

**HERG-BRET / Évaluation par la technologie BRET de
l'interaction moléculaire avec le canal potassique Kv11.1
responsable d'arythmies ventriculaires médicamenteuses**

Par
Etienne Durette

Sciences pharmaceutiques
Faculté de Pharmacie

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures en vue
de l'obtention du grade M. Sc. en Sciences pharmaceutiques,
option pharmacologie

Avril 2016

© Etienne Durette, 2016

Résumé

Le canal Kv11.1, dont l'inhibition occasionne une prolongation de l'intervalle QT, est directement impliqué dans des cas d'effets secondaires cardiotoxiques. Depuis 2006, Santé Canada exige que les nouvelles molécules et leurs métabolites soient évalués en phase préclinique pour le risque d'allongement de l'intervalle QT. La méthode de référence évalue l'électrophysiologie des cardiomyocytes en culture lors d'une courte exposition au médicament (<30min). Bien que cette méthode soit la plus fiable actuellement, elle permet seulement d'identifier les molécules qui bloquent directement le passage des ions dans le pore du canal (effet aigu).

La méthode HERG-BRET vise à identifier les molécules susceptibles d'interagir avec le canal Kv11.1 par le moyen d'une altération du trafic vésiculaire (effet chronique). Ce type d'interaction est considéré comme un biomarqueur de la capacité à bloquer l'activité de ce canal. L'étude présentée tente de déterminer si un test de localisation cellulaire de hERG basé sur le BRET permettra un criblage à haut débit et une meilleure évaluation de l'affinité d'interaction avec hERG, comparativement aux méthodes alternatives actuelles. Dans le modèle HERG-BRET, la protéine hERG fusionnée à la luciférase de *renilla* (donneur d'énergie) est exprimée dans une lignée cellulaire HEK293. Cette même lignée exprime également une protéine verte fluorescente modifiée (accepteur d'énergie) qui est ancrée à la membrane plasmique. L'échange d'énergie entre le donneur et l'accepteur est un indice de la localisation de hERG à la membrane plasmique. Les fluctuations de ratio BRET suite à une exposition de 16h à un composé pharmaceutique reflètent donc l'effet du composé sur la translocation de Kv11.1. Vingt-cinq composés pharmaceutiques déjà caractérisés dans la littérature scientifique ont été testés : 12 ont été classés comme chaperons pharmacologiques, 4 comme inhibiteurs du trafic, 1 comme inhibiteur ayant les deux effets mentionnés et 8 n'ont pas pu être classés. Le comportement du biosenseur à l'égard des composés testés suggère que la méthode HERG-BRET ne peut pas être utilisée seule pour évaluer le risque cardiotoxique des médicaments. Toutefois, elle peut fournir des informations complémentaires pertinentes quand à la nature de l'interaction entre un composé pharmaceutique et la sous unité hERG du canal Kv11.1.

Mots-clés :

Kv11.1, hERG, prolongation de l'intervalle QT, mécanismes d'inhibition, évaluation préclinique *in vitro*, *patch-clamp* (électrophysiologie), BRET.

Abstract

The Kv11.1 channel is directly involved in cardiotoxic adverse effects since its inhibition is responsible for a prolongation of the QT interval. In 2006, Health Canada established a guideline that constrains drug developers to a preclinical evaluation of QT prolongation risks for new molecules and their metabolites. The gold standard method (*patch-clamp*) consists in electrophysiology measurements on cultured cardiomyocytes for a brief exposition to the tested compound (<30min). Even though this method is the most reliable, it only allows the identification of molecules that inhibit the channel by preventing ions from traveling through the pore (acute effect).

The HERG-BRET method aims to identify molecules that can interact with Kv11.1 and alter its vesicular transport as a proxy for inhibiting the activity of the channel (chronic effects). This study attempts to determine if a BRET-based cellular localization assay will allow a high throughput screening and a better evaluation of the affinity of pharmaceuticals compounds with hERG, in comparison to alternative methods. In the HERG-BRET model, a fusion protein generated with the gene sequence for hERG and the one for the *renilla luciferase* (energy donor) is stably expressed in a HEK 293 cell line. The same cell line also stably expresses a green fluorescent protein (energy acceptor) that is anchored at the plasma membrane. The energy transfer that occurs between the donor and the acceptor suggests that hERG is located at the membrane. Variations of BRET ratios following a 16 hours incubation with a compound reflects the compound's effects on Kv11.1's translocation. Twenty-five compounds that have been previously characterized in the literature were tested: 12 were categorized as pharmacological chaperones, 4 as traffic inhibitors, 1 as an inhibitor that undergoes both effects and 8 remain uncategorized.

The biosensor's behavior towards the tested compounds suggests that the HERG-BRET method cannot be used alone to assess cardiotoxic liability, but it can bring interesting facts to our attention regarding the nature of the interaction between the hERG subunits of Kv11.1 and a tested compound.

Key-words:

Kv11.1, hERG, QT interval prolongation, Inhibition mechanisms, *in vitro* preclinical evaluations, *patch-clamp* (electrophysiology), BRET.

Table des matières

| | |
|---|------------|
| Résumé | I |
| Abstract | II |
| Table des matières | III |
| Liste des tableaux | VI |
| Liste des figures | VII |
| Liste des sigles et abréviations | X |
| Remerciements | XII |
| 1. Introduction | 1 |
| 1.1 L'activité électrique du cœur | 1 |
| 1.2 Les arythmies | 4 |
| 1.2.1 Les formes d'arythmies..... | 4 |
| 1.2.2 Les médicaments anti-arythmiques | 4 |
| 1.3 L'effet arythmogène causé par l'inhibition de Kv11.1 | 6 |
| 1.4 Quelques cas importants | 8 |
| 1.4.1 Thioridazine : l'élément déclencheur | 8 |
| 1.4.2 Terfenadine : un cas de retrait du marché | 8 |
| 1.4.3 Verapamil : un cas d'effet compensatoire..... | 9 |
| 1.5 Médicaments à risque | 10 |
| 1.6 La sous-unité protéique hERG | 13 |
| 1.6.1 La structure de hERG | 14 |
| 1.6.2 L'assemblage et le transport vésiculaire de hERG | 15 |
| 1.6.3 La fonction de hERG | 17 |
| 1.7 Les mutations héréditaires de long QT | 18 |
| 1.7.1 Le phénotype dominant négatif | 18 |
| 1.7.2 L'haplo-insuffisance | 19 |
| 1.8 Mécanismes biologiques derrière l'inhibition de Kv11.1 | 20 |
| 1.8.1 Les inhibiteurs fonctionnels | 20 |
| 1.8.2 Les inhibiteurs de translocation | 21 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 1.8.3 | Déterminants structuraux prédisposant à une interaction avec hERG | 22 |
| 1.9 | Exigences règlementaires | 23 |
| 1.9.1 | Essais <i>in vitro</i> | 23 |
| 1.9.2 | Essais <i>in vivo</i> | 24 |
| 1.10 | Méthodes de criblage | 25 |
| 1.10.1 | La modélisation <i>in silico</i> | 25 |
| 1.10.2 | Compétition par des radioligands ou des traceurs fluorescents | 25 |
| 1.10.3 | Efflux de Rubidium (Rb ⁺) | 26 |
| 1.10.4 | Colorants fluorescents | 26 |
| 1.10.5 | Patch-clamp automatisé | 26 |
| 1.10.6 | HERG-Lite® | 27 |
| 1.11 | BRET | 28 |
| 1.12 | Hypothèse | 30 |
| 2. | Objectifs spécifiques | 31 |
| 3. | Matériel et méthodes | 32 |
| | Principe derrière le biosenseur HERG-BRET | 32 |
| 3.1 | Analyse comparative des constructions plasmidiques | 35 |
| 3.1.1 | Matériel requis | 38 |
| 3.1.2 | Grandes lignes du protocole | 39 |
| 3.2 | Preuve de concept en lignée cellulaire stable | 40 |
| 3.2.1 | Matériel requis | 41 |
| 3.2.2 | Grandes lignes du protocole | 41 |
| 3.3 | Analyse comparative des profils obtenus pour 25 composés avec HERG-BRET, HERG-Lite® et par <i>patch-clamp</i> | 44 |
| 3.3.1 | Matériel requis | 44 |
| 3.3.2 | Grandes lignes du protocole | 45 |
| 3.4 | Analyse des données brutes | 46 |
| 4. | Résultats | 47 |
| 4.1 | Analyse comparative des constructions plasmidiques | 47 |
| 4.2 | Preuve de concept en lignée cellulaire stable | 53 |
| 4.3 | Analyse comparative des profils obtenus pour 25 composés avec HERG-BRET, HERG-Lite® et par <i>patch-clamp</i> | 56 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 5. | Discussion..... | 1 |
| 5.1 | Analyse comparative des constructions plasmidiques | 1 |
| 5.1.1 | Le site d'insertion <i>Nter</i> | 1 |
| 5.1.2 | Le site d'insertion <i>S2S3</i> | 2 |
| 5.1.3 | Le site d'insertion <i>S1</i> | 2 |
| 5.1.4 | La mutation G601S | 2 |
| 5.1.5 | L'étiquette moléculaire HA | 3 |
| 5.2 | Preuve de concept en lignée cellulaire stable..... | 5 |
| 5.3 | Analyse comparative des EC₅₀ obtenus pour 25 composés avec HERG-BRET, HERG-Lite® et par <i>patch-clamp</i>..... | 7 |
| 5.3.1 | Les bloqueurs du pore selon la méthode HERG-BRET | 7 |
| 5.3.2 | Les inhibiteurs de trafic selon la méthode HERG-BRET | 8 |
| 5.3.3 | Les composés à effet double selon la méthode HERG-BRET | 9 |
| 5.3.4 | Les composés non classés par la méthode HERG-BRET | 10 |
| 5.3.5 | HERG-BRET vs <i>hERG-Lite®</i> | 11 |
| 6. | Conclusion et perspectives | 13 |
| 7. | Bibliographie..... | 15 |

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau I. Avis émis par Santé Canada concernant les médicaments susceptibles de prolonger l'intervalle QT. | 11 |
| Tableau II. Localisation et fonction des protéines interagissant avec hERG. | 16 |
| Tableau III. La mesure du signal <i>rGFP</i> est suffisante pour donner un indice fiable de la viabilité cellulaire. | 57 |
| Tableau IV. Vue d'ensemble des résultats générés à l'aide du biosenseur HERG-BRET pour 25 composés. | 85 |
| Tableau V. Comparaison des profils de 25 composés avec HERG-BRET, <i>hERG-Lite</i> ® et <i>patch-clamp</i> | 86 |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1. Propagation du courant de conduction dans les tissus cardiaques. | 1 |
| Figure 2. Implications des canaux ioniques dans le potentiel d'action. | 2 |
| Figure 3. Électrocardiogramme et corrélation avec le volume ventriculaire. | 3 |
| Figure 4. Prolongation de l'intervalle QT par l'inhibition de Kv11.1. | 6 |
| Figure 5. Structure de la protéine membranaire hERG. | 14 |
| Figure 6. Les différents états d'activation de Kv11.1. | 17 |
| Figure 7. Le pore de Kv11.1 doit être ouvert pour que les inhibiteurs fonctionnels s'y lient. | 21 |
| Figure 8. Principe de la technologie BRET. | 28 |
| Figure 9. Détection de l'expression membranaire de hERG- <i>rLuc</i> lorsque la translocation de cette protéine est permise. | 33 |
| Figure 10. Détection de la rétention de hERG- <i>rLuc</i> dans le ER lorsque la translocation de cette protéine est inhibée. | 33 |
| Figure 11. Effets des inhibiteurs de Kv11.1 dans le modèle HERG-BRET. | 34 |
| Figure 12. Représentation des trois sites potentiels d'insertion de <i>rLuc</i> au sein de la sous unité protéique hERG. | 35 |
| Figure 13. Site d'insertion du <i>tag</i> HA au sein de hERG. | 36 |
| Figure 14. Position de la mutation G601S au sein de hERG. | 36 |
| Figure 15. Représentation schématique de la banque de plasmides générés pour les essais préliminaires du développement du biosenseur HERG-BRET. | 37 |
| Figure 16. Le site d'insertion Nter ne permet pas d'observer de fluctuation d'expression membranaire de hERG malgré une exposition à de puissants chaperons. | 48 |
| Figure 17. Le site d'insertion S1 permet d'observer d'importantes fluctuations d'expression membranaire de hERG suite à une exposition à de puissants chaperons. | 49 |
| Figure 18. L'effet chaperon des inhibiteurs fonctionnels peut être observé tant pour la protéine atteinte de la mutation G601S que pour celle qui en est exempte. | 50 |
| Figure 19. La fenêtre dynamique d'interaction est plus grande lorsque la protéine hERG- <i>rLuc</i> possède l'étiquette HA. | 52 |
| Figure 20. La construction hERG- <i>rLuc</i> (HA/S1) permet aussi la détection des inhibiteurs de translocation. | 52 |
| Figure 21. Le transfert du gène codant pour hERG- <i>rLuc</i> (HA/S1) dans le vecteur pIRES n'affecte pas l'expression de la protéine. | 53 |

| | |
|---|----|
| Figure 22. Le tri de la population cellulaire a permis de sélectionner 4 sous-populations stables exprimant hERG-rLuc (HA/S1) et rGFP-CAAX à des niveaux variés. | 54 |
| Figure 23. La sous-population exprimant le plus fortement hERG-rLuc (HA/S1) et rGFP-CAAX permet une meilleure fenêtre d'interaction comparativement aux autres. | 55 |
| Figure 24. Relation entre les comptes rGFP et la densité cellulaire. | 58 |
| Figure 25. Comportement du biosenseur HERG-BRET lors d'une exposition à l'acétaminophène (témoin). | 59 |
| Figure 26. Aucune tendance ne peut être observée quant à l'effet de l'amiodarone sur hERG. | 60 |
| Figure 27. L'amsacrine agit comme chaperon pharmacologique envers hERG. | 61 |
| Figure 28. L'astemizole agit comme chaperon pharmacologique envers hERG. | 62 |
| Figure 29. Le bepridil agit comme chaperon pharmacologique envers hERG. | 63 |
| Figure 30. Aucune tendance ne peut être observée quant à l'effet de la chlorpromazine sur hERG. | 64 |
| Figure 31. Le cisapride agit comme chaperon pharmacologique envers hERG. | 65 |
| Figure 32. Le clofilium agit comme chaperon pharmacologique envers hERG. | 66 |
| Figure 33. La desipramine semble inhiber le trafic de hERG. | 67 |
| Figure 34. Le diltiazem semble inhiber le trafic de hERG. | 68 |
| Figure 35. Le domperidone agit comme chaperon pharmacologique envers hERG. | 69 |
| Figure 36. Aucune tendance ne peut être observée quant à l'effet du droperidol sur hERG. | 70 |
| Figure 37. Le E4031 agit comme chaperon pharmacologique envers hERG. | 71 |
| Figure 38. L'acide éthacrynique semble inhiber le trafic de hERG. | 72 |
| Figure 39. Le fluspirilene agit comme chaperon pharmacologique envers hERG. | 73 |
| Figure 40. L'halopéridol agit comme chaperon pharmacologique envers hERG à de faibles doses et comme inhibiteur de trafic à de fortes doses. | 74 |
| Figure 41. Aucune tendance ne peut être observée quant à l'effet de l'ivermectin sur hERG. | 75 |
| Figure 42. Aucune tendance ne peut être observée quant à l'effet du ketanserine sur hERG. | 76 |
| Figure 43. La papavérine semble inhiber le trafic de hERG. | 77 |
| Figure 44. La pentamidine agit comme chaperon pharmacologique envers hERG. | 78 |
| Figure 45. Le pimozide agit comme chaperon pharmacologique envers hERG. | 79 |
| Figure 46. Aucune tendance ne peut être observée quant à l'effet du prazosin sur hERG. | 80 |
| Figure 47. La quinidine agit comme chaperon pharmacologique envers hERG. | 81 |
| Figure 48. Aucune tendance ne peut être observée quant à l'effet de la terfenadine sur hERG. | 82 |
| Figure 49. Aucune tendance ne peut être observée quant à l'effet du verapamil sur hERG. | 83 |

Figure 50. La vinpocetine agit comme chaperon pharmacologique envers hERG. 84

Figure 51. Représentation schématique du donneur et de l'accepteur d'énergie exprimés de façon stable dans le modèle HERG-BRET. 4

Liste des sigles et abréviations

Ab : anticorps

APD : durée du potentiel d'action

AV : atrio-ventriculaire

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

Bpm : battements par minute

BRET : transfert d'énergie de résonance de bioluminescence

BSA : albumine sérique bovine

CaCl₂ : chlorure de calcium

CNBD : domaine de liaison aux nucléotides cycliques

CNG : canaux potassiques régulés par les nucléotides cycliques

CO₂ : dioxyde de carbone

DBC : coelenterazine 400A, aussi appelée *Deep Blue C*.

DMEM : milieu *eagle* modifié de Dulbecco

DMSO : diméthylsulfoxyde

EC₅₀ : concentration permettant 50% d'efficacité

ECG : électrocardiogramme

ER : réticulum endoplasmique

FACS : trieur cellulaire (*Fluorescence Activated Cell Sorter*)

FBS : sérum bovin fœtal

GFP : protéine verte fluorescente

HA : hémagglutinine

HCN : canaux activés par l'hyperpolarisation

HEK 293 : cellules embryonnaires de rein humain.

HERG : *human ether-a-go-go related gene*

HERG-rLuc : nom donné au donneur d'énergie utilisé dans la méthode présentée. Il consiste en une protéine fusion entre *hERG* et *rLuc*.

Hyg^R : gène de résistance à l'hygromycine

IC₅₀ : concentration permettant 50% d'inhibition

ICH : *International Conference on Harmonization of Technical Requirements of Pharmaceuticals for Human Use*.

I_{Kr} : courant K⁺ de repolarisation tardive

K⁺ : ion potassique

KCNH2 : gène codant pour la protéine hERG.

KCNH2 : ARNm codant pour la protéine hERG.

KRas : GTPase impliquée dans plusieurs cancers

Na⁺ : ion sodique

Nter : extrémité amino-terminale (N-terminale)

PAS : domaine Per-Arnt-Sim

PBS : tampon phosphate

PEI : polyéthylèneimine

PM : membrane plasmique

PORN : poly-ornithine

P/S : pénicilline/streptomycine

Rb⁺ : ion rubidium

RGFP : protéine verte fluorescente avec un motif provenant de *Renilla reniformis*

RGFP-CAAX : nom donné à l'accepteur d'énergie utilisé dans la méthode présentée. Il est ancré à la PM par un domaine polybasique de *kRas* et un domaine de prénylation.

RLuc : luciférase de *Renilla reniformis*

S1 : nom donné au site d'insertion de *rLuc* dans la séquence de hERG près du premier passage transmembranaire.

S2S3 : nom donné au site d'insertion de *rLuc* dans la séquence de hERG entre le deuxième et le troisième passage transmembranaire.

SA : sino-atrial

TdP : torsade de Pointes

TGI : tractus gastro-intestinal

VGK : canaux potassiques régulés par le voltage

VIH1 : virus d'immunodéficience humaine 1

VSD : domaine senseur de voltage

YFP : protéine jaune fluorescente

Remerciements

Je désire remercier spécialement messieurs Denis deBlois et Michel Bouvier, respectivement directeur et co-directeur de recherche, pour l'opportunité qu'ils m'ont donné de travailler à leur côté sur ce projet de maîtrise. Leur professionnalisme, leur patience ainsi que l'encadrement qu'ils m'ont offert ont grandement contribué à mon apprentissage et à mon développement professionnel.

Merci à Grégoire Leclair qui a été un excellent conseiller tout au long de mon cheminement et aux membres de la Plateforme de biopharmacie pour leur accompagnement et leur support. Merci à Marc Servant qui m'a également encadré avec respect et intérêt. Merci à Florence Dô pour son soutien tant technique que moral et sa grande délicatesse. Je remercie également Jacques Turgeon qui nous a généreusement offert les constructions plasmidiques initiales. Merci aussi à tous ceux qui se reconnaîtront par « *les amis du 4^e étage* » pour leur enthousiasme et leur encouragement. Merci à Christian Le Gouill qui m'a tellement appris sur le BRET et à Mireille Hogue pour ses conseils, son aide et son écoute. Merci à l'équipe du laboratoire de Michel Bouvier pour le respect partagé et les moments vécus ensemble. Merci à Stéphane Laporte pour la permission d'utiliser le couple donneur/accepteur d'énergie présenté dans mon projet de maîtrise.

Merci au groupe de recherche universitaire sur le médicament (GRUM) qui m'a permis d'obtenir une bourse de recrutement en début de maîtrise. Merci à la faculté de pharmacie pour la bourse de rédaction qui m'a été décernée en fin de parcours.

Merci à ma femme et meilleure amie pour son soutien continu et son affection inconditionnelle.

1. Introduction

1.1 L'activité électrique du cœur

La contraction du cœur est la force qui permet d'assurer la circulation du sang jusqu'aux membres les plus en périphérie de l'organisme. Elle est initiée par l'activité électrique des cellules *pacemaker* du nœud sino-atrial (SA) qui amorcent un courant de conduction. Celui-ci se propage dans l'oreillette vers le nœud atrio-ventriculaire (AV), puis est transporté par des fibres conductrices (His et Purkinje) jusqu'aux cardiomyocytes, cellules musculaires du cœur, pour initier leur activité mécanique. Il existe un délai entre deux initiations du courant de conduction au nœud SA pour permettre aux cardiomyocytes de se décontracter avant de procéder à une prochaine contraction. [1]

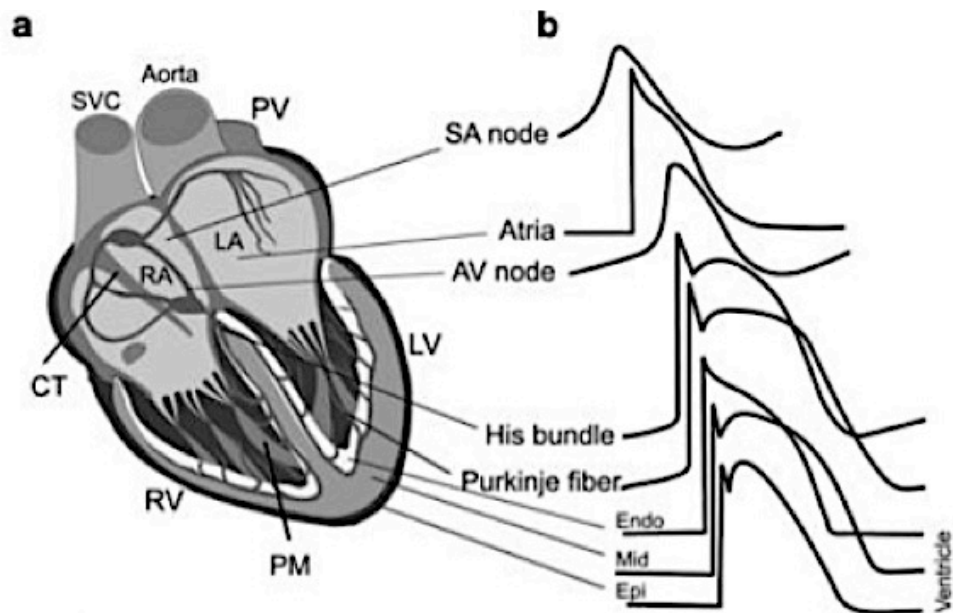


Figure 1. Propagation du courant de conduction dans les tissus cardiaques.

En **a** : les tissus cardiaques. SVC, veine cave supérieure; PV, veine pulmonaire; CT, crista terminalis; RA, oreillette droite; LA, oreillette gauche; RV, ventricule droit; LV, ventricule gauche; Endo, endocarde; Mid, myocarde; Epi, épicarde; PM, muscles papillaires. En **b** : les variations du potentiel d'action dans les tissus cardiaques au cours de la propagation du courant de conduction du nœud SA jusqu'à l'épicarde (Adaptation d'une figure de *Tripathi*). [1]

Le potentiel d'action des cardiomyocytes est divisé en cinq phases influencées par l'activité de plusieurs canaux ioniques. La phase 0 se caractérise par une dépolarisation rapide de la membrane, les phases 1, 2 et 3 font partie de l'étape de repolarisation et la phase 4 est caractérisée par un retour à l'état de repos.

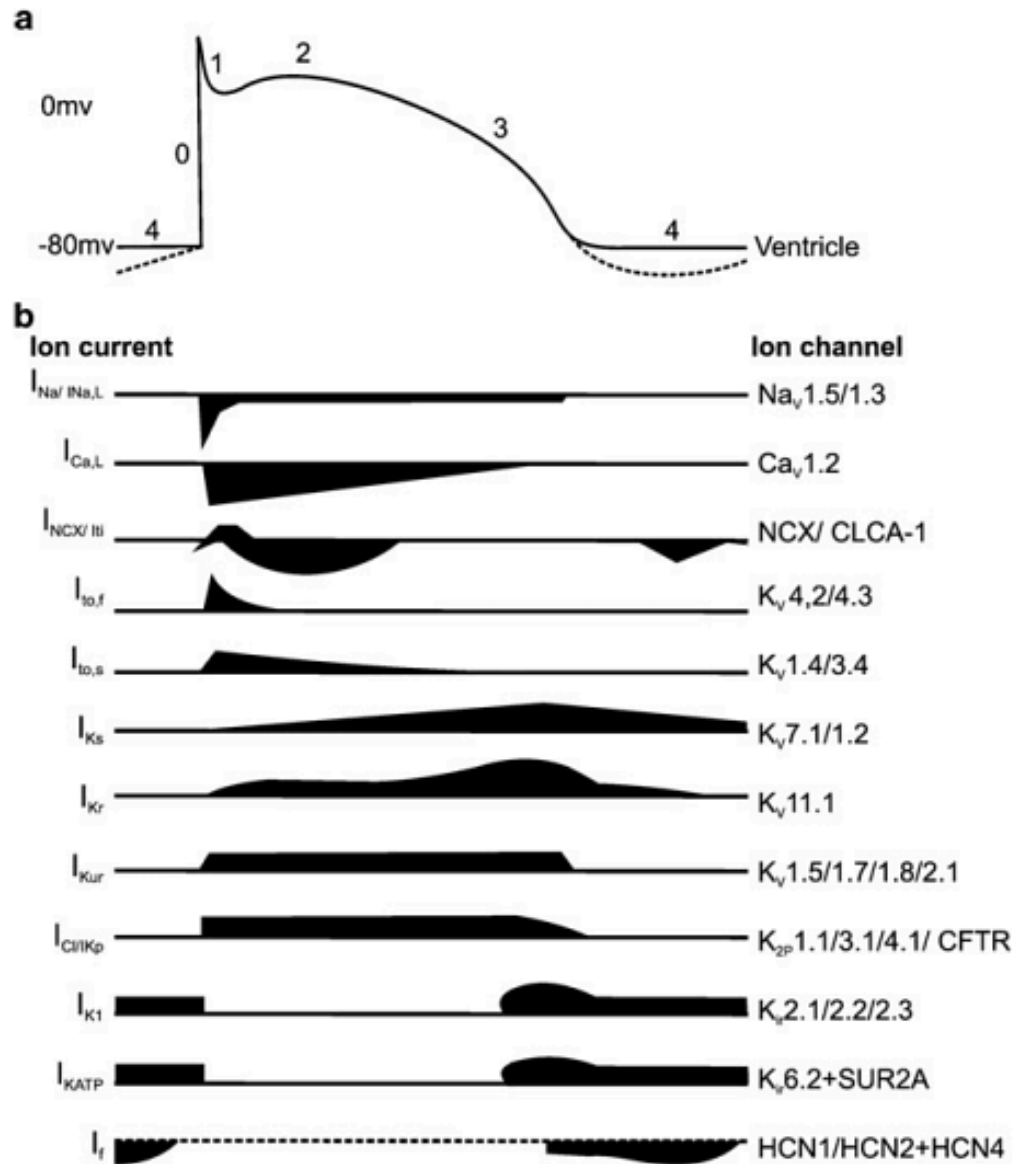


Figure 2. Implications des canaux ioniques dans le potentiel d'action.

En **a**, le potentiel d'action et ses 5 phases (0 à 4). En **b**, la contribution des canaux ioniques à la variation du potentiel d'action. Les déflections sous la droite signifient un mouvement des ions vers l'intérieur de la cellule, alors que celles au dessus de la droite signifient un mouvement vers l'extérieur. [1]

Lors de la phase 0, les canaux sodiques sont ouverts et laissent passer des ions sodium (Na^+) vers le milieu intracellulaire. Ensuite, lors de la phase 1, les canaux sodiques se ferment et les canaux potassiques s'ouvrent pour laisser sortir des ions potassium (K^+) dans le milieu extracellulaire. La phase 2 est caractérisée par un plateau résultant de l'équilibre entre la sortie des ions K^+ et l'entrée d'ions calcium (Ca^{2+}) par les canaux calciques de type L. En phase 3, les canaux potassiques à rectification retardée permettent au potentiel membranaire de diminuer considérablement pour éventuellement atteindre l'état de repos, en phase 4, qui est maintenu par un courant K^+ entrant.[2]

Les variations du potentiel d'action se manifestent à l'électrocardiogramme (ECG) par des ondes distinctes auxquelles on associe également des points marquants du cycle contraction/relaxation. L'onde P représente la dépolarisation de l'oreillette droite, le complexe QRS reflète la dépolarisation des myocytes ventriculaires et l'onde T représente leur repolarisation. L'intervalle QT reflète donc un cycle de contraction (systole) / relaxation (diastole) ventriculaire. L'onde T est souvent suivie d'une onde U qui, pour l'instant, n'est pas bien caractérisée.[1]

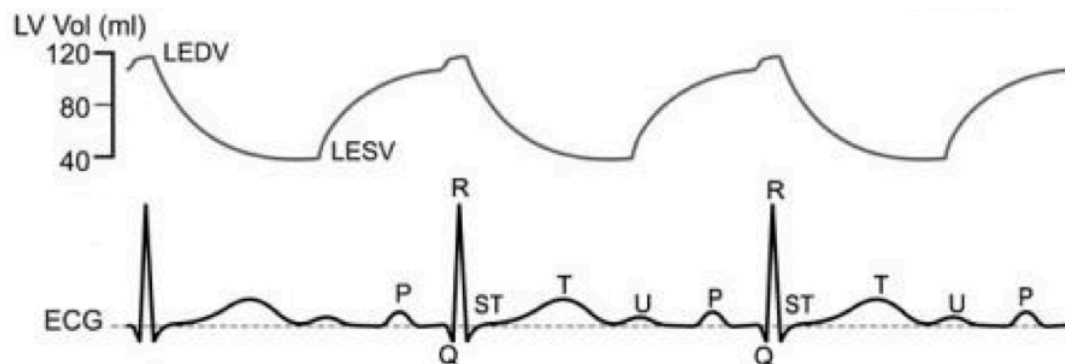


Figure 3. Électrocardiogramme et corrélation avec le volume ventriculaire.

Dans la partie inférieure, un ECG typique avec ses ondes P, Q, R, S, T et U. L'indication ST signifie la fin de l'onde S et le début de l'onde T. Dans la partie supérieure, le volume sanguin du ventricule gauche (LV Vol) est un indice de son activité mécanique. Lors de la contraction le volume est réduit et il augmente lors de la relaxation. LEDV, Volume de fin de diastole du ventricule gauche; LESV, Volume de fin de systole du ventricule gauche.[1]

1.2 Les arythmies

La fréquence à laquelle les cycles de contraction/relaxation, ou battements, sont répétés permet de caractériser le rythme cardiaque. À l'état de repos, il varie d'un individu à un autre entre 60 et 100 battements par minute (bpm). Les arythmies sont caractérisées par des anomalies de l'électrophysiologie des tissus cardiaques ayant des répercussions sur le cycle contraction/relaxation des cardiomyocytes. [3]

1.2.1 Les formes d'arythmies

Lorsque la formation ou la propagation du potentiel d'action est entravée, le rythme cardiaque est ralenti. La condition médicale pour laquelle le rythme cardiaque au repos est inférieur à 60 bpm se nomme bradycardie. Dans d'autres cas d'arythmies, le rythme cardiaque au repos se voit être accéléré au delà de 100 bpm. On parle alors de tachycardie. Ces deux types d'arythmies peuvent être causés par des problèmes provenant du nœud SA, des oreillettes, du nœud AV et des ventricules. Plusieurs facteurs peuvent être à l'origine d'arythmies cardiaques. Certains sont intrinsèques, comme la perte d'automaticité des cellules *pacemaker* causée par le vieillissement, les cardiomyopathies et certains facteurs génétiques. D'autres sont extrinsèques au fonctionnement du cœur, comme le déséquilibre en électrolytes, l'hyperthyroïdie et même l'usage de médicaments.[3]

1.2.2 Les médicaments anti-arythmiques

Les médicaments anti-arythmiques constituent un moyen efficace et non invasif de traiter les arythmies. La plupart de ces drogues ciblent des canaux ioniques afin d'altérer l'excitabilité et la conductibilité des tissus cardiaques.[4] En 1970, Vaughan Williams a établi une classification pour les médicaments anti-arythmiques selon leur mécanisme d'action.[5] Il les sépare en quatre grandes classes que l'on nomme *classe I*, *II*, *III* et *IV*. L'effet principal des composés de *classe I* est le blocage de canaux sodiques. Ceci a pour effet de réduire la vitesse de dépolarisation en phase 0. Les médicaments de *classe I* peuvent également être divisés en sous-classes en fonction de l'impact de leur effet sur la durée du potentiel d'action (APD). Ceux de la *classe Ia* prolonge l'APD, ceux de la *classe Ib* le raccourcissent et ceux de la *classe Ic* ne l'influencent pas.[4] Les médicaments de *classe II*, quant à eux,

bloquent les récepteurs β -adrénergiques et réduisent ainsi l'activité du nœud SA [3, 4]. Ceux de *classe III* bloquent les canaux potassiques de repolarisation retardée en phase 3, comme le Kv11.1, et prolongent l'APD. Pour ce qui est des médicaments de la *classe IV*, ils bloquent les canaux calciques, impliqués dans la phase 2 de repolarisation.

Il faut toutefois noter que ce système de classification n'est pas infaillible. En effet, d'autres mécanismes d'actions, comme le blocage des récepteurs α -adrénergiques ou l'activation de récepteurs cholinergiques, peuvent induire une modification du rythme cardiaque. De plus, certains médicaments peuvent agir sur plus d'un type de récepteurs/canaux à la fois et pourraient donc être associés à plus d'une classe.[4] En réalité, le canal Kv11.1, qui est une cible des médicaments de classe *III*, est aussi une *cible secondaire* pour de nombreux médicaments anti-arythmiques des classes *I*, *II* et *IV*, ce qui peut occasionner une confusion lors de la classification. On sait aussi maintenant que Kv11.1 a une grande susceptibilité envers de nombreux médicaments non anti-arythmiques, *i.e.* dont l'usage vise une condition médicale non reliée au rythme cardiaque. [5] Cette susceptibilité peut causer l'apparition d'effets secondaires arythmiques chez des patients non cardiaques.

1.3 L'effet arythmogène causé par l'inhibition de Kv11.1

Comme Kv11.1 exerce un rôle important dans le rythme cardiaque, l'altération de sa fonction est susceptible de causer une arythmie, à moins d'observer un effet compensatoire par d'autres canaux ioniques. En effet, l'inhibition de Kv11.1 prolonge la durée globale du potentiel d'action, ce qui se traduit à l'ECG par une prolongation de l'intervalle QT. Cette inhibition peut être bénéfique lors du traitement d'un patient atteint d'une arythmie causée par un intervalle QT court, mais elle peut également être fatale lorsqu'elle est à l'origine d'effets secondaires associés à la prise de médicaments chez un patient sain. En effet, la prolongation de l'intervalle QT retarde la relaxation complète des cardiomyocytes et peut causer des contractions ventriculaires prématurées. Le maintien de cette condition mène dans certains cas à un type d'arythmie parfois fatal nommé Torsade de Pointe (TdP). [6]

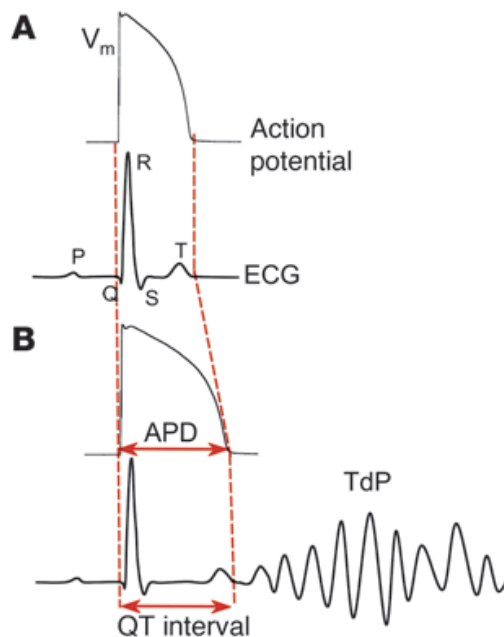


Figure 4. Prolongation de l'intervalle QT par l'inhibition de Kv11.1.

En (A), l'étendu de l'intervalle QT corrèle avec la durée du potentiel d'action (APD). En (B), l'inhibition de Kv11.1 occasionne une prolongation de l'APD qui se traduit par une expansion de l'intervalle QT. Cet effet néfaste rend le patient atteint susceptible à des arythmies ventriculaires pouvant être fatales, telle que la TdP. [6]

Cet effet est suffisamment sérieux pour avoir entraîné le retrait du marché de plusieurs drogues non anti-arythmiques depuis les années 90s.[7] De nos jours, les agences réglementaires exigent que toute nouvelle molécule au potentiel thérapeutique soit systématiquement évaluée dans le but d'écarter dès le stade préclinique celles qui montrent un potentiel d'interaction avec Kv11.1. En effet, la direction générale des produits de santé et des aliments de Santé Canada a émis une ligne directrice à l'intention de l'industrie concernant le danger de prolongation de l'intervalle QT associé à la prise de médicaments. Cette ligne directrice a été élaborée par l'ICH (*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements of Pharmaceuticals for Human Use*), thème S7B, puis adoptée par Santé Canada en avril 2006.[2] Cette exigence réglementaire sera abordée plus en détail à la *section 1.9*.

1.4 Quelques cas importants

Depuis la parution de publications suggérant l'implication de Kv11.1 dans les effets secondaires arythmiques associés à la prise de médicaments, de nombreux composés pharmaceutiques de classes thérapeutiques différentes et de structures variées font l'objet de restrictions sévères en clinique et certains ont même été retirés du marché.[5] Un recensement détaillé des avis émis par Santé Canada à l'égard du risque d'allongement de l'onde QT sera présenté à la section 1.5, mais voici d'abord quelques cas marquants dans la découverte de cet effet secondaire.

