overexpressing or CASK-silenced myocytes (Figure 6A). Western blots performed from lysates of Ad-shscr– and Ad-shCASK–infected atrial myocytes revealed that $Na_v1.5$ protein expression was not modified by CASK silencing.

Interestingly, CASK silencing impacted syntrophin level, reducing its expression by 34% ($P<0.001$), whereas dystrophin levels remained unchanged (Online Figure VII). Biotinylation experiments were performed to assess $Na_v1.5$ surface expression. In Ad-shCASK myocytes, $Na_v1.5$ expression was reduced by $\approx 20\%$ in the total fraction whereas increased by $\approx 45\%$ in the membrane fraction ($P<0.05$; Figure 6B). TIRFm experiments also demonstrated a $\approx 20\%$ increase in surface staining of $Na_v1.5$ in Ad-shCASK myocytes ($P<0.001$; Figure 6C). These results showed that the increase in I_{Na} on CASK silencing was neither transcriptional nor translational and rather because of increased surface expression of $Na_v1.5$. Therefore, a likely explanation was that CASK regulates anterograde trafficking and/or stabilization at the sarcolemma.

As the canonical early step in ion channel trafficking is the transport from the endoplasmic reticulum (ER) to the Golgi apparatus, the hypothesis of an increased forward trafficking was tested in silencing conditions. Twelve hour post infection with Ad-shscr or Ad-shCASK, cardiac myocytes were treated

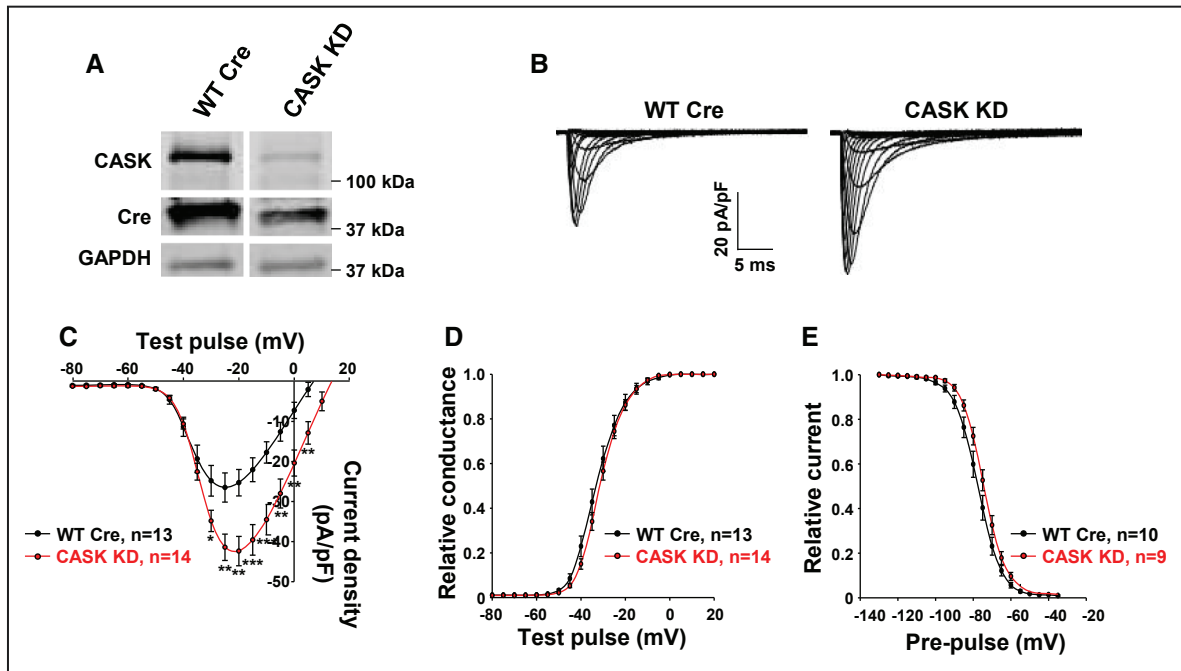


Figure 5. The cardiac sodium current I_{Na} is upregulated by CASK (calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase) knockdown (KD) in mouse ventricular myocytes. **A**, Representative Western blot showing the reduction of CASK expression in heart lysate from CASK knockout (KD) mice ($n=3$). **B**, Family traces of whole-cell I_{Na} recorded in freshly isolated ventricular myocytes from wild-type (WT) Cre or CASK KD mice. **C**, Current density–voltage relationships (5 mmol/L $[Na^+]_o$) of I_{Na} obtained from WT Cre (black) and CASK KD (red) freshly isolated ventricular myocytes. **D** and **E**, Voltage-dependent activation and steady-state inactivation curves from WT Cre and CASK KD freshly isolated cardiac myocytes ($N=3$). * $P<0.05$, ** $P<0.01$, and *** $P<0.001$.

for 48 hours with brefeldin-A (BFA) before electrophysiological recordings. Voltage-clamp experiments showed that I_{Na} density was not increased in Ad-shCASK–infected cells after BFA treatment (Figure 6D). TIRFm experiments also showed a reduced Na_v1.5 surface staining in Ad-shCASK myocytes treated with BFA (Figure 6E). In addition, biotinylation experiments performed on HEK293–Na_v1.5 cells showed that the increase in Na_v1.5 surface expression was reduced after BFA treatment in shCASK cells (Figure 6F).

Therefore, these results indicate that alterations in trafficking processes are involved in the effect of CASK in the regulation of I_{Na} .

CASK Silencing Modulates the Expression of Na_v1.5 Channels at the LM

To understand further the mechanisms of Na_v1.5 regulation by CASK, we investigated whether CASK silencing affected a specific Na_v1.5 channel population.

Ad-shscr– or Ad-shCASK–infected atrial myocytes were cultured at half confluence, a situation that allows formation of cell contacts (ID-like structures) between some myocytes and the preservation of free membranes (LM-like structures; Figure 7A). Immunostainings of Na_v1.5 channels were performed and quantified by drawing lines in contact zones versus free membranes. As shown Figure 7B, the Na_v1.5 signal was increased by $\approx 21\%$ at LM ($P<0.01$) and by $\approx 10\%$ at ID (not significant) in CASK-silenced myocytes (Figure 7B). These results support that the LM membrane pool of Na_v1.5 channels is more susceptible to CASK modulation. In addition, it supports the concept that different Na_v1.5 pools coexist in cardiac myocytes.

CASK Expression Is Downregulated in Remodeled Atria, Whereas Its Localization Is Unchanged

Given the specific targeting of CASK to the costamere, we examined whether the expression and localization of the protein could be altered during conditions characterized by the remodeling of myocardial structure and of myocyte architecture such as dilated atria.^{18,20,21}

In control human atrial tissue samples, CASK was expressed at the LM and excluded from ID as in rat (Figure 8A). In patients with dilated atria, CASK remained localized at the costamere whereas its expression level was reduced as evidenced by fainter fluorescence intensity ($P<0.001$; Figure 8B) and a by $\approx 42\%$ decrease in total protein expression ($P<0.01$; Figure 8C). Chronically hemodynamic atrial overload associated with the development of ischemic heart failure in rat is also characterized by profound ultrastructural alterations of atrial myocytes.^{18,20} In this model too, CASK protein expression was decreased, whereas its localization in membrane subdomains remained unchanged (Online Figure VIII). These results indicate that CASK expression is downregulated during atrial remodeling.

Discussion

This study is the first characterization of CASK in cardiac myocytes. We found that CASK is the sole cardiac MAGUK protein identified to date excluded from the ID and strictly located at LM, where it associated with dystrophin. We showed that CASK directly interacts with Na_v1.5 C-terminus and downregulates the sodium current. CASK silencing decreases dystrophin protein levels without impacting Na_v1.5 or dystrophin

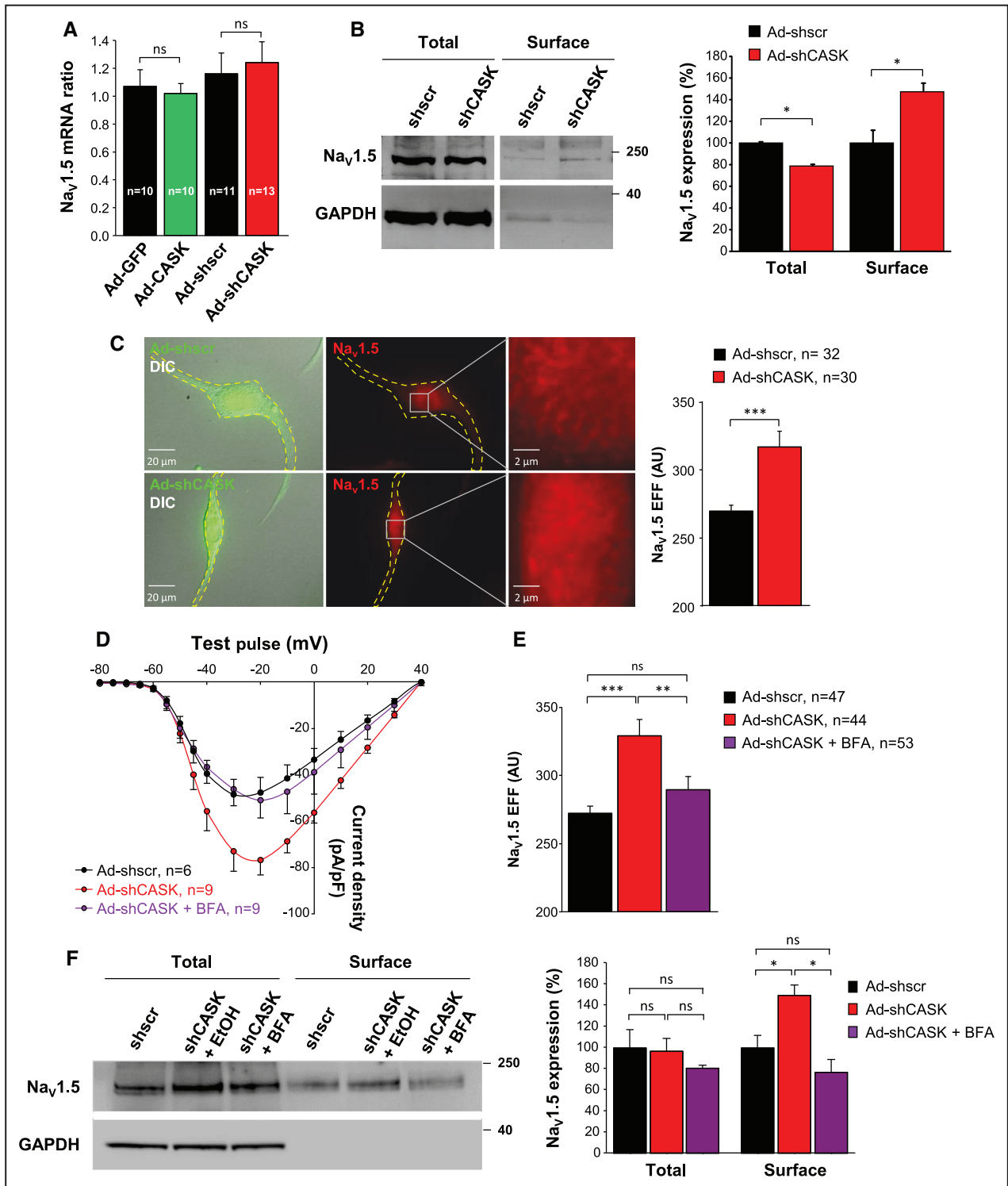


Figure 6. CASK (calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase) regulates early anterograde trafficking of $Na_v1.5$ channels. **A**, RT-qPCR histogram of CASK mRNA expression levels in myocytes infected with Ad-GFP (black), Ad-CASK (green), Ad-scramble short hairpin RNA (shscr; black), or Ad-short hairpin RNA for CASK (shCASK; red; N=4). **B**, Representative biotinylation assay performed in Ad-shscr- and Ad-shCASK-infected atrial myocytes and corresponding histogram showing the expression level of $Na_v1.5$ normalized to GAPDH in total and surface fractions (n=3). **C**, Example Total Internal Reflection Fluorescence microscopy (TIRFM) images taken from fixed Ad-shscr (black) and Ad-shCASK (red) atrial myocytes and corresponding histogram of $Na_v1.5$ evanescent field fluorescence (EFF) intensity (arbitrary units [AU]). **D**, Current density–voltage relationships (25 mmol/L $[Na^+]_o$) of I_{Na} obtained from adult atrial myocytes infected with Ad-shscr (black) or Ad-shCASK treated with brefeldin-A (BFA; purple) or nontreated (red; N=3). **E**, Histogram of $Na_v1.5$ EFF intensity from TIRFM images taken from fixed atrial myocytes infected with Ad-shscr (black) and Ad-shCASK treated with BFA (purple) and nontreated (red; N=3). **F**, Representative biotinylation assay performed in shscr and shCASK transfected HEK- $Na_v1.5$ cells and corresponding histogram showing the expression level of $Na_v1.5$ normalized to GAPDH in total and surface fractions (n=3). * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001, ns, not significant.

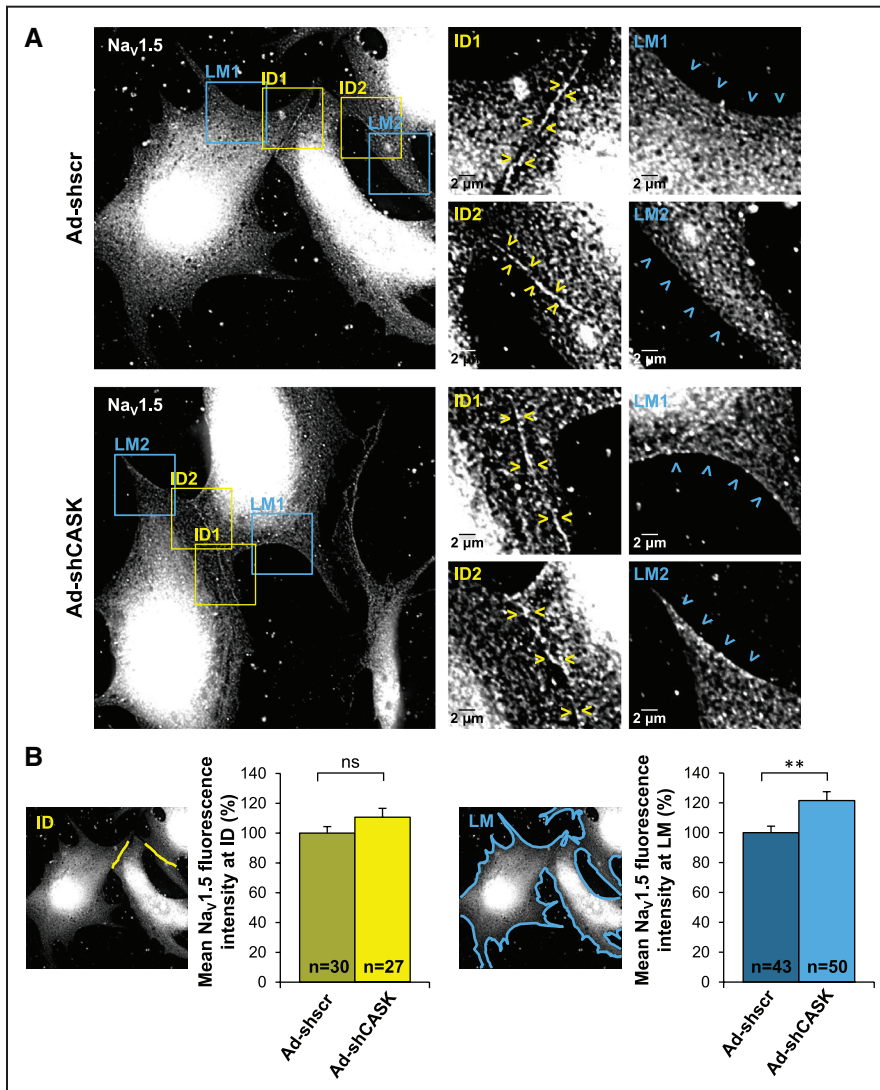


Figure 7. CASK (calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase) silencing increases Na_v1.5 channels expression at the lateral membrane (LM). **A**, High-resolution 3-dimensional deconvolution microscopy images of Na_v1.5 in cultured atrial myocytes infected with either scramble short hairpin RNA (Ad-shscr) or Ad-short hairpin RNA for CASK (Ad-shCASK) adenoviruses and enlargement of outlined squares. Arrowheads point cell contacts (intercalated disc [ID]-like structures, yellow) or free membranes (LM-like structures, blue). **B**, Histograms of the mean fluorescence intensity of Na_v1.5 signal obtained from lines drawn along the ID (yellow) or the LM (blue) as shown in the example images (left of the histograms).

expression levels. We demonstrated that CASK modulates the early trafficking of Na_v1.5 and prevents its functional expression at the cell surface and more specifically at the LM. Finally, we showed that CASK expression is reduced during atrial remodeling but its localization remained unchanged.

Unique Localization of CASK in Cardiac Myocytes

The 2 already known cardiac MAGUK proteins, SAP97 and ZO-1, are both preferentially expressed at the ID, a membrane domain specialized in the rapid propagation of APs along cardiac fibers. IDs, located at the ends of cardiac myocytes, are the sites of intense electric activity and concentrate numbers of ion channels, notably the main cardiac sodium channel, Na_v1.5. It has been proposed that this organization facilitates longitudinal propagation of the AP over transverse propagation and determines conduction velocity.²²

Na_v1.5 channels located at the ID are associated with different partners such as connexin-43,² plakophilin-2,^{3,4} ankyrin-G,^{5,6} and SAP97.^{7,8} All of these partners participate in anchoring/stabilization of Na_v1.5 at the ID. In accordance, the sodium current recorded by macropatch in the midsection of cardiac myocytes (LM) is of smaller amplitude than the

current recorded at the ID.^{23–25} At the LM, Na_v1.5 has been shown to interact with the dystrophin/syntrophin complex.¹⁹ In the dystrophin-deficient mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy, the LM pool of Na_v1.5 is strongly reduced and I_{Na} is decreased by $\approx 30\%$.^{8,19} In agreement, transverse conduction velocity is more reduced than longitudinal conduction velocity in Δ SIV mouse hearts.²⁵ From these observations, a scheme can be drawn on the relative contribution of the populations of Na_v1.5 in the propagation of the AP: the ID pool having a higher weight than the LM pool. Our results indicate that CASK could participate in the maintenance of low level of functional Na_v1.5 at the LM.

CASK, a New Member of the Dystrophin–Glycoprotein/Na_v1.5 Macromolecular Complex

Scanning ion conductance microscopy identified 3 topographical entities in the LM: T-tubules, crests, and z grooves, the latter corresponding to T-tubule openings.²⁶ Like T-tubules, crests show a periodicity of $\approx 2 \mu\text{m}$.²⁷ Here, we focused on the LM distribution of CASK into microdomains using high-resolution 3D deconvolution microscopy. We showed that CASK was in closer association with dystrophin than with

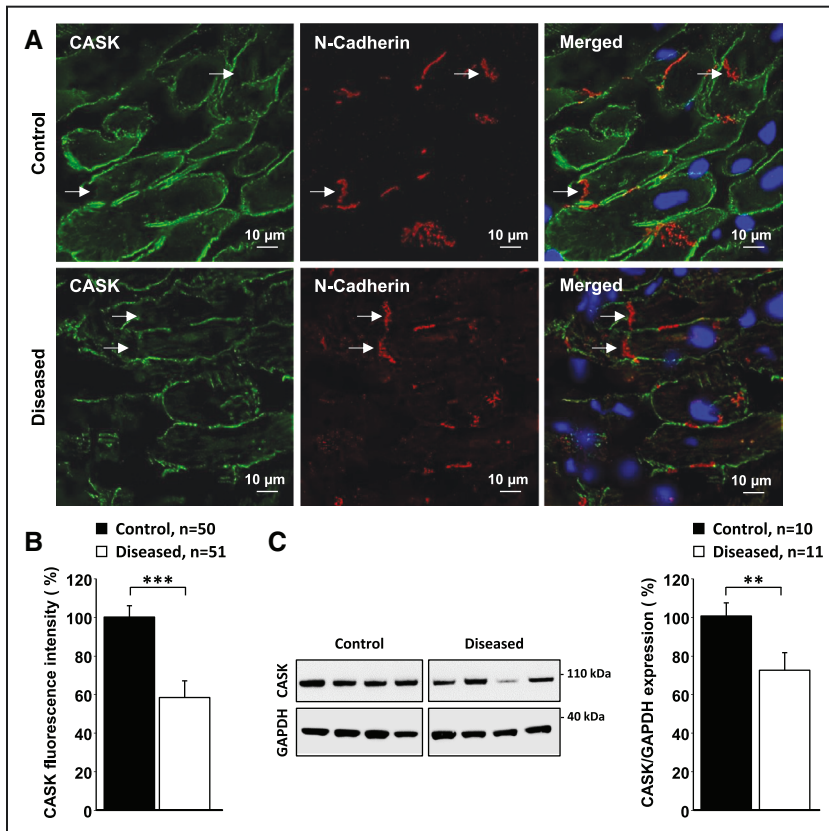


Figure 8. CASK (calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase) expression is reduced in dilated and remodeled atria. **A**, High-resolution 3-dimensional deconvolution microscopy images of CASK (**left**), N-cadherin (**middle**), and merged image (**right**) taken from control human and dilated atria (diseased) cryosections. Arrows indicate intercalated disc. **B**, Histogram of CASK fluorescence intensity in control and diseased human atria (%; n=6). **C**, Representative Western blot and corresponding histogram showing the expression level of CASK normalized to GAPDH in whole lysates from control and diseased atria (n=9). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

vinculin, 2 costameric proteins. In addition, we showed that CASK was able to precipitate dystrophin and that CASK staining at LM was extinct in mdx cardiac myocytes, suggesting that dystrophin is necessary for proper localization of CASK. However, in contrast to dystrophin which also extends along T-tubules in the rat myocardium, CASK was not found deep in the T-tubule because it did not colocalize with calcium channels or ryanodine receptors and its expression pattern was not affected by detubulation.

Interestingly, we showed that CASK silencing reduced syntrophin levels, whereas dystrophin and $Na_v1.5$ levels were unchanged. In addition, we showed that CASK directly interacts with the $Na_v1.5$ channel C-terminus using myocyte-enriched fraction from rat heart lysates. Moreover, $Na_v1.5$ C-terminus also interacted with purified CASK protein, suggesting that $Na_v1.5$ and CASK interaction is not dependent on the presence of syntrophin. Altogether, these results suggest that CASK is downstream dystrophin and upstream syntrophin and that syntrophin and CASK could compete for $Na_v1.5$ channel binding, likely at early stages of trafficking

Super-resolution scanning patch-clamp recordings showed that $Na_v1.5$ channels do not distribute homogeneously along the LM but instead form clusters confined into functional microdomains, with the largest aggregated at crest regions.²⁷ Here, we showed that CASK, $Na_v1.5$, and dystrophin all displayed a periodicity of 2 μm and that CASK was associated with $Na_v1.5$. In light of this distribution and poor expression in T-tubules, one could speculate that the macromolecular complex formed by $Na_v1.5$, CASK, and dystrophin corresponds to crest structures identified by scanning

ion conductance microscopy. The differential distribution of $Na_v1.5$ in microdomains of the LM suggests distinct roles for crests and T-tubules in electric and contractile activities of cardiac myocytes. For instance, $Na_v1.5$ located at the crest could play a preferential role in the propagation of the AP along the LM, whereas those located in T-tubules could be involved in excitation-contraction coupling. In this line, the specific localization of CASK at LM and its exclusion from T-tubules suggests a role for CASK in the regulation of the surface pool/crest population of sodium channels.

Mechanisms of Regulation of I_{Na} by CASK

MAGUKs are multidomain scaffolding proteins known to be involved in trafficking, targeting, and signaling of ion channels and receptors. In neurons, differential sorting of glutamate receptor subtypes has been shown to start in the ER and to depend on SAP97 and CASK. Although AMPARs are trafficked to the plasma membrane via the classical secretory pathway, NMDARs are diverted toward a specialized ER subcompartment. This ER subcompartment is composed of NMDAR subunits, CASK and SAP97. Although CASK does not directly bind to NMDAR, it prevents the SAP97-dependent ER retention of NMDAR.²⁸ When bound to CASK, SAP97 colocalizes with NMDAR, whereas when unbound, SAP97 preferentially associates with AMPAR.²⁹ These studies suggest that CASK regulates SAP97 association with glutamate receptor subtypes and subsequent sorting and trafficking to correct location. In cardiac myocytes, Shy et al²⁵ showed that the last 3 residues of $Na_v1.5$ in C-terminus, the SIV motif, are essential for the localization of $Na_v1.5$ at the LM, but not

required for its expression at the ID and T-tubules. The SIV motif interacts with syntrophin at the LM and with SAP97 at the ID, thereby defining distinct pools of Na_v1.5 multiprotein complexes. However, the mechanisms regulating the differential sorting of Na_v1.5 to specific membrane subdomains have not been elucidated.

In this context, the present study provides new insights in processes regulating the sorting of Na_v1.5. Our results revealed that CASK exerts a repressive effect on the functional expression of Na_v1.5. In vitro silencing or in vivo knockdown of CASK increased I_{Na^+} . In addition, this negative regulatory function was conserved for both atrial and ventricular myocytes. We showed that the current increase observed after CASK silencing was because of increased surface expression of Na_v1.5, and more specifically, at the LM. Treatment with the inhibitor of forward transport between ER and Golgi apparatus, BFA, prevented the effect. This result shows that CASK impedes Na_v1.5 trafficking. Therefore, one could hypothesize that Na_v1.5 sorting could be determined during anterograde processing steps of trafficking. Despite a common biosynthetic pathway, the early association of the channel with β auxiliary subunits and with other partners during biosynthesis could determine its sorting and final targeting to specific subdomains. Our results support that CASK plays a role in maintaining low level of Na_v1.5 at the LM by repressing a yet unknown identified step of channel trafficking. In this regard, CASK is unique among MAGUK proteins investigated to date that usually favors anchoring/stabilization of ion channels at the sarcolemma.

CASK Expression Is Reduced During Atrial Remodeling

Costameres encircle myocytes perpendicularly to their longitudinal axis in alignment with z-lines, making the bridge between extracellular matrix, sarcolemma, and intracellular contractile sarcomeres. They reinforce the sarcolemma during cardiac workload and transmit contractile forces exerted by myocytes or extracellular matrix in a bidirectional manner.³⁰

Both in human and rat, diseased atria characterized by extensive structural alterations of atrial myocytes,²⁰ CASK expression levels was reduced, whereas its LM localization was not modified. Whether this downregulation of CASK is associated with the redistribution of Na_v1.5 subpopulations in diseased myocardium needs to be carefully examined.

In summary, this study constitutes the first description of an unconventional MAGUK protein both in terms of localization and function in the heart. CASK acts as a repressor of the population of Na_v1.5 dedicated to the LM by preventing early trafficking. These results represent a substantial step forward in the concept of differentially regulated pools of Na_v1.5 within the cardiac myocyte having distinct roles in cardiac physiology. Notably, CASK could participate in maintaining low level of Na_v1.5 at the LM and consequently contribute to the anisotropic conduction.

Acknowledgments

We thank Dr H. Boycott for careful reading of the article and helpful comments. We acknowledge the contribution of S. Vermij in acquiring data and preparing material for the Figures 3 and 5. We thank M. Essers (Department of Clinical Research, University of Bern, Switzerland) for kindly providing the mdx mouse heart samples. We

thank Dr N. Mougenot of PECMV (Plate forme d'Expérimentation Cœur Muscle Vaisseaux) Platform, Pitié-Salpêtrière Hospital, France, for helpful assistance with the animal model.

Sources of Funding

This work was supported by Fondation Leducq Structural Alterations in the Myocardium and the Substrate for Cardiac Fibrillation (E. Balse and S.N. Hatem), the European Union (EUTRAF-261057; E. Balse and S.N. Hatem), and the AFM-Telethon with the reference 17758 (E. Balse), and the Swiss National Science Foundation (grant 310030_165741, H. Abriel).

Disclosures

None.

References

- Balse E, Steele DF, Abriel H, Coulombe A, Fedida D, Hatem SN. Dynamic of ion channel expression at the plasma membrane of cardiomyocytes. *Physiol Rev*. 2012;92:1317–1358. doi: 10.1152/physrev.00041.2011.
- Agullo-Pascual E, Lin X, Leo-Macias A, Zhang M, Liang FX, Li Z, Pfenniger A, Lübckemeier I, Keegan S, Fenyö D, Willecke K, Rothenberg E, Delmar M. Super-resolution imaging reveals that loss of the C-terminus of connexin43 limits microtubule plus-end capture and Nav1.5 localization at the intercalated disc. *Cardiovasc Res*. 2014;104:371–381. doi: 10.1093/cvr/cvu195.
- Sato PY, Musa H, Coombs W, Guerrero-Serna G, Patiño GA, Taffet SM, Isom LL, Delmar M. Loss of plakophilin-2 expression leads to decreased sodium current and slower conduction velocity in cultured cardiac myocytes. *Circ Res*. 2009;105:523–526. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.201418.
- Sato PY, Coombs W, Lin X, Nekrasova O, Green KJ, Isom LL, Taffet SM, Delmar M. Interactions between ankyrin-G, Plakophilin-2, and Connexin43 at the cardiac intercalated disc. *Circ Res*. 2011;109:193–201. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.247023.
- Makara MA, Curran J, Little SC, Musa H, Polina I, Smith SA, Wright PJ, Unudurthi SD, Snyder J, Bennett V, Hund TJ, Mohler PJ. Ankyrin-G coordinates intercalated disc signaling platform to regulate cardiac excitability in vivo. *Circ Res*. 2014;115:929–938. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.305154.
- Mohler PJ, Rivolta I, Napolitano C, LeMaillet G, Lambert S, Priori SG, Bennett V. Nav1.5 E1053K mutation causing Brugada syndrome blocks binding to ankyrin-G and expression of Nav1.5 on the surface of cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:17533–17538. doi: 10.1073/pnas.0403711101.
- Milstein ML, Musa H, Balbuena DP, Anumonwo JM, Auerbach DS, Furspan PB, Hou L, Hu B, Schumacher SM, Vaidyanathan R, Martens JR, Jalife J. Dynamic reciprocity of sodium and potassium channel expression in a macromolecular complex controls cardiac excitability and arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:E2134–E2143. doi: 10.1073/pnas.1109370109.
- Petitprez S, Zmoos AF, Orogodnik J, Balse E, Raad N, El-Haou S, Albesa M, Bittihn P, Luther S, Lehnart SE, Hatem SN, Coulombe A, Abriel H. SAP97 and dystrophin macromolecular complexes determine two pools of cardiac sodium channels Nav1.5 in cardiomyocytes. *Circ Res*. 2011;108:294–304. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.228312.
- Funke L, Dakoji S, Bredt DS. Membrane-associated guanylate kinases regulate adhesion and plasticity at cell junctions. *Annu Rev Biochem*. 2005;74:219–245. doi: 10.1146/annurev.biochem.74.082803.133339.
- Abi-Char J, El-Haou S, Balse E, Neyroud N, Vranckx R, Coulombe A, Hatem SN. The anchoring protein SAP97 retains Kv1.5 channels in the plasma membrane of cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;294:H1851–H1861. doi: 10.1152/ajpheart.01045.2007.
- Eldstrom J, Choi WS, Steele DF, Fedida D. SAP97 increases Kv1.5 currents through an indirect N-terminal mechanism. *FEBS Lett*. 2003;547:205–211.
- El-Haou S, Balse E, Neyroud N, Dilanian G, Gavillet B, Abriel H, Coulombe A, Jeromin A, Hatem SN. Kv4 potassium channels form a tripartite complex with the anchoring protein SAP97 and CaMKII in cardiac myocytes. *Circ Res*. 2009;104:758–769. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.191007.
- Godreau D, Vranckx R, Maguy A, Goyenvallé C, Hatem SN. Different isoforms of synapse-associated protein, SAP97, are expressed in the heart

- and have distinct effects on the voltage-gated K⁺ channel Kv1.5. *J Biol Chem*. 2003;278:47046–47052. doi: 10.1074/jbc.M308463200.
14. Rhett JM, Jourdan J, Gourdie RG. Connexin 43 connexon to gap junction transition is regulated by zonula occludens-1. *Mol Biol Cell*. 2011;22:1516–1528. doi: 10.1091/mbc.E10-06-0548.
 15. Hsueh YP, Wang TF, Yang FC, Sheng M. Nuclear translocation and transcription regulation by the membrane-associated guanylate kinase CASK/LIN-2. *Nature*. 2000;404:298–302. doi: 10.1038/35005118.
 16. Cohen AR, Woods DF, Marfatia SM, Walther Z, Chishti AH, Anderson JM, Wood DF. Human CASK/LIN-2 binds syndecan-2 and protein 4.1 and localizes to the basolateral membrane of epithelial cells. *J Cell Biol*. 1998;142:129–138.
 17. Leonoudakis D, Conti LR, Radeke CM, McGuire LM, Vandenberg CA. A multiprotein trafficking complex composed of SAP97, CASK, Veli, and Mint1 is associated with inward rectifier Kir2 potassium channels. *J Biol Chem*. 2004;279:19051–19063. doi: 10.1074/jbc.M400284200.
 18. Boycott HE, Barbier CS, Eichel CA, Costa KD, Martins RP, Louault F, Dilanian G, Coulombe A, Hatem SN, Balse E. Shear stress triggers insertion of voltage-gated potassium channels from intracellular compartments in atrial myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:E3955–E3964. doi: 10.1073/pnas.1309896110.
 19. Gavillet B, Rougier JS, Domenighetti AA, Behar R, Boixel C, Ruchat P, Lehr HA, Pedrazzini T, Abriel H. Cardiac sodium channel Nav1.5 is regulated by a multiprotein complex composed of syntrophins and dystrophin. *Circ Res*. 2006;99:407–414. doi: 10.1161/01.RES.0000237466.13252.5e.
 20. Rucker-Martin C, Milliez P, Tan S, Decrouy X, Recouvreur M, Vranckx R, Delcayre C, Renaud JF, Dunia I, Segretain D, Hatem SN. Chronic hemodynamic overload of the atria is an important factor for gap junction remodeling in human and rat hearts. *Cardiovasc Res*. 2006;72:69–79. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.06.016.
 21. Aimé-Sempé C, Folliguet T, Rücker-Martin C, Krajewska M, Krajewska S, Heimbürger M, Aubier M, Mercadier JJ, Reed JC, Hatem SN. Myocardial cell death in fibrillating and dilated human right atria. *J Am Coll Cardiol*. 1999;34:1577–1586.
 22. Spach MS. Anisotropy of cardiac tissue: a major determinant of conduction? *J Cardiovasc Electrophysiol*. 1999;10:887–890.
 23. Verkerk AO, van Ginneken AC, van Veen TA, Tan HL. Effects of heart failure on brain-type Na⁺ channels in rabbit ventricular myocytes. *Europace*. 2007;9:571–577. doi: 10.1093/europace/eum121.
 24. Lin X, Liu N, Lu J, Zhang J, Anumonwo JM, Isom LL, Fishman GI, Delmar M. Subcellular heterogeneity of sodium current properties in adult cardiac ventricular myocytes. *Heart Rhythm*. 2011;8:1923–1930. doi: 10.1016/j.hrthm.2011.07.016.
 25. Shy D, Gillet L, Ogrodnik J, et al. PDZ domain-binding motif regulates cardiomyocyte compartment-specific NaV1.5 channel expression and function. *Circulation*. 2014;130:147–160. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007852.
 26. Lab MJ, Bhargava A, Wright PT, Gorelik J. The scanning ion conductance microscope for cellular physiology. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013;304:H1–11. doi: 10.1152/ajpheart.00499.2012.
 27. Bhargava A, Lin X, Novak P, Mehta K, Korchev Y, Delmar M, Gorelik J. Super-resolution scanning patch clamp reveals clustering of functional ion channels in adult ventricular myocyte. *Circ Res*. 2013;112:1112–1120. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.300445.
 28. Jeyifous O, Waites CL, Specht CG, Fujisawa S, Schubert M, Lin EI, Marshall J, Aoki C, de Silva T, Montgomery JM, Garner CC, Green WN. SAP97 and CASK mediate sorting of NMDA receptors through a previously unknown secretory pathway. *Nat Neurosci*. 2009;12:1011–1019. doi: 10.1038/nn.2362.
 29. Lin EI, Jeyifous O, Green WN. CASK regulates SAP97 conformation and its interactions with AMPA and NMDA receptors. *J Neurosci*. 2013;33:12067–12076. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0816-13.2013.
 30. Samarel AM. Focal adhesion signaling in heart failure. *Pflü ers Arch*. 2014;466:1101–1111. doi: 10.1007/s00424-014-1456-8.

Novelty and Significance

What Is Known?

- Cardiac sodium channels are located in distinct membrane domains of the cardiac myocyte and interact with several partners, defining different populations of sodium channels that could play different roles in cardiac electrophysiology.
- At the intercalated disc, a high concentration of sodium channels is found in interaction with several anchoring partners where they contribute to the fast and longitudinal propagation of the action potential.
- While recent studies have identified another subpopulation of sodium channels at the lateral membrane, which underlies a sodium current of small amplitude, the partners and mechanisms regulating this subpopulation are still largely unknown.

What New Information Does This Article Contribute?

- In atrial and ventricular myocardium, we identified a new MAGUK protein, CASK, which is restricted to the lateral membranes of cardiac myocytes and interacts with both the dystrophin–glycoprotein complex and sodium channels, defining a new multimolecular complex in this specific membrane domain.
- CASK negatively regulates the sodium current both in vitro and in vivo and reduces the surface expression of sodium channels at the lateral membrane by impeding channel trafficking.
- CASK seems to be a crucial determinant of the organization of the subpopulation of sodium channel of the lateral membrane; reduced CASK expression in diseased myocardium might contribute to the alteration of the normal anisotropic propagation of electric impulses.

Cardiac myocytes are highly organized cells, characterized by specific plasma membrane domains specialized in mechanical and electric functions. These domains are constituted by macromolecular complexes containing several ion channels and partners, particularly well described for the intercalated disc. Here, we describe a new macromolecular complex at the lateral membrane of cardiac myocytes that organizes a subpopulation of sodium channels. We found that the MAGUK protein CASK is an unconventional partner of Na_v1.5 channels in cardiac myocytes. CASK is specifically distributed in costameric structures of the lateral membrane in association with dystrophin. We show that CASK directly interacts with Na_v1.5 and negatively regulates the corresponding current both in vitro and in vivo by impeding Na_v1.5 trafficking to the plasma membrane. Finally, we show that CASK expression is reduced in remodeled/dilated atrial biopsies without changes in localization. These results not only strengthen the concept of differentially regulated pools of Na_v1.5 channels within the cardiac myocyte but also suggest that CASK could participate in maintaining low levels of active Na_v1.5 at the lateral membrane. Given the role of Na_v1.5 in the fast activation and propagation of the action potential, the repressive effect of CASK on Na_v1.5 could contribute to the anisotropic conduction of the depolarization wave.

Lateral Membrane-Specific MAGUK CASK Down-Regulates $\text{Na}_v1.5$ Channel in Cardiac Myocytes

Catherine A. Eichel, Adeline Beuriot, Morgan Y.E. Chevalier, Jean-Sébastien Rougier, Florent Louault, Gilles Dilanian, Julien Amour, Alain Coulombe, Hugues Abriel, Stéphane N. Hatem and Elise Balse

Circ Res. 2016;119:544-556; originally published online June 30, 2016;

doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309254

Circulation Research is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75231

Copyright © 2016 American Heart Association, Inc. All rights reserved.

Print ISSN: 0009-7330. Online ISSN: 1524-4571

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://circres.ahajournals.org/content/119/4/544>

Data Supplement (unedited) at:

<http://circres.ahajournals.org/content/suppl/2016/06/30/CIRCRESAHA.116.309254.DC1.html>

Permissions: Requests for permissions to reproduce figures, tables, or portions of articles originally published in *Circulation Research* can be obtained via RightsLink, a service of the Copyright Clearance Center, not the Editorial Office. Once the online version of the published article for which permission is being requested is located, click Request Permissions in the middle column of the Web page under Services. Further information about this process is available in the [Permissions and Rights Question and Answer](#) document.

Reprints: Information about reprints can be found online at:
<http://www.lww.com/reprints>

Subscriptions: Information about subscribing to *Circulation Research* is online at:
<http://circres.ahajournals.org/subscriptions/>

SUPPLEMENTAL MATERIAL

DETAILED METHODS

Animals

Adult male Wistar rats (Janvier) were treated in accordance with French Institutional guidelines (Ministère de l'Agriculture, France, authorization 75-1090) and conformed to the Directive 2010/63/EU of the European Parliament.

Cardiomyocytes Isolation

Adult atrial or ventricular cardiomyocytes were obtained by enzymatic dissociation on a Langendorff column as previously described¹. Briefly, hearts were retrogradely perfused at 5mL/min through the aorta, first with an enzymatic solution containing in mmol/L: NaCl 100, KCl 4, MgCl₂ 1.7, glucose 10, NaHCO₃ 5.5, KH₂PO₄ 1, HEPES 22, BDM 15 and 200U/ml collagenase A (Roche Diagnostics) plus 0.5% bovine serum albumin, pH 7.4 (NaOH) at 37°C. Solution was bubbled with 95% O₂/5% CO₂ throughout. Tissue was cut into small pieces and gently minced with a glass pipette. Cells were plated on laminin-coated (Roche) 35mm Petri dishes or 18mm coverslips and maintained in Kraft-Brühe (KB) solution, in mmol/L: glutamate Acid Potassium Salt Monohydrate 70, KCl 25, Taurine 20, KH₂PO₄ 10, MgCl₂ 3, EGTA 0.5, Glucose 10, HEPES 10, until experiments. Isolated cells were used for immunofluorescence experiments within 2-8 hours after isolation (freshly isolated cells) or after 3-5 days in culture (immunofluorescence experiments or patch-clamp recordings). Cells were cultured under standard conditions (37°C, 5% CO₂) in M199 medium (Gibco) supplemented with 1% penicillin/streptomycin (Gibco), 5% fetal bovine serum (Gibco) and 1% insulin/transferrin/selenium cocktail (Sigma). Detubulation was achieved using formamide (1.5 mol/L) for 10 min². To induce formation of adherens junctions with the substrate, Petri dishes were coated with goat anti-human Fc antibody (50 µg/ml, overnight) and recombinant Fc-N-cadherin fusion protein (2 µg/ml, 1h) before seeding the cells³. Brefeldin-A was incubated for 48h (5 µg/ml) 12h after adenoviral infections.

Cardiac-specific CASK Knockdown mouse

Mice were generated by Cre/loxP-mediated gene targeting through homologous recombination. The homozygous floxed CASK^{tm1Sud} mouse (The Jackson Laboratory, Atasoy *et al.*, 2007) was bred with a cardiac myocyte-specific Cre-recombinase mouse, α myosin heavy chain (α MHC)-Cre (The Jackson Laboratory).

Plasmids and adenoviruses

ShRNA sequences for CASK 5'-tggagaatgtgaccagagttcgctgga-3' (shCASK) or its control (shscr) 5'-gcactaccagagctaactcagatagtagt-3' were provided by Origene into a pRFP-C-RS vector. For overexpression experiments, the CASK sequence (NM_001126055) was cloned into a pIRES-GFP vector (pIRES-GFP-CASK) and the pIRES-GFP vector served as control. HEK293 cells stably expressing Nav_v1.5 channels were transiently transfected using LipofectaminTM (Lipofectamin 2000; Invitrogen) with 2 µg of either shscr or shCASK and pIRES-GFP or pIRES-GFP CASK. ShCASK or shscr under a U6 promoter (Ad-shscr and Ad-shCASK) and CASK sequence (Ad-CASK) were cloned into pShuttle vector. Expression cassettes were transferred into the adenovirus vector containing GFP reporter for selection of infected cells. Adenoviruses were then produced, amplified and concentrated for further infections. Rat adult cardiomyocytes were infected 24h after isolation with 5.10⁷ particles/ml of Ad-shscr, Ad-shCASK, empty vector (Ad-GFP) or Ad-CASK. Overexpression studies were performed 3 days post infection while silencing studies were performed 5 days after infection.

Immunohistochemistry, immunocytochemistry and antibodies

Monoclonal anti-dystrophin (clone MANDYS8, 5.75 µg/ml), monoclonal anti-vinculin (clone hVIN-1, 23.3 µg/ml) and monoclonal anti-actinin (clone EA-53, 1:400) were obtained from

Sigma. Polyclonal antibody recognizing human/rat Nav1.5 was purchased from Alomone labs (ASC-005, 8 µg/ml). Monoclonal anti-Cav1.2 (clone N263/31, 10 µg/ml) was obtained from UC Davis/NIH NeuroMab Facility. Monoclonal anti-CASK used for biochemical assays was from UC Davis/NIH NeuroMab Facility (clone S56A-50, 2-20 µg/ml) and polyclonal anti-CASK used for immunocytochemistry was from Abcam (ab3383, 10 µg/ml). Monoclonal anti-caveolin 3 (clone 26/Caveolin 3, 5 µg/ml) was purchased from BD Biosciences. Monoclonal anti-N-cadherin (clone 3B9, 5 µg/ml) was from Zymed Laboratories. Polyclonal anti-GAPDH used for biochemical assays was from Cell Signaling (2118L, 1:20 000). Mouse anti-dystrophin (D8168, 0.6µg/ml) and mouse anti-pan-syntrophin (ab11425, 0.2 µg/ml) used for biochemical assays were purchased from Sigma-Aldrich and abcam respectively. Membrane of live cells were stained 15 min with a solution containing 1 µM of the voltage-sensitive di-8-ANEPPS dye (Life Technologies, D3167).

Deconvolution microscopy

Freshly isolated cells and myocardium cryosections were observed on an Olympus epifluorescence microscope (60X, UPlanSApo, 1.35). Digital images were captured with a CoolSnap camera (Roper-Scientific) in Z-depth in 0.2 µm increments using Metamorph software (Molecular Devices). Images were deconvoluted using acquired point spread function with the Metamorph 3D-deconvolution module. For representation, 2 frames were z-projected into one frame. Fluorescence quantification and colocalisation analysis were performed using ImageJ software (NIH).

Evanescent field microscopy and image analysis

HEK293 and adult cardiac myocytes were cultured on glass bottomed dishes (170 µm thickness, Ibidi), fixed and stained with anti-Nav1.5 antibody. Cells were visualized with total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy using the Olympus CellTIRF system. Cells were placed on an Olympus IX81-ZDC2 inverted microscope and TIRF illumination achieved with the motorized integrated TIRF illuminator combiner (MITICO-2L) using a APON 60X 1.49 numerical aperture (NA) oil immersion objective. GFP and RFP were visualized using a 50 mW solid state 491-nm and 561 lasers for excitation and dual band optical filter (M2TIR488-561). All image acquisition, TIRF angle adjustment and some of the analysis was performed using the xcellence software (Olympus). The lasers beams were focused on the periphery of the back focal plane of the objective in order to obtain an evanescent field of 75nm. Digital images were captured on a cooled charge-coupled device (CCD) camera (ORCA-ER, Hamamatsu). Control wide field and differential interference contrast (DIC) images were also acquired. Cells were selected on the basis of the GFP fluorescence and outlined manually using ImageJ software. Selected regions of interest (ROI) were pasted on the Nav1.5 images and the evanescent field fluorescence intensity was measured for each cell (mean intensity/area, in arbitrary unit).

Real time RT-PCR

Total mRNA was extracted from snap frozen hearts with TRIzol (Life Technologies) and quantified by NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). cDNA was synthesized from 2 µg of total mRNA with random primers by Superscript™ III reverse transcriptase (Life Technologies). Quantitative real-time PCR was performed using the LightCycler 480 System (Roche Diagnostics) and the Brilliant II SYBR Green qPCR Master Mix (Agilent Technologies), according to the manufacturer's instructions. Specific primers were designed to amplify *cask* (*cask*-F: 3' gtaagccccactgtgtct 5' and *cask*-R: 5' ttctggggccataaagtgag 3') and *scn5a* (*scn5a*-F: 3' tatgtcctcagccccttc 5' and *scn5a*-R: 5' gaacacgcagttggcagg 3'). All data were normalized to mRNA level of housekeeping genes *polr2a*, *rplp0*, *rpl32* (*polr2a*-F: 3' cgtatccgcatcatgaacagt 5' and *polr2a*-R: 5' tcatccatctatccaccactctt 3'; *rplp0*-F: 3' cgacctggaagtccaactac 5' and *rplp0*-R: 5' gtctgctcccacaatgaag 3'; *rpl32*-F: 3' ccagaggcatcgacaaca 5' and *rpl32*-R: 5' cgactccagctccttga 3') using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

Protein Extraction

Frozen tissues were homogenized in a lysis buffer, in mmol/L: NaCl 150, Tris-HCl 50 (pH7.5), EDTA 1 and 0.5% Triton 100-X and 1% protease cocktail inhibitor (Sigma) using a polytron. Solubilization was achieved by rotating the preparation 1h at 4°C. Soluble fractions obtained from 15 min centrifugation at 15000g and 4°C were used for experiments. Protein concentrations were measured by BCA Protein Assay (Pierce) using a BSA standard curve.

Immunoprecipitation Assays

Whole heart lysates were incubated with equal amount of antibodies or IgG (control) overnight at 4°C before pull-down with G-Sepharose beads (Sigma) for 1h. Material bound to washed-beads was eluted, boiled and separated by western blot.

Biotinylation Assays

Live cells were biotinylated for 30 minutes at 4°C using PBS containing 0.5 mg/ml of EZ Link Sulfo-NHS-SS-Biotin (Sigma). Cells were washed with PBS and incubated for 10 minutes in PBS containing 100 mmol/L Glycine to quench unlinked biotin. Cells were then lysed for 30 minutes at 4°C with RIPA buffer containing, in mmol/L: NaCl 150 and Tris-HCl 50 (pH7.5) supplemented with 1% NP-40, 0.5% Na-deoxycholate, 0.1% SDS, 1% Triton X-100 and protease inhibitor cocktail (Sigma). After centrifugation, supernatants were incubated with 50 µl of streptavidin-sepharose beads (ThermoFisher Scientific) overnight at 4°C. After 5 washes with RIPA buffer, samples were warmed for 20 minutes at 37°C in 2X sample buffer and analyzed by western blot as described below.

Pull-down assays

cDNAs encoding the last 66 amino acids of Nav1.5 WT and S2014Stop were cloned into pGEX- 4T1 (Amersham Bioscience, Piscataway, USA). Expression of GST-fusion proteins in E.Coli K12 cells was induced with 0.5 mmol/L IPTG for 2 h at 30°C. Cells were harvested by centrifugation and re-suspended in lysis buffer (in mol/L: Tris pH 7.5 mM, NaCl 250, EDTA 1, PMSF 1, and 0.5% NP40, 0.2 mg/ml DNASE I (Roche) and 0.2 mg/ml Lysozyme (Roche)). After bacterial lysis, fusion proteins were purified on Glutathione-Sepharose beads (Amersham Bioscience). Purified protein CASK obtained from OriGene (NM_003688) or soluble fractions obtained after applying the protein extraction protocol (see above) were incubated with GSH-sepharose beads containing either GST or the GST fusion proteins. After four washes in Lysis Buffer, samples were re-suspended with 2X Sample Buffer (NuPAGE® LDS Sample Buffer 4X, Life Technologies) containing 50 mM Dithiothreitol (NuPAGE® Sample Reducing Agent 10X, Life Technologies) and heated ten minutes at 60°C. Beads were removed from the samples and the resulting pulled-down proteins were analyzed by Western blot as described below.

Western Blot

Proteins were separated on NuPAGE® Novex® 10% Bis-Tris gels or NuPAGE® Novex® 3-8% Tris-Acetate gels for high molecular weight proteins (Life Technologies) and transferred on nitrocellulose membrane (Biorad). Incubation were performed with appropriate primary antibodies followed by HRP-coupled secondary antibodies (Cell Signaling). Proteins were revealed with ECL Prime (GE Healthcare) and images were acquired using a LAS4000 Camera (GE Healthcare).

Electrophysiological measurements

I_{Na} properties were studied using standard whole-cell patch clamp. For experiments performed on cultured cells, pipette solution contained in mmol/L: NaCl 5, CaCl₂ 2, MgCl₂ 2, CsCl 130, HEPES 10, EGTA 15 and MgATP 4, pH 7.2 with CsOH. Cells were perfused with a solution containing in mmol/L: NaCl 25, CaCl₂ 2, MgCl₂ 2.5, CsCl 108.5, HEPES 10, CoCl₂ 2.5 and glucose 10, pH 7.4 with CsOH (E_{Na} ~40 mV) or NaCl 135, CaCl₂ 2, KCl 4, MgCl₂ 2.5, HEPES 10, and glucose 20, pH 7.4 with NaOH (E_{Na} ~80 mV). For experiments performed on freshly isolated WT Cre and CASK KO ventricular myocytes, pipette solution contained in mmol/L: aspartic acid 60, cesium aspartate 70, CaCl₂ 1, MgCl₂ 1, HEPES 10, EGTA 11, and Na₂ ATP 5,

pH 7.2 with CsOH. Myocytes were bathed with a solution containing in mmol/L: NaCl 5, NMDG-Cl 125, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1.2, CsCl 5, HEPES and glucose 5, pH adjusted to 7.4 with CsOH. 10 μmol/L nifedipine and 10 μmol/L CoCl₂ were added to the extracellular solution to prevent calcium current contamination of the recordings. For the current-V_m and activation (m_∞) protocol, currents were elicited by 50ms depolarizing pulses from a holding potential of -120 mV, in 5 or 10 mV increments, between -100 and +60 mV, at a frequency of 0.2 Hz. For the steady-state availability-V_m protocol (h_∞), currents were elicited by a 50ms test pulse to -20 mV following 1s pre-pulses applied in 5 or 10 mV increments, between -140 mV and -20 mV, from a holding potential of -120 mV, at 0.2 Hz.

Human samples

In accordance with approval of Institution Ethic Committee, biopsies of right atrial appendages were obtained from 28 patients undergoing cardiac surgery. Two groups of patients were defined. The control group was constituted of patients in sinus rhythm, preserved left ventricular function and a normal atria (N=14); the diseased group was constituted of patients with marked dilation of the right atria associated with chronic AF (up to 6 months duration) or with severe mitral and tricuspid valve regurgitations (N=14).

Experimental model of atrial dilatation.

