

UNIVERSITÉ DE NANTES

FACULTÉ DE MÉDECINE

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTÉ

Année 2012

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

N° 13

Physiopathologie des troubles du rythme et de la conduction cardiaques :

Nouvelles pistes

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie

Spécialité : Physiopathologie Cardiovasculaire

Présentée

et soutenue publiquement par

Delphine BÉZIAU

Le 14 septembre 2012, devant le jury ci-dessous

<i>Président</i>	Mme GAUTHIER-ERFANIAN Chantal, PU • <i>Université de Nantes</i>
<i>Rapporteurs</i>	M. BENITAH Jean-Pierre, CR1 • <i>Université Paris Sud 11</i> M. LORY Philippe, DR2 • <i>Université de Montpellier 1 et 2</i>
<i>Examineurs</i>	M. COULOMBE Alain, DR2 • <i>Université Pierre et Marie Curie, Paris</i> M. GUIHARD Gilles, MCU • <i>Université de Nantes</i>
<i>Directeur de thèse</i>	Mme BARÓ Isabelle, DR2 • <i>Université de Nantes</i>

***Vise toujours la lune, si tu rates,
tu atterriras parmi les étoiles...***

[Oscar Wilde]

Remerciements

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements aux Docteurs Jean-Pierre Benitah et Philippe Lory pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Merci également aux Docteurs Alain Coulombe et Gilles Guihard pour m'avoir consacré un peu de leur temps ces trois dernières années pour mon suivi de thèse et d'être aujourd'hui examinateurs de mon travail. Je remercie très chaleureusement le Professeur Chantal Gauthier d'avoir accepté de présider ce jury de thèse et de m'avoir fait confiance dans mon activité d'enseignement. Merci Chantal pour vos conseils et vos encouragements.

Je tiens à remercier les Professeurs Pierre Pacaud et Hervé Le Marec pour m'avoir accueillie à l'institut. Merci de votre disponibilité et votre aide. Merci également au Professeur Patricia Lemarchand pour son soutien lors de ma demande de financement de thèse.

Il y a maintenant 6 ans que j'ai frappé à la porte du bureau d'Isabelle Baró pour effectuer un stage dans son équipe. Isa, merci d'avoir été le stimulus activateur de ma passion pour les canaux ioniques. Merci de m'avoir fait confiance tout au long de ma thèse. Merci de m'avoir apporté ton soutien dans les hauts et les bas tant personnels que professionnels. J'ai beaucoup apprécié nos discussions « extralab » autour d'une table à San Diego ou à Nantes. J'ai énormément appris à tes côtés, et j'espère avoir été à la hauteur de tes espérances.

Flavien, Jean et Céline, mes ex-colocataires, merci de votre bonne (et mauvaise) humeur dans le bureau 234 ! Flavien, merci de votre gentillesse et de vos précieux conseils, même si l'attente est parfois longue pour passer la porte de votre bureau, vous prenez toujours le temps de nous recevoir et de répondre à nos questions. Jean, le rouge vous va si bien, votre humour va me manquer outre Atlantique. Votre patience à mes interminables questions de biochimie méritera que je vous lègue mon timer ! Céline, tu as été ma grande sœur survoltée ces trois dernières années. Franche et de bons conseils, tu as toujours trouvé les mots justes pour me remettre le pied à l'étrier dans les moments de grande remise en question. Je tenais à te féliciter de tes progrès en « désaméricanisation », j'ai adoré partagé mon bureau avec toi, un grand merci Céline !

Gildas, sans toi le cliché du savant fou n'existerait pas ! Parler de sciences avec toi est un plaisir. Tu m'as beaucoup appris au cours de ces 6 années au laboratoire, merci d'avoir toujours été disponible pour moi. J'espère que ton Gildas Positionning System ne te fera pas de farce à San Francisco, bonne chance dans ce nouveau « post-doc ».

Un grand merci à notre équipe administrative de choc : Corinne, Anne, Isabelle, Sylvie, Raïssa, Sonia et Vimla. J'admire votre patience et votre gentillesse, vous êtes la force de ce labo.

J'aimerais maintenant remercier toute l'équipe des patchistes. Julien Piron, Céline Nicolas, Jérôme Mordel, Frank Choveau et Nicolas Rodriguez, les « anciens » qui m'ont transmis le gène de résistance à l'électrophysiologie. Tiphaine, Jean-Baptiste et Thomas, je vous souhaite bonne chance pour le début de l'aventure en thèse ! Fayal, Fabien, Sébastien et Zeineb, les « actuels » avec qui j'ai partagé mes cris de joies et crises de nerfs devant l'install. Zeineb, ça a été un plaisir de faire ta connaissance, je te souhaite de t'épanouir dans ton nouveau job de post-doc Maman. Fayal, travailler à tes côtés apprend à rester zen et à relativiser. Je n'oublierai jamais ce fameux jour férié en salle de patch, où vous m'avez brillamment piégé toi et Yassine. Je te souhaite bonne chance pour ta fin de thèse à San Francisco ! Fabien Isk, nos compets de seal me manqueront au Canada. J'emporterai bien tes lunettes en souvenir, mais j'ai peur pour ta santé. Merci de ta bonne humeur et de ta gentillesse, bon courage dans toutes les tâches que je te laisse gracieusement au labo ! A toute l'équipe de canalopathes, un grand merci ! Agnès H, Agnès C, Marie-Jo, Béa, Stéphanie et Aurore, merci de votre précieuse aide pour nos manips. Françoise, Gilles, Benoît J, Mickaël, Nicolas, Ludovic et Jérôme, ce fût un plaisir de travailler avec vous. Merci

également à Philippe pour ces précieux conseils en microscopie confocale, pour sa disponibilité et sa gentillesse.

Merci à toute l'équipe enseignante de la fac des sciences : Chantal, Patrick, Chrystelle, Angela, Xavier, Hélène et Murielle, pour votre aide et votre disponibilité au cours de ces 3 années de monitorat.

J'ai trouvé ma deuxième famille au laboratoire au sein de l'équipe de génétique. Merci à tous d'avoir fait une petite place à une patchiste qui n'aime pas le sucre dans votre grande confrérie de la gourmandise ! Merci Françoise, Aurore, Florence, Jean Jacques, Richard, Aude, JB, Eric, Martine, Marie-France, Pierre, Marta, Christian, Floriane, Xavier, Mini Steph, Jade, Hadja et Vincent pour votre bonne humeur et l'ensemble de ces très bons moments partagés. Hadja, ton rire communicatif résonnera encore longtemps dans mes souvenirs. Vincent, on se suit depuis 20 ans maintenant, je te donne RDV à Montréal !

Un grand merci aux « anciens » qui m'ont accueilli avec gentillesse et qui m'ont aidé à retrouvé mon chemin dans le labyrinthe de nos anciens locaux à la fac de médecine : Patrice, Benoît B, David, Solena, Raph et Leslie. Merci également aux « ex Laennec-Tek », Patricia, Linda, Soizic et Emmanuel, avec qui j'ai eu le plaisir de travailler durant l'été 2009.

Je ne peux pas citer tout le monde, mais j'ai une pensée pour chacun des membres de l'institut du thorax avec lesquels j'ai pu échanger au cours de ces 6 années.

Un grand merci à Jonathan Ledoux d'avoir accepté de me recevoir en post-doc dans son équipe à l'institut de cardiologie de Montréal.

J'arrive maintenant à ceux avec qui j'ai autant partagé sur le plan personnel que professionnel. David, conciliant et de bonne humeur à tout moment, merci d'avoir toujours le sourire au milieu de ta barbe mal rasée et d'être aussi bavard passée une certaine heure ! 16 octobre 2009, Julien, ta soirée de fin de thèse nous a permis d'apprendre à nous connaître et à devenir amis. J'ai mille mercis à t'adresser : merci pour l'appartement, pour Saint Gilles et surtout merci pour les jolis projets que tu m'as confié, ça a été un vrai plaisir de travailler avec toi, j'apprécie ta rigueur et ta détermination. Ben (Lauzier), croiser ton chemin a été une chance pour moi. Je te remercie de toutes les excellentes soirées passées ensemble. Nos débats sur la vie, le Taï-Shogun, le week-end jeux. Merci de tes diarrhées verbales qui font ton charme ! Et bien sûr merci de t'être autant impliqué pour m'aider à donner une suite à ma thèse.

A mes copainllègues Rétais d'adoption : Laetitia, Ben C, Babeth et Sandie. Que de bons souvenirs avec vous aussi. 3 km au large du continent et on oublie le temps d'un week end ce qui fait qu'on se connaît tous. Babeth, miss multicolore, merci de ton peps et de ton rire si communicatif. C'est un plaisir de te retrouver le temps d'un détour à Nantes ! Sandie, je t'ai découverte en apache au coin d'un tipi, merci de ta joie de vivre et d'être toujours partante pour t'amuser. Je garde un super souvenir de nos soirées time's up qui m'auront appris qui est le général MacArthur ! Laetitia, avec tes quelques années supplémentaires (si si) tu nous prouves que rester jeune c'est dans la tête. Merci de ton dynamisme et de ta générosité. Qui va m'accompagner sur la route du travail, maintenant ? Ben, mon petit oiseau préféré, des bancs de la fac à notre cosoutenance d'hypodoctorat en passant par le petit Jet27 Batard, merci d'avoir toujours le mot pour me faire sourire, merci de m'avoir fait partager tes passions pour Rachmaninov et le ciel étoilé et surtout merci de nous avoir organisé des week-end inoubliables. Je suis très contente d'avoir partagé ces trois années de thèse avec quelqu'un d'aussi brillant que toi. Je te souhaite le meilleur pour ta soutenance et surtout pour la suite.

A mes grandes copines du labo : Sabine, Anne, Steph, Estelle et Nolwenn. Anne, tu es la première à t'être occupée de moi au labo. J'ai tout de suite eu un coup de cœur pour toi, tu es un rayon de soleil avec ton rire si communicatif ! Merci de m'avoir soutenu et d'être toujours présente malgré la distance ! Estelle, ma maman d'adoption, très attirée par la sorcière à ses heures perdues... Merci d'avoir été si attentionnée à mon égard, merci pour

ton écoute et surtout merci pour m'avoir fait gagner mon pari de thèse ;). Nolwenn, derrière ta discrétion se cache une fille avec un cœur en or... Merci pour tous les bons moments passés ensemble au labo et en dehors. J'ai hâte de te retrouver à Montréal ! Steph, ma grande sœur, toujours prévenante et attentionnée. Merci pour ton écoute et ton amitié sans faille. Je suis si heureuse d'avoir partagé ce WE d'EVJF avec toi à Paris, je te souhaite un beau mariage avec ton chéri et plein de bonheur, parce que tu le mérites ! Ma Sabine, au cœur grand comme ça... Merci de tous ces inoubliables moments passés en ta compagnie ! Merci d'avoir su redonner vie à ma pelle à neige, d'avoir pris tes clés pour m'emmener à Pornic... Merci d'être toi, et d'être toujours là pour les autres, je te souhaite plein de bonheur

dans ta nouvelle vie...



A mes deux irremplaçables copains : Simon et Yassine. Yassine, mon deuxième frère, mon confident, mon binôme de boxe, mon binôme de patch, mon ami, merci. Merci de tous ces moments passés avec toi. De la Cigale à notre plateau de fruits de mer en passant par Vertou, je n'ai que des souvenirs inoubliables... Merci de ta bienveillance à mon égard, de ta gentillesse et de ta patience. Merci d'avoir su trouver les mots pour me remonter le moral, de m'avoir autant fait rire, merci d'être toujours là ! Simon, sans toi, ma thèse n'aurait jamais été la même... Tellement de souvenirs avec toi... Je n'arrive pas à faire de phrases pour t'exprimer à quel point tu es un ami exceptionnel et combien tu me manqueras quand je serai partie. A défaut, j'ai des mots : fraises, lundi, vestiaire, escalier, flan aux pruneaux, perroquet, rock, Gainsbourg, guitare, Noir Dez, caravane, Parnière, Baba, je chante un baiser...

A tous mes amis de Vendée, Nantes, Rennes, Paris et de Navarre, merci d'avoir toujours eu les bonnes questions : « et ta thèse, elle avance ??? », « tu cherches, mais tu trouves au moins ? ». Merci les copains de m'avoir sorti la tête du guidon, et d'avoir su comprendre mes absences répétées ces dernières années.

Merci Jean, Béatrice, Sylvain, Anne-Lise, Naïs, Ethel, Mohammed, Mamadou, Mariama, Diané, Karamba, Aïssatou et Dalo pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail et pour tous les bons moments passés avec vous.

Un merci tout particulier à ma copine Caro et à Benoît qui ont toujours été là pour m'encourager. Merci de m'avoir fait le plaisir d'être la marraine de votre adorable petite Lili.

A ma famille, Papa, Maman, Yohann, Lucie, Mamie, Tata, Jean-Louis et à ceux qui ne sont plus, avec qui j'aurais tant aimé partager l'aboutissement de ces années de travail. Yohann, mon frère adoré et Lucie ma future belle-sœur, je vous remercie d'avoir toujours été là pour moi. Ce mois de Septembre va être chargé en émotions, puisque vous avez choisi de vous marier. Je vous souhaite la plus belle des vies tous les 2. Papa, Maman, merci pour tout ce que vous avez fait pour moi. Merci d'avoir soutenu mon choix de carrière et de m'avoir aidé à m'y épanouir même si ça a été aux dépens de se voir de nombreuses fois. Votre affection m'a permis d'aller au-delà de mes limites. J'ai de la chance d'avoir des parents comme vous. Rien ne m'est plus cher que la fierté que je lis dans vos yeux.

A Baptiste. Tu es arrivé dans ma vie en plein dans cette extraordinaire aventure, plus d'un aurait pris peur, mais pas toi. Tu es resté et tu as accepté le partage de mes journées entre toi et le labo. Merci d'avoir su m'apporter l'équilibre nécessaire pour accomplir ce travail, d'avoir su m'encourager et m'écouter. Merci de t'être autant intéressé à mon travail jusqu'à en connaître les détails. Je suis heureuse que tu aies accepté de me suivre outre-Atlantique pour mon post-doc.

Table des matières

REMERCIEMENTS	I
TABLE DES MATIERES.....	V
LISTE DES ABREVIATIONS	IX
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	XI
LISTE DES TABLEAUX	XIII
AVANT-PROPOS	1
I. INTRODUCTION.....	3
I – L’ACTIVITE ELECTRIQUE CARDIAQUE	5
I.1 – Naissance et conduction de l’influx électrique dans le cœur	5
I.2 – L’électrocardiogramme.....	6
I.3 – Le potentiel d’action et les courants ioniques.....	9
I.3.1 – Les différentes phases et les courants impliqués.....	9
I.3.2 – Périodes réfractaires	11
I.3.3 – Hétérogénéité électrique intrinsèque du cœur	11
II – LES CANAUX IONIQUES CARDIAQUES.....	15
II.1 - <i>Rappels électrophysiologiques</i>	15
II.2 – <i>Les canaux calciques de type L</i>	19
II.2.1 – Rôle physiologique	20
II.2.1.1 – courant dépolarisant	20
II.2.1.2 – Couplage excitation-contraction	21
II.2.1.3 – Couplage excitation-transcription	23
II.2.2 – Structure	24
II.2.2.1 – Sous unité alpha 1	25
II.2.2.2 – sous unité bêta	28
II.2.2.3 – sous unité alpha 2 delta	30
II.2.2.4 – sous unité gamma	31
II.2.3 – Régulation du canal calcique Ca _v 1.2.....	32
II.2.3.1 – Régulation par le voltage.....	32
II.2.3.2 – Régulation par le calcium	34
II.2.3.3 – Régulation par des molécules intracellulaires.....	34
II.2.4 – Pathologies associées au canal calcique Ca _v 1.2	37
II.2.4.1 – Troubles du rythme et de la conduction cardiaques.....	37
II.2.4.2 – Pathologies cardiaques acquises.....	38
II.2.4.3 – Autres pathologies	39
II.3 – <i>Les canaux sodiques voltage-dépendants cardiaques</i>	40
II.3.1 – Rôle physiologique	40
II.3.2 – Structure	40
II.3.2.1 – Sous unité alpha	40
II.3.2.2 – sous unité bêta	41
II.3.3 – Régulation des canaux sodiques	42
II.3.3.1 – Par le voltage.....	42
II.3.3.2 – Par des protéines régulatrices.....	43