1.4.1 Thioridazine : l'élément déclencheur

Le premier médicament ayant été associé à des effets secondaires arythmiques, mais dont l'usage premier ne vise pas la correction du rythme cardiaque, est la thioridazine, commercialisée sous le nom MELLARIL® en 1959 [8]. En effet, une publication parue en 1966 rapporte que ce médicament antipsychotique est à l'origine de cas de tachycardie ventriculaire.[9] Toutefois, à cette époque, les mécanismes moléculaires en cause n'étaient pas encore connus. Entre 2000 et 2005, trois cas de décès associés à la prise de ce médicament ont été rapportés. Suite à ces événements, Santé Canada a émis un avis d'arrêt de vente de la thioridazine. [8]

1.4.2 Terfenadine : un cas de retrait du marché

Un exemple américain important de retrait du marché est celui de la terfenadine. Cet agent antihistaminique, utilisé pour soulager les symptômes d'allergies, est métabolisé par le cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) pour libérer l'agent actif : la fexofenadine. Le SELDANE®, nom commercial de la terfenadine, est paru sur les tablettes en 1983 et a été utilisé par 100 millions de personnes en l'espace de 10 ans. Toutefois, un avis a été émis en 1993 pour signaler à la population un risque cardiotoxique relié à la prise de ce médicament, particulièrement lorsqu'il est pris en concomitance avec des agents connus pour inhiber la biotransformation hépatique. En effet, dans la plupart des cas, la terfenadine ne présente que très peu de risque puisque le CYP3A4 la transforme en fexofenadine, la rendant ainsi presque indétectable en circulation. Toutefois, lorsque le métabolisme hépatique est inhibé,

par la consommation de jus de pamplemousse ou l'administration d'autres drogues métabolisées par le même cytochrome, les concentrations plasmatiques de terfenadine augmentent à des niveaux pouvant être dangereux. Malgré cet avis, le SELDANE® a conservé son titre d'antihistaminique le plus utilisé jusqu'en 1996. Un an plus tard, une formulation de fexofenadine a été commercialisée, diminuant ainsi le risque cardiotoxique, tout en conservant le même principe actif. Puis, en 1998, le SELDANE® a été retiré du marché puisqu'il existait des alternatives beaucoup plus sécuritaires pour le traitement des allergies saisonnières, une condition pour laquelle les risques n'en valaient pas la peine. [5, 10]

1.4.3 Verapamil : un cas d'effet compensatoire

Il faut noter que dans certains cas, un médicament peut occasionner une inhibition de Kv11.1, mais aussi un effet compensatoire via l'interaction avec d'autres canaux ioniques. Un exemple de ce type de cas est celui du verapamil qui bloque le Kv11.1, mais qui inhibe également les canaux calciques de type L, ce qui réduit le courant de dépolarisation. Au global, l'intervalle QT demeure inchangé lors de la prise de ce médicament. [5, 11, 12]

1.5 Médicaments à risque

Les causes les plus communes de retrait de médicaments du marché canadien sont la toxicité hépatique et les événements cardiovasculaires. [7] Le tableau présenté à la page suivante contient une liste des médicaments ayant fait l'objet d'avis de sécurité émis par Santé Canada relativement au risque d'allongement de l'intervalle QT. L'ordre de présentation des médicaments dans le tableau correspond à l'ordre chronologique de parution de l'avis concerné. Certains d'entre eux ont été retirés du marché, tandis que d'autres font l'objet de recommandations sévères à l'égard des professionnels de la santé pour assurer un suivi sécuritaire de leurs patients. Il faut noter que les avis retenus pour ce recensement ne spécifiaient pas le mécanisme biologique en cause derrière le risque de prolongation de l'onde QT. Les cas rapportés ne sont donc pas automatiquement reliés au canal Kv11.1. Toutefois, ils permettent de réaliser le besoin important d'évaluer au stade préclinique l'influence d'une molécule sur le système cardiovasculaire.

Les informations contenues dans ce tableau proviennent toutes de la base de données de Santé Canada concernant les rappels et avis de sécurité. De nombreux avis relatant des effets indésirables cardiovasculaires ont été identifiés, mais **seuls les avis spécifiant le risque d'allongement de l'intervalle QT ont été retenus**. Les avis relatifs au SENSIPAR® et au XGEVA®, font mention d'un allongement de l'onde QT par l'induction d'une hypocalcémie.[13, 14] Leur effet indésirable n'est donc pas relié au canal Kv11.1, mais ces médicaments ont tout de même été retenus dans ce recensement puisque les avis qui les concernent recommandaient aux professionnels de la santé de surveiller de près les patients présentant un allongement congénital ou documenté de long QT. L'allongement congénital de l'intervalle QT sera discuté à la *section 1.7*. Aussi, un avis de sécurité concernant le RASILEZ® mentionnait des effets néfastes cardiovasculaires causés par l'induction d'hyperkaliémie, ce qui laisse supposer une implication indirecte de Kv11.1, mais cet avis a été discriminé puisqu'il ne contenait aucune mention de ce canal ou de l'allongement de l'onde QT.[15]

Tableau I. Avis émis par Santé Canada concernant les médicaments susceptibles de prolonger l'intervalle QT.

| NOM COMMERCIAL & NOM GÉNÉRIQUE | INDICATION PRINCIPALE | ANNÉE DE L'AVIS | DÉTAILS SUR L'AVIS ÉMIS PAR SANTÉ CANADA |
|--------------------------------------|-----------------------------|-----------------|--|
| SERENTIL® (Bésylate de mésoridazine) | Troubles psychotiques | 2000 | Limitation à un usage de dernier recours. Usage contre-indiqué avec d'autres médicaments connus pour prolonger le QT et chez les patients souffrant de long QT congénital ou avec des antécédents d'arythmies cardiaques. [16] |
| PREPULSID® (Cisapride) | Troubles de motilité du TGI | 2000 | Retrait du marché en 2000 [17] |
| ZOLOFT® (Sertraline) | Dépression | 2003 | L'usage concomitant de la sertraline et du pimozide (ORAP®) est contre-indiqué : la sertraline augmente la concentration plasmatique de pimozide, ce qui peut entraîner un allongement de l'intervalle QT. [18] |
| MELLARIL® (Thioridazine) | Troubles psychotiques | 2005 | Retrait du marché en 2005 [8] |
| PAXIL® (Paroxétine) | Dépression | 2005 | L'usage concomitant de la paroxétine et du pimozide (ORAP®) est contre-indiqué : la paroxétine augmente la concentration plasmatique de pimozide, ce qui peut entraîner un allongement de l'intervalle QT. [19] |
| DARVON-N® (Dextropropoxyphène) | Douleurs légères à modérées | 2010 | Retrait du marché en 2010. À des doses thérapeutiques, ce médicament peut prolonger de manière importante l'intervalle PR, élargir le complexe QRS, allonger l'intervalle QT et ainsi augmenter le risque d'arythmies cardiaques. [20] |
| INVIRASE® (Mésylate de saquinavir) | VIH1 | 2010 | Recommandation d'effectuer des ECG de suivi chez les patients traités par INVIRASE potentialisé par le ritonavir. [21] |
| SANDOZ DROPERIDOL® (Dropéridol) | Nausées | 2010 | Usage de dernier recours limité au milieu hospitalier. Contre-indiqué chez les patients atteints d'une prolongation connue ou présumée de l'intervalle QT. [22] |
| STRATTERA® (Atomoxétine) | TDAH | 2011 | Possibilité d'augmentation de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque. Prescrire avec prudence et suivre les patients de près.* [23] |
| ANZEMET® (Mésylate de dolasétron) | Nausées | 2011 | Retrait de la solution injectable en 2011. L'usage des comprimés selon les conditions décrites dans la monographie est toujours permise, mais à éviter chez les patients insuffisants rénaux ou à risque d'arythmies. [24] |
| ZOFRAN® (Ondansétron) | Nausées | 2012 | Allongement dose-dépendant de l'intervalle QT. Des restrictions sont émises par Santé Canada pour l'administration de ce produit pharmaceutique. [25] |
| XGEVA® (Denosumab) | Métastases osseuses | 2012 | Allongement de l'intervalle QT par induction d'hypocalcémie. De nombreux autres effets secondaires graves ont été observés. Les médecins doivent chercher les facteurs de risques d'hypocalcémie et monitorer le taux sérique de calcium des patients traités au denosumab. [14] |

| NOM COMMERCIAL & NOM GÉNÉRIQUE | INDICATION PRINCIPALE | ANNÉE DE L'AVIS | DÉTAILS SUR L'AVIS ÉMIS PAR SANTÉ CANADA |
|------------------------------------|----------------------------------|-----------------|---|
| CELEXA® (Citalopram) | Dépression | 2012 | Allongement dose-dépendant de l'intervalle QT. [26] |
| CAPRELSA® (Vandétanib) | Cancer médullaire de la thyroïde | 2012 | Risque sérieux d'allongement de l'intervalle QT, de TdP et de mort subite. L'accès à ce médicament est limité au Programme de distribution restreinte. Seuls les médecins inscrits sont autorisés à prescrire le vandétanib suite à une formation sur la sélection et le suivi des patients. [27] |
| CIPRALEX® (Escitalopram) | Dépression | 2012 | Allongement dose-dépendant de l'intervalle QT. À éviter chez les patients atteints du syndrome de long QT congénital ou traités avec des médicaments qui allongent l'intervalle QT ou diminuent les concentrations en électrolytes. [28] |
| SENSIPAR® (Cinacalcet) | Hyperparathyroïdie secondaire | 2013 | Allongement de l'intervalle QT par induction d'hypocalcémie. Prescrire avec prudence et suivre les patients de près.* [13] |
| ZITHROMAX® (Azithromycine) | Infection bactérienne | 2013 | Des cas d'allongement du QT ont été identifiés à des doses thérapeutiques. Prescrire avec prudence et suivre les patients de près.* [29] |
| REMERON® (Mirtazapine) | Dépression | 2014 | La plupart des cas de long QT ont été observés suite à une surdose ou chez des patients présentant d'autres facteurs de risque d'allongement de l'intervalle QT. Prescrire avec prudence et suivre les patients de près.* [30] |
| MOTILIUM® (Maléate de Domperidone) | Troubles de motilité du TGI | 2015 | L'administration de domperidone est contre-indiquée chez les patients atteints d'un long QT congénital, de troubles électrolytiques, d'insuffisance cardiaque, d'insuffisance hépatique ou prenant des agents prolongeant l'intervalle QT et des inhibiteurs puissants du CYP3A4. [31] |

* **Prescrire avec prudence et suivre les patients de près** s'ils présentent un allongement congénital ou documenté de long QT, un déséquilibre électrolytique, s'ils souffrent d'arythmie ou d'insuffisance cardiaque d'importance clinique ou s'ils sont traités avec des anti-arythmiques de classe IA ou III, des antipsychotique, des antidépresseurs ou des fluoroquinolones.

À noter que deux des médicaments listés dans le *Tableau 1* ont été approuvés par Santé Canada après 2006 (année d'entrée en vigueur de la ligne directrice à l'intention de l'industrie). Le premier est le CAPRELSA® pour lequel Santé Canada a remis une déclaration de conformité à la compagnie Astra Zeneca en 2012. [32] Le second est le XGEVA®, pour lequel Santé Canada a remis une déclaration de conformité à la compagnie Amgen Canada Inc. en 2011. [33]

1.6 La sous-unité protéique hERG

Tel que mentionné précédemment, le canal Kv11.1 est important pour le maintien de l'intégrité de l'électrophysiologie des cardiomyocytes. Sa susceptibilité à interagir avec de nombreuses molécules aux structures et aux fonctions variées a attiré l'attention de nombreux chercheurs au cours des vingt-cinq dernières années. Plusieurs contributions ont permis d'en savoir davantage sur la structure du canal et de ses sous-unités, sur son assemblage et son trafic vésiculaire, ainsi que sur sa fonction dans le maintien du rythme cardiaque.

La protéine hERG, principalement exprimée par les cardiomyocytes, constitue une sous-unité du canal potassique Kv11.1. Plusieurs appellations peuvent être utilisées pour désigner cette protéine, dépendamment de son stade de maturation. Dans cet ouvrage, la nomenclature utilisée est tirée d'un article de *review* écrit par Jamie I. Vandenberg *et al* publié dans *Physiological Review* par le *American Physiological Society*. *KCNH2*, le nom officiel, sera utilisé pour désigner le gène et *KCNH2* pour identifier l'ARNm. L'appellation hERG servira à désigner la sous-unité protéique, tandis que le canal complètement assemblé sera appelé Kv11.1. L'acronyme hERG signifie **human Ether a-go-go Related Gene**. Ce nom a initialement été attribué à la protéine puisqu'elle est l'orthologue humain d'un canal potassique encodé par le *ether a-go-go related gene* que l'on retrouve chez la drosophile. Kaplan et Trout, en 1969, ont nommé ce canal ainsi puisqu'il était relié aux mouvements des pattes des drosophiles, lors de l'anesthésie à l'éther, qui ressemblaient à ceux des danseurs de boîtes à gogo. [5]

À noter que hERG et ses isoformes sont aussi exprimés dans d'autres tissus comme l'hippocampe [34], certains tissus musculaires lisses du système digestif [35, 36], les cellules β des îlots pancréatiques [37] et même dans certains cancers [38-40]. C'est toutefois seulement son expression par les cardiomyocytes qui est traitée dans le présent travail.

1.6.1 La structure de hERG

HERG possède six passages transmembranaires (S1-S6), dont les quatre premiers (S1-S4) constituent le domaine senseur de voltage (VSD) et contribuent à la perception des variations de potentiels membranaires. Les deux derniers (S5-S6), quant à eux, font partie du pore du canal Kv11.1 lorsqu'il est assemblé. [5] Comme hERG possède un nombre pair de passage transmembranaire, les régions C-terminale et N-terminale se situent du même côté de la membrane, soit du côté cytoplasmique. De plus, ce canal ionique partage des propriétés avec les canaux potassiques régulés par le voltage (VGK), ceux régulés par les nucléotides cycliques (CNG) et ceux activés par l'hyperpolarisation (HCN). En effet, la région N-terminale de hERG possède un domaine Per-Arnt-Sim (PAS) typique des canaux VGK [41] et la région C-terminale renferme un domaine de liaison aux nucléotides cycliques (CNBD) aussi retrouvé chez les canaux CNG et les HCN. [42]

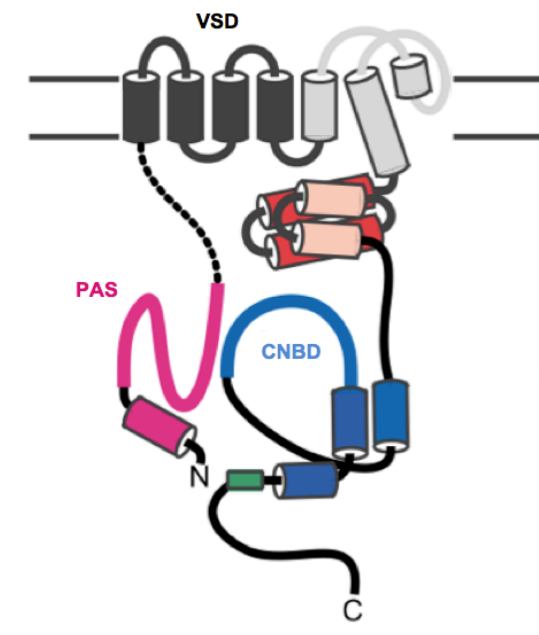


Figure 5. Structure de la protéine membranaire hERG.

Six régions de la protéine hERG traversent la membrane de part et d'autre. Les quatre premières forment le VSD et les deux dernières participent à la formation d'un pore lors de l'assemblage du canal Kv11.1. Le domaine PAS se situe dans la région N-terminale et le CNBD se trouve dans la région C-terminale (Adaptation d'une figure de *Brelidze*). [43]

1.6.2 L'assemblage et le transport vésiculaire de hERG

Pour exercer ses fonctions, le Kv11.1, formé de quatre sous-unités protéiques hERG, doit être assemblé et transporté jusqu'à la membrane plasmique (PM). Après la synthèse des sous-unités hERG, celles-ci tétramérisent dans le réticulum endoplasmique (ER) et chaque sous-unité subit une première glycosylation. Le complexe est ensuite transporté jusqu'à l'appareil de Golgi où plusieurs modifications post-traductionnelles ont lieu, dont une seconde glycosylation. Puis, le canal est finalement transporté jusqu'à la PM. Comme le démontre le *Tableau II*, à la page suivante, le transport vésiculaire de Kv11.1 fait intervenir plusieurs protéines aux rôles variés et peut être interrompu par le système de contrôle de qualité pour dégrader les complexes atteints de défauts conformationnels. [5]

À noter que le *Tableau II* fait mention de *protéines* agissant comme chaperon pharmacologique. Dans les prochaines sections, il sera plutôt question de *molécules pharmaceutiques* pouvant agir comme chaperon pharmacologique. Celles-ci ne font pas partie de l'environnement physiologique du canal Kv11.1, mais elles ont la propriété d'intervenir dans l'assemblage et le transport vésiculaire de hERG de façon directe (en s'y liant et en favorisant une conformation adéquate pour le transport vésiculaire) ou indirecte (en interagissant avec un autre acteur impliqué dans l'assemblage et le trafic).

Tableau II. Localisation et fonction des protéines interagissant avec hERG.

Plusieurs protéines sont impliquées dans le transport, l'internalisation, le recyclage, la régulation et la dégradation de hERG. (Extrait d'un tableau de *Vandenberg*). [5]

| Protein | Location | Function |
|--|--------------------------------|---|
| <i>Chaperones</i> | | |
| Hsp70 | Cytosolic | Promoter trafficking WT hERG, retain mutants |
| Hsc70 | Cytosolic | |
| Hsp90 | Cytosolic | Increase trafficking of WT hERG, retain mutants |
| Calnexin | ER membrane | Retention of misfolded hERG |
| Grp78 | ER membrane | ER stress/unfolded protein response |
| Grp94 | ER membrane | ER stress/unfolded protein response |
| Calreticulin | ER membrane | ER stress/unfolded protein response |
| Hsp-organizing protein | Cytosolic | |
| Sigma 1 receptor | ER membrane | Enhance hERG maturation and stability |
| Bag-2 | Cytosolic | Binds and inhibits Hsc70 ATPase domain |
| <i>Cochaperones</i> | | |
| DnaJA-1/2/4 | Cytosolic | Quality control, modulates hERG degradation |
| FKBP38 | ER membrane | Quality control, folding and export |
| KCNE1 | ER/plasma membrane | Modulates Kv11.1 current |
| KCNE2 | ER/plasma membrane | Modulates Kv11.1 current |
| KCNQ1 | ER/plasma membrane | Modulates Kv11.1 current |
| <i>ER export/endorosomal recycling</i> | | |
| Sar1 | ER, cytosolic, plasma membrane | Regulates ER export of hERG |
| Rab11B | ER, Golgi, plasma membrane | Golgi processing of hERG |
| <i>Ubiquitination/deubiquitinylation</i> | | |
| CHIP | ER membrane | Ubiquitinate chaperone bound hERG |
| Nedd4-2 | ER plasma membrane | Reduces cell surface expression of hERG |
| STAMBP | ER membrane | hERG endocytosis from plasma membrane |
| <i>Retrotranslocation</i> | | |
| Vps24 | MVBs | Accelerate degradation of mature hERG |
| Caveolin-1, -3 | plasma membrane, endosomes | Endocytosis of mature hERG |
| Dynamin-2 | Plasma membrane, endosomes | Endocytosis of mature hERG |
| <i>Others</i> | | |
| EDEM | ER membrane | Degradation of misfolded glycoprotein |
| ARHGAP6 | Cytosolic | Acts on PLC to reduce hERG current |
| GM130 (Golgin-95) | Golgi | Vesicle trafficking to cis-Golgi |
| 14-3-3 ϵ | Cytosolic | Regulate PKA modulation of Kv11.1 |
| KCR1 | Plasma membrane | Reduce the sensitivity of hERG to drug blockers |

1.6.3 La fonction de hERG

Tel que mentionné précédemment, le Kv11.1 exerce un rôle important dans le maintien de l'électrophysiologie des cardiomyocytes. C'est principalement à la phase 3 du potentiel d'action que Kv11.1 exerce ses fonctions pour terminer l'étape de repolarisation et amener la membrane à un état de repos. [44] Comme le courant induit par Kv11.1 s'installe tardivement au cours du potentiel d'action, on le nomme courant potassique de repolarisation tardive (I_{Kr}). [5] La protéine hERG joue donc un rôle central dans le cycle de contraction/relaxation du cœur puisqu'elle forme un canal potassique ayant pour rôle d'assurer la relaxation des cardiomyocytes suite à leur excitation.

Le Kv11.1 exerce ses fonctions en passant par trois états d'activation différents : fermé, ouvert et inactif. Ce sont les variations de voltage membranaire qui induisent le passage d'un état à un autre. À des potentiels inférieurs à -60mV, le canal est fermé. Il se retrouve ouvert à des potentiels membranaires négatifs supérieurs à -60mV. Puis, à des potentiels positifs, il est ouvert, mais inactif. La capacité à passer d'un état à un autre est essentielle à l'exercice des fonctions de Kv11.1. [44]

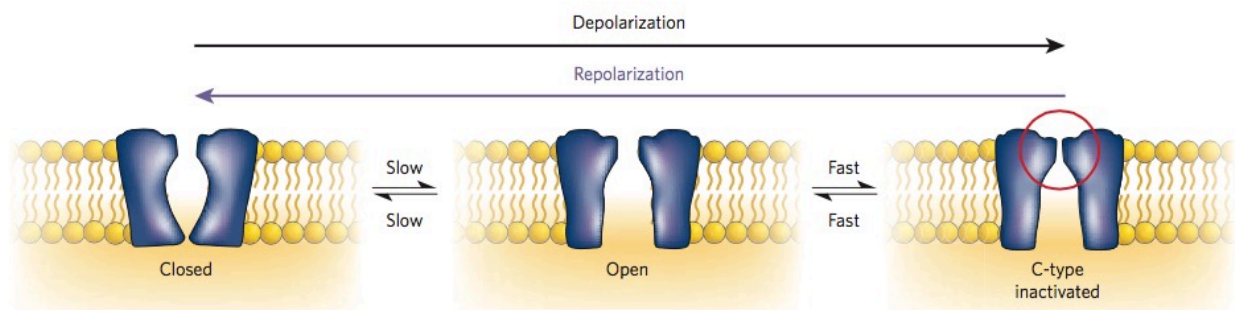


Figure 6. Les différents états d'activation de Kv11.1.

Le canal est fermé à des potentiels membranaires très négatifs, mais s'ouvre progressivement lors de la dépolarisation étant donné l'augmentation du potentiel. À l'atteinte de potentiel positif, le canal demeure ouvert, mais s'inactive rapidement. Lors de la repolarisation, le canal passe par la même série d'états d'activation, mais dans le sens opposé. [44]

1.7 Les mutations héréditaires de long QT

Certaines mutations héréditaires occasionnent un prolongement de l'intervalle QT indépendamment de la prise de médicament. Cette condition est appelée syndrome de long QT autosomal dominant, ou syndrome Romano-Ward, et prédispose les patients atteints à des problèmes cardiaques. [45] En effet, ces personnes sont susceptibles de développer naturellement des arythmies ventriculaires et sont aussi beaucoup plus sensibles aux effets secondaires des médicaments inhibiteurs de Kv11.1 puisque leur onde QT est déjà plus longue que celle d'un patient sain. Plus de 450 mutations putatives de *KCNH2* ont été identifiées [5], dont la grande majorité occasionne des défauts de biogénèse, c'est-à-dire de maturation de l'ARNm [46], de stabilité de l'ARNm [47] ou de conformation et de trafic des protéines.[48-50] Il existe toutefois certaines mutations, comme I593R et G628S, pour lesquelles la maturation des canaux Kv11.1 n'est pas affectée, mais pour lesquelles la fonctionnalité est atteinte. [50] Autrement dit, ces mutants moins fréquents sont transportés sans problème à la PM, mais ne peuvent pas exercer leur fonction.

Un individu homozygote pour une mutation de *KCNH2* est très sévèrement prédisposé à des troubles cardiaques intra-utérin et néo-natal et risque de mourir à un très bas âge.[51] Il a aussi été démontré que certaines mutations de *KCNH2* pouvaient être en cause dans des cas de mort fœtale intra-utérine. [52] Dans le cas où les patients sont hétérozygotes, les mutations peuvent causer un phénotype dominant négatif ou une haplo-insuffisance.

1.7.1 Le phénotype dominant négatif

Dans le cas de la dominance négative, la protéine hERG mutante est exprimée et tétramérise avec d'autres sous unités mutantes et/ou des sous-unités sauvages pour former des complexes hétéro-tétramériques. Comme le phénotype mutant est dominant au sein du complexe, un canal qui possède au moins une sous-unité mutante adoptera le phénotype mutant. Étant donné que la contribution de chaque allèle est considérée équivalente, il devrait y avoir autant de sous-unités mutantes que de sous-unités sauvages exprimées chez le patient. Ceci laisse peu de chance qu'un canal soit formé de quatre sous-unités sauvages.

1.7.2 L'haplo-insuffisance

Dans le cas de l'haplo-insuffisance, la mutation de *KCNH2* cause un défaut au niveau de l'ARNm qui est perçu par la cellule avant que la traduction ait lieu. Aucune protéine mutante n'est donc exprimée. Les protéines sauvages, provenant de l'allèle non muté, sont exprimées, assemblées et transportées jusqu'à la PM pour exercer leur fonction. Toutefois, comme seulement un allèle sur deux contribue à la formation de protéines, il y a une diminution de 50% du nombre total de Kv11.1 à la membrane, comparativement à un individu sain. Ceci se traduit par une perte de 50% des fonctions associées à ce canal potassique.[53-57] Il faut noter que la sévérité des effets observés varie d'une mutation à une autre.[55]

1.8 Mécanismes biologiques derrière l'inhibition de Kv11.1

Suite à la découverte de l'implication du canal Kv11.1 dans les arythmies acquises lors de la prise de médicament, un seul mécanisme a été proposé : l'inhibition fonctionnelle du canal par le blocage direct du pore. Toutefois, une publication du groupe d'Arthur M. Brown, parue en 2004, a permis de proposer un nouveau mécanisme pouvant expliquer la prolongation de l'intervalle QT par des composés pharmaceutiques : l'inhibition de la translocation du canal dans les voies de transport vésiculaire. [58]

1.8.1 Les inhibiteurs fonctionnels

Les inhibiteurs fonctionnels sont aussi appelés bloqueurs directs puisqu'ils interagissent au niveau du pore de Kv11.1 pour perturber le passage des ions. Il a été démontré que ces inhibiteurs s'associent à la face interne du pore. La face externe est en fait si étroite qu'elle ne peut permettre que le passage d'ions. Ceci implique donc qu'un bloqueur direct doit avoir des propriétés hydrophobes pour traverser la membrane cellulaire. De plus, pour que l'association ait lieu, le canal doit être dans un état d'activation pour lequel le pore est ouvert, c'est-à-dire dans l'état ouvert ou dans l'état inactif (voir *Figure 7*). Certains inhibiteurs s'associent préférentiellement au canal dans son état ouvert, d'autres dans son état inactif et d'autres s'associent aussi bien au canal qu'il soit dans un état ou dans l'autre. [5]

Le blocage direct du pore de Kv11.1 est un effet secondaire aigu des inhibiteurs fonctionnels, c'est-à-dire que l'effet se manifeste dans les quelques minutes suivant l'exposition des cardiomyocytes à la drogue en circulation. Cependant, un effet chronique, suivant une exposition prolongée au médicament pour plusieurs heures, est aussi observable dans certains cas. En effet, il a été démontré que les inhibiteurs fonctionnels de hERG permettent le rétablissement du transport vésiculaire pour certains mutants de rétention (retenu dans le ER) suite à une exposition de 16 heures. [59] Les inhibiteurs fonctionnels auraient donc deux effets observables : un effet aigu de blocage direct et un effet chaperon sur les mutants de rétention lors d'exposition chronique.

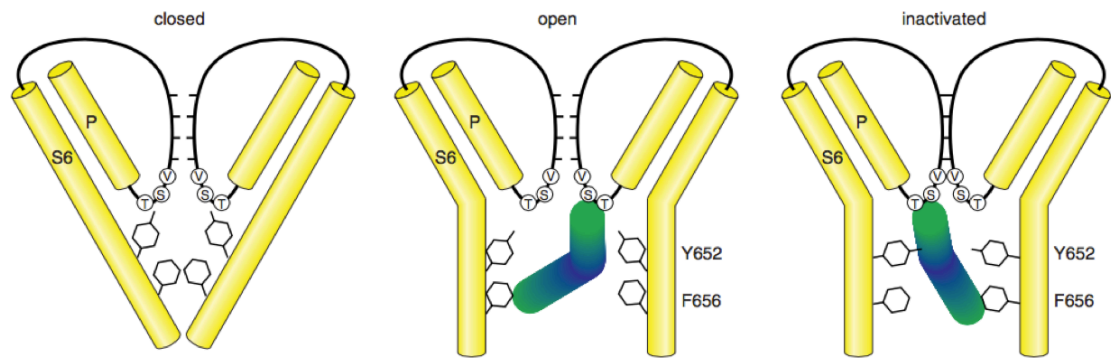


Figure 7. Le pore de Kv11.1 doit être ouvert pour que les inhibiteurs fonctionnels s’y lient.

Cette figure présente le 6^e passage transmembranaire et le *linker* reliant le 5^e et le 6^e passage transmembranaire (appelé *P-linker*) de deux sous unités hERG. Les bloqueurs directs peuvent seulement s’associer au pore lorsque le canal est dans un état ouvert ou inactif. Cette association fait intervenir quelques résidus importants, dont les résidus T623, S624 et V625 dans la région supérieure du pore, ainsi que les résidus aromatiques Y552 et F656. L’orientation de ces résidus varie de l’état ouvert à l’état inactif ce qui permet aux drogues de se lier selon différentes orientations en fonction de l’état d’activation du canal. [5]

1.8.2 Les inhibiteurs de translocation

En 2004, des études menées sur le trioxyde d’arsenic (As_2O_3) ont démontré que l’usage de cette drogue induisait une prolongation de l’intervalle QT en interférant avec les processus de maturation de Kv11.1 dans le ER, plutôt qu’en bloquant directement le pore. [58] Autrement dit, cette drogue raccourcit l’onde QT en réduisant le nombre de canaux Kv11.1 à la membrane. L’année suivante, la pentamidine a aussi été identifiée comme étant un inhibiteur de translocation. [60] Il faut noter que ce type d’inhibition nécessite une exposition prolongée au médicament. En effet, l’altération de processus biologiques intracellulaires peut demander plusieurs heures, contrairement au blocage direct du pore qui peut se faire en quelques minutes.

De plus, certains composés, comme la fluoxetine et le ketoconazole, agissent comme inhibiteurs fonctionnels suite à un court temps d’exposition et deviennent

des inhibiteurs de translocation après quelques heures. Il a aussi été démontré qu'une mutation du résidu F656 de hERG, important pour le blocage du pore, empêchait ces deux drogues d'agir comme des inhibiteurs fonctionnels, mais ne les empêchait pas d'inhiber la translocation du canal lors de sa maturation. [61, 62] Ceci suggère que les drogues peuvent interagir avec hERG sur d'autres sites que le pore et/ou que l'inhibition du trafic peut faire intervenir des protéines impliquées dans la maturation de hERG (voir *Tableau II*). [5] Un autre exemple particulier supportant cette idée est celui de la geldanamycine. Cet antibiotique inhibe spécifiquement la chaperonne Hsp90 qui est essentielle à la maturation de hERG et inhibe ainsi sa translocation dans les voies de transport vésiculaire de façon indirecte.[49] Toutefois, les drogues qui inhibent les participants intermédiaires, comme Hsp90 ou tout autre chaperon cellulaire (voir *Tableau II*), sont susceptibles d'influencer la maturation de nombreuses autres protéines importantes. Ceci mènerait fort probablement à l'apparition d'autres symptômes de sévérités différentes.

1.8.3 Déterminants structuraux prédisposant à une interaction avec hERG

Différentes études ont permis d'identifier trois caractéristiques physico-chimiques particulièrement importantes des inhibiteurs de Kv11.1. Premièrement, tel que mentionné brièvement plus haut, les inhibiteurs fonctionnels de hERG doivent être hydrophobes pour pouvoir traverser la PM et atteindre la face interne du pore. Les inhibiteurs de translocation doivent aussi la traverser pour rejoindre les protéines dans les voies de trafic vésiculaire. Cette caractéristique peut également contribuer à de fortes interactions hydrophobes entre la molécule et les résidus Y652 et F656 se situant au niveau du pore. Deuxièmement, les composés qui interagissent avec hERG doivent généralement être flexibles, ce qui expliquerait leur capacité à adopter différentes conformations dans la cavité du pore. Troisièmement, il a été démontré que les inhibiteurs de Kv11.1 dotés de nombreux cycles aromatiques sont ceux qui ont les effets les plus marqués. Il faut toutefois noter que ces prédictions sont basées sur la modélisation *in silico* qui, comme il le sera présenté dans la *section 1.10*, possède des désavantages importants diminuant sa fiabilité. [5]

1.9 Exigences réglementaires

L'allongement de l'intervalle QT peut être causé par une perturbation de l'activité de plusieurs canaux ioniques impliqués dans l'établissement du potentiel d'action des cardiomyocytes. Toutefois, il semblerait que ce soit le courant potassique de rectification retardé qui ait le plus d'influence sur l'APD. [2] Pour cette raison, la réglementation entourant le développement du médicament exige que les effets d'une nouvelle molécule thérapeutique envers hERG soient évalués avant de passer en phase clinique. Les exigences réglementaires actuelles impliquent deux types d'essais complémentaires, l'un *in vitro* et l'autre *in vivo*. Ces essais ont pour objectif d'évaluer si une substance ou ses métabolites retardent la repolarisation des cardiomyocytes et d'établir une corrélation entre la concentration et l'effet observé. On peut toutefois noter qu'il existe plusieurs autres informations cliniques et non cliniques pertinentes permettant une évaluation intégrée du risque, comme les résultats d'études d'interactions médicamenteuses, de pharmacocinétique, de distribution et d'accumulation dans les tissus. [2]

1.9.1 Essais *in vitro*

Les essais effectués *in vitro* consistent en la mesure d' I_{Kr} sur des cellules en culture et peuvent impliquer le recours à des préparations unicellulaires ou multicellulaires. Les préparations unicellulaires peuvent consister en un système d'expression hétérologue, pour lequel le canal ionique à l'étude est exprimé dans des cellules non cardiaques, ou en un cardiomyocyte isolé, qui lui seul permet d'obtenir des informations à la fois sur l'APD et sur les courants ioniques. Dans les préparations multicellulaires, il est possible que certaines composantes fassent obstacle à la diffusion des molécules vers le site d'action. Toutefois, elles sont stables et permettent d'étudier l'influence d'une molécule sur chaque phase du potentiel d'action. Les populations de cellules pour ces tests peuvent provenir du lapin, du furet, du cochon d'Inde, du chien, du porc et parfois de l'humain. L'électrophysiologie des cardiomyocytes chez le rat et la souris est trop différente de celle de l'humain pour que ces espèces puissent être utilisées. De plus, les essais *in vitro* doivent inclure des résultats obtenus pour des concentrations allant au delà des concentrations plasmatiques thérapeutiques prévues. [2]

1.9.2 Essais *in vivo*

Les essais *in vivo* permettent d'évaluer la mesure de l'intervalle QT en procédant à des ECG sur des animaux traités avec la molécule à tester. Pour la même raison que celle décrite dans la section précédente, les animaux utilisés pour ces essais peuvent être le lapin, le furet, le cochon d'Inde, le chien, le porc et le singe, mais pas le rat, ni la souris. Comme pour les tests *in vitro* en préparations multicellulaires, les essais *in vivo* permettent d'étudier l'effet d'une molécule sur une variété de canaux ioniques et de types cellulaires. Toutefois, les essais *in vivo* ont l'avantage d'inclure les facteurs neuronaux et hormonaux pouvant affecter les propriétés de la molécule à tester. Ils permettent également d'inclure les effets indésirables pouvant être générés par les métabolites de la molécule. En effet, les préparations utilisées pour les tests *in vitro* ont une capacité métabolique limitée. Par contre, les modèles animaux intacts ont tout l'équipement biologique nécessaire pour la biotransformation d'une molécule. Lorsqu'un allongement de l'intervalle QT est observé dans les tests *in vivo*, mais ne l'était pas dans les tests *in vitro*, il est recommandé d'investiguer sur l'effet potentiel des métabolites. Pour ce faire, les métabolites peuvent simplement être analysés dans le système *in vitro* utilisé initialement. [2]

1.10 Méthodes de criblage

La méthode de référence actuelle pour l'évaluation *in vitro* du risque cardiotoxique associé à hERG est le *patch-clamp* (aussi appelée *voltage-clamp*). Toutefois, elle permet seulement d'identifier les inhibiteurs fonctionnels de Kv11.1 (bloqueurs directs du pore). Effectivement, lors d'un essai de type *patch-clamp*, des cardiomyocytes sont exposés à la molécule à tester pour une courte durée (< 30 minutes). Cette méthode n'adresse donc pas la possibilité que ces molécules induisent des modifications cellulaires plus complexes qui nécessitent une exposition prolongée comme une altération du trafic vésiculaire. Plusieurs des méthodes alternatives publiées dans les dernières années tentent d'identifier les inhibiteurs de translocation et/ou d'augmenter le débit opérationnel pour l'identification des inhibiteurs fonctionnels, qui est très faible pour le *patch-clamp*. Cependant, tel que décrit brièvement ci-dessous, ces méthodes comportent différents inconvénients.

1.10.1 La modélisation *in silico*

La modélisation *in silico* peut être utilisée pour prédire le potentiel d'interaction d'une drogue ou d'une petite molécule envers Kv11.1. Cependant, la structure cristallographique de Kv11.1 n'a jamais été élucidée. Les modèles *in silico* utilisent des modèles d'homologie basés sur des cristaux d'autres canaux potassiques. Toutefois, il est connu que le canal Kv11.1 possède des propriétés uniques qui le distinguent de ces autres canaux.[63, 64] De plus, un modèle d'homologie constitue une image statique d'un canal dans une conformation donnée et ne permet pas de prendre en considération les réarrangements structuraux pouvant être occasionnés lors des transitions d'états (fermé, ouvert ou inactif) de canaux ioniques voltage-dépendants comme Kv11.1. Ces réarrangements sont fortement susceptibles d'influencer l'association de médicaments au canal. [65-69]

1.10.2 Compétition par des radioligands ou des traceurs fluorescents

Les essais de compétition utilisent des bloqueurs directs de Kv11.1 de très haute affinité et ne peuvent donc pas être utilisés pour identifier les molécules qui lient hERG en dehors du pore. Effectivement, il a été démontré qu'il existe des sites alternatifs pour certains inhibiteurs de translocation [61, 62] et pour des toxines agissant contre Kv11.1. [70] De plus, ces essais ne prennent pas en considération

que les ligands ont des affinités relatives envers hERG qui peuvent dépendre de l'état d'activation du canal, tel que mentionné dans la section 1.8.1.