Myocardial infarction was induced in 2 months-old male Wistar rats by ligating the left coronary artery (n=13). Sham rats underwent the same surgical procedure without left coronary artery ligation (n=14). The cardiopathy was characterized by transthoracic echography 2 months after surgery. Atria were collected, placed in lysis buffer, homogenized and frozen at -80°C for use in western blot experiments. Atria were fixed with 4% PFA for 10 min at RT, embedded in cryomatrix and 8μm-thick sections were prepared for IF.

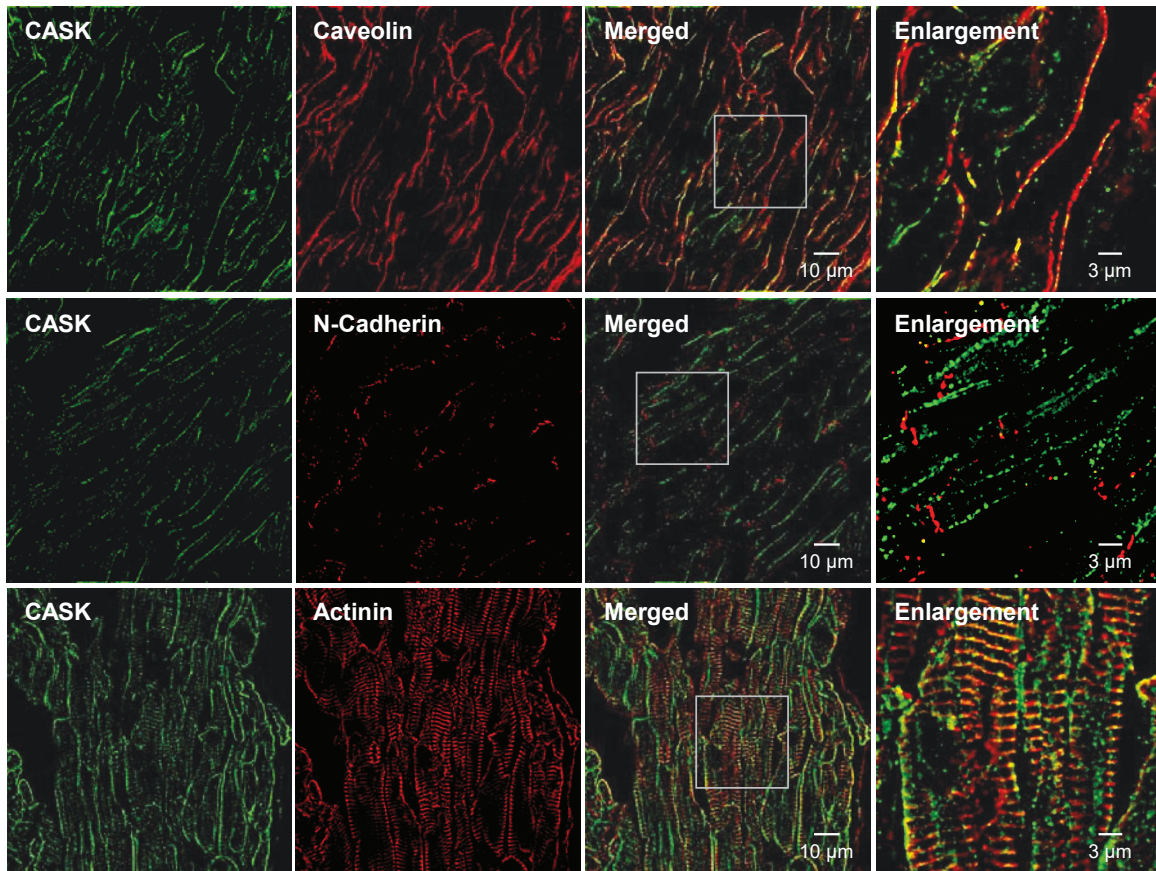
Statistics

Data was tested for normality using the D'Agostino and Pearson normality test. Statistical analysis was performed using Student's *t* test or ANOVA followed by post-hoc Student-Newman-Keuls test on raw data. Results are given as means ± SEM and *P* values of less than 0.05 were considered significant. *: *P*<0.05, **: *P*<0.01 and ***: *P*<0.001. N corresponds to the number of independent experiments, and n to the number of samples.

REFERENCES

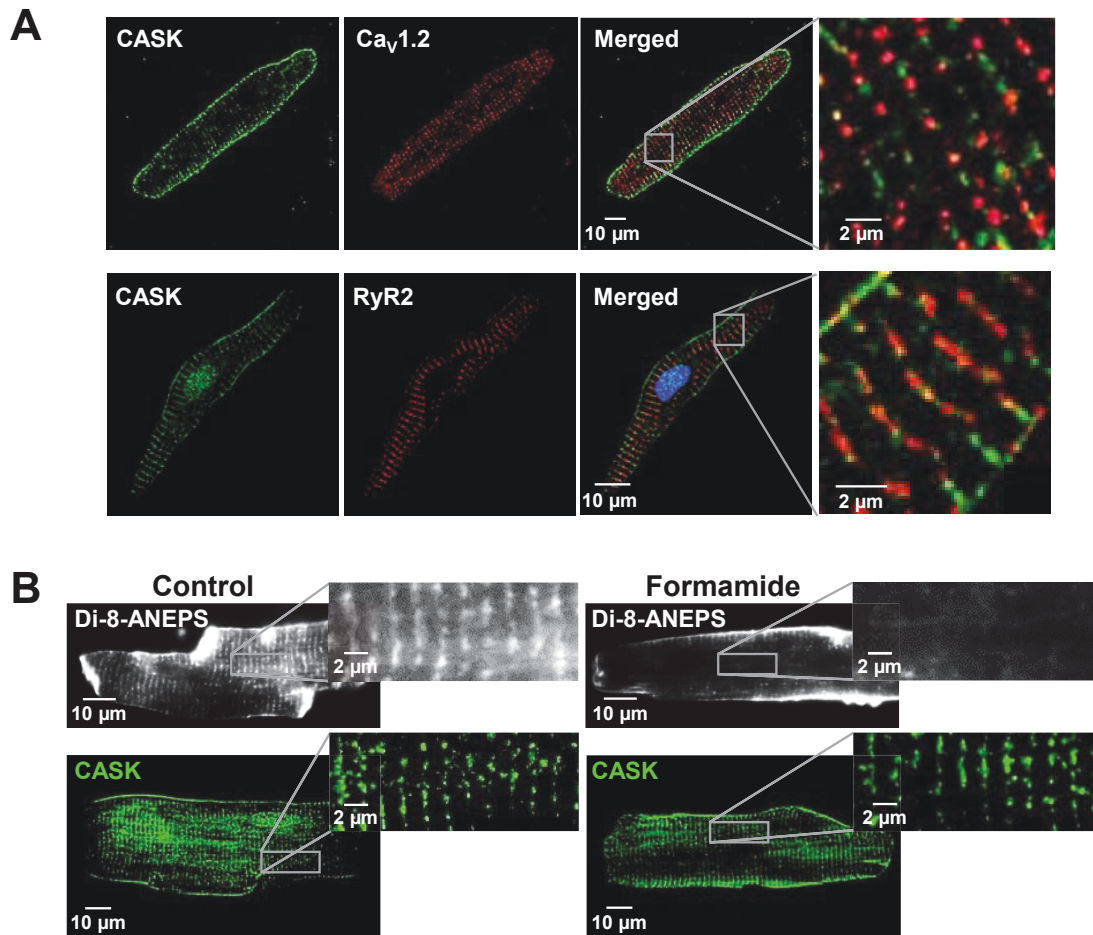
1. Boycott HE, Barbier CS, Eichel CA, Costa KD, Martins RP, Louault F, Dilanian G, Coulombe A, Hatem SN, Balse E. Shear stress triggers insertion of voltage-gated potassium channels from intracellular compartments in atrial myocytes. *Proc Natl Acad Sci U A*. 2013;110:E3955–64.
2. Brette F, Komukai K, Orchard CH. Validation of formamide as a detubulation agent in isolated rat cardiac cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283:H1720–1728.
3. Smyth JW, Shaw RM. Visualizing cardiac ion channel trafficking pathways. *Methods Enzymol*. 2012;505:187–202.

Online Figure I



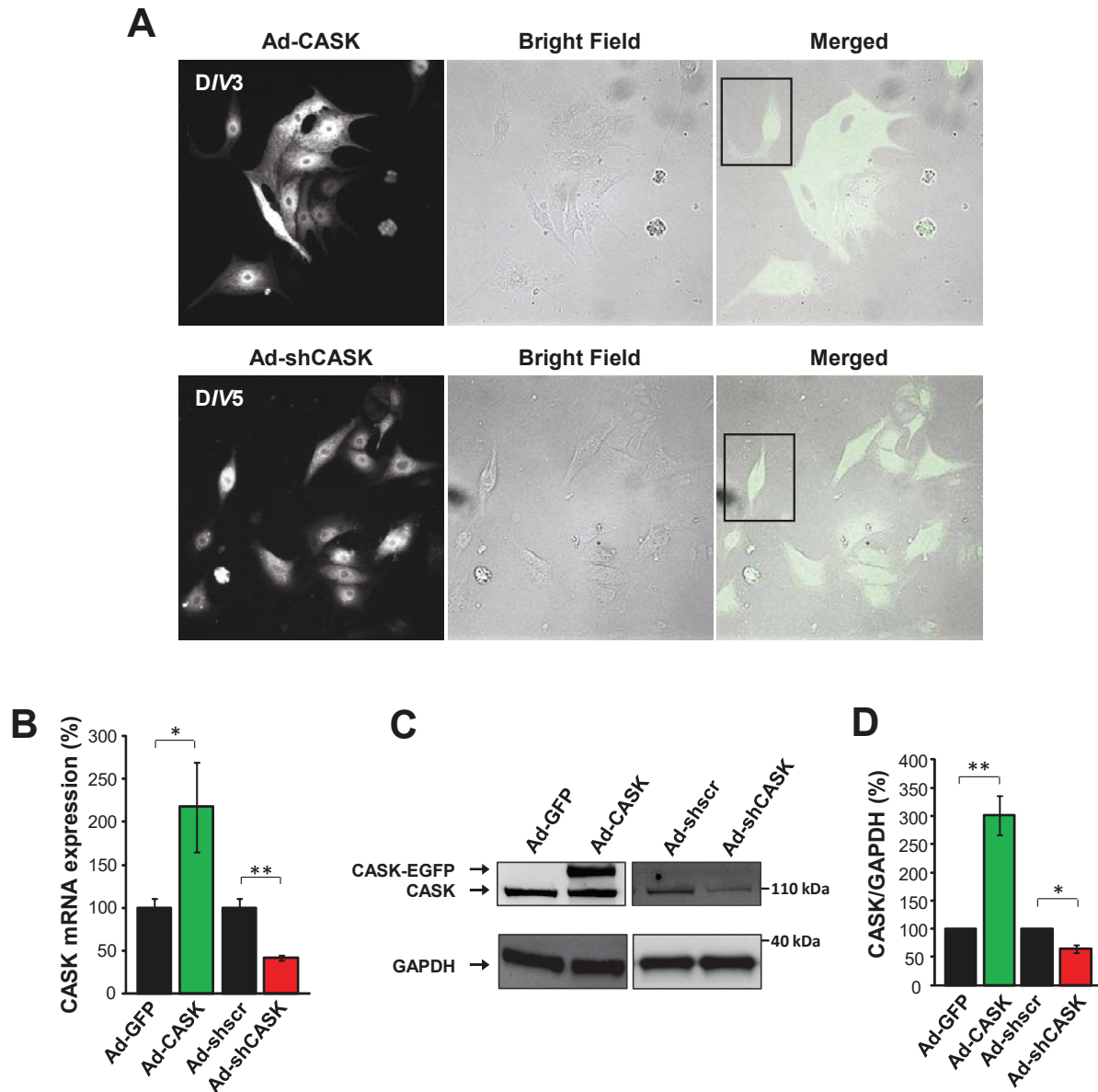
Online Figure I. CASK is expressed at the lateral membrane of cardiac myocytes and excluded from the intercalated disc in the atrial myocardium. High resolution 3-D deconvolution microscopy images and enlargements of outlined squares (right panels) obtained from atrial tissue sections stained with CASK and caveolin3 (top panel), N-cadherin (middle panel) and α -actinin (bottom panel). Note that the focal plane was selected in order to highlight the different structures of interest.

Online Figure II



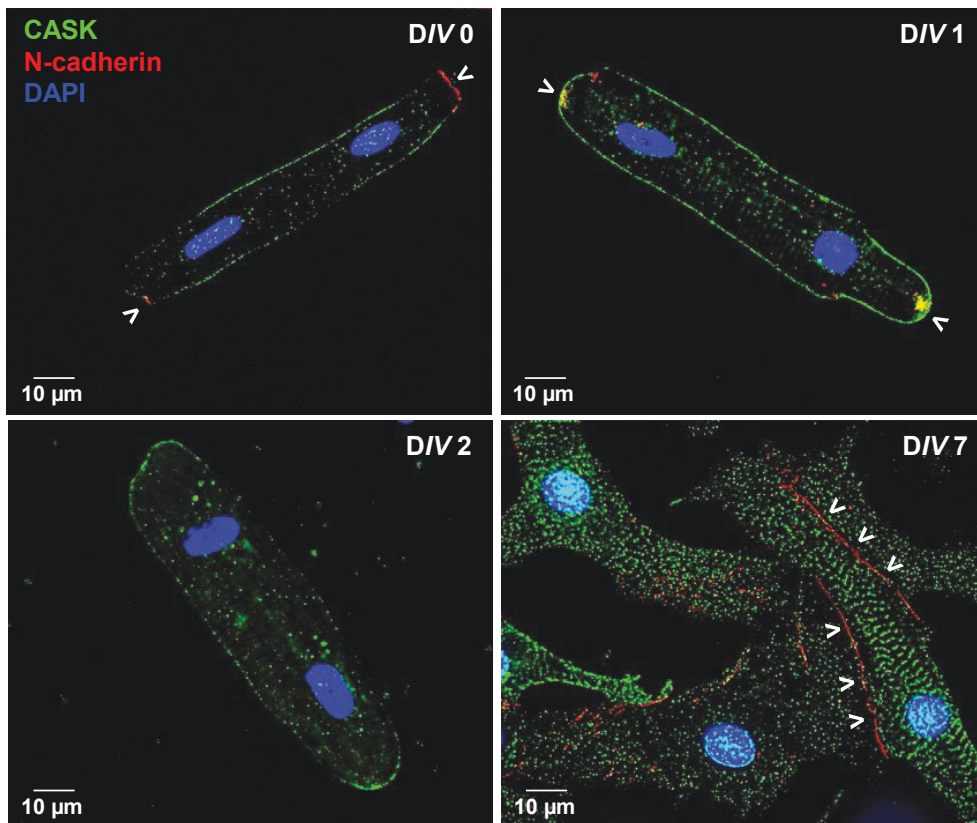
Online Figure II. CASK expression at the z-line does not correspond to T-tubule localization. (A) High resolution 3-D deconvolution microscopy images of CASK and Ca_v1.2 channel (top panel) or ryanodine receptor 2 (RyR2, bottom panel) in freshly isolated ventricular myocytes. Right panels correspond to enlargement of outlined squares. (B) Live images of Di-8-ANEPS staining (top panel) and post-staining of CASK after fixation (bottom panel) in control or formamide-treated cardiac myocytes.

Online Figure III



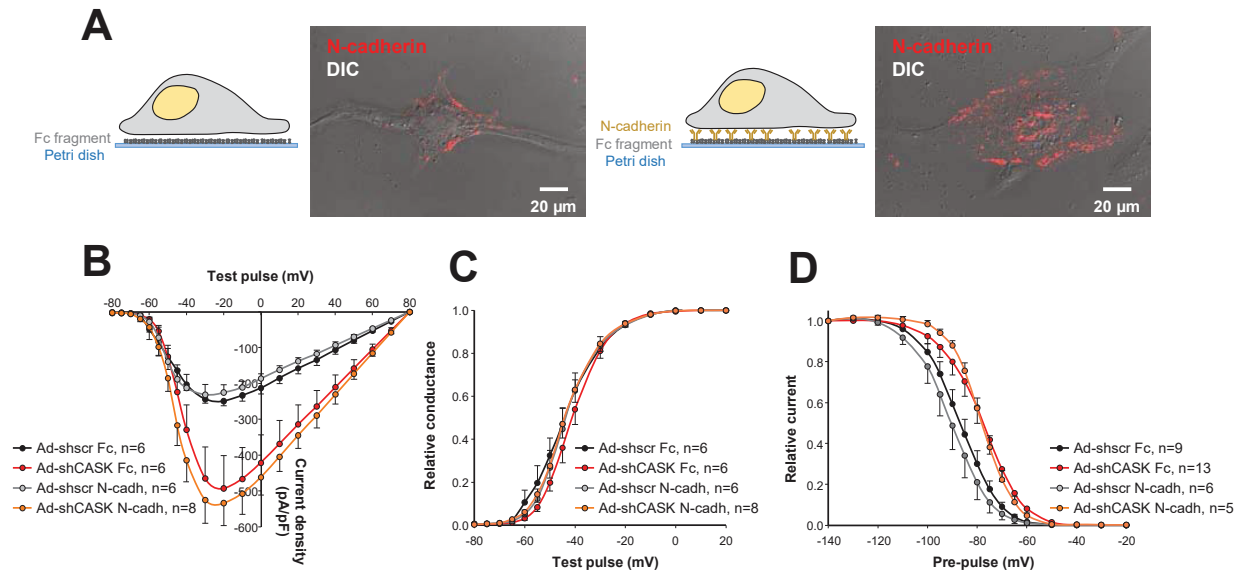
Online Figure III. Modulation of CASK mRNA and protein levels by adenoviral transfer technology. (A) Representative bright field and epifluorescence images of adenoviral infection efficiency in cultured rat atrial myocytes for overexpression (top) and silencing (bottom) experiments (20X). Squares in the merged images outline representative isolated cell used for patch clamp experiments. (B) Histogram showing the expression level of CASK mRNA in adult atrial myocytes infected with Ad-CASK (green) or Ad-shCASK (red) compared to their respective control Ad-GFP and Ad-shscr (black). (C) Representative western blot showing increased CASK expression in Ad-CASK infected myocytes (endogenous CASK at ~110 kDa and CASK-EGFP at ~140 kDa) or decreased CASK expression in myocytes infected with either Ad-shCASK. (D) Histogram of the expression level of CASK normalized to GAPDH after modulation of its expression by shRNA or overexpressing adenoviruses (N=2). * P<0.05; ** P<0.01.

Online Figure IV



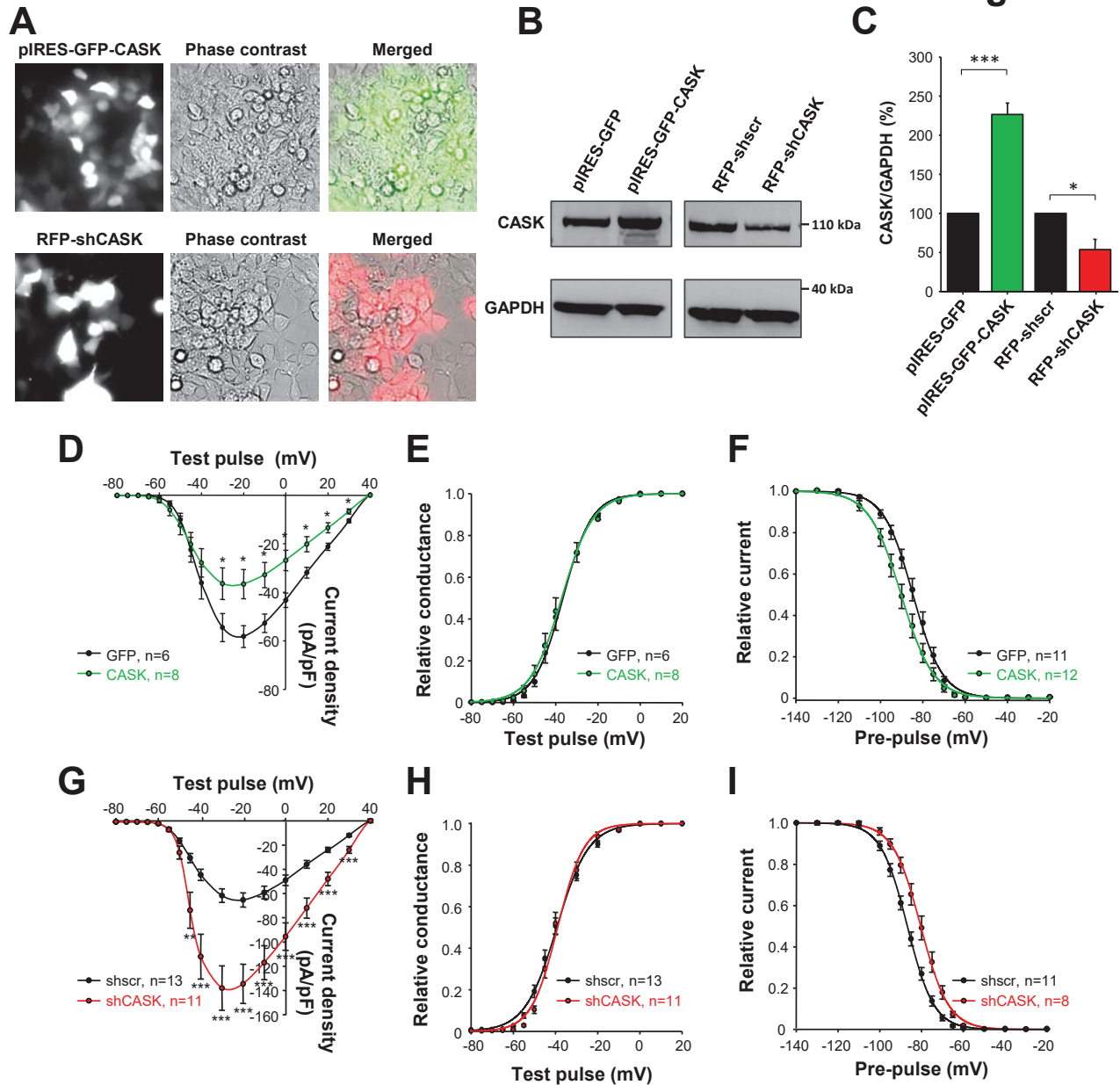
Online Figure IV. Distribution of CASK in cardiac myocytes in function of the time in culture. High resolution 3-D deconvolution microscopy images showing the distribution of CASK and the adherens junction protein N-cadherin at different days *in vitro* (DIV). N-cadherin was used as a marker of the intercalated disc (ID) or ID-like structures after reestablishment of cell-cell contacts. Arrowheads point the localization of ID in freshly isolated cells and cell-cell contacts stained with N-cadherin. Note that the two proteins are never associated and that CASK is absent at sites of contact.

Online Figure V



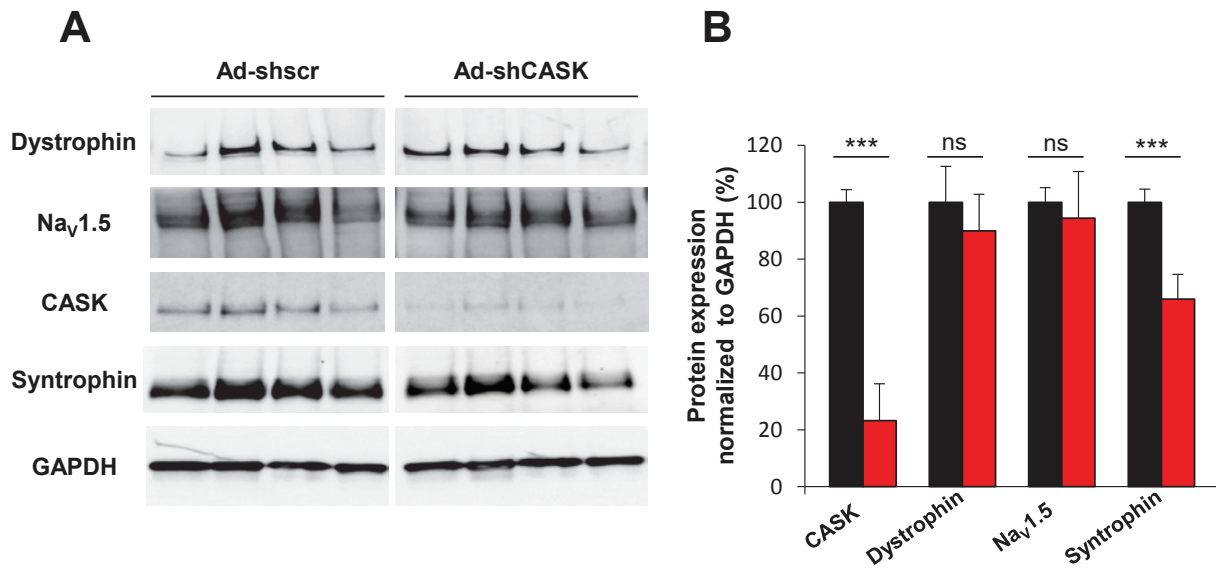
Online Figure V. CASK negatively regulates the cardiac sodium current I_{Na} in polarized cardiac myocytes. (A) Cartoon depicting the induction of adherens junctions with the substrate and corresponding TIRFm images of N-cadherin staining (right panels). (B) Current density-voltage relationships (135 mmol/L $[Na^+]_o$) of I_{Na} obtained from adult atrial myocytes infected with Ad-shscr and seeded on Fc (black) or on N-cadh (grey) or from myocytes infected with Ad-shCASK and seeded on Fc (red) or N-cadh (orange) (N=2). (C-D) Voltage-dependent activation and steady-state inactivation curves obtained from adult atrial myocytes in the same four conditions (N=2). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Online Figure VI



Online Figure VI. CASK regulates the cardiac sodium current I_{Na} in non-polarized HEK293- $Na_v1.5$ cells. (A) Representative phase contrast and epifluorescence images of the transfection efficiency in HEK293- $Na_v1.5$ cells. (B) Representative western blots showing CASK expression in HEK293- $Na_v1.5$ cells transfected with either pIRES-GFP-CASK or RFP-shCASK. (C) Histogram of the expression level of CASK normalized to GAPDH after modulation of its expression by overexpression plasmids or shRNA (N=2). * P<0.05; *** P<0.001. (D) Current density-voltage relationships (25 mmol/L $[Na^+]_o$) of I_{Na} obtained from GFP (black) and CASK (green) transfected HEK293 cells. (E-F) Activation and steady-state inactivation curves obtained from GFP (black) and CASK (green) HEK293 cells (N=3). (G) Current density-voltage relationships (25 mmol/L $[Na^+]_o$) of I_{Na} obtained from shscr (black) and shCASK (red) transfected HEK293 cells. (H-I) Activation and steady-state inactivation curves obtained from shscr (black) and shCASK (red) HEK293 cells (N=3). * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001.

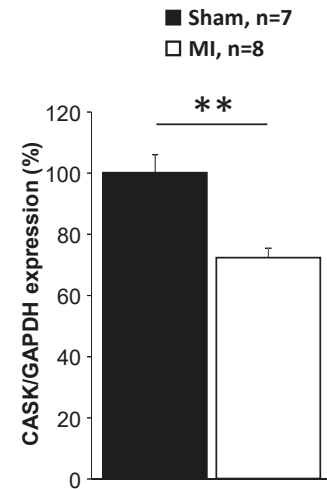
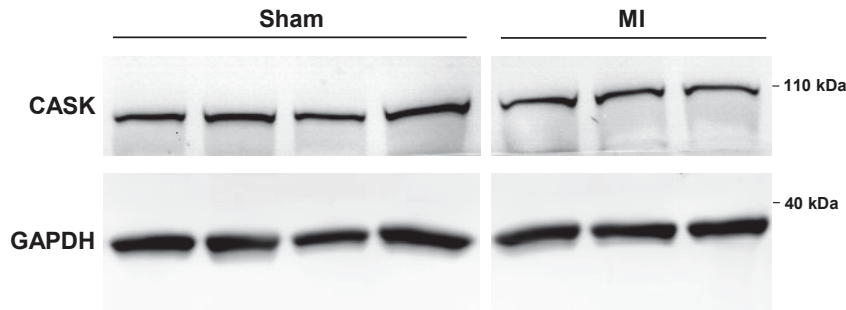
Online Figure VII



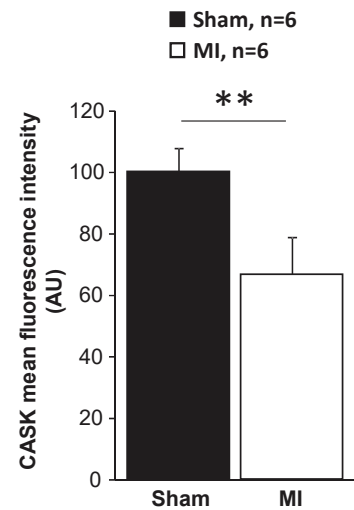
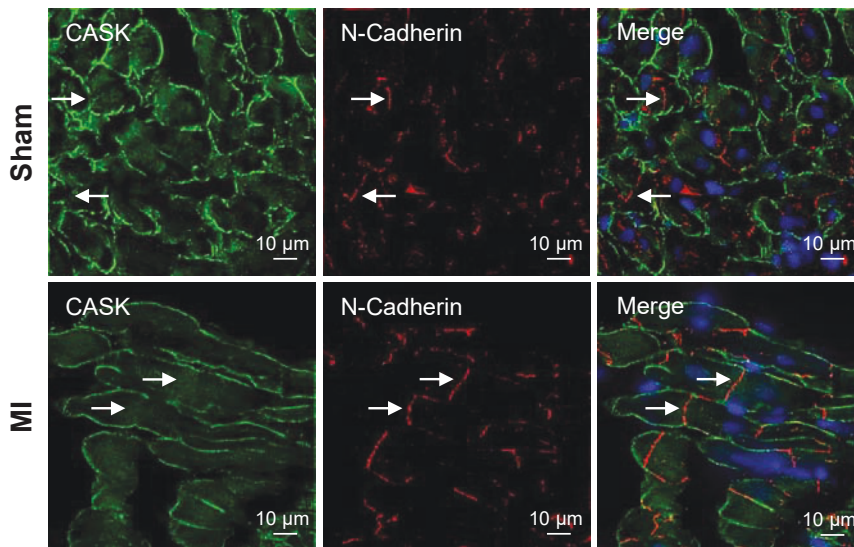
Online Figure VII. CASK silencing inhibits syntrophin expression. (A) Representative western blot showing the expression of CASK, dystrophin, Na_v1.5 and syntrophin in control (black) and CASK-silenced myocytes (red). GAPDH served as loading control. (B) Histogram showing the relative protein expression normalized to GAPDH in Ad-shscr and Ad-shCASK. n=7 independent cultures, N=3-5 western blots. ns, not significant; *** P<0.001.

Online Figure VIII

A



B



Online Figure VIII. CASK expression is reduced but its localization is unchanged in a model of chronic hemodynamic overload and dilated atria. (A) Representative western blot and histogram of the expression level of CASK normalized to GAPDH in sham and MI rats (N=3). (B) High resolution 3-D deconvolution microscopy images showing the distribution of CASK and N-cadherin in sham and MI rats and corresponding histogram of CASK fluorescence intensity from the same rats (N=3) from serial tissue slices. Arrows indicate the localization of intercalated discs. ** P < 0.01.

3. Résumé des résultats

Au cours de cette étude, nous avons pu décrire, pour la première fois, la présence et la fonction de la protéine CASK dans le cardiomyocyte. À l'inverse des deux autres protéines MAGUK, ZO-1 et SAP-97, déjà décrites au niveau cardiaque, nous avons constaté que celle-ci était spécifiquement localisée à la membrane latérale et totalement exclue des disques intercalaires. Par le biais d'expériences d'immunofluorescence et de co-immunoprécipitation, CASK s'est par ailleurs révélée être un nouveau membre du complexe costamérique Dystrophine-Glycoprotéines. Nous avons également montré que la localisation de la protéine CASK, à la membrane latérale, est dépendante de la présence de la Dystrophine. En effet, chez la souris mdx déficiente pour la Dystrophine (lignée modèle de la myopathie de Duchenne), on constate que la protéine CASK est absente du sarcolemme des cardiomyocytes.

Le canal sodique Nav1.5 a également pour partenaire le complexe Dystrophine-Glycoprotéines. Nous avons alors testé l'hypothèse d'une interaction entre Nav1.5 et CASK. Par expériences de microscopie et de biochimie (co-immunoprécipitation et pull down assay), il s'est avéré, que la protéine CASK est un partenaire direct du canal sodique cardiaque Nav1.5. En effet, cette interaction est dépendante de la région C-terminale du canal et plus précisément du motif SIV (formant des liaisons aux domaines PDZ) composé de trois acides aminés (Sérine – Isoleucine – Valine). Ainsi à la membrane latérale du myocyte cardiaque, CASK s'intègre dans un complexe macromoléculaire regroupant, au moins, des protéines de liaison à la matrice extracellulaire et une sous population de canaux sodiques. Il est intéressant de constater que le motif SIV a déjà été décrit pour interagir avec un autre membre du complexe Dystrophine-Glycoprotéines qu'est la Syntrophine (Gavillet et al. 2006) mais aussi avec la SAP-97 au disque intercalaire (Petitprez et al. 2011). Nos observations suggèrent donc un phénomène de compétition entre les protéines CASK, Syntrophine et SAP-97 quant à la liaison pour le canal Nav1.5 *via* le motif SIV. Elles soutiennent également notre hypothèse selon laquelle l'association précoce du canal avec des partenaires clés pourrait déterminer ensuite son adressage dans un compartiment spécifique de la membrane. Néanmoins, le moment où cette association a lieu (dans le réticulum endoplasmique ou juste à la sortie de celui-ci avant d'atteindre l'appareil de Golgi) n'est pas encore connu (Figure 25).

Afin de déterminer ce que pouvait engendrer une telle liaison entre CASK et le canal sodique, nous avons modifié l'expression de cette MAGUK, par inhibition (Ad-shCASK) ou par surexpression (Ad-CASK), dans différents modèles d'étude (les cellules cardiaques atriales de rat, les HEK-293 ou encore dans des cellules atriales de souris invalidées pour CASK spécifiquement dans le cœur). Nous avons constaté que ces modulations d'expression de CASK interféraient directement sur la densité du courant sodique I_{Na} enregistré. En effet, par expérience de patch-clamp, lorsque CASK est inhibée, le

courant I_{Na} augmente et inversement, lorsque la protéine CASK est surexprimée le courant I_{Na} diminue. Des expériences complémentaires de biotinylation et de microscopie à onde évanescente (TIRF), associées ou non à des traitements à la Bréfeldine-A (inhibiteur du trafic antérograde) nous ont permis de mettre en évidence que ces variations de courant sodique I_{Na} sont engendrées par une accumulation, dans le cas où CASK est inhibée, des canaux sodiques dans le plan membranaire. Ainsi, en plus de sa localisation singulière restreinte à la membrane latérale, la protéine CASK ne favorise ni l'ancrage ni la stabilisation du canal sodique dans le cardiomyocyte. Au contraire, CASK empêche les canaux $Na_v1.5$ de s'accumuler à la membrane latérale en affectant leur trafic antérograde par un mécanisme encore inconnu.

De manière intéressante, nous avons aussi montré qu'en conditions pathologiques, notamment dans des oreillettes dilatées humaines provenant de patients présentant une fibrillation atriale, que l'expression de la protéine CASK est réduite. Notre hypothèse est que cette diminution de la protéine CASK à la membrane latérale des myocytes chez ces patients pourrait être à l'origine d'une altération dans la propagation anisotrope du potentiel d'action due à un déséquilibre dans la répartition des canaux sodiques entre membrane latérale et disque intercalaire. La perte de CASK pourrait ainsi favoriser l'apparition de phénomènes arythmiques.

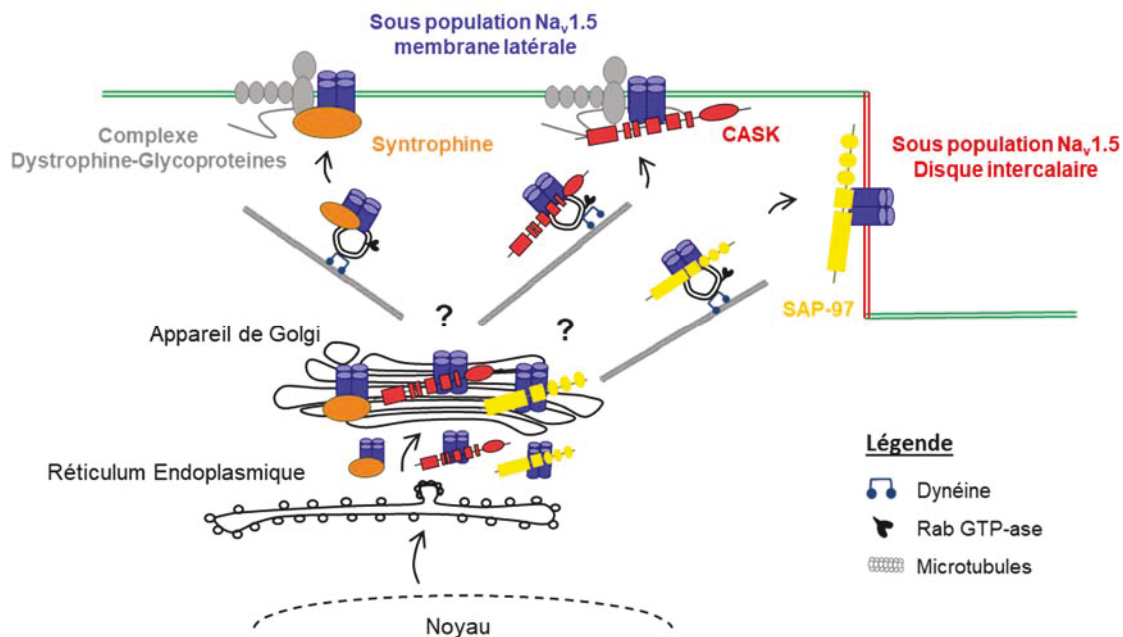


Figure 25 : La destinée des canaux sodiques $Na_v1.5$ vers la membrane est influencée par ses partenaires. Représentation schématique de la formation des deux sous-populations de canaux sodiques trouvées au sarcolemme du cardiomyocyte. La Syntrophine, CASK et SAP-97 entreraient en compétition pour se lier à $Na_v1.5$ ce qui déterminerait sa future localisation : à la membrane latérale (où CASK régule négativement le courant I_{Na}) ou au disque intercalaire (où SAP-97 régule positivement le courant I_{Na}).

4. Résultats complémentaires

Durant cette étude, nous avons constaté que l'inhibition de la protéine CASK dans les cardiomyocytes atriaux de rats adultes entraînait une augmentation du courant sodique I_{Na} . Dans un premier temps, nous avons donc étudié le taux d'expression du gène *SCN5A* codant pour le canal $Na_v1.5$. Les résultats obtenus ont montré que l'absence de CASK n'influencait pas sur la transcription du gène. De même, lorsque nous avons quantifié par western blot le taux d'expression protéique du canal $Na_v1.5$, celui-ci est resté inchangé lorsque CASK est inhibée. Les variations du courant I_{Na} observées lors de la modulation de l'expression de CASK ne peuvent donc pas s'expliquer par des activités de transcription ou de traduction du canal plus importantes (voir Article 1, Figure 6).

Nous avons donc supposé que le mode de régulation de CASK sur le courant I_{Na} passait par une régulation de la quantité de canaux sodiques présents à la membrane de la cellule. Cette hypothèse a d'ailleurs été confirmée par des expériences de biotinylation et de quantification de l'intensité de fluorescence de $Na_v1.5$ dans le plan membranaire par microscopie TIRF (voir Article 1, Figure 6). Néanmoins, nous ne savions pas si ce contrôle de l'enrichissement de la membrane latérale en canaux sodiques par CASK était dû à une altération dans les voies de trafic antérograde (vers la membrane) ou bien rétrograde (recyclage et dégradation). Pour répondre à cette question, nous avons donc utilisé des inhibiteurs du protéasome que sont l'ALLN et le MG-132 dans des cellules atriales de rats adultes surexprimant la protéine CASK. Ainsi, dans ces cellules où le courant I_{Na} enregistré est fortement diminué, si la régulation du courant sodique par CASK passe par la voie de trafic rétrograde, en limitant leur recyclage et en favorisant leur dégradation, l'ajout d'un inhibiteur du protéasome devait pouvoir contrer cet effet. Dans ce contexte, le résultat attendu après traitement à l'ALLN ou au MG-132 aurait été une augmentation de la densité de canaux $Na_v1.5$ à la membrane, associée à une restauration du courant sodique.

Les effets de l'ALLN et du MG-132 ont été testés sur des cellules atriales de rats à 4 jours post-infection par un adénovirus permettant la surexpression de CASK (Ad-CASK), en présence de 10 μ M de l'inhibiteur et ce durant une période de traitement allant de 2h à 6h. Les cellules ont ensuite été fixées pour étudier leur morphologie et la répartition des canaux sodiques avant et après traitement. Nous avons constaté que l'ajout des inhibiteurs, ALLN et MG-132, n'affecte pas la morphologie générale des cellules et leurs membranes semblent intactes, même à 6h de traitement (Figure 26).

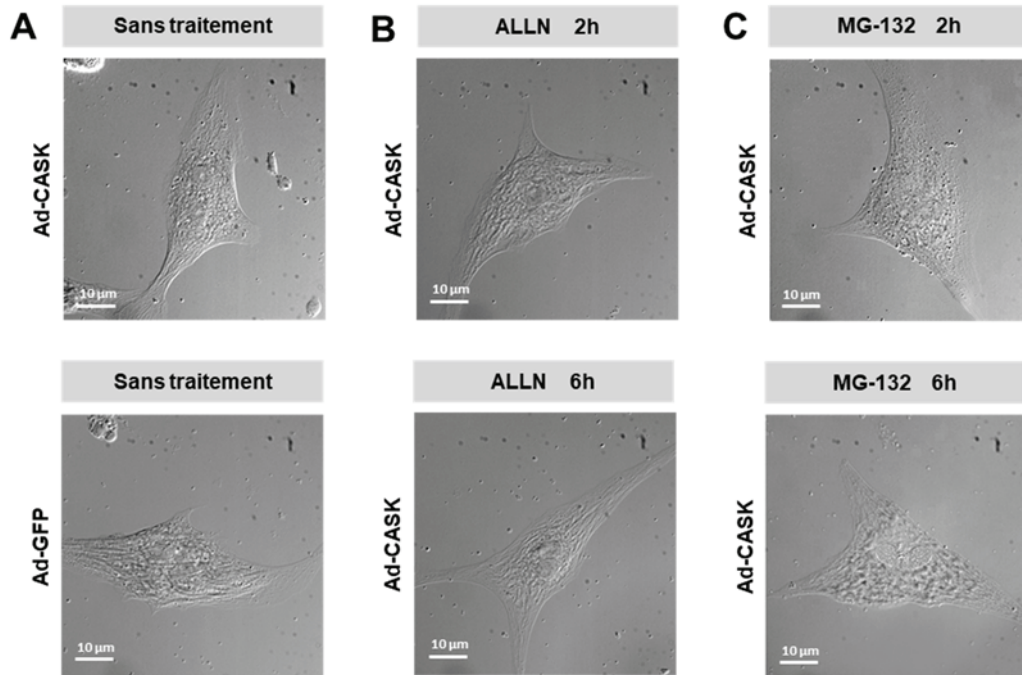


Figure 26 : Les traitements aux inhibiteurs du protéasome, ALLN et MG-132 n'altèrent pas la morphologie des cardiomyocytes. Images acquises en fond clair, de cellules atriales de rats adultes après infection avec un adénovirus contrôle (Ad-GFP) ou de surexpression de CASK (Ad-CASK). Les cellules après 4 jours d'infection ont reçu un traitement à l'ALLN (B) durant 2h (haut) ou 6h (bas) ou un traitement au MG-132 (C) durant 2h (haut) ou 6h (bas). Leur morphologie est ensuite comparée à des cellules atriales n'ayant pas reçu de traitement (A).

La distribution du canal sodique $Na_v1.5$ a ensuite été observée par immunofluorescence. En condition contrôle (Ad-GFP), à la membrane latérale des cellules atriales isolées (correspondant ici à la périphérie des cellules), on peut remarquer une accumulation des canaux sous la forme d'un marquage ponctiforme prononcé. Cette accumulation est indiquée par des flèches dans les agrandissements (Figure 27 A, gauche). Dès lors que la cellule surexprime la protéine CASK (Ad-CASK), on observe une perte de l'intensité de fluorescence à la membrane des cellules avec un marquage ponctiforme plus diffus. Cette baisse reflète donc une diminution de la quantité de canaux $Na_v1.5$ présents à la membrane latérale (Figure 27 A, droite). Les observations de la répartition des canaux sodiques à la membrane dans les cellules traitées avec les inhibiteurs du protéasome durant 2h, 3h et 6h, ne montrent pas de différences en comparaison à la condition de surexpression de CASK (Ad-CASK) sans traitement (Figure 27 B, C et D), le marquage reste diffus à la membrane latérale. Ainsi, ces résultats suggèrent que le blocage de l'activité du protéasome ne permet pas de redistribuer les canaux sodiques à la membrane lorsque la protéine CASK est surexprimée.

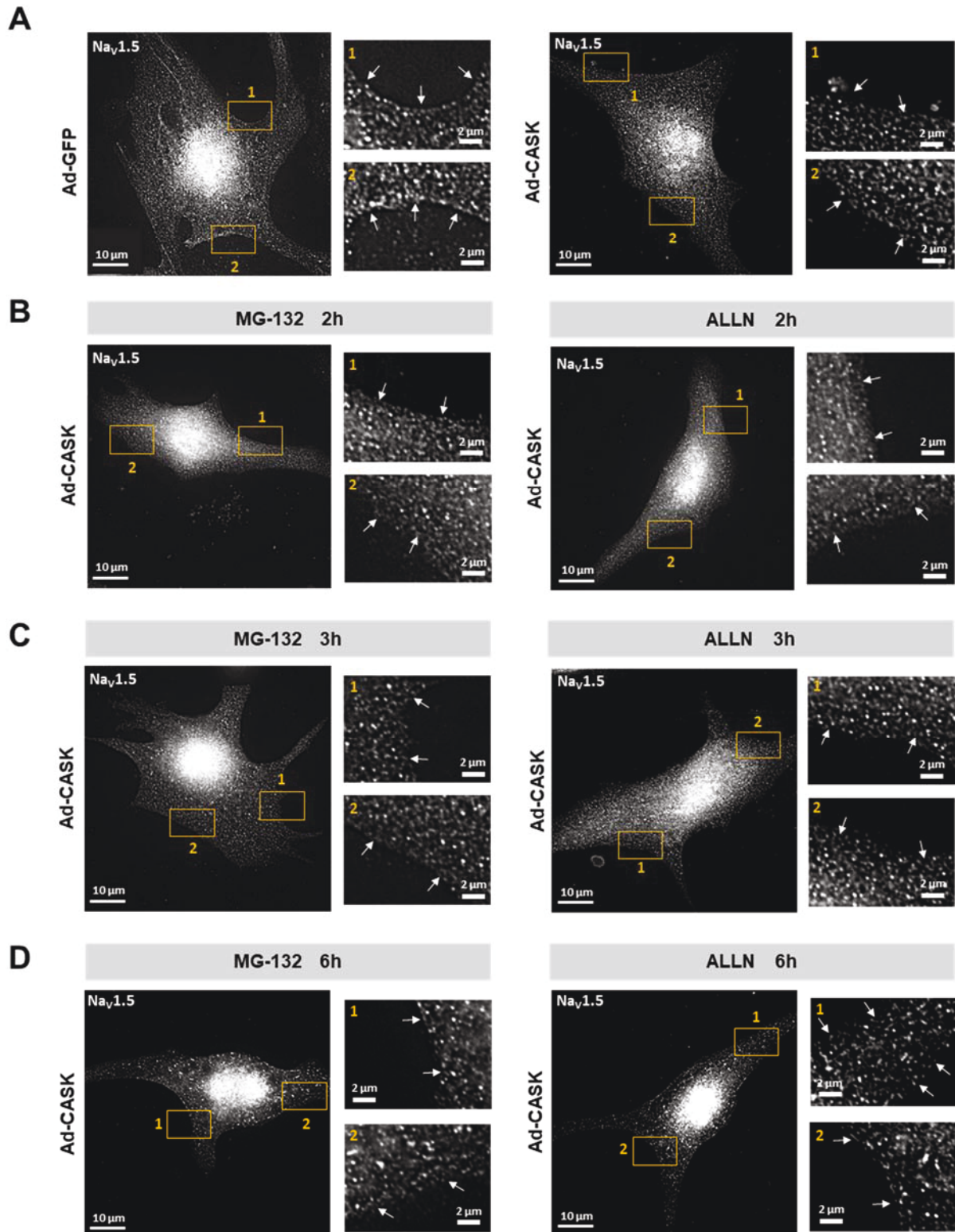


Figure 27 : Distribution du canal $Na_v1.5$ à la membrane du cardiomyocyte atrial en présence de CASK et d'inhibiteurs du protéasome. Images acquises en microscopie 3D à déconvolution avec leurs agrandissements respectifs à partir de cellules atriales de rats adultes. (A) Gauche : après infection avec un adénovirus contrôle (Ad-GFP) et droite : de surexpression de CASK (Ad-CASK). Les cellules après 4 jours d'infection ont reçu un traitement au MG-132 ou à l'ALLN durant 2h (B), 3h (C) et 6h (D). Les flèches pointent vers la membrane des cellules, représentant ici la membrane latérale.

Pour confirmer ces observations de microscopie, l'intensité moyenne de la fluorescence à la membrane latérale des cellules, dans les conditions traitées au MG-132 ou à l'ALLN *versus* non traitées, a été quantifiée (Figure 28 A). Les résultats montrent une diminution significative de l'intensité de fluorescence à la membrane latérale des cellules (d'environ 20%) dès lors qu'elles surexpriment la protéine CASK (Figure 28 B) par rapport à la condition contrôle (Ad-GFP). Cette différence significative reste inchangée lors des traitements avec les inhibiteurs du protéasome ALLN et MG-132 (Figure 28 B). Ainsi, CASK influence négativement la densité de canaux sodiques présents à la membrane latérale des cellules mais cette régulation n'emprunte pas la voie de trafic rétrograde et ne favorise pas une rétention des canaux dans les vésicules en vue d'une dégradation par le protéasome.

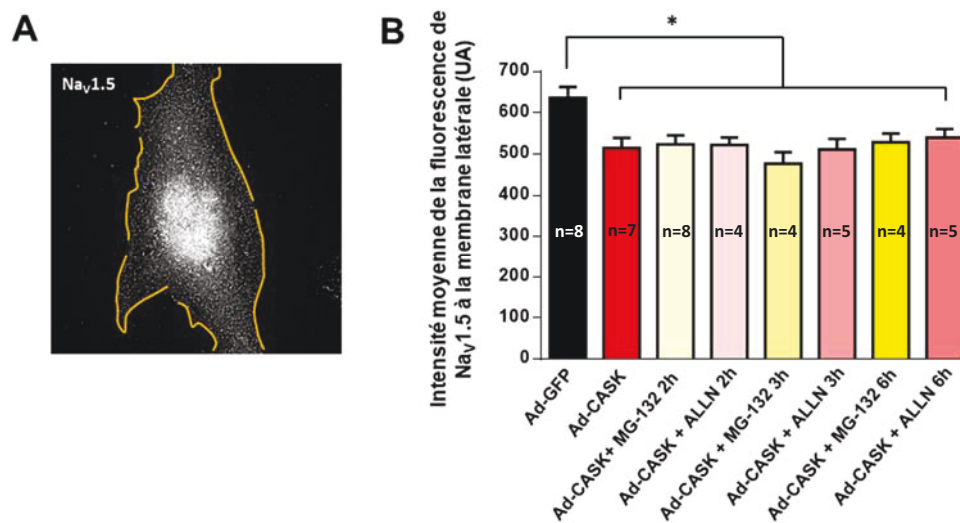


Figure 28 : La protéine CASK ne participe pas à la dégradation des canaux Nav1.5.

(A) Exemple d'image obtenue en microscopie 3D à déconvolution. Les tracés en jaune représentent ceux utilisés pour quantifier l'intensité de fluorescence à la membrane latérale des myocytes atriaux de rats adultes. (B) Histogramme représentant l'intensité de fluorescence moyenne du marquage Nav1.5 mesurée à la membrane des cardiomyocytes atriaux de rats adultes. Les cellules ont été infectées par des adénovirus contrôle (Ad-GFP) ou de surexpression de CASK (Ad-CASK). Ces dernières ont ensuite reçu un traitement à l'ALLN ou un traitement au MG-132 pendant 2h, 3h et 6h. (*) $P < 0,05$.

Des expériences supplémentaires de patch-clamp ont été réalisées afin d'étudier l'impact du traitement avec un inhibiteur du protéasome sur le courant sodique I_{Na} après surexpression de la protéine CASK. Le MG-132 est décrit comme étant un inhibiteur du protéasome plus sélectif que l'ALLN, les enregistrements de courant se sont donc concentrés sur ce traitement en particulier. La densité moyenne de canaux sodiques à la membrane latérale n'étant pas affectée par la durée du traitement (pas de différences entre 2h et 6h) d'après les observations de microscopie, seules deux temps moyens de traitement ont été retenus : à savoir 3h et 4h. Les cellules ont été traitées et le courant enregistré durant la même journée. On constate alors que l'effet represseur de CASK sur le courant I_{Na} n'est pas aboli par la présence du MG-132 et que le courant sodique observé est significativement diminué de moitié en présence de la protéine CASK couplée ou non à un traitement

au MG-132 (Figure 29). En effet, à -20mV qui est la valeur du potentiel pour lequel on enregistre le pic du courant sodique, la densité de courant mesurée est de $-78,4 \pm 2,4$ pA/pF en condition contrôle (Ad-GFP) et de $-39,2 \pm 2,5$ pA/pF en condition de surexpression de la protéine CASK (Ad-CASK). Un traitement de 3h ou de 4h au MG-132 n'entraîne pas de hausse du courant I_{Na} qui reste significativement plus faible par rapport à la condition contrôle Ad-GFP (respectivement : $-41,7 \pm 8,5$ pA/pF et $-50,6 \pm 2,04$ pA/pF) (Figure 29). Ainsi, le courant sodique n'est pas restauré après la surexpression de la protéine CASK couplée à un traitement par un inhibiteur du protéasome dans les cellules atriales. Ces résultats supportent donc davantage les observations de microscopie précédentes et ont contribué à orienter notre étude sur l'implication de CASK dans la régulation de la voie de trafic antérograde des canaux sodiques $Na_v1.5$ en utilisant comme inhibiteur la Bréfeldine-A (voir Article 1, Figure 6).