II.3.4 – Pathologies cardiaques associées	45
III – LES TROUBLES ARYTHMIQUES ET DE LA CONDUCTION CARDIAQUES	47
III.1 – <i>Le syndrome de Brugada</i>	48
III.1.1 – Historique.....	48
III.1.2 – Epidémiologie, description clinique et tests pharmacologiques.....	49
III.1.4 – Facteurs génétiques	51
III.1.5 – Mécanismes ioniques et cellulaires impliqués	52
III.1.5.1 – L’hypothèse de la repolarisation	53
III.1.5.2 – L’hypothèse de la dépolarisation	55
III.1.6 – Traitements	56
III.2 – <i>Le syndrome du QT court</i>	57
III.2.1 – Historique.....	57
III.2.2 – Epidémiologie et description clinique	58
III.2.3 – Facteurs génétiques	59
III.2.4 – Traitements	61
III.3 – <i>Les troubles de la conduction auriculo-ventriculaire</i>	61
III.3.1 – Description clinique	61
III.3.2 – Facteurs génétiques	62
III.4 – <i>Les syndromes chevauchants</i>	63
IV – OBJECTIFS DE LA THESE.....	67
II. MATERIEL ET METHODES	69
I – BIOLOGIE MOLECULAIRE	71
I.1 – <i>Mutagenèse dirigée</i>	71
I.1.1 – Principe général	71
I.1.2 – Protocole	71
I.2 – <i>Transformation bactérienne et purification de l’ADN plasmidique</i>	72
I.2.1 – Principe général	72
I.2.2 – Protocole	72
II – MODELES BIOLOGIQUES	73
II.1 – <i>Lignées cellulaires</i>	73
II.2 – <i>Milieux de culture</i>	74
II.3 – <i>Repiquage</i>	74
II.4 – <i>Transfection</i>	74
II.4.1 – Par la polyéthylénimine	74
II.4.2 – Par le FuGENE ® 6.....	75
III – PATCH-CLAMP	77
III.1 – <i>Principe et dispositif expérimental</i>	77
III.2 – <i>Solutions</i>	77
III.3 – <i>Analyses</i>	78
IV – BIOCHIMIE	79
IV.1 – <i>Western blot</i>	79
IV.2 – <i>Biotinylation des protéines de surface cellulaire</i>	80
V – BIOLOGIE CELLULAIRE.....	81
V.1 – <i>Immunocytochimie</i>	81
V.2 – <i>FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)</i>	82
VI – MODELISATION MATHEMATIQUE (IYER ET AL, 2004)	84
VII – STATISTIQUES.....	84
III. RESULTATS ET DISCUSSION.....	85
I – ARYTHMIES MULTIFOCALES DU TISSU DE PURKINJE (MULTIFOCAL ECTOPIC PURKINJE-RELATED PREMATURE CONTRACTIONS) :	
UNE NOUVELLE CANALOPATHIE CARDIAQUE LIEE A <i>SCN5A</i>	87

I.1 – Introduction	89
I.2 – Article	90
I.3 – Discussion	93
II – MUTATIONS ASSOCIEES DES GENES <i>SCN5A</i> ET <i>CACNA1C</i> DANS UNE FAMILLE ATTEINTE DU SYNDROME DE BRUGADA ET DE TROUBLES DE LA CONDUCTION CARDIAQUE	97
II.1 – Introduction	99
II.2 – Article.....	100
II.3 – Analyse des résultats	103
II.4 – Discussion	103
III – SYNDROME DU QT COURT ASSOCIE A UN DEFICIT PRIMAIRE EN CARNITINE : NOUVEAU MECANISME	111
III.1- Introduction.....	113
III.2 – Résultats	116
III.2.1 – Etude fonctionnelle à partir d’un plasmide codant pour le canal calcique Ca _v 1.2 de rat.....	116
III.2.1.1 – Effet du variant Ca _v 1.2 p.A253P sur le courant I _{Ca,L}	116
III.2.1.2 – Effet du variant A253P sur l’expression totale de Ca _v 1.2	118
III.2.1.3 – Effet du variant A253P sur l’expression à la surface cellulaire de Ca _v 1.2	120
III.2.1 – Etude fonctionnelle à partir d’un plasmide codant pour le canal calcique Ca _v 1.2 humain	121
III.3 – DISCUSSION	124
IV. DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION.....	129
V. ANNEXES.....	135
I – EVOLUTION DES CONCEPTS ET DES TECHNOLOGIES EN GENETIQUE	137
I.1 - Modèles génétiques : du modèle monogénique au modèle polygénique	137
I.2 – Méthodes d’étude génétique.....	138
II – ENSEIGNEMENTS	141
II.1 – Initiation à la pharmacologie, 2 ^{ème} année de licence	141
II.1.1 - Transmission synaptique	141
II.1.1.1 - Activité électrique des neurones et synapses neuro-neuroniques (logiciel SYNAPSE)	141
II.1.1.2 - Pharmacologie de la transmission neuro-musculaire du muscle squelettique (logiciel PHARMATUTOR)	141
II.1.1.3 - Activité électrique de surface de la préparation « nerf sciatique – muscle gastrocnémien » isolée de grenouille	142
II.1.2 - Pharmacodynamie et pharmacocinétique	142
II.1.2.1 - Pharmacodynamie : réalisation de courbes concentration-réponse (logiciel PHARMATUTOR)	142
II.1.2.2 - Simulation de pharmacocinétique (logiciel PHARMATUTOR)	143
II.1.3 - Tests comportementaux chez la souris.....	143
II.2 – Physiologie animale intégrée – 3 ^{ème} année de licence	144
II.2.1 - Étude de la consommation de dioxygène chez l’homme et chez la souris	144
II.2.2 - Étude de la contraction du muscle squelettique de grenouille	144
II.2.3 - Électromyographie – Réflexe myotatique chez l’homme	145
II.2.4 - Enregistrement des mouvements spontanés de l’intestin de rat	145
II.2.5 - Électrocardiographie chez l’homme	146
II.2.6 - Clairance de l’inuline chez le rat	146
II.2.7 - Régulation de la sécrétion pancréatique chez le rat.....	146
II.2.8 - Régulation de la pression artérielle chez le lapin.....	147
II.2.9 - Cœur isolé perfusé de rat par la technique de Langendorff	147
II.2.10 - Étude des potentiels d'action cardiaques chez la grenouille enregistrés à l'aide de microélectrodes intracellulaires	147
III – COMMUNICATION SCIENTIFIQUE	149
VI. BIBLIOGRAPHIE	153

Liste des abréviations

A

ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
AID : domaine d'interaction α
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
ARN : acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ATP : adénosine triphosphate

B

BAV : blocs auriculo-ventriculaires
BID : domaine d'interaction β

C

CaM : calmoduline
CaMKII : protéine kinase dépendante de l'interaction calcium/calmoduline de type II

D

DEF : défibrillateur automatique

E

ECG : électrocardiogramme

F

FV : fibrillation ventriculaire

I

$I_{Ca,L}$: courant calcique de type L
 I_{K1} : courant potassique à rectification entrante
 I_{Na} : courant sodique
iPS : cellules souches pluripotentes induites
 I_{to} : courant potassique transitoire

K

K.O. : *knock-out*

L

LCCVD: canaux calciques voltage-dépendants de type L

N

Na^+/K^+ /ATPase: pompe sodium-potassium
NAV : nœud auriculo-ventriculaire
NCX : échangeur sodium-calcium
NS : nœud sinusal

P

PA : potentiel d'action
PKA : protéine kinase A dépendante de l'adénosine monophosphate cyclique

R

RyR : récepteur à la ryanodine

S

SBr : syndrome de Brugada

SERCA : *sarco/endoplasmic reticulum calcium-ATPase*

SNP : polymorphisme nucléotidique (*single nucleotide polymorphism*)

SQTC : syndrome du QT court

SQTL : syndrome du QT long

SRP : syndrome de repolarisation précoce

T

TdC : troubles de la conduction

Tubules T : tubules transverses

Table des illustrations

Figure 1 – Mécanismes de la mort subite cardiaque par arythmie ventriculaire	1
Figure 2 - Distribution du tissu nodal permettant la propagation de l'influx électrique cardiaque.	6
Figure 3 - Electrocardiogramme.	7
Figure 4 - Activité électrique du myocarde.....	10
Figure 5 - Représentation des différentes phases du potentiel d'action ventriculaire.	11
Figure 6 – Potentiels d'action auriculaires et ventriculaires et contribution des courants ioniques associés	12
Figure 7 - Hétérogénéité électrique entre les cellules épicaudiques, M et endocardiques.	13
Figure 8 - Potentiels d'action de la base et de l'apex ventriculaires chez le chien.....	14
Figure 9 - Schématisation du mode simplifié de fonctionnement d'un canal ionique.....	18
Figure 10 : Implication des canaux calciques de type L dans les grandes fonctions cellulaires.	20
Figure 11 - Couplage excitation-contraction.	23
Figure 12 - Représentation schématique des différentes sous-unités d'un canal calcique....	25
Figure 13 – Courant de fenêtre et post-dépolarisations précoces.....	33
Figure 14 – Post-dépolarisations précoces et tardives.....	48
Figure 15 - Electrocardiogrammes des trois formes de syndrome de Brugada.....	50
Figure 16 - Bases cellulaires du syndrome de Brugada selon l'hypothèse de la repolarisation	53
Figure 17 - Potentiel d'action ventriculaire et implication des courants ioniques de la phase 1 dans le syndrome de Brugada.....	54
Figure 18 - Bases cellulaires du syndrome de Brugada selon l'hypothèse de la dépolarisation	55
Figure 19 - Indications pour l'implantation d'un défibrillateur automatique chez des patients atteints du syndrome de Brugada.....	57
Figure 20 - Electrocardiogramme d'un patient atteint du syndrome du QT court.....	59
Figure 21 – Potentiel d'action ventriculaire d'un patient atteint du syndrome du QT court	60
Figure 22 - Représentation schématique du canal sodique Na _v 1.5 et de ses mutations associées à leurs phénotypes	65
Figure 23 – Technique de biotinylation des protéines de surface cellulaire.....	81
Figure 24 – Effets des mutations Ca _v 1.2 p.N300D et Na _v 1.5 p.Q1695X sur le potentiel d'action ventriculaire gauche et sur les courants qui le composent à partir d'un modèle unicellulaire (Iyer <i>et al.</i> , 2004).....	108

Figure 25 – Famille atteinte du syndrome du QT court et d'un déficit primaire en carnitine	113
Figure 26 – Arbre généalogique de la famille QT court - déficit primaire en carnitine	114
Figure 27 – Le variant faux-sens A223P du canal calcique $Ca_v1.2$	115
Figure 28 – Effets de la mutation p.A253P sur la densité de courant $I_{Ca,L}$	117
Figure 29 – Effet du variant A253P sur la dépendance au potentiel du canal $Ca_v1.2$	118
Figure 30 – Expression totale des protéines $Ca_v1.2$ WT et mutées A253P	119
Figure 31 – Marquages intracellulaires de la protéine $Ca_v1.2$ sur cellules HEK-tSA-201.	119
Figure 32 – Expression à la surface cellulaire des protéines $Ca_v1.2$ WT et mutées A253P	120
Figure 33 - Effets de la mutation p.A223P sur la densité de courant $I_{Ca,L}$	122
Figure 34 - Effet du variant A223P sur la dépendance au potentiel du canal $Ca_v1.2$	123

Liste des tableaux

Tableau I - Valeurs physiologiques d'un tracé électrocardiographique humain.	9
Tableau II - Propriétés électrochimiques des ions majoritaires dans le cardiomyocyte.	16
Tableau III - Courants ioniques contribuant au potentiel d'action cardiaque.	19
Tableau IV - Classification des canaux calciques selon leurs propriétés biophysiques et pharmacologiques.	27
Tableau V - distribution tissulaire de la sous-unité β	30
Tableau VI - Partenaires régulateurs du canal calcique $\text{Ca}_v1.2$	35
Tableau VII - Partenaires régulateurs du canal sodique $\text{Na}_v1.5$	44
Tableau VIII – Classification des mécanismes des arythmies cardiaques.	47
Tableau IX - Drogues utilisées pour démasquer le syndrome de Brugada.	51
Tableau X - Les différentes formes de SBr et leurs gènes associés.	52
Tableau XI - Gènes responsables du syndrome du QT court.	59
Tableau XII – Primers utilisés lors de la mutagenèse dirigée du gène <i>CACNA1C</i>	72
Tableau XIII – Proportions plasmidiques utilisées pour les transfections par le FuGENE® 6 au cours de mes projets de thèses.	76
Tableau XIV – Anticorps utilisés pour les expériences de biochimie.	80
Tableau XV – Séquences d'acquisition des images lors des expériences de FRAP.	83

Avant-propos

La mort subite cardiaque est un problème majeur de santé publique puisqu'elle touche 350 000 adultes chaque année en Europe, soit 1000 décès par jour, chiffre correspondant à la mortalité cumulée des cancers les plus meurtriers (sein, poumon et colon-rectum) (Haissaguerre, 2010). Elle se définit comme un décès survenant dans l'heure qui suit l'apparition des premiers symptômes tels que des douleurs thoraciques ou l'essoufflement (Fishman *et al.*, 2010). Chez la moitié des victimes, il s'agit de la première et dernière manifestation d'une cardiopathie sous-jacente méconnue. Dans 80% des cas, la mort subite cardiaque est liée à une pathologie coronarienne, dans 10 à 15% des cas à une cardiomyopathie et enfin pour les 5 à 10% restants, elle est due à des troubles du rythme cardiaque sans cardiopathie sous-jacente. Le taux de survie est inférieur à 3% en France. Le mécanisme létal est, dans 80% des cas, un trouble du rythme ventriculaire causé par l'instabilité électrique du cœur : torsades de pointes ou tachycardie qui peuvent dégénérer en fibrillation (figure 1).

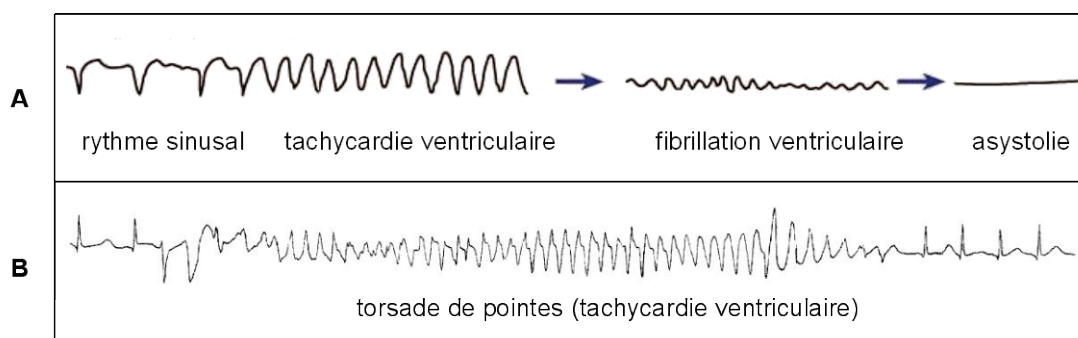


Figure 1 – Mécanismes de la mort subite cardiaque par arythmie ventriculaire

(A) La tachycardie ventriculaire (monomorphe ou polymorphe, complexes QRS larges, fréquence cardiaque rapide) peut dégénérer en fibrillation ventriculaire (FV, *perte de toute activité électrique organisée des ventricules*) et causer la mort par asystolie. Modifié d'après (Huikuri *et al.*, 2001). (B) Les torsades de pointes décrivent des torsions autour de la ligne isoelectrique. Elles sont liées à un phénomène de réentrée ventriculaire (désynchronisation des périodes réfractaires des cellules myocardiques), causée par une bradycardie importante ou un allongement de l'intervalle QT comme dans cet exemple chez un garçon de 15 ans. Modifié d'après (Napolitano & Priori, 2002)

L'apparition de troubles du rythme cardiaque sans cardiopathie sous-jacente peut être due à l'existence chez le patient d'une pathologie arythmique d'origine génétique telle que le syndrome de Brugada ou le syndrome du QT long par exemple. Une meilleure connaissance de ces pathologies représente un enjeu de santé publique majeur pour permettre un meilleur dépistage et ainsi prévenir la mort subite cardiaque.

Notre laboratoire, fondé en 1996 par Denis Escande et Hervé Le Marec, contribue à l'amélioration des connaissances de nouveaux marqueurs moléculaires de l'activité électrique cardiaque. En 2004, l'unité de recherche a rejoint les services cliniques du pôle « thorax » du CHU de Nantes pour constituer *l'institut du thorax* regroupant dans une même structure cliniciens et scientifiques. Cette interaction entre les structures de soins et de recherche permet de développer des projets centrés sur les relations gène-fonction en pathologie cardiovasculaire, respiratoire et métabolique, allant de la génétique moléculaire à la physiologie intégrée, avec des finalités diagnostiques, pronostiques et thérapeutiques.

L'hypothèse centrale de mon travail de thèse est que le risque de mort subite cardiaque liée à des troubles du rythme ou de la conduction est modulé par des variants génétiques impliqués dans l'activité électrique cardiaque. Au cours de mes 3 années de thèse, j'ai travaillé sur 3 pathologies d'origine génétique : le syndrome de Brugada, le syndrome du QT court et les troubles de la conduction. Jusqu'alors ces pathologies ont été décrites comme liées à une altération dans un gène unique (pathologies monogéniques). Il est communément admis par les cliniciens et les généticiens que l'expressivité de ces pathologies est très variable, allant de l'absence de symptômes à des formes cliniques extrêmement sévères. Par conséquent, des variations dans un gène majeur sont nécessaires mais ne sont pas suffisantes pour expliquer le développement de la maladie. D'autres facteurs pouvant être d'origine endogène (gène à effet mineur) ou exogène (environnement, mode de vie, alimentation...), ainsi que les mécanismes physiopathologiques de ces maladies restent à identifier. C'est dans ce contexte qu'au cours de ma thèse, je me suis intéressée à l'identification de nouveaux mécanismes responsables des troubles du rythme et de la conduction cardiaques avec pour objectif final d'appliquer ces recherches afin d'améliorer la prise en charge des patients.