1.10.3 Efflux de Rubidium (Rb^+)

Les canaux potassiques permettent le passage d'ions Rb^+ , qui sont de plus petite taille que les ions K^+ . La mesure des variations d'efflux de Rb^+ en présence d'une drogue peut donc constituer une manière de mesurer indirectement la capacité d'une molécule à inhiber Kv11.1. [71] Toutefois, cette méthode sous-estime de façon très marquée les concentrations permettant 50% d'inhibition de l'activité du canal (IC_{50}) pour la plupart des drogues. Ceci étant dû aux altérations d'état d'activation occasionnées par l'ion Rb^+ . [72]

1.10.4 Colorants fluorescents

Cette technologie est basée sur des colorants fluorescents conçus pour mesurer les changements de potentiel membranaire, une autre mesure indirecte de l'activité de Kv11.1. Cependant, trois colorants commerciaux ont été utilisés et aucun d'entre eux n'ont permis d'obtenir des valeurs qui corrèlent avec celles obtenues par *patch-clamp*. L'une des raisons est que plusieurs des petites molécules testées ont la capacité de lier ces colorants fluorescents, réduisant ainsi considérablement le signal perçu. [73]

1.10.5 Patch-clamp automatisé

Les techniques électrophysiologiques de mesure du potentiel membranaire demeurent actuellement les méthodes les plus fiables. Traditionnellement, le *patch-clamp* pouvait requérir un travail laborieux et ne se pratiquait qu'à très faible débit. Le développement de méthodes automatisées permettant l'enregistrement de valeur pour plusieurs cellules à la fois a toutefois permis d'améliorer le potentiel de criblage. Toutefois, l'automatisation du *patch-clamp* n'adresse pas la possibilité qu'une exposition prolongée à un médicament puisse causer un effet cardiotoxique. [5]

1.10.6 HERG-Lite®

La méthode *hERG-Lite*® utilise la mutation G601S de hERG afin d'identifier les inhibiteurs fonctionnels de Kv11.1 dans un système d'expression hétérologue. Cette mutation, identifiée en 1999 chez une famille atteinte du syndrome de long QT, cause un défaut de maturation de hERG et engendre une forte rétention de la protéine dans le ER. Il a été démontré que les bloqueurs directs du pore de Kv11.1 pouvaient agir comme chaperon pharmacologique envers ce mutant en rétablissant son transport vers la PM suite à une exposition prolongée (16h). [56, 74, 75] *HERG-Lite*® utilise l'immunodétection, à l'aide du tag HA inséré dans la première boucle extracellulaire de hERG G601S, afin d'évaluer les fluctuations de Kv11.1 à la membrane. Cette méthode utilise également une protéine hERG exempte de la mutation G601S, mais qui possède elle aussi le tag HA afin d'identifier les inhibiteurs de translocation. Ceux-ci diminuent le niveau d'expression membranaire de la protéine, contrairement à l'effet observé pour les inhibiteurs fonctionnels. *HERG-Lite*® permet un criblage à haut débit et identifie correctement l'ordre de puissance de 100 composés pharmaceutiques en distinguant les inhibiteurs fonctionnels des inhibiteurs de translocation. Toutefois, ce test sous-estime de 1 à 2 ordres de grandeur l'affinité des inhibiteurs, relativement au *patch-clamp*. De plus, il ne permet pas d'identifier la nature de l'interaction induisant une inhibition de l'accès à la membrane, par exemple une interaction directe avec hERG, une interaction avec une protéine chaperonne, une augmentation de l'internalisation, une diminution de l'expression génique, etc. [59]

Le biosenseur développé dans le cadre de mon projet de maîtrise et décrit dans le présent travail s'apparente beaucoup à la méthode *HERG-Lite*®. Il utilise toutefois une autre méthode de détection : le transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET).

1.11 BRET

Le transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET) est un phénomène naturel observé chez plusieurs espèces d'animaux marins. Cette réaction de bioluminescence est utilisée pour développer des technologies visant à mesurer la proximité entre des protéines ou des domaines protéiques au sein d'une même protéine. Lors d'un essai de BRET, l'une des protéines est fusionnée à un donneur d'énergie et l'autre à un accepteur d'énergie. Le donneur émet de l'énergie sous forme de bioluminescence lorsqu'on lui fournit son substrat. Si l'accepteur se situe à proximité du donneur (<10nm), l'énergie émise l'excite et l'accepteur émet à son tour une énergie sous forme lumineuse à une longueur d'onde différente. Le signal BRET est le ratio entre l'intensité du signal émis par l'accepteur et celui émis par le donneur. [76]

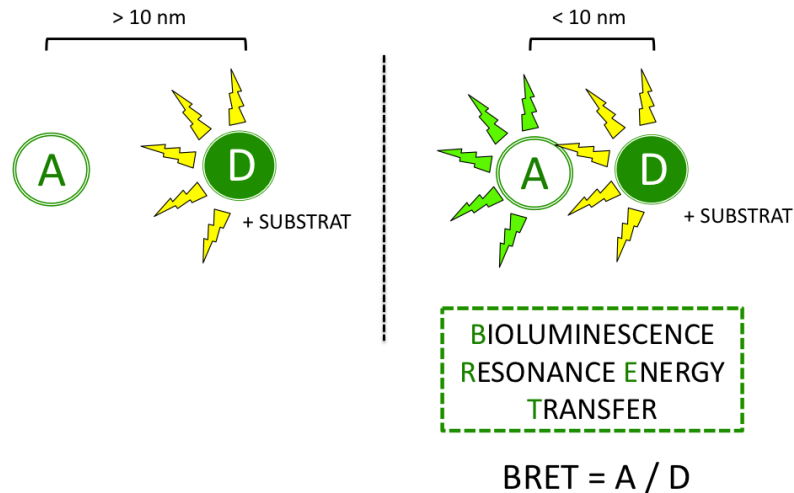


Figure 8. Principe de la technologie BRET.

Lorsque les protéines du modèle sont à proximité, le donneur d'énergie (D) utilise son substrat pour émettre une lumière qui excite l'accepteur d'énergie (A). Ce dernier émet ensuite une lumière à une longueur d'onde différente. Toutefois, si les protéines ne sont pas suffisamment près l'une de l'autre, seule l'énergie du donneur pourra être détectée suite à l'ajout du substrat.

Le BRET peut être utilisé dans des contextes variés. En effet, cette technologie peut être utilisée pour la détection d'interactions spécifiques entre deux protéines, pour l'évaluation de mouvements intramoléculaires et même pour le moniotring de la localisation cellulaire d'une protéine. [76-79] La première méthodologie BRET développée (appelée BRET I) utilisait la luciférase provenant de l'organisme marin

renilla reniformis (rLuc) comme donneur d'énergie et la protéine jaune fluorescence (YFP) comme accepteur d'énergie. Le BRET I utilise la coelenterazine comme substrat qui permet une émission de lumière par rLuc avec un pic d'émission à 480 nm, une longueur d'onde appropriée pour l'excitation de la YFP qui émet à son tour à 530 nm. Depuis, plusieurs nouveaux couples donneur/accepteur d'énergie ont été développés et différents substrats de luciférase ont été synthétisés afin d'obtenir de meilleurs signaux et d'augmenter l'applicabilité de la méthode en criblage à haut débit. [76, 77]

1.12 Hypothèse

Un test de localisation de hERG dans la cellule basé sur le BRET permettra un criblage à haut débit et une meilleure évaluation de l'affinité d'interaction avec hERG, comparativement aux méthodes alternatives actuelles.

Nous proposons une nouvelle méthode, que nous avons appelée HERG-BRET, pour laquelle le niveau d'expression de Kv11.1 à la PM est évalué en tirant avantage d'une réaction de BRET et permet d'identifier les molécules pouvant agir comme inhibiteurs fonctionnels et/ou comme inhibiteurs de translocation. Ce biosenseur permettra d'augmenter la capacité de criblage préclinique de l'innocuité des médicaments actuellement en développement en milieu académique et industriel. Le *patch-clamp* est très dispendieux et le temps requis pour l'obtention des résultats est généralement long. Le biosenseur offert permettra un premier criblage d'un grand nombre de molécules sur une courte période (quelques jours) pour un cout moindre. Les utilisateurs pourront discriminer rapidement les molécules dont le potentiel d'interaction avec hERG sera perçu comme risqué à l'aide de la méthode HERG-BRET et pourront faire une sélection plus restreinte de molécules à valider au *patch-clamp*.

2. Objectifs spécifiques

Objectif 1 : Déterminer la construction *donneur d'énergie* la plus adéquate. Le biosenseur requiert qu'une protéine fusion soit créée entre hERG et un donneur d'énergie, la luciférase de *renilla* (*rLuc*). Le premier objectif est de tester trois sites d'insertion différents de *rLuc* dans la séquence de hERG: à l'extrémité N-terminale (Nter), près du premier passage transmembranaire (S1) et dans la première boucle intracellulaire (S2S3). Un autre facteur qui devra être évalué est la présence de l'étiquette moléculaire HA (ou *tag* HA) dans la première boucle extracellulaire. Il s'agit d'un outil de détection qui pourrait être utile lors de la validation de la méthode, mais des tests devront être effectués pour évaluer l'influence de cette étiquette moléculaire sur les résultats obtenus. Le dernier facteur qui sera à évaluer est la possibilité d'utiliser le mutant G601S de hERG, partiellement retenu dans le ER, afin de faciliter l'identification des molécules agissant comme chaperons pharmacologiques envers cette protéine.

Objectif 2: Générer une lignée cellulaire stable exprimant à la fois le donneur et l'accepteur d'énergie. L'utilisation d'une lignée cellulaire stable pour le développement de ce biosenseur permettra de minimiser la variabilité et d'augmenter le débit de la procédure.

Objectif 3 : Comparer HERG-BRET à la méthode *hERG-Lite*® et au *patch-clamp*. Parmi les méthodes alternatives de criblage présentées à la *section 1.10*, le test *hERG-Lite*® [59] est celui qui s'apparente le plus au biosenseur que nous développons. Il classe correctement les inhibiteurs, mais sous-estime leur affinité apparente envers hERG. Nous voudrions tester plusieurs composés présentés dans l'article portant sur le test *hERG-Lite*® et comparer les EC_{50} obtenues pour chacun, en plus de les comparer aux valeurs de références obtenues par *patch-clamp* et disponibles dans la littérature.

3. Matériel et méthodes

Principe derrière le biosenseur HERG-BRET

Dans la méthode proposée, la luciférase provenant de l'organisme marin *Renilla reniformis* (*rLuc*) agit comme donneur d'énergie bioluminescente. La protéine verte fluorescente provenant du même organisme (*rGFP*) agit comme accepteur d'énergie fluorescent de haute affinité. La *rGFP* est aussi fusionnée à un polypeptide composé du domaine polybasique de KRAS et d'un domaine de prénylation. Ces deux composantes permettent l'ancrage de la *rGFP* à la face interne de la membrane plasmique. Cette construction sera désignée *rGFP-CAAX* [79] tout au long du présent travail. La *rLuc*, quant à elle, est fusionnée à hERG et peut voyager dans la cellule selon les propriétés de translocation de la protéine de fusion. Si le trafic de hERG-*rLuc* vers la membrane cellulaire est permis, le donneur et l'accepteur d'énergie se retrouvent dans le même compartiment. La proximité entre ces deux composantes est perçue suite à l'ajout de la coelenterazine 400A, aussi appelée *Deep Blue C* (DBC). Effectivement, en présence de ce substrat, la *rLuc* émet de l'énergie sous forme de luminescence à 395 nm. Celle-ci permet l'excitation de la *rGFP* qui émet une fluorescence à 510 nm. Le ratio entre la fluorescence et la luminescence perçues, appelé ratio BRET, reflète l'abondance de hERG-*rLuc* à la membrane.

Tel que mentionné à la *Section 1.11*, il existe plusieurs variantes au BRET I. Le couple donneur/accepteur d'énergie choisi pour ce projet ainsi que le substrat utilisé sont typiques du BRET II. En effet, la DBC, permet de décaler le pic d'émission de la *rLuc* à 395 nm. Cette différence plus marquée entre les pics d'émission du donneur et de l'accepteur d'énergie confère un avantage au BRET II comparativement au BRET I [76]. Quoi qu'il en soit, pour alléger la lecture, seule l'appellation BRET sera utilisée dans les sections suivantes.

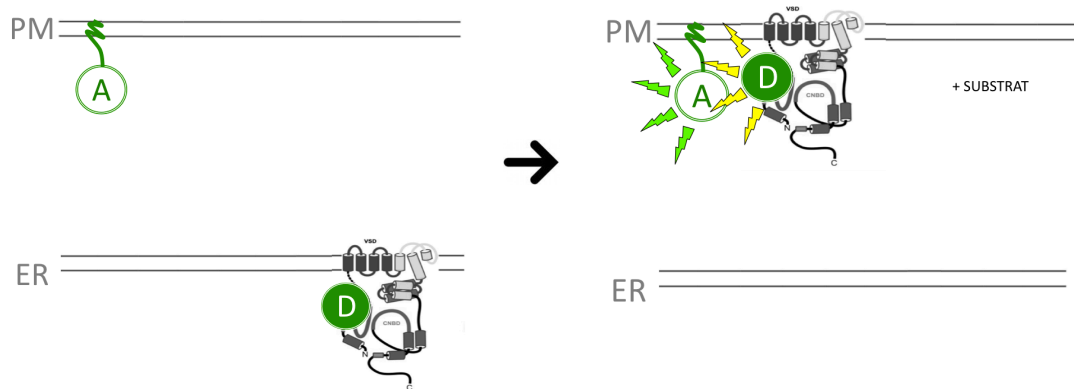


Figure 9. Détection de l'expression membranaire de hERG-rLuc lorsque la translocation de cette protéine est permise.

Lorsque les deux protéines sont dans le même compartiment cellulaire, un signal lumineux est émis par le donneur d'énergie (D), suite à l'ajout du substrat, et un autre par l'accepteur d'énergie (A). PM : membrane plasmique. ER : Réticulum endoplasmique.

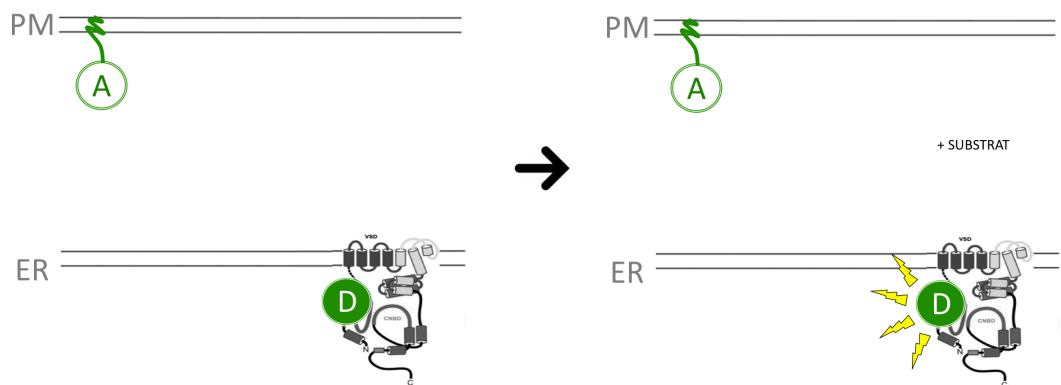


Figure 10. Détection de la rétention de hERG-rLuc dans le ER lorsque la translocation de cette protéine est inhibée.

Lorsque les deux protéines ne sont pas dans le même compartiment cellulaire, un signal lumineux est émis par le donneur d'énergie (D) suite à l'ajout du substrat. Aucun signal n'est émis par l'accepteur d'énergie. PM : membrane plasmique. ER : Réticulum endoplasmique.

Lors d'un essai HERG-BRET, des cellules HEK 293 exprimant les deux protéines décrites en début de section sont exposées pendant 16h au médicament à tester. Les inhibiteurs fonctionnels de Kv11.1, comme mentionné précédemment, ont la particularité d'agir comme des chaperons pharmacologiques. Ils permettront donc une augmentation du niveau d'expression de hERG à la PM, ce qui se traduit par une augmentation du signal BRET comparativement aux cellules contrôles non exposées. Les inhibiteurs de la translocation de Kv11.1, quant à eux, diminueront le signal BRET puisqu'ils inhibent son trafic vers la PM.

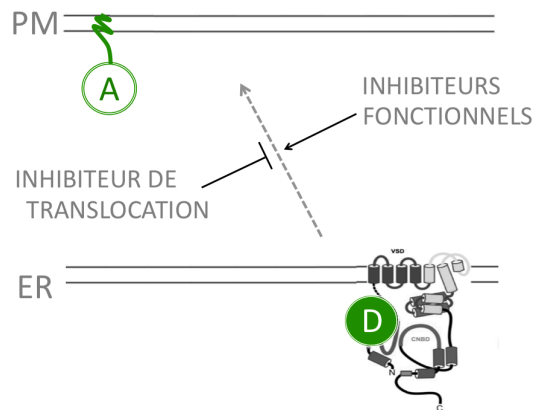


Figure 11. Effets des inhibiteurs de Kv11.1 dans le modèle HERG-BRET.

Les inhibiteurs fonctionnels de Kv11.1 favorisent le transport de hERG vers la PM tandis que les inhibiteurs de translocation l'inhibent.

3.1 Analyse comparative des constructions plasmidiques

La première étape à accomplir pour mettre en place le biosenseur HERG-BRET est la conception des constructions plasmidiques codant pour les protéines de fusion décrites à la section précédente. Le *rGFP-CAAX* a été conçu par Christian Le Gouill en 2013 et a été utilisé dans d'autres modèles afin de valider que cet accepteur d'énergie permette bien la détection de protéines membranaires. La construction hERG-*rLuc* a toutefois dû être conçue à partir des séquences d'ADN à notre disposition. Celles-ci étaient les constructions pcDNA3-hERG WT HA et pcDNA3-hERG G601S HA, conçues par Florence Dô à partir du plasmide pcDNA3-hERG WT généreusement fourni par le Dr Jacques Turgeon. La conception de hERG-*rLuc* a requis l'élaboration de plusieurs stratégies de construction. En effet, l'insertion de la *rLuc* dans hERG doit être minutieusement pensée afin de ne pas modifier de façon trop importante la conformation de la protéine. Pour cette raison, trois sites potentiels d'insertion ont été identifiés à l'aide d'outils informatiques de prédiction de conformation. Puis, des stratégies de construction pour chacun des sites ont été élaborées.

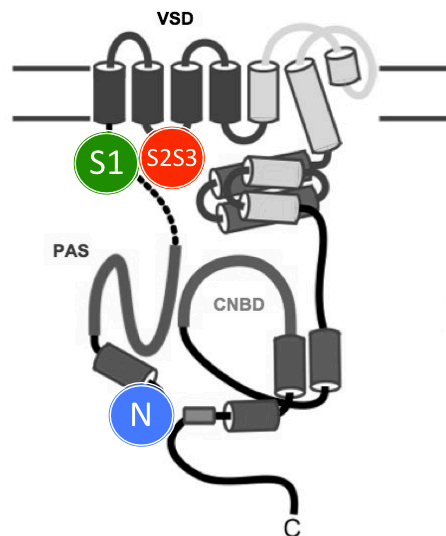


Figure 12. Représentation des trois sites potentiels d'insertion de *rLuc* au sein de la sous unité protéique hERG.

Trois sites d'insertion pour la luciférase ont été choisis : à l'extrémité de la région N-terminale (N), près du premier passage transmembranaire (S1) et dans la première boucle intracellulaire (S2S3). (Adaptation d'une figure de *Brelidze*). [43]

Deux autres facteurs ont été à considérer lors de la conception de la construction hERG-rLuc. Le premier est la possibilité de conserver le *tag* HA dans la première boucle extracellulaire de la protéine. Ce *tag* a été inséré dans la séquence codant pour hERG lors de la conception des plasmides initiaux pour des fins d'immunodétection. Le deuxième est la possibilité d'utiliser le mutant G601S de hERG comme modèle de rétention dans le ER pour faciliter l'identification des molécules ayant pour effet de favoriser le trafic vésiculaire de hERG.

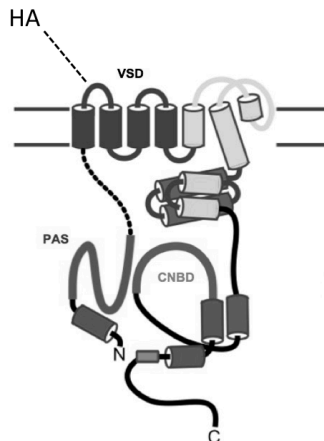


Figure 13. Site d'insertion du *tag* HA au sein de hERG.

L'étiquette moléculaire HA est positionnée dans la première boucle extracellulaire de la protéine (Adaptation d'une figure de *Brelidze*). [43]

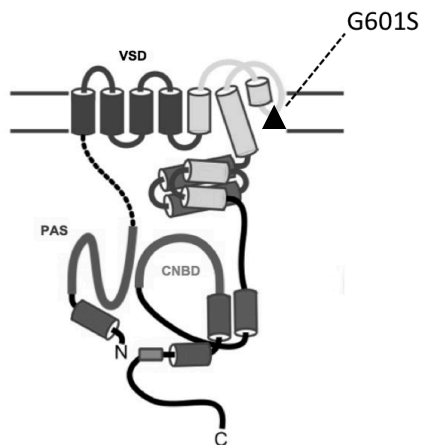


Figure 14. Position de la mutation G601S au sein de hERG.

La mutation G601S se situe dans la région formant le pore du canal Kv11.1 et occasionne une rétention de la protéine dans le ER (Adaptation d'une figure de *Brelidze*). [43]

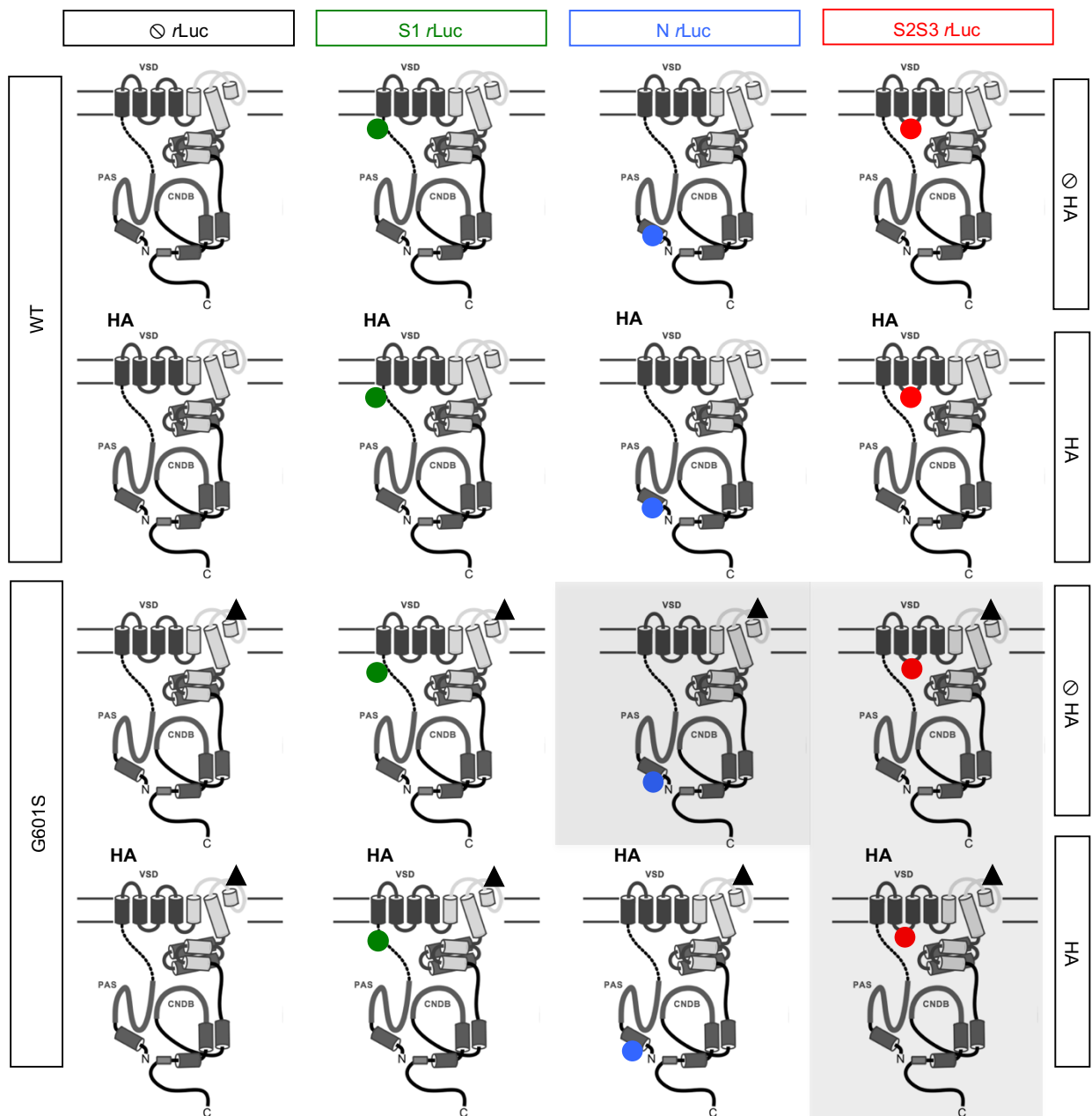


Figure 15. Représentation schématique de la banque de plasmides générés pour les essais préliminaires du développement du biosenseur HERG-BRET.

Un pool de plasmide (en vecteur pcDNA3) a été généré en fonction des sites d'insertion de *rLuc* présentés précédemment et des deux autres facteurs à considérer. Les constructions ombragées sont celles qui n'ont pas été terminées, les résultats préliminaires suggéraient qu'elles ne seraient pas utiles pour le biosenseur (Adaptation d'une figure de *Brelidze*). [43]

La *Figure 15* présente le pool de plasmides qui a été généré pour accomplir les essais préliminaires du développement du biosenseur HERG-BRET. Des courbes de l'effet concentration-dépendent de l'ajout des composés ont été effectuées avec chaque construction en transfections transitoires pour évaluer l'influence de la position de rLuc, de la présence de l'étiquette moléculaire HA et de la mutation G601S de hERG sur le chaperonnage de la protéine par des molécules de références.

3.1.1 Matériel requis

Pour la conception des différentes constructions, plusieurs enzymes de restriction ont été utilisées ainsi que des kits pour le clonage, la purification et l'amplification des plasmides. Les séquences d'ADN ont été obtenues grâce aux services offerts par la Plateforme de génomique de l'IRIC, puis comparées aux séquences attendues. Lorsque les séquences concordent, des tests comparatifs des constructions ont été effectués en transfections transitoires de cellules HEK 293. Voici une brève liste du matériel requis pour l'obtention des résultats préliminaires :

- Enceinte de sécurité biologique
- Lecteur de plaque pour mesure de fluorescence (*FlexStationII*)
- Lecteur de plaque pour mesure de luminescence/fluorescence (*Tristar*)
- Imprimante à composés HP digital dispenser
- Incubateur 37°C, 0.05% CO₂
- Plaques 96 puits standard, opaques, blanches
- Tube conique Falcon 15 ml, 50 ml
- Hématimètre
- Microscope optique à champ inversé.
- Assortiment de pipettes et d'embouts (20µl, 200µl, 1000µl et pipettes à canaux multiples 1200µl)
- Constructions hERG-rLuc
- Construction rGFP-CAAX
- ADN de sperme de saumon
- Polyéthylèneimine (PEI)
- Polyornithine (PORN)
- Tampon phosphate (PBS) stérile
- Milieu de culture (DMEM)
- Sérum foetal bovin (FBS)
- Pénicilline/Streptomycine (P/S)
- Cellules HEK 293
- Tampon Tyrode
- Chlorure de calcium (CaCl₂)
- Deep Blue C (DBC)
- Molécules de référence à tester
- Véhicule (DMSO)

3.1.2 Grandes lignes du protocole

Au **Jour 1**, les mélanges d'ADN sont préparés et additionnés de PEI à raison de 2 μ l de PEI par μ g d'ADN total. Après environ 15 minutes d'incubation, le mélange est ajouté aux cellules HEK 293 en suspension dans un milieu de culture complet (DMEM, 10%FBS, 1%P/S). Celles-ci sont ensuiteensemencées dans une plaque 96 puits standard, opaque dont les puits ont préalablement été recouverts de PORN à raison de 50 000 cellules par puits. La plaque est ensuite incubée à 37°C et 0.05% CO₂ jusqu'à la prochaine étape.

Au **Jour 2**, le contenu des puits est aspiré et ceux-ci sont lavés avec du PBS pour finalement accueillir du milieu frais contenant la molécule à tester ou le véhicule (DMSO). La concentration finale de DMSO dans chaque puits est de 0.34%. La plaque est ensuite replacée pour incubation pendant 16 heures (jusqu'au jour 3).

Au **Jour 3**, le contenu des puits est aspiré et ceux-ci sont lavés avec du PBS. 90 μ l de tampon Tyrode (CaCl₂ 1mM) sont ensuite ajoutés à chaque puits. Une lecture de fluorescence est ensuite effectuée au *FlexStationII* (excitation à 485 nm et émission à 535 nm) pour vérifier l'efficacité de transfection. Cette mesure permet en effet d'évaluer l'expression du plasmide *rGFP-CAAX* dans les cellules, indépendamment de l'activité de la *rLuc*, qui pour l'instant est inactive étant donné que son substrat n'a pas encore été ajouté. Cette mesure de fluorescence permet donc d'avoir une idée de l'efficacité de transfection. Ensuite, la DBC est ajoutée à chaque puits et la plaque est installée à 37°C pendant 5 minutes. La plaque est finalement insérée dans le *Tristar* pour effectuer une mesure à 400 nm (émission par la *rLuc*) et une autre à 515 nm (émission par la *rGFP*) à 37°C. Les résultats générés par le *Tristar* peuvent ensuite être analysés.

3.2 Preuve de concept en lignée cellulaire stable

Une fois que la construction la plus adéquate pour le développement du biosenseur HERG-BRET a été identifiée grâce aux résultats de l'analyse comparative en transfections transitoires, la confection d'une lignée cellulaire stable a été amorcée. L'utilisation d'une telle lignée cellulaire permettra de minimiser la variabilité dans les résultats et d'augmenter le débit opérationnel de la procédure. Une première transfection stable a été effectuée par Mireille Hogue à l'été 2014 pour générer une lignée cellulaire HEK293 exprimant de façon stable *rGFP-CAAX*. La sélection de cette lignée se fait à l'aide du gène *Hyg^R*, contenu sur le vecteur utilisé, qui confère aux cellules stables une résistance à l'hygromycine. Il suffit donc d'ajouter cet antibiotique au milieu de culture, à une concentration de 100 µg/ml, afin de s'assurer que les cellules prolifératives sont celles qui expriment le *rGFP-CAAX*.

Une seconde transfection a été effectuée sur cette lignée cellulaire pour sélectionner une nouvelle lignée exprimant de façon stable hERG-*rLuc* en plus de la construction *rGFP-CAAX*. Afin de s'assurer que les cellules expriment à la fois les deux composantes du biosenseur, il est essentiel d'utiliser des vecteurs qui confèrent une résistance à des antibiotiques différents. Le vecteur pcDNA3, dans lequel les plasmides initiaux avaient été construits, possède le gène *neo^R* qui confère une résistance à la généticine en cellules eucaryotes. Toutefois, sur ce vecteur, le contrôle de l'expression du gène d'intérêt et du gène de sélection se fait via deux promoteurs différents. À long terme, il est donc possible que les cellules continuent d'exprimer le gène de résistance, mais cessent d'exprimer le gène d'intérêt. Le gène codant pour la construction choisie a donc été transféré dans le vecteur bicistronique pRES*puro* par assemblage isotherme de Gibson, puisque ce vecteur n'utilise qu'un promoteur pour l'expression des deux gènes. Aussi, ce vecteur possède un gène de résistance à la puromycine. Ceci a permis d'appliquer une pression de sélection double, grâce à l'hygromycine et la puromycine, afin de générer une lignée cellulaire exprimant de façon stable le donneur et l'accepteur d'énergie. Les étapes permettant la confection, la purification, l'amplification et la validation des plasmides sont similaires à celles mentionnées précédemment.

3.2.1 Matériel requis

- Enceinte de sécurité biologique
- Lecteur de plaque pour mesure de fluorescence (*FlexStationII*)
- Lecteur de plaque pour mesure de luminescence (*Tristar*)
- Imprimante à composés HP digital dispenser
- Incubateur 37°C, 0.05% CO₂
- Plaques 96 puits standard, opaques, blanches
- Plaque 6 puits transparents
- Tube conique Falcon 15 ml, 50 ml
- Hématimètre
- Microscope optique à champ inversé.
- Assortiment de pipettes et d'embouts (20µl, 200µl, 1000µl et pipettes à canaux multiples 1200µl)
- Tubes pour le tri avec un bouchon doté d'un tamis cellulaire
- FACS
- Constructions hERG-rLuc en vecteur pIRES*puro*
- Construction rGFP-CAAX
- Lignée cellulaire exprimant rGFP-CAAX de façon stable
- Polyéthylèneimine (PEI)
- Polyornithine (PORN)
- Tampon phosphate (PBS) stérile
- Milieu de culture (DMEM)
- Sérum foetal bovin (FBS)
- Pénicilline/Streptomycine (P/S)
- Hygromycine
- Puromycine
- Tampon Tyrode
- Chlorure de calcium (CaCl₂)
- Deep Blue C (DBC)
- Molécules et véhicule (DMSO)
- Ab mouse anti-HA
- Ab goat anti-mouse (AF633)
- Albumine sérique bovine (BSA)

3.2.2 Grandes lignes du protocole

Avant de procéder à la genèse de la lignée stable exprimant hERG-rLuc et rGFP-CAAX, il a fallu effectuer quelques transfections transitoires afin de s'assurer que les résultats étaient similaires tant avec le vecteur pcDNA3 qu'avec le vecteur pIRES. La méthode à suivre est la même que celle présentée à la *section 3.1.2*, à l'exception du fait que les cellules transfectées ont été celles exprimant rGFP-CAAX de façon stable. Une fois cette étape effectuée, la preuve de concept en lignée cellulaire stable a pu être réellement entamée.

Genèse de la lignée stable

Le plasmide a d'abord été linéarisé avec l'enzyme de restriction *PvuI* pour favoriser son insertion dans le génome des cellules. Cette enzyme a été choisie puisqu'elle possède un site de restriction unique sur le vecteur. Les plasmides linéarisés ont ensuite été purifiés et dosés afin de transfecter les cellules avec environ 1 µg d'ADN. Le plasmide est ensuite additionné de PEI à raison de 3 µl de PEI par µg d'ADN total. Après environ 15 minutes d'incubation, le mélange est ajouté aux cellules *rGFP-CAAX* stables en suspension dans un milieu de culture complet (DMEM, 10%FBS, 1%P/S) contenant 100 µg/ml d'hygromycine. Celles-ci sont ensuiteensemencées dans une plaque à 6 puits clairs à raison de 1,2 millions de cellules par puits. La plaque est ensuite incubée à 37°C et 0.05% CO₂ jusqu'à la prochaine étape.

Après environ 48 heures, les cellules subissent un passage et sont exposées pour la première fois à 0.5 µg/ml de puromycine (des concentrations allant de 0.25 à 10 µg/ml ont été testées, mais 0.5 µg/ml est la concentration la plus élevée permettant la croissance). Pour croître, les cellules doivent maintenant obligatoirement exprimer les gènes de résistance à l'hygromycine et la puromycine. Elles expriment donc obligatoirement *hERG-rLuc* et *rGFP-CAAX*.

Sélection d'une sous-population

Bien que les cellules stables générées expriment toutes *hERG-rLuc* et *rGFP-CAAX*, elles n'ont pas obligatoirement le même niveau d'expression. Pour cette raison, avant d'aller plus loin, il a été nécessaire de trier la population de cellules en sous-populations stables. Pour ce faire, on utilise la technologie de tri cellulaire permise grâce au *Fluorescence Activated Cell Sorter* (FACS). Avant de procéder au tri, les cellules doivent subir un protocole de marquage pour permettre la détection des cellules positives. La protéine *rGFP-CAAX* possède déjà un marqueur fluorescent (*rGFP*). Le marquage a donc seulement dû être effectué pour la protéine *hERG-rLuc*. Le tag HA extracellulaire, décrit précédemment, a été d'une grande utilité lors de cette manipulation puisqu'il s'agit d'une étiquette moléculaire très utilisée en immunodétection. Ainsi, une fois le marquage effectué, il a été possible de trier les cellules en fonction de leur niveau d'expression de *hERG-rLuc* et *rGFP-CAAX*.

Preuve de concept en lignée stable

Au **Jour 1**, les cellules hERG-rLuc et rGFP-CAAX stables sont mises en suspension dans un milieu de culture complet (DMEM, 10%FBS, 1%P/S) contenant 100 µg/ml d'hygromycine et 0.5 µg/ml de puromycine. Celles-ci sont ensuiteensemencées dans une plaque 96 puits standard, opaque dont les puits ont préalablement été recouverts de PORN à raison de 50 000 cellules par puits. La plaque est ensuite incubée à 37°C et 0.05% CO₂ pendant 5 à 6 heures. Ensuite, le contenu des puits est aspiré et ceux-ci sont lavés avec du PBS pour finalement accueillir du milieu simple frais (sans FBS, ni antibiotiques, ni agents de sélection) contenant la molécule à tester ou le véhicule (DMSO). La concentration finale de DMSO dans chaque puits est de 0.34%. La plaque est ensuite remplacée pour incubation pendant 16 heures (jusqu'au jour 2).