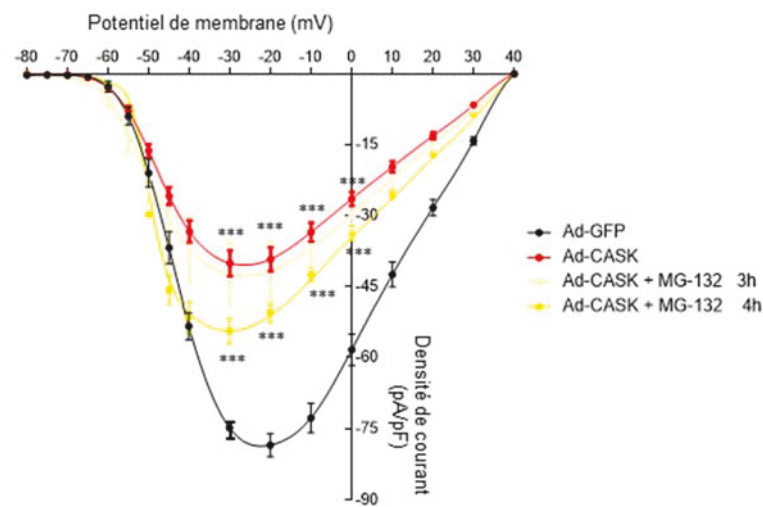


Figure 29 : Le courant sodique I_{Na} en présence de la protéine CASK surexprimée n'est pas restauré après un traitement au MG-132 dans les cellules atriales de rats adultes. Courbe relation courant-potentiel obtenue en patch-clamp, en configuration cellule entière. Pour chaque potentiel imposé (mV), une valeur de densité de courant est associée (pA/pF). Les densités de courant enregistrées dans les conditions Ad-CASK seul (rouge, n=10), Ad-CASK + traitement de 3h au MG-132 (jaune clair, n=5) ou Ad-CASK + traitement de 4h au MG-132 (jaune foncé, n=3) sont comparés aux résultats obtenus dans les cellules ayant seulement été infectées avec un adénovirus contrôle (Ad-GFP, noir, n=4). (***) $P < 0,001$

5. Conclusion

Cette étude a constitué la première description de la protéine MAGUK CASK comme étant un nouveau partenaire du complexe $Na_v1.5$ /Dystrophine-Glycoprotéines spécifiquement à la membrane latérale. L'interaction directe entre CASK et les canaux sodiques réduit leur expression fonctionnelle à la membrane latérale. Cependant, les mécanismes moléculaires régulant l'organisation spatiale et temporelle des canaux sodiques sont encore largement méconnus. Dans ce contexte, les partenaires de $Na_v1.5$ jouent donc un rôle central dans l'organisation des canaux ioniques dans les microdomaines membranaires des cardiomyocytes. De plus, par le biais de sa régulation spécifique des canaux $Na_v1.5$, CASK serait alors impliquée dans le maintien de l'anisotropie.

B. Projet 2

Caractérisation du rôle fonctionnel des différents domaines composant la protéine CASK

1. Contexte et objectif

La superfamille des protéines MAGUKs, dont CASK fait partie, est caractérisée par la présence de nombreux domaines d'interactions protéiques, tels que les domaines PDZ, SH3 ou encore GUK. La combinaison de ces domaines mais aussi leur répétition dans certaines MAGUKs, leur permettent d'interagir avec plusieurs partenaires en même temps et être ainsi intégrés au centre de larges complexes protéiques. Cette particularité de structure propre aux MAGUKs peut expliquer les rôles multiples qu'elles adoptent comme l'ancrage des canaux ioniques à la membrane, l'échafaudage de complexes macromoléculaires, l'interaction des canaux avec des seconds messagers et le trafic intracellulaire (Montgomery, Zamorano, et Garner 2004).

Suite à notre première étude, où nous avons caractérisé le rôle de la protéine CASK, nous avons axé cette seconde étude sur le rôle des domaines fonctionnels qui composent la protéine. En effet, la protéine CASK est une MAGUK dont la composition est peu conventionnelle avec notamment la présence d'un domaine homologue à la CAMKII (en N-terminal), d'un doublet de domaines L27, de domaines PDZ, SH3 et HOOK uniques et pour finir en C-terminal, le domaine GUK. De plus, il a été observé que dans les neurones et dans les cellules épithéliales, ces interactions sont importantes pour l'établissement et le maintien de la polarité des cellules (Hsueh 2009; Leonoudakis, Conti, Radeke, et al. 2004). Il a également été montré dans le neurone, que le domaine CAMKII de CASK conserve son activité de phosphorylation (Mukherjee et al. 2008) et que le domaine GUK permet à la protéine de transloquer au noyau afin d'influencer l'activité de certains facteurs de transcription (Hsueh et al. 2000). Ces capacités sont propres à la protéine CASK et ne sont pas retrouvées chez les autres MAGUKs. Ainsi, ces observations renforcent l'aspect singulier de cette protéine.

Dans le but d'identifier le/les domaine(s) d'interaction de CASK avec ses partenaires comme la Dystrophine et décortiquer les mécanismes par lesquels cette MAGUK est capable de réguler l'expression des canaux $Na_v1.5$ à la membrane latérale, nous avons généré plusieurs adénovirus. Ces derniers permettent la surexpression, dans les cardiomyocytes de rats adultes en culture, des formes tronquées de la protéine CASK. Ainsi, chacun des sept domaines qui composent la protéine ont été

délétés l'un après l'autre : CASK^{ΔCAMKII}, CASK^{ΔL27A}, CASK^{ΔL27B}, CASK^{ΔPDZ}, CASK^{ΔSH3}, et CASK^{ΔGUK}. L'utilisation d'adénovirus permettant une infection presque totale des cardiomyocytes en culture, toutes les constructions ont ainsi été testées et étudiées directement dans des cultures primaires de myocytes cardiaques. Les effets de la surexpression des formes tronquées de la protéine CASK sur la régulation des canaux sodiques a été étudiée par des approches d'électrophysiologie, de biochimie et d'imagerie. Le trafic de ces canaux lors de la surexpression de la protéine CASK et de ses formes tronquées a été caractérisé par microscopie 3D à déconvolution et TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence).



Circulation Research

Manuscript Submission and Peer Review System

Disclaimer: The manuscript and its contents are confidential, intended for journal review purposes only, and not to be further disclosed.

URL: <https://circres-submit.aha-journals.org>

Manuscript Number: CIRCRES/2018/313987

Title: CASK couples sodium channel exocytosis to cell adhesions in cardiomyocytes via distinct functional domains

Authors:

Adeline Beuriot
Catherine Eichel
Gilles Dilanian
Florent Louault
Dario Melgari
Nicolas Doisne
Alain Coulombe
Stephane Hatem
Elise Balse

For Circulation
distribute.

Circulation Research Online Submission: <https://circres-submit.aha-journals.org>

Circulation Research Homepage: <http://circres.ahajournals.org>

Circulation Research Editorial Office

3355 Keswick Rd, Main Bldg 103

Baltimore, MD 21211

CircRes@circresearch.org

Telephone: 410-327-5005

SHORT COMMUNICATION

CASK couples sodium channel exocytosis to cell adhesions in cardiomyocytes via distinct functional domains

Beuriot

Exocytosis to cell adhesion coupling by CASK

Adeline Beuriot, MSc¹, Catherine A. Eichel, PhD¹, Gilles Dilanian, MSc¹, Florent Louault, MSc¹, Dario Melgari PhD¹, Nicolas Doisne PhD^{1,2}, Alain Coulombe, PhD¹, Stéphane N. Hatem, MD, PhD^{1,2,3} and Elise Balse, PhD^{1*}

¹Sorbonne Universités - UPMC Univ Paris 06 - Inserm - UMR_S 1166 - Unité de recherche sur les maladies cardiovasculaires, le métabolisme et la nutrition - Faculté de Médecine - Site Pitié-Salpêtrière, 91 boulevard de l'Hôpital, 75013 PARIS - FRANCE

²Institute of Cardiometabolism and Nutrition, Paris, France

³Département de Cardiologie, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Pitié-Salpêtrière, PARIS - FRANCE

*Corresponding author:

Dr. Elise Balse, PhD
INSERM UMRS1166
Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière
91, Boulevard de l'Hôpital
75013 Paris
(tel) +33140779650
(fax) +33140779545
E-mail: elise.balse@upmc.fr

Total word count: 3894/4000

- Basic Science
- Membrane Transport/Ion Channels
- Physiology
- Myocyte
- Myocardium

SHORT COMMUNICATION

ABSTRACT:

Rationale: Specific molecular mechanisms underlying cardiac sodium channel trafficking and localization in cardiomyocytes directly influence anisotropic propagation of the myocardial action potential. We previously reported how the MAGUK protein CASK negatively regulates the main cardiac sodium channel, $\text{Na}_v1.5$, which carries the sodium current (I_{Na}). CASK prevents $\text{Na}_v1.5$ trafficking to the lateral membrane, reducing the number of functional channels at this cardiomyocyte membrane compartment. CASK is also a new member of the dystrophin-glycoprotein complex, and like syntrophin, binds to the C-terminal domain of the channel.

Objective: To unravel the mechanisms of CASK-mediated negative I_{Na} regulation, and interaction with the dystrophin-glycoprotein complex.

Methods and results: CASK adenoviral truncated constructs with sequential single functional domain deletions were designed for overexpression in cardiac myocytes: $\text{CASK}^{\Delta\text{CAMKII}}$, $\text{CASK}^{\Delta\text{L27A}}$, $\text{CASK}^{\Delta\text{L27B}}$, $\text{CASK}^{\Delta\text{PDZ}}$, $\text{CASK}^{\Delta\text{SH3}}$, $\text{CASK}^{\Delta\text{HOOK}}$, and $\text{CASK}^{\Delta\text{GUK}}$. Whole-cell patch clamp and total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFm) experiments showed that both L27B and GUK domains are required for the negative regulatory effect of CASK on I_{Na} and $\text{Na}_v1.5$ surface expression. Co-immunoprecipitation experiments showed that the CASK HOOK domain is essential for interaction with the dystrophin-glycoprotein complex.

Conclusion: This study demonstrates that the multi-modular structure of CASK confers an ability to simultaneously interact with several targets within cardiomyocytes. Through its L27B, GUK, and HOOK domains, CASK couples $\text{Na}_v1.5$ exocytosis to adhesion points at cardiomyocyte lateral membranes. By locally regulating $\text{Na}_v1.5$ exocytosis, CASK appears to act as a cornerstone in molecular organization of electrical polarity in cardiomyocytes.

Keywords: CASK, $\text{Na}_v1.5$, dystrophin, L27B, GUK, HOOK, cardiomyocytes

Non-standard Abbreviations and Acronyms:

- MAGUK: Membrane Associated GUanylate Kinase
- CASK: Calcium/Calmodulin-dependent Serine Kinase
- TIRFm: Total Internal Reflection Fluorescence microscopy

SHORT COMMUNICATION

INTRODUCTION

Cardiomyocytes are structurally polarized cells, possessing highly organized membrane domains characterized by specific sets of proteins. Ion channels are localized in three major cardiomyocyte membrane domains: 1) intercalated discs responsible for the electro-mechanical coupling, 2) T-tubules, excitation-contraction coupling location, and, 3) lateral membranes where focal adhesion complexes (costameres) interact with the extracellular matrix to link adjacent myocytes in the myocardium.

Intercalated discs are specialized in the rapid action potential propagation along cardiac fibers as they concentrate a number of ion channels and notably, the Na_v1.5 sodium channel. Thus sodium currents (I_{Na}) have higher amplitudes at cardiomyocyte intercalated discs than at lateral membranes^{1,2}. At the lateral membrane, costameric pools of Na_v1.5 channels account for ~30% of the total current^{3,4}, whereas T-tubule pools account for less than 20%⁵. From these observations, a model concerning the relative contribution of the different Na_v1.5 populations to action potential propagation can be defined, where the intercalated disc pool predominantly contributes. Such a configuration favors longitudinal action potential propagation over transverse propagation, and therefore determines conduction velocity in the myocardium⁶. As such, considerable efforts have been made to understand the molecular mechanisms regulating Na_v1.5 channel expression at specialized cardiomyocyte membrane domains. The currently accepted model is that Na_v1.5 channel subpopulations are organized at distinct cardiomyocyte membrane domains by specific molecular partners. For instance, Na_v1.5 channels located at the intercalated discs are associated with gap junctional, desmosomal, actin cytoskeleton-binding, and Membrane-Associated GUanylate Kinase (MAGUK) proteins, whereas Na_v1.5 channels located at the lateral membrane interact with syntrophin⁷. These Na_v1.5 partners can all positively regulate the sodium current, likely by favoring membrane anchoring and/or stabilization. Recently, we have characterized an unconventional Na_v1.5 channel partner, the MAGUK protein CASK (Calcium/Calmodulin-dependent Serine protein Kinase)⁸. In contrast to other MAGUK proteins, CASK is restricted to the lateral membranes, associates with the dystrophin-syntrophin complex, and reduces Na_v1.5 expression by impeding its anterograde trafficking to the lateral membrane.

CASK's apparent contradictory role that both targets Na_v1.5 channels to the lateral membrane and reduces their functional expression suggests a complex role for the MAGUK protein. Indeed, CASK contains multi-functional domains that can be involved in diverse protein-protein interactions. For instance, in both neurons and epithelial cells, multiple protein-protein interactions are important for establishing and maintaining polarity⁹⁻¹¹. Here we investigated the role of the different CASK domains in organizing and regulating the Na_v1.5/dystrophin-glycoprotein macromolecular complex using CASK adenoviral constructs with a single functional domain deleted each time: CASK^{ΔCAMKII}, CASK^{ΔL27A}, CASK^{ΔL27B}, CASK^{ΔPDZ}, CASK^{ΔSH3}, CASK^{ΔHOOK} and CASK^{ΔGUK}. Using a combination of whole-cell patch-clamp, total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy and biochemistry, we showed that L27B and GUK domains are involved in CASK's negative regulatory effect on I_{Na} and Na_v1.5 surface expression in cardiomyocytes. Using co-immunoprecipitation experiments, we showed that CASK's HOOK domain is responsible for interactions with the dystrophin-glycoprotein complex. This study provides mechanistic insights into how the multi-modular structure of CASK makes the link between Na_v1.5 exocytosis and cell adhesion.

METHODS

An expanded Methods section is available in the Online Data Supplement.

Cell preparations, adenovirus and adenoviral infections

SHORT COMMUNICATION

Adult rat atrial or ventricular myocytes were obtained by enzymatic dissociation on a Langendorff column as previously described⁸. CASK^{WT} and truncated sequences: CASK^{ΔCAMKII}, CASK^{ΔL27A}, CASK^{ΔL27B}, CASK^{ΔPDZ}, CASK^{ΔSH3}, CASK^{ΔHOOK}, and CASK^{ΔGUK}, were designed and cloned into a pShuttle vector with CMV promoter. Expression cassettes were transferred into the adenovirus vector containing a GFP reporter. Adult cardiomyocytes were transduced 24 h after isolation with 5.107 particles/ml of CASK^{WT}, CASK^{ΔX}, or empty vector (GFP) as negative control. Overexpression studies were performed 3 days after transduction.

Immunofluorescence and total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFm)

Immunofluorescence and TIRF microscopy images were acquired as previously described⁸. Analysis was performed using ImageJ software (NIH). Details are given in the Online Data Supplement.

Protein extraction, western blot and co-immunoprecipitation

These procedures were performed as previously reported⁸. See the Online Data Supplement for additional details.

Semi-quantitative real-time PCR

Details of specific primers designed to amplify *cas*, *scn5a* and housekeeping genes are described in the Online Data Supplement.

Electrophysiological measurements

Patch-clamp recordings were performed in the whole-cell configuration at room temperature. Detailed solutions and protocols are available in the Online Data Supplement.

Statistics

Data are represented as mean±SEM; * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$, and *** = $P < 0.001$; ^{ns} = not significant.

RESULTS

Design and expression of truncated CASK adenoviral constructs in cardiomyocytes.

We designed one full-length CASK protein corresponding to the 100 kDa cardiac isoform (CASK^{WT}) and seven domain-specific deletion versions in which one single domain was truncated at a time (CASK^{ΔX}). Deleted CASK proteins and full-length CASK were fused to a C-terminal GFP reporter (Figure 1A). GFP alone serves as a control condition. All constructs were sub-cloned into adenoviral vectors to enable overexpression in adult rat cardiomyocytes. Figure 1A shows the expected molecular weights of the various CASK isoforms. Western blot experiments performed on lysates obtained from cultured ventricular adult rat cardiomyocytes three days after adenoviral infection confirmed CASK protein overexpression at anticipated molecular weights (Figure 1B). A range of 100 to 140 kDa proteins corresponding to the full-length protein or truncated forms of CASK plus GFP was observed at significantly higher levels for CASK^{WT} and CASK^{ΔX} than the GFP control expressing only endogenous CASK (Figure 1B). RT-qPCR experiments performed on total mRNA isolated from cardiomyocytes three days after adenoviral infections demonstrated an average 6-fold increase in CASK mRNA levels for all eight constructs compared to the GFP control. Both CASK^{WT} and CASK^{ΔX} constructs had equivalent mRNA expression levels ($P < 0.001$), suggesting that all constructs had similar cardiomyocyte transduction efficacy (Figure 1C).

Characterization of CASK domains involved in sodium current regulation and Na_v1.5 surface expression in cardiomyocytes.

SHORT COMMUNICATION

We previously showed that CASK acts as a negative regulatory partner of the cardiac sodium current I_{Na} by preventing anterograde trafficking and surface expression of $Na_v1.5$ channels in the sarcolemma⁸. Here, we investigated the role of the different CASK domains in I_{Na} regulation and $Na_v1.5$ surface expression.

First, whole-cell patch-clamp experiments were conducted in adult rat cardiomyocytes three days after transduction. For all constructs, i.e. CASK^{WT} and CASK^{ΔX}, sodium current density was compared to GFP control only expressing endogenous CASK. I_{Na} was reduced by ~50% in CASK^{WT}-transduced cardiomyocytes ($P < 0.001$). Similarly, average current-voltage (I-V) plots from voltage clamp experiments showed significant decreases in I_{Na} densities at different tested voltages in CASK^{ΔCAMKII}, CASK^{ΔL27A}, CASK^{ΔPDZ}, CASK^{ΔSH3}, and CASK^{ΔHOOK}-transduced cardiomyocytes ($P < 0.001$). On the contrary, deletion of either L27B or GUK domains prevented such a reduction of I_{Na} , and both CASK^{ΔL27B} and CASK^{ΔGUK} showed similar current densities to GFP control-transduced cardiomyocytes (Figure 1A-B). Cell capacitances were similar between the different conditions, implying that CASK does not significantly influence cell growth. Activation or steady-state inactivation properties were not changed between GFP, CASK^{WT}, and CASK^{ΔX} (Figure 1C-D; Supplemental Table 1). These experiments demonstrate that CASK's I_{Na} inhibiting function is dependent on functional L27B and GUK domains.

Second, total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFm) was used to quantify the evanescent field fluorescence (EFF) intensity of the $Na_v1.5$ signal. Three days after transduction, cardiomyocytes seeded on TIRF-glass micro-dishes were fixed and stained with anti- $Na_v1.5$ antibody. Cell boundaries were delineated using differential interference contrast (DIC) images and $Na_v1.5$ EFF was quantified in critical angle in GFP control, CASK^{WT}, CASK^{ΔL27B}, and CASK^{ΔGUK} (Figure 3A). TIRF experiments showed a ~30% decrease in $Na_v1.5$ surface staining in CASK^{WT} cardiomyocytes compared to GFP control ($P < 0.001$) (Figure 3B). In contrast, the $Na_v1.5$ EFF signal in either CASK^{ΔL27B}- or CASK^{ΔGUK}-transduced myocytes was of similar intensity to that measured in GFP control (Figure 3B). As RT-qPCR and Western blot experiments did not show any changes in *scn5a* copy number and in global $Na_v1.5$ protein expression between GFP control, CASK^{WT}, and CASK^{ΔX} (Supplemental Figure 1), these results suggest that CASK negatively regulates I_{Na} by modulating $Na_v1.5$ surface expression, which involves both L27B and GUK domains.

Characterization of the CASK domain interacting with dystrophin in cardiomyocytes.

Using immunohistochemistry and co-immunoprecipitation assays, we previously reported that CASK associates with dystrophin at the lateral membrane of cardiomyocytes. Immunostaining performed on dystrophin-deficient mdx mouse ventricular cryosections showed a loss of CASK staining, suggesting that CASK expression at the lateral membrane depends on dystrophin expression⁸. Here, we investigated which CASK domain is involved in this interaction.

Western blot experiments showed that CASK^{WT} or CASK^{ΔX} overexpression did not modify dystrophin expression levels compared to GFP control (Figure 4A-B). However, the association between CASK and dystrophin was again supported by co-immunoprecipitation experiments performed on cardiomyocyte lysates overexpressing CASK^{WT} (Figure 4C). Dystrophin was able to precipitate CASK with all truncated CASK^{ΔX} constructs except for CASK^{ΔHOOK} (Figure 4C).

These results suggest that the six-amino-acid-containing HOOK domain of CASK is responsible for interactions with the dystrophin-glycoprotein complex in cardiomyocytes.

DISCUSSION

To the best of our knowledge, this study is the first to identify a partner protein coupling ion channel trafficking to specific cardiomyocyte mechano-transduction areas. We found that CASK regulates anterograde $Na_v1.5$ channel trafficking and influences channel interactions with dystrophin-glycoprotein complexes via specific L27B, GUK, and HOOK domains. Thus,

SHORT COMMUNICATION

the multi-modular structure of CASK confers an ability to simultaneously interact with several targets in cardiomyocyte, likely functioning as a cornerstone in locally directed exocytosis.

Role of L27B and GUK CASK domains in Na_v1.5 trafficking and exocytosis.

In neurons, correct synapse organization is ensured by the interaction of the extracellular domains of neurexin and neuroligin, respectively expressed in pre- and post-synaptic elements. Yeast two-hybrid screens identified CASK as an intracellular molecule interacting with neurexins¹². In the pre-synaptic terminal, a complex formed by Mint1, a vesicular trafficking-related protein that binds to Munc18, Veli, a multi-adaptor protein, and CASK, has been characterized¹³. CASK is the cornerstone of this macromolecular complex as it binds Mint1 through its CAMKII domain and Veli through its L27B domain^{13,14}. Due to its interactions with both neurexin and vesicular trafficking-related proteins, this tripartite complex has been proposed to couple synaptic vesicle exocytosis to neuronal cell adhesion. Consequently, the Mint1/Veli/CASK complex has been suggested to perform a bridging role between cargo vesicles and the anterograde molecular motor kinesin, KIF-17¹⁵. In addition, other studies have reported interactions between the CASK GUK domain and the C2B domain of rabphilin-3a, a presynaptic protein involved in synaptic vesicle exocytosis. This suggests that the rabphilin-3a/CASK/neurexin complex could participate in the guidance of presynaptic vesicles towards exocytosis zones¹⁶.

Additional proteins have also been shown to associate with this macromolecular complex, including SAP97, another MAGUK protein. Interestingly, the molecular arrangement of the complex affects receptor binding, trafficking and final targeting. For instance, differential sorting of glutamate receptor subtypes was shown to depend on SAP97/CASK interactions. When unbound from CASK, SAP97 preferentially associates with AMPARs, which are then trafficked to the plasma membrane through the classical secretory pathway. When bound to CASK, SAP97 associates with NMDARs which are then driven towards dendritic outposts instead of being retained in the endoplasmic reticulum^{17,18}. In brain, but also in polarized epithelial cells, Mint1/Veli/SAP97/CASK complexes were shown to associate with inward rectifier Kir2.x channels. While Kir channels are targeted to basolateral membranes, dominant interfering CASK forms lead to channel mislocalization¹¹.

Although the sequence of interactions of different CASK components have not yet all been completely characterized, CASK appears to play a central role in the organization of macromolecular complexes implicated in trafficking and plasma membrane localization of ion channels and receptors. Our data demonstrates that both CASK L27B and GUK domains are mandatory in regulating the functional Na_v1.5 channel expression in cardiomyocyte sarcolemma, and strongly support that CASK is involved in channel trafficking and targeting towards specialized membrane micro-domains.

Role of the CASK HOOK domain in macromolecular complex scaffolding.

We previously showed that CASK is enriched in dystrophin-glycoprotein complexes, a costameric complex located at cardiomyocyte lateral membranes⁸. Costameres constitute physical links between sarcomeric z-lines, the sarcolemma, and the extracellular matrix. They guarantee the three-dimensional organization of the myocardium when sheets of myocytes slide against each other during each contraction. Here we show that CASK interacts with dystrophin through its HOOK domain.

The HOOK domain corresponds to a protein 4.1 binding motif¹⁹. Protein 4.1 links spectrin and actin in the cytoskeleton, and thus has a role in mechanical stability and membrane protein organization²⁰. In epithelial cells, transmembrane syndecans are anchored to the actin cytoskeleton through interactions between CASK and protein 4.1²¹. In neurons, intercellular junctions formed by neurexins and neuroligins at the synapse are also connected to the actin cytoskeleton through CASK and protein 4.1 interactions²². A large macromolecular complex formed of CASK, neurexin, Mint1, Veli, protein 4.1, spectrin, and actin, organizes and stabilizes the pre-synaptic element²². Despite all members of this complex possessing PDZ domains, they are not involved in the formation of this large complex, rendering these domains free for other interactions¹³. Indeed, in heart and skeletal

SHORT COMMUNICATION

muscle cells, the Mint1/Veli/SAP97/CASK complex was also found to associate with ion channels, notably Kir2.x channels. Kir2.x channels also interact with components of the dystrophin-glycoprotein complex including syntrophins, dystrophin, and dystrobrevin at the neuromuscular junction, although with lower affinities²³. These data are consistent with previous findings showing that the PDZ-binding domain of Nav1.5 channels is able to interact with both CASK and syntrophin in cardiomyocytes^{3,8}. By interacting with either syntrophin or CASK, Nav1.5 could be regulated in opposite directions, as syntrophin positively regulates I_{Na} at the lateral membrane^{3,7}. The fact that CASK^{ΔHOOK} does not rescue I_{Na} suggests that the HOOK domain is not involved in channel trafficking, but is instead critical in organizing focal adhesions, notably the dystrophin-glycoprotein complex implicated in mechano-transduction. This point is particularly interesting as Nav1.5 channels are not homogeneously distributed along the lateral membrane but are concentrated at costameres²⁴. Therefore, CASK could adjust Nav1.5 channel exocytosis in response to changes in myocardium working conditions.

In summary, our data indicate that CASK couples Nav1.5 exocytosis to cell adhesion complexes at cardiomyocyte lateral membranes through its multi-modular organization. This study further establishes CASK's role in the organization of cardiomyocyte Nav1.5 subpopulations. An unanswered question is how a protein that regulates Nav1.5 channel trafficking and anchoring, also inhibits the corresponding ionic current. We can only speculate that the costameric macromolecular complex containing CASK constitutes a submembrane dead-end of non-functional channels, as is already described for non-junctional Cx43/Nav1.5 channels in the perinexus²⁵.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Rachel Peat for careful reading of the manuscript and helpful comments.

SOURCE OF FUNDING

This work was supported by the European Union (EUTRAF-261057; EB and SNH), and by the AFM-Telethon (17758; EB) and doctoral fellowship (21324; AB).

DISCLOSURES

None.

REFERENCES

1. Verkerk AO, van Ginneken ACG, van Veen TAB, Tan HL. Effects of heart failure on brain-type Na⁺ channels in rabbit ventricular myocytes. *Europace*. 2007;9:571–577.
2. Lin X, Liu N, Lu J, Zhang J, Anumonwo JM, Isom LL, Fishman GI, Delmar M. Subcellular heterogeneity of sodium current properties in adult cardiac ventricular myocytes. *Heart Rhythm*. 2011;8:1923–30.
3. Gavillet B, Rougier JS, Domenighetti AA, Behar R, Boixel C, Ruchat P, Lehr HA, Pedrazzini T, Abriel H. Cardiac sodium channel Nav1.5 is regulated by a multiprotein complex composed of syntrophins and dystrophin. *Circ Res*. 2006;99:407–14.
4. Petitprez S, Zmoos AF, Ogrodnik J, Balse E, Raad N, El-Haou S, Albasa M, Bittihn P, Luther S, Lehnart SE, Hatem SN, Coulombe A, Abriel H. SAP97 and dystrophin macromolecular complexes determine two pools of cardiac sodium channels Nav1.5 in cardiomyocytes. *Circ Res*. 2011;108:294–304.
5. Orchard C, Brette F. t-Tubules and sarcoplasmic reticulum function in cardiac ventricular myocytes. *Cardiovasc Res*. 2008;77:237–244.
6. Spach MS. Anisotropy of cardiac tissue: a major determinant of conduction? *J Cardiovasc Electrophysiol*. 1999;10:887–890.
7. Balse E, Eichel C. The Cardiac Sodium Channel and Its Protein Partners. *Handb Exp Pharmacol*. 2018;246:73–99.

SHORT COMMUNICATION

- Eichel CA, Beuriot A, Chevalier M, Rougier J-S, Louault F, Dilanian G, Amour J, Coulombe A, Abriel H, Hatem SN, Balse E. Lateral Membrane-Specific MAGUK CASK Down-Regulates Nav1.5 Channel in Cardiac Myocytes. *Circ Res*. 2016;
- Atasoy D, Schoch S, Ho A, Nadasy KA, Liu X, Zhang W, Mukherjee K, Nosyreva ED, Fernandez-Chacon R, Missler M, Kavalali ET, Südhof TC. Deletion of CASK in mice is lethal and impairs synaptic function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:2525–2530.
- Hsueh Y-P. The role of the MAGUK protein CASK in neural development and synaptic function. *Curr Med Chem*. 2006;13:1915–1927.
- Leonoudakis D, Conti LR, Radeke CM, McGuire LM, Vandenberg CA. A multiprotein trafficking complex composed of SAP97, CASK, Veli, and Mint1 is associated with inward rectifier Kir2 potassium channels. *J Biol Chem*. 2004;279:19051–63.
- Hata Y, Butz S, Südhof TC. CASK: a novel dlg/PSD95 homolog with an N-terminal calmodulin-dependent protein kinase domain identified by interaction with neuexins. *J Neurosci*. 1996;16:2488–94.
- Butz S, Okamoto M, Südhof TC. A tripartite protein complex with the potential to couple synaptic vesicle exocytosis to cell adhesion in brain. *Cell*. 1998;94:773–782.
- Borg JP, López-Figueroa MO, de Taddèo-Borg M, Kroon DE, Turner RS, Watson SJ, Margolis B. Molecular analysis of the X11-mLin-2/CASK complex in brain. *J Neurosci*. 1999;19:1307–1316.
- Wong-Riley MTT, Besharse JC. The kinesin superfamily protein KIF17: one protein with many functions. *Biomol Concepts*. 2012;3:267–282.
- Zhang Y, Luan Z, Liu A, Hu G. The scaffolding protein CASK mediates the interaction between rabphilin3a and beta-neurexins. *FEBS Lett*. 2001;497:99–102.
- Jeyifous O, Waites CL, Specht CG, Fujisawa S, Schubert M, Lin E, Marshall J, Aoki C, de Silva T, Montgomery JM, Garner CC, Green WN. SAP97 and CASK mediate sorting of N-Methyl-D-Aspartate Receptors through a novel secretory pathway. *Nat Neurosci*. 2009;12:1011–1019.
- Lin EI, Jeyifous O, Green WN. CASK Regulates SAP97 Conformation and Its Interactions with AMPA and NMDA Receptors. *J Neurosci*. 2013;33:12067–12076.
- Hanada T, Takeuchi A, Sondarva G, Chishti AH. Protein 4.1-mediated membrane targeting of human discs large in epithelial cells. *J Biol Chem*. 2003;278:34445–34450.
- Baines AJ, Lu H-C, Bennett PM. The Protein 4.1 family: hub proteins in animals for organizing membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1838:605–619.
- Cohen AR, Woods DF, Marfatia SM, Walther Z, Chishti AH, Anderson JM. Human CASK/LIN-2 binds syndecan-2 and protein 4.1 and localizes to the basolateral membrane of epithelial cells. *J Cell Biol*. 1998;142:129–38.
- Biederer T, Südhof TC. CASK and protein 4.1 support F-actin nucleation on neuexins. *J Biol Chem*. 2001;276:47869–47876.
- Leonoudakis D, Conti LR, Anderson S, Radeke CM, McGuire LM, Adams ME, Froehner SC, Yates 3rd JR, Vandenberg CA. Protein trafficking and anchoring complexes revealed by proteomic analysis of inward rectifier potassium channel (Kir2.x)-associated proteins. *J Biol Chem*. 2004;279:22331–46.
- Bhargava A, Lin X, Novak P, Mehta K, Korchev Y, Delmar M, Gorelik J. Super-resolution scanning patch clamp reveals clustering of functional ion channels in adult ventricular myocyte. *Circ Res*. 2013;112:1112–1120.
- Rhett JM, Ongstad EL, Jourdan J, Gourdie RG. Cx43 Associates with Nav1.5 in the Cardiomyocyte Perinexus. *J Membr Biol*. 2012;245:411–422.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Validation of CASK adenoviral constructs in cardiomyocytes. (A) Schematic representation of CASK structure, domain-specific deletions, and expected molecular weights. (B) Representative western blot showing CASK expression in cultured rat cardiomyocytes transduced with each truncated CASK construct. CASK^{WT} fused to GFP

SHORT COMMUNICATION

corresponds to a ~140 kDa band. GAPDH served as a loading control. **(C)** RT-qPCR histogram of CASK mRNA expression levels in cardiomyocytes transduced with GFP, CASK^{WT}, or CASK^{ΔX}, where ^{ΔX} corresponds to any deletion. CASK mRNA levels in cardiac cells is normalized to endogenous CASK mRNA levels under control conditions (GFP). Legend: ns = not significant; *** = P<0.001; n = number of samples; N = 3-7 individual experiments.

Figure 2. Both L27B and GUK CASK domains are implicated in the downregulation of the cardiac sodium current I_{Na} in cultured cardiomyocytes. **(A)** Current density-voltage relationships (25 mmol/L $[Na^+]_o$) of I_{Na} obtained from cardiomyocytes transduced with GFP control (black), CASK^{WT} (red), or truncated forms of CASK (CASK^{ΔX}). **(B)** Histogram of I_{Na} current density recorded at -20mV normalized to GFP control. **(C-D)** Voltage-dependent activation and steady-state inactivation curves from cardiomyocytes transduced with GFP control (black), CASK^{WT} (red), or truncated forms of CASK (CASK^{ΔX}). Legend: ns = not significant; *** = P<0.001; n = number of recorded cells; N = 3-16 independent experiments.

Figure 3. Deleting L27B or GUK CASK domains increases cardiac $Na_v1.5$ channel surface expression. **(A)** Total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFm) images of $Na_v1.5$ taken from fixed cultured cardiomyocytes transduced with either GFP, CASK^{WT}, CASK^{ΔL27B}, or CASK^{ΔGUK}. **(B)** Histogram of $Na_v1.5$ evanescent field fluorescence (EFF) intensity in arbitrary units (in % of GFP control). Legend: ns = not significant; * = P < 0.05, *** = P < 0.001; n = number of cells; N = 4 independent experiments.

Figure 4. CASK interacts with dystrophin through its HOOK domain in cultured rat cardiomyocytes. **(A)** Representative Western blot of dystrophin expression after overexpression of either GFP, CASK^{WT}, or CASK^{ΔX}. **(B)** Corresponding histogram showing the dystrophin expression level normalized to GAPDH in cardiomyocytes transduced infected with the different adenoviral constructs (N=5 independent experiments). **(C)** Representative co-immunoprecipitation assay performed on cardiomyocyte lysates after transduction with CASK^{WT} or CASK^{ΔX} showing the loss of association with dystrophin for the CASK^{ΔHOOK} construct (N=3 independent experiments). Legend: ns = not significant.

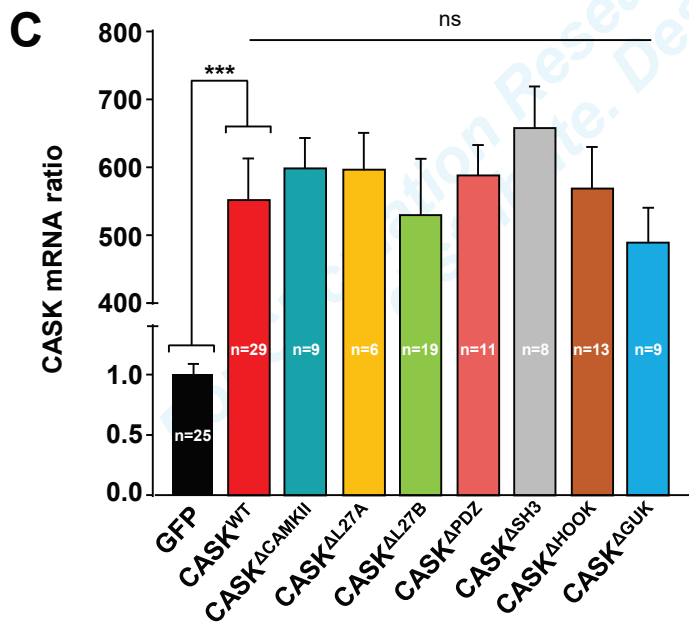
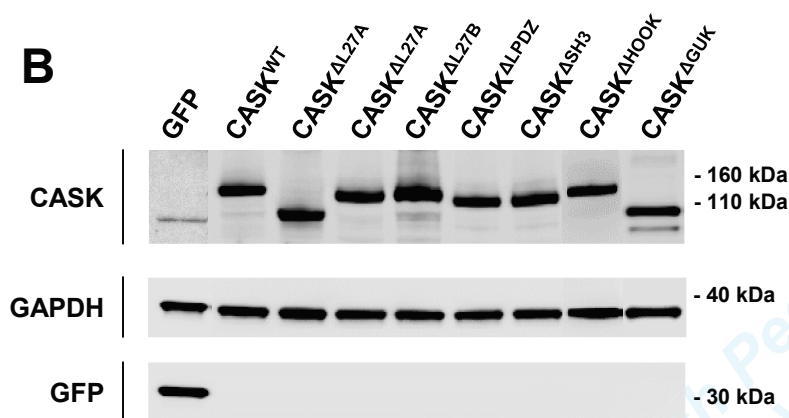
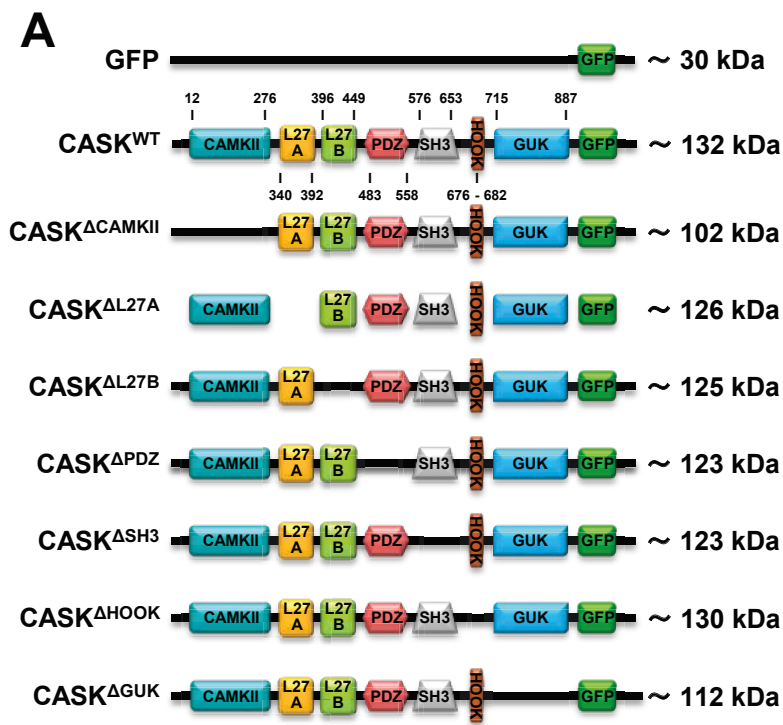


Figure 1. Validation of CASK adenoviral constructs in cardiomyocytes. (A) Schematic representation of CASK structure, domain-specific deletions, and expected molecular weights. (B) Representative western blot showing CASK expression in cultured rat cardiomyocytes transduced with each truncated CASK construct. CASK^{WT} fused to GFP corresponds to a ~140 kDa band. GAPDH served as a loading control. (C) RT-qPCR histogram of CASK mRNA expression levels in cardiomyocytes transduced with GFP, CASK^{WT}, or CASK^{ΔX}, where ^{ΔX} corresponds to any deletion. CASK mRNA levels in cardiac cells is normalized to endogenous CASK mRNA levels under control conditions (GFP). Legend: ns = not significant; *** = P<0.001; n = number of samples; N = 3-7 individual experiments.

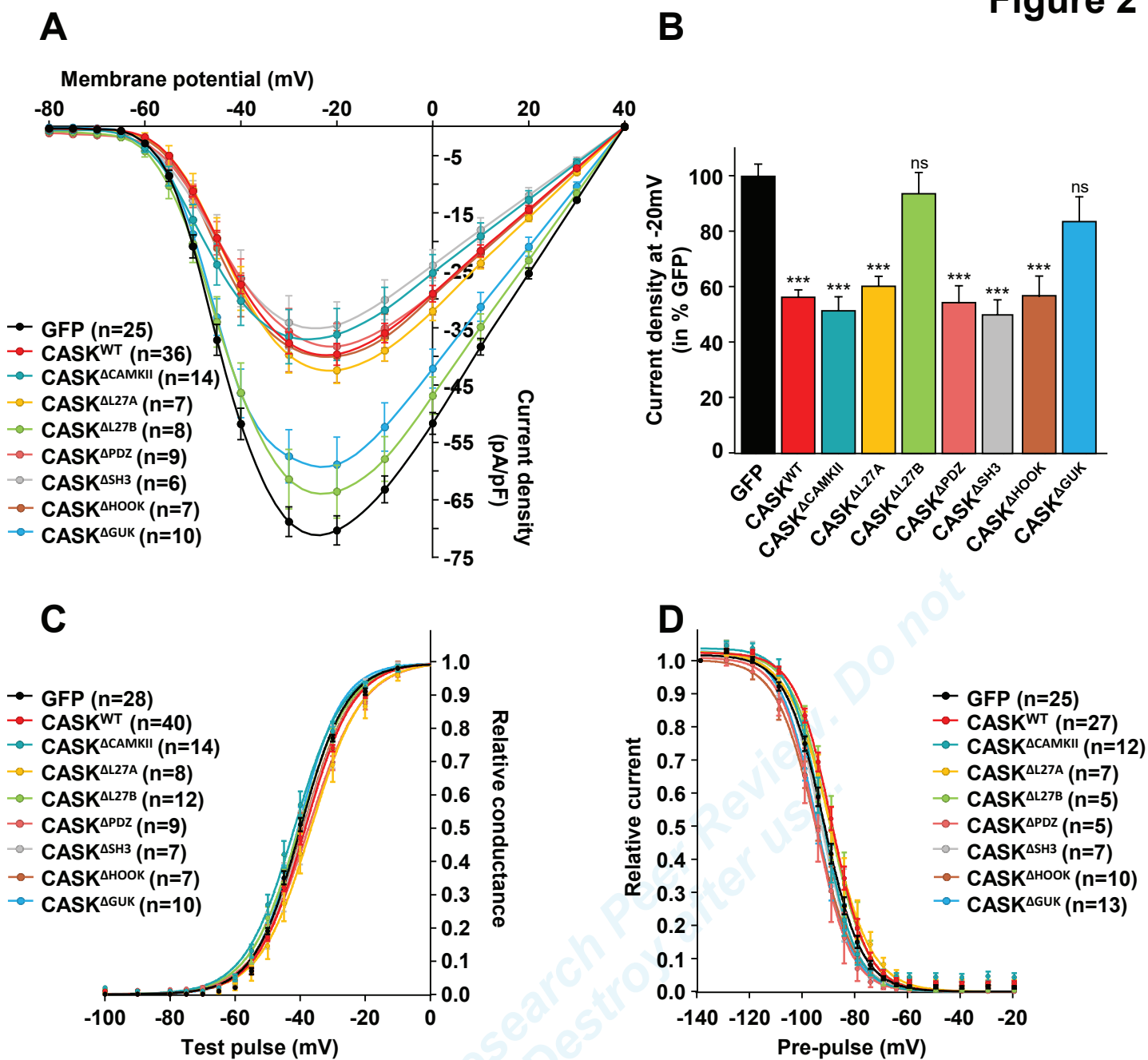
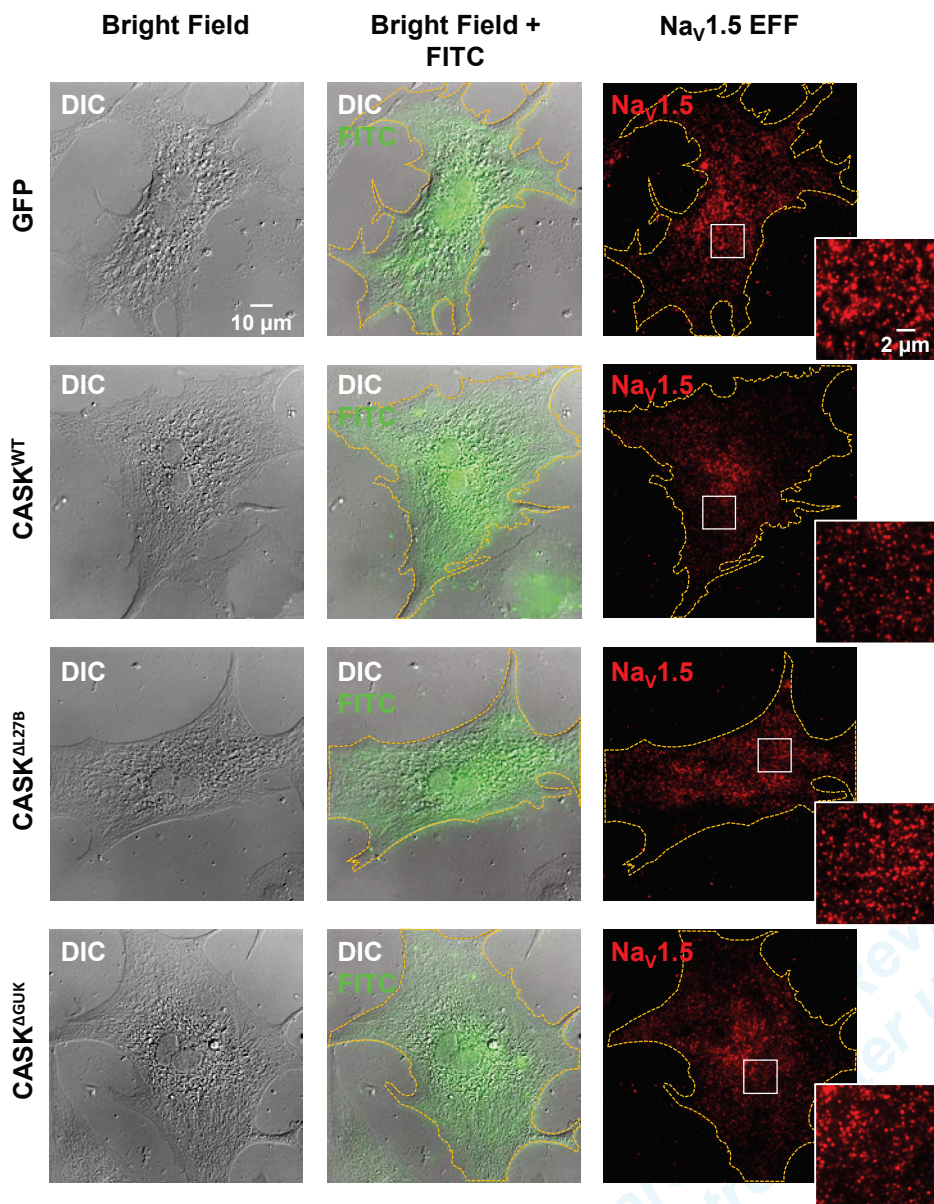


Figure 2. Both L27B and GUK CASK domains are implicated in the downregulation of the cardiac sodium current I_{Na} in cultured cardiomyocytes. (A) Current density-voltage relationships (25 mmol/L $[Na^+]_o$) of I_{Na} obtained from cardiomyocytes transduced with GFP control (black), CASK^{WT} (red), or truncated forms of CASK (CASK^{ΔX}). **(B)** Histogram of I_{Na} current density recorded at -20mV normalized to GFP control. **(C-D)** Voltage-dependent activation and steady-state inactivation curves from cardiomyocytes transduced with GFP control (black), CASK^{WT} (red), or truncated forms of CASK (CASK^{ΔX}). Legend: ns = not significant; *** = $P < 0.001$; n = number of recorded cells; N = 3-16 independent experiments.

A



B

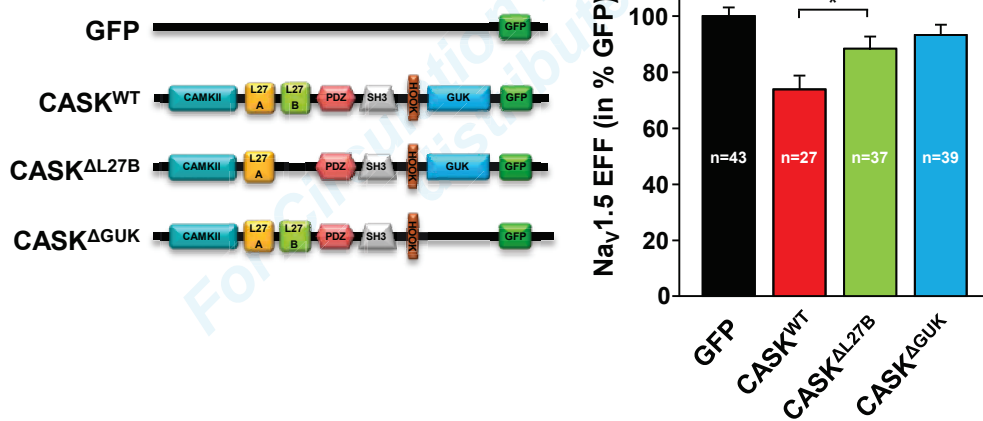


Figure 3. Deleting L27B or GUK CASK domains increases cardiac Na_v1.5 channel surface expression. (A) Total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFm) images of Na_v1.5 taken from fixed cultured cardiomyocytes transduced with either GFP, CASK^{WT}, CASK^{ΔL27B}, or CASK^{ΔGUK}. (B) Histogram of Na_v1.5 evanescent field fluorescence (EFF) intensity in arbitrary units (in % of GFP control). Legend: ns = not significant; * = P < 0.05; *** = P < 0.001; n = number of cells; N = 4 independent experiments.

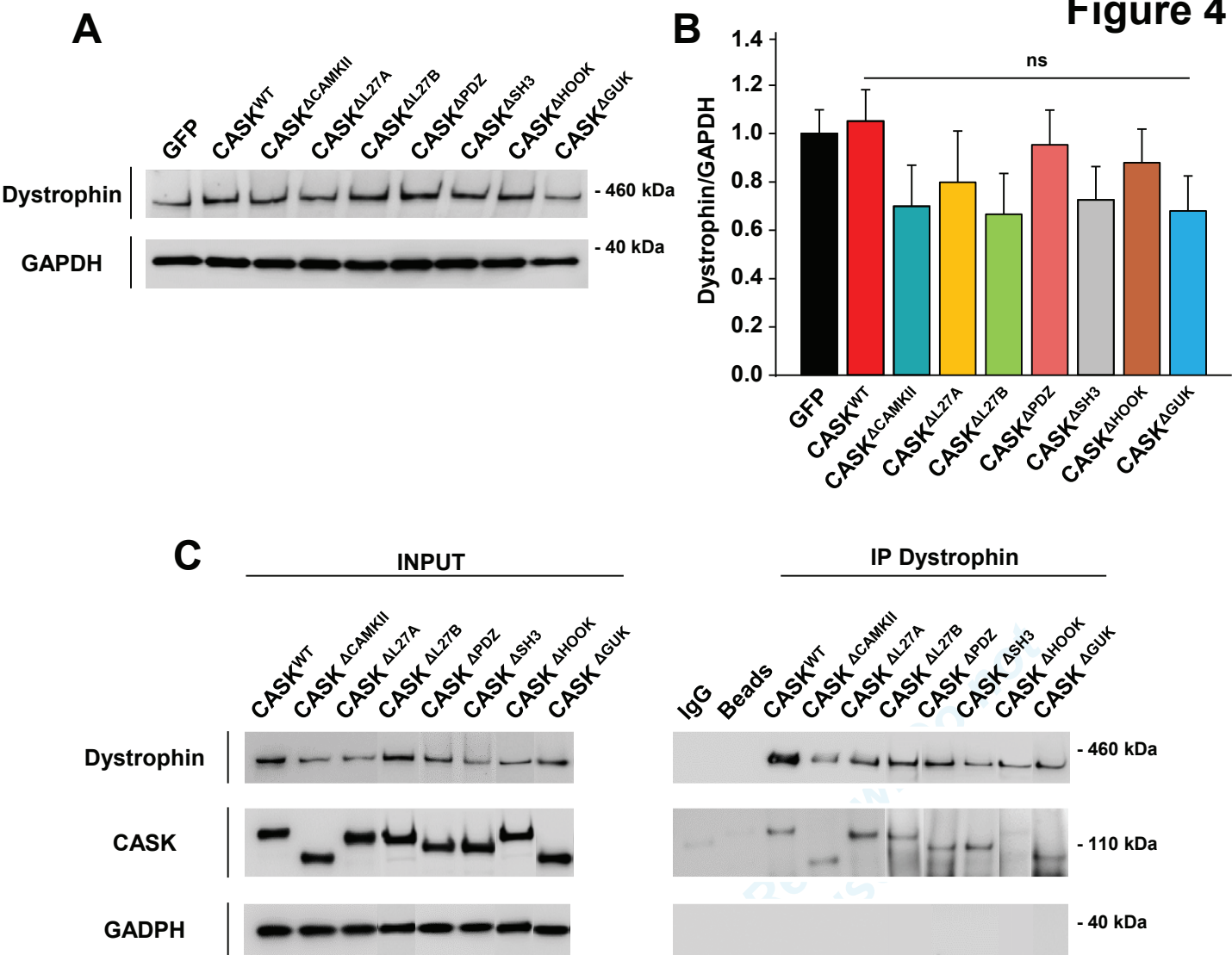


Figure 4. CASK interacts with dystrophin through its HOOK domain in cultured rat cardiomyocytes. (A) Representative Western blot of dystrophin expression after overexpression of either GFP, CASK^{WT}, or CASK^{ΔX}. (B) Corresponding histogram showing the dystrophin expression level normalized to GAPDH in cardiomyocytes transduced infected with the different adenoviral constructs (N=5 independent experiments). (C) Representative co-immunoprecipitation assay performed on cardiomyocyte lysates after transduction with CASK^{WT} or CASK^{ΔX} showing the loss of association with dystrophin for the CASK^{ΔHOOK} construct (N=3 independent experiments). Legend: ns = not significant.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

DETAILED METHODS

Animals

Studies were performed in adult male Wistar rats (~200 g, Janvier Labs, France). All animals were treated in accordance with French Institutional guidelines (Ministère de l'Agriculture, France, authorization 75-1090) and conformed to the Directive 2010/63/EU of the European Parliament for the use and care of animals.