I. INTRODUCTION

I – L'activité électrique cardiaque

I.1 – Naissance et conduction de l'influx électrique dans le cœur

Le cœur possède une activité intrinsèque qui lui permet de générer son activité rythmique de manière automatique. Cet automatisme est dû à l'existence d'un tissu électrique particulier appelé tissu nodal (figure 2). Il est constitué de cellules spécialisées capables de générer des potentiels d'action (PA) de manière spontanée. L'influx électrique prend naissance, au niveau de l'oreillette droite, dans le nœud sinusal (NS) situé à la jonction du *crista terminalis* auriculaire et du tissu veineux. Il est ensuite diffusé au sein des oreillettes jusqu'au nœud auriculo-ventriculaire (NAV) où la vitesse de conduction est alors ralentie, permettant la contraction des oreillettes avant celle des ventricules et ainsi le remplissage de ceux-ci. Le rôle du NAV est de filtrer les impulsions électriques qui lui parviennent, de les éliminer en partie (si leur fréquence est trop élevée), de les coordonner et d'en faire un influx électrique homogène transmis au faisceau de His, localisé dans la partie haute du septum interventriculaire. Le faisceau de His se divise rapidement en une branche droite et une branche gauche elle-même rapidement subdivisée en une hémibranche antérieure et une autre postérieure. Ces branches se ramifient pour former le réseau de Purkinje dont les ramifications vont au contact du myocarde ventriculaire auquel elles transmettent l'influx. L'onde de dépolarisation au sein des ventricules se transmet du côté gauche du septum interventriculaire vers le côté droit puis se propage sur la partie inférieure du septum en direction de l'apex, elle remonte ensuite le long des parois ventriculaires de l'endocarde à l'épicarde vers le plancher auriculo-ventriculaire. L'onde d'excitation parcourt donc le cœur de l'intérieur vers l'extérieur et de la pointe vers la base. Physiologiquement, la fréquence à laquelle se succèdent les PA est imposée par la fréquence de dépolarisation des cellules du NS et est régulée par le système nerveux autonome. La régulation de la fréquence cardiaque par le système parasympathique permet d'avoir un rythme de 60 à 90 battements par minutes (100 battements par minute environ en son absence). En cas de déficience d'une des composantes du tissu nodal, ce seront les cellules nodales sous-jacentes qui imposeront le rythme appelé rythme d'échappement et assureront la transmission de l'influx électrique. Par exemple, lorsque les cellules du NS sont dysfonctionnelles, ce sont les cellules du NAV qui prennent le relai mais à une fréquence diminuée (environ 50 battements par minute). Lors d'un bloc de conduction auriculo-ventriculaire complet (découplage entre les oreillettes et les ventricules), la fréquence au niveau des oreillettes sera imposée par les cellules du NS, celle des ventricules sera assurée par les cellules du faisceau de His/Purkinje (environ 30 battements par minute). Ce système électrique explique la régularité du rythme cardiaque et assure la coordination des contractions auriculo-ventriculaires.

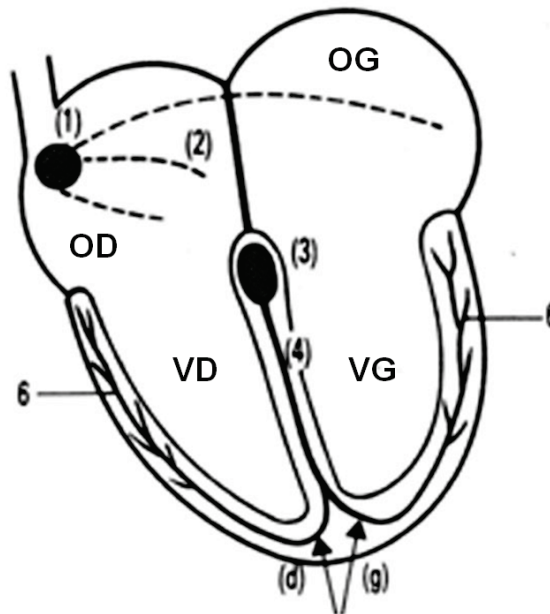


Figure 2 - Distribution du tissu nodal permettant la propagation de l'influx électrique cardiaque.

Le tissu nodal est formé du nœud sinusal (1) siégeant dans la paroi de l'oreillette droite près de l'abouchement de la veine cave supérieure, puis de fibres assez mal définies (---) à l'intérieur des oreillettes (2), du nœud auriculo-ventriculaire (3) qui siège juste au niveau de la jonction de l'oreillette droite avec le ventricule droit. De ce nœud, naît le tronc du faisceau de His (4) qui se divise ensuite en deux branches, droite (d) et gauche (g), puis se distribue grâce au réseau de Purkinje (6) jusqu'au contact des cellules myocardiques. OD, oreillette droite ; OG, oreillette gauche ; VD, ventricule droit ; VG, ventricule gauche. Modifié à partir du site : http://umvf.univ-nantes.fr/cardiologie-et-maladies-vasculaires/enseignement/cardio_1/site/html/1.html.

I.2 – L'électrocardiogramme

L'électrocardiogramme (ECG) représente l'enregistrement en surface de l'activité électrique du cœur générée par la propagation des PA cellulaires dans les différents compartiments cardiaques. Son caractère non invasif en fait un outil diagnostique très couramment utilisé pour détecter des anomalies cardiaques. L'ECG standard est enregistré sur 12 dérivations permettant d'avoir une représentation tridimensionnelle de l'activité électrique du cœur : six dérivations précordiales (V1 à V6) permettant une visualisation de l'activité électrique dans un plan horizontal et 6 dérivations des membres (DI, DII, DIII, aVR, aVF et aVL) permettant une visualisation dans un plan frontal (figure 3).

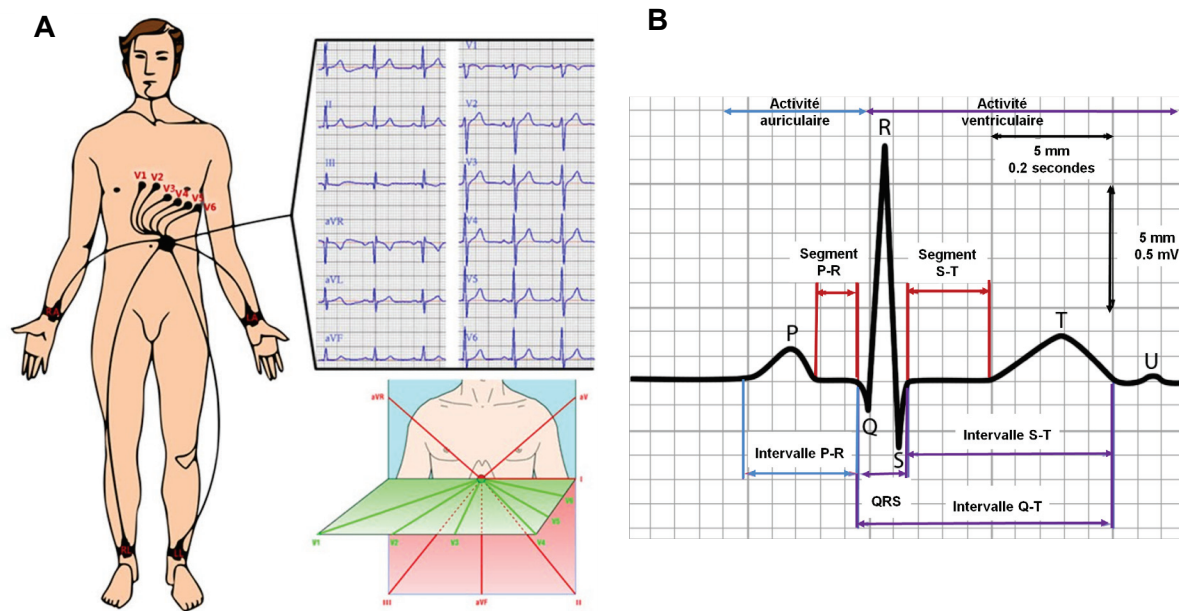


Figure 3 - Electrocardiogramme.

(A) Représentation schématique de l'emplacement des différentes électrodes. En haut à droite, exemple d'un électrocardiogramme normal (<http://www.ivline.info/2010/05/quick-guide-to-ecg.html>). En bas à droite, plan des différentes dérivations. (B) Principaux paramètres de l'électrocardiogramme.

L'ECG reflète donc la séquence d'événements électriques associée au cycle d'excitation (dépolarisation) et de repolarisation de chaque région du cœur. La propagation de l'onde de dépolarisation ou de repolarisation cellulaire crée une variation du champ électrique entourant la cellule, assimilé à un vecteur électrique instantané élémentaire. Lorsque ce vecteur se dirige vers l'électrode positive, une déflexion positive est enregistrée à l'ECG. A l'inverse, lorsqu'il se dirige vers l'électrode négative (pour les dérivations DI, DII et DIII) ou vers la borne centrale de potentiel (pour les dérivations aVR, aVF, aVL et V1 à V6), une déflexion négative est enregistrée. Le cycle cardiaque est représenté par la succession des ondes P, Q, R, S, T et U, positives ou négatives selon les dérivations observées (figure 3).

La première onde retrouvée sur un tracé ECG est l'onde P correspondant à la dépolarisation des oreillettes. Sur un tracé ECG normal, cette onde est positive dans toutes les dérivations à l'exception de la dérivation aVR où elle est négative. L'influx atteint ensuite le nœud auriculo-ventriculaire. L'activation de ce nœud, tout comme le nœud sinusal, ne provoque aucune onde identifiable sur l'ECG et se traduit par un retour à la ligne isoélectrique avant l'onde suivante R ou Q. L'intervalle PR reflète le temps de conduction auriculo-ventriculaire. Son allongement traduit un trouble de conduction entre les oreillettes et les ventricules. Puis, l'influx atteint le faisceau de His permettant la dépolarisation septale et des deux ventricules. La dépolarisation septale donne une première déflexion positive

appelée onde R (comme en V1) ou négative appelée onde Q (comme en V6) en fonction de la localisation de l'électrode positive. Puis la dépolarisation se fait selon un vecteur en direction apicale (dit vecteur apical) puis en direction pariétale ventriculaire gauche (vecteur pariétal) puis en direction basale (vecteur basal) vers l'arrière et le haut donnant le complexe QRS. Par convention, la première déflexion négative est une onde Q, la première déflexion positive une onde R, toute onde négative suivant une onde R est nommée une onde S et toute onde positive survenant après une onde S est nommée onde R'. Le ventricule gauche ayant une masse musculaire plus développée que le ventricule droit, le voltage généré par sa dépolarisation déterminera la forme du complexe QRS. Ainsi, les dérivations situées à droite permettront l'enregistrement d'un complexe à prédominance négative et inversement pour les dérivations situées à gauche. L'intervalle QT correspond aux temps de dépolarisation et de repolarisation ventriculaires. Sa durée dépend de la fréquence cardiaque, de l'âge, et du sexe. Cet intervalle QT peut être corrigé (QTc) en l'adaptant à la fréquence cardiaque. Le calcul du QTc est donné par la formule de Bazett : $QTc = QT / \sqrt{RR}$. Le segment ST, quant à lui, correspond à la dépolarisation totale des cellules ventriculaires, il est normalement isoélectrique. Son déplacement marqué vers le haut indique parfois un état pathologique (par exemple, le syndrome de Brugada). Il est débuté par le point J (pour Jonction ST) qui est quasiment inexistant en conditions physiologiques. Enfin la forme de l'onde T illustre l'hétérogénéité de la repolarisation qui existe au sein de la paroi ventriculaire. Sur certains tracés ECG, une onde U, d'origine discutée peut être observée (Perez Riera *et al.*, 2008). Celle-ci apparaît après l'onde T et est de faible amplitude. Quatre hypothèses majeures quant à l'origine de l'onde U sont débattues. Celle-ci pourrait être due à : (i) une repolarisation tardive des systèmes de conduction et des fibres de Purkinje (Hoffmand & Cranefield, 1960), (ii) une repolarisation tardive des muscles papillaires (Bufalari *et al.*, 1956), (iii) l'existence de potentiels tardifs causés par les forces mécaniques du tissu ventriculaire (Surawicz, 1998), (iv) une repolarisation prolongée des cellules M du mid-myocarde (Antzelevitch & Sicouri, 1994).

Le tableau I récapitule les valeurs physiologiques des paramètres mesurés à partir d'un tracé ECG enregistré chez l'homme.

Tableau I - Valeurs physiologiques d'un tracé électrocardiographique humain.

Rythme	Sinusal, autant d'ondes P que de QRS
Fréquence (intervalle RR)	Entre 60 et 100 battements par minute
Axe moyen	Gauche, entre -30° et +90°
Onde P	Durée < 0.12 secondes Amplitude ≤ 2.5 mm Positive en DII, négative en aVR
Conduction auriculo-ventriculaire (P-R)	De 0.12 à 0.2 secondes
Conduction intraventriculaire (QRS)	Durée ≤ 0.1 secondes Amplitude < 15 mm en DI, < 12 mm en aVL
Repolarisation (QTc)	Durée < 0.44 secondes
Segment ST	Isoélectrique
Onde T	Asymétrique Amplitude < 5 mm (dérivations périphériques), < 10 mm (dérivations précordiales) Positive en DI, DII, V4, V5 et V6, négative en aVR Maximale en DII et V1

I.3 – Le potentiel d'action et les courants ioniques

I.3.1 – Les différentes phases et les courants impliqués

La fonction cardiaque normale dépend de son activité électrique reflétant l'activation chronologique des différentes régions du cœur (Fozzard, 1991). Le PA est responsable de la propagation de l'influx électrique. Il s'agit d'une modification brutale du potentiel membranaire de repos d'une cellule douée d'automatisme ou excitable, qui est transmise rapidement de cellule en cellule via un couplage électrique assuré par les jonctions gap. Les membranes cellulaires isolent le milieu intracellulaire du milieu extracellulaire. L'existence de structures protéiques ancrées à la membrane permet un échange entre ces milieux. Parmi ces protéines, les canaux ioniques permettent le passage passif des ions de part et d'autre de la membrane grâce à la force électromotrice lorsque le canal est ouvert. Ainsi, le PA est le résultat de l'activité d'une trentaine de canaux ioniques différents et dépend des variations de perméabilité de ces canaux. La morphologie du PA est différente d'un type cellulaire à l'autre, selon que les cellules soient spécialisées dans l'automatisme, l'excitabilité, ou la conduction (figure 4). Il existe également une hétérogénéité régionale

(ventriculaire/auriculaire, épicarde/endocarde) due à une expression différentielle des canaux ioniques dans ces régions (Gaborit *et al.*, 2007).

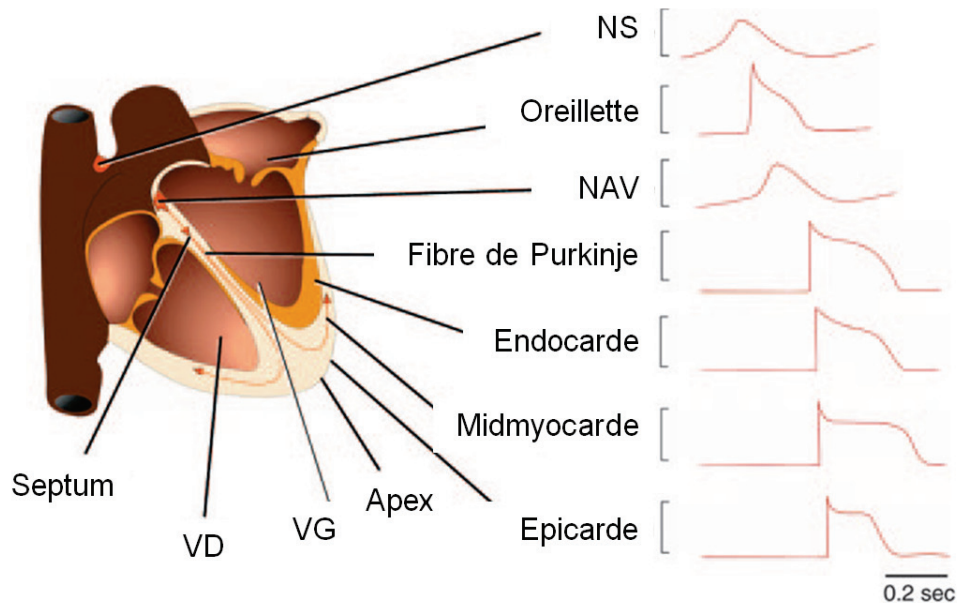


Figure 4 - Activité électrique du myocarde.

Représentation schématique du cœur et des potentiels d'actions spécifiques de chaque région cardiaque. NS, nœud sinusal ; NAV, nœud auriculo-ventriculaire ; VG, ventricule gauche ; VD, ventricule droit. Modifié d'après (Nerbonne & Kass, 2005).

Il existe deux grands groupes de cellules dans le cœur : les cellules automatiques (cellules nodales) et les cellules non-automatiques (myocytes ventriculaires et auriculaires). Les cellules automatiques possèdent un potentiel diastolique non stable. Lors de la diastole, le potentiel de ces cellules se dépolarise progressivement jusqu'à atteindre le potentiel seuil de déclenchement du PA. Les cellules non automatiques, quant à elles, présentent un potentiel diastolique stable. Dans les cardiomyocytes ventriculaires, le PA comprend 5 phases successives : (i) une phase de dépolarisation rapide (phase 0) due à l'activation des canaux sodiques dépendants du potentiel (voltage-dépendants), (ii) une phase de repolarisation précoce (phase 1) due à l'inactivation du courant sodique et à l'activation du courant potassique transitoire sortant dépendant du potentiel (I_{to}), (iii) une phase de plateau, ou maintien de la dépolarisation (phase 2) due à l'activation des courants calciques de type L entrant ($I_{Ca,L}$), potassiques sortants (I_{Kr} et I_{Ks}) ainsi qu'à l'échangeur Na^+-Ca^{2+} (NCX) qui fonctionne dans le sens d'une entrée d'ions Na^+ contre une sortie d'ions Ca^{2+} , (iv) une phase de repolarisation (phase 3) due à la diminution des courants entrants et à l'activation maximale des courants potassiques sortants ramenant le potentiel de membrane à sa valeur de repos, (v) une phase de stabilisation du potentiel de repos (phase 4) due au courant potassique I_{K1} et à l'activité de la pompe sodium-potassium dépendante de l'adénosine

triphosphate (Na^+/K^+ ATPase) qui permet de créer le gradient ionique des ions Na^+ et K^+ de part et d'autre de la membrane (figure 5).