Au **Jour 2**, le contenu des puits est aspiré et ceux-ci sont lavés avec du PBS pour finalement accueillir du tampon Tyrode (CaCl₂ 1mM). Une lecture de fluorescence est ensuite effectuée au *FlexStationII* (excitation à 485 nm et émission à 535 nm). Cette mesure permet d'évaluer l'expression du gène rGFP-CAAX dans les cellules, indépendamment de l'activité de la rLuc. Ensuite, la DBC est ajoutée à chaque puits. Après 5 minutes, une mesure à 400 nm (émission par la rLuc) et une autre à 515 nm (émission par la rGFP) à 37°C est effectuée au *Tristar*.

En effectuant ces manipulations, il a été possible d'obtenir une preuve de concept en lignée cellulaire stable. De plus, en comparant les résultats obtenus pour chacune des sous-populations triées, l'une de ces sous-populations s'est distinguée des autres. C'est donc elle qui a été choisie pour effectuer les tests visant à comparer les méthodes de détection du risque associé à hERG, tel que décrit dans la prochaine section.

3.3 Analyse comparative des profils obtenus pour 25 composés avec HERG-BRET, HERG-Lite® et par *patch-clamp*

Une fois que la lignée cellulaire stable du biosenseur a été générée, une analyse comparative des méthodes de détection mentionnées a pu être réalisée. Vingt-cinq composés appartenant à des classes variées d'inhibiteurs ont été testés avec la méthode HERG-BRET, selon le protocole présenté pour la preuve de concept en lignée stable. Tous les essais ont été réalisés à des passages cellulaires inférieurs à 15. Les résultats ont ensuite été comparés à ceux publiés dans l'article de Wible concernant la méthode *hERG-Lite*® et à la méthode de référence actuelle, soit le *patch-clamp*. [59] La méthode *hERG-Lite*® a été choisie pour l'analyse comparative puisqu'elle est la méthode alternative qui ressemble le plus au biosenseur HERG-BRET. Tel que mentionné précédemment, elle sous-estime toutefois de façon considérable les EC₅₀ comparativement au *patch-clamp*. L'objectif est d'évaluer si, en utilisant le BRET comme technologie de détection, les résultats se rapprochent des valeurs de référence obtenues au *patch-clamp*.

3.3.1 Matériel requis

- Enceinte de sécurité biologique
- Lecteur de plaque pour mesure de fluorescence (*FlexStationII*)
- Lecteur de plaque pour mesure de luminescence/fluorescence (*Tristar*)
- Imprimante à composés HP digital dispenser
- Incubateur 37°C, 0.05% CO₂
- Plaques 96 puits standard, opaques, blanches
- Hématimètre
- Microscope optique à champ inversé.
- Assortiment de pipettes et d'embouts (20µl, 200µl, 1000µl et pipettes à canaux multiples 1200µl)
- Sous-population cellulaire stable choisie (hERG High, rGFP High)
- Polyornithine (PORN)
- Tampon phosphate (PBS) stérile
- Milieu de culture (DMEM)
- Sérum foetal bovin (FBS)
- Pénicilline/Streptomycine (P/S)
- Hygromycine
- Puromycine
- Tampon Tyrode
- Chlorure de calcium (CaCl₂)
- Deep Blue C (DBC)
- Composés de référence à tester
- Véhicule (DMSO)

3.3.2 Grandes lignes du protocole

Au **Jour 1**, les cellules hERG-rLuc et rGFP-CAAX stables sont mises en suspension dans un milieu de culture complet (DMEM, 10%FBS, 1%P/S) contenant 100 µg/ml d'hygromycine et 0.5 µg/ml de puromycine. Celles-ci sont ensuiteensemencées dans une plaque 96 puits standard, opaque dont les puits ont préalablement été recouverts de PORN à raison de 50 000 cellules par puits. La plaque est incubée à 37°C et 0.05% CO₂ pendant 5 à 6 heures. Par la suite, le contenu des puits est aspiré et lavé avec du PBS pour finalement être remplacé par du milieu simple frais (sans FBS, ni antibiotiques, ni agents de sélection) contenant la molécule à tester ou le véhicule (DMSO). La concentration finale de DMSO dans chaque puits est de 0.34%. La plaque est ensuite replacée pour incubation pendant 16 heures (jusqu'au jour 2).

Au **Jour 2**, le contenu des puits est aspiré et ceux-ci sont lavés avec du PBS pour finalement accueillir du tampon Tyrode (CaCl₂ 1mM). Une lecture de fluorescence est d'abord effectuée au *FlexStationII* (excitation à 485 nm et émission à 535 nm). Cette mesure permet d'évaluer l'expression du gène rGFP-CAAX dans les cellules, indépendamment de l'activité de la rLuc. Ensuite, la DBC est ajoutée à chaque puits. Après 5 minutes, une mesure à 400 nm (émission par la rLuc) et une autre à 515 nm (émission par la rGFP) à 37°C sont effectuées au *Tristar*.

Ce protocole a été appliqué afin de générer des courbes de l'effet concentration-dépendent de l'ajout des composés pour les 25 composés à tester. Chaque expérience a été réalisée quatre fois en quadruplicata. Autrement dit, 16 valeurs ont été obtenues pour chaque concentration de chacun des composés.

À la *section 4.3*, des résultats de tests de viabilité cellulaire seront présentés. Comme il s'agit de tests complémentaires effectués en parallèle, le protocole détaillé n'est pas présenté ici. Par contre, le principe de chaque essai sera brièvement exposé à même la *section 4.3*.

3.4 Analyse des données brutes

Lors de l'établissement des courbes de l'effet concentration-dépendent de l'ajout des composés, les mesures de fluorescence (*rGFP*) se sont avérées être un bon indice de la viabilité cellulaire, tel qu'il sera démontré à la *section 4.3*. Toutefois, les comptes *rGFP* basaux (ceux mesurés pour les cellules seulement exposées au véhicule) se sont avérés être très différents d'une manipulation à une autre. Pour cette raison, plutôt que d'établir un seuil *rGFP* au dessous duquel les résultats sont considérés comme faussés par une cytotoxicité, il a plutôt été choisi d'établir un indice cytotoxique relatif à chaque manipulation. Autrement dit, la viabilité cellulaire a été évaluée comme compromise lorsque les comptes *rGFP* s'abaissaient sous le compte basal moins trois fois l'écart type associé à cette même mesure (véhicule – 3 x écart type). Les concentrations de composés pharmaceutiques pour lesquelles cette cytotoxicité a été observée sont traitées séparément (elles sont représentées par un « x » dans les *figures 25 à 49*).

Chaque courbe de l'effet concentration-dépendent de l'ajout des composés a été répétée en 4 essais pour un même composé pharmaceutique (les *figures 25 à 49* présentent les 4 essais). Chacun de ces essais a été réalisé en quadruplicata. Deux lignes horizontales pointillées se retrouvent aussi sur chaque graphe. Elles marquent les limites d'une fenêtre délimitée par le ratio BRET basal (véhicule) \pm (3 x écart type). L'effet d'un composé à une certaine dose est considéré comme significatif si le ratio BRET franchit l'un ou l'autre des seuils délimités par cette fenêtre.

4. Résultats

Les mesures obtenues grâce aux différents appareils ont été analysées à l'aide du programme *Excel* de la suite *Office* et du logiciel *Prism 6* de *GraphPad*. Pour faciliter la lecture des résultats, les figures des *sections 4.1* et *4.2* présentent, mis à part quelques exceptions, les données obtenues seulement avec l'astemizole et le cisapride dans le contexte de courbes de l'effet concentration-dépendent de l'ajout des composés. Ces deux molécules font partie des inhibiteurs fonctionnels les plus puissants parmi ceux testés par Wible.[59]

4.1 Analyse comparative des constructions plasmidiques

Les figures suivantes présentent les résultats obtenus en transfections transitoires pour les constructions dont les sites d'insertion de *rLuc* varient (Nter, S1, S2S3). Les sites d'insertion Nter (*figure 16*) et S2S3 ne permettant pas d'observer de fluctuations d'expression membranaires de hERG, malgré une exposition à de puissants chaperons pharmacologiques, ont été discriminées. La position S1, quant à elle, s'est avéré être adéquate pour détecter les changements dans la localisation de hERG dans la cellule (*figure 17 et 20*). La protéine hERG non mutée ainsi que celle portant la mutation G601S ont aussi été testées. Les fluctuations d'expression membranaires de hERG ont tout aussi bien pu être décelées avec ou sans la mutation G601S (*figure 18*). L'influence de l'étiquette moléculaire HA a également été évaluée. La construction possédant la séquence HA dans la première boucle extracellulaire a permis d'observer des plus grandes fenêtres d'interaction (*figure 19*). Bien que les résultats aient permis d'identifier une seule construction avec laquelle la suite du projet a été réalisée, il sera toujours possible de revenir un pas en arrière au besoin.

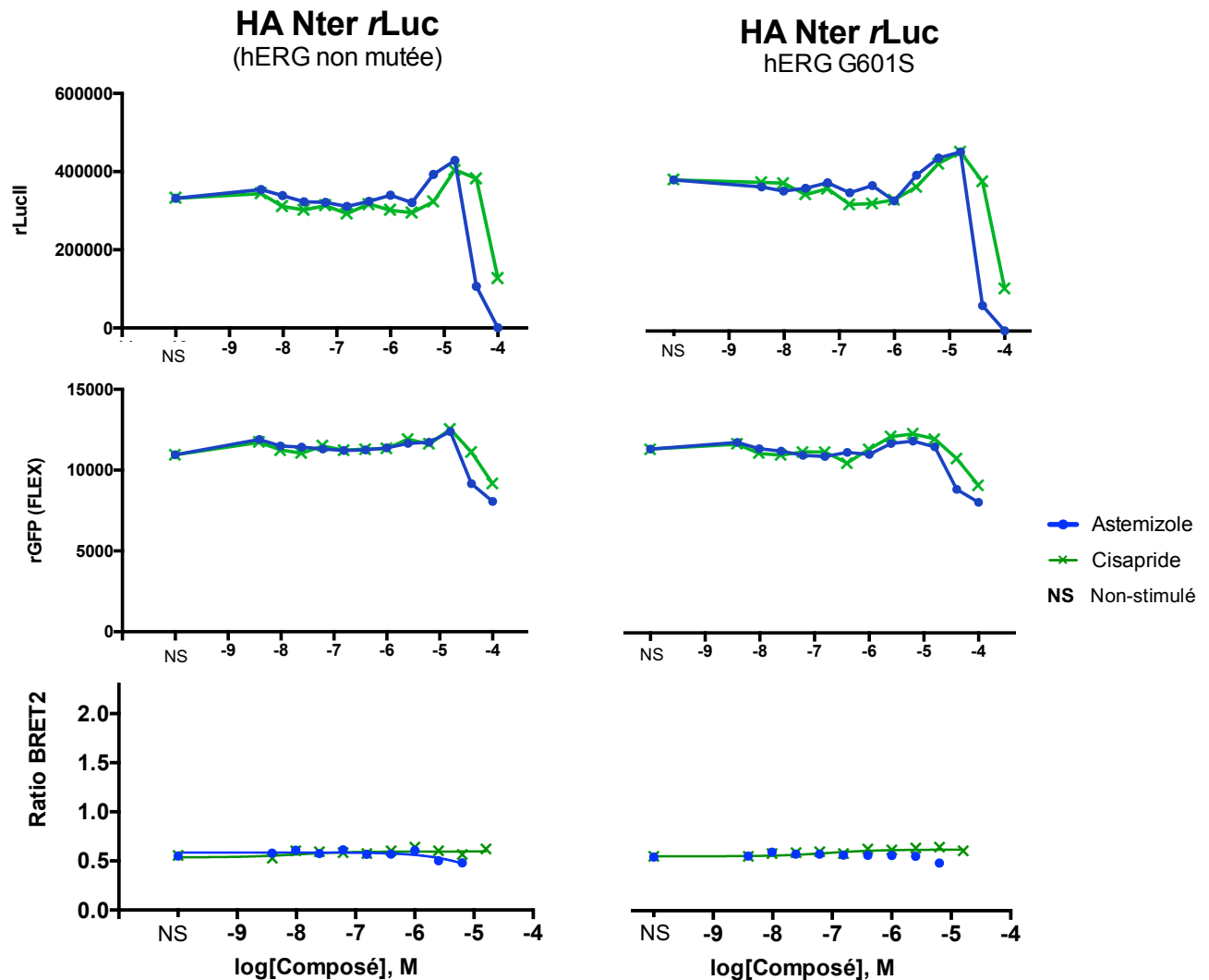


Figure 16. Le site d'insertion Nter ne permet pas d'observer de fluctuation d'expression membranaire de hERG malgré une exposition à de puissants chaperons.

Pour des concentrations croissantes de molécules agissant comme chaperon pharmacologique envers hERG, les ratios BRET semblent demeurer constant tant pour la protéine atteinte de la mutation G601S (panneau inférieur droit) que pour celle qui en est exempte (panneau inférieur gauche). Cette absence de fluctuation n'est toutefois pas liée au niveau d'expression de l'accepteur et du donneur d'énergie, puisque les comptes *rLuc* (panneaux supérieurs) et *rGFP* (panneaux médians) sont relativement élevés dans chacun des cas. Un seul essai de l'effet concentration-dépendent de l'ajout des composés a été effectué avec les constructions ayant *rLuc* en Nter ($N = 1$). Toutefois, des tests de titrations des plasmides en transfections transitoires avaient d'abord été effectués (résultats non présentés, $N = 2$) et suggéraient aussi que la construction plasmidique ne serait pas adéquate pour le développement du biosenseur.

Aucune courbe de l'effet concentration-dépendent de l'ajout des composés n'a été générée pour la construction avec le site d'insertion S2S3, car les résultats préliminaires de titration des vecteurs (résultats non présentés, $N = 3$) laissaient croire que le profil qui serait obtenu avec cette construction serait identique à celui obtenu pour la construction plasmidique dont le site d'insertion était Nter (figure 16). Autrement dit, il n'a pas été nécessaire de se rendre jusqu'aux courbes de l'effet concentration-dépendent de l'ajout des composés avec la construction S2S3 puisque des données préliminaires suggéraient que l'interaction entre le donneur et l'accepteur d'énergie était impossible dans ce modèle, malgré un niveau d'expression adéquat du donneur et de l'accepteur d'énergie.

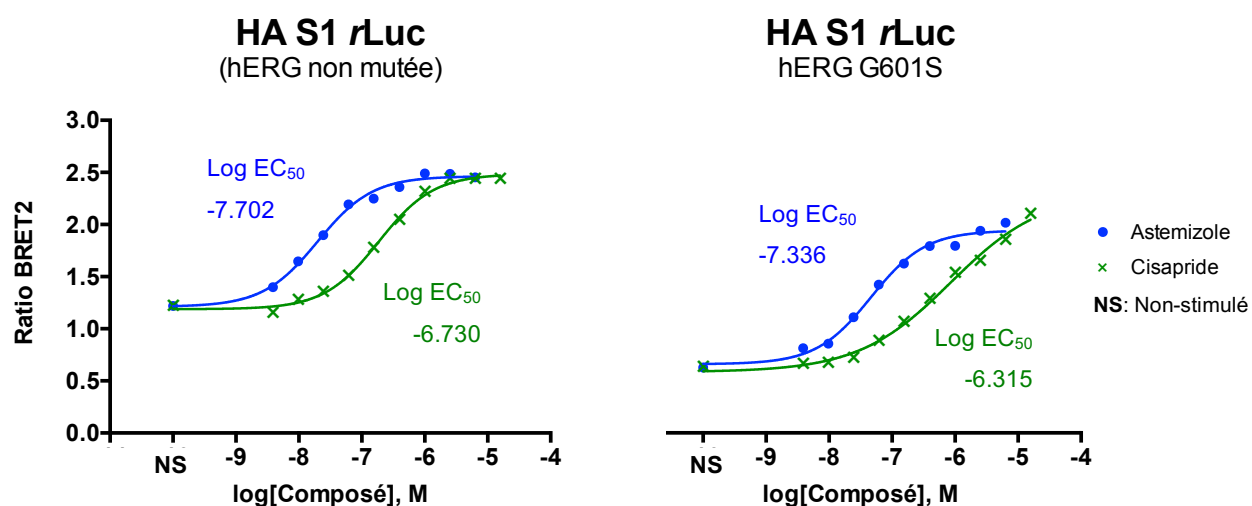


Figure 17. Le site d'insertion S1 permet d'observer d'importantes fluctuations d'expression membranaire de hERG suite à une exposition à de puissants chaperons.

Pour des concentrations croissantes de molécules agissant comme chaperon pharmacologique envers hERG, la réponse augmente jusqu'à l'atteinte éventuelle d'un plateau tant pour la protéine atteinte de la mutation G601S (panneau de droite) que pour celle qui en est exempte (panneau de gauche). $N = 3$. *Seulement une courbe pour chaque construction est représentée ici puisqu'il s'agit de résultats bruts, mais en tout trois essais ont été réalisés, chacun suggérant le même profil.*

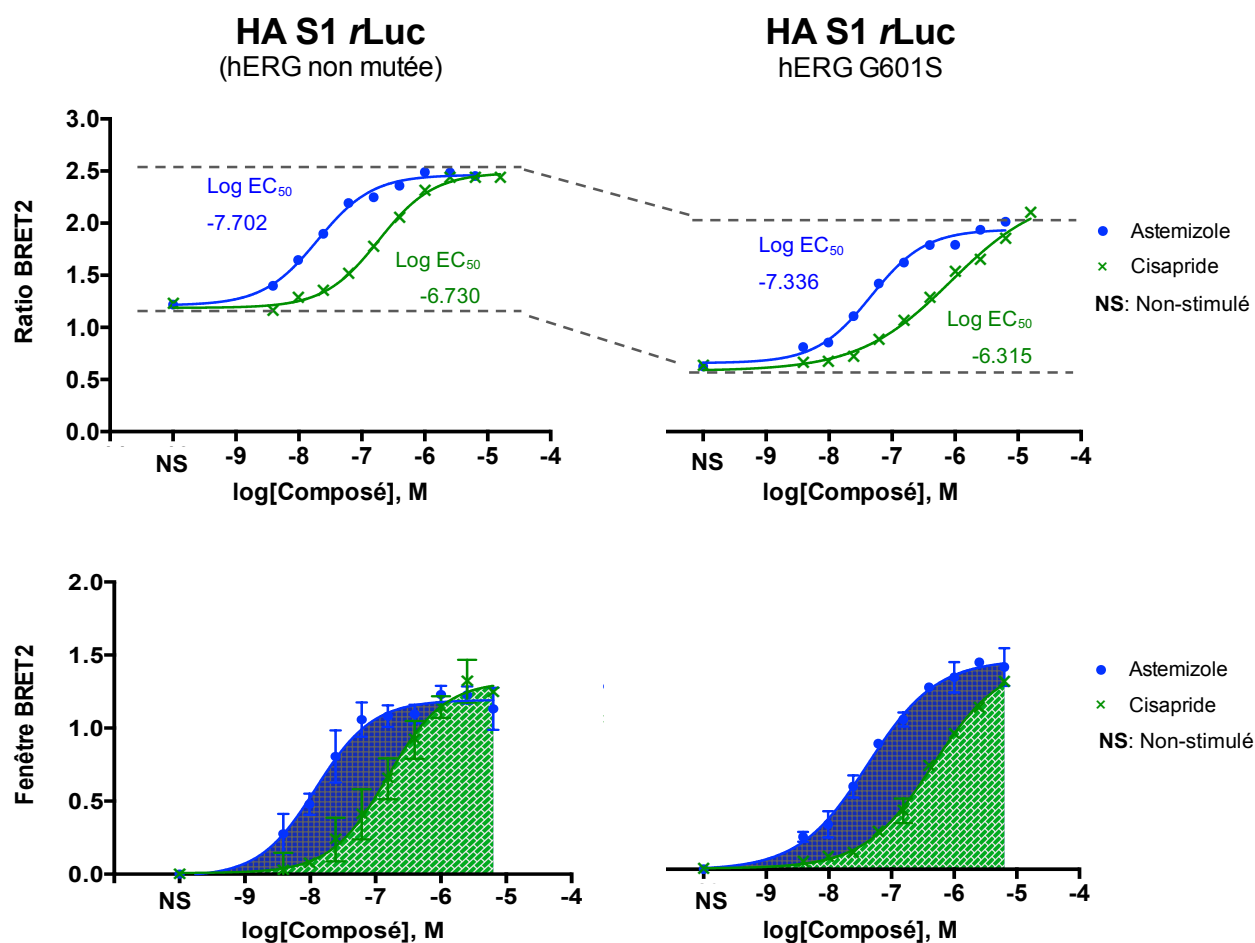
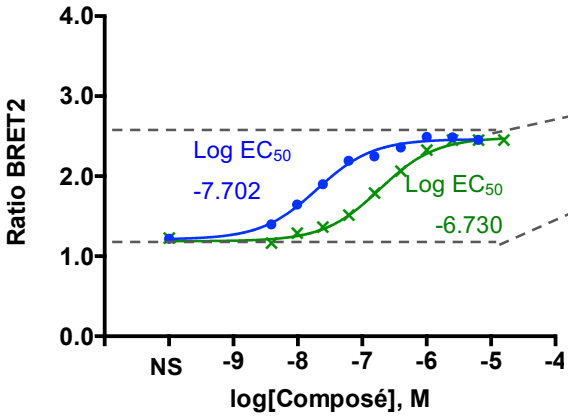


Figure 18. L'effet chaperon des inhibiteurs fonctionnels peut être observé tant pour la protéine atteinte de la mutation G601S que pour celle qui en est exempte.

Cette figure est en fait une adaptation de la *Figure 17*. Les mêmes graphes y sont présentés, mais cette fois-ci avec un accent sur l'ampleur de l'écart entre le niveau basal d'expression membranaire et le plateau. Tel qu'attendu, le niveau basal d'expression est plus bas pour la protéine atteinte de la mutation G601S (panneau supérieur droit), comparativement à celle qui en est exempte (panneau supérieur gauche). Par contre, les fenêtres d'interaction sont similaires dans chacun des cas (panneaux inférieurs). *N = 3. Seulement deux courbes pour chaque construction sont considérées dans les moyennes représentées ici (panneaux inférieurs) puisque les troisièmes ont été effectuées à des concentrations de composés légèrement différentes.*

HA S1 rLuc
(hERG non mutée)



S1 rLuc
(hERG non mutée)

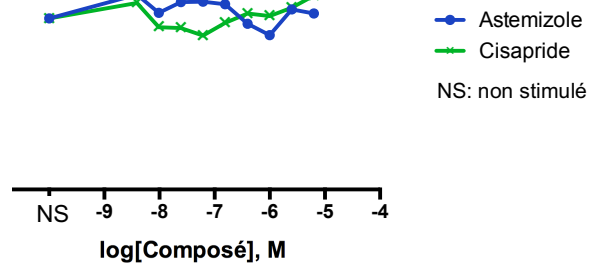
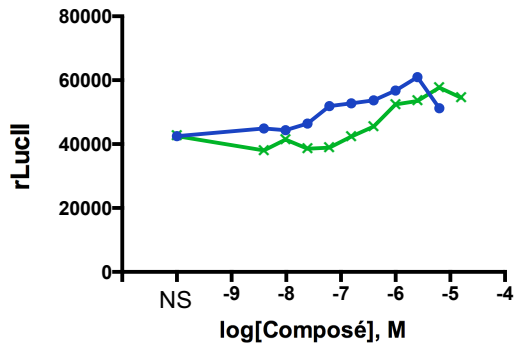
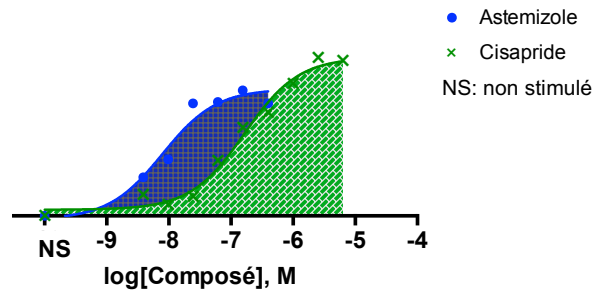
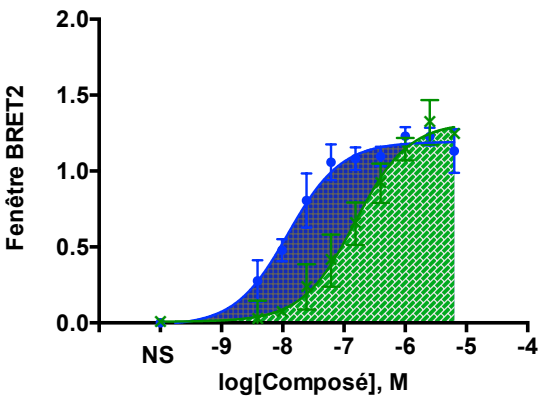
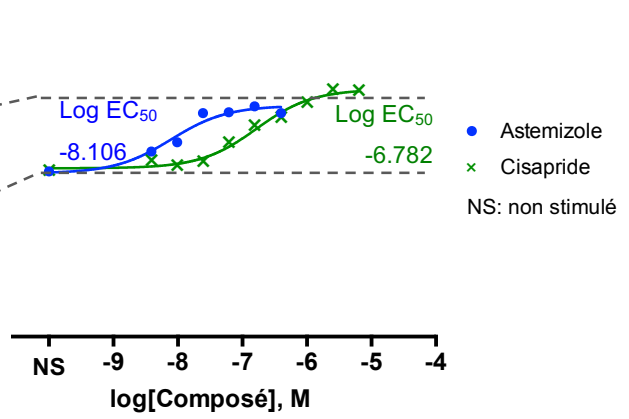


Figure 19. La fenêtre dynamique d'interaction est plus grande lorsque la protéine hERG-rLuc possède l'étiquette HA.

Les cellules exprimant la construction hERG-rLuc possédant l'étiquette HA semblent avoir un niveau de BRET basal plus faible (panneau supérieur gauche) que celle exprimant la construction qui en est exempte (panneau supérieur droite). Comme les comptes de luciférase semblent peu varier d'une construction à l'autre (panneaux inférieurs), il serait plausible de croire que la diminution du signal basal en présence du HA soit due à une altération dans la conformation de la protéine. Le même profil a été observé avec les constructions de hERG G601S avec et sans l'étiquette HA (résultats non présentés). Toutefois, le niveau maximal de BRET perçu ne varie que très peu. Ainsi, la construction hERG-rLuc (HA) offre la plus grande fenêtre d'interaction. $N = 3$ pour les panneaux de gauche (un seul est représenté dans le panneau supérieur et 2 dans le panneau inférieur puisque le troisième a été effectué à des concentrations légèrement différentes). $N = 2$ pour les panneaux de droite, mais un seul a pu être présenté, le second ayant été effectué à des concentrations de composés légèrement différentes.

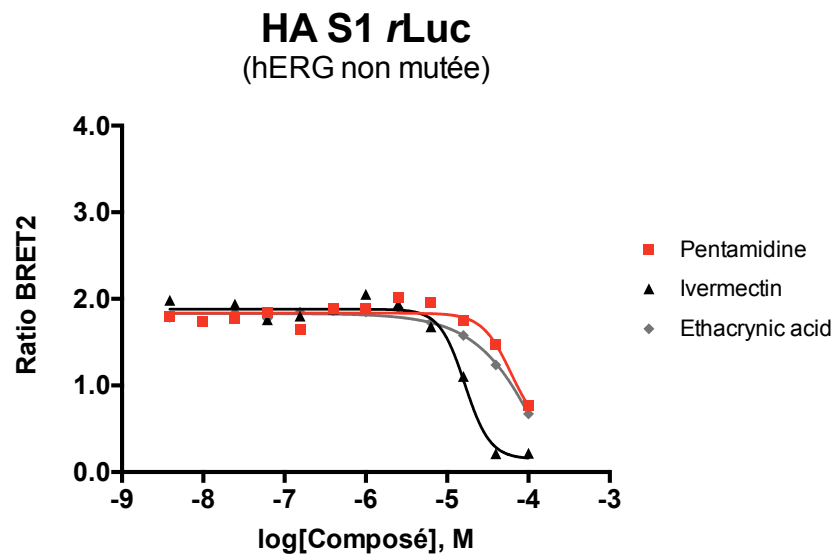


Figure 20. La construction hERG-rLuc (HA/S1) permet aussi la détection des inhibiteurs de translocation.

En plus de détecter les inhibiteurs fonctionnels comme l'astemizole et le cisapride, tel que présenté dans les figures précédentes, cette construction permet de détecter un abaissement du niveau de localisation membranaire de hERG par des inhibiteurs de translocation. La pentamidine, l'ivermectin et l'acide éthacrynique sont des inhibiteurs de translocation présentés dans l'article de Wible. [59] $N = 1$

4.2 Preuve de concept en lignée cellulaire stable

Les résultats ci-dessous (*Figure 21*) sont issus de transfections transitoires effectuées dans des cellules HEK293 avant de passer à la conception d'une lignée stable. Ils consistent en des titrations de plasmides codant pour le gène hERG-*rLuc* (HA/S1) d'une part dans le vecteur pcDNA3 et d'autre part dans le vecteur pIRES. Ces résultats permettront de valider que le clonage de la séquence codante pour hERG-*rLuc* (HA/S1) dans le vecteur pIRES n'influence pas les ratios BRET observables.

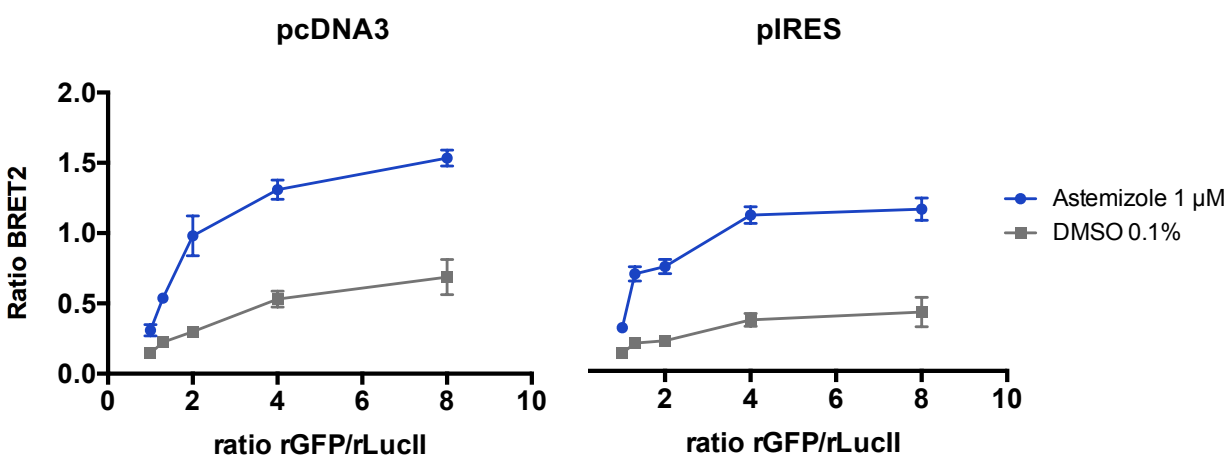


Figure 21. Le transfert du gène codant pour hERG-*rLuc* (HA/S1) dans le vecteur pIRES n'affecte pas l'expression de la protéine.

Plus le ratio de l'ADN plasmidique *rGFP/rLuc* transfecté est grand, plus la fenêtre entre les conditions stimulées et non stimulées est grande. Dans cet essai, la quantité de *rGFP* transfectée est fixée à 4.8 ng/puits. C'est la quantité de *rLuc* transfectée qui varie d'une condition à l'autre. Ce résultat suggère que le transfert dans le vecteur pIRES n'influence pas l'expression du gène. *N = 2 (réalisé en quadruplicata), seulement un est représenté ici puisque les concentrations de plasmide utilisées étaient légèrement différentes lors du second essai.*

Suite à la validation du plasmide en vecteur pIRES, une transfection stable a pu être effectuée dans les cellules stables *rGFP-CAAX*. Ceci a permis de générer une population de cellules exprimant de façon stable hERG-*rLuc* (HA/S1) et *rGFP-CAAX*. Le niveau d'expression des deux constituants du biosenseur dans les cellules générées n'étant pas homogène, il a fallu trier les cellules en sous-populations.

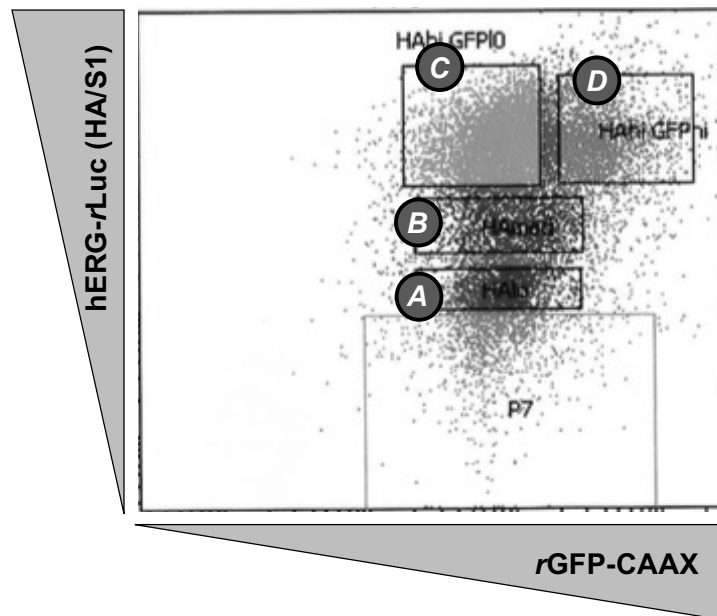


Figure 22. Le tri de la population cellulaire a permis de sélectionner 4 sous-populations stables exprimant hERG-rLuc (HA/S1) et rGFP-CAAX à des niveaux variés.

À partir de la population de cellules transfectées, 4 sous-populations ont été recueillies et amplifiées pour des essais comparatifs : hERG Low rGFP Low (A), hERG Med rGFP Low (B), hERG High rGFP Low (C) et hERG High rGFP High (D). La détection du niveau d'expression de hERG-rLuc (HA/S1) a été permise par immunodétection de l'étiquette HA, tandis que la détection du niveau d'expression de rGFP-CAAX a été permise grâce à la propriété intrinsèque de fluorescence de la GFP.

Les sous-populations recueillies lors du tri ont ensuite été comparées dans le contexte d'essai de l'effet concentration-dépendant de l'ajout de composé afin d'en identifier qu'une seule avec laquelle les prochaines étapes seraient effectuées.

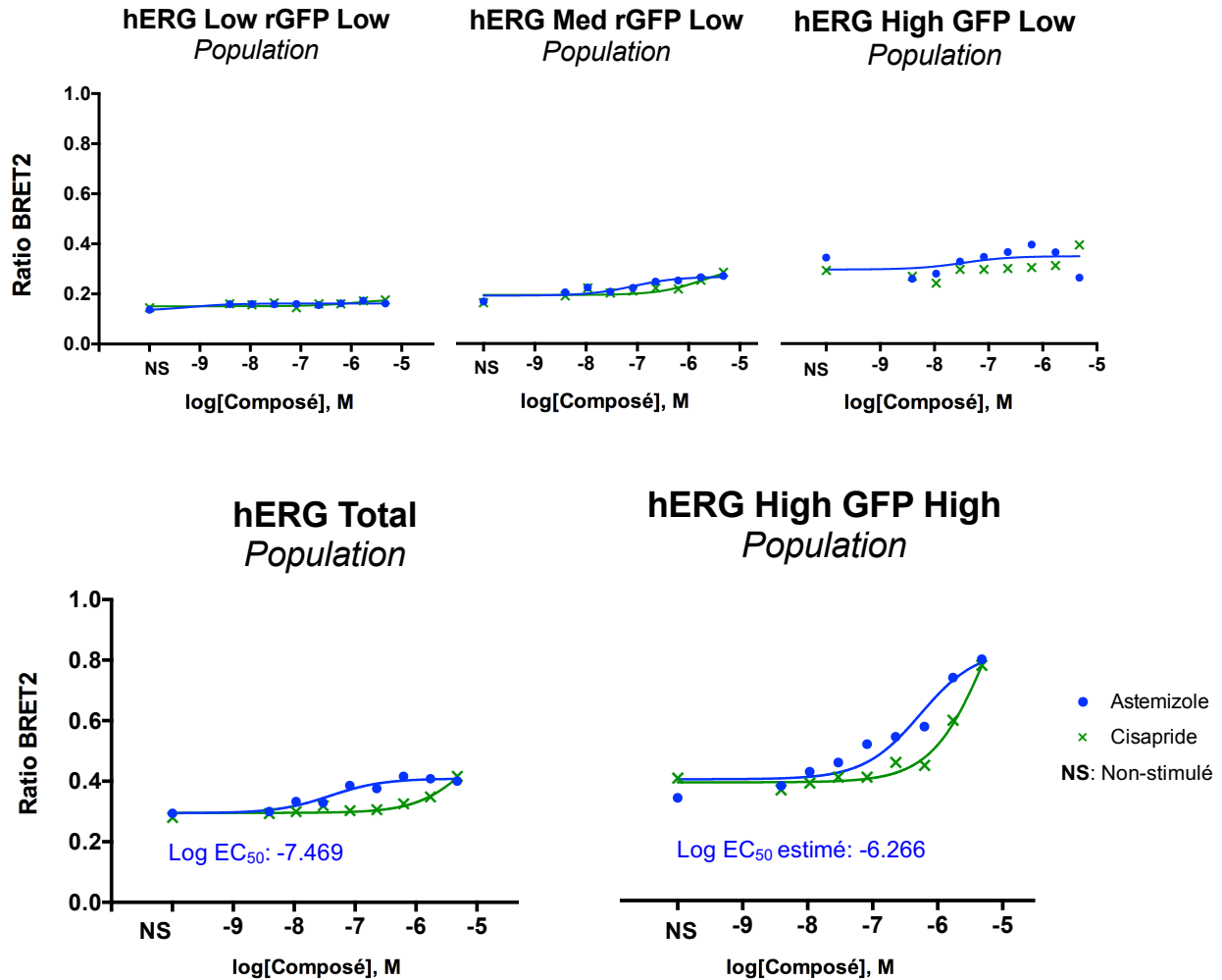


Figure 23. La sous-population exprimant le plus fortement hERG-rLuc (HA/S1) et rGFP-CAAX permet une meilleure fenêtre d'interaction comparativement aux autres.

Parmi les 4 sous-populations stables générées et triées, la population *hERG High rGFP High* est celle qui possède le plus haut niveau basal et qui permet la plus grande fenêtre d'interaction. L'écart entre le niveau d'expression basal et maximal est toutefois plus petit (~0.4) que celui obtenu en transfections transitoires (~1.5), vu aux *Figures 17, 18* et *19*. *N = 1*. Comme toutes les sous-populations générées ont été congelées, il sera toujours possible de revenir un pas en arrière. Cet essai a été réalisé à nouveau avec les populations *hERG Total* et *hERG High GFP High* (*N=4*) pour confirmer le choix de la sous-population. Ces résultats additionnels serviront à l'analyse comparative de la section 4.3.