Isolation and culture of adult rat cardiomyocytes

Adult atrial or ventricular cardiomyocytes were obtained by enzymatic dissociation on a Langendorff column as previously described¹. Briefly, rats were anesthetized with an i.p. injection of pentobarbital sodium (110 mg/kg) and heparin sodium (250 units/kg). The heart was then excised and cannulated via the aorta on a Langendorff apparatus and perfused in a constant flow rate (5mL/min). The perfusate consisted as an enzymatic solution containing in mmol/L: NaCl 100, KCl 4, MgCl₂ 1.7, glucose 10, NaHCO₃ 5.5, KH₂PO₄ 1, HEPES 22, BDM 15 and 200UI/mL collagenase A (Roche Diagnostics) plus bovine serum albumin 7.5, pH 7.4 (NaOH) for ~20 min. Solution was equilibrated with 95% O₂ and 5% CO₂ and maintained at a temperature of 37°C. Atrial and ventricular tissues were separated and cut into small pieces and cells were gently dissociated with pipettes in Kraft-Brühe (KB) solution, in mmol/L: glutamate Acid Potassium Salt Monohydrate 70, KCl 25, Taurine 20, KH₂PO₄ 10, MgCl₂ 3, EGTA 0.5, Glucose 10, and HEPES 10. Cardiomyocytes were plated on Petri dishes or Ibidi micro-dishes double-coated with Poly-D-lysine/laminin (Roche/Sigma). Cells were maintained under standard conditions (37°C, 5% CO₂) in M199 medium (Gibco) supplemented with 1% penicillin/streptomycin (Gibco), 5% fetal bovine serum (Gibco) and 1% insulin/transferrin/selenium cocktail (Sigma). Isolated cells were used for immunofluorescence, biochemistry experiments or patch-clamp recordings after 3-5 days in culture.

Adenoviruses

Full-length CASK (CASK^{WT}) and truncated sequences (CASK^{ΔCAMKII}, CASK^{ΔL27A}, CASK^{ΔL27B}, CASK^{ΔPDZ}, CASK^{ΔSH3}, CASK^{ΔHOOK}, CASK^{ΔGUK}) were designed and cloned into a pShuttle vector with CMV promoter. Expression cassettes were transferred into the adenovirus vector containing GFP reporter for selection of infected cells. All the production, amplification and purification process were conducted by a Vector Production Center (Gene Therapy Laboratory, INSERM U1089, IRT-1, Nantes, France). Rat adult cardiomyocytes were infected 24h after isolation with 5.107 particles/ml of CASK^{WT}, CASK^{ΔX} or empty vector (GFP) as negative control. Overexpression studies were performed 3 days post transduction.

Immunofluorescence and deconvolution microscopy

Cells fixation was performed with paraformaldehyde 4% (Sigma) for 10 min at room temperature (RT). For permeabilization, cells were incubated in PBS supplemented with 0.1% Triton X-100, 1% BSA, 10% sera for 1h at RT. Primary antibodies were applied over night at 4°C with blocking buffer (PBS containing 1% BSA, 3% sera, diluted antibodies according to the manufacturer's instructions. Secondary antibodies (2.5 to 5 μg/mL) FITC (Abcam) or AlexaFluor594 (Life Technologies) and DAPI (0.2μg/μL Sigma) to detect nuclei were diluted in blocking buffer and added on samples for 1h incubation at RT.

Total Internal Reflection Fluorescence microscopy (TIRFm)

Fluorescence intensity at surface membrane was visualized using the Olympus CellTIRF system. Cells were placed on an Olympus IX81-ZDC2 inverted microscope and TIRF illumination was achieved with the motorized integrated TIRF illuminator combiner (MITICO-2L) and dual band optical filter (M2TIR488-561) using a 60X/1.49 APON OTIRF oil immersion objective, allowing GFP and RFP visualization. All image acquisitions, TIRF angle adjustment and some of the

analysis were performed using the xcellence software (Olympus). Fluorescence analysis were performed using ImageJ software (NIH).

Protein extraction

Cardiomyocytes expressing the appropriate constructs were lysed by scraping the cells into a lysis buffer, in mmol/L: Tris 50 (pH 7.5), NaCl 150, EDTA 2, 1% Triton X-100 and 1 % protease cocktail inhibitor (Sigma Aldrich) and lysates were placed on a rotating 3D shaker for 1h at 4°C. After centrifugation, protein concentrations per supernatant were then determined by the BCA method (Pierce).

Co-Immunoprecipitation assays

Cardiomyocytes were lysed as described above. Lysates were then incubated all night with antibodies (10µg) or IgG mouse (0.1µg/mL) at 4°C on a rotating 3D shaker. G-Sepharose beads (50µL for 2mg of total proteins, Sigma) were added for 1h before being washed with lysis buffer 3 times. Protein complexes bound to washed-beads were eluted with 2X sample buffer, followed by a denaturation step before separation by western blot.

Western Blot analysis

NuPAGE® Novex® 10 % Bis-Tris or 3-8 % Tris acetate gels (Life Technologies) were used, depending on the size of expected proteins. Proteins were transferred onto nitrocellulose membrane (Biorad) and blocked with 5% nonfat dry milk for 60 min and probed overnight at 4°C with primary antibodies. Anti-rabbit or anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Cell Signaling) were used before revealing membrane with a chemiluminescent detection reagent ECL Prime (GE Healthcare). Images were acquired using a ImageQuant LAS4000 camera system (GE Healthcare) and then analyzed with the ImageJ software. The relevant spots were measured and normalized versus that of the corresponding spot in the control condition. These normalized densities were averaged from at least 3 separate experiments.

Antibodies

Polyclonal rabbit antibody recognizing Na_v1.5 was obtained from Alomone Labs (ASC-005, 8µg/mL). Monoclonal mouse anti-CASK used for biochemical assays were from Origene (Clone S56A-50, TA326522, 1.5-5µg/mL) and Merck Millipore (Clone 2G5.1, MABN1547, 0.6µg/mL). Monoclonal rabbit anti-GAPDH was purchased from Cell Signaling (Clone 14C10, 2118, 1:40000). Polyclonal rabbit anti-GFP used for immunocytochemistry (0.3µg/mL) and western blotting (2µg/mL) was obtained from CliniSciences (TP401). Monoclonal mouse anti-Dystrophin (Clone MANDYS8, D8168, 0.6µg/mL) used for biochemical assays were purchased from Sigma.

Real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Total mRNA was extracted from cells in culture by using PureLink® RNA Mini Kit (Life Technologies) and quantified by assessing optical density at 260 and 280 nm via a NanoDrop apparatus (Thermo Scientific). cDNA was synthesized using a mix of random primers, DNTP, Oligo DT12-18 follow by the addition of Superscript™ III reverse transcriptase (Life Technologies). Quantitative real-time PCR were carried out using SensiFAST™ SYBR No-ROX (2X, Biorad) on a LightCycler 480 System (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's specifications. All qPCR samples were run in duplicate and for each primer pair, a non-template control (NTC) was applied. Specific primers were designed to amplify *cask* (*cask*-F: CCAGGATCAGCATCTTCAC and *cask*-R: TGGCTCTCTGTAAGTGCATCG) and *scn5a* (*scn5a*-F: TATGTCCTCAGCCCCTTCC and *scn5a*-R: GAACACGCAGTTGGTCAGG). All data were normalized to mRNA level of housekeeping genes *polr2a*, *rplp0* and *rpl32* (*polr2a*-F: CGTATCCGCATCATGAACAGTGA and *polr2a*-R: TCATCCATCTTATCCACCACCTCTT; *rplp0*-F: CGACCTGGAAGTCCAACACTAC and *rplp0*-R: GTCTGCTCCCACAATGAAG; *rpl32*-F:

CCAGAGGCATCGACAACA and *rpl32*-R: GCACTTCCAGCTCCTTGA) using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

Electrophysiology

Sodium current was recording in standard whole-cell patch clamp. The perfusion medium for recording I_{Na} was composed, in mmol/L: NaCl 25, CsCl 108.5, HEPES 10, glucose 10, MgCl₂ 2.5, CoCl₂ 2.5, CaCl₂ 0.5 and supplemented with 1 μmol/L of ryanodine, pH adjusted to 7.4 with CsOH. The intrapipette conducting medium was composed, in mmol/L: NaCl 5, MgCl₂ 2, CaCl₂ 1, EGTA 15, HEPES 10, MgATP 4, CsCl 130, pH adjusted to 7.2 with CsOH. For the current-V_m and activation (m_{∞}) protocol, currents were elicited by 50ms depolarizing pulses from a holding potential of -120 mV, in 5 or 10 mV increments, between -100 and +60 mV, at a frequency of 0.2 Hz. For the steady-state availability-V_m protocol (h_{∞}), currents were elicited by a 50ms test pulse to -20 mV following 1s pre-pulses applied in 5 or 10 mV increments, between -140 mV and -20 mV, from a holding potential of -120 mV, at 0.2 Hz.

Statistics

Data were tested for normality using the D'Agostino and Pearson normality test. Statistical analysis was performed using Student's t test or ANOVA followed by post-hoc Student-Newman-Keuls test on raw data. Results are given as means ± SEM and P values of less than 0.05 were considered significant (Legend: * = P<0.05, ** = P<0.01 and *** = P<0.001; ns = not significant). N corresponds to the number of independent experiments, and n to the number of samples.

REFERENCES

1. Eichel CA, Beuriot A, Chevalier MYE, Rougier J-S, Louault F, Dilanian G, Amour J, Coulombe A, Abriel H, Hatem SN, Balse E. Lateral Membrane-Specific MAGUK CASK Down-Regulates NaV1.5 Channel in Cardiac Myocytes. *Circ Res*. 2016;119:544–556.

A

Peak current density at -20 mV

	Mean raw data (pA/pF)	Current density (% from GFP)	Cell capacitance (pF)
GFP	-70.36 ± 2.92 (n=25)	100 ± 4.15 (n=25)	53.12 ± 2.39 (n=25)
CASK ^{WT}	-39.64 ± 1.90 (n=36) ***	56.34 ± 2.70 (n=36) ***	48.82 ± 2.44 (n=36) ^{ns}
CASK ^{ΔCAMKII}	-36.18 ± 3.66 (n=14) ***	51.43 ± 5.21 (n=14) ***	47.58 ± 2.49 (n=14) ^{ns}
CASK ^{ΔL27A}	-42.40 ± 2.49 (n=7) ***	60.27 ± 3.54 (n=7) ***	46.01 ± 3.44 (n=7) ^{ns}
CASK ^{ΔL27B}	-65.94 ± 5.34 (n=8) ^{ns}	93.73 ± 7.59 (n=8) ^{ns}	54.47 ± 5.97 (n=8) ^{ns}
CASK ^{ΔPDZ}	-38.27 ± 4.26 (n=9) ***	54.39 ± 6.05 (n=9) ***	54.17 ± 5.94 (n=9) ^{ns}
CASK ^{ΔSH3}	-34.56 ± 4.45 (n=6) ***	49.12 ± 6.32 (n=6) ***	44.51 ± 3.77 (n=6) ^{ns}
CASK ^{ΔHOOK}	-40.02 ± 4.91 (n=7) ***	56.88 ± 6.99 (n=7) ***	49.25 ± 6.50 (n=7) ^{ns}
CASK ^{ΔGUK}	-58.88 ± 6.24 (n=10) ^{ns}	83.69 ± 8.86 (n=10) ^{ns}	53.49 ± 3.51 (n=10) ^{ns}

B

Activation properties

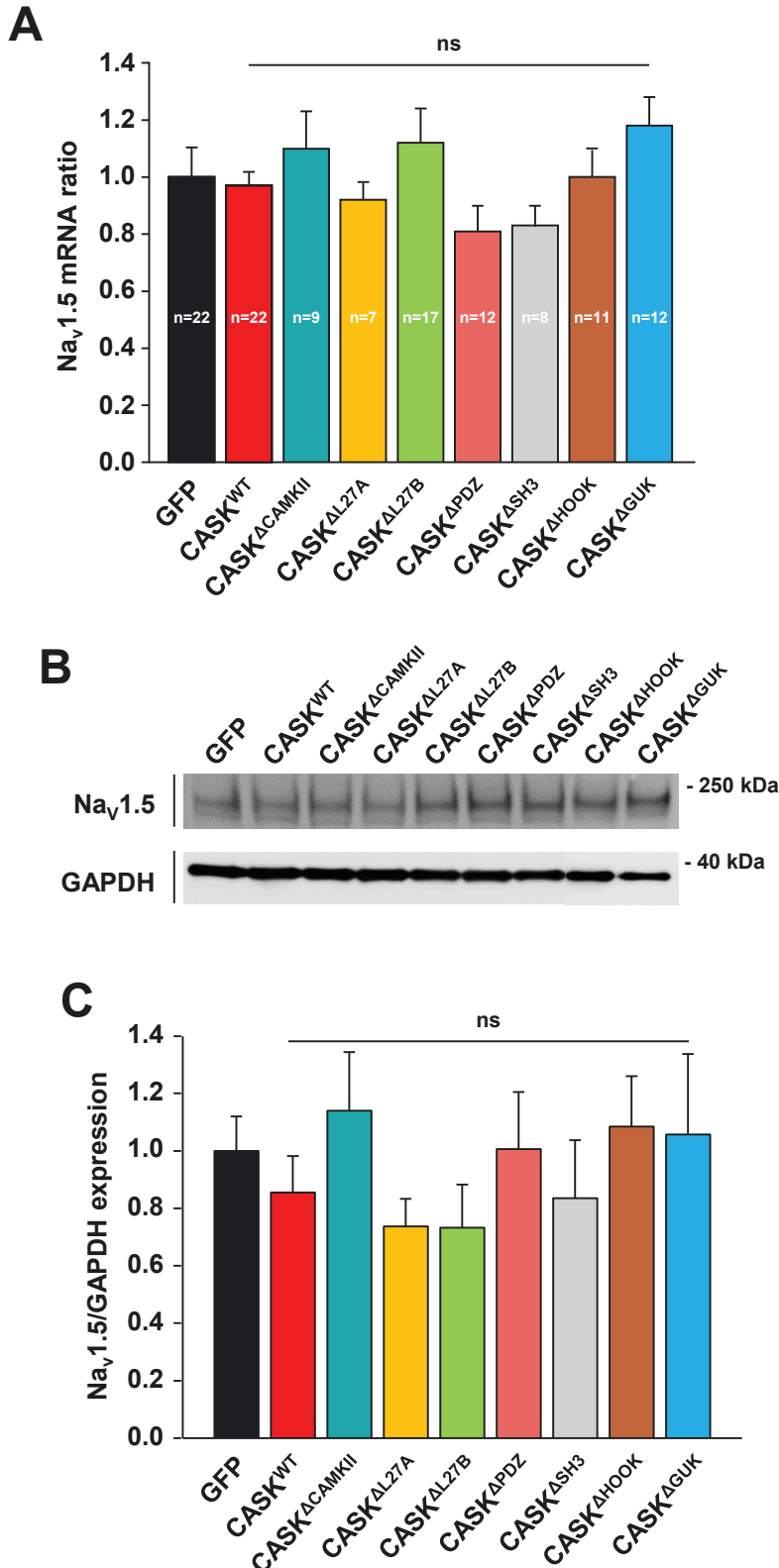
	Membrane potential at half activation V _{0.5} (mV)	Slope factor k (mV)
GFP	-39.88 ± 0.75 (n=28)	6.76 ± 0.19 (n=28)
CASK ^{WT}	-38.44 ± 0.51 (n=40) ^{ns}	7.19 ± 0.11 (n=40) ^{ns}
CASK ^{ΔCAMKII}	-41.01 ± 0.30 (n=14) ^{ns}	7.36 ± 0.30 (n=14) ^{ns}
CASK ^{ΔL27A}	-36.55 ± 2.16 (n=8) ^{ns}	7.28 ± 0.26 (n=8) ^{ns}
CASK ^{ΔL27B}	-40.44 ± 1.40 (n=12) ^{ns}	7.46 ± 0.30 (n=12) ^{ns}
CASK ^{ΔPDZ}	-37.36 ± 0.17 (n=9) ^{ns}	8.26 ± 0.89 (n=9) **
CASK ^{ΔSH3}	-38.74 ± 2.57 (n=7) ^{ns}	6.80 ± 0.21 (n=7) ^{ns}
CASK ^{ΔHOOK}	-39.38 ± 1.52 (n=7) ^{ns}	7.39 ± 0.55 (n=7) ^{ns}
CASK ^{ΔGUK}	-40.70 ± 0.54 (n=10) ^{ns}	6.68 ± 0.18 (n=10) ^{ns}

C

Inactivation properties

	Membrane potential at half inactivation V _{0.5} (mV)	Slope factor k (mV)
GFP	-92.61 ± 0.83 (n=25)	-6.81 ± 0.20 (n=25)
CASK ^{WT}	-89.65 ± 0.95 (n=27) ^{ns}	-6.19 ± 0.16 (n=27) ^{ns}
CASK ^{ΔCAMKII}	-93.17 ± 1.46 (n=12) ^{ns}	-5.88 ± 0.38 (n=12) ^{ns}
CASK ^{ΔL27A}	-90.03 ± 2.15 (n=12) ^{ns}	-6.35 ± 0.24 (n=12) ^{ns}
CASK ^{ΔL27B}	-89.69 ± 3.20 (n=5) ^{ns}	-6.59 ± 0.40 (n=5) ^{ns}
CASK ^{ΔPDZ}	-95.74 ± 2.70 (n=5) ^{ns}	-6.03 ± 0.35 (n=5) ^{ns}
CASK ^{ΔSH3}	-92.81 ± 2.99 (n=7) ^{ns}	-5.66 ± 0.47 (n=7) ^{ns}
CASK ^{ΔHOOK}	-95.67 ± 1.16 (n=10) ^{ns}	-7.50 ± 0.41 (n=10) ^{ns}
CASK ^{ΔGUK}	-95.49 ± 1.21 (n=13) ^{ns}	-6.50 ± 0.22 (n=13) ^{ns}

Supplemental Table 1. Summary table of electrophysiological parameters of cardiac sodium current recorded in adult rat cardiomyocytes 3 days after transduction with adenoviral constructs. (A) Mean current density of I_{Na} recorded at -20 mV and cell capacitances. (B) Activation parameters. (C) Steady-state inactivation parameters. Legend: ns = not significant; ** = P<0.01; * = P<0.001; n=number of cells; N=3-16 independent experiments.**



Online Figure 1. CASK does not regulate translational or transcriptional levels of Na_v1.5. (A) mRNA levels of Na_v1.5 in cardiomyocytes 3 days after infection with the different CASK constructs estimated by RT-qPCR and normalized to the control GFP condition (N=3-13 independent experiments). (B) Representative western blot of Na_v1.5 expression after overexpression of GFP, CASK^{WT} or CASK^{ΔX}. (C) Corresponding histogram showing the expression level of Na_v1.5 normalized to GAPDH in cardiomyocytes infected with either GFP, CASK^{WT} or CASK^{ΔX} (N=7 independent experiments). ns: not significantly different from GFP.

3. Résumé des résultats

Au cours de cette seconde étude, le rôle des domaines fonctionnels de la protéine CASK a été décrit pour la première fois dans les cardiomyocytes. Les différentes constructions virales que nous avons utilisées nous ont permis d'étudier l'impact de la délétion de chaque domaine sur la régulation du courant sodique mais également d'identifier le domaine responsable de l'interaction avec le complexe Dystrophine-Glycoprotéines au niveau de la membrane latérale du myocyte cardiaque.

Après avoir validé nos constructions par des expériences de western blot et de RT-qPCR, nous avons cherché à identifier le ou les domaine(s) impliqué(s) dans la régulation du courant sodique I_{Na} . Ainsi, nous avons constaté que la densité du courant sodique, enregistrée par des expériences de patch-clamp, était fortement diminuée lorsque la protéine CASK totale était surexprimée. De plus, cette perte de courant était retrouvée même après les délétions successives des domaines CAMKII, L27A, PDZ, SH3 ou HOOK de la protéine CASK. L'implication de ces cinq domaines dans la régulation négative qu'exerce CASK sur le courant sodique a donc été écartée. Cependant, la perte des domaines L27B et GUK entraîne une restauration de la densité de courant vers des valeurs équivalentes à notre condition contrôle (Ad-GFP). De plus, au cours notre précédente étude, nous avons montré que la protéine CASK régulait négativement le courant sodique en empêchant l'accumulation des canaux $Na_v1.5$ dans le plan membranaire (voir Article 1, Figure 6). Des expériences complémentaires de microscopie à onde évanescente (TIRF) nous ont permis de mettre en évidence que ce contrôle exercé par CASK, sur le trafic des canaux sodiques vers la membrane latérale, requière la présence des domaines L27B et GUK (Figure 30). En effet, nous avons montré que leur absence entraînait une augmentation de la densité de canaux $Na_v1.5$ présents à la membrane des cardiomyocytes. La perte de ces deux domaines de CASK ne modulant pas les taux d'expression protéique ou d'ARNm de $Na_v1.5$, l'augmentation du nombre de canaux dans le plan membranaire est donc due à une hausse du trafic des canaux ioniques vers le sarcolemme. Cependant les mécanismes par lesquels ces deux domaines régulent le trafic du canal ne sont pas encore connus. Toutefois, les domaines L27B et GUK de la protéine CASK ont déjà été décrits comme impliqués dans la formation de complexes macromoléculaires, eux même associés à des moteurs moléculaires contrôlant l'exocytose de vésicules synaptiques (Zhang et al. 2001; Wong-Riley et Besharse 2012; Wu, Muthaiyan Shanmugam, et al. 2016). Ces observations pourraient donc être transposées aux cardiomyocytes où les domaines L27B et GUK interviendraient dans la régulation de l'exocytose des canaux $Na_v1.5$ au costamère, en s'associant très probablement à des acteurs de cette voie de trafic.

De manière intéressante, grâce à cette approche de délétion de domaines, nous avons mis en évidence que l'interaction de CASK avec le complexe Dystrophine-Glycoprotéines dans le

cardiomyocyte se faisait par le biais du plus petit domaine de la protéine CASK, à savoir le domaine HOOK (Figure 30). Ce domaine est ordinairement décrit comme permettant à la protéine CASK de faire le lien entre le cytosquelette d'Actine et les protéines transmembranaires grâce à la formation du complexe HOOK/protéine 4.1/Spectrine/Actine (Biederer et Sudhof 2001). Dans le cardiomyocyte, il permettrait à CASK de se lier au complexe Dystrophine-Glycoprotéines, lui-même déjà relié au cytosquelette d'Actine. Le domaine PDZ, majoritairement sollicité pour les interactions protéiques, ainsi que les cinq autres domaines de CASK, seraient alors libres d'interagir avec d'autres partenaires et de contribuer à la formation de larges complexes macromoléculaires.

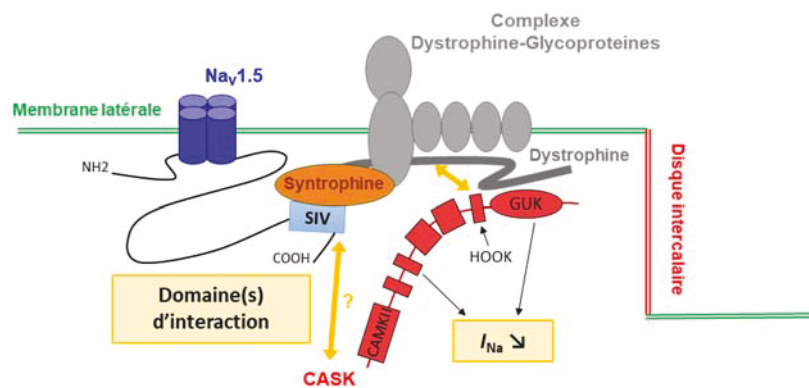


Figure 30 : Représentation schématique du complexe macromoléculaire composé de la protéine CASK, du complexe Dystrophine-Glycoprotéines et du canal sodique Na_v1.5 à la membrane latérale des cardiomyocytes. Le domaine HOOK de CASK permet l'interaction avec le complexe Dystrophine-Glycoprotéines, la Syntrophine (membre du complexe Dystrophine-Glycoprotéines) se lie à Na_v1.5 par son domaine C-terminal, SIV. Ce même domaine permet à CASK de s'associer au canal sodique via un ou plusieurs de ses domaines (non identifiés à ce jour). Les domaines L27B et GUK de CASK participent à la régulation négative des canaux sodiques en agissant sur leur trafic jusqu'à la membrane par un mécanisme encore inconnu.

4. Résultats complémentaires

Les canaux potassiques interviennent dans les différentes phases de repolarisation et dans le maintien du potentiel de repos des myocytes cardiaques. Au sein de cette vaste famille de canaux, codés par plus de 40 gènes, on peut distinguer deux grands types de canaux potassiques en fonction du nombre de segments transmembranaires qui les composent : les canaux potassiques à six segments transmembranaires (Kv) qui sont les plus fréquemment retrouvés et les canaux potassiques à deux segments transmembranaires (Kir) (Grandi et al. 2017). Au niveau cardiaque, plusieurs travaux ont rapporté l'existence d'une interaction entre la protéine MAGUK SAP-97 et les canaux potassiques. En effet, cette dernière régule les canaux potassiques dépendant du potentiel tels que les canaux K_v1.5 et K_v4.x mais aussi des canaux potassiques à rectification entrante comme les canaux Kir2.x dans les cardiomyocytes. Ainsi, la surexpression de la protéine SAP-97 entraîne l'augmentation de la densité de

courant potassique I_{Kur} , porté par les canaux $K_V1.5$ en favorisant leur stabilisation à la membrane plasmique (Abi-Char et al. 2008). De plus, la surexpression de la SAP-97 accentue la présence des canaux $K_V1.5$ spécifiquement au niveau des zones de jonction de type disque intercalaire dans les cardiomyocytes en culture (Abi-Char et al. 2008). De la même manière, une autre étude a montré que la protéine SAP-97 régule positivement le courant potassique I_{to} , porté par les canaux $K_V4.x$, dans les myocytes cardiaques. En effet, l'invalidation de cette protéine MAGUK dans différents modèles cellulaires diminue le courant I_{to} (El-Haou et al. 2009). Outre les canaux $K_V1.5$ et $K_V4.x$, il a également été observé une co-localisation de la SAP-97 avec les canaux potassiques $Kir2.x$ au niveau des tubules-T et des disques intercalaires dans le myocarde et les myocytes fraîchement isolés (Vaidyanathan et al. 2010). De la même manière que pour les canaux dépendants du potentiel, la protéine SAP-97 exerce un rôle de régulateur positif sur le courant I_{K1} en participant à l'augmentation du nombre de canaux ioniques fonctionnels présents à la membrane (Vaidyanathan et al. 2010). Plus récemment, des travaux ont mis évidence que les canaux $Na_V1.5$ et $Kir2.1$ ainsi que SAP-97 appartiennent à un même complexe macromoléculaire. De cette interaction découle un phénomène de régulation réciproque entre ces deux types de canaux. En effet, une diminution de l'expression fonctionnelle des canaux $Kir2.1$ entraîne une diminution de l'expression des canaux $Na_V1.5$ et une baisse du courant I_{Na} . À l'inverse, en condition de surexpression des canaux $Kir2.1$, il est observé une augmentation d' I_{Na} ce qui favorise l'excitabilité cardiaque. Ces résultats sont également transposables dans le cas où cette fois l'expression fonctionnelle des canaux sodiques est modulée, le courant I_{K1} est alors soit augmenté soit diminué (Milstein et al. 2012). Par ailleurs, des études antérieures ont montré par des approches de protéomique, que les canaux $Kir2.x$ ont pour partenaires des membres du complexe costamérique Dystrophine-Glycoprotéines tels que la Syntrophine, la Dystrophine, ou encore la Dystrobrevine mais aussi plusieurs protéines MAGUKs dont la SAP-97 et CASK. De plus, ces interactions, rendues possibles par un motif de liaison aux domaines PDZ sur l'extrémité C-terminale des canaux Kir , ont lieu dans le muscle squelettique, le cerveau ou dans le tissu cardiaque (Leonoudakis et al. 2001; Leonoudakis, Conti, Anderson, et al. 2004).

Ainsi, dans ce contexte où les canaux ioniques s'associent avec des protéines MAGUKs et des membres du complexe Dystrophine-Glycoprotéines formant alors des complexes macromoléculaires nécessaires à l'adressage, à l'ancrage et à la stabilisation des canaux ioniques dans des domaines spécifiques de la membrane, nous avons testé l'hypothèse d'une régulation des canaux potassiques par la protéine CASK. En effet, si l'interaction de la SAP-97 avec les canaux sodiques et les canaux potassiques ainsi que les conséquences de ces interactions sont connues, il n'existe à ce jour aucune étude menée sur la régulation des courants potassiques par la protéine CASK.

Pour étudier la régulation potentielle de la protéine CASK sur les courants potassiques, son inhibition a été réalisée dans les cardiomyocytes de rats adultes 24h après l'isolement cellulaire, par un adénovirus contenant une séquence d'ARN interférant ciblant la protéine CASK (Ad-shCASK). Les courants potassiques ont été enregistrés cinq jours après l'infection par des expériences de patch-clamp en configuration cellule entière. Les densités de courant obtenues en condition d'inactivation de CASK ont été comparées à celles enregistrées en condition contrôle (Ad-SCR).

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux canaux potassiques à rectification entrante : les canaux Kir2.x (pour K⁺ Inward Rectifier). La sous-unité α de ces canaux ioniques ne présente que deux segments transmembranaires associés entre eux par une boucle P extracellulaire. À l'inverse des canaux voltage-dépendants, aucun des deux segments n'est sensible au voltage. Quatre sous-unité α s'associent pour former un pore fonctionnel qui ne présente cependant ni porte d'activation ni porte d'inactivation. Le passage des ions potassium à travers ces canaux se fait dans le sens entrant plutôt que sortant, d'où leur nom dérivant de cette rectification entrante des ions. Le courant I_{K1} porté par les canaux Kir2.1 et Kir2.2 intervient dans le maintien du potentiel de repos membranaire (Hibino et al. 2010). Comme évoqué précédemment, la régulation du courant I_{Na} est étroitement liée à celle du courant I_{K1} , nous avons donc étudié en patch-clamp les effets de l'inhibition de la protéine CASK sur le courant I_{K1} (CASK étant un répresseur du courant sodique). Dans nos conditions expérimentales, nous avons constaté que l'extinction de la protéine CASK (Ad-shCASK) dans les cardiomyocytes ventriculaires entraîne une augmentation du courant I_{K1} (Figure 31 A). En effet, la densité de courant à -130mV est en moyenne de $1,64 \pm 0,29$ pA/pF en condition contrôle (Ad-shSCR) alors qu'elle est de $5,50 \pm 0,32$ pA/pF en condition Ad-shCASK ($P < 0,001$; Figure 31 B). Ainsi, la protéine CASK régule négativement le courant I_{K1} dans les cardiomyocytes ventriculaires de rats.

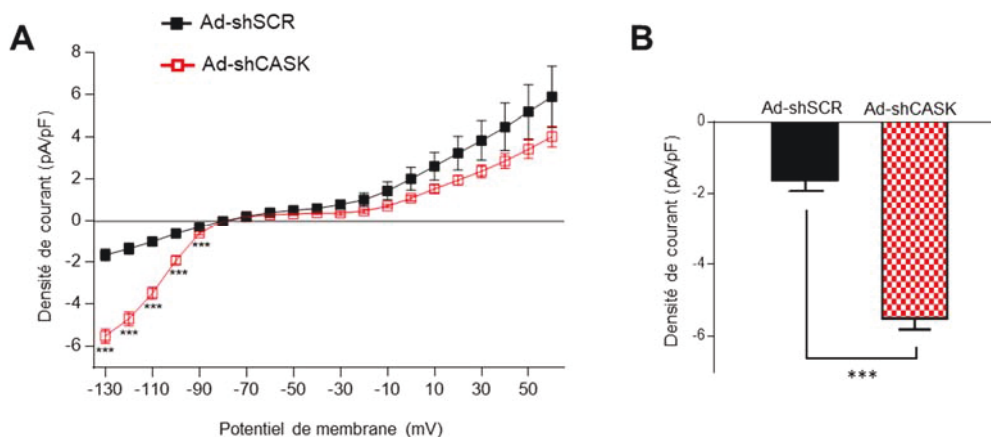


Figure 31 : Le courant potassique I_{K1} est régulé négativement par la protéine CASK dans les cardiomyocytes ventriculaires de rats adultes. (A) Courbe de relation courant-potentiel obtenue en patch-clamp, en configuration cellule entière. Pour chaque potentiel imposé (mV), une valeur de densité de courant est associée (pA/pF). Les densités de courant I_{K1} ont été enregistrées 5 jours après l'infection virale par les adénovirus Ad-shCASK (n=12) et Ad-shSCR (n=11). (B) Histogramme représentant la densité moyenne de courant à -130mV correspondant au pic de densité de courant I_{K1} . (***) $P < 0,001$.

Chez les mammifères, les canaux potassiques dépendants du voltage sont répartis en quatre sous familles selon leur homologie avec les canaux potassiques initialement découverts chez la drosophile dans les années 80 : $K_v1.x$ (*Shaker*), $K_v2.x$ (*Shab*), $K_v3.x$ (*Shaw*) et $K_v4.x$ (*Shal*) et chacune de ces sous familles comprend plusieurs isoformes (Chandy et Gutman 1993). Les sous-unités α de ces canaux sont toutes composées de six segments transmembranaires parmi lesquels on peut distinguer un segment senseur du voltage (S4) et une boucle P (entre S5 et S6) qui participe à la formation du pore du canal. Quatre sous-unités α s'associent entre elles pour former un pore fonctionnel (Shieh et al. 2000). Ces canaux potassiques sont à l'origine de courants repolarisants tel que le courant transitoire sortant I_{to} porté par les canaux $K_v4.2$ et $K_v4.3$. Celui-ci intervient juste après la phase de dépolarisation et permet d'abaisser le potentiel membranaire à une gamme de valeur permettant l'activation des canaux calciques de type L, en vue de la phase de plateau du potentiel d'action pendant laquelle a lieu la contraction. Nous avons constaté que l'extinction de la protéine CASK (Ad-shCASK) dans les cardiomyocytes ventriculaires de rat n'entraîne pas de modifications du courant I_{to} (Figure 32 A). En effet la densité du courant I_{to} à +60 mV est de $19,29 \pm 8,05$ pA/pF en condition contrôle (Ad-shSCR) et de $19,09 \pm 12,07$ pA/pF en condition Ad-shCASK (Figure 32 B). Ainsi, la protéine CASK ne régule pas le courant I_{to} dans les cardiomyocytes ventriculaires de rats.

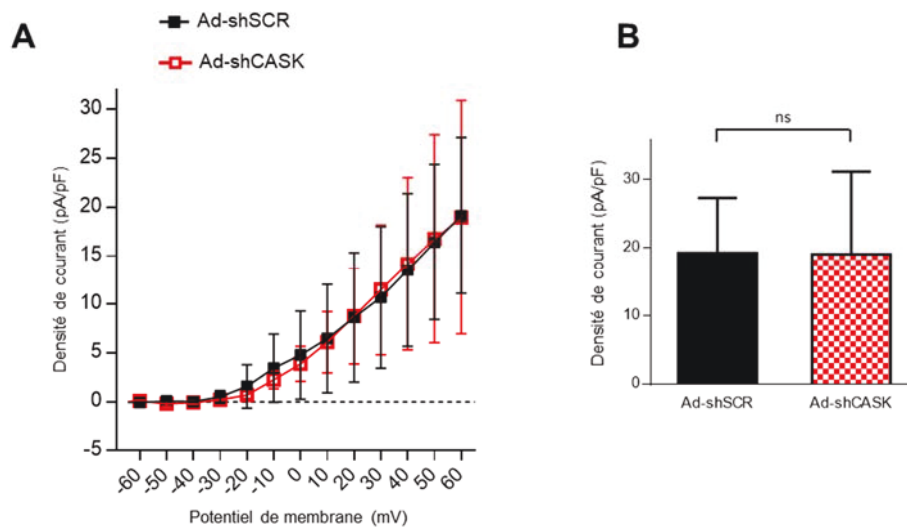


Figure 32 : Le courant potassique I_{to} n'est pas régulé par la protéine CASK dans les cardiomyocytes ventriculaires de rats adultes. (A) Courbe de relation courant-potential obtenue en patch-clamp, en configuration cellule entière. Pour chaque potentiel imposé (mV), une valeur de densité de courant est associée (pA/pF). Les densités de courant I_{to} ont été enregistrées 5 jours après l'infection virale par les adénovirus Ad-shCASK (n=9) et Ad-shSCR (n=7). (B) Histogramme représentant la densité moyenne de courant à +60 mV correspondant au pic de densité de courant I_{to} ; ns = non significatif.

L'expression fonctionnelle des canaux ioniques à la membrane plasmique du myocyte cardiaque, dépend de leur synthèse protéique, de leur adressage à la membrane ainsi que de leur organisation spatiale en complexes macromoléculaires fonctionnels. Ainsi, afin de déterminer si le niveau d'expression de CASK pouvait moduler l'expression des canaux Kir et K_v , nous avons réalisé des expériences de western blot à partir de lysats protéiques provenant de cardiomyocytes ventriculaires de rat adultes après 5 jours de culture et préalablement infectés par les adénovirus (Ad-shCASK et son contrôle Ad-shSCR). L'extinction de la protéine CASK en condition Ad-shCASK est d'un peu plus de 60% en comparaison avec la condition contrôle (Ad-shSCR) exprimant seulement la protéine CASK endogène (Figure 33). À partir des mêmes lysats nous avons constaté qu'il n'y a pas de différences significatives du taux d'expression protéique des canaux potassiques à rectification entrante Kir2.1, Kir2.2 et Kir2.3, ni des canaux potassiques voltage-dépendants $K_v4.2$ et $K_v4.3$ (Figure 33). Par ailleurs, nous nous sommes aussi intéressés à l'expression protéique du canal Kir3.1 portant le courant I_{KACH} à rectification entrante dans nos conditions expérimentales, bien que nous n'ayons pas enregistré spécifiquement ce courant en patch-clamp. L'expression protéique de ce canal n'est pas non plus modifiée par l'invalidation de CASK (Figure 33). D'après ces résultats, la modulation du niveau d'expression de la protéine CASK ne modifie pas le niveau d'expression des différents canaux potassiques étudiés ici. Ainsi, la régulation du courant I_{K1} par CASK ne passerait pas par des modifications traductionnelles. Ces observations sont donc similaires aux résultats observés précédemment avec les canaux sodiques.

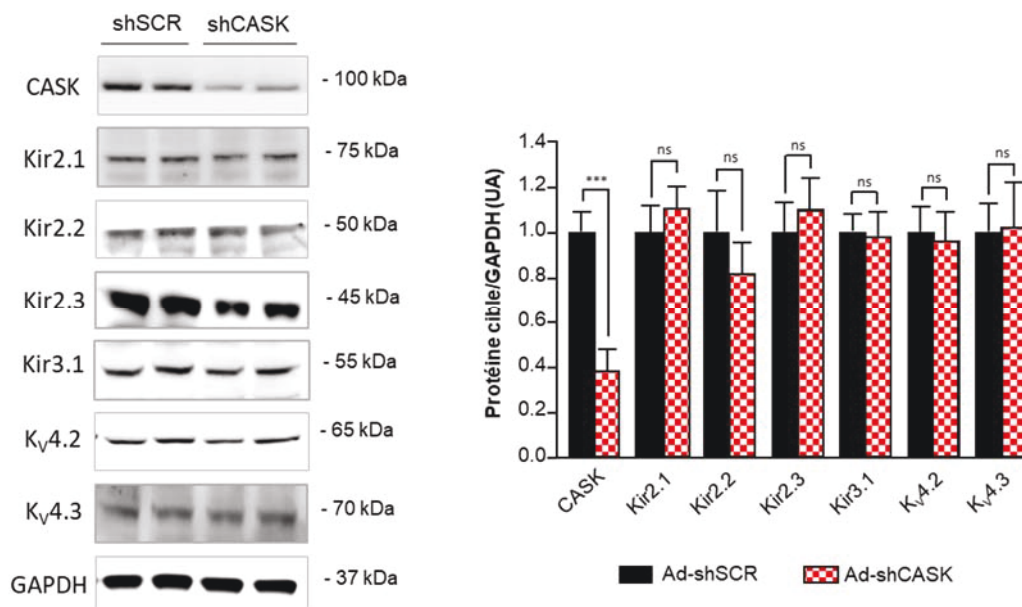


Figure 33 : L'inhibition de la protéine CASK ne modifie pas l'expression protéique des canaux potassiques Kir2.x, $K_v4.x$ et Kir3.1. Western blots réalisés à partir de lysats de cardiomyocytes ventriculaires 5 jours après l'infection par les virus Ad-shSCR et Ad-shCASK (N=4, gauche). Les différents canaux potassiques sont détectés entre 45 et 75 kDa, la GAPDH sert de témoin de charge. Histogramme représentant la quantification du taux d'expression protéique de CASK et de chaque canal potassique normalisé à celui de la GAPDH et comparé entre la condition contrôle Ad-shSCR et d'inhibition Ad-shCASK (droite). (***) $P < 0,001$ et ns = non significatif.

Parmi les canaux potassiques à six segments transmembranaires, nous nous sommes également intéressés aux canaux $K_v1.5$. Ces canaux sont activés lors des phases 1 et 3 de repolarisation au cours du potentiel d'action. Ils sont donc essentiels et déterminent en partie la durée du potentiel d'action. En effet, si leur expression protéique est augmentée ou si leur fonctionnement est altéré tel un défaut d'inactivation, la repolarisation sera plus rapide et la durée du potentiel d'action raccourcie. Le courant I_{Kur} (UltraRapid delayed rectifier) porté par les canaux $K_v1.5$ est alors fortement impliqué dans des cas d'arythmie telle que la fibrillation atriale où il constitue une cible thérapeutique potentielle (Fedida et al. 1993; Brundel et al. 2001). Nous avons donc enregistré le courant I_{Kur} dans des myocytes atriaux de rats 5 jours après l'infection par un adénovirus shCASK ou un adénovirus contrôle (Ad-SCR). Nous avons constaté que l'extinction de la protéine CASK (Ad-shCASK) dans les cardiomyocytes atriaux de rat n'entraîne pas de modifications du courant I_{Kur} . En effet la densité du courant I_{Kur} à +60 mV est de $3,67 \pm 0,79$ pA/pF en condition Ad-shSCR et de $3,68 \pm 0,53$ pA/pF en condition Ad-shCASK (Figure 34). Ainsi, la protéine CASK ne régule pas le courant I_{Kur} dans les cardiomyocytes atriaux de rats.

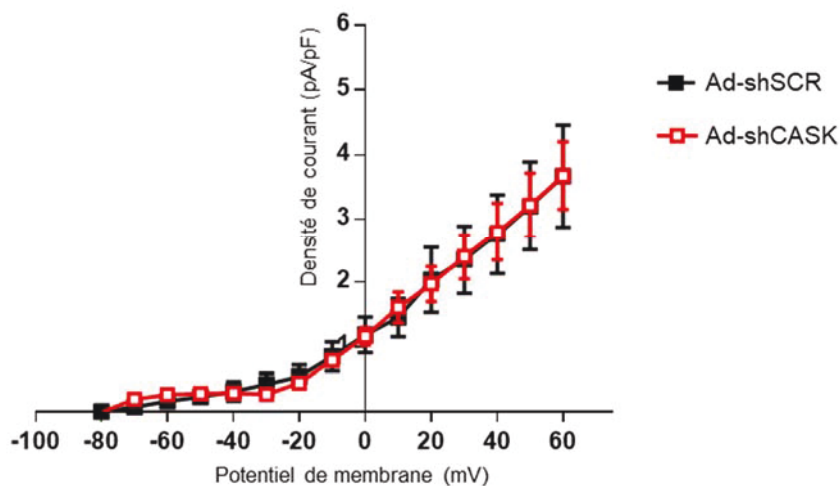


Figure 34 : Le courant potassique I_{Kur} n'est pas régulé par la protéine CASK dans les cellules atriales de rats adultes. Courbe de relation courant-potentiel obtenue en patch-clamp, en configuration cellule entière. Pour chaque potentiel imposé (mV), une valeur de densité de courant est associée (pA/pF). Les densités de courant I_{Kur} ont été enregistrées 5 jours après l'infection virale par les adénovirus Ad-shCASK (n=7) et Ad-shSCR (n=5).

Aucune expérience de biochimie n'a été réalisée pour les canaux $K_v1.5$ dans les cellules atriales après invalidation de la protéine CASK mais le résultat serait très probablement, comme pour les autres canaux, négatif. La régulation des canaux ioniques par la protéine CASK ne passant pas par les voies transcriptionnelles ni traductionnelles mais plutôt par une altération du trafic telle que la rétention des canaux ioniques dans des compartiments intracellulaires.

Nous avons également enregistré le courant calcique I_{Ca} porté par les canaux calciques de type L dans les cellules ventriculaires de rats ($Ca_v1.2$). Ces derniers constituent la voie d'entrée majeure des ions calcium dans les cardiomyocytes. Ils interviennent lors de la phase 2 du potentiel d'action, correspondant à la phase de plateau, et participent ainsi activement au couplage excitation-contraction. La structure de leur sous-unité α est similaire à celle du canal sodique avec 24 segments transmembranaires répartis en quatre domaines identiques. Le repliement des domaines entraîne le rapprochement des quatre boucles P, présentes sur chacun des domaines entre S5 et S6, formant ainsi le pore du canal. Néanmoins le canal calcique de type L n'est pas seulement constitué d'une sous-unité α . En effet, il est associé à trois sous-unités régulatrices : un dimère α_2/δ (à la fois transmembranaire et extracellulaire) et les monomères intracellulaire β et transmembranaire γ (Bers et Perez-Reyes 1999). Nous avons donc enregistré le courant I_{Ca} dans des myocytes ventriculaires de rats 5 jours après l'infection par un adénovirus shCASK ou un adénovirus contrôle (Ad-shSCR). Nous avons constaté que l'inhibition de la protéine CASK (Ad-shCASK) dans les cardiomyocytes ventriculaires de rat entraîne une augmentation significative du courant I_{Ca} (Figure 35 A). En effet la densité du courant I_{Ca} à 0 mV est de $3,46 \pm 0,82$ pA/pF en condition Ad-shSCR et de $8,35 \pm 1,29$ pA/pF en condition Ad-shCASK ($P < 0,01$; Figure 35 B). Ainsi, la protéine CASK régule négativement le courant I_{Ca} dans les cardiomyocytes ventriculaires de rats.

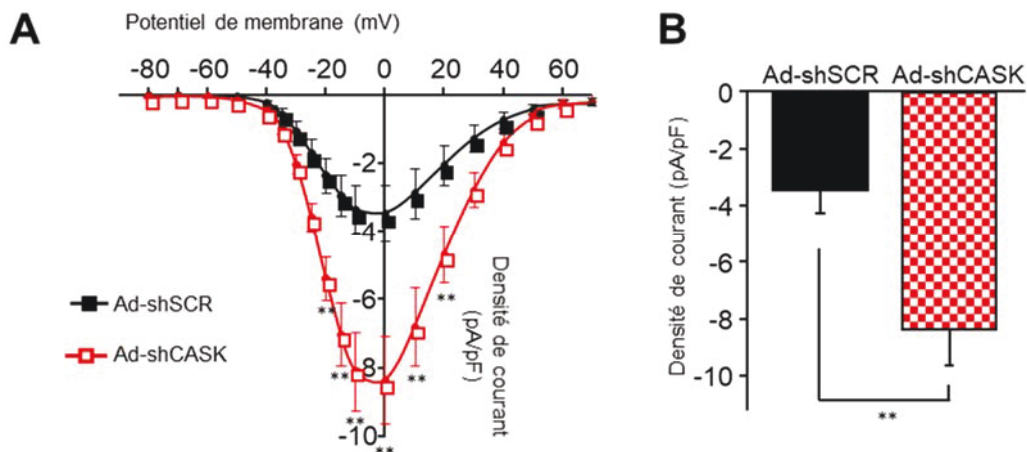


Figure 35 : Le courant calcique I_{Ca} est régulé négativement par la protéine CASK dans les cardiomyocytes ventriculaires de rats adultes. (A) Courbe de relation courant-potential obtenue en patch-clamp, en configuration cellule entière. Pour chaque potentiel imposé (mV), une valeur de densité de courant est associée (pA/pF). Les densités de courant I_{Ca} ont été enregistrées 5 jours après l'infection virale par les adénovirus Ad-shCASK ($n=8$) et Ad-shSCR ($n=8$). (B) Histogramme représentant la densité de courant moyenne à 0 mV correspondant au pic de densité de courant I_{Ca} . (**) $P < 0,01$

D'après ces résultats complémentaires, on constate que la protéine MAGUK CASK n'intervient pas dans la régulation de l'ensemble des courants ioniques. En effet, les expériences de patch-clamp ont mis en évidence que les courants I_{Kur} et I_{to} ne sont pas affectés par CASK, contrairement aux courants I_{Na} , I_{K1} ou encore I_{Ca} . Néanmoins, lorsque la densité d'un de ces courants ioniques est influencée par la

protéine CASK, la régulation se fera toujours dans le sens d'un effet répresseur. La protéine CASK présente donc un effet totalement opposé à celui de la SAP-97. Comme pour le canal sodique, il semblerait que la voie de trafic antérograde des canaux $Ca_v1.2$, Kir2.1 et Kir2.2 soit impactée par CASK, une diminution de la densité de ces canaux à la membrane aurait pour conséquence de diminuer le courant ionique associé. Dans les cellules épithéliales, il avait déjà été montré que le recrutement de la protéine CASK au sein d'un complexe formé par les canaux Kir2.2, SAP-97, Veli et Mint1 était indispensable pour l'adressage des canaux Kir2.2 à la membrane basolatérale de la cellule. La protéine CASK détiendrait donc un rôle central dans le trafic des canaux ioniques (Leonoudakis, Conti, Radeke, et al. 2004). Cependant, cette hypothèse, validée pour les canaux $Na_v1.5$, reste à être vérifiée par des expériences de TIRF (permettant de quantifier suite à un immunomarquage, la densité de canaux présents dans le plan membranaire) ainsi que des expériences de biotinylation dans les cardiomyocytes. La régulation du canal sodique par CASK impliquant les domaines L27B et GUK, il serait intéressant de vérifier si ces mêmes domaines sont également impliqués dans la régulation des courants I_{K1} et I_{Ca} . En intervenant dans la régulation des canaux responsables des phases de dépolarisation, de plateau et de maintien du potentiel de repos, la protéine CASK serait alors déterminante pour l'initiation et l'établissement de la durée du potentiel d'action. Des modifications de l'expression fonctionnelle de CASK dans les cardiomyocytes pourraient ainsi participer à la survenue d'arythmies.

5. Conclusion

Cette seconde étude a constitué la première description du rôle des domaines fonctionnels de la protéine CASK dans les cardiomyocytes. En effet, CASK est divisée en sept domaines d'interaction protéiques qui confèrent à la protéine la capacité d'interagir simultanément avec plusieurs partenaires. Nous avons ainsi constaté que le domaine HOOK est responsable de l'interaction avec le complexe Dystrophine-Glycoprotéines à la membrane latérale des myocytes cardiaques. De plus les domaines L27B et GUK sont quant à eux impliqués dans la régulation négative du courant sodique I_{Na} . En effet, ces deux domaines interviendraient durant le trafic antérograde des canaux sodiques et contribueraient, par des mécanismes encore inconnus, à empêcher les canaux $Na_v1.5$ d'atteindre et/ou de se stabiliser aux costamères de la membrane latérale des cardiomyocytes. Ce travail contribue ainsi à la compréhension des processus sous-jacents l'adressage des canaux sodiques vers les domaines spécialisés de la membrane latérale.

C. Projet 3

Rôle de la protéine CASK *in vivo* : étude de son implication dans les propriétés électrique et mécanique cardiaques

1. Contexte et objectif

L'organisation des canaux ioniques, sodiques et potassiques, dans des domaines spécialisés du cardiomyocyte (membrane latérale *versus* disque intercalaire) est déterminante pour la propagation du potentiel d'action cardiaque. En effet, celui-ci est rapidement transmis de cellules en cellules à travers les disques intercalaires. Sa propagation se fait donc préférentiellement dans le sens longitudinal, on parle ainsi d'anisotropie. Toutes modifications dans la propagation de cet influx électrique dans le tissu cardiaque est à l'origine d'arythmies (Valderrábano 2007). Les deux protéines MAGUKs, SAP-97 et CASK, participent à l'organisation de deux sous populations de canaux sodiques dans des domaines différents du sarcolemme du cardiomyocyte (respectivement disque intercalaire et membrane latérale). Ces observations suggèrent donc que ces MAGUKs, en régulant l'organisation des canaux ioniques dans les microdomaines de la membrane des cellules cardiaques, ont un rôle important à jouer dans le maintien de la conduction anisotrope du potentiel d'action (Figure 36).

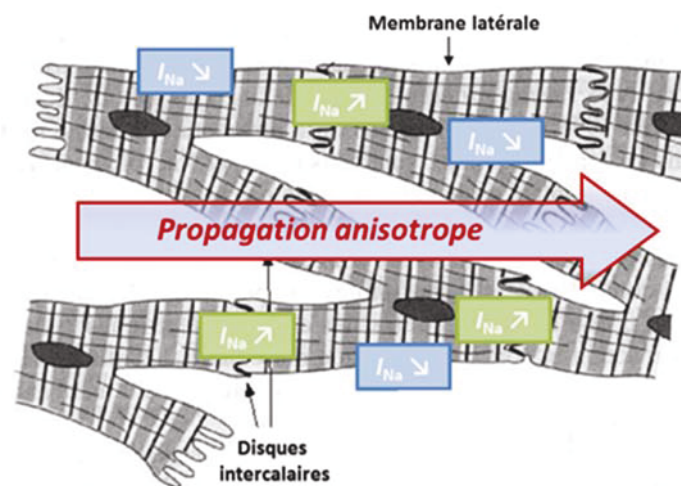


Figure 36 : Représentation schématique de la propagation anisotrope du potentiel d'action cardiaque. La population de canaux $Na_v1.5$ présente à la membrane latérale est négativement régulée par CASK et la population présente aux disques intercalaires est positivement régulée par SAP-97. Cette régulation différentielle pourrait favoriser la propagation anisotrope du potentiel d'action dans le sens longitudinal.