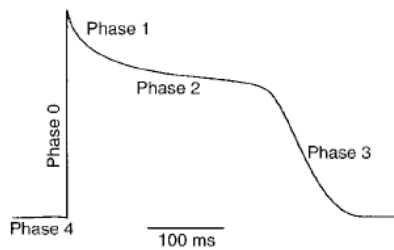


Figure 5 - Représentation des différentes phases du potentiel d'action ventriculaire.

I.3.2 – Périodes réfractaires

Dès la fin de la phase 0 du PA, le tissu cardiaque n'est plus ou peu excitable. Ceci est dû à l'existence de périodes réfractaires capitales au bon fonctionnement du cœur car elles permettent une conduction unidirectionnelle ainsi qu'une relaxation complète du muscle cardiaque avant toute nouvelle contraction. Deux types de périodes réfractaires sont distingués : (i) la période réfractaire absolue qui commence juste après la fin de la phase 0 et qui se prolonge au cours de la phase 2 du PA. Au cours de cette période, les cardiomyocytes ignorent toute nouvelle stimulation, ainsi aucune dépolarisation membranaire n'est possible. (ii) La période réfractaire relative qui est liée à la phase 3 du PA permettant, suite à un stimulus fort, le déclenchement d'un PA alors que la phase de repolarisation du précédent n'est pas totalement achevée. L'existence de ces périodes réfractaires est liée à l'inactivation complète du courant Na^+ lors de la phase de plateau et partielle lors de la phase 3. Durant la phase de repolarisation, le retour du potentiel membranaire vers sa valeur de repos favorise la levée d'inactivation du courant Na^+ . Ainsi, une nouvelle activation du courant est possible. Cependant, l'intervention du courant potassique I_{K1} va éloigner le potentiel membranaire du seuil d'activation des canaux Na^+ et donc du déclenchement du PA. Ce mécanisme permet de protéger le cœur contre l'apparition de battements supplémentaires liés à des réactivations précoces du myocarde comme dans le cas de troubles du rythme ventriculaire.

I.3.3 – Hétérogénéité électrique intrinsèque du cœur

Comme mentionné précédemment, il existe une hétérogénéité de l'activité électrique cardiaque. En effet, des tissus possédant la même fonction peuvent avoir une activité électrique différente. C'est le cas entre les myocytes ventriculaires et auriculaires. Le potentiel membranaire de repos des cellules auriculaires (≈ -70 à -80mV) est de 5 à 10 mV plus dépolarisé que les cellules ventriculaires (Schram *et al.*, 2002). De plus, leur PA est

caractérisé par une phase 2 de plateau plus courte et une phase 3 de repolarisation plus lente par rapport au PA ventriculaire (figure 6). Les courants ioniques mis en jeu lors du décours du PA sont différents d'un compartiment à l'autre.

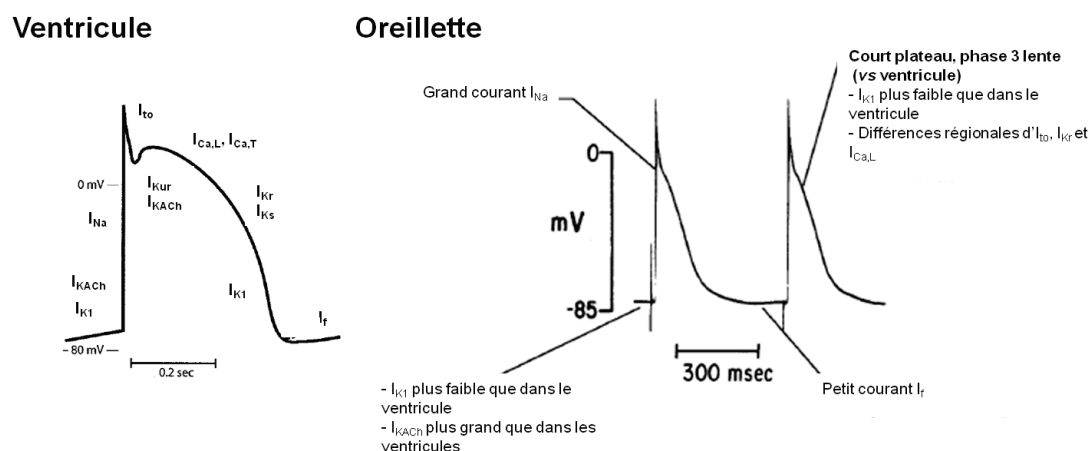


Figure 6 – Potentiels d'action auriculaires et ventriculaires et contribution des courants ioniques associés

A gauche : Représentation schématique d'un PA ventriculaire et courants ioniques associés aux différentes phases. A droite : PA auriculaire droit de chien et courants ioniques associés différant du PA ventriculaire, modifié d'après (Schram et al., 2002).

Des différences régionales ont également été observées au sein des oreillettes et des ventricules. Le myocarde ventriculaire est constitué de 3 types cellulaires ayant des caractéristiques électrophysiologiques et fonctionnelles différentes : les cellules épicaudiques, M et endocardiques. Ces trois types cellulaires diffèrent principalement au niveau des phases 1 et 3 de repolarisation du PA (figure 7). Des expériences sur cellules ventriculaires humaines et canines isolées (épicaudiques ou endocardiques) ont montré que le PA épicaudique comparé au PA endocardique était caractérisé par une durée plus courte, une phase de repolarisation précoce plus proéminente ainsi que par la présence d'une encoche entre les phases 1 et 2 appelée « *notch* » donnant un aspect de « *spike and dome* » au PA. Ces différences sont principalement dues à une hétérogénéité de la densité du courant I_{to} , mis en évidence dans les myocytes ventriculaires de chien, de chat, de lapin, de rat et humain (Furukawa et al., 1990; Antzelevitch et al., 1991; Fedida & Giles, 1991; Clark et al., 1993; Liu et al., 1993; Wettwer et al., 1994; Nabauer et al., 1996), du courant I_{Ks} mis en évidence dans les cardiomyocytes de chien et humain (Liu & Antzelevitch, 1995; Pereon et al., 2000), du courant d'échange I_{NaCa} (Zygmunt et al., 2000) et du courant I_{Na} tardif mis en évidence dans les cardiomyocytes de chien (Zygmunt et al., 2001) (figure 7). Le courant I_{to} est plus grand dans les cellules épicaudiques et M que dans les cellules

endocardiques expliquant l'existence de l'encoche au niveau de la phase 1 du PA. Dans les cellules M, il a été montré que le courant I_{Ks} est plus faible que dans les cellules épiscopardiques et endocardiques et que les courants I_{Na} tardif et I_{NaCa} sont plus grands. Ces différences expliquent l'allongement de la durée de la phase 2 de plateau dans les cellules M par rapport aux cellules endocardiques et épiscopardiques.

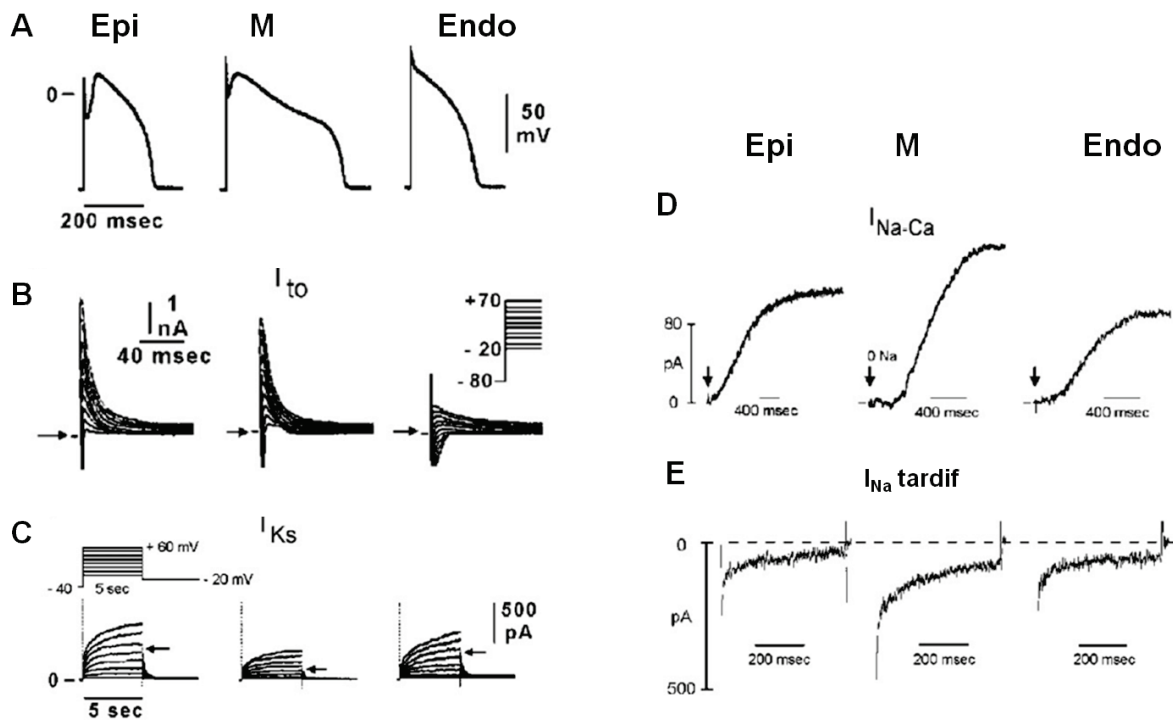


Figure 7 - Hétérogénéité électrique entre les cellules épiscopardiques, M et endocardiques.

(A) PA enregistrés sur des cardiomyocytes ventriculaires épiscopardique, M et endocardique gauches de chien. (B) Courant potassique transitoire I_{to} . (C) Activation voltage dépendante du courant I_{Ks} . (D) Courant d'échange I_{NaCa} . (E) Courant tardif I_{Na} sensible à la TTX. Modifié d'après (Antzelevitch & Burashnikov, 2011)

Ajouté à ce gradient transmural, il existe également une hétérogénéité électrique le long de l'axe apico-basal du cœur. La durée du PA est plus longue au niveau de la base par rapport à l'apex du myocarde ventriculaire, comme il a été montré dans une étude réalisée sur le chien (Szentadrassy *et al.*, 2005). Dans cette même étude, il a également été observé que la contribution de la phase 1 de repolarisation au déroulement du PA était plus importante au niveau de l'apex qu'au niveau de la base des ventricules (figure 8).

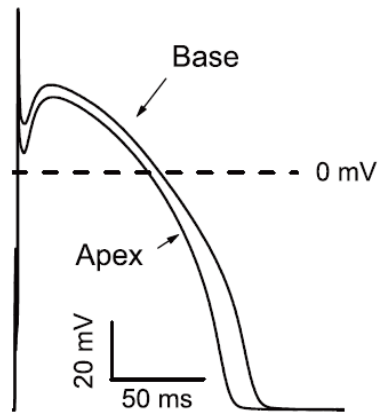


Figure 8 - Potentiels d'action de la base et de l'apex ventriculaires chez le chien.

D'après (Szentadrassy et al., 2005)

II – Les canaux ioniques cardiaques

II.1 - Rappels électrophysiologiques

Les courants ioniques sont dus à un transfert d'ions de part et d'autre de la membrane cellulaire. Pour entrer ou sortir de la cellule, les ions ont besoin d'une voie hydrophile constituée par des protéines spécialisées : les canaux ioniques. Ceux-ci pour être fonctionnels doivent osciller entre au moins deux états : un état fermé et un état ouvert. Lorsque le canal ionique est ouvert, il permet le passage des ions selon leur gradient électrochimique c'est-à-dire selon deux forces indépendantes, l'une chimique, l'autre électrique. Le gradient chimique permet le mouvement des ions à travers le canal ionique du compartiment le plus concentré au compartiment le moins concentré. Le gradient électrique quant à lui, provoque le mouvement des ions dans la direction de l'opposé de leur charge (négative pour un cation, positive pour un anion). Le potentiel transmembranaire pour lequel le gradient chimique d'une espèce ionique s'oppose parfaitement à son gradient électrique est appelé potentiel d'équilibre. En 1889, Walther Hermann Nernst formula une équation permettant de déterminer le potentiel d'équilibre de chaque espèce ionique :

$$E_x = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[X]_e}{[X]_i}$$

Où : E_x est le potentiel d'équilibre de l'ion X en V,
 R est la constante des gaz parfaits (8,31 V.C.K⁻¹.mole⁻¹),
 T est la température en K,
 Z est la charge/valence de l'ion X,
 F est la constante de Faraday (96485,309 C.mole⁻¹),
 $[X]_e$ est la concentration extracellulaire de l'ion X en M,
 $[X]_i$ est la concentration intracellulaire de l'ion X en M.

Par convention, un courant entrant représente une entrée de charges positives dans la cellule, à l'inverse, un courant sortant représente une sortie de charges positives de la cellule. Comme l'intérieur de la cellule est chargé négativement, un courant entrant va être dépolarisant et un courant sortant sera repolarisant ou hyperpolarisant selon que la cellule ait été dépolarisée préalablement ou non. Le tableau II résume les propriétés électrochimiques des ions majoritaires dans le cardiomyocyte.

Tableau II - Propriétés électrochimiques des ions majoritaires dans le cardiomyocyte.

Ions	Concentration intracellulaire en mM	Concentration extracellulaire en mM	Potentiel d'inversion en mV	Nature du courant
Ca ²⁺ 	0.0001	2,5	+ 150	Dépolarisant
Na ⁺ 	10	142	+ 70	Dépolarisant
K ⁺ 	155	4	- 98	Repolarisant
Cl ⁻  ext int	5 - 30	101	- 30 à - 65	Dépolarisant Repolarisant

Ext, extracellulaire ; int, intracellulaire.

La plupart des canaux ioniques cardiaques sont voltage-dépendants, c'est-à-dire qu'ils s'ouvrent et se ferment selon les variations du potentiel membranaire. Cependant le potentiel (voltage) n'est pas le seul facteur à pouvoir influencer l'ouverture et la fermeture des canaux, le temps, la phosphorylation, l'étirement ou certaines substances physiologiques ou pharmacologiques en sont capables également.

Dans les cardiomyocytes, la pompe Na⁺/K⁺/ATPase enrichi la cellule en K⁺ et diminue la quantité d'ions Na⁺ présente à l'intérieur de la cellule. Ainsi, les cardiomyocytes qui sont perméables majoritairement au K⁺ au repos, vont amener le potentiel membranaire de repos de la cellule à se rapprocher du potentiel d'équilibre des ions K⁺ autour de -80 mV. Lors du déclenchement du PA, la cellule va devenir perméable à d'autres espèces ioniques ce qui va faire varier la valeur de son potentiel membranaire. Une cellule au repos est donc caractérisée par un excès de charges négatives à l'intérieur par rapport à l'extérieur. La loi d'Ohm régit le mouvement des ions à travers la membrane :

$$U = R \times I$$

Où : U est le potentiel membranaire en V

R est la résistance de la membrane cellulaire en Ω

I est le courant en A

Selon cette loi, lorsqu'un canal s'ouvre, il génère un courant ionique qui va affecter le potentiel membranaire de la cellule. La notion de résistance membranaire R d'une membrane traduit l'opposition au passage des ions. Inversement, la notion de conductance membranaire g (exprimée en μS , nS ou pS) traduit la facilitation du passage des ions. Les deux sont reliés par la relation : $R = 1/g$. En 1943, Goldman, puis en 1949 Hodgkin et Katz ont généralisé l'équation de Nernst pour le cas de la membrane d'un neurone renfermant plusieurs types de conductances (Goldman, 1943; Hodgkin & Katz, 1949):

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K]_e + P_{Na}[Na]_e + P_{Cl}[Cl]_i}{P_K[K]_i + P_{Na}[Na]_i + P_{Cl}[Cl]_e}$$

Où : E_m est le potentiel membranaire de la cellule en mV

R est la constante des gaz parfaits ($8,31 \text{ V.C.K}^{-1}.\text{mole}^{-1}$)

T est la température en K

F est la constante de Faraday ($96485,309 \text{ C.mole}^{-1}$)

P_X la perméabilité de la membrane pour l'espèce ionique X

$[X]_e$ est la concentration extracellulaire de l'ion X

$[X]_i$ est la concentration intracellulaire de l'ion X

Le modèle classique de fonctionnement des canaux ioniques décrit trois états (Hille, 1978) : (i) un état fermé où le canal ne laisse pas passer de courant, mais peut être ouvert par un stimulus approprié. (ii) Un état ouvert où le canal laisse passer un courant. A partir de cet état le canal peut, soit se refermer, soit passer dans un état inactivé. (iii) Un état inactivé où le canal est fermé et donc où il n'y a pas de courant, cet état suit l'état ouvert. A partir de cet état, le canal doit passer dans un état fermé avant de pouvoir être activé de nouveau. Le passage entre ces différents états dépend de différents paramètres comme par exemple le potentiel et le temps. Le passage de l'état fermé à l'état ouvert est nommé activation, de l'état ouvert à l'état inactivé, inactivation, de l'état inactivé à ouvert, réactivation, de l'état inactivé à fermé, levée d'inactivation et enfin pour le passage de l'état ouvert à l'état fermé, on parle de désactivation (figure 9). Cependant, des mesures effectuées sur canal unitaire par les techniques de patch-clamp et de bicouches lipidiques ont depuis montré que de nombreux types de canaux ioniques ne suivent pas un simple modèle à trois états, mais présentent différents états de conductance nommés sous-états. Le plus souvent, ces sous-états ont une conductance inférieure à l'état principal du canal, bien que ce ne soit pas toujours le cas (Fox, 1987). Des modèles plus complexes de type Markovien ont également été décrits. Ils mettent en évidence, pour le canal sodique par exemple, l'existence de

plusieurs états fermés en cascade provoquant un délai avant d'atteindre l'état ouvert (Horn & Vandenberg, 1984).