4.3 Analyse comparative des profils obtenus pour 25 composés avec HERG-BRET, *HERG-Lite*® et par *patch-clamp*

Dans cette section, les résultats de courbes de l'effet concentration-dépendant de l'ajout de composé générées pour une sélection de 25 composés ayant un effet potentiel sur hERG sont présentés. À la fin de cette série de figures, deux tableaux permettront de soulever les points importants des résultats obtenus. Ceux-ci seront ensuite discutés dans la *Section 5*.

Avant de procéder à l'analyse des résultats, il est nécessaire d'identifier un moyen de distinguer l'effet d'un composé envers hERG de celui d'un même composé sur l'ensemble de la cellule. Autrement dit, il est important de pouvoir identifier les concentrations auxquelles les composés occasionnent une toxicité cellulaire. Pour ce faire, le protocole de viabilité cellulaire alamarBlue® (Thermo Fisher Scientific) a d'abord été utilisé pour évaluer l'activité réductrice des cellules envers le resazurin, indice de la viabilité des cellules. Les résultats ont ensuite été comparés à deux lectures de fluorescence donnant un indice de la densité cellulaire : la coloration des noyaux aux DAPI et la coloration intrinsèque des cellules utilisées qui expriment une GFP ancrée à la PM. Ces méthodes ont été comparées afin de mettre en évidence que la lecture de l'intensité du signal *rGFP* suffit pour donner un indice fiable de la densité et de la viabilité cellulaire (*Tableau III* et *figure 24*).

Tableau III. La mesure du signal rGFP est suffisante pour donner un indice fiable de la viabilité cellulaire.

Dans chaque colonne d'une plaque à 96 puits, un nombre déterminé de cellules de la sous population stable *hERG High rGFP High* ont étéensemencées. Le lendemain, trois méthodes différentes ont été utilisées pour évaluer leur capacité à révéler le nombre de cellules viables présentes dans chaque puits. Les résultats ont tous été calculés en considérant 50 000 cellules/puits comme la mesure de référence (100%). Les comptes rGFP sont une mesure directe du nombre de membranes cytoplasmiques (auxquelles sont ancrés les marqueurs fluorescents) dans les puits. Les comptes DAPI sont une mesure directe du nombre de noyaux présents au fond des puits. Les valeurs associées au *resazurin* sont des mesures indirectes de l'activité oxydative des cellules (indice de la prolifération cellulaire). Trois essais ont été effectués pour chacun des tests. Chacun des essais ont été effectués avec 8 répliques. Seules les moyennes sont présentées pour alléger la lecture.

| Nombre de cellules ensemencées (x 1000) | 0 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 |
|---|---|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Viabilité attendue (%) | 0 | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 | 120 | 140 | 160 | 180 |
| Viabilité évaluée avec les comptes rGFP (%) | 0 | 13 | 26 | 62 | 87 | 100 | 131 | 152 | 177 | 188 |
| Viabilité évaluée avec les comptes DAPI (%) | 0 | 4 | 28 | 59 | 90 | 100 | 132 | 143 | 159 | 159 |
| Viabilité évaluée avec le Resazurin (%) | 0 | 11 | 31 | 51 | 74 | 100 | 133 | 158 | 185 | 189 |

Ainsi, en mesurant l'intensité du signal de fluorescence émis par la rGFP suite à une excitation à l'aide d'un faisceau lumineux (*FlexStationII*), il est possible d'évaluer la proportion de cellules viables présentes dans chaque puits. La figure suivante présente les valeurs brutes de fluorescences de la rGFP mesurés en fonction de la densité cellulaire.

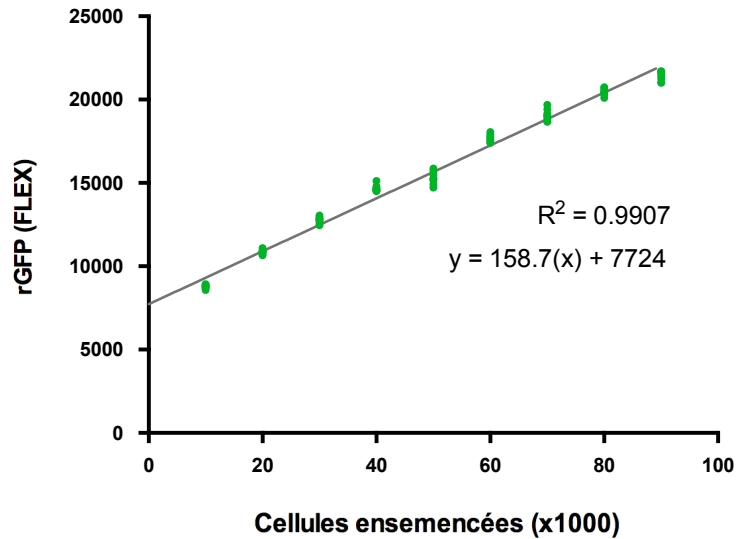


Figure 24. Relation entre les comptes rGFP et la densité cellulaire.

Trois essais ont été effectués pour ce test. Chacun des essais ont été effectués avec 8 réplicas. Les résultats d'un seul essai sont présentés ci-haut. Ceux-ci représentent très bien l'ensemble des résultats.

Les prochaines figures présentent les résultats bruts de courbes de l'effet concentration-dépendant de l'ajout des composés obtenues pour les 25 composés testés (en ordre alphabétique). Ces figures seront suivies de tableaux récapitulatifs qui résument les grandes lignes des résultats obtenus avec la méthode HERG-BRET et les comparent aux méthodes *hERG-Lite*® et *patch-clamp*.

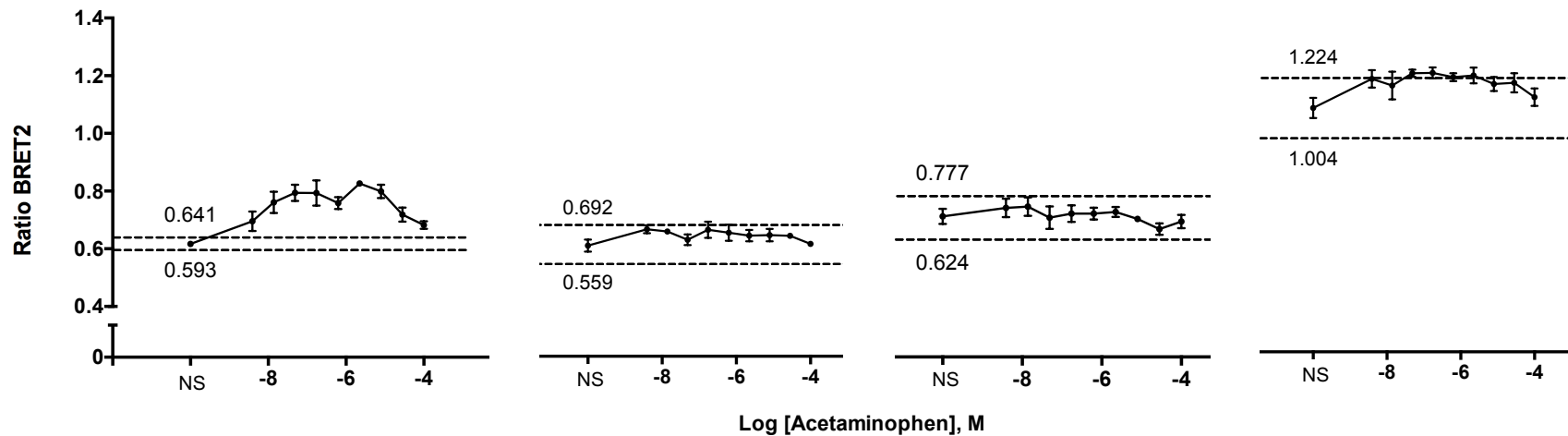


Figure 25. Comportement du biosenseur HERG-BRET lors d'une exposition à l'acétaminophène (témoin).

Ce composé est décrit dans la littérature pour n'avoir aucun effet sur l'activité ou le trafic du canal Kv11.1. À l'exception du premier essai, les fluctuations de ratio BRET en fonction de la dose d'acétaminophène se situent à l'intérieur de la fenêtre délimitée par la moyenne du véhicule \pm (3 x écart type). De plus, aucune cytotoxicité n'a été observée aux concentrations testées. NS : Non stimulé.

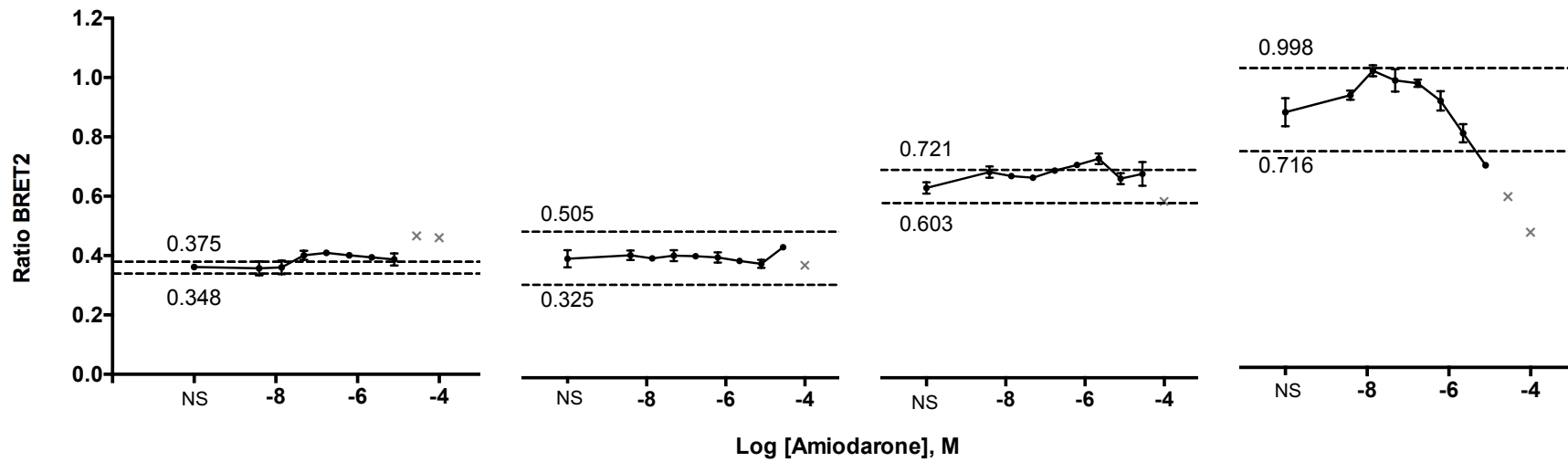


Figure 26. Aucune tendance ne peut être observée quant à l'effet de l'amiodarone sur hERG.

Pour tous les essais, les ratios BRET ne s'éloignent que peu ou pas de la fenêtre délimitée par la moyenne du véhicule \pm (3 x écart type). Lors des 4 essais, la dose la plus élevée a causé une cytotoxicité (valeurs identifiées par un x). Aussi, pour les essais 1 et 4, le log [amiodarone] de -4.55 a causé une cytotoxicité. NS : Non stimulé.

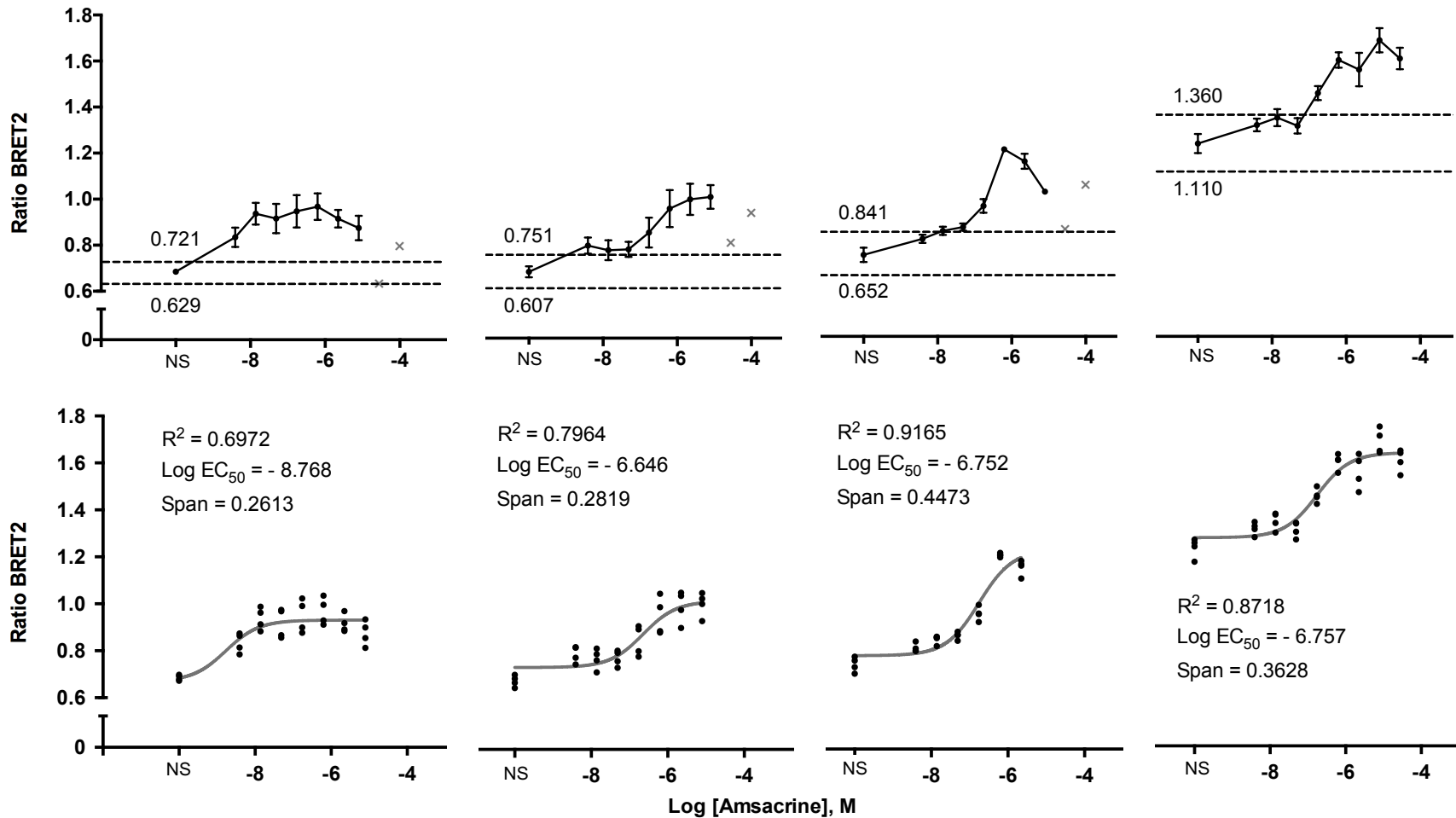


Figure 27. L'amsacrine agit comme chaperon pharmacologique envers hERG.

Pour tous les essais, les ratios dépassent la fenêtre délimitée par la moyenne du véhicule ± (3 x écart type). Pour les 3 premiers essais, les log [amsacrine] de -4.55 et de -4.00 ont causé une cytotoxicité (valeurs identifiées par un x). Le ratio relatif au log [amsacrine] de -4.00 est manquant pour le 4^e essai (problème technique). Les panneaux inférieurs présentent les mêmes données que les panneaux supérieurs correspondant, mais ils affichent les informations relatives à l'effet chaperon seulement. NS : Non stimulé.

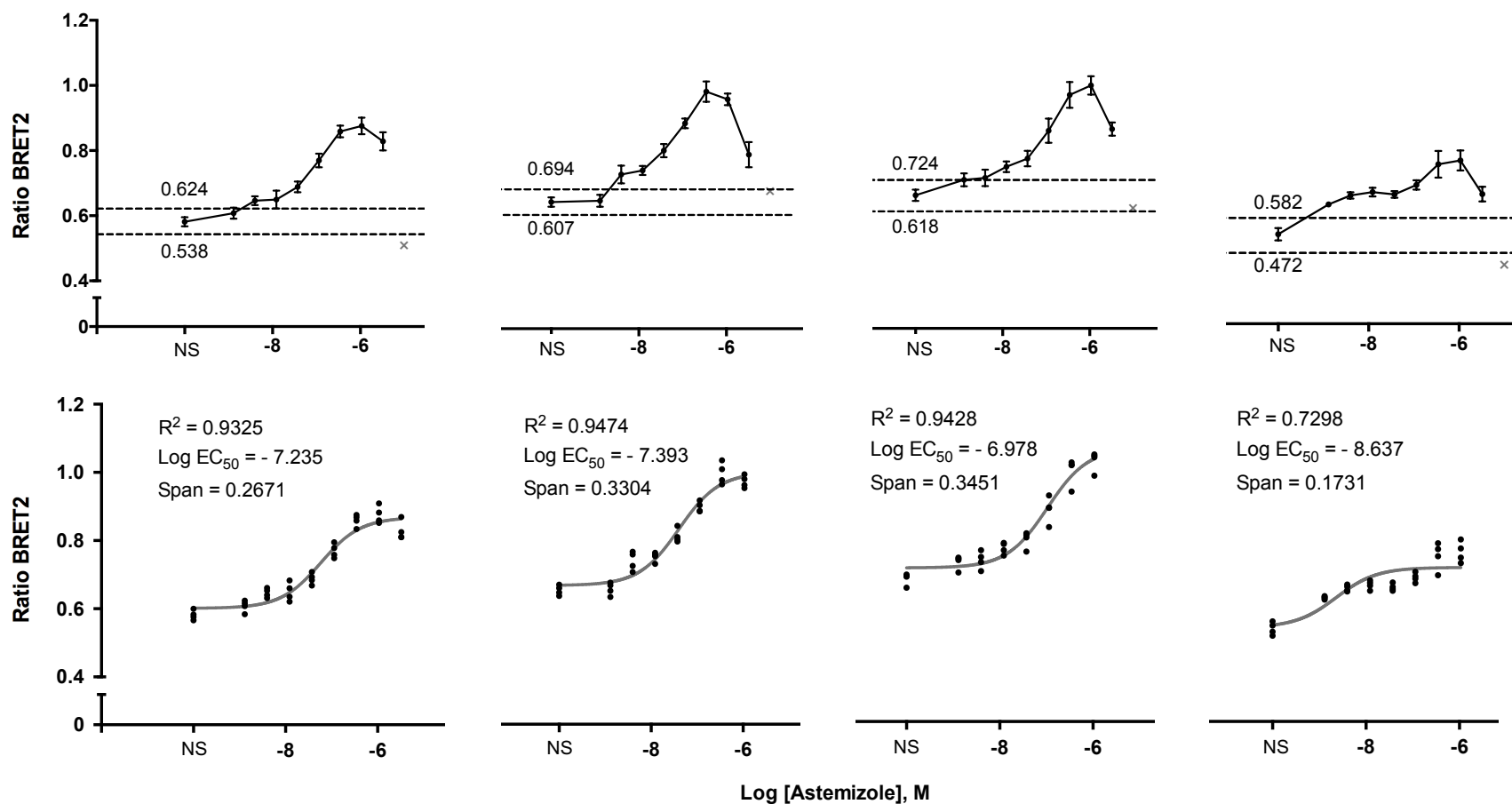


Figure 28. L'astemizole agit comme chaperon pharmacologique envers hERG.

Pour tous les essais, les ratios dépassent la fenêtre délimitée par la moyenne du véhicule \pm (3 x écart type). Aussi, le log [astemizole] de -4.00 a causé une cytotoxicité (valeurs identifiées par un x). Les panneaux inférieurs présentent les mêmes données que les panneaux supérieurs correspondant, mais ils affichent les informations relatives à l'effet chaperon seulement. NS : Non stimulé.

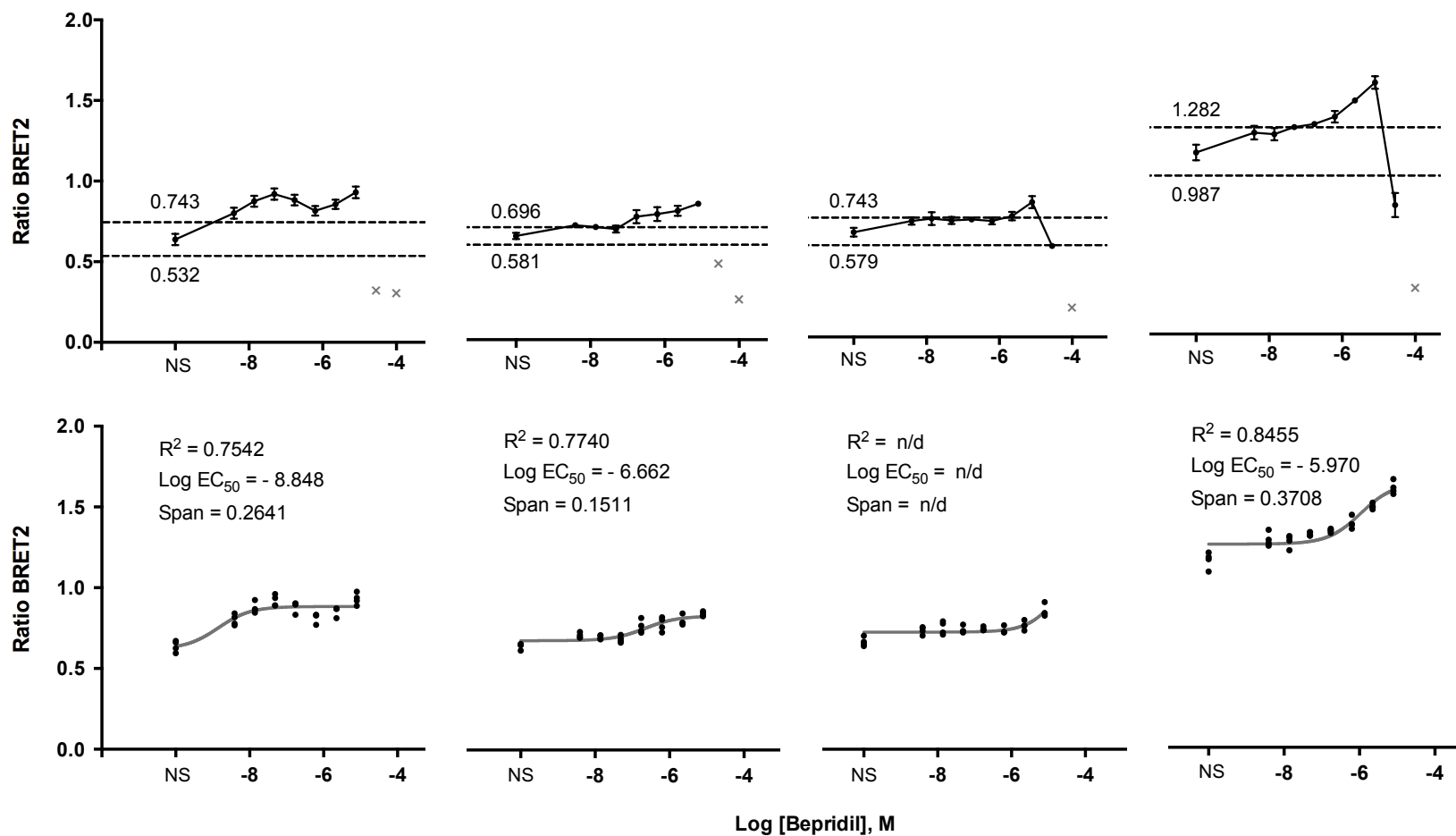


Figure 29. Le bepridil agit comme chaperon pharmacologique envers hERG.

Pour tous les essais, les ratios dépassent la fenêtre délimitée par la moyenne du véhicule \pm (3 x écart type). Aussi, le log [bepridil] de -4.00 a causé une cytotoxicité (valeurs identifiées par un x) lors des 4 essais et celui de -4.55 a causé une cytotoxicité lors des deux premiers essais. Les panneaux inférieurs présentent les mêmes données que les panneaux supérieurs correspondant, mais ils affichent les informations relatives à l'effet chaperon seulement. Ces informations sont non disponibles (n/d) pour le 3^e essai puisque la courbe sigmoïdale tracée n'en est qu'au début de sa phase ascendante. NS : Non stimulé.

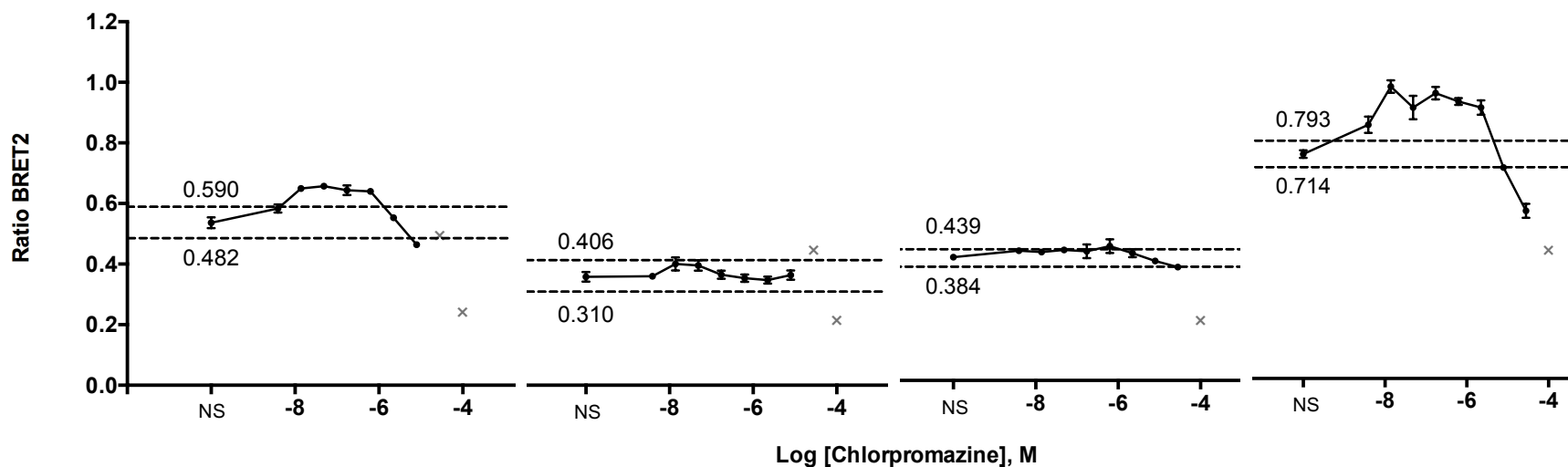


Figure 30. Aucune tendance ne peut être observée quant à l'effet de la chlorpromazine sur hERG.

Pour les essais 2 et 3 (2 graphes centraux), les ratios BRET ne s'éloignent que peu ou pas de la fenêtre délimitée par la moyenne du véhicule \pm (3 x écart type). Pour ce qui est du 1^{er} et du 4^e essai, les ratios traversent la limite supérieure de cette fenêtre, puis s'abaissent sous sa limite inférieure. Aussi, une cytotoxicité a pu être observée pour le log [chlorpromazine] de -4.00 lors de chaque essai et pour celui de -4.55 lors des deux premiers essais (valeurs identifiées par un x). NS : Non stimulé.

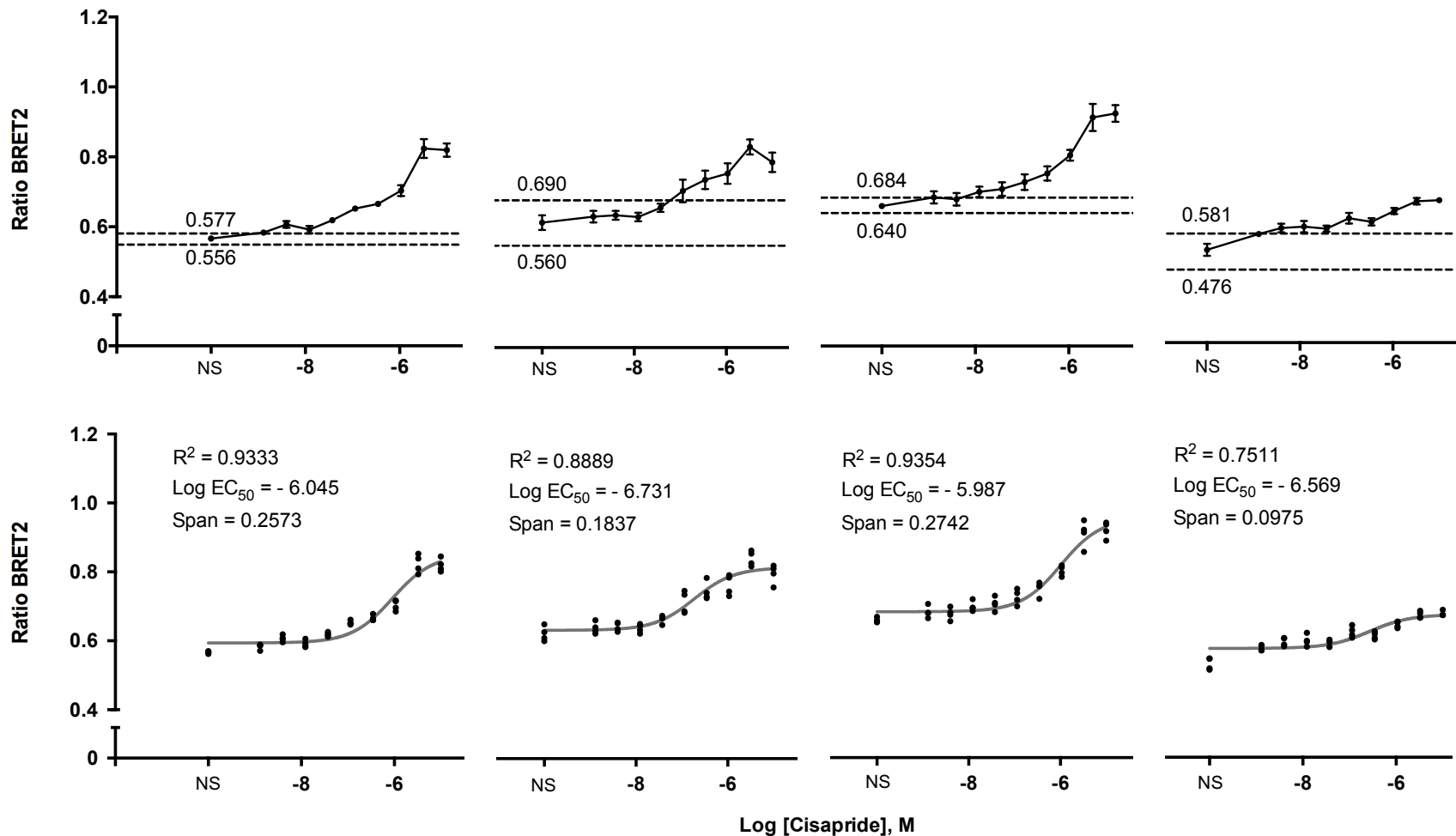


Figure 31. Le cisapride agit comme chaperon pharmacologique envers hERG.

Pour tous les essais, les ratios dépassent la fenêtre délimitée par la moyenne du véhicule \pm (3 x écart type). Aucune cytotoxicité n'a été observée aux concentrations testées. Les panneaux inférieurs présentent les mêmes données que les panneaux supérieurs correspondant, mais ils affichent les informations relatives à l'effet chaperon seulement. NS : Non stimulé.

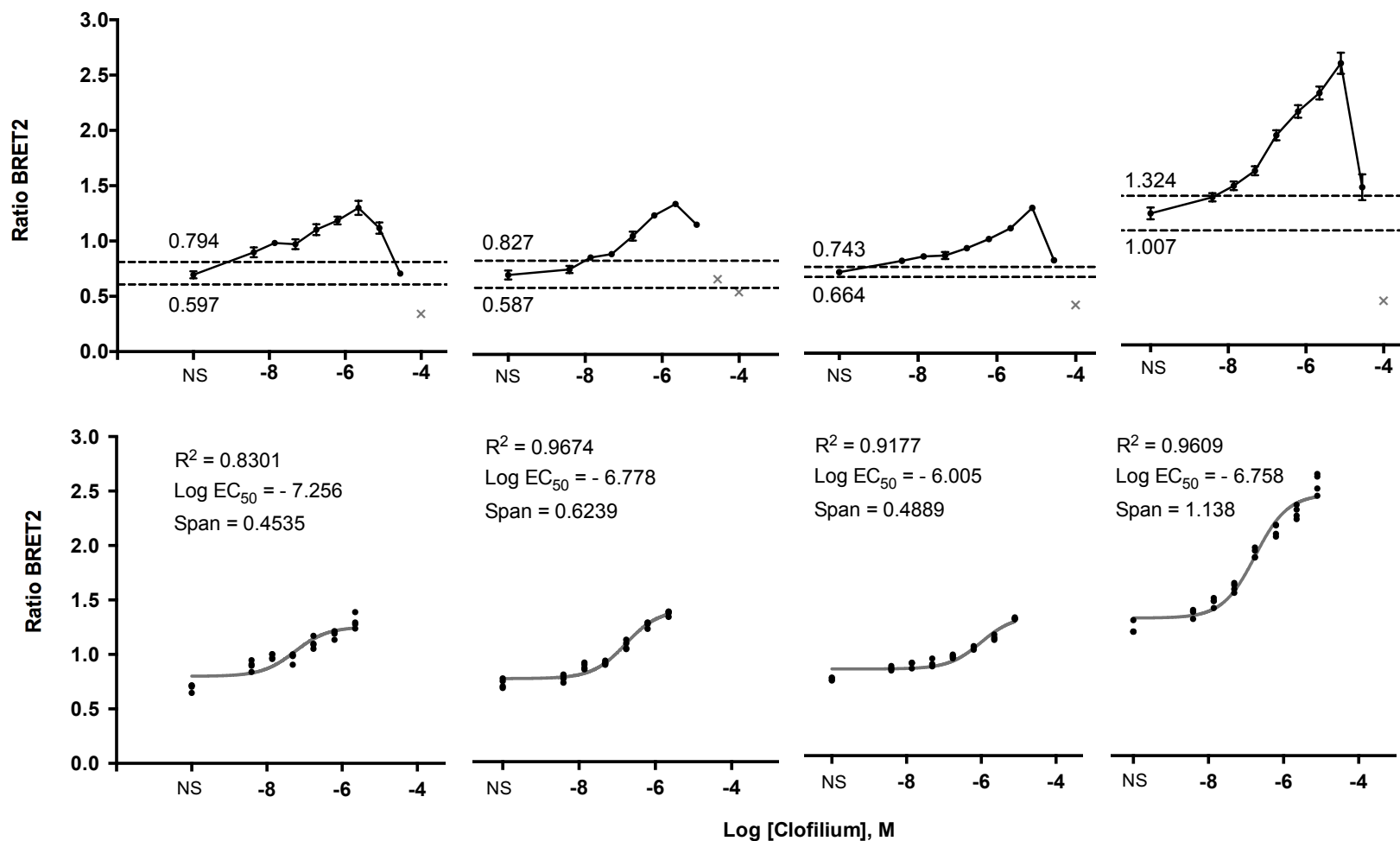


Figure 32. Le clofilium agit comme chaperon pharmacologique envers hERG.

Pour tous les essais, les ratios dépassent la fenêtre délimitée par la moyenne du véhicule \pm (3 x écart type). Aussi, une cytotoxicité a pu être observée pour le log [clofilium] de -4.00 lors de chaque essai et pour celui de -4.55 lors du deuxième essai (valeurs identifiées par un x). Les panneaux inférieurs présentent les mêmes données que les panneaux supérieurs correspondant, mais ils affichent les informations relatives à l'effet chaperon seulement. NS : Non stimulé.

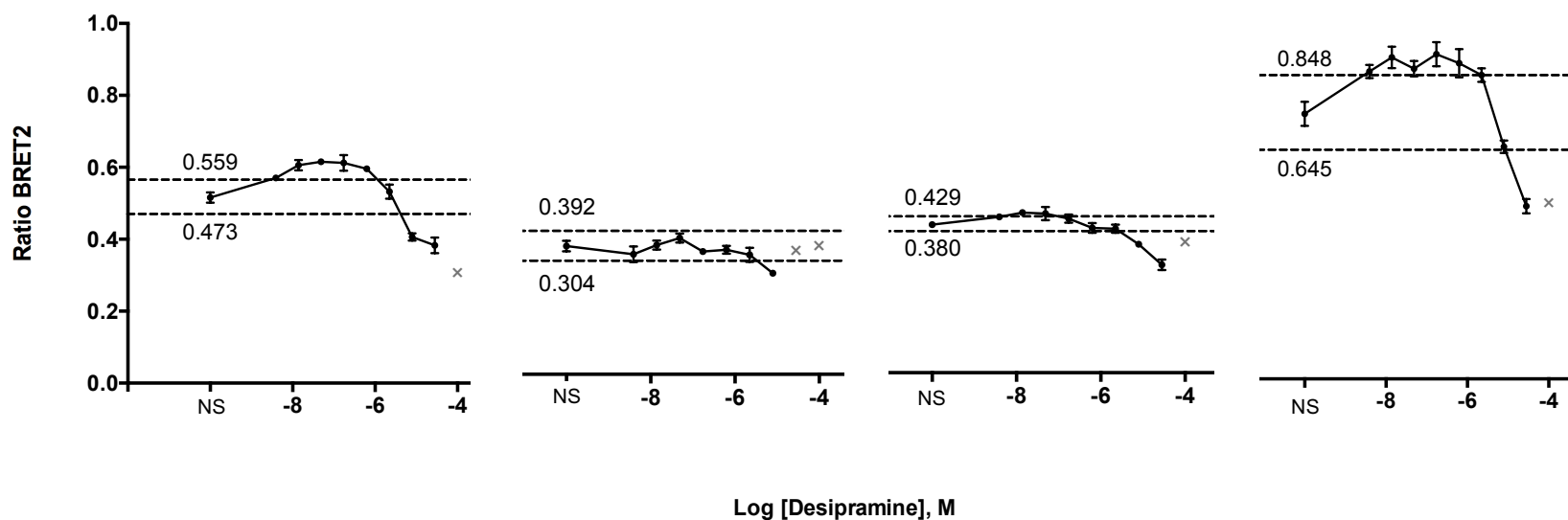


Figure 33. La desipramine semble inhiber le trafic de hERG.

Pour tous les essais, les ratios franchissent la limite inférieure de la fenêtre délimitée par la moyenne du véhicule \pm (3 x écart type).

Aussi, le log [desipramine] de -4.00 a causé une cytotoxicité (valeurs identifiées par un x) lors de chacun des essais. Celui de -4.55 a aussi causé une cytotoxicité dans le cas du deuxième essai. NS : Non stimulé.