Précédemment, nous avons vu que la protéine CASK est exprimée exclusivement à la membrane latérale des cardiomyocytes et est un nouveau partenaire du complexe costamérique Dystrophine-Glycoprotéines. Ce complexe, reliant le cytosquelette d'Actine à la matrice extracellulaire, permet la détection et la transduction de signaux mécaniques entre l'intérieur du myocyte cardiaque et son environnement extérieur et inversement. Ainsi, en appartenant à ce complexe costamérique, CASK pourrait également être impliquée dans la mécanotransduction. Cependant, à l'heure actuelle, aucune information n'est disponible quant au rôle de CASK dans les propriétés mécaniques et électriques cardiaques *in vivo*. En effet, l'inhibition de la protéine CASK totale étant létale (Atasoy et al. 2007), son invalidation *in vivo* doit donc passer par une voie alternative. C'est pourquoi, afin de surmonter cette létalité, nous avons eu recours à de petits virus à ADN non pathogènes (adeno-associated virus, AAV) afin d'inhiber CASK spécifiquement dans le cœur de rats adultes. L'avantage de ces AAV est qu'ils peuvent être délivrés par voies systémiques chez l'animal (la veine de la queue ou la veine jugulaire) ou encore en injection intracardiaque et peuvent présenter, ou non, un tag fluorescent comme la GFP. Le phénotype cardiaque, consécutif à l'extinction de la protéine CASK chez ces animaux, a ensuite été évalué au moyen de deux procédés. Dans un premier temps, des échocardiographies ont permis de vérifier si la fonction ventriculaire était altérée puis, dans un second temps, des électrocardiogrammes ont été enregistrés et analysés afin de savoir si l'inhibition de CASK entraînait des modifications de l'activité électrique du cœur. Ces modifications pouvant intervenir lors des phases de dépolarisation avec la mesure de la durée du complexe QRS et de repolarisation ventriculaire avec la mesure de l'intervalle QT. Des échantillons de tissus ont également été récupérés afin de réaliser des expériences de biochimie et de microscopie. Un autre aspect intéressant quant à l'utilisation d'un AAV associé à un tag fluorescent est que, par l'intermédiaire de ce vecteur viral, les cellules cardiaques qui ont intégré le virus exprimeront également la GFP. Ainsi, après un isolement cellulaire, les cardiomyocytes qui n'expriment plus la protéine CASK peuvent être facilement identifiés en microscopie, à l'image de ceux présentés en Figure 37 B. Dans ces conditions, nous nous affranchissons des étapes de culture cellulaire et d'infection. En effet, une des limites de la culture cellulaire de cardiomyocytes est que ces derniers se différencient et perdent leur structure polarisée avec par exemple l'internalisation des complexes d'accrochages myocyte-myocyte au niveau du disque intercalaire. Il faut alors attendre plusieurs jours, durant lesquels les cardiomyocytes subissent une croissance de type hypertrophique, avant que les contacts intercellulaires ne se reforment (Figure 37 A). Les cardiomyocytes fraîchement isolés et n'exprimant plus la protéine CASK présentent donc un intérêt majeur, d'une part pour pouvoir enregistrer les répercussions de l'extinction de CASK sur les courants ioniques spécifiquement à la membrane latérale et au disque intercalaire par la technique de macro-patch et d'autre part pour étudier l'expression et la distribution des membres du complexe Dystrophine-Glycoprotéines.

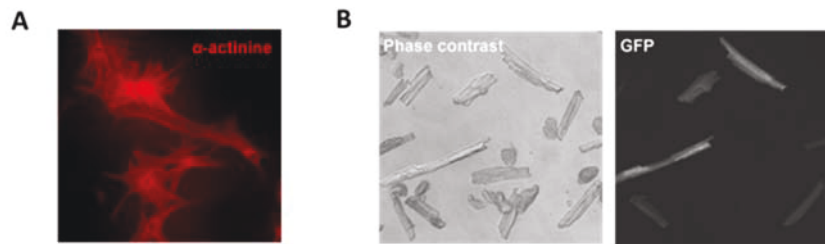


Figure 37 : Différence de morphologie entre des cardiomyocytes en culture et des cardiomyocytes fraîchement isolés. (A) Immunomarquage sur des cardiomyocytes après 5 jours de culture, l' α -actinine permet de visualiser les sarcomères. (B) Exemple d'image de cardiomyocytes fraîchement isolés issus de rats AAV (en fond clair, gauche), le tag GFP permet de sélectionner les cellules infectées (droite).

2. Résultats

La première étape de cette étude a donc été d'inhiber spécifiquement dans le cœur la protéine CASK. Cette extinction a été entreprise au moyen d'AAV. Le virus adéno-associé ou AAV (Adeno-Associated Virus) a été découvert dans les années 60 comme étant, au premier abord, un contaminant des cultures d'adénovirus. Appartenant à un nouveau genre viral, son fonctionnement a été décrit comme totalement « dépendovirus ». En effet, une fois dans la cellule, l'AAV seul entre dans une phase de latence et aucune expression de gènes viraux n'est observée. Cette absence d'activité virale est due à l'ADN simple brin contenu dans la capsid du virus qui ne code que pour deux protéines et celles-ci ne sont pas impliquées dans les mécanismes de réplication virale. Ainsi, l'AAV est dépendant de la machinerie cellulaire d'un virus auxiliaire. Dès que celui-ci entre à son tour dans la cellule, l'AAV sort de sa phase de latence et entame sa phase de réplication. Son nom dérive donc de sa particularité à être incapable de se répliquer sans la présence d'un virus auxiliaire. Ce dernier peut faire partie de la famille des adénovirus (premier virus auxiliaire à avoir été identifié), du virus de l'herpès simplex de type 1, du papillomavirus ou encore du cytomégalovirus. Contrairement aux adénovirus qui, malgré leur efficacité induisent des réponses immunitaires, les AAVs ne sont pas pathogènes et peuvent être présents dans l'organisme à plus long terme (Balakrishnan et Jayandharan 2014). Selon la nature des protéines présentes à la surface de la capsid des AAVs, une douzaine de sérotype d'AAVs a ainsi pu être isolée chez plusieurs espèces comme l'Homme, le bovin, le singe mais aussi chez le chien. Le premier sérotype à avoir été découvert est le sérotype 2 et il reste à ce jour l'AAV le plus largement étudié. Néanmoins, les sérotypes 1 et 3 à 9 sont aujourd'hui bien décrits et de plus en plus utilisés comme vecteurs pour le transfert de gènes. À noter que parmi eux, le sérotype 6 serait, quant à lui, un AAV issu d'une recombinaison entre les AAV1 et AAV2. Les sérotypes 10 à 12 restent les AAVs les moins étudiés. À partir de ces 12 sérotypes, plus d'une centaine de variants ont été identifiés et sont d'origine humaine ou simienne (Grimm et Kay 2003; Z. Wu, Asokan, et Samulski 2006). De plus, il a été montré

qu'en fonction de son sérotype, chaque AAV présentait un tropisme tissulaire différent et était alors capable d'infecter préférentiellement un organe sans en être pour autant exclusif. Toutefois, de manière générale, les AAVs peuvent infecter pratiquement tous les tissus de l'organisme à l'image de l'AAV2 dont l'utilisation seule est freinée par sa non spécificité lors d'études ciblées. C'est pourquoi, plusieurs travaux ont recours à des recombinaisons d'AAVs afin d'augmenter la spécificité d'infection pour un type cellulaire donné. Dans notre cas, nous avons utilisé une recombinaison entre l'AAV2 et l'AAV9 afin de favoriser le tropisme cardiaque. L'AAV9 avait déjà été décrit comme ayant une efficacité d'infection élevée dans le myocarde chez la souris et chez le singe après une injection intraveineuse (Pacak et al. 2006; Inagaki et al. 2006). Les constructions ont été réalisées au laboratoire et la production par un laboratoire spécialisé (Vector Biolabs, Malvern, Pennsylvanie, Etats-Unis). Nous avons ainsi obtenu une quantité suffisante de virus pour infecter plusieurs animaux. Par ailleurs, nous avons utilisé deux virus pour l'inhibition de la protéine CASK : un AAV-shCASK comportant un tag GFP et un AAV-shCASK sans tag GFP. En effet, certaines études ont rapporté que l'utilisation du tag GFP lors de modulations géniques pouvait avoir des répercussions sur la fonction cardiaque comme l'installation d'une cardiopathie dilatée chez la souris (Huang et al. 2000) ainsi qu'une perte de la contractilité des cardiomyocytes chez le rat (Nishimura et al. 2006). Ce défaut de contractilité est également trouvé dans des cellules musculaires de rat où la GFP empêche les liaisons entre l'Actine et la Myosine (Agbulut et al. 2007). Néanmoins, ces résultats entrent en contradiction avec une autre étude montrant que dans les cardiomyocytes de rat, la GFP ne masque pas les sites de liaison Actine/Myosine (Resnicow et al. 2008). De plus, dans des lignées de cellules fibroblastiques il a aussi été observé une induction de l'apoptose consécutive à une cytotoxicité de la GFP (Liu et al. 1999). Cependant, malgré les avis divergents, la GFP reste un tag fluorescent largement utilisé pour visualiser des protéines, des populations cellulaires ou encore des organes lors d'études *in vitro* et *in vivo*. Cette controverse de l'utilisation du tag GFP semble surtout résider dans la quantité de GFP qui est produite par les cellules cibles ainsi que de la lignée cellulaire utilisée.

Dans notre étude, les rats Wistar adultes âgés de 2 mois ont reçu une injection systémique (veine de la queue) unique de 400 μ L contenant $2,10^{12}$ particules virales (diluées dans du PBS) d'AAV2/9-shCASK (noté dans le reste de l'étude AAV-shCASK), présentant ou non un tag GFP, ou d'AAV2/9-shSCR contrôle (AAV contrôle, SCRamble) sans tag GFP. Le phénotype cardiaque des animaux a été étudié à 1 et 3 mois post injection par échocardiographie et électrocardiogramme. Les expériences de biochimie et d'immunofluorescence ont également été réalisées à 1 et 3 mois post injection.

Le tropisme tissulaire de l'AAV2/9, utilisé dans le cadre de ce projet, a été étudié dans un premier temps sur des coupes de cœurs entiers de rats adultes à 1 et 3 mois après l'injection du virus dans la veine de la queue. Ces premières observations en microscopie nous ont permis de vérifier que notre organe cible avait bien été infecté. Pour pouvoir détecter la présence du virus dans le tissu cardiaque et donc l'extinction spécifique de CASK dans le cœur, l'AAV-shCASK utilisé a été couplé à un tag GFP. On peut dès lors constater que les ventricules sont majoritairement infectés par le virus AAV-shCASK par rapport aux oreillettes (Figure 38 A). Par ailleurs, aucune différence d'intensité de fluorescence dans les ventricules n'est visible entre 1 mois et 3 mois post injection, ce qui suggère que l'infection est déjà maximale à 1 mois et reste stable au minimum jusqu'à 3 mois (Figure 38 A). À un plus fort grossissement, sur des coupes longitudinales de ventricule, il est possible de faire la distinction entre les myocytes cardiaques qui ont reçu le virus et qui n'expriment donc plus la protéine CASK et les myocytes cardiaques non fluorescents qui expriment toujours la protéine CASK (Figure 38, B).

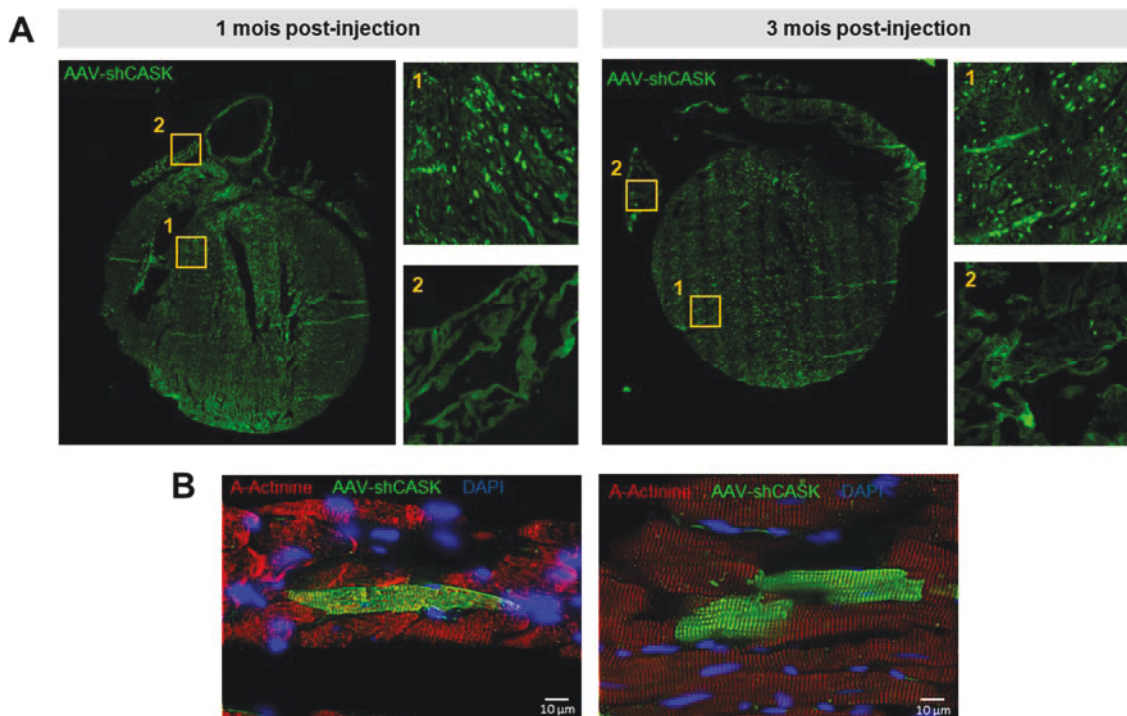


Figure 38 : Les ventricules sont plus infectés par le virus AAV-shCASK que les oreillettes.

(A) Observation macroscopique d'une coupe longitudinale de cœur de rat entier ayant reçu une injection d'AAV-shCASK à 1 mois (gauche) et à 3 mois (droite). La fluorescence du tag GFP couplée à la séquence shCASK reflète les zones du cœur qui sont infectées. Les agrandissements montrent une différence d'infection entre les ventricules (1) et les oreillettes (2). (B) Coupes longitudinales de ventricule d'un rat 1 mois après l'injection de l'AAV-shCASK. Images acquises sur un microscope à déconvolution 3D. L' α -Actinine marque les sarcomères des cardiomyocytes et le tag GFP sert à identifier les cellules n'exprimant plus la protéine CASK.

Cependant l'estimation du pourcentage de cellules infectées est difficilement réalisable sur simples coupes de tissu étant donné l'épaisseur réelle du myocarde et des différents feuilletts qui le compose. Néanmoins, il existe des techniques de microscopie qui pourrait être utilisées afin de visualiser la pénétrance du virus comme celle de la transparisation. Aussi appelée *clearing* ce procédé

chimique rend un fragment de tissu ou un organe entier transparent et peut être associé à de l'immunofluorescence pour visualiser les structures et la localisation des protéines d'intérêt, suivit d'une reconstitution 3D. Lors du sacrifice des animaux, compte tenu du large spectre d'infection des AAVs, d'autres organes en plus du ventricule ont été prélevés à 3 mois post-injection. Ainsi, des échantillons de foie, de cerveau, de muscle (récupérés sur un des deux membres postérieurs de l'animal) et de poumon ont été observés en microscopie à fluorescence afin de vérifier la spécificité tissulaire, dans notre cas cardiaque, de la recombinaison des AAVs 2 et 9. Les résultats de microscopie ne montrent pas de cellules infectées par l'AAV-shCASK comportant le tag GFP dans le tissu musculaire, le tissu cérébral ou encore dans le foie (Figure 39 A). Comme précédemment, quelques cardiomyocytes ventriculaires se distinguent des autres au sein du tissu cardiaque par le biais de leur fluorescence (Figure 39 B). Ces cellules cardiaques ont donc bien reçu le virus AAV-shCASK. Néanmoins, dans le poumon on peut remarquer la présence de cellules fluorescentes signifiant alors qu'elles expriment, elles aussi, le tag GFP (Figure 39 B). Ainsi, l'AAV-shCASK issu de la recombinaison des AAVs 2 et 9 n'est pas totalement spécifique du cœur car il touche également le tissu pulmonaire. On peut donc supposer que ce virus reste tout de même efficace car il atteint l'organe ciblé dans ce travail, qu'est le cœur, mais qu'en étant véhiculé par la circulation sanguine, cet AAV pourrait perdre en efficacité du fait de sa capacité à se disperser et à s'intégrer aussi dans des cellules pulmonaires. La proportion de zones infectées dans le cœur visibles sur la Figure 38 A ne serait donc pas à son maximum si on prend en compte la proportion de virus restée dans les poumons.

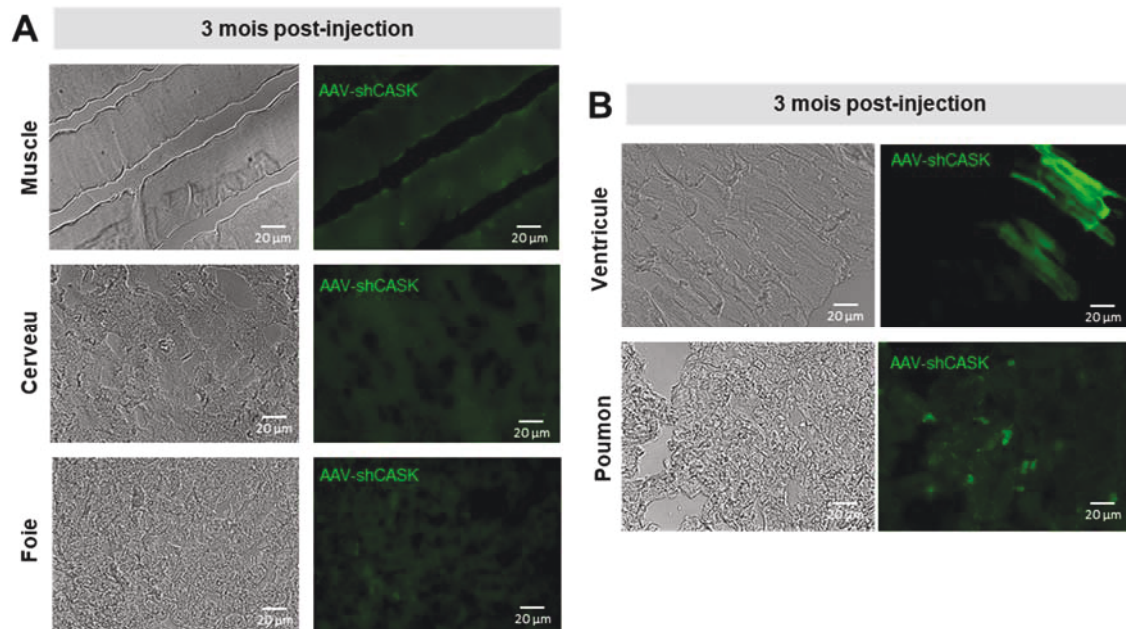


Figure 39 : *Tropisme tissulaire de l'AAV2/9-shCASK à 3 mois post-infection. Coupes longitudinales de cerveau, poumon, muscle, foie et de ventricule prélevés chez le rat 3 mois après l'injection de l'AAV-shCASK comportant un tag GFP. Les images ont été acquises sur un microscope à déconvolution 3D en fond clair (gauche) ainsi qu'en fluorescence (droite) afin de vérifier la spécificité de l'AAV2/9. (A) Les cellules musculaires, du cerveau et du foie n'expriment pas le tag GFP. (B) Certains cardiomyocytes ventriculaires expriment fortement le tag GFP ainsi que quelques cellules pulmonaires. L'AAV2/9 infecterait donc le cœur mais toucherait aussi le poumon.*

L'AAV-shCASK atteignant tout de même le cœur, une exploration de la fonction cardiaque a été menée par échocardiographie transthoracique à 1 mois et 3 mois post infection. Cette technique non invasive permet de visualiser, en temps réel, les structures cardiaques à l'aide d'un faisceau d'ultrasons selon plusieurs modes d'enregistrement. Le mode bidimensionnel nous renseigne sur la morphologie des cavités ventriculaire et atriale gauches ainsi que sur l'aspect de l'aorte. Il nous fournit également des informations sur l'épaisseur et le déplacement des parois ventriculaires et sur la cinétique des valves cardiaques. Le mode temps mouvement (TM) permet l'enregistrement du mouvement des différentes structures cardiaques au cours du temps. Ainsi, durant les phases de contraction et de la relaxation (systole et diastole), les dimensions du ventricule gauche, les épaisseurs du septum interventriculaire et de la paroi postérieure du ventricule gauche sont enregistrées (Figure 40). À partir de ces paramètres, les fractions d'éjection (FE) et de raccourcissement (FR) ainsi que le ratio h/r du ventricule gauche peuvent être calculés. Ces derniers rendent compte respectivement de la fonction systolique globale du ventricule gauche et de son degré de dilatation ou d'hypertrophie (les formules pour les calculs de ces paramètres sont détaillés dans la légende de la Figure 40).

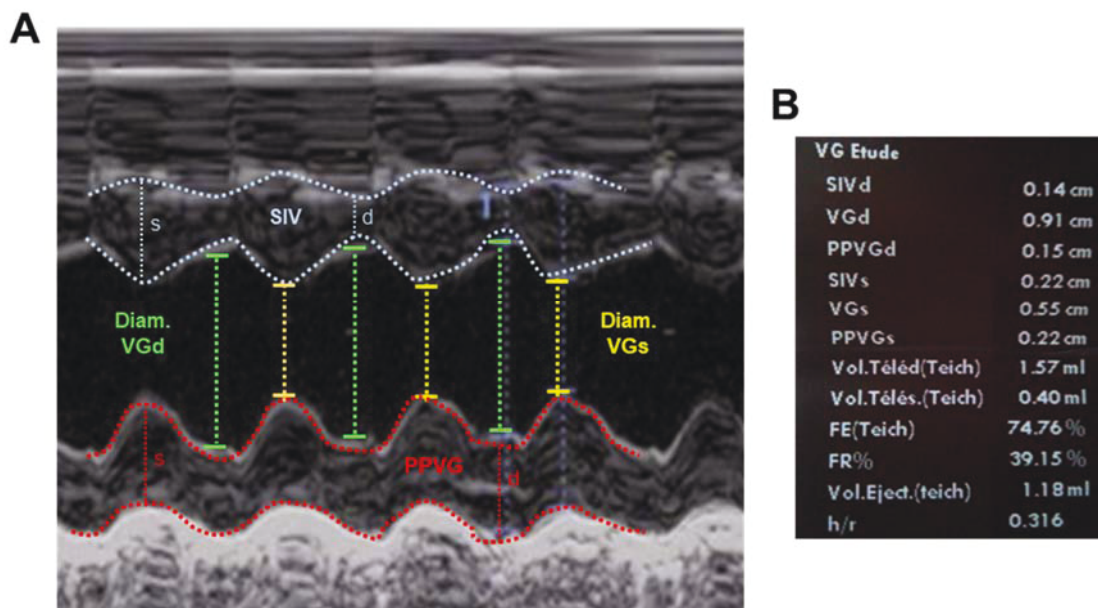


Figure 40 : Mesures des paramètres du ventricule gauche en échocardiographie selon le mode TM sur le cœur de rat adulte. (A) Le diamètre du ventricule gauche (VG) en diastole (vert) et en systole (jaune), ainsi que l'épaisseur du septum interventriculaire (SIV, s : systole, d : diastole, bleu) et de la paroi postérieure du VG (PPVG, s : systole, d : diastole, rouge) sont mesurés comme représenté sur l'image (modifié d'après Hartmann J et al.,2007). (B) Exemple de mesures obtenues sur l'échographe Vivid 7 Dimension (GE healthcare) pour un rat AAV-shCASK.

$$FR (\%) = [(VGd - VGs) / VGs]; FE (\%) = [(VTD - VTS) / (VTD)]; h/r = [(SIVd - PPVGd) / VGd]$$

Avec VTD = volume du VG en fin de diastole et VTS : volume du VG en fin de systole.

Par ailleurs, les observations réalisées par échographie cardiaque en mode temps mouvement ou bidimensionnel peuvent être complétées par un mode Doppler pulsé. Celui-ci permet de visualiser les flux cardiaques (aortique, mitral et pulmonaire) en continu et en couleur. Ce mode sert notamment à mesurer le débit cardiaque, aortique ou pulmonaire, ou encore le flux mitral.

Les échocardiographies ont été réalisées sur des rats anesthésiés par inhalation d'isoflurane (taux de 3-4% d'isoflurane constant couplé à 1 L/min d'oxygène). Les acquisitions et mesures échocardiographiques ont été obtenues sur un échographe Vivid 7 Dimension avec une sonde à haute fréquence de 8 à 14 MHz (GE healthcare). Cette exploration fonctionnelle *in vivo* a été menée sur la plateforme d'échographie cœur, muscles et vaisseaux (PECMV) de l'Hôpital de la Pitié-Salpêtrière (Paris). Nous avons comparé les résultats des différents paramètres des échocardiographies entre un groupe de rats adultes contrôles (AAV-shSCR) et un groupe de rats adultes ayant reçu un AAV-shCASK comprenant le tag GFP ou un groupe de rats adultes ayant reçu un AAV-shCASK sans tag GFP, à 3 mois post injection.

Les résultats obtenus à 1 mois post injection ne montrant pas de différences significatives pour tous les paramètres relevés, seuls les résultats obtenus à 3 mois post injection sont présentés ci-dessous. À 3 mois post injection, une dilatation du ventricule gauche est visible chez les rats ayant reçu l'AAV-shCASK sans tag par rapport au groupe contrôle (AAV-shSCR). En effet, on constate une augmentation du diamètre du ventricule gauche en fin de diastole (PPVG en mm : $8,97 \pm 0,17$ versus $8,37 \pm 0,07$ pour le contrôle AAV-shSCR, $P < 0,05$) et en fin de systole (PPVG en mm : $5,60 \pm 0,23$ versus $4,84 \pm 0,06$ pour le contrôle AAV-shSCR, $P < 0,001$) (Tableau 3). De plus, l'épaisseur du septum interventriculaire et le diamètre de la paroi postérieure du ventricule gauche en fin de systole sont plus fins (respectivement SIV en mm : $2,22 \pm 0,11$ versus $2,60 \pm 0,07$ pour le contrôle AAV-shSCR, $P < 0,01$; et PPVG en mm : $2,28 \pm 0,21$ versus $3,03 \pm 0,08$ pour le contrôle AAV-shSCR, $P < 0,01$) (Tableau 3). Ce remodelage ventriculaire chez les rats AAV-shCASK sans tag s'accompagne d'une altération de la fonction systolique du ventricule gauche avec une diminution de la fraction de raccourcissement (FR en % : $37,56 \pm 1,80$ versus $42,26 \pm 0,47$ pour le contrôle AAV-shSCR, $P < 0,01$) et de la fraction d'éjection (FE en % : $72,65 \pm 2,26$ versus $78,09 \pm 0,49$ pour le contrôle AAV-shSCR, $P < 0,01$) (Tableau 3). La fréquence cardiaque dans les trois groupes (AAV-shCASK avec ou sans tag et AAV-shSCR) est de l'ordre de 340 battements par minute et n'est pas significativement différente. D'après ces résultats d'échocardiographie, l'injection de l'AAV-shCASK sans tag GFP, chez les rats adultes induit l'installation au bout de 3 mois d'une dilatation du ventricule gauche marquée par un affinement des parois, une augmentation de son diamètre et une diminution de la quantité de sang éjectée. L'extinction de la protéine CASK dans le cœur entraînerait donc l'apparition d'une cardiopathie dilatée marquée par l'association d'une dilatation du ventricule gauche et d'un dysfonctionnement de la fonction pompe. En revanche, les résultats obtenus en échographie avec l'AAV taggé GFP ne montrent aucune

modification ni dans la structure, ni dans la fonction du ventricule gauche. En effet, les résultats obtenus pour les rats ayant reçu l'AAV-shCASK avec un tag GFP ne sont significativement pas différents de ceux obtenus pour les rats contrôles (AAV-shSCR) (Tableau 3). Ainsi, la GFP n'entraîne pas, comme cela avait déjà été montré, de cardiopathie dilatée (Huang et al. 2000) ou de perte de contractilité (Agbulut et al. 2007) des cellules cardiaques, qui aurait pu ici avoir des répercussions sur la fraction d'éjection ou encore la fréquence cardiaque. Au contraire, dans cette étude, l'AAV-shCASK avec le tag GFP rejoint le cœur en ciblant majoritairement les ventricules où il s'intègre aux cardiomyocytes ventriculaires (Figure 38) mais son action s'arrêterait là au vu des résultats d'échocardiographie. Ce ne serait donc pas la fonction cardiaque qui pourrait être affectée par la présence de la GFP mais plutôt le fonctionnement du shRNA. En effet, la seule différence qui réside entre les deux AAV-shCASK est la présence ou non de ce tag GFP. En exprimant la GFP, les cardiomyocytes co-expriment le shRNA mais l'activité de ce dernier a pu être altérée par l'étiquette fluorescente. Il pourrait être envisagé que la GFP, si elle est exprimée en trop grande quantité, limite l'interaction du shRNA avec ses protéines partenaires ou avec le brin d'ARN dont il doit empêcher la traduction.

3 mois post-injection			
	AAV-shSCR	AAV-shCASK (GFP)	AAV-shCASK (sans GFP)
Nombre d'animaux (n)	8	8	6
Paramètres fin de diastole (mm)			
Diamètre SIV	1,57 ± 0,04	1,54 ± 0,13 ^{ns}	1,45 ± 0,09 ^{ns}
Diamètre VG	8,37 ± 0,07	8,28 ± 0,10 ^{ns}	8,97 ± 0,17 [*]
Diamètre PPVG	2,02 ± 0,06	1,97 ± 0,07 ^{ns}	1,48 ± 0,18 ^{**}
Paramètres fin de systole (mm)			
Diamètre SIV	2,60 ± 0,07	2,75 ± 0,04 ^{ns}	2,22 ± 0,11 ^{**}
Diamètre VG	4,84 ± 0,06	4,74 ± 0,09 ^{ns}	5,60 ± 0,23 ^{***}
Diamètre PPVG	3,03 ± 0,08	2,92 ± 0,08 ^{ns}	2,28 ± 0,21 ^{**}
Fonctions ventriculaires gauches			
FE (%)	78,09 ± 0,49	78,98 ± 0,55 ^{ns}	72,65 ± 2,26 ^{**}
FR (%)	42,26 ± 0,47	42,87 ± 0,52 ^{ns}	37,56 ± 1,80 ^{**}
Ratio h/r	0,43 ± 0,01	0,45 ± 0,11 ^{ns}	0,33 ± 0,03 ^{***}
Surface de l'OG (mm²)	19,58 ± 1,78	20,40 ± 0,80 ^{ns}	32,67 ± 1,43 ^{***}

Tableau 3 : Modifications des fonctions ventriculaires gauches chez les rats ayant reçu l'AAV-shCASK sans tag à 3 mois post injection. Tableau récapitulatif des résultats des échocardiographies des rats injectés avec l'AAV-shCASK avec ou sans tag, comparés aux résultats obtenus chez les rats contrôles (AAV-shSCR). VG = Ventricule Gauche ; SIV = Septum Interventriculaire ; PPVG = Paroi Postérieure du VG ; FE : Fraction Ejection ; FR = Fraction de Raccourcissement ; h/r : ratio reflétant le degré de dilatation du VG ; OG=Oreillette Gauche. Les données sont présentées en moyenne ± SEM. (*) P<0,05 ; (**) P<0,01 ; (***) P<0,001 et ns = non significatif.

Outre la dilatation du ventricule gauche, les rats ayant reçu l'AAV-shCASK sans tag présentent également une dilation très prononcée de l'oreillette gauche (surface de l'oreillette gauche en mm² : $32,67 \pm 1,43$ versus $19,58 \pm 1,78$ pour le contrôle AAV-shSCR, $P < 0,001$). Cependant, lors des observations de microscopie, les oreillettes étaient bien moins infectées que les ventricules. Cette dilatation pourrait s'être installée consécutivement à la dilatation du ventricule. Un examen Doppler pourrait également renseigner sur le flux mitral et le fonctionnement de la valve qui sépare les cavités supérieure et inférieure du cœur gauche. En effet, une régurgitation mitrale peut entraîner la dilatation à la fois de l'oreillette et du ventricule gauches.

En parallèle des échocardiographies, une exploration de l'activité électrique du cœur des rats (AAV-shCASK et AAV-shSCR) a été menée par le biais d'électrocardiogrammes de surface. Nous avons précédemment vu que la protéine CASK participe à la distribution des canaux ioniques dans les microdomaines de la membrane des cardiomyocytes. À l'échelle du tissu cardiaque, l'influx électrique qui se propage depuis les oreillettes jusqu'aux ventricules actionne les phases successives de contraction et de relaxation (dépolariation et repolarisation) des cavités du cœur. À l'échelle cellulaire, cette contraction harmonieuse du tissu est rendue possible grâce à la répartition spécifique des canaux ioniques au sein de chaque cardiomyocyte. En alliant des enregistrements du potentiel d'action dans plusieurs régions du sarcolemme de cardiomyocytes de rats à de la microscopie, une étude a montré qu'une désorganisation des tubules-T empêchait la propagation du potentiel d'action à la fois vers l'intérieur du cardiomyocyte (*via* les tubules-T) mais aussi dans l'ensemble de la membrane latérale. Les canaux calciques des tubules-T n'étant plus présents pour induire la libération d'ions calcium par le réticulum sarcoplasmique, le potentiel d'action n'amorce pas sa phase 2 et la contraction de la cellule cardiaque n'a pas lieu (Sacconi et al. 2012). Ces résultats soulignent donc l'importance d'une organisation très précise, des différents domaines de la membrane les uns par rapport aux autres ainsi que des canaux ioniques qui y sont présents, afin d'assurer le bon déroulement de la phase de couplage excitation-contraction. Dans ce contexte, la protéine CASK pourrait donc être impliquée dans l'activation normale du couplage excitation-contraction et dans la propagation du potentiel d'action. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons comparé les résultats des électrocardiogrammes entre un groupe de rats adultes contrôle (AAV-shSCR) et un groupe de rats adultes ayant reçu un AAV-shCASK comprenant le tag GFP ou un groupe de rats adultes ayant reçu un AAV-shCASK sans tag GFP, à 3 mois post injection. Les électrocardiogrammes permettent d'enregistrer de manière non invasive les ondes électriques successives qui traversent le tissu cardiaque grâce à l'utilisation d'électrodes. Les principales mesures effectuées sur un électrocardiogramme sont : la durée de l'onde P (temps nécessaire à la dépolariation des oreillettes), la durée de l'intervalle PR (temps nécessaire au passage de l'onde électrique des oreillettes aux ventricules), la durée du

complexe QRS (temps nécessaire à la dépolarisation des ventricules), la durée de l'intervalle QT (temps nécessaire pour la dépolarisation et la repolarisation des ventricules) et enfin la durée de l'intervalle RR (reflet de la fréquence cardiaque) (Figure 41).

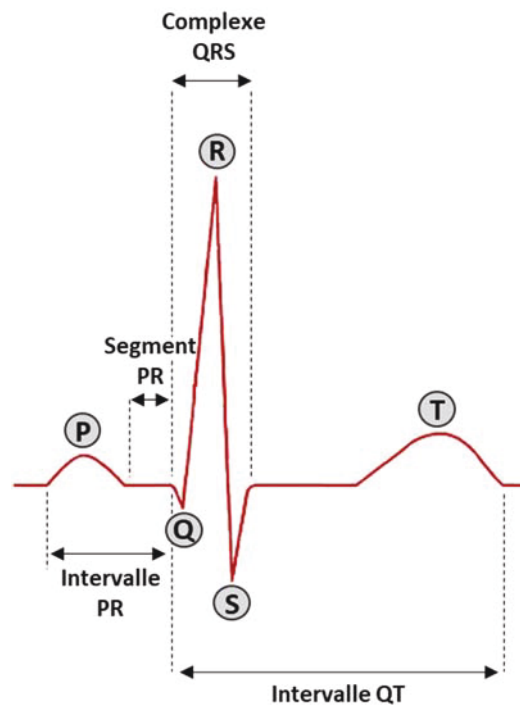


Figure 41 : Représentation schématique du tracé d'un électrocardiogramme normal. Les mesures des durées de l'onde P, de l'intervalle PR, du complexe QRS et de l'intervalle QT sont effectuées comme représenté sur le schéma à l'aide du logiciel d'analyse. Durant l'enregistrement, la répétition du complexe PQRST permet de déterminer la fréquence cardiaque.

Les électrocardiogrammes ont été réalisés sur des rats vigiles introduits dans un système composé d'un tunnel, adapté à la taille de l'animal, dans lequel sont placées quatre électrodes (une pour chaque patte) permettant de capter et d'enregistrer l'activité électrique cardiaque (ecgTUNNEL, EMKA technologies). L'animal est très légèrement anesthésié par de l'isoflurane (taux de 3-4% d'isoflurane constant couplé à 1 L/min d'oxygène) avant d'être placé à l'intérieur du tunnel. Celui-ci est ensuite refermé de manière à confiner l'animal et lui interdire tout mouvement, le contraignant ainsi à rester sur les électrodes. À noter que le tunnel n'est pas totalement hermétique et que l'air peut circuler à l'intérieur pour que l'animal puisse respirer. Une fois que l'animal s'est réveillé et qu'il s'est habitué à ce système de contention, l'enregistrement peut commencer à raison de 5 min par animal en utilisant le logiciel IOX 2.0 (EMKA technologies). Les tracés sont ensuite analysés et les durées de l'onde P, de l'intervalle PR, du complexe QRS, de l'intervalle QT et de l'intervalle RR sont mesurées sur le logiciel ecgAUTO (EMKA technologies).

Les résultats obtenus à 1 mois post injection ne montrant pas de différences significatives pour tous les paramètres relevés, seuls les résultats obtenus à 3 mois post injection sont présentés ci-

dessous. À 3 mois post injection, les rats ayant reçu l'AAV-shCASK sans tag présentent une augmentation de la durée du complexe QRS (en ms : $22,61 \pm 1,17$ versus $17,68 \pm 0,39$ pour le groupe contrôle AAV-shSCR, $P < 0,001$), ainsi qu'un allongement de la durée des intervalles QT et RR (respectivement en ms : $76,63 \pm 2,48$ versus $60,83 \pm 3,87$ pour les rats contrôle AAV-shSCR, $P < 0,01$; et $207,64 \pm 6,01$ versus $189,10 \pm 4,45$ pour le groupe contrôle AAV-shSCR, $P < 0,05$) (Tableau 4). Ainsi, la perte de CASK provoque un ralentissement de la conduction ventriculaire. Ces résultats soutiennent nos observations faites *in vitro*. En effet, la protéine CASK permet de réprimer l'expression fonctionnelle des canaux sodiques à la membrane latérale, nous avons également constaté que CASK exerçait une régulation négative sur les canaux calciques et sur certains canaux potassiques. Dès l'instant où CASK est inhibée alors l'expression fonctionnelle des canaux devient anarchique, ce qui a des répercussions sur le potentiel d'action lors des phases de dépolarisation et de repolarisation ainsi que sur la contractilité des cellules. L'extinction de l'expression de la protéine CASK dans le cœur est ici liée à l'apparition d'un remodelage électrique.

En revanche, la présence d'un tag GFP dans la séquence virale ne provoque aucune altération des durées et différents complexes et intervalles de l'électrocardiogramme. En effet, les résultats obtenus pour les rats ayant reçu l'AAV-shCASK avec un tag GFP ne sont pas significativement différents de ceux obtenus pour les rats contrôles (AAV-shSCR) (Tableau 4). Comme pour les résultats de l'exploration fonctionnelle du cœur par échocardiographie, il semblerait que le virus comprenant le tag GFP ne fonctionne pas malgré la présence évidente de la GFP dans les cardiomyocytes.

		3 mois post-injection		
		AAV-shSCR	AAV-shCASK (tag)	AAV-shCASK (sans tag)
Nombre d'animaux (n)		8	8	6
Durée onde P (ms)		$21,14 \pm 0,75$	$20,29 \pm 0,67$ ^{ns}	$20,40 \pm 1,19$ ^{ns}
Durée de l'intervalle PR (ms)		$47,30 \pm 1,73$	$48,53 \pm 0,69$ ^{ns}	$49,11 \pm 1,82$ ^{ns}
Durée du complexe QRS (ms)		$17,68 \pm 0,39$	$17,45 \pm 0,39$ ^{ns}	$22,61 \pm 1,17$ ^{***}
Durée de l'intervalle QT (ms)		$60,83 \pm 3,87$	$60,90 \pm 2,69$ ^{ns}	$76,63 \pm 2,48$ ^{**}
Durée de l'intervalle RR (ms)		$189,10 \pm 4,45$	$174,62 \pm 6,74$ ^{ns}	$207,64 \pm 6,01$ [*]

Tableau 4 : Ralentissement de la conduction ventriculaire chez les rats ayant reçu l'AAV-shCASK sans tag à 3 mois post injection. Tableau récapitulatif des résultats des électrocardiogrammes enregistrés chez des rats injectés avec l'AAV-shCASK avec ou sans tag, comparés aux résultats obtenus chez les rats contrôles (AAV-shSCR). Onde P = dépolarisation des oreillettes ; intervalle PR = passage de l'influx électrique des oreillettes aux ventricules ; complexe QRS = dépolarisation des ventricules ; intervalle QT : dépolarisation et repolarisation des ventricules ; intervalle RR = fréquence cardiaque. Les données sont présentées en moyenne \pm SEM. (*) $P < 0,05$; (**) $P < 0,01$; (***) $P < 0,001$ et ns = non significatif.

Suite aux résultats d'électrocardiogrammes montrant des défauts de repolarisation, nous avons décidé de comparer des enregistrements de potentiels d'action entre les rats ayant reçus l'AAV-shCASK sans tag et les rats AAV-shSCR (contrôles). Ces acquisitions ont été réalisées au sein de notre équipe par une technique d'électrophysiologie, la microélectrode intracellulaire. Lors du sacrifice des animaux, les muscles papillaires de la valve mitrale des ventricules gauches de l'ensemble des rats ont été prélevés et analysés. Le muscle papillaire est un excellent modèle pour étudier la physiologie ou la physiopathologie cardiaque et est régulièrement utilisé pour caractériser des modèles d'animaux transgéniques ou au cours d'études pharmacologiques (Descorps-Declère et al. 2001; Jensen et al. 2015; Uhl, Freichel, et Mathar 2015). De plus, la dissection des muscles papillaires permet de conserver l'intégrité du tissu musculaire cardiaque. Ainsi, contrairement à des enregistrements utilisant de fines bandes de la paroi ventriculaire, ici les muscles papillaires peuvent être excisés et le tissu restant utilisé pour d'autres expériences comme des expériences de biochimie.

Les rats ont été sacrifiés par l'injection d'une dose létale de pentobarbital sodique (dose 110 mg/kg), le cœur est rapidement prélevé et placé dans un bain froid de Tyrode (en mM : 120 NaCl ; 5,6 KCl ; 0,6 Na PO₄H₂H₂O ; 24 NaHCO₃ ; 1,1 MgCl₂6H₂O ; 0,45 CaCl₂2H₂O supplémenté en 1g/L Glucose, 100mg/L NaPyruvate et 3mg/mL de BDM) oxygéné (95% O₂ et 5% CO₂). Le ventricule gauche est ouvert afin de visualiser le muscle papillaire de la valve mitrale, celui-ci est retiré et placé dans un bain oxygéné de Tyrode délivré sous un flux continu et préchauffé à 37°C. Trois perfusions successives de 10 minutes chacune sont réalisées avec des solutions Tyrode supplémentée ou non en BDM. Le muscle papillaire est ensuite stimulé à la fréquence de 1Hz (intensité de stimulation minimale induisant une contraction) pendant 60 minutes dans la solution de Tyrode oxygénée. La température du bain est maintenue à 37 ± 0,5°C. Après 60 minutes de stimulation, l'enregistrement des potentiels d'action est réalisé *via* une microélectrode en verre remplie avec 3M de KCl et dont la résistance est supérieure à 20MΩ. Pour chaque empalement, le potentiel de repos de chaque potentiel d'action doit être stable pour pouvoir débiter les acquisitions. Un protocole avec une augmentation progressive de la fréquence de stimulation est ensuite lancé (50 potentiels d'action enregistrés à 1Hz puis 50 autres à 2Hz puis 75 autres à 5Hz). La durée et la morphologie des potentiels d'action sont ensuite comparées entre les deux groupes de rats (AAV-shCASK sans tag et AAV-shSCR). Les potentiels d'action sont enregistrés *via* l'utilisation du logiciel Acquis1 (version 4.0, Gérard Sadoc, CNRS, Gif Sur Yvette). Le même logiciel permet l'analyse des potentiels sélectionnés en mesurant automatiquement le potentiel membranaire de repos (Er), la durée du potentiel d'action à 0mV (APD) et son amplitude maximale (APA), la vitesse maximale de dépolarisation V_{max} ou dV/dt_{max} et la durée du potentiel d'action à 5, 25, 75 et 90% de la repolarisation (APD5%, APD25%, APD 75%, APD90% respectivement).

Plusieurs empacements ont été enregistrés dans les muscles papillaires des rats AAV-shSCR (8 empacements) et AAV-shCASK (17 empacements). Les potentiels de repos ne sont pas significativement différents entre les deux groupes à 1, 2 et 5 Hz (Figure 42). Chez les rats ayant reçu l'AAV-shCASK, on constate, à 5Hz de stimulation, une diminution de l'amplitude du potentiel d'action (en mV : $75,63 \pm 2,50$ versus $83,78 \pm 2,48$ pour le contrôle AAV-shSCR, $P < 0,05$) et de la vitesse maximale de dépolarisation (en V/s : $59,06 \pm 6,40$ versus $97,46 \pm 11,97$ pour le contrôle AAV-shSCR, $P < 0,05$) (Figure 42). Cette dernière composante est compatible avec nos résultats précédents. En effet, lors de l'extinction de la protéine CASK, l'augmentation du nombre de canaux sodiques fonctionnels à la membrane et responsables de la phase d'initiation du potentiel d'action vont induire des vagues de dépolarisation plus rapides. Cependant, on s'attendrait au résultat inverse quant à l'amplitude du potentiel d'action, celle-ci étant mesurée au pic de la phase de dépolarisation due aux canaux sodiques, si leur densité à la membrane augmente, alors l'amplitude du potentiel d'action devrait être plus élevée que chez les rats AAV-shSCR. Toutefois, il est envisageable que le faible nombre de rats ($n=2$) et d'enregistrements interprétables pour ce groupe soient à l'origine de cette différence. D'autres expériences seraient donc nécessaires pour confirmer ou non ces résultats.

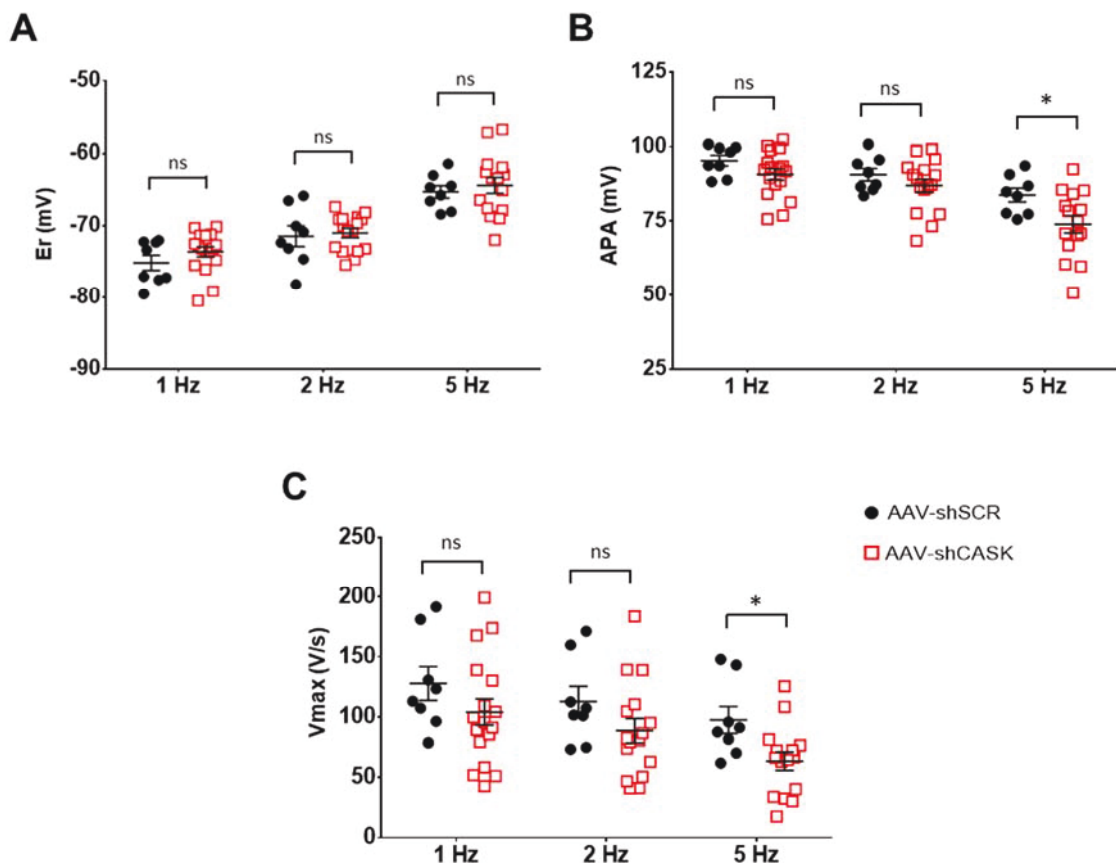


Figure 42 : Diminution de la vitesse de dépolarisation et de l'amplitude du potentiel d'action à 5 Hz chez les rats AAV-shCASK. (A) Comparaisons des potentiels de repos à 1, 2 et 5Hz. (B) Comparaisons de l'amplitude du potentiel d'action à 1, 2 et 5Hz. (C) Comparaisons de la vitesse de dépolarisation à 1, 2 et 5Hz. (nombre d'animaux : AAV-shSCR $n=2$ pour 8 empacements, AAV-shCASK $n=5$ pour 17 empacements). (*) $P < 0,05$ et ns = non significatif

La durée du potentiel d'action au début de la phase de repolarisation (5 et 25 %) n'est pas significativement différente entre les deux groupes AAV-shCASK et contrôle (Figure 43). Le stade très précoce de la phase de repolarisation, correspondant ici à 5 % de repolarisation, est caractérisé par l'activation du courant potassique transitoire sortant I_{to} . Nous avons constaté lors de notre approche *in vitro*, que ce courant n'était pas régulé par la protéine CASK (voir partie « Projet 2 : Résultats complémentaires » page 141). Ainsi, cette étude de potentiel d'action permet de soutenir nos résultats précédents. Lorsque la phase de repolarisation est largement avancée (75%) on observe à 1Hz chez les rats ayant reçu l'AAV-shCASK sans tag, une diminution de la durée du potentiel d'action (en mV : $25,83 \pm 1,71$ versus $36,30 \pm 2,98$ pour le contrôle AAV-shSCR ; $P < 0,05$) (Figure 43). Cette différence devient encore plus importante lors de la phase finale de repolarisation (90%) (en mV : $53,03 \pm 13,37$ versus $78,30 \pm 3,28$ pour le contrôle AAV-shSCR ; $P < 0,001$) (Figure 43). Toujours à 90% de repolarisation, la durée du potentiel d'action se raccourcit également à 2Hz de stimulation (en mV : $59,98 \pm 4,60$ versus $76,35 \pm 3,12$ pour le contrôle AAV-shSCR ; $P < 0,05$). Ces résultats indiquent donc que les courants potassiques repolarisants, qui interviennent vers 75% de la phase de repolarisation, comme les courants I_{Kr} ou I_{Ks} seraient plus importants chez les rats AAV-shCASK et accélèreraient la repolarisation. Cependant, ces deux courants n'ont quant à eux pas été testés en électrophysiologie sur des cardiomyocytes en culture n'exprimant plus la protéine CASK. À 90% de repolarisation, on trouve parmi les courants repolarisants, le courant potassique I_{K1} qui est régulé négativement par la protéine CASK (voir partie « Projet 2 : Résultats complémentaires » page 140). En résumé, une perte de la protéine CASK dans le cœur pourrait induire un courant I_{K1} de plus grande amplitude, raccourcissant donc la durée de repolarisation terminale. Un parallèle peut donc être fait entre les expériences d'enregistrement de potentiel d'action par microélectrode intracellulaire et les résultats de patch-clamp sur des cardiomyocytes en culture après modulation de l'expression de CASK par des adénovirus. Pour aller plus loin dans l'interprétation des résultats de cette partie, il faudrait ajouter d'autres protocoles expérimentaux associant des agents pharmacologiques au cours des enregistrements. En effet, de nombreuses molécules sont disponibles sur le marché et plusieurs d'entre elles ont déjà été décrites et validées pour des expériences d'électrophysiologie, lorsque l'on souhaite dissocier les différents courants ioniques enregistrés. L'avantage de ces agents pharmacologiques est qu'ils peuvent présenter une action inhibitrice sur une composante du potentiel d'action en particulier. Des enregistrements réalisés avec ou sans bloqueurs des différents canaux ioniques permettraient donc de discriminer ici chaque canal affecté par l'extinction de la protéine CASK durant la phase de repolarisation.