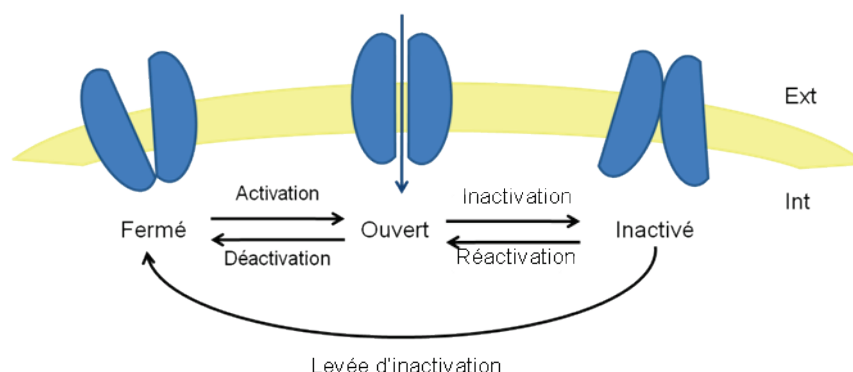


Figure 9 - Schématisation du mode simplifié de fonctionnement d'un canal ionique.

Ext, extracellulaire ; int, intracellulaire.

Comme décrit précédemment, les cellules cardiaques spécialisées dans l'automatisme, dans la conduction de l'influx électrique ou dans la contractilité expriment un répertoire de canaux ioniques différents résumé dans le tableau III. Des canaux chlore et TRP (*transient receptor potential*) ont également été décrits dans les cardiomyocytes. Les canaux chlore participent à la régulation de l'activité électrique cardiaque, du pH, du volume cellulaire et du transport osmotique et métabolique (Hume *et al.*, 2000). Quatre types de canaux chlore ont été identifiés dans les cardiomyocytes : (i) des canaux régulés par la phosphorylation dépendante de la PKA, des canaux régulés par le volume cellulaire, des canaux activés par le calcium intracellulaire et des canaux chlore à rectification entrante. Une étude réalisée par Benitah et coll. en 1997 a montré l'implication du courant I_{Cl} au cours de l'hypertrophie et de la défaillance cardiaque (Benitah *et al.*, 1997). La sous-famille des canaux TRP, composé de sept membres (TRP1-7), est perméable aux ions Na^+ et Ca^{2+} . L'entrée de calcium par ces canaux est impliquée dans le développement d'hypertrophie cardiaque et d'insuffisance cardiaque (Eder & Molkentin, 2011), de cardiomyopathie dilatée, de dystrophie musculaire, et de troubles arythmiques (Franz & Bode, 2003; Nakayama *et al.*, 2006; Williams & Allen, 2007).

La suite de cette introduction va se focaliser sur le canal calcique de type L $Ca_v1.2$ et sur le canal sodique $Na_v1.5$, sur lesquels l'ensemble de mon travail de thèse a porté.

Tableau III - Courants ioniques contribuant au potentiel d'action cardiaque.

Courant	Type du canal	Type du gène	Activation	Inactivation	Réactivation	Espèce	Tissu
I_{Na}	Na_v (1.5, 1.7 et 1.3)	<i>SCN</i> (5A, 9A et 3A)	Très rapide	Rapide	Rapide	H, C, D, S, R, F	O, P, V, NAV, NS*
$I_{to,f}$	$K_v4.3$	<i>KCND3</i>	Rapide	Rapide	Rapide	H, C, D, S, R, F	O, P, V
$I_{to,s}$	$K_v1.4$	<i>KCNA4</i>	Rapide	Modérée	Lente	H, R, S, L, F	V, (O, NAV, NS)
$I_{Ca,L}$	Ca_v (1.2 et 1.3)	<i>CACNA</i> (1C et 1D)	Rapide	Modérée	Rapide	H, C, D, S, R, F	O, P, V, NAV, NS
$I_{Ca,T}$	$Ca_v3.1$	<i>CACNA1G</i>	Rapide	Rapide	Lente	C, D, Cl, R	O, P, NAV, NS
I_{Kr}	HERG	<i>KCNH2</i>	Modérée	Rapide	Lente	H, C, D, Cl, S, R, L	O, P, V, NAV, NS
I_{Ks}	K_vLQT1	<i>KCNQ1</i>	Très lente	Absentes mais déactivation		H, D, Cl, L	O, P, V, NS
I_{Kur}	$K_v1.5$	<i>KCNA5</i>	Très rapide	Très lente	Lente	H, D	O
I_{K1}	K_{ir} (2.1, 2.2 et 2.3)	<i>KCNJ</i> (2, 12 et 14)				H, C, D, F, S, L, R	O, P, V
$I_{K,Ach}$	K_{ir} (3.1 – 3.4)	<i>KCNJ</i> (3 - 5)				H	
I_f		<i>HCN2 – HCN4</i>	Lente	Absente	Absente	H	NAV, NS

*H, homme ; C, chat ; D, chien ; S, souris ; R, rat ; F, Furet ; L, lapin ; Cl, cochon d'inde ; O, oreillette ; P, Purkinje ; V, ventricule ; NAV, nœud auriculo-ventriculaire ; NS, nœud sinusal. * Chez certaines espèces mais pas toutes. I signifie courant.*

II.2 – Les canaux calciques de type L

Le Ca^{2+} est un second messager ubiquitaire, primordial dans la signalisation intracellulaire. Il régule une grande variété de fonctions cellulaires comme le couplage excitation-contraction musculaire, la libération d'hormones ou de neurotransmetteurs ou encore l'expression génique. L'importance du calcium lors de la contraction cardiaque a été reportée pour la première fois au 19^{ème} siècle (Ringer, 1883). Il a ensuite fallu attendre les années 1960 pour que le courant calcique soit décrit comme acteur de la phase de plateau du PA cardiaque (Orkand & Niedergerke, 1964). C'est la technique de double séparation de saccharose qui a été utilisée pour mettre en évidence ce courant, qui paraissait très lent comparé au seul courant connu à l'époque le courant I_{Na} . Dans les années qui suivirent, 2 découvertes majeures ont permis d'accélérer les recherches sur les canaux calciques : l'implication des ces canaux dans le couplage excitation-contraction (Fabiato & Fabiato, 1975) et le clonage de l'isoforme cardiaque constituant le pore du canal (Mikami *et al.*, 1989).

II.2.1 – Rôle physiologique

Les canaux calciques voltage-dépendants médient l'entrée de Ca^{2+} dans de nombreux types cellulaires dont les myocytes cardiaques où ils appartiennent à deux grandes familles : les canaux calciques de type T, et les canaux calciques de type L (LCCVD). L'entrée de calcium par ces canaux va permettre d'initier de nombreuses fonctions cellulaires (figure 10, pour revue (Catterall, 2011)).

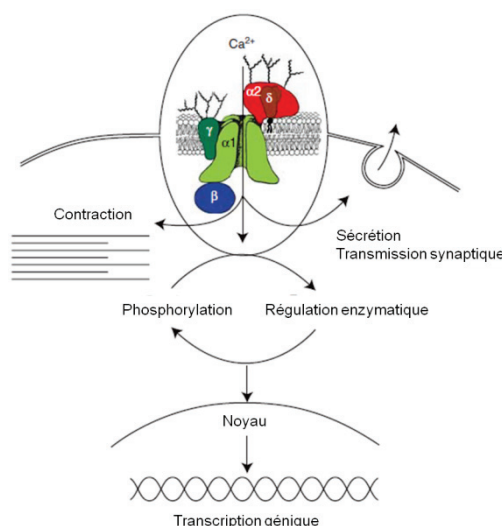


Figure 10 : Implication des canaux calciques de type L dans les grandes fonctions cellulaires.

Modifié d'après (Catterall, 2011)

Dans les cellules cardiaques et musculaires lisses, l'activation des canaux calciques va permettre l'initiation de la contraction suite à l'entrée de calcium (cf § II.2.1.2 – Couplage excitation-contraction). Dans les cellules endocrines, les canaux calciques voltage-dépendants permettent l'initiation de la sécrétion hormonale (Yang & Berggren, 2006). Ils sont notamment impliqués dans la sécrétion d'insuline dans les cellules β du pancréas et dans la sécrétion de catécholamines dans les cellules chromaffines. Dans les neurones, ils permettent d'initier la transmission synaptique. Enfin, dans de nombreux types cellulaires, ils régulent l'activité enzymatique, l'expression génique (cf § II.2.1.3 – Couplage excitation-transcription) et d'autres processus biochimiques (Catterall, 2011).

II.2.1.1 – courant dépolarisant

Les LCCVD permettent l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule, contribuant ainsi à la génération d'un courant électrique dépolarisant. La fonction de ces canaux diffère selon le type cellulaire cardiaque. Dans les myocytes ventriculaires, contrairement aux myocytes

auriculaires, ils ne sont pas distribués uniformément à la surface cellulaire, en effet, 65 à 90% des LCCVD se localisent au niveau d'invaginations du sarcolemme nommées tubules T (tubules Transverses) (Carl *et al.*, 1995; Kawai *et al.*, 1999). D'un point de vue pharmacologique, de nombreux antagonistes des LCCVD ont été décrits à ce jour, parmi ceux-ci les molécules appartenant à la famille des dihydropyridines qui ont donné le nom de récepteurs aux dihydropyridines aux LCCVD (Fleckenstein, 1983). Lors du pic du PA, la membrane est dépolarisée entre 30 et 50 mV, potentiel auquel les LCCVD vont s'activer rapidement mais avec une force électromotrice faible (le potentiel d'équilibre des ions Ca^{2+} étant proche). Puis, lors de la phase 1 du PA ventriculaire, la cellule va commencer à se repolariser et ainsi approcher le potentiel de membrane du potentiel pour lequel $I_{\text{Ca,L}}$ est maximum. Ce mécanisme explique l'existence du plateau lors de la phase 2 du PA ventriculaire où l'activation d'un faible pourcentage des canaux potassiques générant les courants I_{Kr} et I_{Ks} contre-balance l'activation maximale des LCCVD. Dans les cellules du NS, les LCCVD jouent un rôle crucial dans la conduction de l'influx électrique. En effet, le courant $I_{\text{Ca,L}}$ est essentiel à la phase rapide de dépolarisation du PA sinusal. Enfin, dans les cellules du tissu de conduction (Purkinje et His), la densité de courant $I_{\text{Ca,L}}$ est réduite par rapport à celle observée dans les cardiomyocytes ventriculaires, expliquant la différence des phases de plateau observées dans ces deux types cellulaires (Schram *et al.*, 2002).

II.2.1.2 – Couplage excitation-contraction

Le couplage excitation-contraction est une propriété des cellules musculaires regroupant l'ensemble des processus assurant la transformation de l'influx électrique en une cascade de signalisation intracellulaire qui permet la contraction de la cellule. Ce couplage est possible grâce à une organisation structurale et moléculaire adaptée des cardiomyocytes. Les tubules T sont répartis régulièrement sur l'ensemble de la cellule permettant ainsi une propagation du PA jusqu'au cœur de la cellule. Ils sont positionnés de façon précise par rapport aux protéines contractiles. Comme vu précédemment (cf § II.2.1.1 – Courant dépolarisant), les LCCVD sont fortement exprimés au niveau des tubules T. En regard des tubules T, le réticulum sarcoplasmique (RS) est un compartiment intracellulaire spécialisé dans le stockage et la libération du Ca^{2+} . Il est formé de deux parties structurellement et fonctionnellement distinctes : le RS jonctionnel et le RS longitudinal. Le RS jonctionnel forme les citernes terminales situées en vis-à-vis des tubules T. Il est spécialisé dans le stockage et la libération du Ca^{2+} assuré par un récepteur présent à sa membrane, le récepteur à la ryanodine (RyR). Le RS longitudinal, quant à lui, relie les citernes terminales. Il est spécialisé dans la recapture du Ca^{2+} grâce, notamment, à une pompe calcique dépendante de l'hydrolyse de l'ATP : la SERCA (*Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase*). Dans le cœur, on retrouve l'isoforme SERCA2a régulée par une

protéine qui lui est associée, le phospholamban. La juxtaposition d'un tubule T et d'une citerne terminale du RS jonctionnel forme une structure caractéristique appelée diade. Cet espace restreint entre les tubules T et la citerne terminale du RS jonctionnel va permettre une communication optimale entre les LCCVD et les RyR. Seule une des 3 isoformes des RyR est exprimée dans les cardiomyocytes, le RyR de type 2. Ce récepteur-canal est un hétérotétramère faisant partie d'un complexe macromoléculaire. Diverses protéines régulatrices interagissent avec les sous-unités du RyR dont la FKBP12.6 (*FK506 binding protein 12.6 kDa*) qui est une molécule d'immunophiline, la PKA, qui est une protéine kinase dépendante de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), la mAKAP (*A kinase anchoring protein*) qui est une protéine d'ancrage, les protéines phosphatases 1 et 2A (PP1, PP2A) et une phosphodiesterase (PDE) de type 4. Cette organisation structurale très précise des cardiomyocytes permet de localiser environ 10 à 25 LCCVD à proximité de 100 à 200 RyR2. Le RyR possède deux sites de fixation au Ca^{2+} : l'un à haute affinité qui induit l'ouverture du canal et l'autre à basse affinité qui induit sa fermeture.

Les LCCVD sont indispensables à la mise en place du couplage excitation-contraction dans les myocytes cardiaques. Au repos, la concentration cytoplasmique de Ca^{2+} est très faible ($\approx 100 \text{ nM}$). L'arrivée d'un PA le long de la membrane plasmique du cardiomyocyte va provoquer l'ouverture des LCCVD et permettre l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule. Lorsque la concentration en Ca^{2+} intracellulaire sera suffisante (entre 100 nM et $10 \mu\text{M}$), les canaux RyR seront activés et permettront la libération du Ca^{2+} stocké dans le RS. Au-delà d'une concentration de $10 \mu\text{M}$ dans la cellule, les canaux RyR seront inactivés. Ce mécanisme autocatalytique est appelé communément CICR (*Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release*), il a été initialement mis en évidence dans le muscle strié squelettique (Endo *et al.*, 1970; Ford & Podolsky, 1970) puis dans le muscle cardiaque (Fabiato & Fabiato, 1973; Fabiato & Fabiato, 1975). Le Ca^{2+} ainsi libéré va se fixer sur les myofilaments et provoquer la contraction de la cellule. Le muscle va ensuite se relaxer, pour cela, 80% à 90% du Ca^{2+} va être recapté par les pompes SERCA2a et les 10% à 20% restants seront extrudés de la cellule par l'échangeur NCX présent dans le sarcolemme du cardiomyocyte (figure 11).

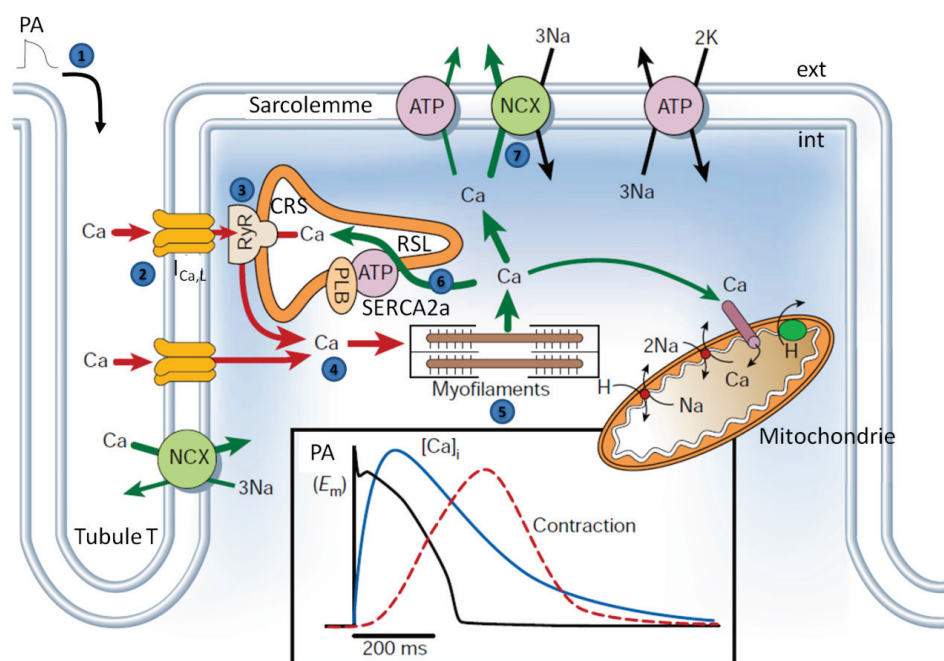


Figure 11 - Couplage excitation-contraction.

Lors de l'arrivée du PA (1), les LCCVD sont activés (2) et provoquent l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule. Le Ca^{2+} va activer les canaux RyR (3) et ainsi permettre la libération du Ca^{2+} stocké dans le RS (4). Le Ca^{2+} va ensuite interagir avec les myofilaments afin d'engendrer la contraction cellulaire (5). Enfin le Ca^{2+} va être recapté par les SERCA2a au niveau du RS (6) et extrudé de la cellule via l'échangeur NCX (7). Dans l'encadré, l'évolution au cours du temps d'un PA, de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire ainsi que de la contraction, mesurés sur des cardiomyocytes ventriculaires de lapin. ATP, adénosine triphosphate ; NCX, échangeur sodium/calcium ; PLB, phospholamban ; RSL, réticulum sarcoplasmique longitudinal ; CRS, citerne du RS ; RyR, récepteur à la ryanodine ; PA, potentiel d'action ; LCCVD, canaux calciques voltage-dépendants de type L ; SERCA2a, sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase ; Ca, calcium ; tubule T, tubule transverse ; $I_{\text{Ca,L}}$, courant calcique de type L ; Na, sodium ; H, protons ; K, potassium ; ext, extracellulaire ; int, intracellulaire ; Em, potentiel en mV ; $[\text{Ca}]_i$, concentration intracellulaire en calcium en mM. Modifié d'après (Bers, 2002).