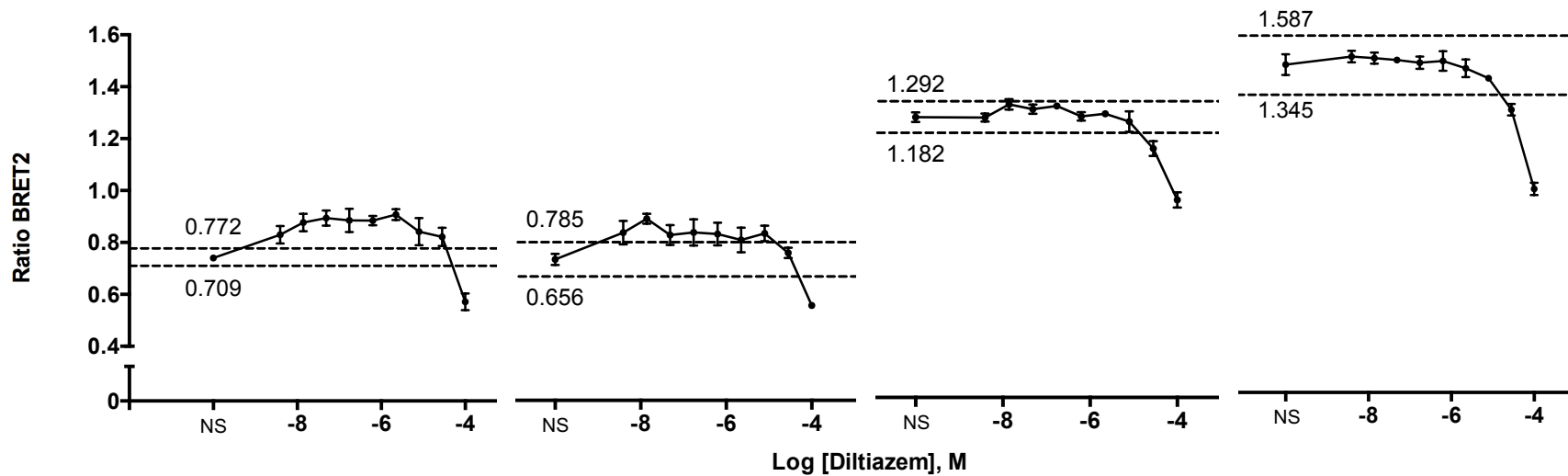


Figure 34. Le diltiazem semble inhiber le trafic de hERG.

Pour tous les essais, les ratios franchissent la limite inférieure de la fenêtre délimitée par la moyenne du véhicule \pm (3 x écart type).

De plus, aucune cytotoxicité n'a été observée aux concentrations testées. NS : Non stimulé.

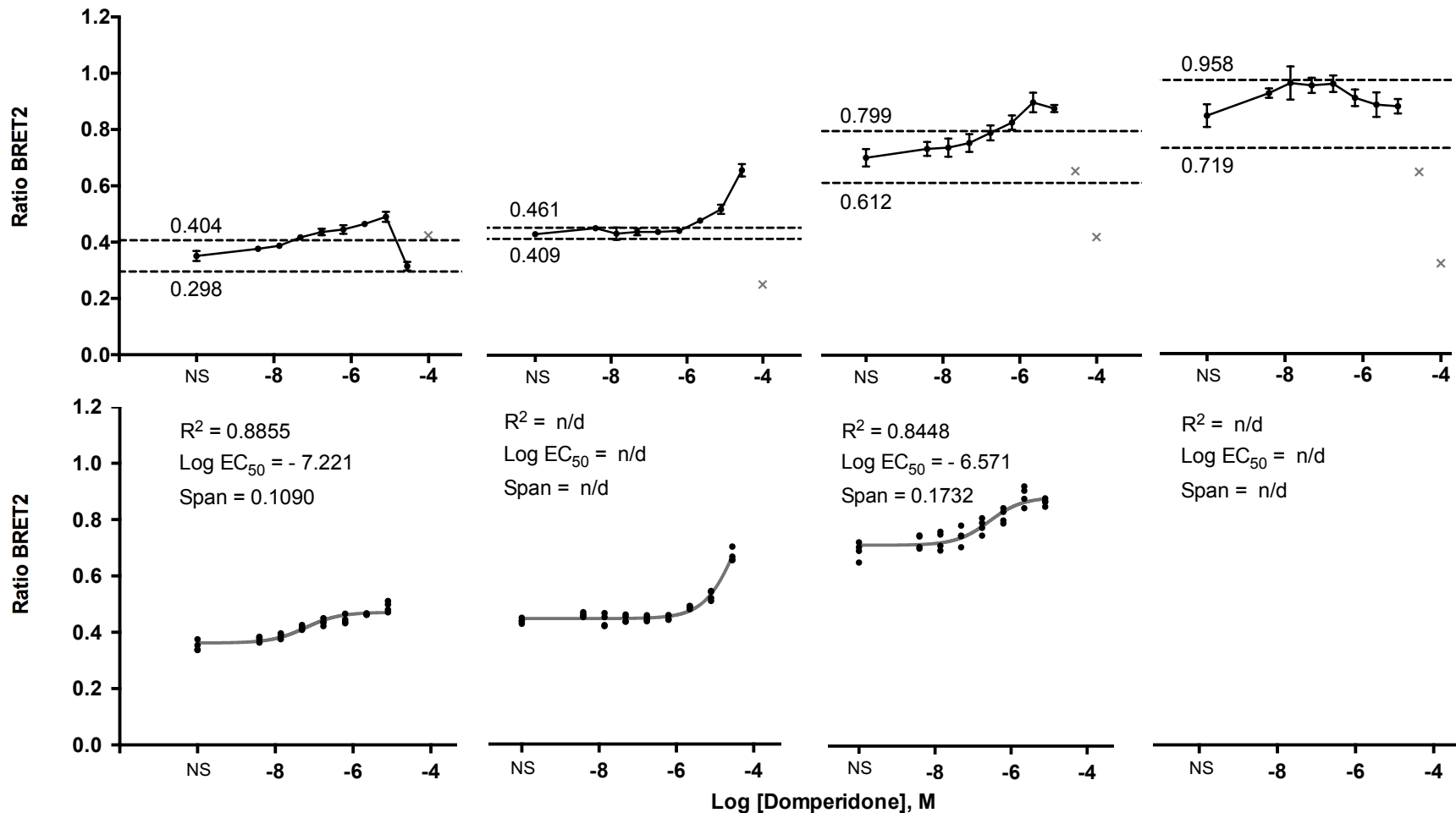


Figure 35. Le domperidone agit comme chaperon pharmacologique envers hERG.

Pour les 3 premiers essais, les courbes franchissent le seuil supérieur de la fenêtre délimitée par la moyenne du véhicule \pm (3 x écart type). Aussi, le log [domperidone] de -4.00 a causé une cytotoxicité (valeurs identifiées par un x) lors des 4 essais et celui de -4.55 a causé une cytotoxicité lors des deux derniers essais. Les panneaux inférieurs présentent les mêmes données que les panneaux supérieurs correspondant, mais ils affichent les informations relatives à l'effet chaperon seulement. Ces informations sont non disponibles (n/d) pour le 2^e et le 4^e essai. NS : Non stimulé.

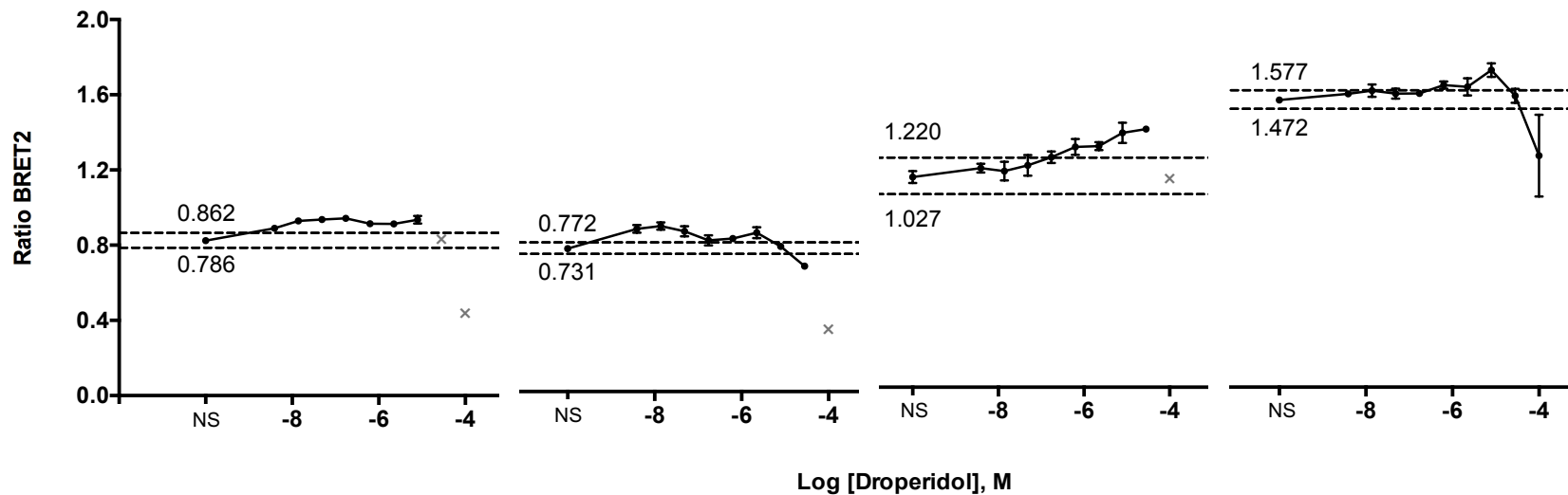


Figure 36. Aucune tendance ne peut être observée quant à l'effet du droperidol sur hERG.

Pour tous les essais, les ratios BRET débordent de la fenêtre délimitée par la moyenne du véhicule \pm (3 x écart type). Ils franchissent la limite supérieure dans tous les cas, mais redescendent sous la limite inférieure pour les essais 2 et 4. Lors des 3 premiers essais, la dose la plus élevée a causé une cytotoxicité (valeurs identifiées par un x). Lors du premier essai, le log [Droperidol] de -4.55 a aussi causé une cytotoxicité. NS : Non stimulé.

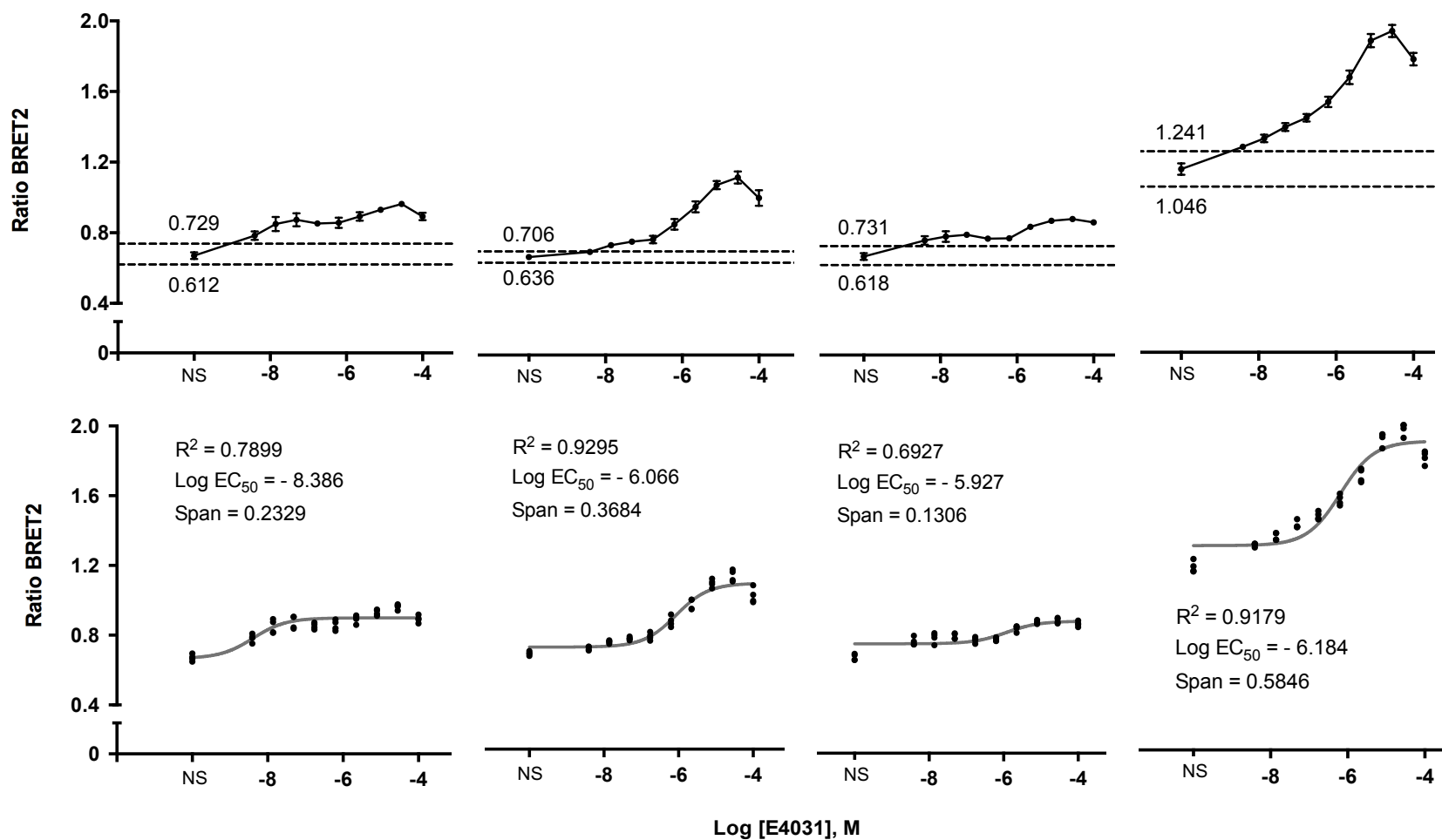


Figure 37. Le E4031 agit comme chaperon pharmacologique envers hERG.

Pour tous les essais, les courbes franchissent la limite supérieure de la fenêtre délimitée par la moyenne du véhicule \pm (3 x écart type). Aussi, aucune des doses testées n'occasionne une cytotoxicité. Les panneaux inférieurs présentent les mêmes données que les panneaux supérieurs correspondant, mais ils affichent les informations relatives à l'effet chaperon seulement. NS : Non stimulé.

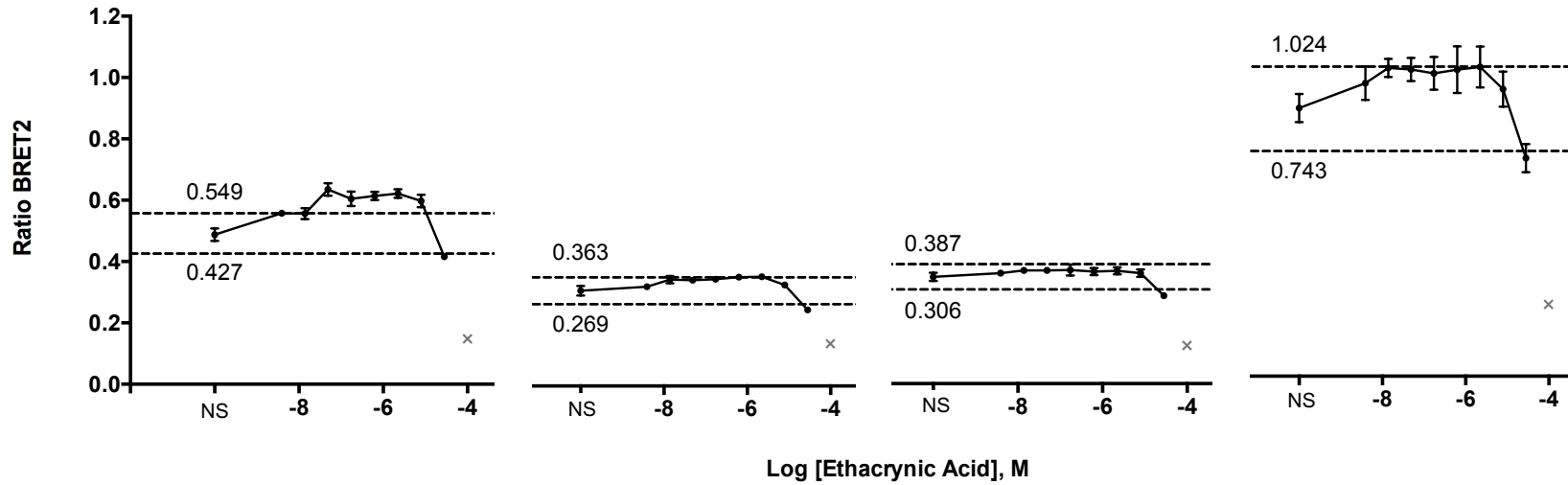


Figure 38. L'acide éthacryinique semble inhiber le trafic de hERG.

Pour tous les essais, les ratios BRET débordent légèrement de la fenêtre délimitée par la moyenne du véhicule $\pm (3 \times \text{écart type})$. Les ratios BRET relatifs au log [Ethacrynic Acid] de -4.55 se situent tous directement sous la limite inférieure de cette fenêtre. Le log [Ethacrynic Acid] de -4.00 a causé une cytotoxicité (valeurs identifiées par un x) lors des 4 essais. NS : Non stimulé.

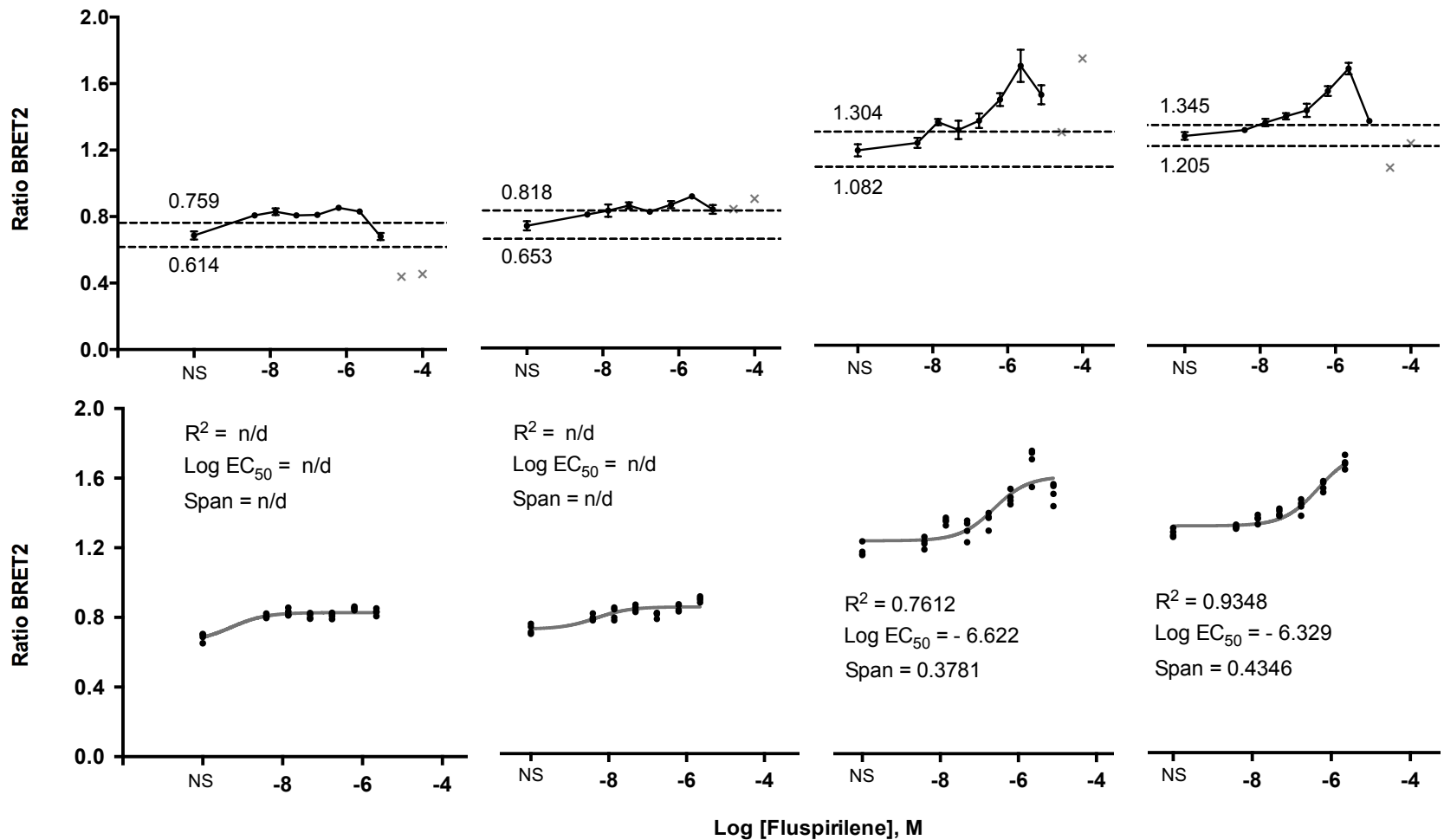


Figure 39. Le fluspirilene agit comme chaperon pharmacologique envers hERG.

Pour tous les essais, les courbes franchissent la limite supérieure de la fenêtre délimitée par la moyenne du véhicule \pm (3 x écart type). Aussi, les deux doses testées les plus élevées occasionnent une cytotoxicité. Les panneaux inférieurs présentent les mêmes données que les panneaux supérieurs correspondant, mais ils affichent les informations relatives à l'effet chaperon seulement. Ces informations ne sont pas disponibles pour les essais 1 et 2. NS : Non stimulé.

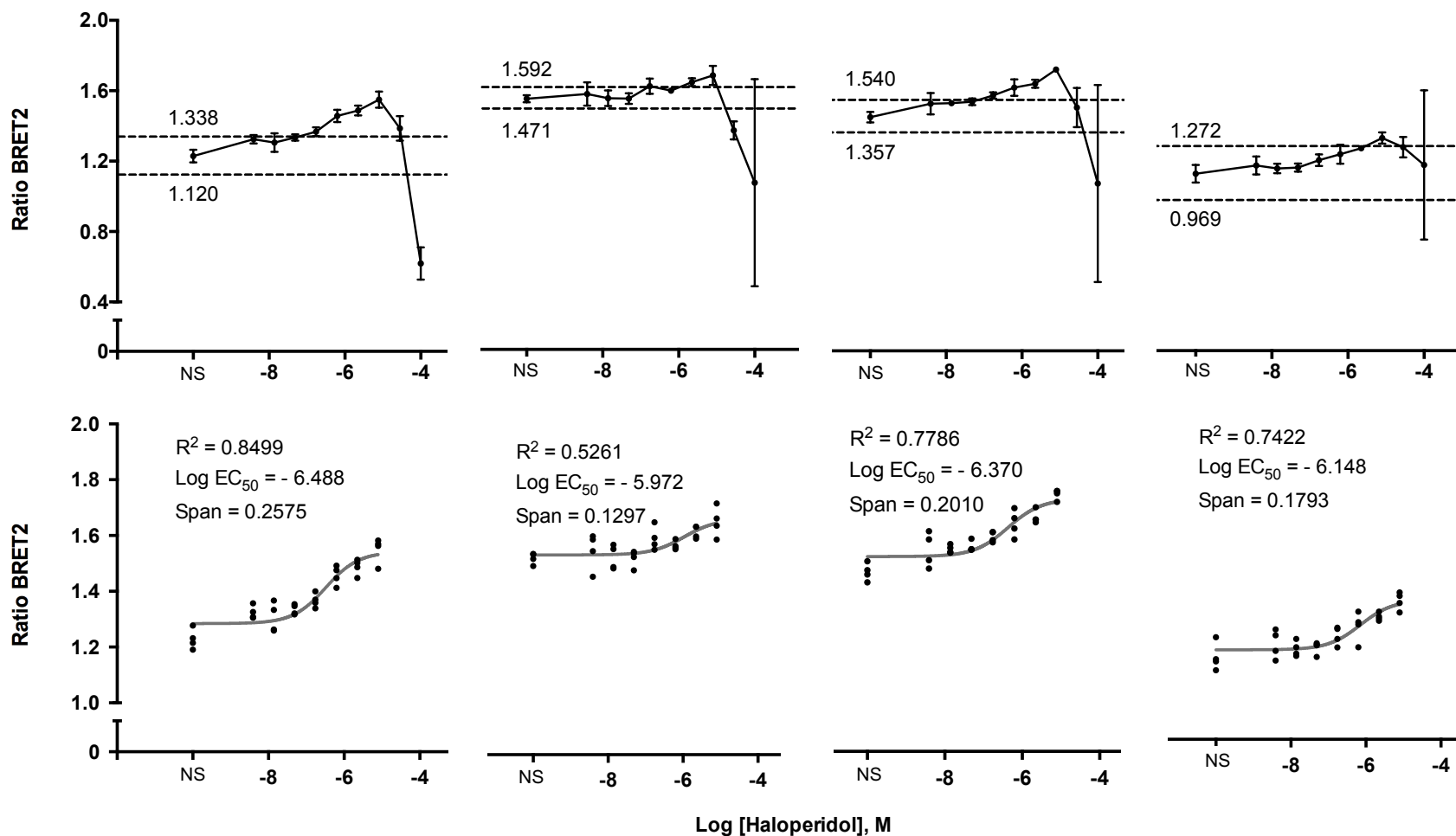


Figure 40. L'halopéridol agit comme chaperon pharmacologique envers hERG à de faibles doses et comme inhibiteur de trafic à de fortes doses.

Pour les 3 premiers essais, les courbes franchissent la limite supérieure de la fenêtre délimitée par la moyenne du véhicule \pm (3 x écart type), puis redescendent sous le seuil inférieur. Aucune dose testée n'occasionne une cytotoxicité. Les panneaux inférieurs présentent les mêmes données que les panneaux supérieurs correspondant, mais ils affichent les informations relatives à l'effet chaperon seulement. NS : Non stimulé.

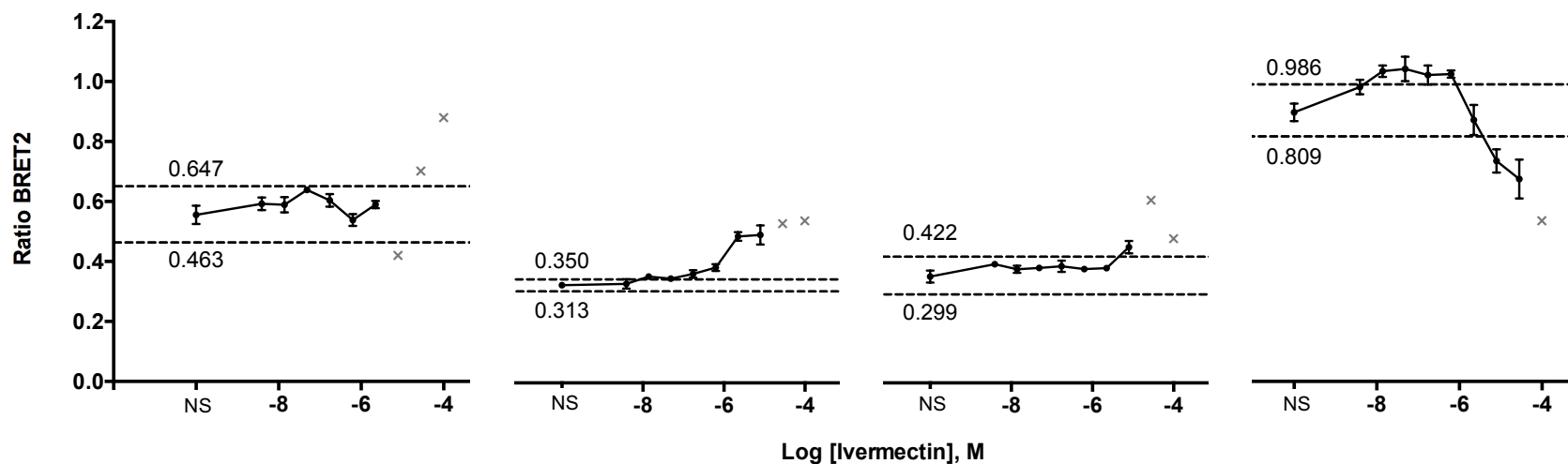


Figure 41. Aucune tendance ne peut être observée quant à l'effet de l'ivermectin sur hERG.

D'un essai à un autre, le comportement du biosenseur suite à une exposition à l'ivermectin varie beaucoup. Pour les essais 1 et 3, les ratios BRET ne s'éloignent peu ou pas de la fenêtre délimitée par la moyenne du véhicule \pm (3 x écart type), tandis qu'ils franchissent considérablement le seuil supérieur pour les essais 2 et 4. Lors du 4^e essai, la courbe générée s'abaisse sous la limite inférieure de la fenêtre à de fortes doses. Le log [Ivermectin] de -4.00 a causé une cytotoxicité (valeurs identifiées par un x) lors des 4 essais et d'autres doses élevées ont causé une cytotoxicité dans certains cas. NS : Non stimulé.

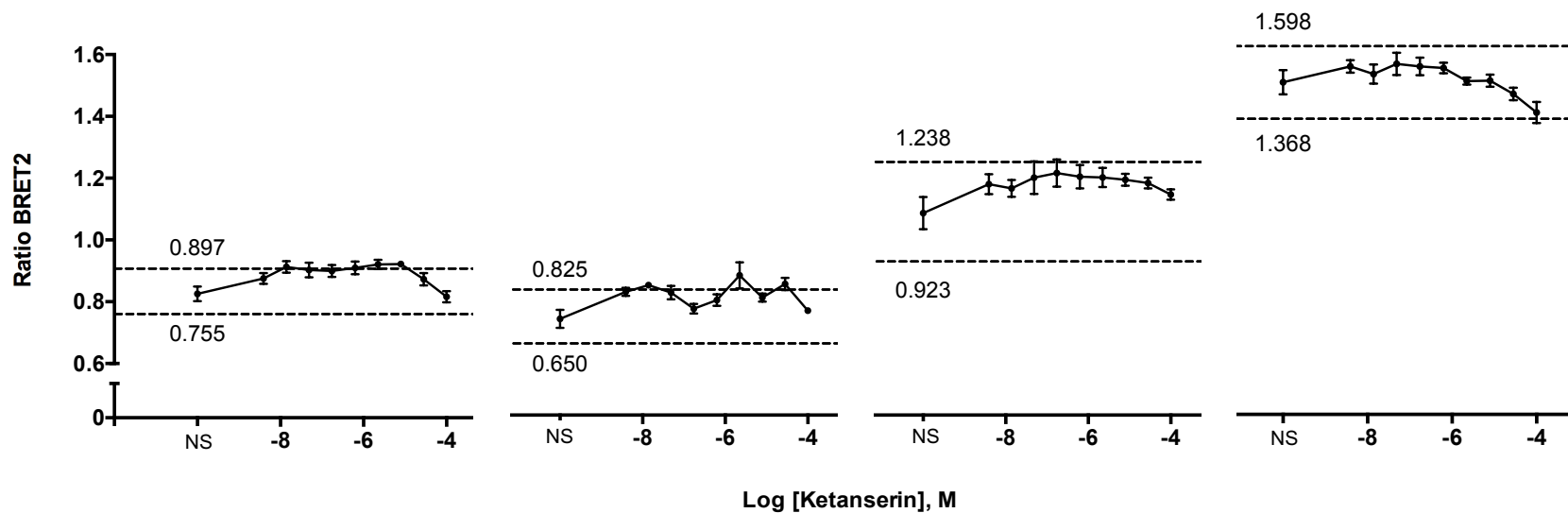


Figure 42. Aucune tendance ne peut être observée quant à l'effet du ketanserin sur hERG.

Pour tous les essais, les ratios BRET ne s'éloignent peu ou pas de la fenêtre délimitée par la moyenne du véhicule \pm (3 x écart type).

De plus, aucune dose testée ne cause de cytotoxicité. NS : Non stimulé.

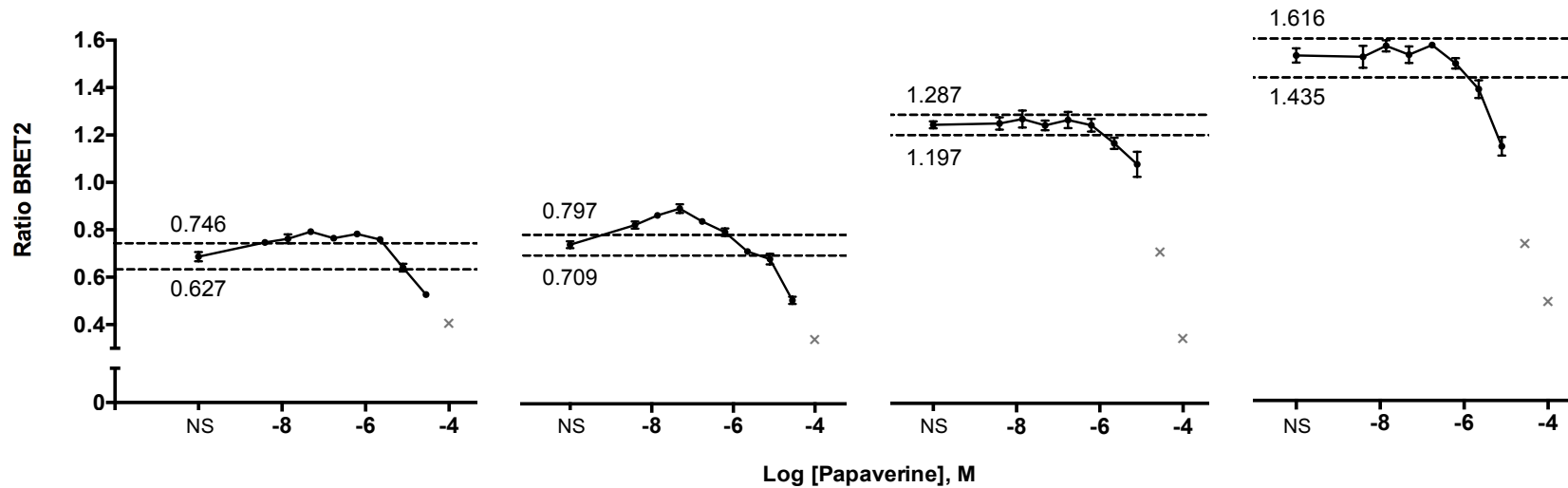


Figure 43. La papavérine semble inhiber le trafic de hERG.

Pour chacun des essais, les ratios BRET s'abaissent sous le seuil inférieur de la fenêtre délimitée par la moyenne du véhicule \pm (3 x écart type). Aussi, le log [Papaverine] de -4.00 a causé une cytotoxicité (valeurs identifiées par un x) lors des 4 essais et celui de -4.55 a causé une cytotoxicité lors des deux derniers essais. NS : Non stimulé.

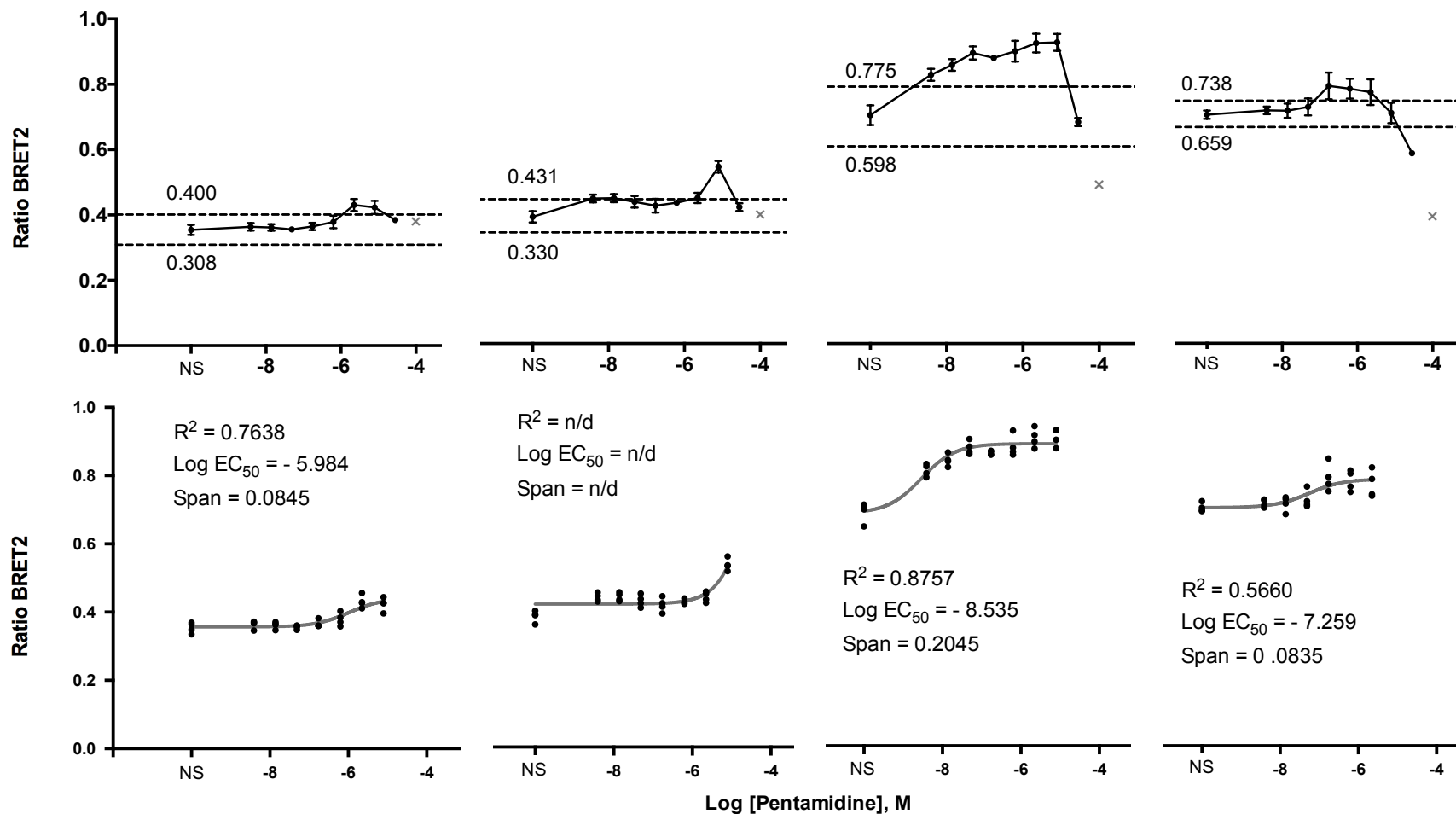


Figure 44. La pentamidine agit comme chaperon pharmacologique envers hERG.