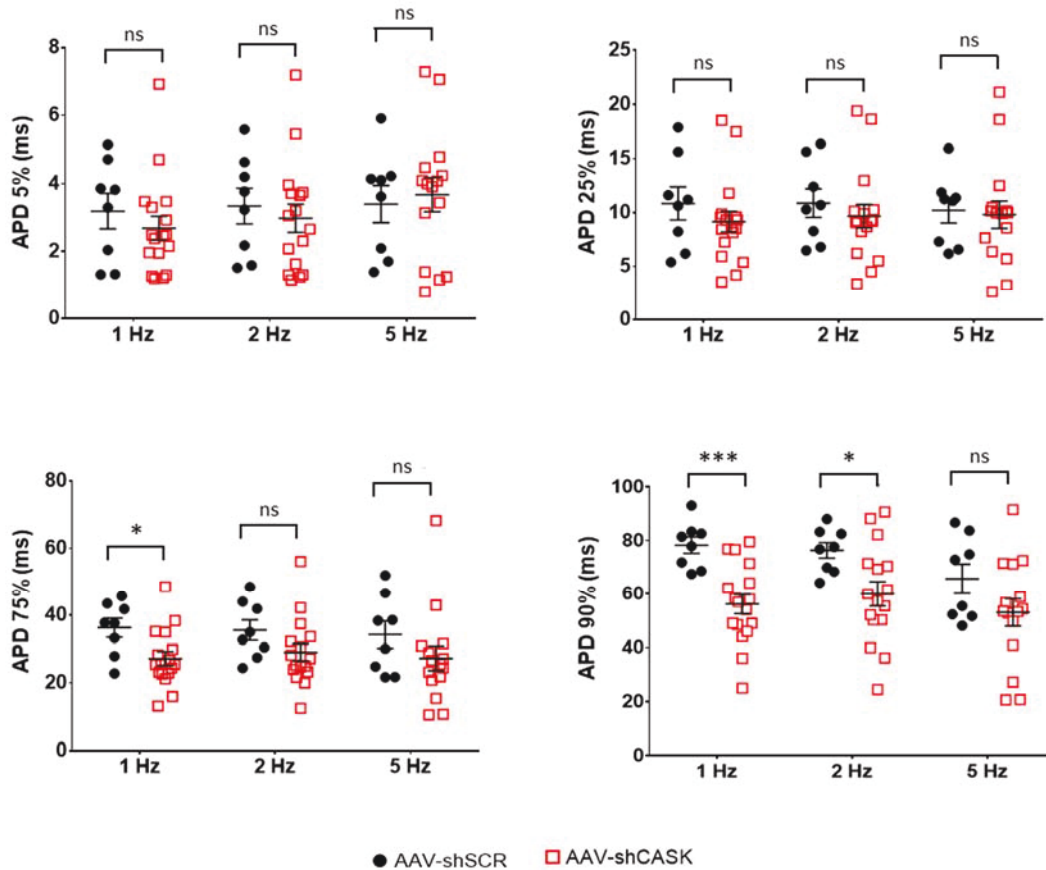


Figure 43 : Variation de la durée du potentiel d'action à 75 et 90% de repolarisation. Comparaisons des durées des potentiels d'action à 1, 2 et 5Hz enregistrées à 5%, 25%, 75% et 90% de repolarisation (nombre d'animaux : AAV-shSCR n=2 pour 8 empacements, AAV-shCASK n=5 pour 17 empacements). (*) $P < 0,05$; (***) $P < 0,001$ et ns = non significatif.

Cependant, malgré les résultats encourageants obtenus en échocardiographie, en électrocardiogramme ou en microélectrode, les analyses biochimiques et d'expression de l'ARNm de CASK se sont révélées être totalement négatives. La présence du tag GFP indiquait pourtant l'infection majoritaire des ventricules par le virus AAV-shCASK en microscopie et laissait sous entendre que la version sans tag du même virus, pouvait lui aussi atteindre le cœur et engendrer les résultats présentés plus haut. Ces dernières expériences de biochimie et de RT-qPCR ont été réalisées en dernier étant donné qu'une partie de l'étude a été menée avant les sacrifices et la microélectrode le jour même. Les extractions protéiques et d'ARNm ont donc été conduites en même temps pour les séries à 1 mois et à 3 mois.

Tout d'abord pour les rats ayant reçu l'AAV-shCASK comportant un tag GFP, aucune différence significative n'a été observée par rapport aux rats du groupe contrôle (AAV-shSCR) en terme d'expression protéique (Figure 44 A et B) et d'ARNm de CASK (Figure 44 C) dans les ventricules. Les résultats pour les oreillettes ne sont pas présentés ici, cependant, ils ne montrent pas non plus de différences significatives. Ces résultats négatifs confirment tout d'abord ceux précédemment observés en échocardiographie et électrocardiogramme. En effet, malgré la présence évidente de la GFP dans

les cellules ventriculaires en immunofluorescence, les ventricules tout comme les oreillettes, présentent toujours autant de protéine CASK et d'ARNm de CASK après 1 mois ou 3 mois post-infection. Ce virus n'a donc pas fonctionné. La présence de la GFP pourrait remettre en question le fonctionnement de l'AAV mais aucune étude n'a rapporté jusqu'à présent un problème d'interférence. Au contraire, l'utilisation de tag fluorescent reste couramment employée afin de détecter les tissus infectés en thérapie génique.

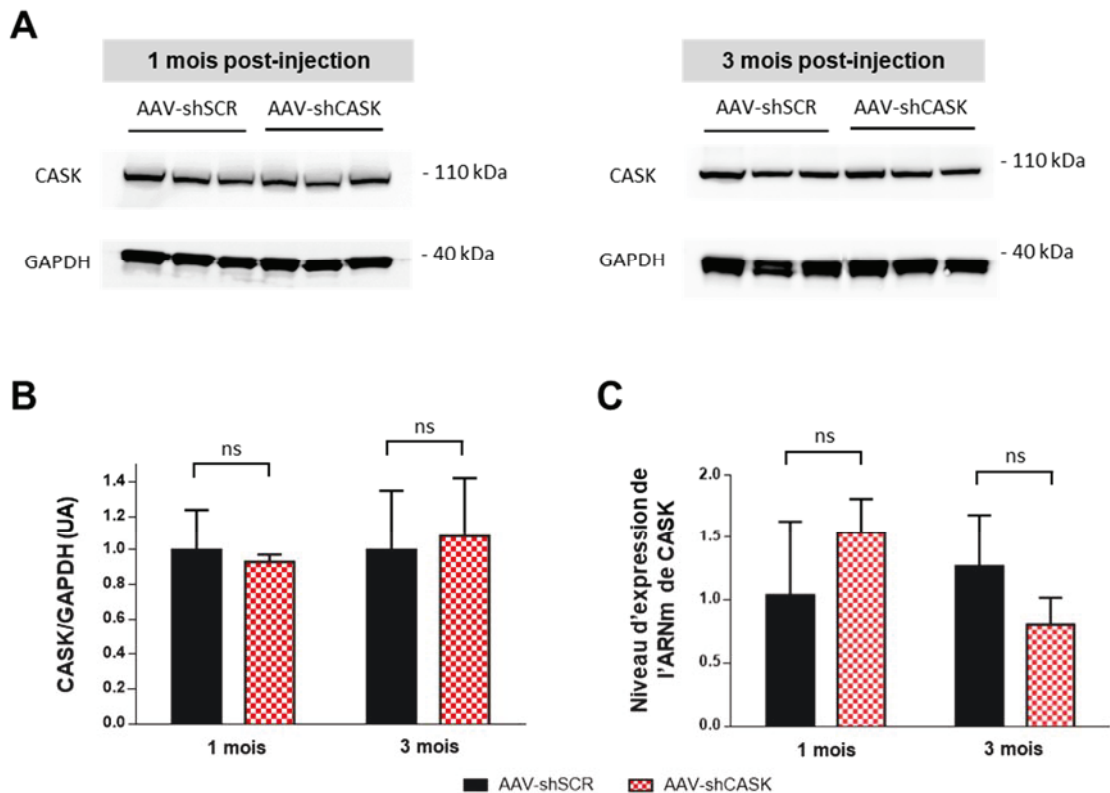


Figure 44 : Les taux d'expression protéique et d'ARNm et de CASK restent inchangés chez les rats ayant reçus l'AAV-shCASK avec le tag GFP à 1 mois et 3 mois post injection. (A) Western blots réalisés à partir de lysats de ventricules de rats à 1 mois (gauche) et 3 mois (droite) post-injection avec les AAV-shSCR et AAV-shCASK. La protéine CASK est détectée vers 100 kDa, la GAPDH sert de témoin de charge. (B) Histogramme représentant la quantification du taux d'expression protéique de CASK normalisé à la GAPDH entre les rats contrôles AAV-shSCR (n=3) et les rats AAV-shCASK (n=3). (C) Histogramme représentant le taux d'expression de l'ARNm de CASK entre les rats contrôles AAV-shSCR (n=3) et les rats AAV-shCASK (n=3) obtenus par RT-qPCR.

Concernant la série de rats ayant reçu l'AAV-shCASK sans tag, les ventricules et oreillettes ont été séparés afin de quantifier, par des analyses biochimiques et d'expression de gènes, le taux d'infection du virus. Ne comportant pas de tag, celui-ci n'a pas pu être suivi par microscopie. Les résultats d'échocardiographie et d'électrocardiogramme indiquaient que le ventricule gauche était soumis à un remodelage structural et électrique avec notamment une dilatation et un allongement de la durée de la phase de repolarisation. L'extinction de CASK semblait être à l'origine de ces modifications dans le

cœur des rats ayant reçus l'AAV-shCASK. Néanmoins, comme pour l'AAV-shCASK avec un tag GFP, il n'a pas été observé de différences significatives dans le taux d'expression protéique de CASK parmi les lysats de tissus ventriculaires ou atriaux. Seules les oreillettes gauches, qui présentaient une forte dilatation en échocardiographie, montrent une tendance à la diminution du taux protéique de CASK (près de 40%) dans ce tissu mais ce résultat n'est pas statistiquement exploitable du fait de la grande variabilité entre les rats (Figure 45).

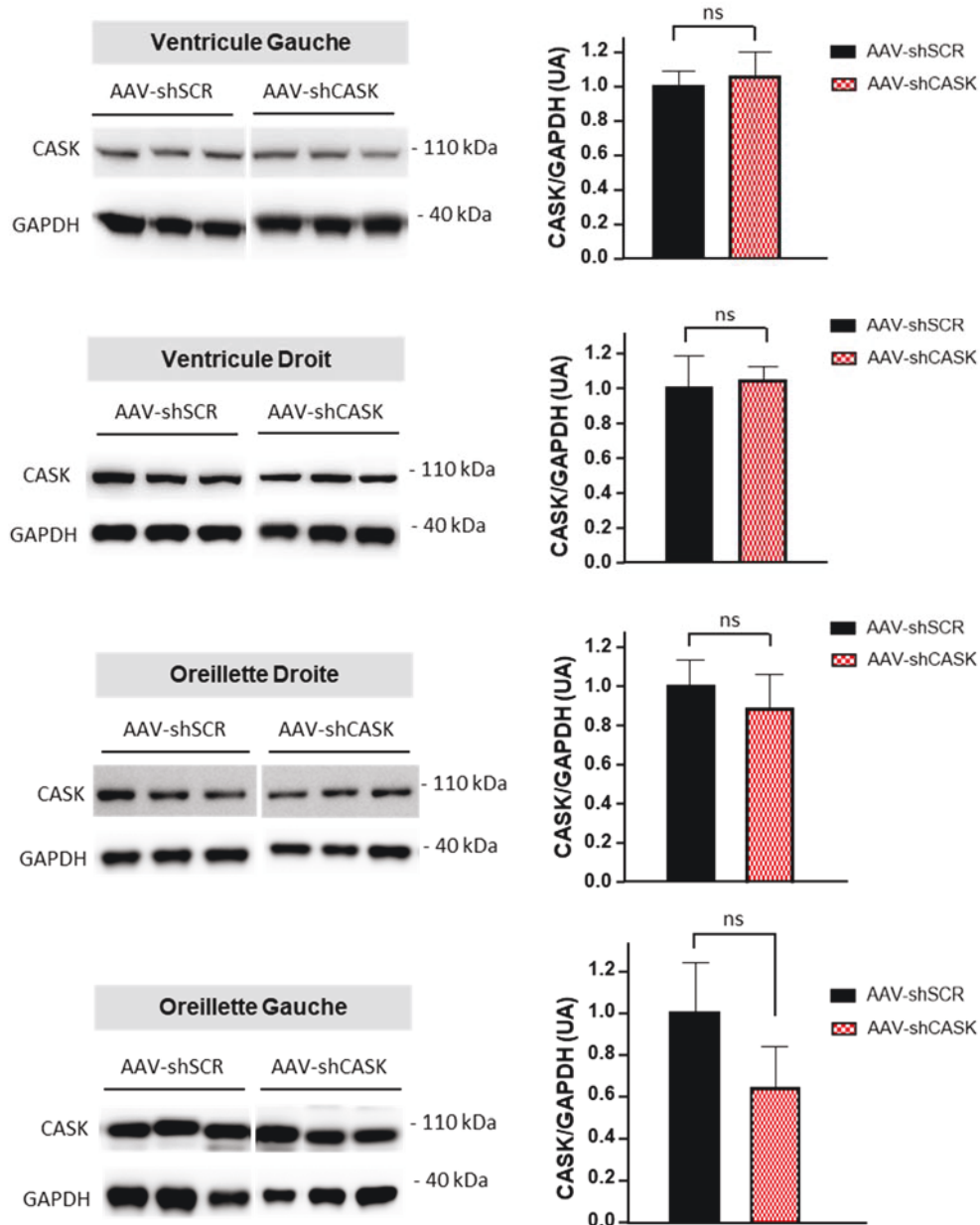


Figure 45 : L'AAV-shCASK sans tag GFP ne modifie pas le taux d'expression protéique de CASK à 3 mois post injection. Western blots réalisés à partir de lysats de ventricules gauche ou droit et d'oreillettes gauche ou droite de rats à 3 mois post-injection avec les AAV-shSCR et AAV-shCASK sans tag (gauche). La protéine CASK est détectée vers 100 kDa, la GAPDH sert de témoin de charge. Histogrammes représentant la quantification du taux d'expression protéique de CASK normalisé à la GAPDH de chaque western blot entre les rats contrôles AAV-shSCR (n=6) et les rats AAV-shCASK (n=6) (droite).

De plus, la quantification du niveau d'expression de l'ARNm de CASK dans les quatre tissus n'a pas montré de variations significatives entre les rats AAV-shCASK et les rats contrôles AAV-shSCR (Figure 46). Une tendance à la diminution de 20% du taux d'expression de l'ARNm de CASK est visible dans les ventricules gauches chez les rats AAV-shCASK par rapport au groupe contrôle (Figure 46). Néanmoins, ce résultat n'est pas statistiquement différent, d'autant plus qu'il n'est pas non plus en accord avec le résultat précédent sur le taux protéique de CASK qui lui, ne varie pas.

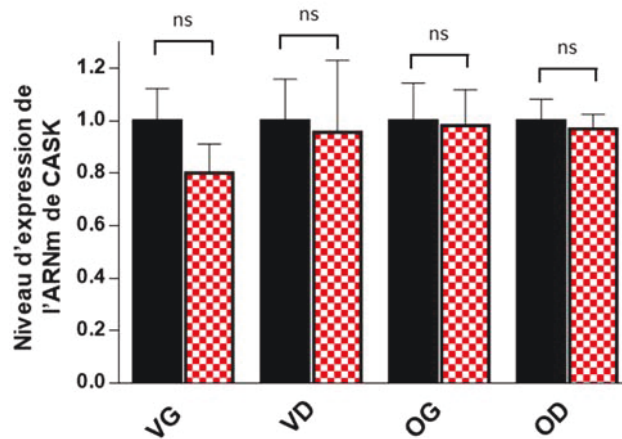


Figure 46 : L'AAV-shCASK sans tag GFP ne modifie pas le taux d'ARNm de CASK à 3 mois post injection. Histogramme représentant le taux d'ARNm de CASK dans les lysats de ventricules gauche ou droit (VG et VD) et d'oreillettes gauche ou droite (OG et OD) de rats à 3 mois post-injection avec les AAV-shSCR (n=6) et AAV-shCASK sans tag (n=6). La quantification du taux d'ARNm de CASK est normalisée à la condition contrôle AAV-shSCR.

Cette dernière partie de résultats demeure très surprenante. Premièrement ne pouvant montrer une diminution de CASK dans le cœur suite à l'injection d'un AAV supposé l'inhiber, l'ensemble de cette étude ne peut donc pas être exploitée davantage. Deuxièmement, les variations observées en échocardiographie, en électrocardiogramme ou encore en microélectrode obtenues suite à l'extinction présumée de CASK sont des résultats très intéressants mais ne peuvent pas être validés et sont alors remis en question. Par quoi ont-ils donc été induits si la protéine CASK est toujours transcrite et traduite dans le tissu cardiaque ? Cependant, dans la mesure où les expériences de RT-qPCR et de western blot ont été réalisées sur des lysats totaux, et non après purification des cardiomyocytes, l'éventuelle implication d'une prolifération des fibroblastes ou des cellules immunitaires masquant les effets de l'extinction de CASK dans les cardiomyocytes n'a pas pu être testée. En effet, le tissu cardiaque n'étant pas composé uniquement de cardiomyocytes, et la protéique CASK étant également présente dans les fibroblastes, une autre approche aurait été de digérer au préalable les cœurs par la technique du Langendorff et d'effectuer les expériences de western blot et de RT-qPCR sur du lysat enrichi en cardiomyocytes et non pas sur tissu entier. Cependant, pour cette série de rat AAV-shCASK sans tag GFP, les expériences de microélectrode nécessitaient la dissection du cœur entier rendant

impossible son utilisation en Langendorff. De plus, la quantité de virus à notre disposition n'étant pas très élevée, il n'a pas été possible de travailler avec un groupe d'animaux plus large permettant de les diviser en sous groupe afin de les attribuer à une expérimentation en particulier.

3. Conclusion

Une mise au point quant à l'utilisation d'un AAV-shCASK doit encore être réalisée afin de déterminer si le taux d'extinction attendu de CASK n'est pas visible du fait d'un taux d'infection trop faible du virus ou bien si ce sont les expériences post-mortern de biochimie qui ne ciblent pas suffisamment les cardiomyocytes. En effet, les myocytes cardiaques ne représentent qu'environ 30% de la population des cellules du muscle cardiaque. Ainsi, en travaillant sur le tissu dans son ensemble, les cardiomyocytes qui ont été infectés se retrouvent « dilués » parmi une population comprenant différents types cellulaires (fibroblastes, cellules endothéliales, macrophages, etc). Cependant, le fait qu'aucune des expériences de biochimie ou de RT-qPCR ne tende vers une diminution, il semble que le problème soit plutôt lié à la construction du virus. Parmi les sérotypes identifiés, nous avons retenu pour notre étude une recombinaison des AAVs 2 et 9. Certains travaux ont tenté de comparer la recombinaison de l'AAV2 avec les autres sérotypes, en se basant sur la présence de gènes rapporteurs, afin de déterminer quel sérotype présentait le meilleur tropisme cardiaque. Il en ressort que pour la souris, la recombinaison de l'AAV2 et 6, administrée par injection intracardiaque, est la plus appropriée pour infecter spécifiquement le cœur (Zincarrelli 2010). Chez le rat, après une injection dans l'apex du cœur, il a été rapporté que les AAVs de sérotype 1, 6 et 8 présentaient un fort tropisme cardiaque (Palomeque 2007). Un an plus tard, une autre étude démontre que pour le rat, le sérotype 9 est très largement supérieur en termes d'infection dans le cœur, comparativement aux sérotypes 1, 6 et 8 (Bish 2008). Ces résultats contradictoires tendent à montrer qu'il n'existe pas vraiment de sérotype parfaitement adapté ou du moins que le résultat dépend essentiellement du modèle animal utilisé, de la construction et des procédures expérimentales. Un changement de promoteur, en faveur du promoteur CMV, en amont de la séquence du shRNA pourrait éventuellement nous apporter des réponses quant à l'efficacité du promoteur U6 que nous avons utilisé pour notre construction. De plus, malgré la capacité de diffusion du virus, plusieurs équipes optent néanmoins pour délivrer l'AAV par une ou plusieurs injections directement dans le cœur chez l'animal nouveau-né. Ainsi, nous pourrions envisager d'optimiser notre mode d'administration du virus. Ces résultats, même négatifs, restent cependant encourageants et serviront de base pour améliorer par la suite l'étude du rôle fonctionnel de CASK dans un modèle *in vivo*.

Discussion et Perspectives

A. Résumé des travaux

Les canaux ioniques sont des protéines transmembranaires qui contrôlent et facilitent le passage d'ions de part et d'autre de la membrane plasmique des cellules. Dans les cardiomyocytes, cellules musculaires spécialisées dans l'excitabilité et la contraction du muscle cardiaque, ils sont à l'origine de l'initiation et de la propagation d'un influx électrique, aussi appelé potentiel d'action. La présence des canaux ioniques à la membrane de la cellule et leur bon fonctionnement sont dépendants de plusieurs composantes telles que leur trafic intracellulaire, leur ancrage et leur stabilisation au sarcolemme des myocytes ainsi que de leurs interactions avec différents partenaires. Depuis quelques années, il est admis que les canaux ioniques ne sont pas répartis de manière homogène dans les compartiments membranaires du cardiomyocyte (disque intercalaire *versus* membrane latérale) mais plutôt organisés en sous populations, elles-mêmes régulées différemment selon le complexe macromoléculaire auquel elles appartiennent et selon leur localisation au sein de domaines spécialisés de la membrane. Cependant, les mécanismes régissant le trafic et l'organisation de ces sous populations de canaux ne sont aujourd'hui que partiellement identifiés. Nous avons caractérisé pour la première fois un des acteurs de cette machinerie, la protéine MAGUK CASK. Les protéines MAGUK forment une famille de protéines à multiples domaines d'interactions protéiques. Fortement exprimées au niveau cérébral, ces protéines ont un rôle majeur dans la plasticité synaptique du fait de leur capacité à s'associer à des protéines d'échafaudage, au cytosquelette d'Actine, mais également en participant à l'ancrage et à l'agrégation de canaux ioniques. Dans les cardiomyocytes, nous avons montré que la protéine CASK est exclusivement localisée au niveau des costamères de la membrane latérale, en association avec le complexe Dystrophine-Glycoprotéines. De plus, cette protéine est aussi capable d'interagir et de réguler négativement une sous population de canaux sodiques Nav1.5 présente à la membrane latérale. Afin de décortiquer les mécanismes par lesquels CASK régule non seulement ces canaux Nav1.5 mais également d'autres canaux ioniques et d'identifier le(s) domaine(s) d'interaction avec ses partenaires, nous avons généré plusieurs adénovirus. Ces derniers nous ont permis d'inhiber l'expression de la protéine CASK ainsi que de surexprimer sa forme totale ou des formes tronquées pour chacun des 7 domaines qui la composent, directement dans des cardiomyocytes adultes de rats en culture. Nous avons alors identifié le domaine HOOK, comme étant responsable de l'interaction avec le complexe Dystrophine-Glycoprotéines et deux domaines intervenant dans la régulation du courant sodique : les domaines L27B et GUK. En effet, la perte de ces domaines permet de restaurer le courant I_{Na} annulant ainsi l'effet répresseur de la protéine CASK. Nous avons également constaté

que cette régulation du courant sodique ne passe ni par des modifications transcriptionnelles ni traductionnelles du canal Nav1.5. De plus, nous avons remarqué que la distribution membranaire des canaux sodiques diminuait lorsque la protéine CASK était surexprimée dans les cardiomyocytes en culture et que l'absence d'au moins un des domaines (L27B et GUK) semble entraîner une redistribution des canaux à la membrane. Ces résultats suggèrent donc que la protéine CASK est impliquée dans la régulation du trafic antérograde du canal sodique au sein du cardiomyocyte.

Parallèlement à cette étude *in vitro*, nous avons mené une étude sur le rôle fonctionnel de la protéine CASK *in vivo*. Pour cela, nous avons choisi d'inhiber notre protéine d'intérêt en ayant recours à l'utilisation de virus AAV. Cependant, l'extinction de la protéine CASK spécifiquement dans le cœur n'ayant pu être confirmée, les résultats obtenus n'ont pas pu être validés.

B. Discussion et perspectives

Du fait de son expression fonctionnelle restreinte à la membrane latérale des cardiomyocytes, de son appartenance au complexe Dystrophine-Glycoprotéines ainsi que de sa capacité à réguler négativement des courants ioniques, CASK se révèle être une protéine MAGUK singulière dont le rôle précis dans le cœur reste encore à être déterminé. En effet, sa localisation spécifique et son fonctionnement sont diamétralement opposés à ceux jusque là décrits pour les protéines MAGUKs SAP-97 et ZO-1 dans le cardiomyocyte. La caractérisation plus approfondie de la protéine CASK soulève donc de nombreuses questions notamment sur son implication potentielle au cours de processus physiologiques et physiopathologiques.

Implication de la protéine CASK dans la mécanotransduction

La mécanotransduction correspond aux mécanismes cellulaires par lesquels les cellules détectent les forces physiques provenant de leur environnement extérieur et les transforment en signaux biochimiques. La cellule est alors capable de générer une réponse vis-à-vis de ces forces sous la forme de modifications dans sa structure ou dans son fonctionnement. Parmi les forces mécaniques rencontrées par les cardiomyocytes on trouve des phénomènes d'étirement (*stretch*), de compression mais aussi de cisaillement (*shear stress*), ou encore des pertes d'adhérence à la matrice extracellulaire (Samarel 2005). Cette interaction cellule-substrat est rendue possible par la présence à la membrane de la cellule de protéines médiatrices, telle que l'Intégrine qui est la plus étudiée et la mieux caractérisée des protéines d'adhésion à la matrice extracellulaire (Li, Lee, et Zhu 2016). De manière

intéressante, il a été montré que la prolifération de fibroblastes humains était réduite lorsqu'ils sont soumis à des forces d'étirement répétées. Il a également été observé que cette perte de prolifération était engendrée par un arrêt du cycle cellulaire médié par la protéine CASK (Jiang et al. 2016). En effet, cette étude révèle que les protéines CASK et Intégrine $\beta 1$ interagissent directement et qu'une voie de signalisation conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire découlerait de cette interaction, dès lors que les cellules subissent un stress. De plus, des fibroblastes n'exprimant plus la protéine CASK (suite à une inhibition par ARN interférant) et ayant subi les mêmes forces d'étirement sont encore capables de proliférer (Jiang et al. 2016). Cette étude intègre donc la protéine CASK dans les phénomènes de mécanotransduction induits par l'Intégrine. Néanmoins, nous avons montré que dans le cardiomyocyte la protéine CASK liait préférentiellement le complexe Dystrophine-Glycoprotéines plutôt que le complexe Intégrine-Vinculine-Taline. Cependant, les deux complexes semblent être connectés par des protéines intermédiaires comme la Filamine. En effet, cette protéine est localisée le long des filaments d'Actine et assure le maintien de leurs architectures tri-dimensionnelles. De plus, il a été montré que la Filamine pouvait interagir aussi bien avec le complexe Dystrophine-Glycoprotéines par les Sarcoglycanes (Thompson et al. 2000) qu'avec les Intégrines du second complexe costamérique (Loo, Kanner, et Aruffo 1998; Gontier et al. 2005). La Filamine serait alors à l'origine de l'association des deux complexes en liant d'un côté les Sarcoglycanes et de l'autre l'Intégrine et participerait ainsi à la création d'une voie de signalisation bi-directionnelle entre les deux complexes du costamère (Anastasi et al. 2004, 2009). Dans ce contexte, la protéine CASK pourrait donc elle aussi s'intégrer parmi les multiples protéines intervenant dans les mécanismes de mécanotransduction, notamment en participant au recrutement d'autres protéines par le biais de ses nombreux domaines ou bien en activant des voies de signalisation en réponse aux tensions exercées sur le cardiomyocyte. Pour apporter des réponses à ces questions, nous avons entrepris de séquencer le transcriptome des cardiomyocytes en culture après modulation de l'expression génique de CASK (inhibition ou surexpression de ses formes totale et tronquées) par la technique du RNA-seq. Nous pourrions alors identifier les éventuelles voies de signalisation régulées par la protéine CASK ainsi que les protéines dont l'expression est liée à celle de CASK.

Implication de la protéine CASK dans des processus pathologiques

De nombreuses mutations perte de fonction du gène codant pour la protéine CASK ont été associées principalement à des retards psychomoteurs dont les degrés de sévérité varient selon les patients, des cas de microcéphalie ou encore d'épilepsie (Najm et al. 2008; Saitsu et al. 2012). Un seul cas recense l'implication d'une mutation sur le gène CASK liée à une pathologie cardiaque, à savoir la tétralogie de Fallot (cardiopathie congénitale caractérisée par une communication interventriculaire,

un déplacement de l'aorte, une sténose pulmonaire et une hypertrophie ventriculaire droite) (Nakamura et al. 2014). Au cours de notre première étude, nous avons constaté que dans le tissu atrial des patients présentant une dilatation de l'oreillette droite associée à une fibrillation atriale chronique (depuis plus de 6 mois), le taux d'expression protéique de CASK est diminué de 40%. Cependant, il n'a pas été observé de redistribution de la protéine CASK, celle-ci reste toujours exprimée exclusivement à la membrane latérale mais en moindre quantité (Article 1 Figure 8). Les mêmes résultats ont été obtenus dans les oreillettes dilatées de rats, chez lesquels un infarctus du myocarde a été induit par une ligature de l'artère coronaire gauche (Article 1 Online Figure VIII). Ainsi durant le remodelage du tissu atrial, l'expression de la protéine CASK est réduite. Une étude plus approfondie de l'implication de CASK au cours de processus pathologiques permettrait de nous renseigner sur le rôle de cette protéine durant le remodelage tissulaire. Pour cela, des rats ayant subi un infarctus du myocarde pourraient recevoir un vecteur viral permettant la surexpression de la protéine CASK (AAV-CASK), le phénotype cardiaque de ces animaux pourra ensuite être suivi par échocardiographies et électrocardiogrammes. L'hypothèse testée ici serait que la surexpression de la protéine CASK pourrait empêcher ou bien inverser le remodelage du tissu cardiaque des suites de l'infarctus. CASK en étant ainsi surexprimée pourrait alors contribuer à préserver la polarité structurale des cardiomyocytes (membrane latérale *versus* disque intercalaire) et empêcher leur désorganisation. Un autre processus pourrait également dépendre de la protéine CASK : la morphogénèse cardiaque. En effet, au cours du développement, les cardiomyocytes acquièrent leur polarité structurale et fonctionnelle et élaborent progressivement un tissu cardiaque fonctionnel. Des résultats préliminaires sur le profil d'expression de CASK ont déjà été obtenus dans des cœurs de rats à plusieurs stades de développement comprenant les stades embryonnaires (E16 et E18), à la naissance (J0), après la naissance (2, 4 et 6 semaines), à l'âge adulte (8 semaines) et enfin à un âge avancé (1 an). Nous avons constaté que l'expression de la protéine CASK était maximale durant les stades embryonnaires et se stabilisait durant les deux premières semaines de vie de l'animal avant de diminuer progressivement à partir d'un mois après la naissance. La N-Cadherine qui marque les disques intercalaires des cardiomyocytes suit également le même *pattern* d'expression. La Connexine-43 voit son expression protéique considérablement augmenter dès 4 semaines après la naissance avant de diminuer marquant ainsi l'établissement de la polarité du cardiomyocyte, avec un disque intercalaire enrichi en Connexine-43. La Syntrophine, quant à elle, présente un niveau d'expression protéique réduit pendant les stades embryonnaires avant d'augmenter graduellement jusqu'à 1 an (Figure 47). Ainsi, ces différentes protéines qui participent à l'établissement de la polarité du cardiomyocyte sont donc exprimées selon une cinétique différente. Bien que des résultats similaires aient déjà été observés notamment pour la Connexine-43 (Angst et al. 1997), nos observations soulignent surtout l'importance de la protéine CASK durant la mise en place du futur cœur chez les embryons. En effet, il avait été montré et que son

extinction était létale chez la souris dès le stade embryonnaire et induisait de très lourdes malformations cranio-faciales chez les nouveaux-nés, dont l'espérance de vie n'excédait pas quelques heures (Atasoy et al. 2007). Aucune étude n'avait encore été menée sur la cinétique d'expression de la protéine CASK durant la morphogénèse cardiaque. Nos résultats préliminaires supposent que la perte de la protéine CASK durant le développement embryonnaire puisse considérablement perturber la mise en place de la polarité des cardiomyocytes. Selon cette hypothèse, CASK pourrait ainsi amorcer l'établissement de cette polarité structurale en commençant par échaffauder des complexes avec les futurs composants de la membrane latérale, qui s'ajouteraient ensuite au fur et à mesure à l'image de la Syntrophine. Ainsi, la protéine CASK serait indispensable au cours du développement embryonnaire non pas seulement pour la formation des futures structures cérébrales mais aussi pour la formation d'organes vitaux tel que le cœur.

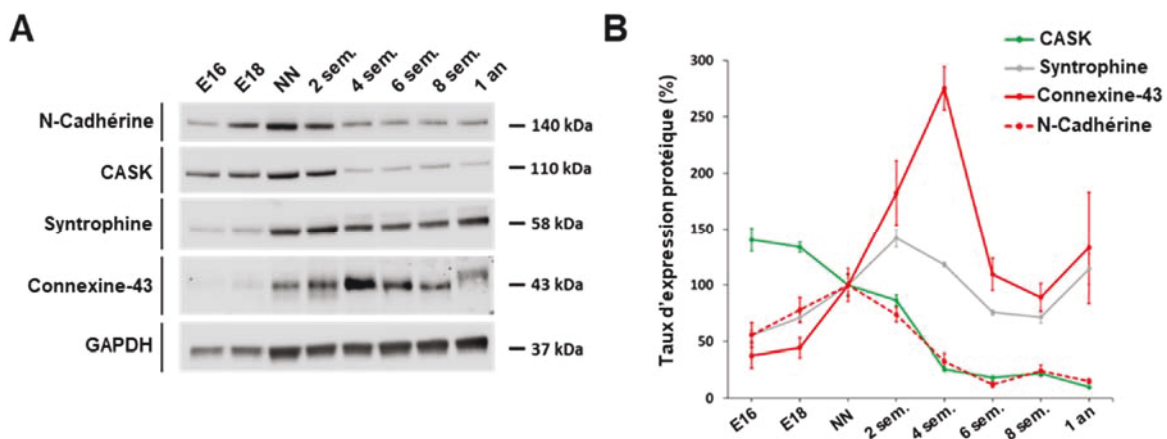


Figure 47 : Profil d'expression protéique au cours du développement des protéines spécialisées du disque intercalaire et de la membrane latérale dans les cardiomyocytes de rats. (A) Western blots réalisés à partir de lysats de ventricules à différents stades de développement (n=4-5), la N-Cadhérine et la Connexine-43 sont des protéines représentatives du disque intercalaire, CASK et la Syntrophine sont des protéines représentatives de la membrane latérale. La GAPDH sert de témoin de charge. (B) Profil d'expression des protéines en % avant et après la naissance. 16^{ème} et 18^{ème} jour du stade embryonnaire (E16 et E18); nouveau-né : NN ; sem : semaines après la naissance

Rôle de la protéine CASK dans le maintien de l'anisotropie

Comme évoqué précédemment, les protéines MAGUKs décrites dans le myocarde s'organisent différemment à la membrane du cardiomyocyte. Ainsi, les protéines ZO-1 et SAP-97 sont exprimées au niveau du disque intercalaire (Toshihiko Toyofuku et al. 1998; Godreau et al. 2002) et la protéine CASK est quant à elle associée au complexe Dystrophine-Glycoprotéines du costamère (Eichel, Beuriot et al. 2016). Cette particularité de localisation suggère ainsi un rôle particulier pour chacune de ces protéines d'ancrage. De plus, les canaux sodiques Na_v1.5 sont divisés en deux sous populations distinctes dans le myocyte cardiaque (Lin et al. 2011) et ne sont pas régulés de la même façon suivant

la protéine MAGUK avec laquelle ils interagissent. En effet, l'inhibition de la protéine SAP-97 entraîne une diminution du courant I_{Na} (Petitprez et al. 2011). Cette protéine exerce donc une régulation positive du courant I_{Na} au niveau du disque intercalaire dans les cardiomyocytes. À l'inverse, la protéine CASK régule négativement le courant I_{Na} à la membrane latérale. Cet exemple de la répartition particulière des protéines MAGUKs et de la régulation des canaux sodiques illustre la notion de polarité structurelle mais aussi fonctionnelle du cardiomyocyte. De manière intéressante, il a été montré que la mise en place de cette organisation différentielle des composants des domaines membranaires s'effectue au cours du développement (Spach et al. 2001). En effet, l'existence d'une telle dichotomie dans la structure du cardiomyocyte est essentielle afin d'assurer la propagation de proche en proche de l'influx électrique et la contraction harmonieuse de l'ensemble des myocytes cardiaques. Ainsi, on distingue deux modes de conduction de l'influx électrique : une conduction longitudinale, selon le grand axe du cardiomyocyte et une conduction transversale, selon l'axe perpendiculaire de la cellule. De nombreuses études ont rapporté que la transmission longitudinale de l'influx électrique d'un myocyte cardiaque à un autre *via* les jonctions communicantes (Connexines-43) était plus rapide par rapport à la transmission transversale. Cette différence de vitesse est à l'origine du phénomène d'anisotropie (Spach et Kootsey 1983; Spach 1999). Ce sens de conduction privilégié et rapide s'installe avec l'âge et avec l'organisation progressive des différentes protéines au sein des structures spécialisées de la membrane des cardiomyocytes. En effet, il a par exemple été montré qu'avant d'être localisées au disque intercalaire dans le myocyte cardiaque adulte, les Connexines-43 sont dans un premier temps distribuées équitablement entre la membrane latérale et le disque intercalaire dans un myocyte néonatal (Gourdie et al. 1992). Par ailleurs, en condition pathologique, le remodelage tissulaire consécutif à un infarctus du myocarde s'accompagne entre autres d'une latéralisation des Connexines-43 (Smith et al. 1991), d'une diminution de la vitesse de conduction transversale du potentiel d'action, provoquant alors une augmentation anormale de la conduction longitudinale occasionnant des troubles du rythme cardiaque (Peters et al. 1997). Si beaucoup d'études se concentrent sur l'organisation des protéines du disque intercalaire et sur leur importance dans la propagation de l'influx électrique, peu d'informations sont disponibles sur l'agencement dans le temps et dans l'espace des composants de la membrane latérale. Très présente dans les premiers stades du développement, la protéine CASK pourrait alors contribuer à adresser les protéines spécifiquement à la membrane latérale puis, lorsque l'architecture du cardiomyocyte est mature, l'expression de la protéine CASK serait réduite (Figure 47) mais pas abolie car cette protéine est nécessaire pour réguler l'expression fonctionnelle des canaux ioniques à la membrane latérale. Ainsi, en réprimant le courant sodique au niveau de la membrane latérale, CASK pourrait prévenir tout courant massif de sodium dans le sens transversal et favoriser la conduction longitudinale. Dans ce contexte, CASK pourrait être alors impliquée dans la conduction anisotrope du potentiel d'action cardiaque.

Identification du ou des domaines d'interaction de CASK avec le canal Nav1.5

Au cours de notre première étude, nous avons mis en évidence l'existence d'une interaction directe entre la protéine CASK et le canal Nav1.5 par le biais d'expériences de microscopie et de biochimie. En effet, le motif SIV d'interaction avec les domaines PDZ du canal Nav1.5, formé par les trois derniers acides aminés de sa partie C-terminale, est responsable de cette liaison. Par ailleurs, nous avons renforcé ce résultat en reproduisant les expériences de GST-pull down en utilisant non pas du lysat de cardiomyocytes mais de la protéine CASK purifiée. Ainsi, nous avons pu montrer que l'interaction entre la protéine CASK et le canal Nav1.5 ne nécessite pas de partenaires intermédiaires. Néanmoins, le ou les domaine(s) de CASK impliqués dans cette interaction avec le canal sodique n'est/ne sont pas encore identifié(s). Les adénovirus générés et permettant la surexpression des différentes formes tronquées de la protéine CASK pourront ainsi être individuellement testés lors de nouvelles expériences de GST-pull down. En fonction des délétions successives des domaines de CASK, nous pourrions alors vérifier si l'interaction est conservée entre CASK et le canal Nav1.5. Le premier domaine potentiel de la protéine CASK pouvant lier le canal sodique, sur son motif SIV C-terminal, serait le domaine PDZ. En effet, les protéines SAP-97 et Syntrophine interagissent avec le canal sodique par leurs domaines PDZ respectifs (Shy et al. 2014). Cependant, lors de nos expériences de surexpression de formes tronquées de CASK, la perte du domaine PDZ n'annule pas l'effet repressur de la protéine CASK sur le courant sodique. Il peut donc être envisagé qu'un autre domaine de la protéine CASK puisse se lier également au canal sodique *via* un site de liaison supplémentaire. De plus, une étude avait déjà rapporté l'existence d'un site de fixation, équivalent au motif SIV, mais localisé dans la partie N-terminale du canal sodique et assurant une liaison additionnelle avec la Syntrophine (Matamoros et al. 2016). Ainsi, la liaison avec le canal sodique pourrait reposer majoritairement sur le motif SIV C-terminal mais être tout de même conservée en l'absence du domaine PDZ de CASK, si un autre domaine de la protéine est lui aussi impliqué (soit sur le même motif SIV remplaçant alors le domaine PDZ manquant, soit sur un autre site de fixation du canal).

Régulation du courant sodique par la protéine CASK

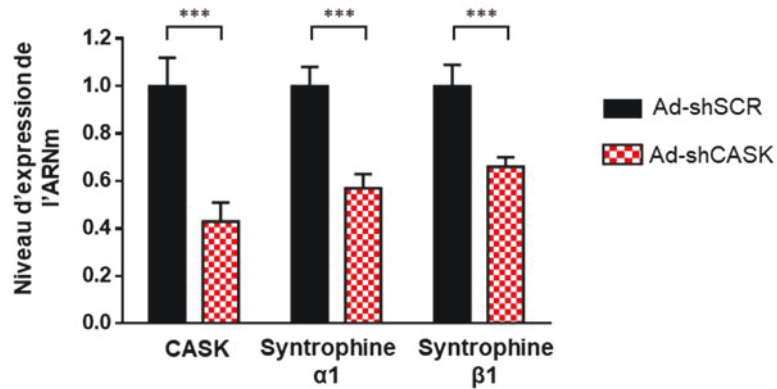
En s'intéressant aux différents domaines de la protéine CASK, notre étude a permis de mieux caractériser l'interaction existant entre CASK et la sous population de canaux sodiques présente à la membrane latérale des cardiomyocytes. Nous avons ainsi identifié deux domaines de la protéine CASK qui sont impliqués dans la régulation du courant sodique I_{Na} . En effet, la perte des domaines L27B ou GUK de CASK permet de restaurer le courant I_{Na} annulant ainsi l'effet répressur de CASK. Cette régulation du courant sodique ne passe ni par des modifications transcriptionnelles ni traductionnelles du canal Nav1.5. De plus, nous avons remarqué que la distribution membranaire des canaux sodiques

diminuait lorsque la protéine CASK était surexprimée dans les cardiomyocytes en culture. Dès lors que les domaines L27B ou GUK étaient tronqués, cette diminution n'était plus observée. Une des raisons qui pourrait expliquer ces résultats est que la protéine CASK affecte directement le trafic antérograde du canal sodique à un stade précoce, c'est-à-dire entre la sortie du réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, ou plus tardivement. Une récente étude menée sur les axones du modèle *C.elegans* a montré que la protéine CASK pouvait se lier à une Kinésine (UNC-104 de la famille des KIF1) *via* ses domaines L27 et GUK. Elle jouerait alors un rôle d'activateur en favorisant le mouvement de la kinésine le long de l'axone. Par mutations, les auteurs ont remarqué que l'inhibition de la protéine CASK provoquait une accumulation sous forme de *clusters* de la Kinésine et une rétention des vésicules dans le corps cellulaire du neurone. Parallèlement, les modulations de CASK auraient aussi une répercussion sur l'activité de la Dynéine (Wu, Shanmugam, et al. 2016). D'après nos résultats, nous pouvons supposer que CASK, dans les cardiomyocytes, agirait non pas comme un activateur des moteurs moléculaires prenant en charge les vésicules contenant les canaux sodiques mais comme répresseur. Dans notre étude, lorsque les domaines L27B et GUK sont présents, le courant sodique est diminué, mais si au moins un de ces deux domaines est absent, le courant est rétabli. L'utilisation d'une construction permettant de surexprimer la protéine CASK avec une double délétion (Ad-CASK^{ΔL27B-GUK}) permettrait de confirmer que ces deux domaines doivent nécessairement être présents pour permettre à la protéine CASK de réguler négativement le courant sodique. Cette régulation s'effectuerait alors *via* une possible rétention du canal dans la cellule grâce à des interactions avec des acteurs du trafic cellulaire antérograde.

Compétition entre les protéines CASK et Syntrophine pour la liaison au canal Nav1.5

Comme évoqué précédemment, le motif de liaison aux domaines PDZ du canal Nav1.5 permet de lier plusieurs protéines. Ainsi, ce motif de liaison est commun aux protéines CASK, SAP-97 et à la Syntrophine. Néanmoins, les protéines CASK et Syntrophine sont présentes uniquement à la membrane latérale et font partie du complexe Dystrophine-Glycoprotéines, tandis que la protéine SAP-97 est quant à elle restreinte au disque intercalaire. Ainsi, la liaison précoce avec l'un ou l'autre de ces partenaires déterminerait l'adressage du canal sodique dans un compartiment membranaire distinct. Cependant les protéines CASK et Syntrophine exercent des effets opposés sur le courant I_{Na} porté par les canaux Nav1.5. Il a ainsi été montré qu'une réduction dans le taux d'expression de la Syntrophine, observé notamment chez les souris mdx (modèle de la myopathie de Duchenne), conduit à une diminution de la densité de courant I_{Na} (Gavillet et al. 2006). À l'inverse, l'inhibition de la protéine CASK entraîne l'augmentation de la densité de courant sodique. De plus, des résultats similaires ont été observés avec la liaison des canaux potassiques Kir2.1 et Kir 2.2 avec la Syntrophine conduisant à

une augmentation de la densité à la membrane de ces canaux et du courant I_{K1} associé (Leonoudakis, Conti, Anderson, et al. 2004). Au cours de nos expériences complémentaires, nous avons observé un effet presseur de CASK sur le courant I_{K1} . De plus, nous avons constaté que dans les cardiomyocytes n'exprimant plus la protéine CASK, après l'infection par l'adénovirus Ad-shCASK, les taux d'ARNm (Figure 48) et protéiques (Article 1 Figure Online VII) de la Syntrophine sont également diminués.



*Figure 48 : Les taux d'expression d'ARNm des protéines Syntrophines α1 et β1 sont fortement diminués lorsque la protéine CASK est inhibée. Histogramme représentant les taux d'expression de l'ARNm de CASK et des Syntrophines α1 et β1 obtenus par RT-qPCR à partir de lysats de cardiomyocytes ventriculaires 5 jours après l'infection virale par Ad-shCASK (n=13) et Ad-shSCR (n=10). (***) P<0,001*

Ces observations suggèrent donc l'existence d'un mécanisme de régulation entre les protéines CASK et Syntrophine ainsi qu'un phénomène de compétition entre ces deux protéines pour les sites de liaisons aux canaux ioniques tels que Kir2.1, Kir2.2 et Nav1.5. Pour étudier les cinétiques d'association précoce entre ces canaux ioniques et leurs partenaires ainsi que leur adressage dans les microdomaines membranaires, une technique basée sur un système de rétention de protéines couplées à des étiquettes fluorescentes et du suivi de leur trafic par microscopie a été mise au point il y a quelques années (Boncompain et al. 2012). Cette technique appelée RUSH pour « *Retention Using Selective Hook* » permet de synchroniser la libération des protéines d'un compartiment donneur vers un compartiment receveur. Cette synchronisation du transport est rendu possible grâce à l'utilisation d'une protéine d'ancrage Hook fusionnée à la Streptavidine. Cette dernière permet la rétention réversible des protéines d'intérêt qui sont couplées à un peptide de liaison à la Streptavidine (SBP) et à un tag fluorescent. La rupture de la liaison entre la protéine d'ancrage et les protéines d'intérêt, dont on veut étudier le trafic vers leurs compartiments cibles en microscopie, se fait par ajout de Biotine. Celle-ci présente une forte affinité pour la Streptavidine et prend ainsi la place du peptide SBP (Figure 49).

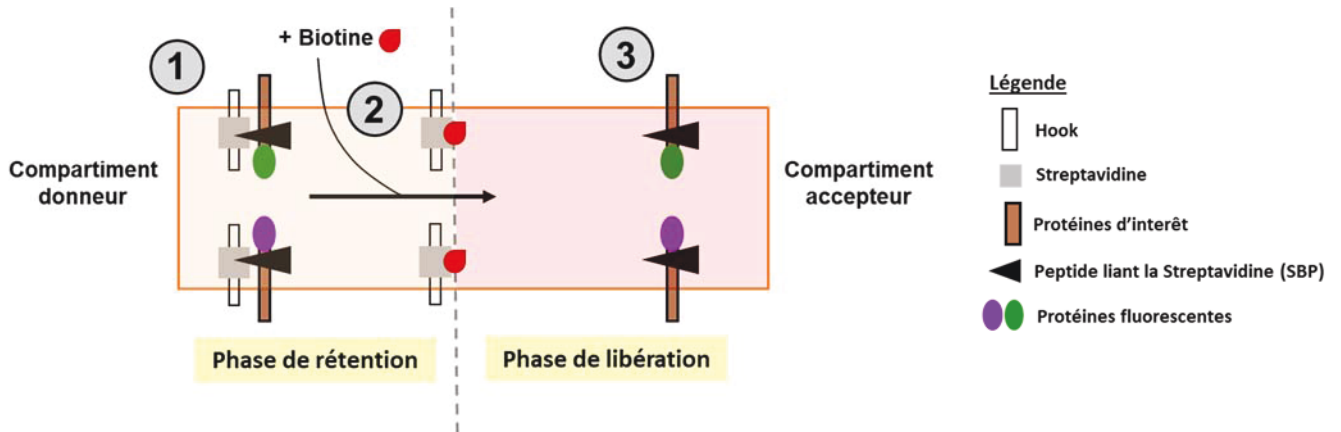


Figure 49 : Principe du système de Retention Using Selective Hook. Représentation schématique du fonctionnement du système RUSH. (1) Les protéines d'ancrage Hook sont fusionnées à la Streptavidine et retiennent les protéines d'intérêt par une liaison au peptide SBP dans le compartiment donneur. (2) L'ajout de la Biotine entraîne la compétition entre la Biotine et le peptide SBP pour le site de liaison à la Streptavidine. La Biotine dont l'affinité pour la Streptavidine est très forte prend la place du peptide SBP, ce qui libère les protéines d'intérêt. (3) Les protéines qui ne sont plus retenues aux protéines Hook peuvent alors migrer vers leur compartiment accepteur et leurs trafics sont suivis en microscopie par le biais de leurs tags fluorescents.

Aucune étude ne rapportant la cinétique du trafic du canal sodique, ce système pourrait alors permettre de suivre son devenir dans la cellule depuis un compartiment donneur choisi (réticulum sarcoplasmique ou appareil de Golgi) jusqu'à un compartiment cible (membrane latérale ou disque intercalaire du cardiomyocyte). L'ajout de ses différents partenaires comme la Syntrophine, CASK, l'Ankyrine-G, la Connexine-43 ou encore la protéine SAP-97 nous fournirait des informations supplémentaires pour comprendre à quel moment et dans quel compartiment ont lieu ces interactions ainsi que leurs conséquences sur l'adressage sur canal $Na_v1.5$. Par ailleurs, il sera également possible de suivre le trafic rétrograde du canal vers les voies de dégradation ou de recyclage. De plus, l'expression des différentes constructions pouvant être transposable aux adénovirus, nous pourrions alors travailler directement dans les cardiomyocytes de rat adulte. Parallèlement à cette technique de RUSH, nous avons commencé à étudier le trafic du canal sodique *via* une méthode alternative en utilisant un adénovirus permettant sa surexpression dans des cardiomyocytes de rats adultes. Le canal ainsi généré est couplé à une étiquette fluorescente mCherry, ce qui permet de suivre le canal en microscopie. Nous avons ainsi constaté que dès 3 jours post infection, le canal surexprimé rejoint le plan membranaire (Figure 50) où il y est alors fonctionnel. Grâce à cette approche, nous pourrions suivre le devenir de ce canal (fusionné à la mCherry) et de son partenaire, la protéine CASK (fusionnée à la GFP), en microscopie TIRF par acquisition d'images à différent temps (sur cellules fixées) ainsi qu'en enregistrements vidéo de plusieurs heures (sur cellules vivantes en culture). Ces expériences de co-surexpression pourront être également réalisées avec les formes tronquées de la protéine CASK, notamment les délétions des domaines impliqués dans la régulation négative des canaux sodiques :

les domaines L27B et GUK. Le trafic de ces protéines surexprimées dans les cardiomyocytes vivants, pourra alors être directement analysé et nous apporter des informations sur le temps que met le canal à atteindre le plan membranaire (en présence et en absence de CASK et de ses formes tronquées), sur la durée de son expression fonctionnelle à la membrane avant d'être internalisé ou encore sur sa dynamique dans le plan membranaire.

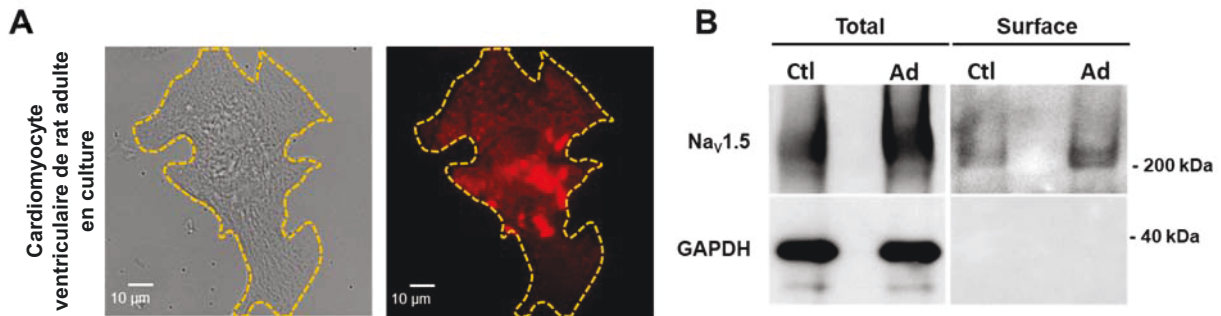


Figure 50: Expression dans le plan membranaire des cardiomyocytes du canal Nav_v1.5-mCherry.