II.2.1.3 – Couplage excitation-transcription

Le Ca^{2+} , en tant que second messenger ubiquitaire régule de nombreuses fonctions physiologiques et parmi celles-ci, il est capable de réguler l'expression génique par l'activation de kinases et de phosphatases qui modulent l'activité des facteurs de transcription. Différents travaux ont montré que l'amplitude, la durée des signaux calciques, ainsi que le mode d'entrée du Ca^{2+} dans la cellule déterminent l'activation de facteurs de transcriptions différents (Bading *et al.*, 1993; Dolmetsch *et al.*, 1997; Hardingham *et al.*,

1997; Dolmetsch *et al.*, 2001). Dans l'une de ces études, il a été montré que l'influx de Ca^{2+} par les LCCVD était nécessaire à l'activation des facteurs CREB (*cAMP responsive element binding protein*) et MEF2 (*myocyte enhanced factor 2*) (Dolmetsch *et al.*, 2001). Le facteur CREB est localisé principalement dans le noyau où il est activé par la phosphorylation de nombreuses sérines dont la sérine 133 dans les 10 secondes suivant la dépolarisation membranaire puis l'entrée de calcium dans la cellule (Bito *et al.*, 1996; Deisseroth *et al.*, 1996; Shaywitz & Greenberg, 1999). L'activation de cette voie de signalisation induit la translocation de la calmoduline au noyau, qui est alors capable d'activer la CaMKII (*Ca²⁺-Calmoduline-dependent protein kinase II*). Celle-ci phosphoryle ensuite le facteur CREB, qui jouera alors son rôle de facteur de transcription (Deisseroth *et al.*, 2003; D'Arco & Dolphin, 2012). L'entrée de Ca^{2+} via les LCCVD permet de réguler d'autres facteurs de transcription parmi ceux-ci le NFAT (*Nuclear Factor of Activated T-cells*). Dans cette voie de signalisation, la calmoduline active une phosphatase, la calcineurine qui déphosphoryle le NFAT, alors transloqué au noyau (Graef *et al.*, 1999). En 2008, Wheeler et coll. ont étudié la contribution des LCCVD au couplage excitation-transcription. Dans ce travail, ils montrent que l'entrée de calcium par les LCCVD est le mécanisme majoritaire de la cascade de signalisation vers le noyau permettant notamment la phosphorylation de la CaMKII (Wheeler *et al.*, 2008). De plus, il a été montré en 2006, que le LCCVD $\text{Ca}_v1.2$ pouvait réguler lui-même l'expression génique (Gomez-Ospina *et al.*, 2006). En effet, dans cette étude, il a été mis en évidence qu'une partie de $\text{Ca}_v1.2$, comprenant la queue C-terminale, pouvait être transloquée au noyau et permettre ainsi la régulation de la transcription. Cette partie clivée de la protéine est nommée CCAT (*calcium channel associate transcription regulator*).

II.2.2 – Structure

Les LCCVD sont des multimères protéiques composés de 3 sous-unités selon un ratio 1 : 1 : 1 (Catterall *et al.*, 2005): la sous-unité $\alpha 1$ qui a elle seule suffit à former le canal, puisqu'elle contient le pore de celui-ci, et 2 sous-unités auxiliaires majeures : la sous-unité β intracellulaire et la sous-unité $\alpha 2$ - δ . La sous-unité γ a également été décrite dans le cœur mais son rôle physiologique n'est pas encore clairement établi (figure 12, pour revue (Benitah *et al.*, 2010; Catterall, 2011)).

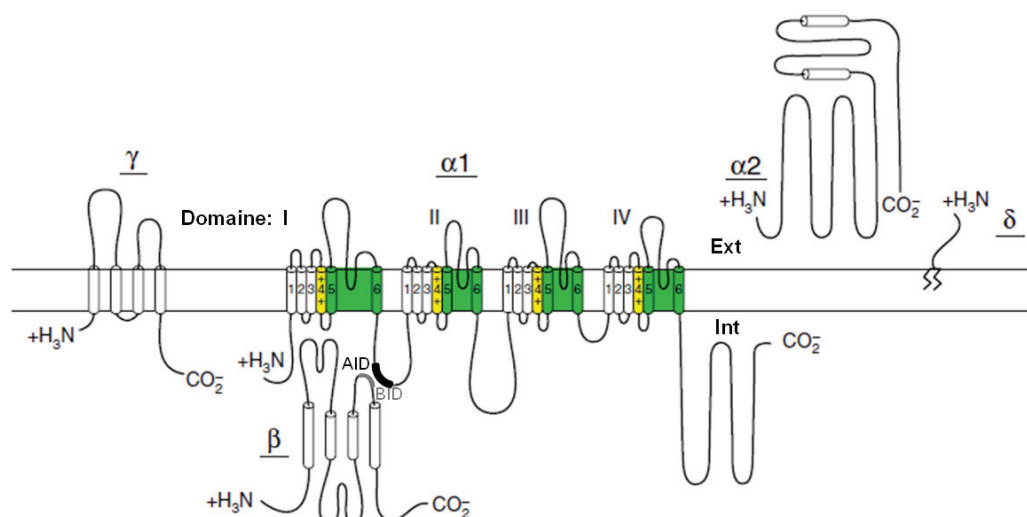


Figure 12 - Représentation schématique des différentes sous-unités d'un canal calcique.

NH_3^+ , extrémité N-terminale ; CO_2^- , extrémité C-terminale ; ext, extracellulaire ; int, intracellulaire ; AID, domaine d'interaction α ; BID, domaine d'interaction β ; en vert, le pore du canal ; en jaune, le segment S4 sensible au potentiel ; les zigzags illustrent l'ancrage glycosylé de la sous-unité $\alpha 2\delta$. Modifié d'après (Catterall, 2011).

II.2.2.1 – Sous unité alpha 1

Les canaux calciques ont été identifiés pour la première fois en 1953 par Fatt et Katz (Fatt & Katz, 1953). Une première classification a été établie selon leurs propriétés biophysiques et pharmacologiques basée en particulier sur la découverte des antagonistes calciques : les dihydropyridines, les benzothiazepines et les phenylalkylamines (Fleckenstein, 1983). La classification des canaux calciques a ensuite été affinée en considérant la diversité des propriétés électrophysiologiques (courants unitaires par exemple), pharmacologiques (sensibilité à certaines toxines) et moléculaires (identification des gènes, comparaison des séquences protéiques...) : les canaux de type neuronaux (type N) bloqués par la ω -conotoxine GVIA, les canaux de type résistants (type R), les canaux de type P/Q (pour Purkinje) sensibles aux ω -agatoxines IVA, les canaux de type transitoires (type T) identifiés dans les neurones et les cellules pacemaker, et enfin les LCCVD (type L) sensibles aux dihydropyridines (pour revue (Catterall *et al.*, 2005)). En utilisant l'homologie avec les canaux calciques du muscle squelettique, les LCCVD cardiaques ont été clonés en 1989 (Mikami *et al.*, 1989). Dix sous-unités α ont été décrites, possédant des caractéristiques et des profils d'expression différents. En 1997, Lory et coll. ont réalisé une nouvelle classification des canaux calciques (Lory *et al.*, 1997), puis une nouvelle nomenclature basée sur celle établie pour les canaux potassiques (Chandy, 1991) a été

réalisée en 2000 afin de classer les différents types de canaux calciques (Ertel *et al.*, 2000) (tableau IV). Dans le cœur, on retrouve 3 types de canaux calciques : les canaux de type T ($\text{Ca}_v3.1$, $\text{Ca}_v3.2$ et $\text{Ca}_v3.3$), P ($\text{Ca}_v2.1$) et L ($\text{Ca}_v1.2$ et $\text{Ca}_v1.3$). Le canal $\text{Ca}_v1.3$ appartenant à la famille des LCCVD est composé, entre autres, de la sous-unité $\alpha1d$ exprimée dans les ventricules et les oreillettes chez le fœtus, puis uniquement dans les tissus supraventriculaires (NS, NAV, oreillettes) à l'âge adulte (Qu *et al.*, 2005). Une étude sur des souris *knock-out* (KO) pour *CACNA1D* a cependant montré que l'absence de $\text{Ca}_v1.3$ serait responsable de bradycardies sinusales, de blocs auriculo-ventriculaires (BAV) ainsi que de troubles de l'audition (Platzer *et al.*, 2000). Dans une étude récente, Baig et coll. ont mis en évidence une mutation du canal $\text{Ca}_v1.3$ (c.1208_1209insGGG) conduisant à une absence de conduction impliquée dans une dysfonction du nœud sinusal au repos qu'il nomme syndrome de la dysfonction du nœud sinusal et surdité (SANDD syndrome, sinoatrial node dysfunction and deafness) (Baig *et al.*, 2011). Dans cette étude, l'insertion d'une glycine dans une région hautement conservée de la protéine conduit à un canal calcique non conducteur. Une autre étude réalisée sur ces souris KO pour *CACNA1D* a montré un ralentissement de l'activité pacemaker et des arythmies spontanées dues à un dysfonctionnement des cellules du nœud sinusal (Mangoni *et al.*, 2003).

La majorité de mon travail de thèse a porté sur le LCCVD composé de la sous-unité $\alpha1c$: $\text{Ca}_v1.2$, majoritairement ventriculaire. La sous-unité $\alpha1c$ est encodée par le gène *CACNA1C* constitué de plus de 500 kb (Soldatov, 1994) situé dans la région distale du chromosome 12p13 (Schultz *et al.*, 1993). Ce gène possède 12 sites d'épissage alternatif permettant de générer jusqu'à 42 isoformes différents. Une étude sur des souris KO pour *CACNA1C* a montré que l'absence de $\text{Ca}_v1.2$ entraînerait une mort précoce de l'embryon (Seisenberger *et al.*, 2000). Des travaux réalisés sur le *zebra fish* ont ensuite confirmés ces observations. Dans cette étude, les auteurs montrent que l'introduction d'une mutation du gène *CACNA1C* supprimant le courant $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ est responsable du développement d'une insuffisance ventriculaire et d'un silence électrique (Rottbauer *et al.*, 2001).

Tableau IV - Classification des canaux calciques selon leurs propriétés biophysiques et pharmacologiques.

Type	Régulation	Protéine	Gène	Tissu	Bloqueurs
L	Haut voltage	Ca _v 1.1 (α 1S)	<i>CACNA1S</i>	Muscle squelettique	DHP, PAA, BTZ
L	Haut voltage	Ca _v 1.2 (α 1C)	<i>CACNA1C</i>	Cœur, cerveau, aorte, poumons, fibroblastes	DHP, PAA, BTZ
L	Haut Voltage	Ca _v 1.3 (α 1D)	<i>CACNA1D</i>	Cerveau, tissu endocrine, cœur : tissus supraventriculaires adultes (oreillette, NS, NAV), ventricule fœtal	DHP, PAA, BTZ
L	Haut voltage	Ca _v 1.4 (α 1F)	<i>CACNA1F</i>		
N	Haut voltage	Ca _v 2.2 (α 1B)	<i>CACNA1B</i>	Cerveau	ω -CgTXGVIA
P/Q	Haut voltage	Ca _v 2.1 (α 1A)	<i>CACNA1A</i>	Cerveau, cœur	ω -Aga-IVA ω -CTX-MVIIC
R	Voltage intermédiaire	Ca _v 2.3 (α 1E)	<i>CACNA1E</i>	Cerveau	Nickel
T	Bas voltage	Ca _v 3.1 (α 1G)	<i>CACNA1G</i>	Cœur, cerveau, ostéoclastes	Nickel (IC ₅₀ = 216 μ M)
T	Bas voltage	Ca _v 3.2 (α 1H)	<i>CACNA1H</i>	Cœur	Nickel (IC ₅₀ = 13 μ M)
T	Bas voltage	Ca _v 3.3 (α 1I)	<i>CACNA1I</i>	Cœur	

DHP, dihydropyridines ; PAA, phénylalkylamines ; BTZ, benzothiazepines ; NS, nœud sinusal ; NAV, nœud auriculo-ventriculaire ; ω -CgTXGVIA, ω -conotoxine GVIA ; ω -Aga-IVA, ω -agatoxine-IVA ; ω -CTX-MVIIC, ω -Conotoxine-MVIIC. Adapté d'après (Lory et al., 1997; Ertel et al., 2000).

Dans le muscle cardiaque, 2 formes de la protéine Ca_v1.2 coexistent : une forme de 210 kDa (tronquée d'une partie de son extrémité C-terminale, cf § II.2.1.3 – Couplage excitation-transcription), et l'autre de 240 kDa. Le canal Ca_v1.2 est formé de 4 domaines répétés (I à IV) de 6 segments transmembranaires (S1 à S6) avec les extrémités N- et C-terminales intracellulaires (Catterall, 2000a) (figure 12).

Le segment S4 de chaque domaine est essentiel à la régulation par le potentiel du canal (Tanabe et al., 1987). Il est enrichi en résidus chargés positivement tels que la lysine et l'arginine qui lui confèrent sa sensibilité au potentiel (figure 12). Le mouvement de ces segments dans la membrane plasmique entraîne le changement de conformation du canal de l'état fermé à l'état ouvert (Stuhmer et al., 1989; Liman et al., 1991; Papazian et al., 1991). Le pore du canal est formé par l'association des segments S5 et S6 des 4 domaines (figure 11). Les boucles reliant chacun des 2 segments S5 et S6 de chaque domaine sont appelées boucles P. Elles portent le filtre de sélectivité du canal constitué de 4 résidus

glutamate EEEE (1 résidu par domaine à une position équivalente dans la boucle P) permettant la liaison au calcium (Tang *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1993; Parent & Gopalakrishnan, 1995). Physiologiquement, le canal calcique $\text{Ca}_v1.2$ est perméable majoritairement au Ca^{2+} (Tsien *et al.*, 1987). Dans la boucle reliant les domaines I et II se trouve une séquence hautement conservée nommée AID (domaine d'interaction α) permettant l'interaction avec la sous-unité β (figure 12) (Dolphin, 2003). Cette interaction masque une séquence de rétention endoplasmique du canal et permet son adressage membranaire (Bichet *et al.*, 2000). Deux types d'inactivation sont décrites pour le canal $\text{Ca}_v1.2$: une inactivation voltage-dépendante et une inactivation calcium-dépendante. La boucle reliant les domaines I et II, et la queue C-terminale sont déterminantes pour l'inactivation voltage-dépendante du canal (Klockner *et al.*, 1995; Soldatov *et al.*, 1998; Stotz & Zamponi, 2001), tandis que le segment S6 de chaque domaine ainsi que le domaine IQ (site de liaison à la calmoduline) situé dans la queue C-terminale sont fondamentaux à l'inactivation calcium-dépendante (Zuhlke & Reuter, 1998; Stotz *et al.*, 2000; Stotz & Zamponi, 2001) (figure 12). De nombreuses zones d'interaction avec des protéines régulatrices ont été localisées dans les différentes régions du canal $\text{Ca}_v1.2$ notamment au niveau des extrémités N- et C-terminales (*cf* § II.2.3 - Régulation du canal calcique $\text{Ca}_v1.2$).

Le canal $\text{Ca}_v1.2$ est glycosylé avant d'être exporté à la surface cellulaire. Sa durée de vie à la surface cellulaire est peu détaillée dans la littérature. Une étude réalisée en 2011 sur des neurones hippocampaux a estimé sa demi-vie à environ 1h (Di Biase *et al.*, 2011). Le canal est ensuite endocyté puis conduit à la dégradation.

II.2.2.2 – sous unité bêta

Il existe 4 sous-familles de sous-unité β ($\beta 1$ à $\beta 4$), chacune possédant des variants d'épissage. La sous-unité $\beta 1a$ a été la première sous-unité β purifiée, en 1987 dans le muscle squelettique (Tanabe *et al.*, 1987) puis clonée en 1989 (Ruth *et al.*, 1989). Par la suite, les autres sous-unités β ont également été clonées (Hullin *et al.*, 1992; Perez-Reyes *et al.*, 1992; Castellano *et al.*, 1993a; Castellano *et al.*, 1993b). Les gènes codant pour les sous-unités $\beta 1$ à $\beta 4$ sont situés sur des chromosomes différents : le chromosome 17q21 pour $\beta 1$ (Gregg *et al.*, 1993), 10q12 pour $\beta 2$ (Taviaux *et al.*, 1997), 12q13 pour $\beta 3$ (Collin *et al.*, 1993) et 2q22-23 pour $\beta 4$ (Taviaux *et al.*, 1997). La distribution tissulaire des variants d'épissage de la sous-unité β est répertoriée dans le tableau V. Dans le cœur, on retrouve les isoformes $\beta 1d$, $\beta 2a-e$ et $\beta 3$ entier ou tronqué.