Pour tous les essais, les courbes franchissent la limite supérieure de la fenêtre délimitée par la moyenne du véhicule \pm (3 x écart type). La dose testée la plus élevée occasionne une cytotoxicité dans chaque cas (valeurs identifiées par un x). À noter que pour le 4^e essai, la courbe redescend sous le seuil inférieur de la fenêtre. Les panneaux inférieurs présentent les mêmes données que les panneaux supérieurs correspondant, mais ils affichent les informations relatives à l'effet chaperon seulement. NS : Non stimulé.

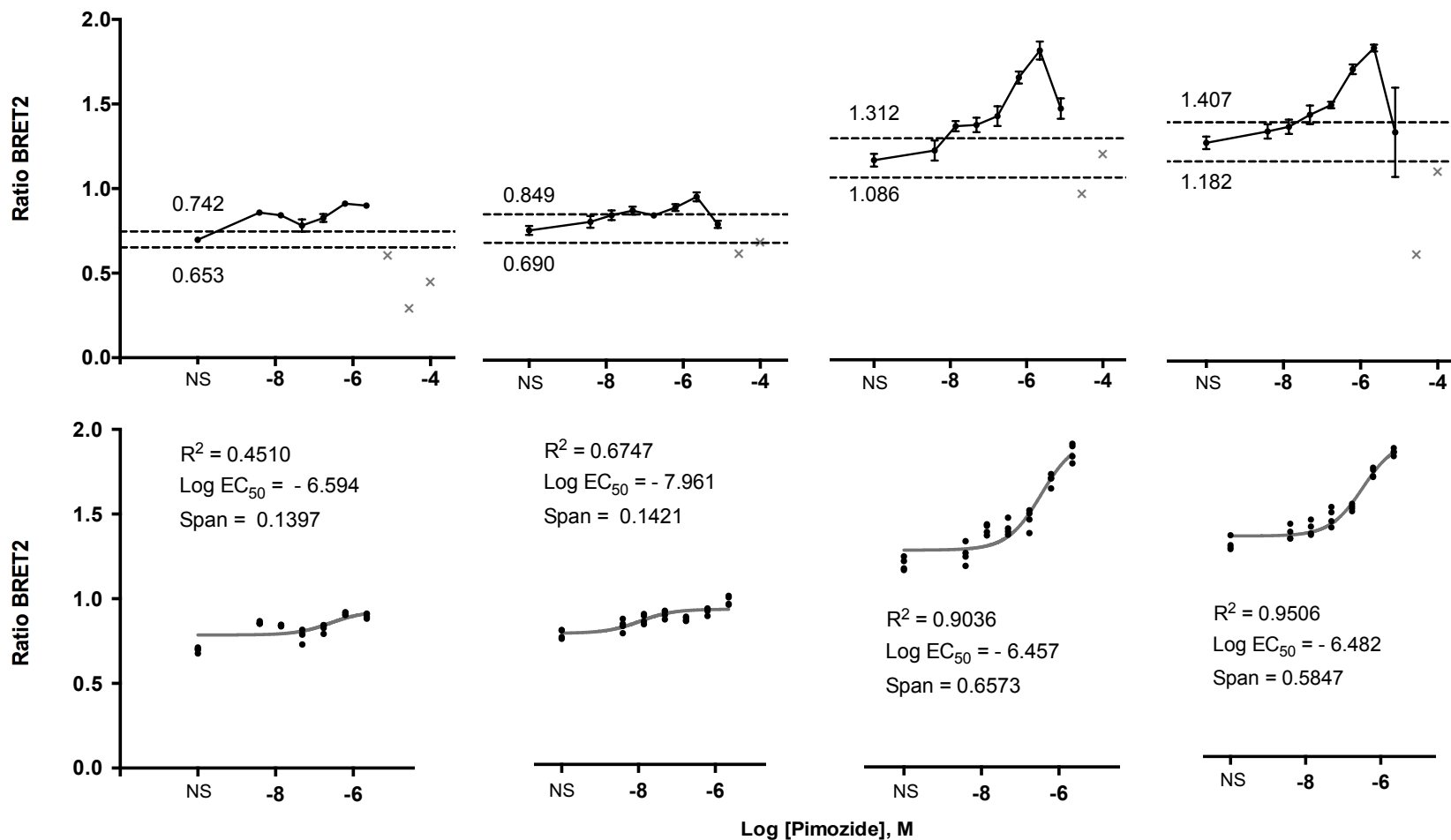


Figure 45. Le pimozide agit comme chaperon pharmacologique envers hERG.

Pour tous les essais, les courbes franchissent la limite supérieure de la fenêtre délimitée par la moyenne du véhicule \pm (3 x écart type). Aussi, les deux doses testées les plus élevées occasionnent une cytotoxicité (valeurs identifiées par un x). Les panneaux inférieurs présentent les mêmes données que les panneaux supérieurs correspondant, mais ils affichent les informations relatives à l'effet chaperon seulement. NS : Non stimulé.

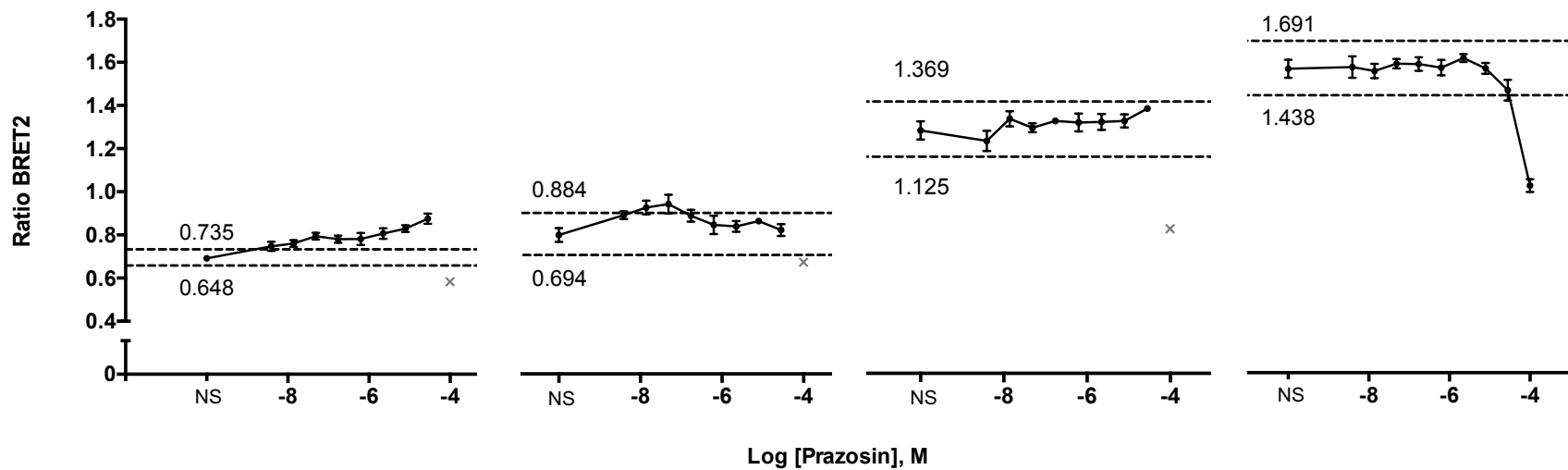


Figure 46. Aucune tendance ne peut être observée quant à l'effet du prazosin sur hERG.

Les profils observés varient considérablement d'un essai à un autre. Lors du premier essai, un effet chaperon pharmacologique est observé. Pour le 2^e et le 3^e essai, les ratios BRET ne s'éloignent peu ou pas de la fenêtre délimitée par la moyenne du véhicule \pm (3 x écart type). Pour le 4^e essai, un effet d'inhibition du trafic est observé. Aussi, lors des 3 premiers essais, la dose maximale testée a causé une cytotoxicité (valeurs identifiées par un x). NS : Non stimulé.

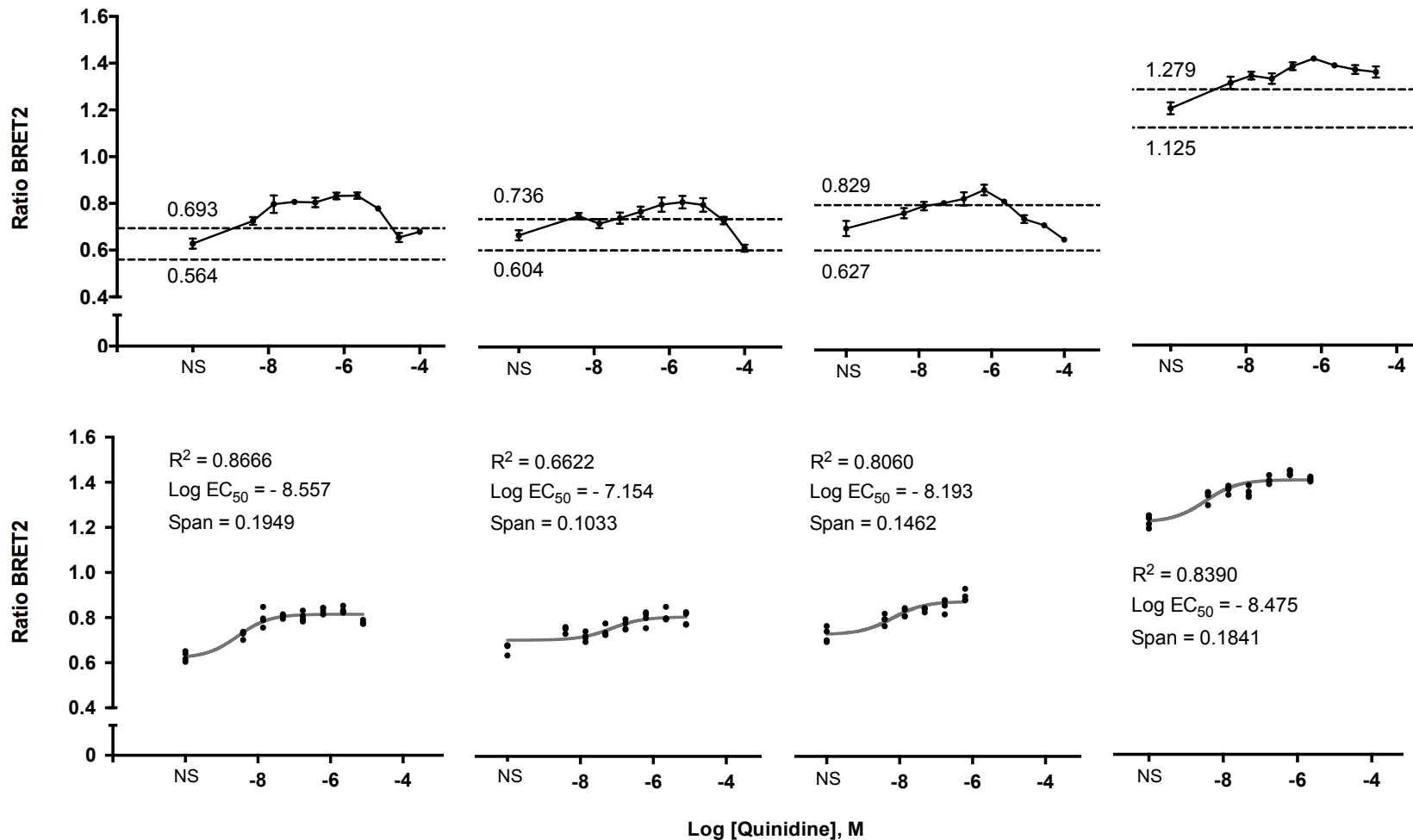


Figure 47. La quinidine agit comme chaperon pharmacologique envers hERG.

Pour tous les essais, les courbes franchissent la limite supérieure de la fenêtre délimitée par la moyenne du véhicule \pm (3 x écart type). À noter que les courbes tracées pour les 3 premiers essais redescendent entre les limites de la fenêtre. Aussi, aucun cas de cytotoxicité n'a été observé aux concentrations testées. Les panneaux inférieurs présentent les mêmes données que les panneaux supérieurs correspondant, mais ils affichent les informations relatives à l'effet chaperon seulement. NS : Non stimulé.

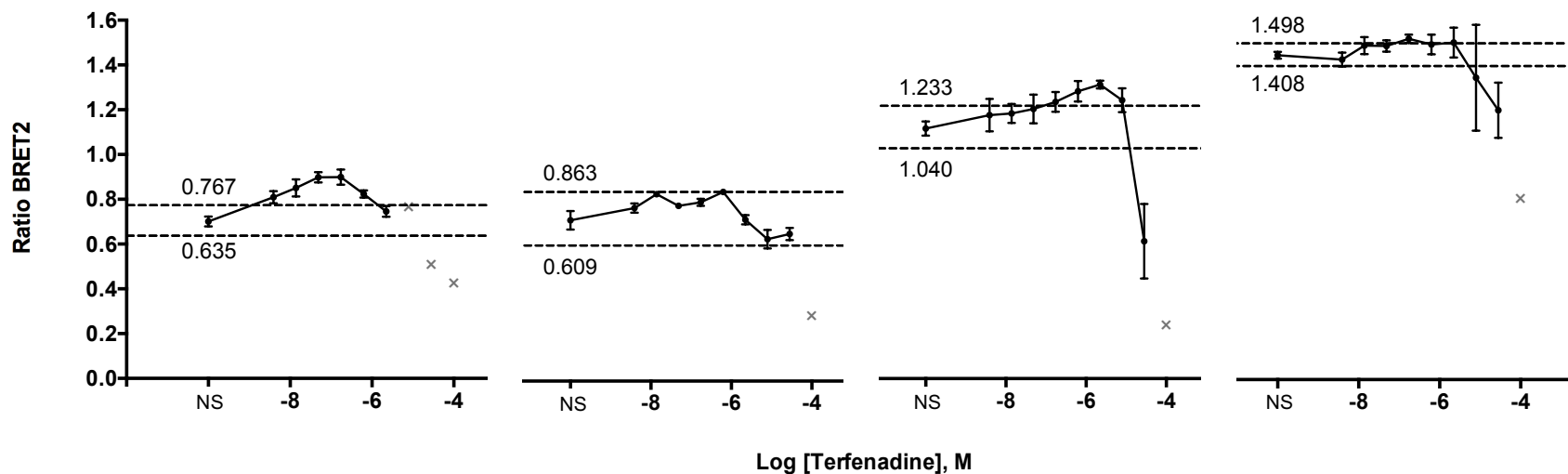


Figure 48. Aucune tendance ne peut être observée quant à l'effet de la terfenadine sur hERG.

Les profils observés varient considérablement d'un essai à un autre. Lors du premier essai, un effet chaperon pharmacologique est observé. Pour le deuxième essai, les ratios BRET ne s'éloignent pas de la fenêtre délimitée par la moyenne du véhicule \pm (3 x écart type). Pour le 3^e essai, les deux effets sont observés. Pour le 4^e essai, un effet d'inhibition du trafic est observé. Aussi, pour chacun des essais, la dose maximale testée a causé une cytotoxicité (valeurs identifiées par un x). Lors du premier essai, les logs [terfenadine] de -4.55 et de -5.10 ont également causé une cytotoxicité. NS : Non stimulé.

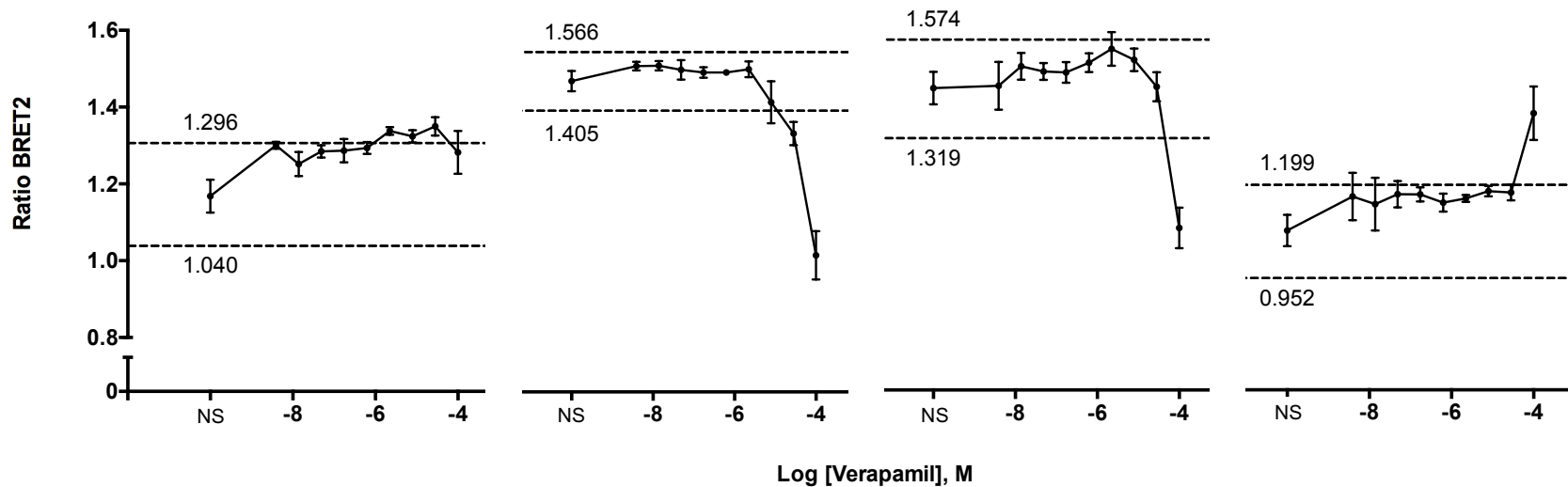


Figure 49. Aucune tendance ne peut être observée quant à l'effet du verapamil sur hERG.

Les profils observés varient considérablement d'un essai à un autre. Lors du premier et du dernier essai, un effet chaperon pharmacologique est observé. Pour le 2^e et le 3^e essai, les ratios BRET s'abaissent sous la fenêtre délimitée par la moyenne du véhicule \pm (3 x écart type). Aussi, aucune dose testée n'a occasionné de cytotoxicité. NS : Non stimulé.

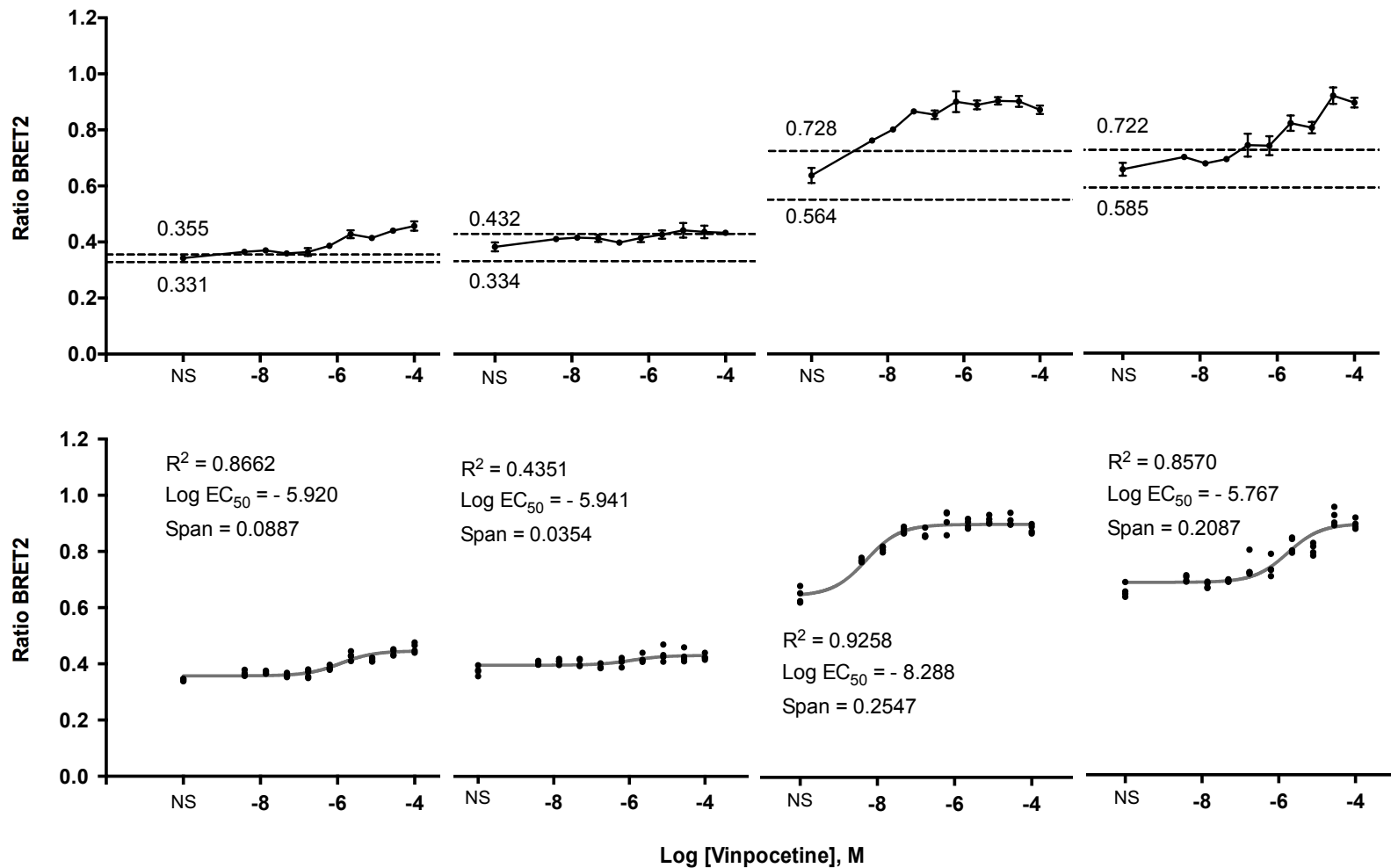


Figure 50. La vinpocetine agit comme chaperon pharmacologique envers hERG.

Pour tous les essais, les ratios dépassent la fenêtre délimitée par la moyenne du véhicule \pm (3 x écart type). Aucune cytotoxicité n'a été observée aux concentrations testées. Les panneaux inférieurs présentent les mêmes données que les panneaux supérieurs correspondant, mais ils affichent les informations relatives à l'effet chaperon seulement. NS : Non stimulé.

Tableau IV. Vue d'ensemble des résultats générés à l'aide du biosenseur HERG-BRET pour 25 composés.

Ce tableau met en évidence les données importantes des figures 26 à 50. $EC_{50\text{CHAPERON}}$ désigne la concentration de composé permettant d'atteindre 50% de l'effet chaperon maximal. $E_{\text{maxCHAPERON}}$ signifie la concentration à laquelle le ratio BRET le plus élevé est observé (pour les composés où un effet chaperon est observé). L'étendu consiste en la différence entre le plateau et le ratio BRET basal. $MEC_{\text{INHIBITION}}$ désigne la concentration minimale permettant de franchir le seuil inférieur de la fenêtre délimitée par la moyenne du véhicule \pm (3 x écart type). MTC signifie la concentration minimale causant une cytotoxicité. Les résultats sont des moyennes exprimées en valeurs logarithmiques pour les colonnes $EC_{50\text{CHAPERON}}$, $E_{\text{maxCHAPERON}}$, $MEC_{\text{INHIBITION}}$, MTC.

| COMPOSÉ | $EC_{50\text{CHAPERON}}$ | $E_{\text{maxCHAPERON}}$ | ÉTENDU | $MEC_{\text{INHIBITION}}$ | MTC | EFFET CHAPERON | INHIBITION DU TRAFIC |
|----------------------|--------------------------|--------------------------|--------|---------------------------|-------|----------------|----------------------|
| Amiodarone | | | | | -4.28 | | |
| Amsacrine | -7.23 | -5.65 | 0.3383 | | -4.55 | ✓ | |
| Astemizole | -7.56 | -6.09 | 0.2789 | | -5.00 | ✓ | |
| Bepidil | -7.16 | -5.10 | 0.2620 | -4.55 | -4.28 | ✓ | |
| Chlorpromazine | | -7.12 | | -4.92 | -4.28 | | |
| Cisapride | -6.33 | -5.24 | 0.2032 | | | ✓ | |
| Clofilium | -6.70 | -5.38 | 0.6761 | | -4.14 | ✓ | |
| Desipramine | | -7.13 | | -4.96 | -4.14 | | ✓ |
| Diltiazem | | | | -4.28 | | | ✓ |
| Domperidone | -6.90 | -5.10 | 0.1411 | | -4.28 | ✓ | |
| Droperidol | | -4.92 | | -4.28 | -4.18 | | |
| E4031 | -6.64 | -4.55 | 0.3291 | | | ✓ | |
| Éthacrynique (acide) | | | | -4.55 | -4.00 | | ✓ |
| Fluspirilene | -6.48 | -5.79 | 0.4064 | | -4.55 | ✓ | |
| Halopéridol | -6.24 | -5.10 | 0.1919 | -4.18 | | ✓ | ✓ |
| Ivermectin | | | | | -4.55 | | |
| Ketanserine | | | | | | | |
| Papaverine | | | | -5.24 | -4.28 | | ✓ |
| Pentamidine | -7.26 | -5.65 | 0.1242 | | -4.00 | ✓ | |
| Pimozide | -6.87 | -5.79 | 0.3810 | | -4.69 | ✓ | |
| Prazosin | | | | | -4.00 | | |
| Quinidine | -8.09 | -5.79 | 0.1571 | | | ✓ | |
| Terfenadine | | | | | -4.28 | | |
| Verapamil | | | | | | | |
| Vinpocetine | -6.48 | -4.55 | 0.1469 | | | ✓ | |

Tableau V. Comparaison des profils de 25 composés avec HERG-BRET, *hERG-Lite*® et *patch-clamp*.

Les valeurs présentées pour le *patch-clamp* et la méthode *hERG-Lite*® sont tirées de l'article publié par les auteurs de la méthode *hERG-Lite*® en 2005. [59] IC50 désigne la concentration permettant 50% d'inhibition fonctionnelle du canal Kv11.1. RC50 signifie la concentration permettant 50% de rescousse des protéines hERG G601S retenue dans le ER. EC50 désigne la concentration permettant 50% d'efficacité dans la réponse observée. Aucune classe d'inhibition n'est précisée pour le *patch-clamp* étant donné que cette méthode ne fait aucune distinction quant au mécanisme d'inhibition exercé par les composés pharmaceutiques. *HERG-Lite*® identifie les chaperons de *hERG* comme des bloqueurs du pore, mais l'appellation « chaperon » est conservé pour HERG-BRET.

| COMPOSÉ | PATCH-CLAMP | <i>hERG-Lite</i> ® | | HERG-BRET | |
|----------------------|-------------|--------------------|----------------------|-----------|----------------------|
| | IC50 (µM) | RC50 (µM) | CLASSE | EC50 (µM) | CLASSE |
| Amiodarone | 0.015 | 0.466 | Effet double | | |
| Amsacrine | 0.230 | 0.500 | Bloqueur du pore | 0.058 | Chaperon |
| Astemizole | 0.001 | 0.052 | Bloqueur du pore | 0.028 | Chaperon |
| Bepridil | 0.023 | 0.114 | Effet double | 0.069 | Chaperon |
| Chlorpromazine | 0.370 | | Effet double | | |
| Cisapride | 0.027 | 0.589 | Bloqueur du pore | 0.465 | Chaperon |
| Clofilium | 0.007 | 0.094 | Bloqueur du pore | 0.200 | Chaperon |
| Desipramine | 5.600 | | Effet double | | Inhibiteur de trafic |
| Diltiazem | 9.100 | | Bloqueur du pore | | Inhibiteur de trafic |
| Domperidone | 0.103 | 0.389 | Bloqueur du pore | 0.127 | Chaperon |
| Droperidol | 0.064 | 0.675 | Bloqueur du pore | | |
| E4031 | 0.012 | 0.739 | Bloqueur du pore | 0.229 | Chaperon |
| Éthacrynique (acide) | | | Inhibiteur de trafic | | Inhibiteur de trafic |
| Fluspirilene | 0.003 | 0.179 | Bloqueur du pore | 0.335 | Chaperon |
| Halopéridol | 0.019 | 0.296 | Bloqueur du pore | 0.570 | Effet double |
| Ivermectin | | | Inhibiteur de trafic | | |
| Ketanserin | 0.107 | 0.567 | Bloqueur du pore | | |
| Papaverine | 7.300 | | Bloqueur du pore | | Inhibiteur de trafic |
| Pentamidine | | | Inhibiteur de trafic | 0.055 | Chaperon |
| Pimozide | 0.001 | 0.125 | Bloqueur du pore | 0.134 | Chaperon |
| Prazosin | 1.570 | | Bloqueur du pore | | |
| Quinidine | 1.070 | 1.637 | Bloqueur du pore | 0.008 | Chaperon |
| Terfenadine | 0.008 | 0.051 | Effet double | | |
| Verapamil | 0.136 | 0.616 | Bloqueur du pore | | |
| Vinpocetine | 0.032 | | Bloqueur du pore | 0.332 | Chaperon |

Parmi les 25 composés testés, 8 n'ont pas pu être caractérisés par la méthode HERG-BRET (*Tableau IV*). Aussi, les classes d'inhibition déterminées par les méthode *hERG-Lite*® et HERG-BRET ne concordent que pour 11 des composés testés (en considérant que les bloqueurs du pore sont aussi des chaperons pharmacologiques) et les concentrations permettant 50% de la réponse maximale pour ces deux méthodes sont décalées de 1 à 2 log (moins sensibles) par rapport à la méthode de référence (*patch-clamp*) pour la plupart des molécules (*Tableau V*). Ces résultats seront traités plus en détail dans la *Section 5.3* de la discussion.

5. Discussion

5.1 Analyse comparative des constructions plasmidiques

Durant la première partie du développement du biosenseur HERG-BRET, trois candidats donneurs d'énergie ont été étudiés afin d'identifier le plus adéquat. En effet, l'accepteur d'énergie (*rGFP-CAAX*) avait déjà été construit et validé par Christian Le Gouill dans le cadre d'un autre projet de recherche[79]. Par contre, le donneur d'énergie (*hERG-rLuc*) n'était encore qu'une idée au début du projet. Il a donc dû être conçu en entier. Trois sites d'insertions dans hERG ont été testés pour en identifier minimalement une avec laquelle des fluctuations d'expression membranaire pourraient être observées, conformément à la littérature, suite à une exposition à des composés pharmaceutiques connus.

5.1.1 Le site d'insertion *Nter*

Le site d'insertion nommé *Nter*, présenté à la *Figure 16*, n'a pas été retenu pour la suite du projet. En observant les comptes *rLuc* et *rGFP* mesurés, on peut comprendre que le donneur et l'accepteur d'énergie sont en effet exprimés par les cellules transfectées. Toutefois, aucune fluctuation de ratio BRET n'est observée peu importe la concentration de composé. Il est possible que ces résultats soient dus au fait que *hERG-rLuc* soit exprimé, mais que l'insertion de la luciférase dans la région N-terminale occasionne un déficit partiel dans le trafic vésiculaire de la protéine vers la membrane. Ceci occasionnerait que la *rLuc* et la *rGFP* ne se situeraient pas dans le même compartiment cellulaire, à l'exception d'une faible quantité de protéine qui s'échappe du ER pour se rendre à la membrane (ce qui expliquerait que le ratio BRET basal soit non nul). Ce déficit serait dû à un défaut de conformation non-réchapable par des chaperons connus de hERG comme l'astemizole et le cisapride (aucune fluctuation observée). Un autre scénario possible serait que la *rLuc* et la *rGFP* ne soient pas suffisamment près l'une de l'autre (la *rLuc* ayant été insérée à l'extrémité de la région N-terminale) pour observer des fluctuations du signal, mais qu'elles soient suffisamment près pour générer un signal basal non nul.

Une manière simple de tester l'hypothèse qu'il y ait un déficit de trafic vésiculaire chez les protéines ayant la *rLuc* en *Nter* serait de procéder à une immunodétection ciblant le *tag* HA extracellulaire. En effet, comme cette étiquette moléculaire a été insérée sur la face externe de la protéine, elle permet de détecter les protéines de fusion, chez des cellules non-perméabilisées, seulement si elles se retrouvent à la membrane plasmique. Le témoin de localisation membranaire le plus approprié pour cet essai serait la protéine hERG-HA sans l'insert *rLuc*. Il suffirait donc de procéder à une transfection transitoire d'une même quantité d'ADN de la construction hERG-HA-*rLuc* (*Nter*), dans une série de puits, et hERG-HA, dans une autre série de puits, puis de procéder à l'immunodétection après 48h. Si le signal est similaire à celui du témoin, l'insertion en *Nter* n'occasionne pas de défaut du trafic vésiculaire, mais la luciférase est trop loin de la membrane pour interagir avec l'accepteur d'énergie. Si le signal est plus faible que celui du témoin, le trafic vésiculaire est entravé.

5.1.2 Le site d'insertion S2S3

Il n'a pas été nécessaire de générer de courbe de l'effet concentration-dépendant de l'ajout des composés pour le site d'insertion S2S3 étant donné que les résultats préliminaires de titration des plasmides en transfection transitoire (résultats non présentés) suggéraient un profil similaire à celui obtenu pour le site d'insertion *Nter* (section 5.1.1).

5.1.3 Le site d'insertion S1

Comme il est possible de le remarquer à la *Figure 17*, le site d'insertion *S1* a permis d'observer d'importantes fluctuations dans les niveaux d'expression membranaire de hERG-*rLuc* suite à une exposition à des concentrations croissantes de puissants chaperons pharmacologiques. Il s'agit précisément du comportement attendu conformément au concept du biosenseur HERG-BRET. Pour cette raison, il s'agit du site d'insertion qui a été retenu pour la suite du projet.

5.1.4 La mutation G601S

La mutation G601S est utilisée dans la méthode *hERG-Lite*® afin d'identifier les composés pharmaceutiques agissant comme chaperon pharmacologique sur hERG (la

protéine non mutée étant plutôt utilisée pour identifier les composés inhibant le trafic de hERG vers la membrane). Pour ce qui est de la méthode HERG-BRET, il semblerait que la protéine non mutée permette d'observer un effet chaperon pharmacologique aussi important que la protéine portant la mutation G601S (*Figure 18*). Cela signifie qu'un pourcentage non nul de hERG-*rLuc* non muté soit retenu dans le ER, probablement pour cause de mauvais repliement. L'utilisation de la protéine non mutée permet également d'observer l'effet d'inhibition du trafic que les composés pharmaceutiques peuvent avoir lors d'une exposition prolongée (*Figure 20*). La protéine atteinte de la mutation G601S semble toutefois avoir un niveau d'expression basal trop faible pour pouvoir observer une inhibition du trafic (résultat non présenté) Pour la suite du développement du biosenseur, le mutant G601S a donc été mis de côté. Le modèle HERG-BRET peut en effet se limiter à une seule protéine de fusion correspondant au donneur d'énergie, ce qui constitue à un avantage méthodologique comparativement à la méthode *hERG-Lite*®.

5.1.5 L'étiquette moléculaire HA

Pour ce qui est de l'étiquette HA, il a été décidé qu'elle serait conservée dans le modèle HERG-BRET étant donné qu'elle permet une fenêtre dynamique plus grande que celle permise par les constructions qui en sont exemptes (*Figure 19*). Il faut toutefois considérer qu'en conservant le *tag* HA, on ajoute une deuxième caractéristique qui éloigne la protéine utilisée de la protéine native (le premier étant l'ajout de *rLuc*). Il faut donc garder en tête qu'il est possible que cette décision influence les résultats finaux. En effet, il n'est pas impossible que la séquence HA influence la physiologie de la protéine ou qu'elle couvre un site auquel un composé est susceptible de se lier. Ainsi, il aurait potentiellement le désavantage d'empêcher la détection de certaines interactions.

La première partie du projet de recherche a donc permis de sélectionner une construction codant pour un donneur d'énergie adéquat pour la détection des fluctuations d'expression membranaire de *hERG* en présence de composés pharmaceutiques agissant comme chaperon pharmacologique. Les deux protéines de fusions utilisées dans la méthode HERG-BRET sont représentées à la *Figure 51*.

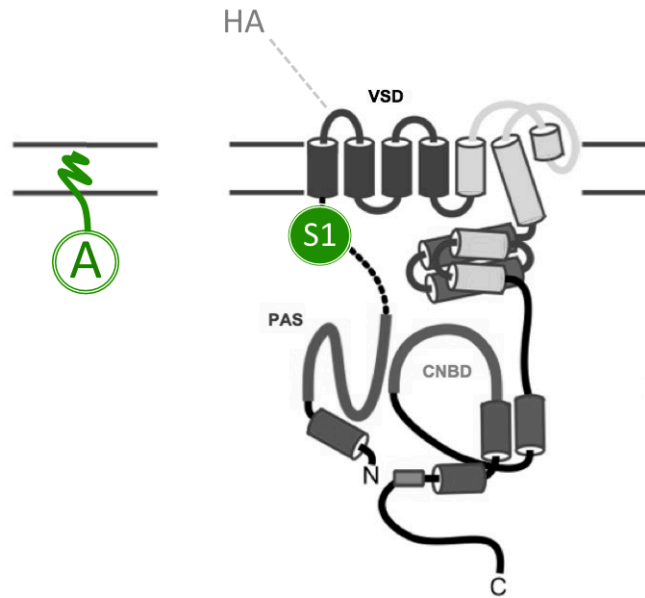


Figure 51. Représentation schématique du donneur et de l'accepteur d'énergie exprimés de façon stable dans le modèle HERG-BRET.

L'accepteur d'énergie, *rGFP-CAAX*, est un marqueur fluorescent ancré à la PM. Le site d'insertion choisi pour le donneur d'énergie (S1) est celui qui se situe le plus près de la première sous unité transmembranaire de hERG. Le donneur d'énergie contient aussi un tag HA dans sa première boucle extracellulaire pour des fins d'immunodétection. PAS : domaine Per-Arnt-Sim typique des canaux VGK. CNBD : domaine de liaison aux nucléotides cycliques retrouvés chez les canaux CNG et HCN. VSD : domaine senseur de voltage contribuant à la perception des variations de potentiels membranaires.