(A) Images acquises en microscopie TIRF sur un cardiomyocyte ventriculaire de rat adulte en culture (en fond clair, gauche) et en fluorescence (droite) 3 à 4 jours post infection par un adénovirus permettant la surexpression du canal Nav_v1.5 couplé au tag mCherry. (B) Expérience de biotinylation à partir de lysats de cardiomyocytes ventriculaires montrant une augmentation dans la fraction des protéines de surface biotinyllées, du canal Nav_v1.5-mCherry lors de sa surexpression (Ad) en comparaison avec la condition contrôle (Ctl) ou seul le canal Nav_v1.5 endogène est exprimé.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

A

- Abi-Char, Joëlle, Saïd El-Haou, Elise Balse, Nathalie Neyroud, Roger Vranckx, Alain Coulombe, et Stéphane N. Hatem. 2008. « The Anchoring Protein SAP97 Retains Kv1.5 Channels in the Plasma Membrane of Cardiac Myocytes ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 294 (4): H1851-1861.
- Abriel, Hugues. 2010. « Cardiac Sodium Channel Na(v)1.5 and Interacting Proteins: Physiology and Pathophysiology ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 48 (1): 2-11.
- Agbulut, Onnik, Alexis Huet, Nicolas Niederländer, Michel Puceat, Philippe Menasché, et Catherine Coirault. 2007. « Green Fluorescent Protein Impairs Actin-Myosin Interactions by Binding to the Actin-Binding Site of Myosin ». *Journal of Biological Chemistry* 282 (14): 10465-71.
- Agullo-Pascual, Esperanza, Xianming Lin, Alejandra Leo-Macias, Mingliang Zhang, Feng-Xia Liang, Zhen Li, Anna Pfenniger, et al. 2014. « Super-Resolution Imaging Reveals That Loss of the C-Terminus of Connexin43 Limits Microtubule plus-End Capture and NaV1.5 Localization at the Intercalated Disc ». *Cardiovascular Research* 104 (2): 371-81.
- Aiba, Takeshi, Federica Farinelli, Geran KostECKI, Geoffrey G. Hesketh, David Edwards, Subrata Biswas, Leslie Tung, et Gordon F. Tomaselli. 2014. « A Mutation Causing Brugada Syndrome Identifies a Mechanism for Altered Autonomic and Oxidant Regulation of Cardiac Sodium CurrentsCLINICAL PERSPECTIVE ». *Circulation: Genomic and Precision Medicine* 7 (3): 249-56.
- Alewine, Christine, Bo-young Kim, Vandana Hegde, et Paul A. Welling. 2007. « Lin-7 targets the Kir 2.3 channel on the basolateral membrane via a L27 domain interaction with CASK ». *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 293 (6): C1733-41.
- Alexander, David B., et Gary S. Goldberg. 2003. « Transfer of Biologically Important Molecules between Cells through Gap Junction Channels ». *Current Medicinal Chemistry* 10 (19): 2045-58.
- Anastasi, Giuseppe, Giuseppina Cutroneo, Roberto Gaeta, Debora Di Mauro, Alba Arco, Angela Consolo, Giuseppe Santoro, Fabio Trimarchi, et Angelo Favalaro. 2009. « Dystrophin-Glycoprotein Complex and Vinculin-Talin-Integrin System in Human Adult Cardiac Muscle ». *International Journal of Molecular Medicine* 23 (2): 149-59.
- Anastasi, Giuseppe, Giuseppina Cutroneo, Fabio Trimarchi, Giuseppe Santoro, Daniele Bruschetta, Placido Bramanti, Antonina Pisani, et Angelo Favalaro. 2004. « Evaluation of Sarcoglycans, Vinculin-Talin-Integrin System and Filamin2 in Alpha- and Gamma-Sarcoglycanopathy: An Immunohistochemical Study ». *International Journal of Molecular Medicine* 14 (6): 989-99.
- Anderson, James Melvin. 1996. « Cell Signalling: MAGUK Magic ». *Current Biology* 6 (4): 382-84.
- Angst, B. D., L. U. Khan, N. J. Severs, K. Whitely, S. Rothery, R. P. Thompson, A. I. Magee, et R. G. Gourdie. 1997. « Dissociated Spatial Patterning of Gap Junctions and Cell Adhesion Junctions during Postnatal Differentiation of Ventricular Myocardium ». *Circulation Research* 80 (1): 88-94.
- Aoki, C., I. Miko, H. Oviedo, T. Mikeladze-Dvali, L. Alexandre, N. Sweeney, et D. S. Bredt. 2001. « Electron Microscopic Immunocytochemical Detection of PSD-95, PSD-93, SAP-102, and SAP-97 at Postsynaptic, Presynaptic, and Nonsynaptic Sites of Adult and Neonatal Rat Visual Cortex ». *Synapse (New York, N.Y.)* 40 (4): 239-57.

- Araç, Demet, Antony A. Boucard, Engin Ozkan, Pavel Strop, Evan Newell, Thomas C. Südhof, et Axel T. Brunger. 2007. « Structures of Neuroligin-1 and the Neuroligin-1/Neurexin-1 Beta Complex Reveal Specific Protein-Protein and Protein-Ca²⁺ Interactions ». *Neuron* 56 (6): 992-1003.
- Aravindan, Rolands G., Victor P. Fomin, Ulhas P. Naik, Mark J. Modelski, Meghna U. Naik, Deni S. Galileo, Randall L. Duncan, et Patricia A. Martin-Deleon. 2012. « CASK Interacts with PMCA4b and JAM-A on the Mouse Sperm Flagellum to Regulate Ca²⁺ Homeostasis and Motility ». *Journal of Cellular Physiology* 227 (8): 3138-50.
- Atasoy, Deniz, Susanne Schoch, Angela Ho, Krisztina A. Nadasy, Xinran Liu, Weiqi Zhang, Konark Mukherjee, et al. 2007. « Deletion of CASK in mice is lethal and impairs synaptic function ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (7): 2525-30.

B

- Baines, Anthony J., Hui-Chun Lu, et Pauline M. Bennett. 2014. « The Protein 4.1 Family: Hub Proteins in Animals for Organizing Membrane Proteins ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1838 (2): 605-19.
- Balakrishnan, Balaji, et Giridhara R. Jayandharan. 2014. « Basic Biology of Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors Used in Gene Therapy ». *Current Gene Therapy* 14 (2): 86-100.
- Balse, Elise, David F. Steele, Hugues Abriel, Alain Coulombe, David Fedida, et Stéphane N. Hatem. 2012. « Dynamic of Ion Channel Expression at the Plasma Membrane of Cardiomyocytes ». *Physiological Reviews* 92 (3): 1317-58.
- Balycheva, Marina, Giuseppe Faggian, Alexey V. Glukhov, et Julia Gorelik. 2015. « Microdomain-specific localization of functional ion channels in cardiomyocytes: an emerging concept of local regulation and remodelling ». *Biophysical Reviews* 7 (1): 43-62.
- Barker, Ralph J., Robert L. Price, et Robert G. Gourdie. 2002. « Increased Association of ZO-1 with Connexin43 during Remodeling of Cardiac Gap Junctions ». *Circulation Research* 90 (3): 317-24.
- Bartos, Daniel C., Eleonora Grandi, et Crystal M. Ripplinger. 2015. « Ion Channels in the Heart ». *Comprehensive Physiology* 5 (3): 1423-64.
- Bauer, H., J. Zweimueller-Mayer, P. Steinbacher, A. Lametschwandtner, et H. C. Bauer. 2010. « The Dual Role of Zonula Occludens (ZO) Proteins ». Research article. *BioMed Research International*. 2010.
- Beardslee, M. A., J. G. Laing, E. C. Beyer, et J. E. Saffitz. 1998. « Rapid Turnover of Connexin43 in the Adult Rat Heart ». *Circulation Research* 83 (6): 629-35.
- Bedford, Mark T., et Steven G. Clarke. 2009. « Protein Arginine Methylation in Mammals: Who, What, and Why ». *Molecular Cell* 33 (1): 1-13.
- Bennett, Eric S. 2002. « Isoform-Specific Effects of Sialic Acid on Voltage-Dependent Na⁺ Channel Gating: Functional Sialic Acids Are Localized to the S5-S6 Loop of Domain I ». *The Journal of Physiology* 538 (3): 675-90.
- Béri-Dexheimer, M., C. Bonnet, P. Chambon, K. Brochet, M. -J. Grégoire, et P. Jonveaux. 2007. « L'hybridation génomique comparative sur microréseau d'ADN (puces à ADN) en pathologie chromosomique constitutionnelle ». *Pathologie Biologie* 55 (1): 13-18.
- Berner, Nicole, Karl-Richard Reutter, et Dieter H. Wolf. 2018. « Protein Quality Control of the Endoplasmic Reticulum and Ubiquitin-Proteasome-Triggered Degradation of Aberrant Proteins: Yeast Pioneers the Path ». *Annual Review of Biochemistry* 87 (juin): 751-82.

- Bers, Donald. 2001. *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force*. Springer Science & Business Media.
- Bers, Donald M., et Edward Perez-Reyes. 1999. « Ca Channels in Cardiac Myocytes: Structure and Function in Ca Influx and Intracellular Ca Release ». *Cardiovascular Research* 42 (2): 339-60.
- Bertin, John, Lin Wang, Yin Guo, Michael D. Jacobson, Jean-Luc Poyet, Srinivasa M. Srinivasula, Sarah Merriam, Peter S. DiStefano, et Emad S. Alnemri. 2001. « CARD11 and CARD14 Are Novel Caspase Recruitment Domain (CARD)/Membrane-Associated Guanylate Kinase (MAGUK) Family Members That Interact with BCL10 and Activate NF-KB ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (15): 11877-82.
- Beyder, A., S. J. Gibbons, A. Mazzone, P. R. Strege, S. A. Saravanaperumal, L. Sha, S. Higgins, et al. 2016. « Expression and Function of the Scn5a-Encoded Voltage-Gated Sodium Channel NaV 1.5 in the Rat Jejunum ». *Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 28 (1): 64-73.
- Beyder, Arthur, Amelia Mazzone, Peter R. Strege, David J. Tester, Yuri A. Saito, Cheryl E. Bernard, Felicity T. Enders, et al. 2014. « Loss-of-Function of the Voltage-Gated Sodium Channel NaV1.5 (Channelopathies) in Patients with Irritable Bowel Syndrome ». *Gastroenterology* 146 (7): 1659-68.
- Bhargava, Anamika, Xianming Lin, Pavel Novak, Kinneri Mehta, Yuri Korchev, Mario Delmar, et Julia Gorelik. 2013. « Super-Resolution Scanning Patch-Clamp Reveals Clustering of Functional Ion Channels in the Adult Ventricular Myocyte ». *Circulation research* 112 (8): 1112-20.
- Biederer, T., et T. C. Südhof. 2001. « CASK and Protein 4.1 Support F-Actin Nucleation on Neurexins ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (51): 47869-76.
- Biederer, Thomas, Yildirim Sara, Marina Mozhayeva, Deniz Atasoy, Xinran Liu, Ege T. Kavalali, et Thomas C. Südhof. 2002. « SynCAM, a Synaptic Adhesion Molecule That Drives Synapse Assembly ». *Science (New York, N.Y.)* 297 (5586): 1525-31.
- Bito, Virginie, Frank R. Heinzel, Liesbeth Biesmans, Gudrun Antoons, et Karin R. Sipido. 2008. « Crosstalk between L-Type Ca²⁺ Channels and the Sarcoplasmic Reticulum: Alterations during Cardiac Remodelling ». *Cardiovascular Research* 77 (2): 315-24. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvm063>.
- Böhm, Johann, Uluç Yiş, Ragıp Ortaç, Handan Cakmakçı, Semra Hız Kurul, Eray Dirik, et Jocelyn Laporte. 2010. « Case Report of Intrafamilial Variability in Autosomal Recessive Centronuclear Myopathy Associated to a Novel BIN1 Stop Mutation ». *Orphanet Journal of Rare Diseases* 5 (décembre): 35.
- Boncompain, Gaele, Severine Divoux, Nelly Gareil, Helene de Forges, Aurianne Lescure, Lynda Latreche, Valentina Mercanti, Florence Jollivet, Graça Raposo, et Franck Perez. 2012. « Synchronization of Secretory Protein Traffic in Populations of Cells ». *Nature Methods* 9 (5): 493-98.
- Bonifacino, Juan S., et Benjamin S. Glick. 2004. « The Mechanisms of Vesicle Budding and Fusion ». *Cell* 116 (2): 153-66.
- Borg, J. P., M. O. López-Figueroa, M. de Taddèo-Borg, D. E. Kroon, R. S. Turner, S. J. Watson, et B. Margolis. 1999. « Molecular Analysis of the X11-MLin-2/CASK Complex in Brain ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 19 (4): 1307-16.
- Brackenbury, William J. 2012. « Voltage-Gated Sodium Channels and Metastatic Disease ». *Channels (Austin, Tex.)* 6 (5): 352-61.

- Brackenbury, William J., et Lori L. Isom. 2011. « Na Channel β Subunits: Overachievers of the Ion Channel Family ». *Frontiers in Pharmacology* 2: 53.
- Bredt, D. S. 2000. « Cell Biology. Reeling CASK into the Nucleus ». *Nature* 404 (6775): 241-42.
- Brodsky, J. L., et A. A. McCracken. 1999. « ER Protein Quality Control and Proteasome-Mediated Protein Degradation ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 10 (5): 507-13.
- Bruce, Alexandra F., Stephen Rothery, Emmanuel Dupont, et Nicholas J. Severs. 2008. « Gap Junction Remodelling in Human Heart Failure Is Associated with Increased Interaction of Connexin43 with ZO-1 ». *Cardiovascular Research* 77 (4): 757-65.
- Brundel, B. J., I. C. Van Gelder, R. H. Henning, A. E. Tuinenburg, M. Wietses, J. G. Grandjean, A. A. Wilde, W. H. Van Gilst, et H. J. Crijns. 2001. « Alterations in Potassium Channel Gene Expression in Atria of Patients with Persistent and Paroxysmal Atrial Fibrillation: Differential Regulation of Protein and mRNA Levels for K⁺ Channels ». *Journal of the American College of Cardiology* 37 (3): 926-32.
- Butz, S., M. Okamoto, et T. C. Südhof. 1998. « A Tripartite Protein Complex with the Potential to Couple Synaptic Vesicle Exocytosis to Cell Adhesion in Brain ». *Cell* 94 (6): 773-82.

C

- Carrithers, Michael D., Sulayman Dib-Hajj, Lisette M. Carrithers, Gouzel Tokmoulina, Marc Pypaert, Elizabeth A. Jonas, et Stephen G. Waxman. 2007. « Expression of the Voltage-Gated Sodium Channel NaV1.5 in the Macrophage Late Endosome Regulates Endosomal Acidification ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 178 (12): 7822-32.
- Caruana, Georgina. 2002. « Genetic Studies Define MAGUK Proteins as Regulators of Epithelial Cell Polarity ». *The International Journal of Developmental Biology* 46 (4): 511-18.
- Caruana, Georgina, et Alan Bernstein. 2001. « Craniofacial Dymorphogenesis Including Cleft Palate in Mice with an Insertional Mutation in the discs large Gene ». *Molecular and Cellular Biology* 21 (5): 1475-83.
- Casini, Simona, Hanno L. Tan, Ilker Demirayak, Carol Ann Remme, Ahmad S. Amin, Brendon P. Scicluna, Houssine Chatyan, et al. 2010. « Tubulin Polymerization Modifies Cardiac Sodium Channel Expression and Gating ». *Cardiovascular Research* 85 (4): 691-700.
- Catterall, William A. 2000. « From Ionic Currents to Molecular Mechanisms: The Structure and Function of Voltage-Gated Sodium Channels ». *Neuron* 26 (1): 13-25.
- Catterall, William A. 2014. « Sodium Channels, Inherited Epilepsy, and Antiepileptic Drugs ». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 54: 317-38.
- Chanda, Baron, Osei Kwame Asamoah, Rikard Blunck, Benoît Roux, et Francisco Bezanilla. 2005. « Gating Charge Displacement in Voltage-Gated Ion Channels Involves Limited Transmembrane Movement ». *Nature* 436 (7052): 852-56.
- Chandy, K. George, et George A. Gutman. 1993. « Nomenclature for mammalian potassium channel genes ». *Trends in Pharmacological Sciences* 14 (12): 434.
- Chao, Hsu-Wen, Chen-Jei Hong, Tzyy-Nan Huang, Yi-Ling Lin, et Yi-Ping Hsueh. 2008. « SUMOylation of the MAGUK Protein CASK Regulates Dendritic Spinogenesis ». *The Journal of Cell Biology* 182 (1): 141-55.

- Chelly, Jamel, Malik Khelfaoui, Fiona Francis, Beldjord Chérif, et Thierry Bienvenu. 2006. « Genetics and Pathophysiology of Mental Retardation ». *European Journal of Human Genetics* 14 (6): 701-13.
- Chen, Xiaobing, Jonathan M. Levy, Austin Hou, Christine Winters, Rita Azzam, Alioscka A. Sousa, Richard D. Leapman, Roger A. Nicoll, et Thomas S. Reese. 2015. « PSD-95 family MAGUKs are essential for anchoring AMPA and NMDA receptor complexes at the postsynaptic density ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (50): E6983-92.
- Chiurazzi, Pietro, Charles E. Schwartz, Jozef Gecz, et Giovanni Neri. 2008. « XLMR Genes: Update 2007 ». *European Journal of Human Genetics: EJHG* 16 (4): 422-34.
- Cohen, A. R., D. F. Woods, S. M. Marfatia, Z. Walther, A. H. Chishti, J. M. Anderson, et D. F. Wood. 1998. « Human CASK/LIN-2 Binds Syndecan-2 and Protein 4.1 and Localizes to the Basolateral Membrane of Epithelial Cells ». *The Journal of Cell Biology* 142 (1): 129-38.
- Compton, S. J., R. L. Lux, M. R. Ramsey, K. R. Strelich, M. C. Sanguinetti, L. S. Green, M. T. Keating, et J. W. Mason. 1996. « Genetically Defined Therapy of Inherited Long-QT Syndrome. Correction of Abnormal Repolarization by Potassium ». *Circulation* 94 (5): 1018-22.
- Cormier, Joseph W., Ilaria Rivolta, Michihiro Tateyama, An-Suei Yang, et Robert S. Kass. 2002. « Secondary Structure of the Human Cardiac Na⁺ Channel C Terminus: Evidence for a Role of Helical Structures in Modulation of Channel Inactivation ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (11): 9233-41.

D

- Danielson, Eric, Nanyan Zhang, Jacob Metallo, Kanwardeep Kaleka, Seung Min Shin, Nashaat Gerges, et Sang H. Lee. 2012. « S-SCAM/MAGI-2 is an essential synaptic scaffolding molecule for the GluA2-containing maintenance pool of AMPA receptors ». *The Journal of Neuroscience* 32 (20): 6967-80.
- D'Arcangelo, Gabriella. 2006. « Reelin Mouse Mutants as Models of Cortical Development Disorders ». *Epilepsy & Behavior: E&B* 8 (1): 81-90.
- Descorps-Declère, A., M. P. Sauviat, K. Samii, et Y. Lecarpentier. 2001. « Mechanical and Electrophysiological Effects of Thiopental on Rat Cardiac Left Ventricular Papillary Muscle ». *BJA: British Journal of Anaesthesia* 86 (1): 103-9.
- Detta, Nicola, Giulia Frisso, et Francesco Salvatore. 2015. « The multi-faceted aspects of the complex cardiac Nav1.5 protein in membrane function and pathophysiology ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1854 (10, Part A): 1502-9.
- DiMichele, Laura A., Jason T. Doherty, Mauricio Rojas, Hilary E. Beggs, Louis F. Reichardt, Christopher P. Mack, et Joan M. Taylor. 2006. « Myocyte-Restricted Focal Adhesion Kinase Deletion Attenuates Pressure Overload-Induced Hypertrophy ». *Circulation Research* 99 (6): 636-45.
- Dimitratos, S. D., D. G. Stathakis, C. A. Nelson, D. F. Woods, et P. J. Bryant. 1998. « The Location of Human CASK at Xp11.4 Identifies This Gene as a Candidate for X-Linked Optic Atrophy ». *Genomics* 51 (2): 308-9.
- Dimitratos, S. D., D. F. Woods, D. G. Stathakis, et P. J. Bryant. 1999. « Signaling Pathways Are Focused at Specialized Regions of the Plasma Membrane by Scaffolding Proteins of the MAGUK Family ». *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 21 (11): 912-21.

- Dobrosotskaya, I., R. K. Guy, et G. L. James. 1997. « MAGI-1, a Membrane-Associated Guanylate Kinase with a Unique Arrangement of Protein-Protein Interaction Domains ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (50): 31589-97.
- Doerks, Tobias, Peer Bork, Emmanuel Kamberov, Olga Makarova, Seonok Muecke, et Ben Margolis. 2000. « L27, a novel heterodimerization domain in receptor targeting proteins Lin-2 and Lin-7 ». *Trends in Biochemical Sciences* 25 (7): 317-18.
- Domínguez, Jorge N., Ángel de la Rosa, Francisco Navarro, Diego Franco, et Amelia E. Aránega. 2008. « Tissue Distribution and Subcellular Localization of the Cardiac Sodium Channel during Mouse Heart Development ». *Cardiovascular Research* 78 (1): 45-52.
- Dunn, P., G. P. Prigatano, S. Szelinger, J. Roth, A. L. Siniard, A. M. Claasen, R. F. Richholt, et al. 2017. « A de Novo Splice Site Mutation in CASK Causes FG Syndrome-4 and Congenital Nystagmus ». *American Journal of Medical Genetics. Part A* 173 (3): 611-17.

E

- Eichel CA, Beuriot A, Chevalier MYE, Rougier J-S, Louault F, Dilanian G, Amour J, Coulombe A, Abriel H, Hatem SN, Balse E. Lateral Membrane-Specific MAGUK CASK Down-Regulates Nav1.5 Channel in Cardiac Myocytes. *Circ Res.* 2016;119:544–556
- Eisner, David A., Jessica L. Caldwell, Kornél Kistamás, et Andrew W. Trafford. 2017. « Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart ». *Circulation Research* 121 (2): 181-95.
- Eldstrom, Jodene, Woo Sung Choi, David F. Steele, et David Fedida. 2003. « SAP97 Increases Kv1.5 Currents through an Indirect N-Terminal Mechanism ». *FEBS Letters* 547 (1-3): 205-11.
- El-Haou, Saïd, Elise Balse, Nathalie Neyroud, Gilles Dilanian, Bruno Gavillet, Hugues Abriel, Alain Coulombe, Andreas Jeromin, et Stéphane N. Hatem. 2009. « Kv4 Potassium Channels Form a Tripartite Complex with the Anchoring Protein SAP97 and CaMKII in Cardiac Myocytes ». *Circulation Research* 104 (6): 758-69.
- Elias, Guillermo M., Lars Funke, Valentin Stein, Seth G. Grant, David S. Brecht, et Roger A. Nicoll. 2006. « Synapse-Specific and Developmentally Regulated Targeting of AMPA Receptors by a Family of MAGUK Scaffolding Proteins ». *Neuron* 52 (2): 307-20.
- Elliott, Perry, Constantinos O'Mahony, Petros Syrris, Alison Evans, Christina Rivera Sorensen, Mary N. Sheppard, Gerald Carr-White, Antonios Pantazis, et William J. McKenna. 2010. « Prevalence of Desmosomal Protein Gene Mutations in Patients with Dilated Cardiomyopathy ». *Circulation. Cardiovascular Genetics* 3 (4): 314-22.
- Engler, Adam J., Christine Carag-Krieger, Colin P. Johnson, Matthew Raab, Hsin-Yao Tang, David W. Speicher, Joseph W. Sanger, Jean M. Sanger, et Dennis E. Discher. 2008. « Embryonic cardiomyocytes beat best on a matrix with heart-like elasticity: scar-like rigidity inhibits beating ». *Journal of cell science* 121 (Pt 22): 3794-3802.
- Epifantseva, Irina, et Robin M. Shaw. 2018. « Intracellular trafficking pathways of Cx43 gap junction channels ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, Gap Junction Proteins*, 1860 (1): 40-47.
- Ervasti, James M. 2003. « Costameres: The Achilles' Heel of Herculean Muscle ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (16): 13591-94.

Ervasti, James M. 2007. « Dystrophin, Its Interactions with Other Proteins, and Implications for Muscular Dystrophy ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1772 (2): 108-17.

F

Fallon, Lara, France Moreau, Benjamin G. Croft, Noura Labib, Wen-Jie Gu, et Edward A. Fon. 2002. « Parkin and CASK/LIN-2 Associate via a PDZ-Mediated Interaction and Are Co-Localized in Lipid Rafts and Postsynaptic Densities in Brain ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (1): 486-91.

Fedida, D., B. Wible, Z. Wang, B. Fermini, F. Faust, S. Nattel, et A. M. Brown. 1993. « Identity of a Novel Delayed Rectifier Current from Human Heart with a Cloned K⁺ Channel Current ». *Circulation Research* 73 (1): 210-16.

Frei, Jeannine A., et Esther T. Stoeckli. 2017. « SynCAMs - From Axon Guidance to Neurodevelopmental Disorders ». *Molecular and Cellular Neurosciences* 81 (juin): 41-48.

Froyen, Guy, Hilde Van Esch, Marijke Bauters, Karen Hollanders, Suzanna G. M. Frints, Joris R. Vermeesch, Koen Devriendt, Jean-Pierre Fryns, et Peter Marynen. 2007. « Detection of Genomic Copy Number Changes in Patients with Idiopathic Mental Retardation by High-Resolution X-Array-CGH: Important Role for Increased Gene Dosage of XLMR Genes ». *Human Mutation* 28 (10): 1034-42.

Funke, Lars, Srikanth Dakoiji, et David S. Bredt. 2005. « Membrane-Associated Guanylate Kinases Regulate Adhesion and Plasticity at Cell Junctions ». *Annual Review of Biochemistry* 74: 219-45.

Futai, Kensuke, Myung Jong Kim, Tsutomu Hashikawa, Peter Scheiffele, Morgan Sheng, et Yasunori Hayashi. 2007. « Retrograde Modulation of Presynaptic Release Probability through Signaling Mediated by PSD-95-Neuroigin ». *Nature Neuroscience* 10 (2): 186-95.

G

Gallagher, Patrick G. 2013. « Abnormalities of the Erythrocyte Membrane ». *Pediatric clinics of North America* 60 (6): 1349-62.

Gandhi, Chris S., et Ehud Y. Isacoff. 2002. « Molecular Models of Voltage Sensing ». *The Journal of General Physiology* 120 (4): 455-63.

Gardoni, Fabrizio. 2008. « MAGUK Proteins: New Targets for Pharmacological Intervention in the Glutamatergic Synapse ». *European Journal of Pharmacology* 585 (1): 147-52.

Gavillet, Bruno, Jean-Sébastien Rougier, Andrea A. Domenighetti, Romina Behar, Christophe Boixel, Patrick Ruchat, Hans-Anton Lehr, Thierry Pedrazzini, et Hugues Abriel. 2006. « Cardiac Sodium Channel Nav1.5 Is Regulated by a Multiprotein Complex Composed of Syntrophins and Dystrophin ». *Circulation Research* 99 (4): 407-14.

Gellens, M. E., A. L. George, L. Q. Chen, M. Chahine, R. Horn, R. L. Barchi, et R. G. Kallen. 1992. « Primary Structure and Functional Expression of the Human Cardiac Tetrodotoxin-Insensitive Voltage-Dependent Sodium Channel ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89 (2): 554-58.

George, Gincy, Sachidanand Singh, Sowmya Bekshe Lokappa, et Jobin Varkey. 2018. « Gene Co-Expression Network Analysis for Identifying Genetic Markers in Parkinson's Disease - a Three-Way Comparative Approach ». *Genomics*, mai.

- Giangreco, Adam, Kim B. Jensen, Yoshimi Takai, Jun Miyoshi, et Fiona M. Watt. 2009. « Necl2 Regulates Epidermal Adhesion and Wound Repair ». *Development (Cambridge, England)* 136 (20): 3505-14.
- Glick, Benjamin S., et Akihiko Nakano. 2009. « Membrane Traffic within the Golgi Apparatus ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 25: 113-32.
- Glynn, Patric, Hassan Musa, Xiangqiong Wu, Sathya D. Unudurthi, Sean Little, Lan Qian, Patrick J. Wright, et al. 2015. « Voltage-Gated Sodium Channel Phosphorylation at Ser571 Regulates Late Current, Arrhythmia, and Cardiac Function In Vivo ». *Circulation* 132 (7): 567-77.
- Godreau, David, Roger Vranckx, Ange Maguy, Catherine Rücker-Martin, Catherine Goyenvalle, Salah Abdelshafy, Sophie Tessier, Jean Paul Couétil, et Stéphane N. Hatem. 2002. « Expression, Regulation and Role of the MAGUK Protein SAP-97 in Human Atrial Myocardium ». *Cardiovascular Research* 56 (3): 433-42.
- Gokce, Ozgun, et Thomas C. Südhof. 2013. « Membrane-Tethered Monomeric Neurexin LNS-Domain Triggers Synapse Formation ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 33 (36): 14617-28.
- Goldin, Alan L. 2001. « Resurgence of Sodium Channel Research ». *Annual Review of Physiology* 63 (1): 871-94.
- Goldin, Alan L. 2003. « Mechanisms of sodium channel inactivation ». *Current Opinion in Neurobiology* 13 (3): 284-90.
- Gontier, Yves, Anu Taivainen, Lionel Fontao, Arnoud Sonnenberg, Arjan van der Flier, Olli Carpen, Georgine Faulkner, et Luca Borradori. 2005. « The Z-Disc Proteins Myotilin and FATZ-1 Interact with Each Other and Are Connected to the Sarcolemma via Muscle-Specific Filamins ». *Journal of Cell Science* 118 (Pt 16): 3739-49.
- González-Mariscal, L., A. Betanzos, et A. Avila-Flores. 2000. « MAGUK Proteins: Structure and Role in the Tight Junction ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 11 (4): 315-24.
- Gourdie, R. G., C. R. Green, N. J. Severs, et R. P. Thompson. 1992. « Immunolabelling Patterns of Gap Junction Connexins in the Developing and Mature Rat Heart ». *Anatomy and Embryology* 185 (4): 363-78.
- Grandi, Eleonora, Michael C. Sanguinetti, Daniel C. Bartos, Donald M. Bers, Ye Chen-Izu, Nipavan Chiamvimonvat, Henry M. Colecraft, et al. 2017. « Potassium channels in the heart: structure, function and regulation ». *The Journal of Physiology* 595 (7): 2209-28.
- Grant, Augustus O., Rashmi Chandra, Christopher Keller, Michael Carboni, et C. Frank Starmer. 2000. « Block of Wild-Type and Inactivation-Deficient Cardiac Sodium Channels IFM/QQQ Stably Expressed in Mammalian Cells ». *Biophysical Journal* 79 (6): 3019-35.
- Grimm, D., et M. A. Kay. 2003. « From Virus Evolution to Vector Revolution: Use of Naturally Occurring Serotypes of Adeno-Associated Virus (AAV) as Novel Vectors for Human Gene Therapy ». *Current Gene Therapy* 3 (4): 281-304.
- Guo, Jun, Hamid Massaeli, Jianmin Xu, Zongchao Jia, Jeffrey T. Wagle, Nasrin Mesaeli, et Shetuan Zhang. 2009. « Extracellular K⁺ Concentration Controls Cell Surface Density of IKr in Rabbit Hearts and of the HERG Channel in Human Cell Lines ». *The Journal of Clinical Investigation* 119 (9): 2745-57.
- Guy, H R, et P Seetharamulu. 1986. « Molecular model of the action potential sodium channel. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (2): 508-12.

H

- Hackett, Anna, Patrick S. Tarpey, Andrea Licata, James Cox, Annabel Whibley, Jackie Boyle, Carolyn Rogers, et al. 2010. « CASK Mutations Are Frequent in Males and Cause X-Linked Nystagmus and Variable XLMR Phenotypes ». *European Journal of Human Genetics: EJHG* 18 (5): 544-52.
- Hallaq, Haifa, Dao W. Wang, Jennifer D. Kunic, Alfred L. George, K. Sam Wells, et Katherine T. Murray. 2011. « Activation of protein kinase C alters the intracellular distribution and mobility of cardiac Na⁺ channels ». *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 302 (3): H782-89.
- Han, Gayoung A., Nancy T. Malintan, Brett M. Collins, Frederic A. Meunier, et Shuzo Sugita. 2010. « Munc18-1 as a Key Regulator of Neurosecretion ». *Journal of Neurochemistry* 115 (1): 1-10.
- Hanada, Toshihiko, Atsuko Takeuchi, Gautam Sondarva, et Athar H. Chishti. 2003. « Protein 4.1-Mediated Membrane Targeting of Human Discs Large in Epithelial Cells ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (36): 34445-50.
- Harmon, Robert M., et Kathleen J. Green. 2013. « Structural and Functional Diversity of Desmosomes ». *Cell Communication & Adhesion* 20 (6): 171-87.
- Hata, Y., S. Butz, et T. C. Südhof. 1996. « CASK: A Novel Dlg/PSD95 Homolog with an N-Terminal Calmodulin-Dependent Protein Kinase Domain Identified by Interaction with Neurexins ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 16 (8): 2488-94.
- Hayashi, Shin, Daniela Tiaki Uehara, Kousuke Tanimoto, Seiji Mizuno, Yasutsugu Chinen, Shinobu Fukumura, Jun-Ichi Takanashi, Hitoshi Osaka, Nobuhiko Okamoto, et Johji Inazawa. 2017. « Comprehensive Investigation of CASK Mutations and Other Genetic Etiologies in 41 Patients with Intellectual Disability and Microcephaly with Pontine and Cerebellar Hypoplasia (MICPCH) ». *PLoS One* 12 (8): e0181791. h
- Heinemann, S. H., H. Terlau, W. Stühmer, K. Imoto, et S. Numa. 1992. « Calcium Channel Characteristics Conferred on the Sodium Channel by Single Mutations ». *Nature* 356 (6368): 441-43.
- Herren, Anthony W., Darren M. Weber, Robert R. Rigor, Kenneth B. Margulies, Brett S. Phinney, et Donald M. Bers. 2015. « CaMKII Phosphorylation of NaV1.5: Novel in Vitro Sites Identified by Mass Spectrometry and Reduced S516 Phosphorylation in Human Heart Failure ». *Journal of proteome research* 14 (5): 2298-2311.
- Hervé, Jean-Claude, Mickaël Derangeon, Denis Sarrouilhe, et Nicolas Bourmeyster. 2014. « Influence of the scaffolding protein Zonula Occludens (ZOs) on membrane channels ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Reciprocal influences between cell cytoskeleton and membrane channels, receptors and transporters, 1838 (2): 595-604.
- Hevner, R. F., L. Shi, N. Justice, Y. Hsueh, M. Sheng, S. Smiga, A. Bulfone, A. M. Goffinet, A. T. Campagnoni, et J. L. Rubenstein. 2001. « Tbr1 Regulates Differentiation of the Preplate and Layer 6 ». *Neuron* 29 (2): 353-66.
- Heyn, Patricia, Alex T Kalinka, Pavel Tomancak, et Karla M Neugebauer. 2015. « Introns and gene expression: Cellular constraints, transcriptional regulation, and evolutionary consequences ». *Bioessays* 37 (2): 148-54.
- Hibino, Hiroshi, Atsushi Inanobe, Kazuharu Furutani, Shingo Murakami, Ian Findlay, et Yoshihisa Kurachi. 2010. « Inwardly Rectifying Potassium Channels: Their Structure, Function, and Physiological Roles ». *Physiological Reviews* 90 (1): 291-366.

- Hiyama, Takeshi Y., Eiji Watanabe, Kentaro Ono, Kiyotoshi Inenaga, Michael M. Tamkun, Shigeru Yoshida, et Masaharu Noda. 2002. « Na(x) Channel Involved in CNS Sodium-Level Sensing ». *Nature Neuroscience* 5 (6): 511-12.
- Hodgkin, A. L., et A. F. Huxley. 1952. « A Quantitative Description of Membrane Current and Its Application to Conduction and Excitation in Nerve ». *The Journal of Physiology* 117 (4): 500-544.
- Hoffman, E. P., R. H. Brown, et L. M. Kunkel. 1987. « Dystrophin: The Protein Product of the Duchenne Muscular Dystrophy Locus ». *Cell* 51 (6): 919-28.
- Hofmann, K. 1999. « The Modular Nature of Apoptotic Signaling Proteins ». *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 55 (8-9): 1113-28.
- Hong, Ting Ting, James W. Smyth, Danchen Gao, Kevin Y. Chu, Jacob M. Vogan, Tina S. Fong, Brian C. Jensen, Henry M. Colecraft, et Robin M. Shaw. 2010. « BIN1 Localizes the L-Type Calcium Channel to Cardiac T-Tubules ». *PLoS Biology* 8 (2): e1000312.
- Hong, Ting Ting, Huanghe Yang, Shan-Shan Zhang, Hee Cheol Cho, Mariya Kalashnikova, Baiming Sun, Hao Zhang, et al. 2014. « Cardiac Spliced BIN1 Folds T-tubule Membrane, Controlling Ion Flux and Limiting Arrhythmia ». *Nature medicine* 20 (6): 624-32. <https://doi.org/10.1038/nm.3543>.
- Hong, TingTing, et Robin M. Shaw. 2016. « Cardiac T-Tubule Microanatomy and Function ». *Physiological Reviews*, novembre.
- Hoskins, R., A. F. Hajnal, S. A. Harp, et S. K. Kim. 1996. « The C. Elegans Vulval Induction Gene Lin-2 Encodes a Member of the MAGUK Family of Cell Junction Proteins ». *Development (Cambridge, England)* 122 (1): 97-111.
- Hoy, Jennifer L., John R. Constable, Stefano Vicini, Zhanyan Fu, et Philip Washbourne. 2009. « SynCAM1 Recruits NMDA Receptors via Protein 4.1B ». *Molecular and Cellular Neurosciences* 42 (4): 466-83.
- Hsueh, Y. P., T. F. Wang, F. C. Yang, et M. Sheng. 2000. « Nuclear Translocation and Transcription Regulation by the Membrane-Associated Guanylate Kinase CASK/LIN-2 ». *Nature* 404 (6775): 298-302.
- Hsueh, Y. P., F. C. Yang, V. Kharazia, S. Naisbitt, A. R. Cohen, R. J. Weinberg, et M. Sheng. 1998a. « Direct Interaction of CASK/LIN-2 and Syndecan Heparan Sulfate Proteoglycan and Their Overlapping Distribution in Neuronal Synapses ». *The Journal of Cell Biology* 142 (1): 139-51.
- Hsueh, Y.P. 2009. « Calcium/Calmodulin-Dependent Serine Protein Kinase and Mental Retardation ». *Annals of Neurology* 66 (4): 438-43.
- Hsueh, Y.P., Fu-Chia Yang, Viktor Kharazia, Scott Naisbitt, Alexandra R. Cohen, Richard J. Weinberg, et Morgan Sheng. 1998b. « Direct Interaction of CASK/LIN-2 and Syndecan Heparan Sulfate Proteoglycan and Their Overlapping Distribution in Neuronal Synapses ». *The Journal of Cell Biology* 142 (1): 139-51.
- Hu, Dan, Hector Barajas-Martinez, Elena Burashnikov, Michael Springer, Yuesheng Wu, Andras Varro, Ryan Pfeiffer, et al. 2009. « A Mutation in the B3 Subunit of the Cardiac Sodium Channel Associated With Brugada ECG Phenotype Clinical Perspective ». *Circulation: Genomic and Precision Medicine* 2 (3): 270-78.
- Hu, Hsiao-Tang, Pu-Yun Shih, Yu-Tzu Shih, et Yi-Ping Hsueh. 2016. « The Involvement of Neuron-Specific Factors in Dendritic Spinogenesis: Molecular Regulation and Association with Neurological Disorders ». *Neural Plasticity* 2016.

Huang, Tzyy-Nan, Hui-Ping Chang, et Yi-Ping Hsueh. 2010. « CASK Phosphorylation by PKA Regulates the Protein-Protein Interactions of CASK and Expression of the NMDAR2b Gene ». *Journal of Neurochemistry* 112 (6): 1562-73.

Huang, Weei-Yuarn, Jose Aramburu, Pamela S. Douglas, et Seigo Izumo. 2000. « Transgenic Expression of Green Fluorescence Protein Can Cause Dilated Cardiomyopathy ». *Nature Medicine* 6 (5): 482-83.

Hunter, Andrew W., Ralph J. Barker, Ching Zhu, et Robert G. Gourdie. 2005. « Zonula Occludens-1 Alters Connexin43 Gap Junction Size and Organization by Influencing Channel Accretion ». *Molecular Biology of the Cell* 16 (12): 5686-98.

I

Inagaki, Katsuya, Sally Fuess, Theresa A. Storm, Gregory A. Gibson, Charles F. Mctiernan, Mark A. Kay, et Hiroyuki Nakai. 2006. « Robust Systemic Transduction with AAV9 Vectors in Mice: Efficient Global Cardiac Gene Transfer Superior to That of AAV8 ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 14 (1): 45-53.

Islas, Socorro, Jesús Vega, Lissette Ponce, et Lorenza González-Mariscal. 2002. « Nuclear Localization of the Tight Junction Protein ZO-2 in Epithelial Cells ». *Experimental Cell Research* 274 (1): 138-48.

J

Jansen, John A., Maartje Noorman, Hassan Musa, Mèra Stein, Sanne de Jong, Roel van der Nagel, Thomas J. Hund, 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 (4): 600-607.

Jensen, Ask Schou, Cristian Pablo Pennisi, Cristian Sevcencu, Jørn Bolstad Christensen, Jette Elisabeth Kristiansen, et Johannes Jan Struijk. 2015. « Differential Effects of Thioridazine Enantiomers on Action Potential Duration in Rabbit Papillary Muscle ». *European Journal of Pharmacology* 747 (janvier): 7-12.

Jeyifous, Okunola, Clarissa L. Waites, Christian G. Specht, Sho Fujisawa, Manja Schubert, Eric I. Lin, John Marshall, et al. 2009. « SAP97 and CASK Mediate Sorting of NMDA Receptors through a Previously Unknown Secretory Pathway ». *Nature Neuroscience* 12 (8): 1011-19.

Jiang, Minmin, Juhui Qiu, Lingling Zhang, Dongyuan Lü, Mian Long, Li Chen, et Xiangdong Luo. 2016. « Changes in tension regulates proliferation and migration of fibroblasts by remodeling expression of ECM proteins ». *Experimental and Therapeutic Medicine* 12 (3): 1542-50.

Jiang, Youxing, Vanessa Ruta, Jiayun Chen, Alice Lee, et Roderick MacKinnon. 2003. « The Principle of Gating Charge Movement in a Voltage-Dependent K⁺ Channel ». *Nature* 423 (6935): 42-48.

Jung, D., B. Yang, J. Meyer, J. S. Chamberlain, et K. P. Campbell. 1995. « Identification and Characterization of the Dystrophin Anchoring Site on Beta-Dystroglycan ». *The Journal of Biological Chemistry* 270 (45): 27305-10.

K

Kaech, S. M., C. W. Whitfield, et S. K. Kim. 1998. « The LIN-2/LIN-7/LIN-10 Complex Mediates Basolateral Membrane Localization of the C. Elegans EGF Receptor LET-23 in Vulval Epithelial Cells ». *Cell* 94 (6): 761-71.

Kamberov, Emmanuel, Olga Makarova, Michael Roh, Albert Liu, David Karnak, Samuel Straight, et Ben Margolis. 2000. « Molecular Cloning and Characterization of Pals, Proteins Associated with MLin-7 ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (15): 11425-31.

Karlsson, Robert, Lisette Graae, Magnus Lekman, Dai Wang, Reyna Favis, Tomas Axelsson, Dagmar Galter, Andrea Carmine Belin, et Silvia Paddock. 2012. « MAG11 Copy Number Variation in Bipolar Affective Disorder and Schizophrenia ». *Biological Psychiatry* 71 (10): 922-30.

Katsuno, Tatsuya, Kazuaki Umeda, Takeshi Matsui, Masaki Hata, Atsushi Tamura, Masahiko Itoh, Kosei Takeuchi, et al. 2008. « Deficiency of Zonula Occludens-1 Causes Embryonic Lethal Phenotype Associated with Defected Yolk Sac Angiogenesis and Apoptosis of Embryonic Cells ». *Molecular Biology of the Cell* 19 (6): 2465-75.

Kim, Eunjoon, et Morgan Sheng. 2004. « PDZ Domain Proteins of Synapses ». *Nature Reviews. Neuroscience* 5 (10): 771-81.

Kim, Seonhee, Maria K. Lehtinen, Alessandro Sessa, Mauro W. Zappaterra, Seo-Hee Cho, Dilenny Gonzalez, Brigid Boggan, et al. 2010. « The Apical Complex Couples Cell Fate and Cell Survival to Cerebral Cortical Development ». *Neuron* 66 (1): 69-84.

Kistner, U., C. C. Garner, et M. Linial. 1995. « Nucleotide Binding by the Synapse Associated Protein SAP90 ». *FEBS Letters* 359 (2-3): 159-63.

Korb, Doreen, Priscilla Y. Tng, Vladimir M. Milenkovic, Nadine Reichhart, Olaf Strauss, Oliver Ritter, Tobias Fischer, Peter M. Benz, et Kai Schuh. 2013. « Identification of PDZ Domain Containing Proteins Interacting with 1.2 and PMCA4b ». Research article. International Scholarly Research Notices. 2013.

Kruse, Martin, Eric Schulze-Bahr, Valerie Corfield, Alf Beckmann, Birgit Stallmeyer, Güven Kurtbay, Iris Ohmert, Ellen Schulze-Bahr, Paul Brink, et Olaf Pongs. 2009. « Impaired endocytosis of the ion channel TRPM4 is associated with human progressive familial heart block type I ». *The Journal of Clinical Investigation* 119 (9): 2737-44.

Ktistakis, Nicholas T., Maurine E. Linden, et Michael G. Roth. 1992. « Action of brefeldin A blocked by activation of a pertussis-toxin-sensitive G protein ». *Nature* 356 (6367): 344-46.

Kühlbrandt, Werner. 2016. « Three in a row—how sodium ions cross the channel ». *The EMBO Journal* 35 (8): 793-95.

L

LaConte, Leslie E. W., Vrushali Chavan, Abdallah F. Elias, Cynthia Hudson, Corbin Schwanke, Katie Styren, Jonathan Shoof, Fernando Kok, Sarika Srivastava, et Konark Mukherjee. 2018. « Two Microcephaly-Associated Novel Missense Mutations in CASK Specifically Disrupt the CASK-Neurexin Interaction ». *Human Genetics* 137 (3): 231-46.

LaConte, Leslie E. W., Vrushali Chavan, Chen Liang, Jeffery Willis, Eva-Maria Schönhense, Susanne Schoch, et Konark Mukherjee. 2016. « CASK Stabilizes Neurexin and Links It to Liprin- α in a Neuronal Activity-Dependent Manner ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 73 (18): 3599-3621.

LaConte, Leslie, et Konark Mukherjee. 2013. « Structural Constraints and Functional Divergences in CASK Evolution ». *Biochemical Society Transactions* 41 (4): 1017-22.

- Landgraf, Peter, Marina Mikhaylova, Tamar Macharadze, Corinna Borutzki, Ana-Claudia Zenclussen, Petra Wahle, et Michael R. Kreutz. 2014. « Binding of Y-P30 to Syndecan 2/3 Regulates the Nuclear Localization of CASK ». Édité par Michal Hetman. *PLoS ONE* 9 (2): e85924.
- Lapidos, Karen A., Rahul Kakkar, et Elizabeth M. McNally. 2004. « The Dystrophin Glycoprotein Complex: Signaling Strength and Integrity for the Sarcolemma ». *Circulation Research* 94 (8): 1023-31.
- Laura, Richard P., Sarajane Ross, Hartmut Koeppen, et Laurence A. Lasky. 2002. « MAGI-1: A Widely Expressed, Alternatively Spliced Tight Junction Protein ». *Experimental Cell Research* 275 (2): 155-70.
- Laverty, H. G., et J. B. Wilson. 1998. « Murine CASK Is Disrupted in a Sex-Linked Cleft Palate Mouse Mutant ». *Genomics* 53 (1): 29-41.
- Lederer, W. J., E. Niggli, et R. W. Hadley. 1990. « Sodium-Calcium Exchange in Excitable Cells: Fuzzy Space ». *Science (New York, N.Y.)* 248 (4953): 283.
- Lee, Seonok, Shuling Fan, Olya Makarova, Samuel Straight, et Ben Margolis. 2002. « A Novel and Conserved Protein-Protein Interaction Domain of Mammalian Lin-2/CASK Binds and Recruits SAP97 to the Lateral Surface of Epithelia ». *Molecular and Cellular Biology* 22 (6): 1778-91.
- Lehtonen, Sanna, Jennifer J. Ryan, Krystyna Kudlicka, Noriaki Iino, Huilin Zhou, et Marilyn G. Farquhar. 2005. « Cell Junction-Associated Proteins IQGAP1, MAGI-2, CASK, Spectrins, and α -Actinin Are Components of the Nephrin Multiprotein Complex ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (28): 9814-19.
- Leonoudakis, Dmitri, Lisa R. Conti, Scott Anderson, Carolyn M. Radeke, Leah M. M. McGuire, Marvin E. Adams, Stanley C. Froehner, John R. Yates, et Carol A. Vandenberg. 2004. « Protein Trafficking and Anchoring Complexes Revealed by Proteomic Analysis of Inward Rectifier Potassium Channel (Kir2.x)-Associated Proteins ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (21): 22331-46.
- Leonoudakis, Dmitri, Lisa R. Conti, Carolyn M. Radeke, Leah M. M. McGuire, et Carol A. Vandenberg. 2004. « A Multiprotein Trafficking Complex Composed of SAP97, CASK, Veli, and Mint1 Is Associated with Inward Rectifier Kir2 Potassium Channels ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (18): 19051-63.
- Leonoudakis, Dmitri, W. Mailliard, K. Wingerd, D. Clegg, et C. Vandenberg. 2001. « Inward Rectifier Potassium Channel Kir2.2 Is Associated with Synapse-Associated Protein SAP97 ». *Journal of Cell*
- Levy, Jonathan M., et Roger A. Nicoll. 2017. « Membrane-Associated Guanylate Kinase Dynamics Reveal Regional and Developmental Specificity of Synapse Stability ». *The Journal of Physiology* 595 (5): 1699-1709.
- Li, D., K. Takimoto, et E. S. Levitan. 2000. « Surface Expression of Kv1 Channels Is Governed by a C-Terminal Motif ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (16): 11597-602.
- Li, Dong, Christian G. Specht, Clarissa L. Waites, Charlotte Butler-Munro, Sergio Leal-Ortiz, Janie W. Foote, David Genoux, Craig C. Garner, et Johanna M. Montgomery. 2011. « SAP97 Directs NMDA Receptor Spine Targeting and Synaptic Plasticity ». *The Journal of Physiology* 589 (Pt 18): 4491-4510.
- Li, Jifen, Mark D Levin, Yanming Xiong, Nataliya Petrenko, Vickas V. Patel, et Glenn L. Radice. 2008. « N-cadherin haploinsufficiency affects cardiac gap junctions and arrhythmic susceptibility ». *Journal of molecular and cellular cardiology* 44 (3): 597-606.

- Li, Shijie, Dongdong Cheng, Bin Zhu, et Qingcheng Yang. 2017. « The Overexpression of CARM1 Promotes Human Osteosarcoma Cell Proliferation through the pGSK3 β / β -Catenin/cyclinD1 Signaling Pathway ». *International Journal of Biological Sciences* 13 (8): 976-84.
- Li, Youjun, Zhiyi Wei, Yan Yan, Qingwen Wan, Quansheng Du, et Mingjie Zhang. 2014. « Structure of Crumbs Tail in Complex with the PALS1 PDZ-SH3-GK Tandem Reveals a Highly Specific Assembly Mechanism for the Apical Crumbs Complex ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (49): 17444-49.
- Li, Yuanhe, Oliver Spangenberg, Ingo Paarmann, Manfred Konrad, et Arnon Lavie. 2002. « Structural Basis for Nucleotide-Dependent Regulation of Membrane-Associated Guanylate Kinase-like Domains ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (6): 4159-65.
- Li, Zhenhai, Hyunjung Lee, et Cheng Zhu. 2016. « Molecular mechanisms of mechanotransduction in integrin-mediated cell-matrix adhesion ». *Experimental cell research* 349 (1): 85-94.
- Lin, Eric I., Okunola Jeyifous, et William N. Green. 2013. « CASK Regulates SAP97 Conformation and Its Interactions with AMPA and NMDA Receptors ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 33 (29): 12067-76.
- Lin, Xianming, Nian Liu, Jia Lu, Jie Zhang, Justus M. B. Anumonwo, Lori L. Isom, Glenn I. Fishman, et Mario Delmar. 2011. « Subcellular Heterogeneity of Sodium Current Properties in Adult Cardiac Ventricular Myocytes ». *Heart Rhythm* 8 (12): 1923-30.
- Lin, Yi-Ling, Ya-Ting Lei, Chen-Jei Hong, et Yi-Ping Hsueh. 2007. « Syndecan-2 Induces Filopodia and Dendritic Spine Formation via the Neurofibromin-PKA-Ena/VASP Pathway ». *The Journal of Cell Biology* 177 (5): 829-41.
- Liu, Hsiao-Sheng, Ming-Shiou Jan, Chao-Kai Chou, Ping-Hong Chen, et Nir-Jihn Ke. 1999. « Is Green Fluorescent Protein Toxic to the Living Cells? ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 260 (3): 712-17.
- Liu, Qinghang, Xiongwen Chen, Scott M. Macdonnell, Evangelia G. Kranias, John N. Lorenz, Michael Leitges, Steven R. Houser, et Jeffery D. Molkenin. 2009. « Protein Kinase C{alpha}, but Not PKC{beta} or PKC{gamma}, Regulates Contractility and Heart Failure Susceptibility: Implications for Ruboxistaurin as a Novel Therapeutic Approach ». *Circulation Research* 105 (2): 194-200.
- Liu, Suxuan, Xinyu Xiong, Sam Varghese Thomas, Yanjie Xu, Xiaoshu Cheng, Xianxian Zhao, Xiaofeng Yang, et Hong Wang. 2016. « Analysis for Carom complex, signaling and function by database mining ». *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 21 (janvier): 856-72.
- Loo, D. T., S. B. Kanner, et A. Aruffo. 1998. « Filamin Binds to the Cytoplasmic Domain of the Beta1-Integrin. Identification of Amino Acids Responsible for This Interaction ». *The Journal of Biological Chemistry* 273 (36): 23304-12.
- Lopez-Santiago, Luis F., Laurence S. Meadows, Sara J. Ernst, Chunling Chen, Jyoti Dhar Malhotra, Dyke P. McEwen, Audrey Speelman, et al. 2007. « Sodium Channel Scn1b Null Mice Exhibit Prolonged QT and RR Intervals ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 43 (5): 636-47.
- Louch, William E., Ole M. Sejersted, et Fredrik Swift. 2010. « There Goes the Neighborhood: Pathological Alterations in T-Tubule Morphology and Consequences for Cardiomyocyte Ca²⁺ Handling ». *Journal of Biomedicine & Biotechnology* 2010: 503906.