La sous-unité β est une protéine cytosolique de 50 à 70 kDa formée de 5 domaines (Dolphin, 2003). Les domaines II et IV sont très conservés dans les différents isoformes,

alors que les domaines 1, 3 et 5 sont sujets à un épissage alternatif. Cette protéine est de type MAGUK avec des domaines SH3 et guanylate cyclase. Le domaine de liaison à la sous-unité α , nommé domaine BID (domaine d'interaction β), est situé dans le domaine IV et est composé de 41 acides-aminés très conservés (De Waard *et al.*, 1994) (figure 12). La sous-unité β est indispensable au fonctionnement du canal calcique, en effet chez les souris KO pour $\beta 2$, une diminution drastique d' $I_{Ca,L}$ dans le cœur et dans les muscles est observée, entraînant la mort de l'embryon à 10,5 jours alors que chez les souris KO pour $\beta 1$, 3 et 4 aucun changement significatif du phénotype cardiaque n'est observé (Weissgerber *et al.*, 2006). Dans une étude de 2007, Cingolani et coll. montrent que la diminution de l'expression de la sous-unité $\beta 2$ par une ARN interférent peut prévenir l'hypertrophie cardiaque en régulant l'influx calcique (Cingolani *et al.*, 2007). Lorsque la sous-unité β est coexprimée avec la sous-unité α , des modifications du trafic à la membrane ainsi que des propriétés biophysiques du canal ont été mises en évidence dans différents modèles de réexpression et dans des cardiomyocytes (Walker & De Waard, 1998; Dolphin, 2003; Herlitze *et al.*, 2003). En effet, la sous-unité β est une protéine chaperonne permettant l'augmentation de l'expression à la surface cellulaire de la sous-unité α (Wakamori *et al.*, 1993; Chien *et al.*, 1995; Josephson & Varadi, 1996; Yamaguchi *et al.*, 2000; Colecraft *et al.*, 2002). En augmentant l'expression membranaire de la sous-unité α , elle permet l'augmentation de la densité de courant calcique générée (Mikami *et al.*, 1989; Lacerda *et al.*, 1991; Varadi *et al.*, 1991; Wei *et al.*, 1991; Pragnell *et al.*, 1994; Shistik *et al.*, 1995). Elle modifie également la voltage-dépendance du canal et elle augmente ses cinétiques d'activation et d'inactivation (Lacerda *et al.*, 1991; Singer *et al.*, 1991; Varadi *et al.*, 1991; Neely *et al.*, 1993; Josephson & Varadi, 1996). Elle ne modifie cependant pas la perméabilité du canal (Wakamori *et al.*, 1993; Shistik *et al.*, 1995; Gollasch *et al.*, 1996).

Tableau V - distribution tissulaire de la sous-unité β .

Ca β	Distribution tissulaire	Références
$\beta 1$	Cerveau, cœur, muscle squelettique, rate, cellules T	(Powers <i>et al.</i> , 1992; Tanaka <i>et al.</i> , 1995; Stokes <i>et al.</i> , 2004)
$\beta 1a$	Muscle squelettique	(Ruth <i>et al.</i> , 1989; Powers <i>et al.</i> , 1992; Witcher <i>et al.</i> , 1995; Scott <i>et al.</i> , 1996)
$\beta 1b$	Cerveau, terminaisons nerveuses (JNM), pancréas	(Perez-Reyes <i>et al.</i> , 1992; Powers <i>et al.</i> , 1992; Witcher <i>et al.</i> , 1995; Scott <i>et al.</i> , 1996; Pichler <i>et al.</i> , 1997; Volsen <i>et al.</i> , 1997; McEnery <i>et al.</i> , 1998; Pagani <i>et al.</i> , 2004)
$\beta 1c$	Cerveau, rate	(Powers <i>et al.</i> , 1992)
$\beta 1d$	Cœur	(Cohen <i>et al.</i> , 2005)
$\beta 2$	Cerveau, cœur, poumon, terminaisons nerveuses (JNM), cellules T, ostéoblastes	(Perez-Reyes <i>et al.</i> , 1992; De Waard <i>et al.</i> , 1995; Tanaka <i>et al.</i> , 1995; Ludwig <i>et al.</i> , 1997; Pichler <i>et al.</i> , 1997; Volsen <i>et al.</i> , 1997; McEnery <i>et al.</i> , 1998; Pagani <i>et al.</i> , 2004; Stokes <i>et al.</i> , 2004; Shao <i>et al.</i> , 2009; Schlick <i>et al.</i> , 2010)
$\beta 2a$	Cerveau, cœur, aorte	(Hullin <i>et al.</i> , 1992; Hullin <i>et al.</i> , 2003; Herzig <i>et al.</i> , 2007)
$\beta 2b$	Cerveau, cœur, aorte	(Hullin <i>et al.</i> , 1992; Chu <i>et al.</i> , 2004; Herzig <i>et al.</i> , 2007)
$\beta 2c$	Cerveau, cœur	(Hullin <i>et al.</i> , 1992; Chu <i>et al.</i> , 2004; Herzig <i>et al.</i> , 2007)
$\beta 2d,e$	Cœur	(Chu <i>et al.</i> , 2004; Herzig <i>et al.</i> , 2007)
$\beta 3$	Cerveau, cœur, aorte, rein, poumon, muscle squelettique, muscle lisse, rate, thalamus, cellules T, trachée	(Hullin <i>et al.</i> , 1992; Witcher <i>et al.</i> , 1993; Castellano <i>et al.</i> , 1993b; Tanaka <i>et al.</i> , 1995; Witcher <i>et al.</i> , 1995; Scott <i>et al.</i> , 1996; Ludwig <i>et al.</i> , 1997; Pichler <i>et al.</i> , 1997; Volsen <i>et al.</i> , 1997; McEnery <i>et al.</i> , 1998; Vance <i>et al.</i> , 1998; Cahill <i>et al.</i> , 2000; Murakami <i>et al.</i> , 2003; Chu <i>et al.</i> , 2004; Pagani <i>et al.</i> , 2004; Stokes <i>et al.</i> , 2004)
$\beta 3$ tronquée	Cerveau, cœur, aorte	(Hullin <i>et al.</i> , 1992)
$\beta 4$	Cerveau, rein, terminaisons nerveuses (JNM), ovaires, muscle squelettique, moelle épinière, cellules T, testicules	(Castellano <i>et al.</i> , 1993a; Tanaka <i>et al.</i> , 1995; Witcher <i>et al.</i> , 1995; Scott <i>et al.</i> , 1996; Burgess <i>et al.</i> , 1997; Ludwig <i>et al.</i> , 1997; Pichler <i>et al.</i> , 1997; Volsen <i>et al.</i> , 1997; McEnery <i>et al.</i> , 1998; Vance <i>et al.</i> , 1998; Stokes <i>et al.</i> , 2004; Schlick <i>et al.</i> , 2010)
$\beta 4a$	Moelle épinière, cervelet	(Helton & Horne, 2002; Helton <i>et al.</i> , 2002; Vendel <i>et al.</i> , 2006)
$\beta 4b$	Moelle épinière, prosencéphale	(Helton <i>et al.</i> , 2002)

D'après (Buraei & Yang, 2010). JNM, jonction neuromusculaire.

II.2.2.3 – sous unité alpha 2 delta

Quatre gènes codants pour la sous-unité $\alpha 2\delta$ (1 à 4) ont été identifiés. Ils sont localisés sur 3 chromosomes différents : 7q21 pour $\alpha 2\delta 1$, 3p21 pour $\alpha 2\delta 2$ et $\alpha 2\delta 3$ et 12p13 pour $\alpha 2\delta 4$. Le clonage du premier a été réalisé en 1988 (Ellis *et al.*, 1988), suivi quelques années plus tard du clonage des 3 suivants (Klugbauer *et al.*, 1999; Qin *et al.*, 2002). La sous-unité $\alpha 2\delta$ est une protéine de poids moléculaire variant de 130 à 200 kDa selon son état de glycosylation (Marais *et al.*, 2001) (figure 12). Elle est constituée de deux régions liées entre elles par des ponts disulfures : $\alpha 2$, qui est indispensable à la stimulation par le potentiel du canal calcique (Gurnett *et al.*, 1996) et δ qui permet l'ancrage d' $\alpha 2$ à la membrane et qui modifie les propriétés biophysiques du canal (Felix *et al.*, 1997). Différents

travaux ont prédit la structure de la sous-unité $\alpha 2\delta$: dans une revue de 2007, Davies et coll. prédisent une structure composée par d'un domaine transmembranaire suivi d'une séquence intracellulaire très courte (Davies *et al.*, 2007); plus récemment le même groupe a prédit que certaines des sous-unités $\alpha 2\delta$ seraient liées par un groupement glycosylphosphatidylinositol (Davies *et al.*, 2010). Dans cette étude, de nombreuses preuves biochimiques sont apportées et supportent l'idée de cet ancrage.

Comme pour les sous-unités α et β , de nombreux variants d'épissage ont été décrits. Dans le système cardiovasculaire, on retrouve les isoformes $\alpha 2\delta 1a-e$ et $\alpha 2\delta 2a$ (Angelotti & Hofmann, 1996). $\alpha 2\delta 1c$ et $\alpha 2\delta 1d$ sont les deux isoformes majoritaires au niveau cardiaque (Barclay *et al.*, 2001; Gong *et al.*, 2001). Le domaine de liaison de la sous-unité $\alpha 2\delta$ à la sous-unité α est situé dans le domaine III de $Ca_v 1.2$ (Felix *et al.*, 1997; Gurnett *et al.*, 1997).

A l'aide d'un modèle de souris KO pour le gène *CACNA2D1*, Fuller-Bicer et coll. mettent en évidence une diminution de la densité de courant $I_{Ca,L}$, un ralentissement de l'inactivation ainsi qu'un décalage des courbes d'activation et d'inactivation vers des potentiels plus négatifs (Fuller-Bicer *et al.*, 2009). En système d'expression hétérologue, l'interaction entre les sous-unités $\alpha 1c$ et $\alpha 2\delta$ modifie les propriétés biophysiques du canal. En effet, la sous-unité $\alpha 2\delta$ quand elle est coexprimée avec la sous-unité α permet l'augmentation de la densité de courant calcique (Singer *et al.*, 1991; Welling *et al.*, 1993; De Waard & Campbell, 1995; Shistik *et al.*, 1995; Bangalore *et al.*, 1996; Gurnett *et al.*, 1996; Felix *et al.*, 1997; Parent *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 1998). Elle accélère les cinétiques d'activation et d'inactivation (Singer *et al.*, 1991; De Waard & Campbell, 1995; Bangalore *et al.*, 1996; Qin *et al.*, 1998; Shirokov *et al.*, 1998) et décale la dépendance au potentiel vers des valeurs plus négatives (Singer *et al.*, 1991; Felix *et al.*, 1997). Ces observations ont été confirmées en associant les différents isoformes cardiaques majoritaires $\alpha 1c$, $\beta 2a$ et $\alpha 2\delta 1$ (Hobom *et al.*, 2000). La sous-unité $\alpha 2\delta$ permet également l'augmentation de l'expression membranaire du canal ainsi que la maturation du complexe canalaire (Shistik *et al.*, 1995).

II.2.2.4 – sous unité gamma

La sous-unité γ a tout d'abord été décrite comme constituant des LCCVD uniquement dans le muscle squelettique où elle a été identifiée pour la première fois (Glossmann *et al.*, 1987). C'est une protéine de 22kDa, formée de 4 domaines transmembranaires et d'extrémités N- et C-terminales intracellulaires (Bosse *et al.*, 1990; Jay *et al.*, 1990) (figure 12). Il existe 8 isoformes de la sous-unité γ principalement exprimés dans le muscle squelettique ($\gamma 1$ et $\gamma 6$) et le cerveau ($\gamma 2-5$ et $\gamma 7-8$) (Burgess *et al.*, 1999; Chu *et al.*, 2001;

Kang & Campbell, 2003). Ces isoformes sont localisés sur 4 chromosomes différents : 17q24 pour γ_1 , 4 et 5, 22q13 pour γ_2 , 16p12 pour γ_3 et 19q13 pour γ_6 , 7 et 8. Au niveau cardiaque, les isoformes γ_4 , γ_6 , γ_7 et γ_8 sont exprimés (Chu *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2011). De nombreuses études ont été réalisées afin de mettre en évidence un effet potentiel de la sous-unité γ sur les LCCVD. Parmi celles-ci, des travaux réalisés sur l'isoforme γ_1 , qui n'est pas exprimé dans le cœur, en coexpression avec l'isoforme cardiaque de la sous-unité α , α_{1c} (Singer *et al.*, 1991; Wei *et al.*, 1991; Lerche *et al.*, 1996; Eberst *et al.*, 1997). Dans ces études en système de réexpression, il a été montré que γ accélère l'inactivation, augmente l'amplitude du courant calcique maximum et déplace la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs. Plus récemment, il a été montré que les isoformes cardiaques γ étaient associés au complexe protéique des LCCVD, et avaient un effet différent selon le type de sous-unités auxquelles elles étaient associées (Yang *et al.*, 2011). Elles sont capables de moduler l'activation, l'inactivation et l'amplitude d' $I_{Ca,L}$. Cette étude permet d'avancer dans la compréhension de l'effet de la sous-unité γ sur les LCCVD dans le cœur, mais ne permet pas encore d'établir clairement son rôle physiologique.

II.2.3 – Régulation du canal calcique $Ca_v1.2$

Le canal calcique $Ca_v1.2$ est sujet à de nombreux mécanismes de régulation.

II.2.3.1 – Régulation par le voltage

$Ca_v1.2$ est voltage-dépendant, sa probabilité d'ouverture augmente avec la dépolarisation membranaire. Dans les cardiomyocytes, le courant calcique de type L s'active à partir de valeurs de potentiels de -40 mV pour arriver à son maximum entre 0 et 10 mV en 2 à 7 ms selon la température (McDonald *et al.*, 1994). Le potentiel d'inversion du courant $I_{Ca,L}$ se situe autour de 60-70 mV. Il s'inactive lentement à partir de -40 mV, avec un potentiel de demi-activation situé à environ -35 mV (figure 13). La superposition des courbes d'activation et d'inactivation du courant calcique permet de mettre en évidence un courant de fenêtre apparaissant pour des potentiels impliqués dans la phase de plateau du PA ventriculaire. Cette zone fenêtre s'explique par l'existence de différents états du canal $Ca_v1.2$. En effet, celui-ci oscille entre 3 modes : le mode 0 où le canal est indisponible à l'ouverture ; le mode 1 où le canal s'ouvre de nombreuses fois mais de manière très brève et le mode 2 au cours duquel le canal atteint sa probabilité d'ouverture maximale avec des périodes d'ouvertures longues entrecoupées de brèves fermetures. L'oscillation entre ces différents états est régulé par la phosphorylation, les agonistes du canal ainsi que par l'intensité de la dépolarisation (McDonald *et al.*, 1994; Hui *et al.*, 2005). La déstabilisation du

courant de fenêtre peut jouer un rôle dans la genèse de troubles du rythme cardiaque en initiant des post-dépolarisations précoces (Antoons *et al.*, 2007) (figure 13).

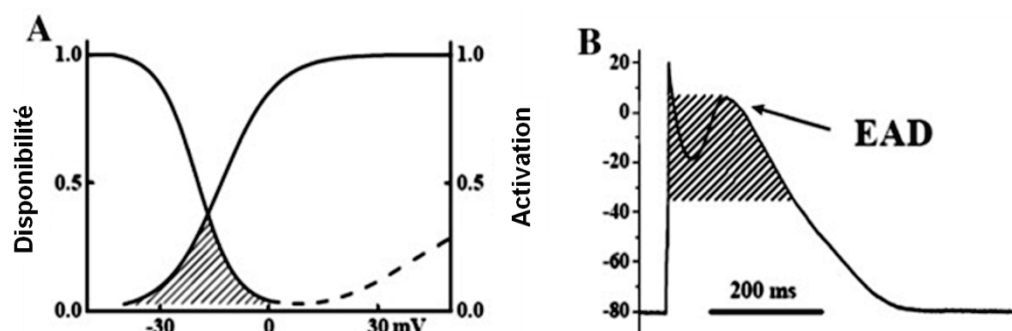


Figure 13 – Courant de fenêtre et post-dépolarisations précoces

(A) Superposition des courbes d'activation et d'inactivation du courant $I_{Ca,L}$ définissant le courant de fenêtre. (B) Implication du courant de fenêtre $I_{Ca,L}$ dans la phase de plateau du PA cardiaque pouvant être responsable de la génération de post-dépolarisations précoces (EAD). Modifié d'après (Benitah *et al.*, 2010).

Le courant $I_{Ca,L}$ possède deux types d'inactivation : l'une voltage-dépendante, l'autre calcium dépendante faisant intervenir des régions différentes du canal. L'inactivation voltage dépendante peut être enregistrée en utilisant le bariure comme ion perméant. En présence de cet ion, un ralentissement de l'inactivation du courant est observé appuyant ainsi une forte contribution de l'inactivation calcium-dépendante. C'est la boucle reliant les domaines I et II qui est impliquée dans cette inactivation. Il existe deux types d'inactivation voltage dépendante : l'une rapide, décrite juste au dessus, et une très lente. Deux études réalisées sur cardiomyocytes de cochon d'inde et de furet à 37°C ont montré que l'inactivation « ultra » lente du courant $I_{Ca,L}$ (constante de temps d'environ 6 ms à 0 mV) était masqué par l'inactivation calcium dépendante de celui-ci (Boyett *et al.*, 1994; McMorn *et al.*, 1996).

Le courant $I_{Ca,L}$ possède également un phénomène de « facilitation » régulé par le voltage (Noble & Shimoni, 1981). La facilitation d'un courant est définie par l'augmentation de son amplitude. Dans les cardiomyocytes, la facilitation d' $I_{Ca,L}$ peut apparaître quand la fréquence de stimulation augmente ou quand la première dépolarisation cellulaire est réalisée à de hauts potentiels. La facilitation dépendante de la fréquence est liée au Ca^{2+} . La facilitation voltage-dépendante a été décrite dans les cardiomyocytes et est observée lorsque le Ba^{2+} est utilisé comme ion perméant (Pietrobon & Hess, 1990). Elle se traduit par une augmentation de la durée d'ouverture du canal ainsi que de sa probabilité d'ouverture (Pietrobon & Hess, 1990; Kleppisch *et al.*, 1994).