5.2 Preuve de concept en lignée cellulaire stable

Jusqu'à cette étape, les manipulations ont été effectuées avec des plasmides de type pcDNA3. Comme l'un des objectifs était de construire un modèle en lignée cellulaire stable, l'insert codant pour le donneur d'énergie sélectionné a été transféré dans un plasmide pIRES. Par contre, avant de générer les transfectants stables, quelques essais ont été effectués en transfections transitoires afin de vérifier si le transfert d'un type de plasmide à un autre influençait le comportement du modèle. Comme les résultats obtenus avec les deux types de plasmides sont similaires (*Figure 21*), la genèse des transfectants stables a pu être entamée. La lignée cellulaire utilisée exprimait initialement *rGFP-CAAX* de façon stable. La transfection a permis que les cellules expriment un deuxième gène de façon stable, celui encodant pour *hERG-rLuc*. Les niveaux d'expression par les transfectants stables étaient très variables, tel qu'illustré à la *Figure 22*. Quatre sous-populations stables ont pu être isolées à l'aide du FACS. Il s'est avéré que la sous-population permettant d'obtenir la plus grande fenêtre dynamique (plateau – BRET basal) lors d'une exposition à deux composés de références (astemizole et cisapride) a été celle qui exprimait le plus fortement les deux composantes du biosenseur (*Figure 23*).

On peut toutefois remarquer que le passage en populations stables a occasionné une perte d'affinité et de sensibilité de l'essai. En effet, le Log EC₅₀ pour l'astemizole, qui était de -7.702 en transfection transitoire (*figure 17*), est maintenant estimé à -6.266. Aussi, l'étendu de la fenêtre d'interaction, qui avait une valeur près de 1.5 en transfection transitoire (*figure 19*), est maintenant d'environ 0.3 (*figure 23*). La meilleure explication serait que les ratios d'expression donneur/accepteur d'énergie soient plus grands en transfections transitoires, les quantités d'ADN ayant été minutieusement sélectionnées afin d'obtenir le meilleur ratio BRET. En effet, de façon générale, plus la quantité de GFP exprimée est grande, comparativement à la quantité de luciférase, plus l'étendu de la fenêtre d'interaction est grand (*figure 21*). Les mesures brutes de signaux *rLuc* en transfection transitoire étaient, pour certaines conditions, jusqu'à 20 fois inférieures à celles observées pour la population stable (résultats non présentés), augmentant ainsi de beaucoup la valeur du ratio d'expression donneur/accepteur. Les mesures de *rGFP*, quant à elles, étaient du même ordre de grandeur dans un cas comme dans l'autre. Cette observation permettrait probablement d'expliquer la perte d'affinité et de sensibilité de l'essai lors du passage en population stable. Quoi qu'il en

soit, comme l'un des objectifs spécifiques du projet était de minimiser la variabilité et d'augmenter le débit opérationnel de la procédure, il a été décidé d'étudier plus en profondeur la sous population stable *hERG high rGFP high*.

5.3 Analyse comparative des EC₅₀ obtenus pour 25 composés avec HERG-BRET, HERG-Lite® et par *patch-clamp*

Les courbes doses-réponses générées comprenaient des concentrations de composés pharmaceutiques allant jusqu'à 100 µM (1×10^{-4}). Comme cette dose est relativement élevée, il était plausible de croire qu'elle occasionnerait une toxicité cellulaire dans certains cas. Pour cette raison, lors de l'analyse, les comptes *rGFP* ont d'abord été utilisés indépendamment des comptes *rLuc* afin d'identifier les concentrations pour lesquelles le ratio BRET serait biaisé par un affaiblissement de la viabilité cellulaire. Quelques essais ont été effectués afin de démontrer que le compte *rGFP* constitue un indice fiable de la viabilité cellulaire (*Tableau III*). Un autre test a permis de démontrer que le compte *rGFP* est directement proportionnel à la densité cellulaire (*Figure 24*).

5.3.1 Les bloqueurs du pore selon la méthode HERG-BRET

Parmi les 25 composés pharmaceutiques testés, 12 ont été classés comme des chaperons pharmacologiques (indice du blocage direct du pore) selon la méthode HERG-BRET. Ces composés ont tous en commun d'avoir occasionné un effet chaperon pharmacologique envers hERG-*rLuc* et de n'avoir occasionné aucune inhibition significative de son trafic dans la cellule. De ces 12 composés, 10 sont également classés comme des bloqueurs du pore par la méthode *hERG-Lite®* : amsacrine, astemizole, cisapride, clofilium, domperidone, E4031, fluspirilene, pimozide, quinidine et vinpocétine. On peut également remarquer que 4 de ces composés n'ont causé aucune toxicité cellulaire aux concentrations testées : cisapride, E4031, quinidine et vinpocétine. Pour les 10 composés mentionnés, les EC₅₀ extraits de la méthode HERG-BRET sont généralement du même ordre de grandeur que les RC50 identifiés par la méthode *hERG-Lite®* (*Tableau V*). Ces valeurs sont toutefois décalées de 1 à 2 log (supérieures) par rapport aux valeurs de références obtenues par *patch-clamp*.

Les 2 composés restants (sur 12) sont le bepridil et la pentamidine. Ceux-ci sont traités à part puisqu'ils ont été classés différemment par la méthode *hERG-Lite®*. Tout d'abord, le bepridil était identifié comme un inhibiteur à effet double. Deux des courbes doses-réponses générées à l'aide de la méthode HERG-BRET (essais 3 et 4) pourraient en fait pointer vers un effet double (*Figure 29*) puisqu'un effet chaperon est

observé aux plus faibles concentrations et qu'une diminution importante du ratio BRET a lieu à une concentration élevée ($\log [\text{Bepridil}] = -4.55$). Toutefois, c'est plutôt une cytotoxicité qui est observée à cette dose dans le cas des essais 1 et 2. Des essais supplémentaires pour lesquels davantage de concentrations seraient testées pourraient aider à mieux se positionner sur le mécanisme d'inhibition de hERG par le bepridil. Ensuite, pour ce qui est du pentamidine, *hERG-Lite*® le classait comme inhibiteur de trafic. L'article présentant les données utilisées pour les comparaisons fait seulement mention qu'une inhibition du trafic devrait être observée à partir d'une concentration de 10 μM ($\log [\text{Pentamidine}] = -5.00$). [59] Parmi les courbes présentées à la *Figure 44*, seule celle du 4^e essai suggère une inhibition du trafic de hERG dans la cellule, et ce, à une concentration supérieure ($\log [\text{Pentamidine}] = -4.55$). Les ratios BRET des autres essais ne franchissent pas le seuil inférieur de la fenêtre délimitée par la moyenne du véhicule $\pm (3 \times \text{écart type})$. À une dose de 100 μM , ce composé occasionne une cytotoxicité, ce qui nous force à exclure cette concentration. Si l'on retourne à la *Figure 20*, qui présentait les résultats de transfectants transitoires exposés aux inhibiteurs de trafic, ce n'est qu'à 100 μM qu'on observe une diminution marquée du ratio BRET. Les résultats finaux sont donc cohérents avec les résultats préliminaires du développement de la méthode.

5.3.2 Les inhibiteurs de trafic selon la méthode HERG-BRET

Un total de 4 composés, parmi les 25 testés, ont été classés comme inhibiteurs du trafic de hERG-*rLuc* : desipramine, diltiazem, acide éthacrynique et papavérine. Ces composés ont tous en commun de n'avoir occasionné aucun effet chaperon pharmacologique envers hERG-*rLuc*, mais d'avoir occasionné une inhibition significative de son trafic dans la cellule. Le diltiazem est le seul de ces 3 composés à n'avoir jamais occasionné de cytotoxicité aux concentrations testées (*Figure 34*). On peut aussi noter que la desipramine est identifiée comme un inhibiteur à effet double par la méthode *hERG-Lite*®. Lors des 1^{er} et 4^e essais opérés avec la méthode HERG-BRET (*Figure 33*), on peut observer que les ratios BRET franchissent le seuil supérieur de la fenêtre délimitée par la moyenne du véhicule $\pm (3 \times \text{écart type})$. Ceci pointerait donc vers le fait que la desipramine pourrait avoir un effet double sur hERG-*rLuc*. Toutefois, les 2^e et 3^e essais ne présentent qu'une inhibition du trafic. Encore une fois,

des essais supplémentaires pour lesquels davantage de concentrations seraient testées pourraient aider à mieux se positionner sur le mécanisme d'inhibition en cause.

Pour ce qui est du diltiazem et de la papavérine, ils sont classés comme des bloqueurs du pore par *hERG-Lite*®. En fait, cette méthode suggère qu'un effet chaperon pharmacologique devrait être observé à partir de 10 µM (log [compound]= -5.00). [59] Pourtant, les résultats obtenus à l'aide de la méthode HERG-BRET pour le diltiazem (*Figure 34*) suggèrent clairement une inhibition du trafic lors de chaque essai. Si davantage d'essais avaient été réalisés, on aurait peut-être même observé un effet double causé par ce composé. En effet, lors des deux premiers essais, les ratios BRET ont franchi le seuil supérieur de la fenêtre délimitée par la moyenne du véhicule ± (3 x écart type). Le même profil a été obtenu pour la papavérine (*Figure 43*), mais cette fois-ci à des doses plus faibles. Ce composé a en fait causé une toxicité cellulaire aux concentrations testées les plus élevées.

L'acide éthacrynique est le seul composé identifié comme un inhibiteur du trafic à la fois par la méthode *hERG-Lite*® et la méthode HERG-BRET. Dans le cas de *hERG-Lite*®, la plus petite concentration causant une inhibition de trafic est 10 µM (log [Ethacrynic acid] = -5.00). La même tendance est observée avec HERG-BRET, c'est-à-dire que, pour chacun des essais réalisés, la courbe franchit le seuil inférieur de la fenêtre délimitée par la moyenne du véhicule ± (3 x écart type) entre les logs [Ethacrynic acid] de -5.10 et -4.55. Si on compare ces résultats à ceux de la *Figure 20*, on peut encore une fois observer une cohérence entre les résultats préliminaires obtenus en transfections transitoires et ceux de la lignée stable finale.

5.3.3 Les composés à effet double selon la méthode HERG-BRET

Un seul des composés testés a été classé dans cette catégorie. Il s'agit de l'halopéridol. Pour ce composé, un effet chaperon à de faibles doses et un effet inhibiteur du trafic à de fortes doses sont observés. On peut toutefois noter que les résultats obtenus avec la concentration la plus élevée (100 µM) affichent une grande variabilité (*Figure 40*). Il est plausible de croire que des changements cellulaires importants surviennent lorsque les cellules sont exposées à cette concentration. Toutefois, les comptes *rGFP*, indice de la viabilité cellulaire, ne suggeraient aucune cytotoxicité pour les concentrations

testées. On peut aussi noter que la méthode *hERG-Lite*® classe l'halopéridol comme un bloqueur direct du pore. Il est possible que la méthode HERG-BRET permette d'identifier une nuance dans l'effet de l'halopéridol sur hERG qu'il n'est pas possible d'observer avec *hERG-Lite*®.

5.3.4 Les composés non classés par la méthode HERG-BRET

Huit composés sur 25 n'ont pas pu être classés à l'aide de la méthode HERG-BRET : amiodarone, chlorpromazine, droperidol, ivermectin, ketanserine, prazosin, terfenadine et verapamil.

Les courbes du ketanserine (*Figure 42*) ne s'éloignent que peu ou pas de la fenêtre délimitée par la moyenne du véhicule \pm (3 x écart type). En fait, le profil observé pour ce composé ressemble en tout point à celui observé pour l'acétaminophène (témoin), présenté à la *Figure 25*. Aussi, aucune des concentrations testées de ketanserine n'a causé de cytotoxicité. Ceci suggère que ce composé pharmaceutique n'ait aucun effet sur hERG. Cependant, ce résultat s'oppose à nos attentes à l'égard de ce composé étant donné que le ketanserine inhibe la fonction du canal Kv11.1 en *patch-clamp* (*Tableau V*). À noter que la méthode *hERG-Lite*® classifiait correctement le ketanserine.

Les courbes de la chlorpromazine (*Figure 30*), quant à elles, pourraient laisser croire à un effet double, comme le prédit le test *hERG-Lite*®. Par contre, les profils des 2^e et 3^e essais ne sont pas suffisamment accentués pour permettre de tirer une conclusion claire. Si la conclusion pouvait être établie seulement en fonction des 1^{er} et 4^e essais, un profil d'inhibiteur à effet double lui aurait été attribué. En effet, lors de ces deux essais, la courbe franchit le seuil supérieur de la fenêtre du véhicule à de faibles doses, puis redescend pour franchir le seuil inférieur à de fortes doses. Quoi qu'il en soit, à cette étape du développement du biosenseur, il est important de considérer chacun des résultats afin d'avoir une vue d'ensemble du comportement du modèle cellulaire en réponse au traitement avec les composés.

Pour ce qui est des 6 composés restants, aucune conclusion n'a pu être tirée étant donné que les résultats observés lors de chacun des essais étaient très variés et, jusqu'à un certain point, contradictoires. Par exemple, les résultats obtenus pour le

prazosin (*Figure 46*) sont contradictoires puisqu'un profil de chaperon pharmacologique a été obtenu lors du premier essai, qu'un profil nul (sans effet) a été observé pour les 2^e et 3^e essais et qu'un profil d'inhibiteur de trafic a été observé lors du dernier essai. Les résultats obtenus pour l'ivermectin présentent également des profils contradictoires d'un essai à un autre. Pourtant, lors des transfections transitoires effectuées en début de projet, ce composé pharmaceutique présentait un profil d'inhibiteur de trafic clair (*Figure 20*). On peut toutefois noter que les doses élevées ont occasionné une mortalité cellulaire importante lors des 4 essais HERG-BRET (*Figure 41*).

Quoi qu'il en soit, l'incapacité de la méthode HERG-BRET à classer un composé pharmaceutique ne dépend pas de la classe d'inhibition attendue pour ce médicament. En effet, parmi les 8 composés non classés, certains font théoriquement partie des bloqueurs du pore (droperidol, ketanserine, prazosin, verapamil), d'autres des inhibiteurs de trafic (ivermectin) et d'autres encore des inhibiteurs à effet double (amiodarone, chlorpromazine, terfenadine). Le déficit observé pour la méthode HERG-BRET serait donc *composé-dépendant* et non pas *classe-dépendant*. Il est possible que cette incapacité à classer ces composés soit due à la perte de sensibilité de l'essai lors du passage en population cellulaire stable, ce qui se manifeste par une diminution de la fenêtre d'interaction. On ne peut pas non plus exclure la possibilité qu'un composé interagisse directement avec la luciférase ou que l'insertion de *rLuc* dans la séquence codant pour *hERG* cache un site d'association avec un composé. Il serait pertinent d'obtenir des courbes de l'effet concentration-dépendant de l'ajout des composés non classés en transfections transitoires ou encore de tenter d'obtenir une sous population cellulaire stable avec une fenêtre dynamique plus importante pour poursuivre l'analyse. L'élargissement de la fenêtre dynamique permettrait probablement aussi de diminuer les variations importantes observées entre les essais pour un même composé.

5.3.5 HERG-BRET vs *hERG-Lite*®

Dans l'ensemble, les EC₅₀ obtenues pour les bloqueurs du pore sont généralement du même ordre de grandeur que ceux présentés pour la méthode *hERG-Lite*®. Par contre, plusieurs des composés testés n'ont pas pu être classés ou bien ont été classés dans une catégorie qui diffère de celle présentée pour la méthode *hERG-Lite*®. Ceci est

probablement dû à la différence entre les deux méthodes quant à la tolérance envers la mortalité cellulaire. Effectivement, pour la méthode HERG-BRET, les concentrations étaient considérées cytotoxiques si elles abaissaient les comptes *rGFP* sous un seuil correspondant au compte du véhicule moins trois fois l'écart type. Autrement dit, une faible tolérance à la mortalité a été établie pour le test HERG-BRET étant donné que la viabilité cellulaire est susceptible de biaiser les résultats (l'objectif étant de mesurer l'effet d'un composé envers hERG et non pas envers la cellule en entier). La méthode *hERG-Lite*®, quant à elle, considère les résultats obtenus valides si 25% des cellulesensemencées demeurent toujours au fond du puits à la fin d'un essai. Elle tolère donc un effet cytotoxique aussi grand que 75%. Ceci permet à *hERG-Lite*® d'avoir des données pour des doses très élevées. Par contre, il est tout à fait plausible de croire que cette mortalité impose un biais qui influence les résultats. En effet, cette méthode repose uniquement sur la quantité de hERG à la membrane, évaluée par immunodétection de l'étiquette HA extracellulaire. Une trop grande mortalité cellulaire cause directement une baisse de hERG détecté (les membranes des cellules mortes étant aspirées lors des lavages). Concrètement, un composé identifié comme inhibiteur de trafic par la méthode *hERG-Lite*® peut ne pas réellement en être un puisque l'effet d'inhibition commence à être observé, dans la majorité des cas, à des concentrations aussi élevées que 10 μM (concentration susceptible de causer une toxicité).

6. Conclusion et perspectives

En somme, ce projet de maîtrise visait à développer un test permettant l'identification des composés pharmaceutiques susceptibles d'induire des fluctuations de l'expression membranaire du canal Kv11.1. La méthode utilisée pour détecter les risques d'interactions entre un composé et la sous unité protéique *hERG* est le *bioluminescence resonance energy transfer* (BRET). Celui-ci implique l'utilisation d'un couple de protéine formé d'un donneur et d'un accepteur d'énergie. La première partie du projet visait à identifier le donneur d'énergie le plus adéquat (l'accepteur ayant déjà été développé et validé dans le passé). Lorsque ce donneur a été sélectionné, une lignée cellulaire stable exprimant à la fois le donneur et l'accepteur d'énergie a été générée. Vingt-cinq composés pharmaceutiques ont finalement été testés sur le modèle cellulaire HERG-BRET, puis les résultats ont été comparés à une méthode alternative (*hERG-Lite*®) et à la méthode de référence (*patch-clamp*).

La méthode HERG-BRET s'est avérée être d'une sensibilité à peu près équivalente à *hERG-Lite*®, ces deux méthodes étant considérablement moins sensibles que le *patch-clamp* (1 à 2 log de différence). Aussi, la classification des composés a été différente d'une méthode à l'autre. HERG-BRET ne parvient pas à détecter et à classer certains inhibiteurs connus. Par contre, *HERG-Lite*® tolère une très grande cytotoxicité ce qui occasionne de toute évidence un biais dans l'analyse des résultats. Il est clair que ces deux méthodes ne remplaceront jamais le *patch-clamp*. Toutefois, elles semblent soulever des observations pertinentes complémentaires à celles obtenues à l'aide des tests d'électrophysiologie. La principale raison est que la période d'exposition à un composé est beaucoup plus grande (16h) pour les méthode *hERG-Lite*® et HERG-BRET, ce qui permet de déceler des modifications dans des processus cellulaires complexes comme le transport vésiculaire. Quoi qu'il en soit, dans le protocole standardisé de la méthode HERG-BRET, il a été impératif d'inclure un test de viabilité cellulaire, d'utiliser les contrôles nécessaires et d'évaluer la possibilité d'un effet dû au positionnement des cellules dans la plaque. Ce dernier exemple a été rencontré en cours de développement : les ratios BRET pour une plaque remplie de la même condition étaient considérablement plus bas dans les colonnes 1 et 12 d'une plaque à 96 puits (résultats non présentés). Pour cette raison, ces deux colonnes ont été laissées vides lors de l'obtention des courbes doses-réponses finales.

L'idée derrière la méthode HERG-BRET a une valeur ajoutée comparativement à la méthode *HERG-Lite*®. En effet, en utilisant des accepteurs d'énergie fluorescents dans d'autres compartiments cellulaires comme le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, les vésicules d'endocytose ou les endosomes et en appliquant le même principe, on peut imaginer qu'il serait possible de *monitorer* les déplacements de hERG-rLuc dans la cellule sous différentes conditions. [79] Ceci permettrait un avancement considérable au niveau de la recherche fondamentale sur cette sous unité protéique du canal Kv11.1.

De plus, une utilité alternative de la méthode HERG-BRET serait l'identification de candidats thérapeutiques pour traiter les patients atteints de mutations héréditaires induisant une rétention intracellulaire de hERG. En effet, cette méthode a pour premier objectif de permettre la discrimination des molécules présentant un risque d'interagir avec hERG. Toutefois, il est possible qu'un composé s'associe à hERG dans un autre domaine que le pore et qu'il augmente son trafic vésiculaire sans toutefois bloquer le passage des ions une fois rendu à la PM.

Finalement, une complexité additionnelle de la problématique est l'effet du polymorphisme sur la réponse cellulaire à un médicament. En effet, le potentiel de prolongation de l'intervalle QT varie d'un composé pharmaceutique à un autre, mais il peut également varier d'un patient à un autre pour un même composé. Le même phénomène peut être dû à des interactions médicamenteuses influencées, entre autres, par la diète d'un patient et son profil pharmacologique. Aussi, certains composés pharmaceutiques exercent des effets sur d'autres constituants cellulaires qui peuvent compenser pour l'effet associé à hERG ou encore l'exacerber. Pour ces raisons, les besoins entourant l'évaluation du risque cardiotoxique des médicaments sont très complexes et ne seront probablement comblés qu'à l'aide d'une combinaison de plusieurs méthodologies adressant des aspects différents de la problématique.

7. Bibliographie

1. Tripathi, O.N., U. Ravens, and M.C. Sanguinetti, *Heart Rate and Rhythm: Molecular Basis, Pharmacological Modulation and Clinical Implications*. 2011: Springer Berlin Heidelberg.
2. Ministre, t.p.e.s.g.C., *Ligne directrice à l'intention de l'industrie: Évaluation non-clinique du risque de repolarisation retardée (allongement de l'intervalle QT) par des produits pharmaceutiques à usage humain - ICH thème S7B*, D.g.d.p.d.s.e.d. aliments, Editor. 2006, Santé Canada - Publications: Ottawa, Ontario.
3. Lilly, L.S., *Pathophysiology of Heart Disease: A Collaborative Project of Medical Students and Faculty*. 2012: Wolters Kluwer Health.
4. Gussak, I., et al., *Electrical Diseases of the Heart: Genetics, Mechanisms, Treatment, Prevention*. 2008: Springer.
5. Vandenberg, J.I., et al., *hERG K(+) channels: structure, function, and clinical significance*. *Physiol Rev*, 2012. **92**(3): p. 1393-478.
6. Robertson, G.A., *Endocytic control of ion channel density as a target for cardiovascular disease*. *J Clin Invest*, 2009. **119**(9): p. 2531-4.
7. Lexchin, J., *How safe are new drugs? Market withdrawal of drugs approved in Canada between 1990 and 2009*. *Open Med*, 2014. **8**(1): p. e14-9.
8. Canada, S. *Archive - Arrêt de vente de l'antipsychotique Thioridazine*. 2005 2015/11/17]; Available from: <http://canadiensensante.gc.ca/recall-alert-rappel-avis/hc-sc/2005/13707a-fra.php>.
9. Schoonmaker, F.W., R.T. Osteen, and J.C. Greenfield, Jr., *Thioridazine (mellaril)-induced ventricular tachycardia controlled with an artificial pacemaker*. *Ann Intern Med*, 1966. **65**(5): p. 1076-8.
10. Hondeghem, L.M., et al., *Drug-induced QTC prolongation dangerously underestimates proarrhythmic potential: lessons from terfenadine*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2011. **57**(5): p. 589-97.
11. Fauchier, L., et al., *Effect of verapamil on QT interval dynamicity*. *Am J Cardiol*, 1999. **83**(5): p. 807-8, A10-1.
12. Yang, T., D. Snyders, and D.M. Roden, *Drug block of I(kr): model systems and relevance to human arrhythmias*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2001. **38**(5): p. 737-44.
13. Canada, S. *Nouvelles mises en garde cardiaques relatives au médicament Sensipar*. 2013 2015/11/18]; Available from: <http://canadiensensante.gc.ca/recall-alert-rappel-avis/hc-sc/2013/36267a-fra.php>.
14. Canada, S. *XGEVA (denosumab) - Risque d'hypocalcémie symptomatique sévère pouvant être fatale - Pour les professionnels de la santé*. 2012 2015/11/18]; Available from: <http://canadiensensante.gc.ca/recall-alert-rappel-avis/hc-sc/2012/14811a-fra.php>.
15. Canada, S. *RASILEZ (aliskirène) et RASILEZ HCT (aliskirène/hydrochlorothiazide) - Risques potentiels d'effets indésirables cardiovasculaires et rénaux chez les patients atteints de diabète de type 2 - Pour les professionnels de la santé*. 2012 2016/01/06]; Available from: <http://canadiensensante.gc.ca/recall-alert-rappel-avis/hc-sc/2012/14685a-fra.php>.
16. Canada, S. *Archivé - Importante Mise en Garde au SERENTIL de la compagnie Novartis*. 2000 2015/11/17]; Available from: <http://canadiensensante.gc.ca/recall-alert-rappel-avis/hc-sc/2000/14321a-fra.php>.
17. Canada, S. *Archivé - PREPULSID (Cisapride)*. 2000 2015/11/17]; Available from: <http://canadiensensante.gc.ca/recall-alert-rappel-avis/hc-sc/2000/14309a-fra.php>.
18. Canada, S. *Archivé - Renseignements importants concernant l'innocuité de ZOLOFT (chlorhydrate de sertraline) Pfizer Canada Inc. - Avis destinés aux professionnels de la*

- santé. 2003 2015/11/18]; Available from: <http://canadiensensante.gc.ca/recall-alert-rappel-avis/hc-sc/2003/14238a-fra.php>.
19. Canada, S. *Renseignements importants en matière d'innocuité concernant l'utilisation concomitante de PAXIL ou PAXIL CR et du pimozide (Orap) – GlaxoSmithKline Inc. – pour les professionnels de la santé.* 2005 2015/11/18]; Available from: <http://canadiensensante.gc.ca/recall-alert-rappel-avis/hc-sc/2005/14357a-fra.php>.
 20. Canada, S. *Darvon-N (dextropropoxyphène) - Rappel et retrait au Canada - Pour les professionnels de la santé.* 2010 2015/11/18]; Available from: <http://canadiensensante.gc.ca/recall-alert-rappel-avis/hc-sc/2010/14597a-fra.php>.
 21. Canada, S. *INVIRASE (mésylate de saquinavir) - Nécessité d'un suivi par électrocardiogramme chez les patients - Pour les professionnels de la santé.* 2010 2015/11/17]; Available from: <http://canadiensensante.gc.ca/recall-alert-rappel-avis/hc-sc/2010/14611a-fra.php>.
 22. Canada, S. *Dropéridol injection USP - Association avec des arythmies sévères - Pour les professionnels de la santé.* 2010 2015/11/18]; Available from: <http://canadiensensante.gc.ca/recall-alert-rappel-avis/hc-sc/2010/14599a-fra.php>.
 23. Canada, S. *STRATTERA (atomoxétine) - Association avec une hausse de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque - Pour les professionnels de la santé.* 2011 2015/11/17]; Available from: <http://canadiensensante.gc.ca/recall-alert-rappel-avis/hc-sc/2011/14662a-fra.php>.
 24. Canada, S. *ANZEMET (mésylate de dolasétron) - Retrait de la solution injectable par voie intraveineuse dosée à 20 mg/mL en raison du risque d'arythmies - Pour les professionnels de la santé.* 2011 2015/11/18]; Available from: <http://canadiensensante.gc.ca/recall-alert-rappel-avis/hc-sc/2011/14633a-fra.php>.
 25. Canada, S. *Renseignements importants en matière d'innocuité approuvés par Santé Canada concernant ZOFRAN (chlorhydrate d'ondansétron dihydraté, ondansétron).* 2012 2015/11/17]; Available from: <http://canadiensensante.gc.ca/recall-alert-rappel-avis/hc-sc/2012/15080a-fra.php>.
 26. Canada, S. *Celexa (citalopram) - Association à des anomalies du rythme cardiaque - Pour le public.* 2012 2015/11/17]; Available from: <http://canadiensensante.gc.ca/recall-alert-rappel-avis/hc-sc/2012/16887a-fra.php>.
 27. Canada, S. *CAPRELSA (vandétanib) - Risque sérieux d'anomalie du rythme cardiaque - Pour les professionnels de la santé.* 2012 2015/11/18]; Available from: <http://canadiensensante.gc.ca/recall-alert-rappel-avis/hc-sc/2012/14671a-fra.php>.
 28. Canada, S. *Antidépresseur Cipralex (escitalopram) : Nouveaux renseignements concernant le risque cardiaque lié à la dose.* 2012 2015/11/18]; Available from: <http://canadiensensante.gc.ca/recall-alert-rappel-avis/hc-sc/2012/13674a-fra.php>.
 29. Canada, S. *Zithromax/Zmax SR (azithromycine) - Risque de battements de coeur irréguliers pouvant entraîner la mort - Pour les professionnels de la santé.* 2013 2015/11/17]; Available from: <http://canadiensensante.gc.ca/recall-alert-rappel-avis/hc-sc/2013/29199a-fra.php>.
 30. Canada, S. *REMERON/REMERON RD (mirtazapine) - Rythme cardiaque anormal - Pour les professionnels de la santé.* 2014 2015/11/18]; Available from: <http://canadiensensante.gc.ca/recall-alert-rappel-avis/hc-sc/2014/38709a-fra.php>.
 31. Canada, S. *Maléate de dompéridone - Association à la survenue de rythmes cardiaques anormaux graves ou de mort subite (arrêt cardiaque) - Pour les professionnels de la santé.* 2015 2015/11/18]; Available from: <http://canadiensensante.gc.ca/recall-alert-rappel-avis/hc-sc/2015/43423a-fra.php>.
 32. Canada, S. *Notice of Compliance Information.* 2012 2016/01/06]; Available from: <http://webprod5.hc-sc.gc.ca/noc-ac/info.do?no=12921&lang=eng>.

33. Canada, S. *Notice of Compliance Information*. 2011 2016/01/06]; Available from: <http://webprod5.hc-sc.gc.ca/noc-ac/info.do?no=12336&lang=eng>.
34. Huffaker, S.J., et al., *A primate-specific, brain isoform of KCNH2 affects cortical physiology, cognition, neuronal repolarization and risk of schizophrenia*. *Nat Med*, 2009. **15**(5): p. 509-18.
35. Parr, E., et al., *ERG K⁺ channels modulate the electrical and contractile activities of gallbladder smooth muscle*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003. **284**(3): p. G392-8.
36. Shoeb, F., A.P. Malykhina, and H.I. Akbarali, *Cloning and functional characterization of the smooth muscle ether-a-go-go-related gene K⁺ channel. Potential role of a conserved amino acid substitution in the S4 region*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(4): p. 2503-14.
37. Rosati, B., et al., *Glucose- and arginine-induced insulin secretion by human pancreatic beta-cells: the role of HERG K⁽⁺⁾ channels in firing and release*. *FASEB J*, 2000. **14**(15): p. 2601-10.
38. Pillozzi, S., et al., *HERG potassium channels are constitutively expressed in primary human acute myeloid leukemias and regulate cell proliferation of normal and leukemic hemopoietic progenitors*. *Leukemia*, 2002. **16**(9): p. 1791-8.
39. Cherubini, A., et al., *HERG potassium channels are more frequently expressed in human endometrial cancer as compared to non-cancerous endometrium*. *Br J Cancer*, 2000. **83**(12): p. 1722-9.
40. Bianchi, L., et al., *herg encodes a K⁺ current highly conserved in tumors of different histogenesis: a selective advantage for cancer cells?* *Cancer Res*, 1998. **58**(4): p. 815-22.
41. Morais Cabral, J.H., et al., *Crystal structure and functional analysis of the HERG potassium channel N terminus: a eukaryotic PAS domain*. *Cell*, 1998. **95**(5): p. 649-55.
42. Warmke, J.W. and B. Ganetzky, *A family of potassium channel genes related to eag in Drosophila and mammals*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(8): p. 3438-42.
43. Brelidze, T.I., et al., *Structure of the C-terminal region of an ERG channel and functional implications*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(28): p. 11648-53.
44. Sanguinetti, M.C. and M. Tristani-Firouzi, *hERG potassium channels and cardiac arrhythmia*. *Nature*, 2006. **440**(7083): p. 463-9.
45. Satler, C.A., et al., *Multiple different missense mutations in the pore region of HERG in patients with long QT syndrome*. *Hum Genet*, 1998. **102**(3): p. 265-72.
46. Zhang, L., et al., *An intronic mutation causes long QT syndrome*. *J Am Coll Cardiol*, 2004. **44**(6): p. 1283-91.
47. Gong, Q., et al., *Nonsense mutations in hERG cause a decrease in mutant mRNA transcripts by nonsense-mediated mRNA decay in human long-QT syndrome*. *Circulation*, 2007. **116**(1): p. 17-24.
48. Anderson, C.L., et al., *Most LQT2 mutations reduce Kv11.1 (hERG) current by a class 2 (trafficking-deficient) mechanism*. *Circulation*, 2006. **113**(3): p. 365-73.
49. Ficker, E., et al., *Role of the cytosolic chaperones Hsp70 and Hsp90 in maturation of the cardiac potassium channel HERG*. *Circ Res*, 2003. **92**(12): p. e87-100.
50. Zhou, Z., et al., *HERG channel dysfunction in human long QT syndrome. Intracellular transport and functional defects*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(33): p. 21061-6.
51. Piippo, K., et al., *Homozygosity for a HERG potassium channel mutation causes a severe form of long QT syndrome: identification of an apparent founder mutation in the Finns*. *J Am Coll Cardiol*, 2000. **35**(7): p. 1919-25.
52. Crotti, L., et al., *Long QT syndrome-associated mutations in intrauterine fetal death*. *JAMA*, 2013. **309**(14): p. 1473-82.
53. Ficker, E., et al., *Retention in the endoplasmic reticulum as a mechanism of dominant-negative current suppression in human long QT syndrome*. *J Mol Cell Cardiol*, 2000. **32**(12): p. 2327-37.

54. Kagan, A., et al., *The dominant negative LQT2 mutation A561V reduces wild-type HERG expression*. J Biol Chem, 2000. **275**(15): p. 11241-8.
55. Zhao, J.T., et al., *Not all hERG pore domain mutations have a severe phenotype: G584S has an inactivation gating defect with mild phenotype compared to G572S, which has a dominant negative trafficking defect and a severe phenotype*. J Cardiovasc Electrophysiol, 2009. **20**(8): p. 923-30.
56. Furutani, M., et al., *Novel mechanism associated with an inherited cardiac arrhythmia: defective protein trafficking by the mutant HERG (G601S) potassium channel*. Circulation, 1999. **99**(17): p. 2290-4.
57. Sanguinetti, M.C., et al., *Spectrum of HERG K⁺-channel dysfunction in an inherited cardiac arrhythmia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(5): p. 2208-12.
58. Ficker, E., et al., *Mechanisms of arsenic-induced prolongation of cardiac repolarization*. Mol Pharmacol, 2004. **66**(1): p. 33-44.
59. Wible, B.A., et al., *HERG-Lite: a novel comprehensive high-throughput screen for drug-induced hERG risk*. J Pharmacol Toxicol Methods, 2005. **52**(1): p. 136-45.
60. Kuryshev, Y.A., et al., *Pentamidine-induced long QT syndrome and block of hERG trafficking*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **312**(1): p. 316-23.
61. Rajamani, S., et al., *Drug-induced long QT syndrome: hERG K⁺ channel block and disruption of protein trafficking by fluoxetine and norfluoxetine*. Br J Pharmacol, 2006. **149**(5): p. 481-9.
62. Takemasa, H., et al., *Coexistence of hERG current block and disruption of protein trafficking in ketoconazole-induced long QT syndrome*. Br J Pharmacol, 2008. **153**(3): p. 439-47.
63. Liu, J., et al., *Structural and functional role of the extracellular s5-p linker in the HERG potassium channel*. J Gen Physiol, 2002. **120**(5): p. 723-37.
64. Torres, A.M., et al., *Structure of the HERG K⁺ channel S5P extracellular linker: role of an amphipathic alpha-helix in C-type inactivation*. J Biol Chem, 2003. **278**(43): p. 42136-48.
65. Stansfeld, P.J., et al., *Drug block of the hERG potassium channel: insight from modeling*. Proteins, 2007. **68**(2): p. 568-80.
66. Stansfeld, P.J., et al., *Insight into the mechanism of inactivation and pH sensitivity in potassium channels from molecular dynamics simulations*. Biochemistry, 2008. **47**(28): p. 7414-22.
67. Chen, J., G. Seebohm, and M.C. Sanguinetti, *Position of aromatic residues in the S6 domain, not inactivation, dictates cisapride sensitivity of HERG and eag potassium channels*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(19): p. 12461-6.
68. Ficker, E., et al., *Molecular determinants of dofetilide block of HERG K⁺ channels*. Circ Res, 1998. **82**(3): p. 386-95.
69. Lees-Miller, J.P., et al., *Molecular determinant of high-affinity dofetilide binding to HERG1 expressed in Xenopus oocytes: involvement of S6 sites*. Mol Pharmacol, 2000. **57**(2): p. 367-74.
70. Tseng, G.N., et al., *Probing the outer mouth structure of the HERG channel with peptide toxin footprinting and molecular modeling*. Biophys J, 2007. **92**(10): p. 3524-40.
71. Tang, W., et al., *Development and evaluation of high throughput functional assay methods for HERG potassium channel*. J Biomol Screen, 2001. **6**(5): p. 325-31.
72. Rezazadeh, S., J.C. Hesketh, and D. Fedida, *Rb⁺ flux through hERG channels affects the potency of channel blocking drugs: correlation with data obtained using a high-throughput Rb⁺ efflux assay*. J Biomol Screen, 2004. **9**(7): p. 588-97.
73. Dorn, A., et al., *Evaluation of a high-throughput fluorescence assay method for HERG potassium channel inhibition*. J Biomol Screen, 2005. **10**(4): p. 339-47.

74. Ficker, E., et al., *The binding site for channel blockers that rescue misprocessed human long QT syndrome type 2 ether-a-gogo-related gene (HERG) mutations*. J Biol Chem, 2002. **277**(7): p. 4989-98.
75. Zhou, Z., Q. Gong, and C.T. January, *Correction of defective protein trafficking of a mutant HERG potassium channel in human long QT syndrome. Pharmacological and temperature effects*. J Biol Chem, 1999. **274**(44): p. 31123-6.
76. Bacart, J., et al., *The BRET technology and its application to screening assays*. Biotechnol J, 2008. **3**(3): p. 311-24.
77. Couturier, C. and B. Deprez, *Setting Up a Bioluminescence Resonance Energy Transfer High throughput Screening Assay to Search for Protein/Protein Interaction Inhibitors in Mammalian Cells*. Front Endocrinol (Lausanne), 2012. **3**: p. 100.
78. Charest, P.G., S. Terrillon, and M. Bouvier, *Monitoring agonist-promoted conformational changes of beta-arrestin in living cells by intramolecular BRET*. EMBO Rep, 2005. **6**(4): p. 334-40.
79. Namkung, Y., et al., *Monitoring G protein-coupled receptor and beta-arrestin trafficking in live cells using enhanced bystander BRET*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 12178.