Lowe, John S., Oleg Palygin, Naina Bhasin, Thomas J. Hund, Penelope A. Boyden, Erwin Shibata, Mark E. Anderson, et Peter J. Mohler. 2008. « Voltage-Gated Nav Channel Targeting in the Heart Requires an Ankyrin-G Dependent Cellular Pathway ». *The Journal of Cell Biology* 180 (1): 173-86.

Lozovatsky, Larissa, Nirmalee Abayasekara, Sorbarikor Piawah, et Zenta Walther. 2009. « CASK Deletion in Intestinal Epithelia Causes Mislocalization of LIN7C and the DLG1/Scrib Polarity Complex without Affecting Cell Polarity ». *Molecular Biology of the Cell* 20 (21): 4489-99.

Lye, Ming F., Alan S. Fanning, Ying Su, James M. Anderson, et Arnon Lavie. 2010. « Insights into Regulated Ligand Binding Sites from the Structure of ZO-1 Src Homology 3-Guanylate Kinase Module ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (18): 13907-17.

M

Ma, Dzwokai, Noa Zerangue, Yu-Fung Lin, Anthony Collins, Mei Yu, Yuh Nung Jan, et Lily Yeh Jan. 2001. « Role of ER Export Signals in Controlling Surface Potassium Channel Numbers ». *Science* 291 (5502): 316-19.

Mahoney, Zhen X., Bénédicte Sammut, Ramnik J. Xavier, Jeanette Cunningham, Gloriosa Go, Karry L. Brim, Thaddeus S. Stappenbeck, Jeffrey H. Miner, et Wojciech Swat. 2006. « Discs-large homolog 1 regulates smooth muscle orientation in the mouse ureter ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (52): 19872-77.

Makara, Michael A., Jerry Curran, Sean C. Little, Hassan Musa, Iuliia Polina, Sakima A. Smith, Patrick J. Wright, et al. 2014. « Ankyrin-G Coordinates Intercalated Disc Signaling Platform to Regulate Cardiac Excitability in Vivo ». *Circulation Research* 115 (11): 929-38.

Mangoni, Matteo E., et Joël Nargeot. 2008. « Genesis and Regulation of the Heart Automaticity ». *Physiological Reviews* 88 (3): 919-82.

Marfatia, S. M., R. A. Lue, D. Branton, et A. H. Chishti. 1994. « In Vitro Binding Studies Suggest a Membrane-Associated Complex between Erythroid P55, Protein 4.1, and Glycophorin C ». *The Journal of Biological Chemistry* 269 (12): 8631-34.

Marionneau, Céline, Cheryl F Lichti, Pierre Lindenbaum, Flavien Charpentier, Jeanne M Nerbonne, R Reid Townsend, et Jean Mérot. 2012. « Mass spectrometry-based identification of native cardiac Nav1.5 channel α subunit phosphorylation sites ». *Journal of proteome research* 11 (12): 5994-6007.

Márquez-Rosado, Lucrecia, Deepika Singh, Hector Rincón-Arano, Joell L. Solan, et Paul D. Lampe. 2012. « CASK (LIN2) Interacts with Cx43 in Wounded Skin and Their Coexpression Affects Cell Migration ». *Journal of Cell Science* 125 (Pt 3): 695-702.

Martin, J. R., et R. Ollo. 1996. « A New Drosophila Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase (Caki) Is Localized in the Central Nervous System and Implicated in Walking Speed ». *The EMBO Journal* 15 (8): 1865-76.

Martínez-Estrada, Ofelia Maria, Antonello Villa, Ferruccio Breviario, Fabrizio Orsenigo, Elisabetta Dejana, et Gianfranco Bazzoni. 2001. « Association of Junctional Adhesion Molecule with Calcium/Calmodulin-Dependent Serine Protein Kinase (CASK/LIN-2) in Human Epithelial Caco-2 Cells ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (12): 9291-96.

Matamoros, Marcos, Marta Pérez-Hernández, Guadalupe Guerrero-Serna, Irene Amorós, Adriana Barana, Mercedes Núñez, Daniela Ponce-Balbuena, et al. 2016. « Nav1.5 N-Terminal Domain Binding

- to A1-Syntrophin Increases Membrane Density of Human Kir2.1, Kir2.2 and Nav1.5 Channels ». *Cardiovascular Research* 110 (2): 279-90.
- Matsumoto, Masahito, Takeshi Y. Hiyama, Kazuya Kuboyama, Ryoko Suzuki, Akihiro Fujikawa, et Masaharu Noda. 2015. « Channel Properties of Nax Expressed in Neurons ». *PloS One* 10 (5): e0126109.
- Maximov, Anton, et Ilya Bezprozvanny. 2002. « Synaptic Targeting of N-Type Calcium Channels in Hippocampal Neurons ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 22 (16): 6939-52.
- Maximov, Anton, Thomas C. Südhof, et Ilya Bezprozvanny. 1999. « Association of Neuronal Calcium Channels with Modular Adaptor Proteins ». *Journal of Biological Chemistry* 274 (35): 24453-56.
- Mburu, Philomena, Yoshiaki Kikkawa, Stuart Townsend, Rosario Romero, Hiromichi Yonekawa, et Steve D. M. Brown. 2006. « Whirlin Complexes with P55 at the Stereocilia Tip during Hair Cell Development ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (29): 10973-78.
- Mburu, Philomena, Mirna Mustapha, Anabel Varela, Dominique Weil, Aziz El-Amraoui, Ralph H. Holme, Andreas Rump, et al. 2003. « Defects in Whirlin, a PDZ Domain Molecule Involved in Stereocilia Elongation, Cause Deafness in the Whirler Mouse and Families with DFNB31 ». *Nature Genetics* 34 (4): 421-28.
- McGee, Aaron W., et David S. Bredt. 1999. « Identification of an Intramolecular Interaction between the SH3 and Guanylate Kinase Domains of PSD-95 ». *Journal of Biological Chemistry* 274 (25): 17431-36.
- McNally, Elizabeth M., David Duggan, J. Rafael Gorospe, Carsten G. Bönnemann, Marina Fanin, Elena Pegoraro, Hart G. W. Lidov, et al. 1996. « Mutations That Disrupt the Carboxyl-Terminus of γ -Sarcoglycan Cause Muscular Dystrophy ». *Human Molecular Genetics* 5 (11): 1841-47.
- Mendoza, Alex de, Hiroshi Suga, et Iñaki Ruiz-Trillo. 2010. « Evolution of the MAGUK Protein Gene Family in Premetazoan Lineages ». *BMC Evolutionary Biology* 10 (avril): 93.
- Mercier, Aurélie, Romain Clément, Thomas Harnois, Nicolas Bourmeyster, Patrick Bois, et Aurélien Chatelier. 2015. « Nav1.5 channels can reach the plasma membrane through distinct N-glycosylation states ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1850 (6): 1215-23.
- Milstein, Michelle L., Hassan Musa, Daniela Ponce Balbuena, Justus M. B. Anumonwo, David S. Auerbach, Philip B. Furspan, Luqia Hou, et al. 2012. « Dynamic Reciprocity of Sodium and Potassium Channel Expression in a Macromolecular Complex Controls Cardiac Excitability and Arrhythmia ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (31): E2134-2143.
- Missler, Markus, Weiqi Zhang, Astrid Rohlmann, Gunnar Kattenstroth, Robert E. Hammer, Kurt Gottmann, et Thomas C. Südhof. 2003. « Alpha-Neurexins Couple Ca²⁺ Channels to Synaptic Vesicle Exocytosis ». *Nature* 423 (6943): 939-48.
- Mohler, Peter J., Ilaria Rivolta, Carlo Napolitano, Guy LeMaillet, Stephen Lambert, Silvia G. Priori, et Vann Bennett. 2004. « Nav1.5 E1053K mutation causing Brugada syndrome blocks binding to ankyrin-G and expression of Nav1.5 on the surface of cardiomyocytes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (50): 17533-38.
- Montgomery, J. M., P. L. Zamorano, et C. C. Garner. 2004. « MAGUKs in Synapse Assembly and Function: An Emerging View ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 61 (7-8): 911-29.

- Moog, Ute, Tatjana Bierhals, Kristina Brand, Jan Bautsch, Saskia Biskup, Thomas Brune, Jonas Denecke, et al. 2015. « Phenotypic and Molecular Insights into CASK-Related Disorders in Males ». *Orphanet Journal of Rare Diseases* 10 (avril): 44.
- Moorman, Antoon F. M., et Wouter H. Lamers. 1994. « Molecular anatomy of the developing heart ». *Trends in Cardiovascular Medicine* 4 (6): 257-64. [https://doi.org/10.1016/1050-1738\(94\)90029-9](https://doi.org/10.1016/1050-1738(94)90029-9).
- Motoike, Howard K., Huajun Liu, Ian W. Glaaser, An-Suei Yang, Michihiro Tateyama, et Robert S. Kass. 2004. « The Na⁺ Channel Inactivation Gate Is a Molecular Complex ». *The Journal of General Physiology* 123 (2): 155-65.
- Mroczkiewicz, Michał, Katarzyna Winkler, Dominika Nowis, Grzegorz Placha, Jakub Golab, et Ryszard Ostaszewski. 2010. « Studies of the Synthesis of All Stereoisomers of MG-132 Proteasome Inhibitors in the Tumor Targeting Approach ». *Journal of Medicinal Chemistry* 53 (4): 1509-18.
- Mukherjee, Konark, Manu Sharma, Henning Urlaub, Gleb P. Bourenkov, Reinhard Jahn, Thomas C. Südhof, et Markus C. Wahl. 2008. « CASK Functions as a Mg²⁺-Independent Neurexin Kinase ». *Cell* 133 (avril): 328-39.
- Murata, M., P. D. Buckett, J. Zhou, M. Brunner, E. Folco, et G. Koren. 2001. « SAP97 Interacts with Kv1.5 in Heterologous Expression Systems ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 281 (6): H2575-2584.
- Murray, K. T., N. N. Hu, J. R. Daw, H. G. Shin, M. T. Watson, A. B. Mashburn, et A. L. George. 1997. « Functional Effects of Protein Kinase C Activation on the Human Cardiac Na⁺ Channel ». *Circulation Research* 80 (3): 370-76.

N

- Nagashima, Shunta, Manami Kodaka, Hiroaki Iwasa, et Yutaka Hata. 2015. « MAGI2/S-SCAM Outside Brain ». *The Journal of Biochemistry* 157 (4): 177-84.
- Nagaya, Naomi, et Diane M. Papazian. 1997. « Potassium Channel α and β Subunits Assemble in the Endoplasmic Reticulum ». *Journal of Biological Chemistry* 272 (5): 3022-27.
- Naim, Eman, Alan Bernstein, John F. Bertram, et Georgina Caruana. 2005. « Mutagenesis of the Epithelial Polarity Gene, Discs Large 1, Perturbs Nephrogenesis in the Developing Mouse Kidney ». *Kidney International* 68 (3): 955-65.
- Najm, Juliane, Denise Horn, Isabella Wimplinger, Jeffrey A. Golden, Victor V. Chizhikov, Jyotsna Sudi, Susan L. Christian, et al. 2008. « Mutations of CASK Cause an X-Linked Brain Malformation Phenotype with Microcephaly and Hypoplasia of the Brainstem and Cerebellum ». *Nature Genetics* 40 (9): 1065-67.
- Nakagawa, Terunaga, Kensuke Futai, Hilal A. Lashuel, Irene Lo, Kenichi Okamoto, Thomas Walz, Yasunori Hayashi, et Morgan Sheng. 2004. « Quaternary Structure, Protein Dynamics, and Synaptic Function of SAP97 Controlled by L27 Domain Interactions ». *Neuron* 44 (3): 453-67.
- Nakamura, Kazuyuki, Kiyomi Nishiyama, Hirofumi Kodera, Mitsuko Nakashima, Yoshinori Tsurusaki, Noriko Miyake, Naomichi Matsumoto, et al. 2014. « A de novo CASK mutation in pontocerebellar hypoplasia type 3 with early myoclonic epilepsy and tetralogy of Fallot ». *Brain and Development* 36 (3): 272-73.

- Namadurai, Sivakumar, Nikitha R. Yereddi, Fiona S. Cusdin, Christopher L.-H. Huang, Dimitri Y. Chirgadze, et Antony P. Jackson. 2015. « A new look at sodium channel β subunits ». *Open Biology* 5 (1).
- Nattel, Stanley, Ange Maguy, Sabrina Le Bouter, et Yung-Hsin Yeh. 2007. « Arrhythmogenic Ion-Channel Remodeling in the Heart: Heart Failure, Myocardial Infarction, and Atrial Fibrillation ». *Physiological Reviews* 87 (2): 425-56.
- Naylor, Claire E, Claire Bagn ris, Paul G DeCaen, Altin Sula, Antonella Scaglione, David E Clapham, et BA Wallace. 2016. « Molecular basis of ion permeability in a voltage-gated sodium channel ». *The EMBO Journal* 35 (8): 820-30.
- Nerbonne, Jeanne M., et Robert S. Kass. 2005. « Molecular Physiology of Cardiac Repolarization ». *Physiological Reviews* 85 (4): 1205-53.
- Nishimura, Satoshi, Shinya Nagai, Masataka Sata, Masayoshi Katoh, Hiroshi Yamashita, Yasutake Saeki, Ryoza Nagai, et Seiryu Sugiura. 2006. « Expression of Green Fluorescent Protein Impairs the Force-Generating Ability of Isolated Rat Ventricular Cardiomyocytes ». *Molecular and Cellular Biochemistry* 286 (1-2): 59-65.
- Nix, S. L., A. H. Chishti, J. M. Anderson, et Z. Walther. 2000. « HCASK and HDlg Associate in Epithelia, and Their Src Homology 3 and Guanylate Kinase Domains Participate in Both Intramolecular and Intermolecular Interactions ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (52): 41192-200.
- Noda, Masaharu, Shin Shimizu, Tsutomu Tanabe, Toshiyuki Takai, Toshiaki Kayano, Takayuki Ikeda, Hideo Takahashi, Hitoshi Nakayama, Yuichi Kanaoka, et Naoto Minamino. 1984. « Primary structure of Electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence ». *Nature* 312 (novembre):
- Nunomura, Wataru, Yuichi Takakuwa, Marilyn Parra, John Conboy, et Narla Mohandas. 2000. « Regulation of Protein 4.1R, P55, and Glycophorin C Ternary Complex in Human Erythrocyte Membrane ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (32): 24540-46.

O

- Ock, Sangmi, Wang Soo Lee, Hyun Min Kim, Kyu-Sang Park, Young-Kook Kim, Hyun Kook, Woo Jin Park, Tae Jin Lee, E. D. Abel, et Jaetaek Kim. 2018. « Connexin43 and Zonula Occludens-1 Are Targets of Akt in Cardiomyocytes That Correlate with Cardiac Contractile Dysfunction in Akt Deficient Hearts ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1864 (4 Pt A): 1183-91.
- Ohno, Hideki, Susumu Hirabayashi, Ai Kansaku, Ikuko Yao, Makiko Tajima, Wataru Nishimura, Hirohide Ohnishi, et al. 2003. « Carom: A Novel Membrane-Associated Guanylate Kinase-Interacting Protein with Two SH3 Domains ». *Oncogene* 22 (52): 8422-31.
- Ojeh, Nkemcho, Vanja Pekovic, Colin Jahoda, et Arto M att . 2008. « The MAGUK-Family Protein CASK Is Targeted to Nuclei of the Basal Epidermis and Controls Keratinocyte Proliferation ». *Journal of Cell Science* 121 (Pt 16): 2705-17.
- Oliva, Carlos, P a Escobedo, C sar Astorga, Claudia Molina, et Jimena Sierralta. 2012. « Role of the MAGUK Protein Family in Synapse Formation and Function ». *Developmental Neurobiology* 72 (1): 57-72.
- Olsen, Olav, et David S. Bredt. 2003. « Functional Analysis of the Nucleotide Binding Domain of Membrane-Associated Guanylate Kinases ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (9): 6873-78.

- Olsen, Olav, Kimberly A. Moore, Masaki Fukata, Toshinari Kazuta, Jonathan C. Trinidad, Fred W. Kauer, Michel Streuli, et al. 2005. « Neurotransmitter Release Regulated by a MALS-Liprin-Alpha Presynaptic Complex ». *The Journal of Cell Biology* 170 (7): 1127-34.
- Olson, Timothy M., Susanne Illenberger, Nina Y. Kishimoto, Stefan Huttelmaier, Mark T. Keating, et Brigitte M. Jockusch. 2002. « Metavinculin Mutations Alter Actin Interaction in Dilated Cardiomyopathy ». *Circulation* 105 (4): 431-37.
- O'Malley, Heather A., et Lori L. Isom. 2015. « Sodium channel β subunits: emerging targets in channelopathies ». *Annual review of physiology* 77: 481-504.
- Oswald, Annelie, et Andrew C Oates. 2011. « Control of endogenous gene expression timing by introns ». *Genome Biology* 12 (3): 107.
- Oxford, Eva M., Hassan Musa, Karen Maass, Wanda Coombs, Steven M. Taffet, et Mario Delmar. 2007. « Connexin43 Remodeling Caused by Inhibition of Plakophilin-2 Expression in Cardiac Cells ». *Circulation Research* 101 (7): 703-11.

P

- Paarmann, Ingo, Ming F. Lye, Arnon Lavie, et Manfred Konrad. 2008. « Structural requirements for calmodulin binding to membrane-associated guanylate kinase homologs ». *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 17 (11): 1946-54.
- Paarmann, Ingo, Oliver Spangenberg, Arnon Lavie, et Manfred Konrad. 2002. « Formation of Complexes between Ca^{2+} -Calmodulin and the Synapse-Associated Protein SAP97 Requires the SH3 Domain-Guanylate Kinase Domain-Connecting HOOK Region ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (43): 40832-38.
- Pacak, Christina A., Cathryn S. Mah, Bijoy D. Thattaliyath, Thomas J. Conlon, Melissa A. Lewis, Denise E. Cloutier, Irene Zolotukhin, Alice F. Tarantal, et Barry J. Byrne. 2006. « Recombinant Adeno-Associated Virus Serotype 9 Leads to Preferential Cardiac Transduction in Vivo ». *Circulation Research* 99 (4): e3-9.
- Palatinus, Joseph A., Michael P. O'Quinn, Ralph J. Barker, Brett S. Harris, Jane Jourdan, et Robert G. Gourdie. 2011. « ZO-1 Determines Adherens and Gap Junction Localization at Intercalated Disks ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 300 (2): H583-594.
- Paoletti, Pierre, Camilla Bellone, et Qiang Zhou. 2013. « NMDA Receptor Subunit Diversity: Impact on Receptor Properties, Synaptic Plasticity and Disease ». *Nature Reviews Neuroscience* 14 (6): 383-400.
- Papadatos, G. Alex, Polly M. R. Wallerstein, Catherine E. G. Head, Rosemary Ratcliff, Peter A. Brady, Klaus Benndorf, Richard C. Saumarez, et al. 2002. « Slowed conduction and ventricular tachycardia after targeted disruption of the cardiac sodium channel gene *Scn5a* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (9): 6210-15.
- Pappalardo, Laura W., Shujun Liu, Joel A. Black, et Stephen G. Waxman. 2014. « Dynamics of Sodium Channel Nav1.5 Expression in Astrocytes in Mouse Models of Multiple Sclerosis ». *Neuroreport* 25 (15): 1208-15.
- Pardo, J. V., J. D. Siliciano, et S. W. Craig. 1983. « A Vinculin-Containing Cortical Lattice in Skeletal Muscle: Transverse Lattice Elements ("costameres") Mark Sites of Attachment between Myofibrils and Sarcolemma ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80 (4): 1008-12.

- Park, Jun Young, Lucinda J. Hughes, Uk Yeol Moon, Raehee Park, Sang-Bae Kim, Khoi Tran, Ju-Seog Lee, Seo-Hee Cho, et Seonhee Kim. 2016. « The apical complex protein Pals1 is required to maintain cerebellar progenitor cells in a proliferative state ». *Development (Cambridge, England)* 143 (1): 133-46.
- Peter, Angela K., Hongqiang Cheng, Robert S. Ross, Kirk U. Knowlton, et Ju Chen. 2011. « The costamere bridges sarcomeres to the sarcolemma in striated muscle ». *Progress in pediatric cardiology* 31 (2): 83-88.
- Peters, Christian J., Sarah S. Chow, Damiano Angoli, Hamed Nazzari, Francisco S. Cayabyab, Ala Morshedian, et Eric A. Accili. 2009. « In Situ Co-Distribution and Functional Interactions of SAP97 with Sinoatrial Isoforms of HCN Channels ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 46 (5):
- Peters, N. S., J. Coromilas, N. J. Severs, et A. L. Wit. 1997. « Disturbed Connexin43 Gap Junction Distribution Correlates with the Location of Reentrant Circuits in the Epicardial Border Zone of Healing Canine Infarcts That Cause Ventricular Tachycardia ». *Circulation* 95 (4): 988-96.
- Petitprez, S., A. F. Zmoos, J. Ogrodnik, E. Balse, N. Raad, S. El-Haou, M. Albesa, et al. 2011. « SAP97 and dystrophin macromolecular complexes determine two pools of cardiac sodium channels Nav1.5 in cardiomyocytes ». *Circ Res* 108 (3): 294-304.
- Peyroche, A, et Cl Jackson. 2000. « La bréfeldine A : inhibition " non compétitive " de l'activité d'échange sur une petite protéine G. » *médecine/sciences* 16 (1): 112.
- Piluso, Giulio, Francesca D'Amico, Valentina Saccone, Ettore Bismuto, Ida Luisa Rotundo, Marina Di Domenico, Stefania Aurino, Charles E. Schwartz, Giovanni Neri, et Vincenzo Nigro. 2009. « A Missense Mutation in CASK Causes FG Syndrome in an Italian Family ». *American Journal of Human Genetics* 84 (2): 162-77.
- Poláková, Eva, et Eric A. Sobie. 2013. « Alterations in T-tubule and dyad structure in heart disease: challenges and opportunities for computational analyses ». *Cardiovascular Research* 98 (2): 233-39.

Q

- Qi, Jie, Yongyue Su, Rongju Sun, Fang Zhang, Xiaofeng Luo, Zongcheng Yang, et Xiangdong Luo. 2005. « CASK inhibits ECV304 cell growth and interacts with Id1 ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 328 (2): 517-21.
- Qu, Y., J. C. Rogers, T. N. Tanada, W. A. Catterall, et T. Scheuer. 1996. « Phosphorylation of S1505 in the Cardiac Na⁺ Channel Inactivation Gate Is Required for Modulation by Protein Kinase C ». *The Journal of General Physiology* 108 (5): 375-79.
- Qu, Y., J. Rogers, T. Tanada, T. Scheuer, et W. A. Catterall. 1994. « Modulation of Cardiac Na⁺ Channels Expressed in a Mammalian Cell Line and in Ventricular Myocytes by Protein Kinase C ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (8): 3289-93.

R

- Reichelt, A. C., R. J. Rodgers, et S. J. Clapcote. 2012. « The role of neurexins in schizophrenia and autistic spectrum disorder ». *Neuropharmacology, Schizophrenia*, 62 (3): 1519-26.
- Remme, Carol Ann. 2013. « Cardiac sodium channelopathy associated with SCN5A mutations: electrophysiological, molecular and genetic aspects ». *The Journal of Physiology* 591 (Pt 17): 4099-4116.

- Ren, D., B. Navarro, H. Xu, L. Yue, Q. Shi, et D. E. Clapham. 2001. « A Prokaryotic Voltage-Gated Sodium Channel ». *Science (New York, N.Y.)* 294 (5550): 2372-75.
- Resnicow, Daniel I., Anneka M. Hooft, Brooke C. Harrison, Josh E. Baker, et Leslie A. Leinwand. 2008. « GFP Fails to Inhibit Actin-Myosin Interactions *in Vitro* ». *Nature Methods* 5 (3): 212-13.
- Rhett, J. Matthew, Jane Jourdan, et Robert G. Gourdie. 2011. « Connexin 43 Connexon to Gap Junction Transition Is Regulated by Zonula Occludens-1 ». *Molecular Biology of the Cell* 22 (9): 1516-28.
- Rhett, J. Matthew, Emily L. Ongstad, Jane Jourdan, et Robert G. Gourdie. 2012. « Cx43 Associates with Na(v)1.5 in the Cardiomyocyte Perinexus ». *The Journal of Membrane Biology* 245 (7): 411-22.
- Rizzo, Stefania, Elisabeth M. Lodder, Arie O. Verkerk, Rianne Wolswinkel, Leander Beekman, Kalliopi Pilichou, Cristina Basso, Carol Ann Remme, Gaetano Thiene, et Connie R. Bezzina. 2012. « Intercalated Disc Abnormalities, Reduced Na(+) Current Density, and Conduction Slowing in Desmoglein-2 Mutant Mice Prior to Cardiomyopathic Changes ». *Cardiovascular Research* 95 (4): 409-18.
- Roh, Michael H., Shuling Fan, Chia-Jen Liu, et Ben Margolis. 2003. « The Crumbs3-Pals1 Complex Participates in the Establishment of Polarity in Mammalian Epithelial Cells ». *Journal of Cell Science* 116 (Pt 14): 2895-2906.
- Ross, Jennifer L., M. Yusuf Ali, et David M. Warshaw. 2008. « Cargo Transport: Molecular Motors Navigate a Complex Cytoskeleton ». *Current opinion in cell biology* 20 (1): 41-47.
- Rousset, Matthieu, Pierre Charnet, et Thierry Cens. 2005. « Structure de la sous-unité β du canal calcique : la place du β -interaction domain ». *médecine/sciences* 21 (3): 279-83.
- Rucker-Martin, Catherine, Paul Milliez, Sisareuth Tan, Xavier Decrouy, Michel Recouvreur, Roger Vranckx, Claude Delcayre, et al. 2006. « Chronic Hemodynamic Overload of the Atria Is an Important Factor for Gap Junction Remodeling in Human and Rat Hearts ». *Cardiovascular Research* 72 (1): 69-79.
- Rudy, B. 1978. « Slow Inactivation of the Sodium Conductance in Squid Giant Axons. Pronase Resistance. ». *The Journal of Physiology* 283 (1): 1-21.
- Ruff, P, D W Speicher, et A Husain-Chishti. 1991. « Molecular identification of a major palmitoylated erythrocyte membrane protein containing the src homology 3 motif. ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (15): 6595-99.

S

- Sacconi, Leonardo, Cecilia Ferrantini, Jacopo Lotti, Raffaele Coppini, Ping Yan, Leslie M. Loew, Chiara Tesi, Elisabetta Cerbai, Corrado Poggesi, et Francesco S. Pavone. 2012. « Action Potential Propagation in Transverse-Axial Tubular System Is Impaired in Heart Failure ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (15): 5815-19.
- Saitsu, Hiroto, Mitsuhiro Kato, Hitoshi Osaka, Nobuko Moriyama, Hideki Horita, Kiyomi Nishiyama, Yuriko Yoneda, et al. 2012. « CASK Aberrations in Male Patients with Ohtahara Syndrome and Cerebellar Hypoplasia ». *Epilepsia* 53 (8): 1441-49.
- Samarel, Allen M. 2005. « Costameres, focal adhesions, and cardiomyocyte mechanotransduction ». *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 289 (6): H2291-2301.

- Samuels, Benjamin Adam, Yi-Ping Hsueh, Tianzhi Shu, Haoya Liang, Huang-Chun Tseng, Chen-Jei Hong, Susan C. Su, et al. 2007. « Cdk5 Promotes Synaptogenesis by Regulating the Subcellular Distribution of the MAGUK Family Member CASK ». *Neuron* 56 (5): 823-37.
- Sato, Ken, et Akihiko Nakano. 2007. « Mechanisms of COPII vesicle formation and protein sorting ». *FEBS Letters*, Membrane Trafficking, 581 (11): 2076-82.
- Sato, Priscila Y., Hassan Musa, Wanda Coombs, Guadalupe Guerrero-Serna, Gustavo A. Patiño, Steven M. Taffet, Lori L. Isom, et Mario Delmar. 2009. « Loss of Plakophilin-2 Expression Leads to Decreased Sodium Current and Slower Conduction Velocity in Cultured Cardiac Myocytes ». *Circulation Research* 105 (6): 523-26.
- Schotten, Ulrich, Sander Verheule, Paulus Kirchhof, et Andreas Goette. 2011. « Pathophysiological Mechanisms of Atrial Fibrillation: A Translational Appraisal ». *Physiological Reviews* 91 (1): 265-325.
- Schuh, Kai, Stjepan Uldrijan, Stepan Gambaryan, Nicola Roethlein, et Ludwig Neyses. 2003. « Interaction of the Plasma Membrane Ca²⁺ Pump 4b/CI with the Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Membrane-Associated Kinase CASK ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (11): 9778-83.
- Schumacher, Sarah M., Dyke P. McEwen, Lian Zhang, Kristin L. Arendt, Kristin M. Van Genderen, et Jeffrey R. Martens. 2009. « Antiarrhythmic Drug-Induced Internalization of the Atrial-Specific K⁺ Channel Kv1.5 ». *Circulation Research* 104 (12): 1390-98.
- Scriven, David R. L., Parisa Asghari, et Edwin D. W. Moore. 2013. « Microarchitecture of the Dyad ». *Cardiovascular Research* 98 (2): 169-76.
- Seto, Toshiyuki, Takashi Hamazaki, Satsuki Nishigaki, Satoshi Kudo, Haruo Shintaku, Yumiko Ondo, Keiko Shimojima, et Toshiyuki Yamamoto. 2017. « A novel CASK mutation identified in siblings exhibiting developmental disorders with/without microcephaly ». *Intractable & Rare Diseases Research* 6 (3): 177-82.
- Shaw, Robin M., Alex J. Fay, Manojkumar A. Puthenveedu, Mark von Zastrow, Yuh-Nung Jan, et Lily Y. Jan. 2007. « Microtubule Plus-End-Tracking Proteins Target Gap Junctions Directly from the Cell Interior to Adherens Junctions ». *Cell* 128 (3): 547-60.
- Sheng, M., et C. Sala. 2001. « PDZ Domains and the Organization of Supramolecular Complexes ». *Annual Review of Neuroscience* 24: 1-29.
- Shepherd, N., et H. B. McDonough. 1998. « Ionic Diffusion in Transverse Tubules of Cardiac Ventricular Myocytes ». *The American Journal of Physiology* 275 (3 Pt 2): H852-860.
- Shieh, Char-Chang, Michael Coghlan, James P. Sullivan, et Murali Gopalakrishnan. 2000. « Potassium Channels: Molecular Defects, Diseases, and Therapeutic Opportunities ». *Pharmacological Reviews* 52 (4): 557-94.
- Shih, H T. 1994. « Anatomy of the action potential in the heart. » *Texas Heart Institute Journal* 21 (1): 30-41.
- Shy, Diana, Ludovic Gillet, et Hugues Abriel. 2013. « Cardiac sodium channel NaV1.5 distribution in myocytes via interacting proteins: The multiple pool model ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, Cardiomyocyte Biology: Cardiac Pathways of Differentiation, Metabolism and Contraction, 1833 (4): 886-94.

- Shy, Diana, Ludovic Gillet, Jakob Ogrodnik, Maxime Albesa, Arie O. Verkerk, Rianne Wolswinkel, Jean-Sébastien Rougier, et al. 2014. « PDZ Domain-Binding Motif Regulates Cardiomyocyte Compartment-Specific NaV1.5 Channel Expression and Function ». *Circulation* 130 (2): 147-60.
- Skach, William R. 2009. « Cellular Mechanisms of Membrane Protein Folding ». *Nature Structural & Molecular Biology* 16 (6): 606-12.
- Smith, J. H., C. R. Green, N. S. Peters, S. Rothery, et N. J. Severs. 1991. « Altered Patterns of Gap Junction Distribution in Ischemic Heart Disease. An Immunohistochemical Study of Human Myocardium Using Laser Scanning Confocal Microscopy ». *The American Journal of Pathology* 139 (4): 801-21.
- Smutny, Michael, et Alpha S. Yap. 2010. « Neighborly relations: cadherins and mechanotransduction ». *The Journal of Cell Biology* 189 (7): 1075-77.
- Smyrnias, Ioannis, Waltraud Mair, Dagmar Harzheim, Simon A. Walker, H. Llewelyn Roderick, et Martin D. Bootman. 2010. « Comparison of the T-Tubule System in Adult Rat Ventricular and Atrial Myocytes, and Its Role in Excitation-Contraction Coupling and Inotropic Stimulation ». *Cell Calcium* 47 (3): 210-23.
- Song, Xianyuan, Yongmei Zhao, Leontine Narcisse, Heather Duffy, Yvonne Kress, Sunhee Lee, et Celia F. Brosnan. 2005. « Canonical Transient Receptor Potential Channel 4 (TRPC4) Co-Localizes with the Scaffolding Protein ZO-1 in Human Fetal Astrocytes in Culture ». *Glia* 49 (3): 418-29.
- Spach, M. S. 1999. « Anisotropy of Cardiac Tissue: A Major Determinant of Conduction? » *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 10 (6): 887-90.
- Spach, M. S., et J. M. Kootsey. 1983. « The Nature of Electrical Propagation in Cardiac Muscle ». *The American Journal of Physiology* 244 (1): H3-22.
- Spach, M. S., J. F. Heidlage, P. C. Dolber, et R. C. Barr. 2001. « Changes in anisotropic conduction caused by remodeling cell size and the cellular distribution of gap junctions and Na⁺ channels ». *Journal of Electrocardiology* 34 (4, Part B): 69-76.
- Stafford, Ryan L., Jason Ear, Mary Jane Knight, et James U. Bowie. 2011. « The Molecular Basis of the Caskin1 and Mint1 Interaction with CASK ». *Journal of Molecular Biology* 412 (1): 3-13.
- Staub, Olivier, et Daniela Rotin. 1996. « WW domains ». *Structure* 4 (5): 495-99.
- Stevenson, D., H. G. Lavery, S. Wenwieser, M. Douglas, et J. B. Wilson. 2000. « Mapping and Expression Analysis of the Human CASK Gene ». *Mammalian Genome: Official Journal of the International Mammalian Genome Society* 11 (10): 934-37.
- Stocker, Patrick J., et Eric S. Bennett. 2006. « Differential Sialylation Modulates Voltage-Gated Na⁺ Channel Gating throughout the Developing Myocardium ». *The Journal of General Physiology* 127 (3): 253-65.
- Straight, Samuel W., David Karnak, Jean-Paul Borg, Emmanuel Kamberov, Heidi Dare, Ben Margolis, et James B. Wade. 2000. « mLin-7 is localized to the basolateral surface of renal epithelia via its NH2 terminus ». *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 278 (3): F464-75.
- Straight, Samuel W., Jay N. Pieczynski, Eileen L. Whiteman, Chia-Jen Liu, et Ben Margolis. 2006. « Mammalian Lin-7 Stabilizes Polarity Protein Complexes ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (49): 37738-47.

- Stühmer, W., F. Conti, H. Suzuki, X. D. Wang, M. Noda, N. Yahagi, H. Kubo, et S. Numa. 1989. « Structural Parts Involved in Activation and Inactivation of the Sodium Channel ». *Nature* 339 (6226): 597-603.
- Su, Susan C., Jinsoo Seo, Jen Q. Pan, Benjamin Adam Samuels, Andrii Rudenko, Maria Ericsson, Rachael L. Neve, David T. Yue, et Li-Huei Tsai. 2012. « Regulation of N-type voltage-gated calcium channels and presynaptic function by cyclin-dependent kinase 5 ». *Neuron* 75 (4): 675-87.
- Sudol, Marius. 1996. « The WW module competes with the SH3 domain? » *Trends in Biochemical Sciences* 21 (5): 161-63.
- Sugihara, Takeru, Shunsuke Nakagawa, Yuko Sasajima, Takayuki Ichinose, Haruko Hiraike, Fukuo Kondo, Hiroshi Uozaki, Toshio Fukusato, et Takuya Ayabe. 2016. « Loss of the Cell Polarity Determinant Human Discs-Large Is a Novel Molecular Marker of Nodal Involvement and Poor Prognosis in Endometrial Cancer ». *British Journal of Cancer* 114 (9): 1012-18.
- Sun, Rongju, Yongyue Su, Xiaodong Zhao, Jie Qi, Xiaofeng Luo, Zongcheng Yang, Yongming Yao, Xiangdong Luo, et Zhaofan Xia. 2009. « Human Calcium/Calmodulin-Dependent Serine Protein Kinase Regulates the Expression of P21 via the E2A Transcription Factor ». *The Biochemical Journal* 419 (2): 457-66.

T

- Tabuchi, Katsuhiko, Thomas Biederer, Stefan Butz, et Thomas C. Südhof. 2002. « CASK Participates in Alternative Tripartite Complexes in Which Mint 1 Competes for Binding with Caskin 1, a Novel CASK-Binding Protein ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 22 (11): 4264-73.
- Talts, J. F., Z. Andac, W. Göhring, A. Brancaccio, et R. Timpl. 1999. « Binding of the G Domains of Laminin Alpha1 and Alpha2 Chains and Perlecan to Heparin, Sulfatides, Alpha-Dystroglycan and Several Extracellular Matrix Proteins ». *The EMBO Journal* 18 (4): 863-70.
- Tan, Hanno L., Sabina Kupersmidt, Rong Zhang, Svetlana Stepanovic, Dan M. Roden, Arthur A. M. Wilde, Mark E. Anderson, et Jeffrey R. Balser. 2002. « A Calcium Sensor in the Sodium Channel Modulates Cardiac Excitability ». *Nature* 415 (6870): 442-47.
- Tanemoto, Masayuki, Takafumi Toyohara, Takaaki Abe, et Sadayoshi Ito. 2008. « MAGI-1a Functions as a Scaffolding Protein for the Distal Renal Tubular Basolateral K⁺ Channels ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (18): 12241-47.
- Terlau, H., S. H. Heinemann, W. Stühmer, M. Pusch, F. Conti, K. Imoto, et S. Numa. 1991. « Mapping the Site of Block by Tetrodotoxin and Saxitoxin of Sodium Channel II ». *FEBS Letters* 293 (1-2): 93-96.
- Thompson, T. G., Y. M. Chan, A. A. Hack, M. Brosius, M. Rajala, H. G. Lidov, E. M. McNally, S. Watkins, et L. M. Kunkel. 2000. « Filamin 2 (FLN2): A Muscle-Specific Sarcoglycan Interacting Protein ». *The Journal of Cell Biology* 148 (1): 115-26.
- Toyofuku, T., Y. Akamatsu, H. Zhang, T. Kuzuya, M. Tada, et M. Hori. 2001. « C-Src Regulates the Interaction between Connexin-43 and ZO-1 in Cardiac Myocytes ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (3): 1780-88. h
- Toyofuku, Toshihiko, Masanori Yabuki, Kinya Otsu, Tsunehiko Kuzuya, Masatsugu Hori, et Michihiko Tada. 1998. « Direct Association of the Gap Junction Protein Connexin-43 with ZO-1 in Cardiac Myocytes ». *Journal of Biological Chemistry* 273 (21): 12725-31.

U

Uhl, Sebastian, Marc Freichel, et Ilka Mathar. 2015. « Contractility Measurements on Isolated Papillary Muscles for the Investigation of Cardiac Inotropy in Mice ». *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, n° 103 (septembre).

V

Vaidyanathan, Ravi, Steven M. Taffet, Karen L. Vikstrom, et Justus M. B. Anumonwo. 2010. « Regulation of Cardiac Inward Rectifier Potassium Current (I(K1)) by Synapse-Associated Protein-97 ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (36): 28000-9.

Valayannopoulos, Vassili, Caroline Michot, Diana Rodriguez, Laurence Hubert, Yoann Saillour, Philippe Labrune, Jocelyne de Laveaucoupet, et al. 2012. « Mutations of TSEN and CASK Genes Are Prevalent in Pontocerebellar Hypoplasias Type 2 and 4 ». *Brain: A Journal of Neurology* 135 (Pt 1): e199; author reply e200.

Valderrábano, Miguel. 2007. « Influence of Anisotropic Conduction Properties in the Propagation of the Cardiac Action Potential ». *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 94 (1-2): 144-68.

Valdivia, Carmen R., Kazuo Ueda, Michael J. Ackerman, et Jonathan C. Makielski. 2009. « GPD1L links redox state to cardiac excitability by PKC-dependent phosphorylation of the sodium channel SCN5A ». *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 297 (4): H1446-52.

Vassilev, P. M., T. Scheuer, et W. A. Catterall. 1988. « Identification of an Intracellular Peptide Segment Involved in Sodium Channel Inactivation ». *Science* 241 (4873): 1658-61.

Veerman, Christiaan C., Arthur A. M. Wilde, et Elisabeth M. Lodder. 2015. « The cardiac sodium channel gene SCN5A and its gene product NaV1.5: Role in physiology and pathophysiology ». *Gene* 573 (2): 177-87.

Velthuis, Aartjan J. W. te, Jeroen F. Admiraal, et Christoph P. Bagowski. 2007. « Molecular Evolution of the MAGUK Family in Metazoan Genomes ». *BMC Evolutionary Biology* 7 (août): 129.

Vermij, Sarah H., Hugues Abriel, Van Veen, et Toon A. B. 2017. « Refining the Molecular Organization of the Cardiac Intercalated Disc ». *Cardiovascular Research* 113 (3): 259-75.

Volta, Manuela, Stefano Calza, Anne M. Roberts, et Roland G. Roberts. 2010. « Characterisation of the Interaction between Syndecan-2, Neurofibromin and CASK: Dependence of Interaction on Syndecan Dimerization ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 391 (2): 1216-21.

W

Waechter, C. J., J. W. Schmidt, et W. A. Catterall. 1983. « Glycosylation Is Required for Maintenance of Functional Sodium Channels in Neuroblastoma Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 258 (8): 5117-23.

Wagner, Stefan, Nataliya Dybkova, Eva C. L. Rasenack, Claudius Jacobshagen, Larissa Fabritz, Paulus Kirchhof, Sebastian K. G. Maier, et al. 2006. « Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Regulates Cardiac Na⁺ Channels ». *The Journal of Clinical Investigation* 116 (12): 3127-38.

Wang, Guey-Shin, Chen-Jei Hong, Tsen-Yann Yen, Hsin-Yi Huang, Yvonne Ou, Tzyy-Nan Huang, Wei-

- Wang, Kevin K. W., et Yuen Po-Wai. 1994. « Calpain Inhibition: An Overview of Its Therapeutic Potential ». *Trends in Pharmacological Sciences* 15 (11): 412-19.
- Wang, Lu, Zibo Zhao, Mark B. Meyer, Sandeep Saha, Menggang Yu, Ailan Guo, Kari B. Wisinski, et al. 2014. « CARM1 Methylates Chromatin Remodeling Factor BAF155 to Enhance Tumor Progression and Metastasis ». *Cancer Cell* 25 (1): 21-36.
- Wang, Qian, Xiao-Wei Chen, et Ben Margolis. 2007. « PALS1 Regulates E-Cadherin Trafficking in Mammalian Epithelial Cells ». *Molecular Biology of the Cell* 18 (3): 874-85.
- Wang, Ting-Fang, Chia-Nung Ding, Guey-Shin Wang, Shih-Chi Luo, Yi-Ling Lin, Youlin Ruan, Robert Hevner, John L. R. Rubenstein, et Yi-Ping Hsueh. 2004. « Identification of Tbr-1/CASK Complex Target Genes in Neurons ». *Journal of Neurochemistry* 91 (6): 1483-92.
- Wang, Yao, Nana Hao, Haiyan Lin, Tianyuan Wang, Jinyang Xie, et Yuexing Yuan. 2018. « Down-Regulation of CASK in Glucotoxicity-Induced Insulin Dysfunction in Pancreatic β Cells ». *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica* 50 (3): 281-87.
- Watanabe, Hiroshi, Tamara T. Koopmann, Solena Le Scouarnec, Tao Yang, Christiana R. Ingram, Jean-Jacques Schott, Sophie Demolombe, et al. 2008. « Sodium Channel B1 Subunit Mutations Associated with Brugada Syndrome and Cardiac Conduction Disease in Humans ». *The Journal of Clinical Investigation* 118 (6): 2260-68.
- Weinhaus, Anthony J., et Kenneth P. Roberts. 2005. « Anatomy of the Human Heart ». *Handbook of Cardiac Anatomy, Physiology, and Devices: Second Edition*, décembre, 59-85.
- West, J. W., D. E. Patton, T. Scheuer, Y. Wang, A. L. Goldin, et W. A. Catterall. 1992. « A Cluster of Hydrophobic Amino Acid Residues Required for Fast Na(+)-Channel Inactivation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89 (22): 10910-14.
- Wong-Riley, Margaret T.T., et Joseph C. Besharse. 2012. « The kinesin superfamily protein KIF17: one protein with many functions ». *Biomolecular concepts* 3 (3): 267-82.
- Woods, D. F., et P. J. Bryant. 1991. « The Discs-Large Tumor Suppressor Gene of Drosophila Encodes a Guanylate Kinase Homolog Localized at Septate Junctions ». *Cell* 66 (3): 451-64.
- Woods, Daniel F., et Peter J. Bryant. 1991. « The discs-large tumor suppressor gene of Drosophila encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions ». *Cell* 66 (3): 451-64.
- Wu, Gong-Her, Muniesh Muthaiyan Shanmugam, Prerana Bhan, Yu-Hsin Huang, et Oliver Ingvar Wagner. 2016. « Identification and Characterization of LIN-2(CASK) as a Regulator of Kinesin-3 UNC-104(KIF1A) Motility and Clustering in Neurons ». *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 17 (8): 891-907.
- Wu, Gong-Her, Muniesh Muthaiyan Shanmugam, Prerana Bhan, Yu-Hsin Huang, et Oliver Ingvar Wagner. 2016. « Identification and Characterization of LIN-2(CASK) as a Regulator of Kinesin-3 UNC-104(KIF1A) Motility and Clustering in Neurons ». *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, mai.
- Wu, Zhijian, Aravind Asokan, et R. Jude Samulski. 2006. « Adeno-Associated Virus Serotypes: Vector Toolkit for Human Gene Therapy ». *Molecular Therapy* 14 (3): 316-27.

X

- Xu, Yanjie, Jixiang Xia, Suxuan Liu, Sam Stein, Cueto Ramon, Hang Xi, Luqiao Wang, et al. 2017. « Endocytosis and Membrane Receptor Internalization: Implication of F-BAR Protein Carom ». *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)* 22: 1439-57.

Y

Yamanaka, Tomoyuki, et Shigeo Ohno. 2008. « Role of Lgl/Dlg/Scribble in the Regulation of Epithelial Junction, Polarity and Growth ». *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 13 (mai): 6693-6707.

Yap, Chan Choo, Fengyi Liang, Yasuhiro Yamazaki, Yuko Muto, Haruo Kishida, Tsuyako Hayashida, Tsutomu Hashikawa, et Ryoji Yano. 2003. « CIP98, a Novel PDZ Domain Protein, Is Expressed in the Central Nervous System and Interacts with Calmodulin-Dependent Serine Kinase ». *Journal of Neurochemistry* 85 (1): 123-34.

Yeager, M. 1998. « Structure of Cardiac Gap Junction Intercellular Channels ». *Journal of Structural Biology* 121 (2): 231-45.

Yoon, Jin-Young, Won-Kyung Ho, Seong-Tae Kim, et Hana Cho. 2009. « Constitutive CaMKII Activity Regulates Na⁺ Channel in Rat Ventricular Myocytes ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 47 (4): 475-84.

Z

Zaklyazminskaya, Elena, et Sergei Dzemeshevich. 2016. « The role of mutations in the SCN5A gene in cardiomyopathies ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Cardiomyocyte Biology: Integration of Developmental and Environmental Cues in the Heart*, 1863 (7, Part B): 1799-1805.

Zaric, J., J.-M. Joseph, S. Tercier, T. Sengstag, L. Ponsonnet, M. Delorenzi, et C. Rüegg. 2012. « Identification of MAGI1 as a Tumor-Suppressor Protein Induced by Cyclooxygenase-2 Inhibitors in Colorectal Cancer Cells ». *Oncogene* 31 (1): 48-59.

Zemljic-Harpe, Alice E., Sornya Ponrartana, Roy T. Avalos, Maria C. Jordan, Kenneth P. Roos, Nancy D. Dalton, Vinh Q. Phan, Eileen D. Adamson, et Robert S. Ross. 2004. « Heterozygous Inactivation of the Vinculin Gene Predisposes to Stress-Induced Cardiomyopathy ». *The American Journal of Pathology* 165 (3): 1033-44.

Zhang, Jinxiu, Xue Yang, Zheng Wang, Hao Zhou, Xingqiao Xie, Yuequan Shen, et Jiafu Long. 2012. « Structure of an L27 Domain Heterotrimer from Cell Polarity Complex Patj/Pals1/Mals2 Reveals Mutually Independent L27 Domain Assembly Mode ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (14): 11132-40.

Zhang, Y., Z. Luan, A. Liu, et G. Hu. 2001. « The Scaffolding Protein CASK Mediates the Interaction between Rabphilin3a and Beta-Neurexins ». *FEBS Letters* 497 (2-3): 99-102.

Zheng, Chan-Ying, Gail K. Seabold, Martin Horak, et Ronald S. Petralia. 2011. « MAGUKs, Synaptic Development, and Synaptic Plasticity ». *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 17 (5): 493-512.

Zhou, Jingsong, Hyeon-Gyu Shin, Jianxun Yi, Wangzhen Shen, Christine P. Williams, et Katherine T. Murray. 2002. « Phosphorylation and Putative ER Retention Signals Are Required for Protein Kinase A-Mediated Potentiation of Cardiac Sodium Current ». *Circulation Research* 91 (6): 540-46.

Zhu, Jinwei, Yuan Shang, et Mingjie Zhang. 2016. « Mechanistic Basis of MAGUK-Organized Complexes in Synaptic Development and Signalling ». *Nature Reviews. Neuroscience* 17 (4): 209-23.

- Zhu, Zheng-Qiu, Dong Wang, Dan Xiang, Yue-Xing Yuan, et Yao Wang. 2014. « Calcium/Calmodulin-Dependent Serine Protein Kinase Is Involved in Exendin-4-Induced Insulin Secretion in INS-1 Cells ». *Metabolism: Clinical and Experimental* 63 (1): 120-26.
- Zollinger, Daniel R., Kae-Jiun Chang, Kelli Baalman, Seonhee Kim, et Matthew N. Rasband. 2015. « The Polarity Protein Pals1 Regulates Radial Sorting of Axons ». *The Journal of Neuroscience* 35 (29): 10474-84.
- Zou, Shengwei, Juan D. Pita-Almenar, et Arnold Eskin. 2011. « Regulation of Glutamate Transporter GLT-1 by MAGI-1 ». *Journal of Neurochemistry* 117 (5): 833-40.
- Zuppinger, C., M. Eppenberger-Eberhardt, et H. M. Eppenberger. 2000. « N-Cadherin: Structure, Function and Importance in the Formation of New Intercalated Disc-like Cell Contacts in Cardiomyocytes ». *Heart Failure Reviews* 5 (3): 251-57.

Rôle de la protéine CASK dans l'organisation des sous populations de canaux ioniques dans le myocyte et dans l'électrophysiologie cardiaque *in vivo*

Les cardiomyocytes sont des cellules hautement différenciées caractérisées par des domaines membranaires distincts où sont présents de nombreux canaux ioniques impliqués dans l'activité électromécanique cardiaque. À ce jour, les mécanismes d'adressage et d'organisation de ces canaux dans les domaines membranaires sont encore peu documentés. Les protéines à multi-domaines de la famille des MAGUKs (Membrane Associated GUanylate Kinase) sont impliquées dans le trafic, l'ancrage et l'agrégation de complexes macromoléculaires à la membrane plasmique. Nous avons identifié pour la première fois dans le cœur un membre de ces protéines d'échafaudage : la protéine CASK (Calcium/Calmodulin-dependant Serine protein Kinase). CASK est localisée exclusivement à la membrane latérale du cardiomyocyte où elle s'associe au complexe Dystrophine-Glycoprotéines par son domaine HOOK et à une sous-population de canaux sodiques $Na_v1.5$. De plus, nous avons constaté que dans le myocyte cardiaque, CASK agit comme un répresseur du courant sodique I_{Na} en régulant le trafic antérograde et / ou la rétention des canaux $Na_v1.5$ dans des espaces sous membranaires *via* ses domaines L27B ou GUK. En réprimant l'expression des canaux sodiques au niveau de la membrane latérale des cellules cardiaques, CASK pourrait ainsi participer au maintien de la conduction anisotrope du potentiel d'action à travers le myocarde.

Mots clés : MAGUKs, CASK, Canaux ioniques, Dystrophine, Costamère, Cardiomyocytes

Characterization of CASK protein function in the regulation of ion channels in cardiomyocytes and its role in cardiac electrophysiology *in vivo*

Cardiomyocytes are highly differentiated cells with well-organized membrane domains containing distinct ion channels with specific roles in electrical and mechanical cardiac properties. However, the functional expression of ion channels in these membrane domains is regulated by complex processes that are just starting to be identified. The multidomain proteins of the MAGUK (Membrane Associated GUanylate Kinase) family are implicated in trafficking, anchoring and organization of macromolecular complexes at the plasma membrane. For the first time, we have identified in the heart a member of these scaffolding proteins named CASK (Calcium/Calmodulin-dependant Serine protein Kinase). CASK has a restricted localization at the lateral membrane where it binds to dystrophin-glycoprotein complex through its HOOK domain and a subpopulation of cardiac sodium channel $Na_v1.5$. Moreover, CASK is able to negatively regulate the sodium current I_{Na} in the cardiac myocyte by impeding anterograde trafficking and/or retention of $Na_v1.5$ channels in submembrane compartments through its L27B or GUK domains. By maintaining low levels of sodium channels at the lateral membrane of cardiac cells, CASK could participate in maintenance of the anisotropic conduction of the depolarization wave in the myocardium.

Keywords: MAGUKs, CASK, Ion channels, Dystrophin, Costamere, Cardiomyocytes