II.2.3.2 – Régulation par le calcium

De nombreuses études ont montré le rôle régulateur du calcium sur l'inactivation du canal $\text{Ca}_v1.2$ (Kass & Sanguinetti, 1984; Lee *et al.*, 1985; Hadley & Hume, 1987). Le Ca^{2+} se lie à la calmoduline (CaM) puis ce complexe moléculaire va se fixer sur le domaine IQ situé dans l'extrémité C-terminale de la sous-unité $\alpha1c$ (Peterson *et al.*, 1999). L'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire va avoir un effet de rétrocontrôle négatif induisant une diminution de l'amplitude de $I_{\text{Ca,L}}$. Ce rétrocontrôle négatif est très important pour limiter l'entrée de Ca^{2+} via $\text{Ca}_v1.2$, permettant de limiter le courant dépolarisant, et ainsi de diminuer le relargage de Ca^{2+} par le RS de 30 à 50% selon les espèces (Grantham & Cannell, 1996; Puglisi *et al.*, 1999; Takamatsu *et al.*, 2003). Le Ca^{2+} relargué par le RS participe également à l'inactivation calcium dépendante de $\text{Ca}_v1.2$ (Sham *et al.*, 1995; Sipido *et al.*, 1995).

La facilitation de $I_{\text{Ca,L}}$ est elle aussi régulée par le calcium intracellulaire (Anderson, 2004). Comme pour l'inactivation calcium dépendante, la facilitation calcium-dépendante nécessite une liaison de haute affinité entre la CaM et le domaine IQ de l'extrémité C-terminale de $\text{Ca}_v1.2$ (Peterson *et al.*, 1999; Zuhlke *et al.*, 1999; Anderson, 2001; Halling *et al.*, 2006). Plus précisément, c'est l'activation de la CaMKII qui est responsable de la facilitation calcium-dépendante par phosphorylation de l'extrémité C-terminale de $\text{Ca}_v1.2$ (Yuan & Bers, 1994; Grueter *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006).

II.2.3.3 – Régulation par des molécules intracellulaires

De nombreuses molécules ont été décrites comme étant impliquées dans la régulation de $\text{Ca}_v1.2$. Certaines d'entre elles sont capables de se fixer à de multiples sites de la sous-unité $\alpha1$ pouvant même chevaucher le site de fixation d'une autre protéine régulatrice. Il est donc nécessaire de bien comprendre le rôle de chacune de ces protéines sur $I_{\text{Ca,L}}$ afin d'élucider les mécanismes de régulation de $\text{Ca}_v1.2$. Le tableau VI répertorie les molécules capables de réguler $I_{\text{Ca,L}}$ dans le cœur.

Tableau VI - Partenaires régulateurs du canal calcique $\text{Ca}_v1.2$.

Molécule	Modèle	Effets	Références
PKA	Cardiomyocytes de grenouille, rat, cochon d'Inde et lapin Myocytes auriculaires humains	- Activée par les récepteurs couplés à une protéine Gs ($\beta 1$ et $\beta 2$ adrénergiques...) et inhibée par les récepteurs couplés à une protéine Gi ($\beta 2$ et $\beta 3$ adrénergiques...) - Augmente la probabilité d'ouverture, la densité de courant et décale la voltage-dépendance vers des potentiels plus négatifs d' $I_{\text{Ca,L}}$	(Tsien et al., 1986; Hescheler et al., 1987; Hartzell et al., 1991; Ouadid et al., 1992; van der Heyden et al., 2005; Rozec & Gauthier, 2006)
KChIP2	Cardiomyocytes de souris	- Interaction avec l'extrémité N-terminale - KChIP2 ^{-/-} , diminution d' $I_{\text{Ca,L}}$ - Améliore le trafic à la surface cellulaire	(Thomsen et al., 2009b)
eIF3	HEK293, Neuro2a et neurones corticaux de rat	- Interaction avec la boucle II-III - Impliquée dans l'internalisation Ca^{2+} -dépendante et dans le trafic endosomal	(Green et al., 2007)
CaM	Oocytes de xénope, HEK 293, COS-1 et cardiomyocytes ventriculaires de cochon d'Inde	- Interaction avec l'extrémité C-terminale (domaine IQ), l'extrémité N-terminale et la boucle I-II - Impliquée dans ICD, FCD et la diminution naturelle du courant (<i>rundown</i>) - Adresse le canal à la membrane en absence de la sous-unité β	(Zuhlke & Reuter, 1998; Peterson et al., 1999; Qin et al., 1999; Pitt et al., 2001; Xu et al., 2004; Halling et al., 2005; Ravindran et al., 2008)
CaMKII	Oocytes de xénope, HEK 293, HEK tsA-201 et cardiomyocytes de rat	- Interaction avec l'extrémité N-terminale et la boucle III-IV en présence de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ - Interaction avec les extrémités N- et C-terminales, les boucles I-II, II-III et III-IV en présence de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ et d'ATP - Impliquée dans les facilitations calcium et voltage dépendantes	(Hudmon et al., 2005; Grueter et al., 2006; Lee et al., 2006)
AKAP 15/18	HEK 293 et cardiomyocytes adultes de rat	- Interaction avec l'extrémité C-terminale via un motif leucine zipper - Lie les PKA et régule la phosphorylation PKA-dépendante - Nécessaire à la régulation β -adrénergique - Contribue à l'augmentation d' $I_{\text{Ca,L}}$ PKA-dépendante	(Fraser et al., 1998; Gray et al., 1998; Hulme et al., 2003; Ruehr et al., 2004)
PP1, PP2A	Cardiomyocytes de souris adultes	- PP2A interagit avec l'extrémité C-terminale - PP2A diminue $I_{\text{Ca,L}}$ dans les cardiomyocytes - Inhibition de PP1 : augmentation d' $I_{\text{Ca,L}}$ - Interaction avec les AKAP	(duBell et al., 1996; Davare et al., 2000; duBell & Rogers, 2004; Ruehr et al., 2004)
Cavéoline 3	Cardiomyocytes de souris adultes et néonataux	- Présent dans le complexe macromoléculaire $\text{Ca}_v1.2/\text{récepteur } \beta 2$ adrénergique/protéine Gs/Adénylate cyclase/PKA/PP2A - Nécessaire à la régulation $\beta 2$ -adrénergique	(Tang et al., 1996; Balijepalli et al., 2006)

Molécule		Effets	Références
Sorcine	Oocytes de xénope, cardiomyocytes de souris adultes surexprimant la sorcine	- Interaction avec l'extrémité C-terminale (chevauche le domaine de liaison à la CaM) - Accélère l'inactivation	(Meyers <i>et al.</i> , 1998; Meyers <i>et al.</i> , 2003)
	HEK 293, cardiomyocytes de lapin adultes	- Augmente $I_{Ca,L}$ et l'inactivation en présence de Ba^{2+}, diminue l'inactivation en présence de Ca^{2+}	
CSN5 / Jab1	COS-7	- Interaction avec la boucle II-III - Extinction CSN5 par un siRNA : augmentation $I_{Ca,L}$ - Rôle physiologique non élucidé	(Kameda <i>et al.</i> , 2006)
Microtubules	Cardiomyocytes de rat	- Inhibition par la colchicine : augmentation $I_{Ca,L}$ - Prévient la facilitation voltage-dépendante par la CaMKII	(Gomez <i>et al.</i> , 2000; Kerfant <i>et al.</i> , 2001)
Actine	Cardiomyocytes de cochon d'Inde	- Inhibition par la cytochalasine D : diminution $I_{Ca,L}$	(Rueckschloss & Isenberg, 2001)
Ahnak / desmoyokine	Cardiomyocytes ventriculaires humains, de rat et de souris	- Interaction avec la sous-unité β - Augmente $I_{Ca,L}$ et ralentit l'inactivation - Phosphorylé lors d'une stimulation β-adrénergique par la PKA	(Haase <i>et al.</i> , 1999; Hohaus <i>et al.</i> , 2002; Haase <i>et al.</i> , 2005; Haase, 2007)

PKA, protein kinase A ; *KChIP2*, potassium channel interacting protein 2 ; *eiF3*, eukaryotic initiation factor 3 ; *CaM*, calmoduline ; *CaMKII*, protéine kinase dépendante de l'interaction calcium-calmoduline de type II ; *AKAP*, A kinase anchoring protein ; *PP1* et *PP2A*, protéines phosphatases de types 1 et 2A ; *CSN5*, COP9 signalosome subunit 5 ; *Jab1*, Jun activating domain-binding protein 1 ; $I_{Ca,L}$, courant calcique de type L ; *ICD*, inactivation calcium-dépendante ; *FCD*, facilitation calcium-dépendante ; *ATP*, adénosine triphosphate ; *ARN*, acide ribonucléique ; *siRNA*, petit ARN interférent.

II.2.4 – Pathologies associées au canal calcique $\text{Ca}_v1.2$

II.2.4.1 – Troubles du rythme et de la conduction cardiaques

De nombreuses pathologies cardiaques provoquant des troubles du rythme ont été associées à des mutations du canal $\text{Ca}_v1.2$. La première canalopathie cardiaque décrite a été le syndrome de Timothy aussi connu sous le nom de syndrome du QT long congénital (SQTL) de type 8. Il s'agit d'un désordre multiorganique de l'enfance, très rare, puisqu'il touche moins de 20 patients dans le monde. Les patients présentent comme symptômes majeurs un allongement de l'intervalle QT et une syndactylie accompagnés d'un dysmorphisme facial, d'un retard de développement, d'autisme et d'une affection des systèmes immunitaires et sécrétoires (Reichenbach *et al.*, 1992; Marks *et al.*, 1995a; Marks *et al.*, 1995b). Ce n'est qu'une dizaine d'années après ces premières observations que les deux premières mutations associées à ce syndrome ont été mises en évidence (Splawski *et al.*, 2004; Splawski *et al.*, 2005). Il s'agit, au niveau protéique, des mutations faux-sens G406R et G402S du canal calcique $\text{Ca}_v1.2$ provoquant un gain-de-fonction du courant $I_{\text{Ca,L}}$ par une altération de l'inactivation de ce courant. Récemment, Yazawa *et coll.* ont reprogrammé des fibroblastes de peau de patients atteints du syndrome de Timothy afin de générer des cellules souches pluripotentes induites (iPS) qu'ils ont différenciées en cardiomyocytes (Yazawa *et al.*, 2011). L'analyse fonctionnelle révèle une contraction irrégulière des cellules, un excès d'entrée de Ca^{2+} , un prolongement du PA, ainsi qu'une activité électrique et des transitoires calciques irréguliers. Dans cette même étude, la roscovitine, qui accélère l'inactivation voltage-dépendante de $\text{Ca}_v1.2$, permet de restaurer les propriétés électriques et calciques des cardiomyocytes.

Des mutations du canal $\text{Ca}_v1.2$ ont également été décrites dans le syndrome de Brugada (SBr ; cf § III.1 - Syndrome de Brugada). Cette pathologie augmente les risques de mort subite cardiaque par fibrillation ventriculaire (FV). Une étude a mis en évidence 2 mutations sur le gène codant pour la sous-unité $\alpha1c$ de $\text{Ca}_v1.2$ (p.A39V et p.G490R) et une sur la sous-unité $\beta2b$ (S481L au niveau protéique) (Antzelevitch *et al.*, 2007). Les patients présentent également un intervalle QT raccourci à l'ECG. Les deux mutations de la sous-unité canal provoquent une diminution de l'amplitude d' $I_{\text{Ca,L}}$ sans modification de la voltage-dépendance, accompagnée pour la mutation A39V d'un défaut de trafic à la surface cellulaire. Une autre mutation localisée sur le gène codant pour la sous-unité $\beta2b$ a depuis été identifiée. Il s'agit de la mutation protéique T11I qui provoque une accélération des cinétiques d'inactivation et un décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs, conduisant ainsi à une diminution du courant dépolarisant $I_{\text{Ca,L}}$ (Cordeiro *et al.*, 2009). Plus récemment, le gène codant pour la sous-unité $\alpha2\delta$ a été décrit comme gène de

susceptibilité au SBr dans une grande étude génétique réalisée par séquençage direct de gènes candidats de patients atteints de différents troubles arythmiques ou de la conduction cardiaques tels que le SBr (Burashnikov *et al.*, 2010). Dans cette étude, 14 variants portés par l'une des 3 sous-unités $\alpha 1c$, $\beta 2b$ ou $\alpha 2\delta$ ont été décrites chez des patients atteints du SBr associé ou non à un intervalle QT raccourci à l'ECG. Seuls 2 des ces 14 variants ont été étudiés au niveau fonctionnel. Il s'agit de la duplication au niveau protéique E1829-Q1833dupl et de la mutation faux-sens V2014I situées sur le gène *CACNA1C* et provoquant toutes les 2 une perte de fonction du courant $I_{Ca,L}$.

Toujours dans cette étude, les gènes codant pour les 3 sous-unités $\alpha 1c$, $\beta 2b$ ou $\alpha 2\delta$ ont été décrits comme gènes de susceptibilité au syndrome de repolarisation précoce (SRP) (Burashnikov *et al.*, 2010). La repolarisation précoce est une caractéristique électrocardiographique courante et généralement considérée comme bénigne. Elle affecte entre 1 à 5% de la population générale. A l'ECG, elle est détectée par une élévation du point J dans n'importe quelle dérivation. Sa présence dans les dérivations inférieures et latérales a été montrée comme associée à une prédisposition aux fibrillations ventriculaires (Haissaguerre *et al.*, 2008). A l'heure actuelle, un seul gène a été identifié dans cette pathologie. Il s'agit du gène codant pour le canal potassique sensible à l'ATP $K_{ir6.1}$ responsable du courant I_{KATP} (Medeiros-Domingo *et al.*, 2010).

Deux études associent des mutations du complexe canalaire $Ca_v1.2$ au syndrome de Brugada et à un intervalle QT raccourci (Antzelevitch *et al.*, 2007; Burashnikov *et al.*, 2010). Le syndrome du QT court (SQTC ; cf § III.2 - Syndrome du QT court) provoque une augmentation des risques de mort subite. En 2011, la mutation S755T de la sous-unité $\alpha 2\delta$ a été associée à cette pathologie (Templin *et al.*, 2011). Elle entraîne une diminution de l'amplitude du courant $I_{Ca,L}$ sans modifier l'expression globale ni à la surface cellulaire des 3 sous-unités du complexe canalaire.

II.2.4.2 – Pathologies cardiaques acquises

Les canalopathies décrites dans le paragraphe précédent sont toutes liées à des mutations de l'une des sous-unités du complexe canalaire $Ca_v1.2$. Cependant, d'autres pathologies cardiaques peuvent être dues à un remodelage des canaux ioniques dans les différents compartiments suite à une lésion du cœur comme lors d'un infarctus du myocarde par exemple. Au cours de l'hypertrophie cardiaque qui est une réponse adaptative à un stress pathologique, la densité du courant $I_{Ca,L}$ serait dans un premier temps augmentée puis se normaliserait lors de la phase d'hypertrophie compensée, pour finalement diminuer lors de la défaillance cardiaque sévère (Richard *et al.*, 1998; Benitah *et al.*, 2002; Richard *et al.*, 2006). Ces observations ont été confirmées dans un modèle d'hypertrophie compensée par

constriction de l'aorte abdominale et dans un modèle d'insuffisance cardiaque (Perrier *et al.*, 2004). Cependant des études réalisées au niveau du canal unique isolé suggèrent que les canaux calciques de type L ont une disponibilité et une probabilité d'ouverture augmentée dans des cellules humaines de cœur insuffisant en stade terminal (Piacentino *et al.*, 2003). Ceci pourrait s'expliquer par une diminution de l'expression des canaux calciques, mais que les canaux exprimés seraient plus actifs à la surface cellulaire. Différentes études ont montré que l'expression des canaux calciques était diminuée au niveau des tubules T dans des modèles d'insuffisance cardiaque humaine (Louch *et al.*, 2004; Lyon *et al.*, 2009). De plus, il a été montré que les canaux calciques seraient hyperphosphorylés au cours de cette pathologie (Chen *et al.*, 2008) entraînant ainsi une augmentation de leur activité. Dans une autre étude, il a été montré que la sous-unité régulatrice β_2 serait surexprimée dans des modèles d'insuffisance cardiaque chez la souris (Hullin *et al.*, 2007). Ces différents travaux appuient l'hypothèse qu'en cas d'hypertrophie cardiaque, l'expression des canaux calciques est diminuée mais que leur activité à la surface cellulaire est augmentée. Par ailleurs, un ralentissement de l'inactivation calcium dépendante a été observé lors d'une insuffisance cardiaque conduisant à une augmentation de l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule (Bito *et al.*, 2008). Enfin, en cas de BAV, une augmentation du courant de fenêtre calcique a été mise en évidence (Antoons *et al.*, 2007).

II.2.4.3 – Autres pathologies

Le canal calcique $\text{Ca}_v1.2$ joue un rôle fondamental dans le cœur mais il est également exprimé dans d'autres tissus et notamment dans le système nerveux central. A ce niveau, $\text{Ca}_v1.2$ n'est pas le seul canal calcique à être exprimé, on retrouve en effet les autres types de canaux calciques, tels que les canaux de type N, P/Q, R et T. Le syndrome de Timothy, décrit précédemment, provoque des affections cardiaques mais il touche également le système nerveux central en retardant son développement conduisant parfois à l'autisme du patient (Splawski *et al.*, 2004; Splawski *et al.*, 2005). Récemment, il a été montré que des SNP (polymorphisme nucléotidique) présents dans le gène codant pour $\text{Ca}_v1.2$ pouvaient être responsables de différentes affections du système nerveux central comme l'autisme, les désordres bipolaires, la dépression majeure récurrente ou encore la schizophrénie (Abrahams & Geschwind, 2008; Sklar *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009; Green *et al.*, 2010). Même si le rôle de $\text{Ca}_v1.2$ est bien documenté dans les tissus excitables, il l'est beaucoup moins dans les autres tissus. Quelques études décrivent une implication de $\text{Ca}_v1.2$ dans le développement de pathologies du système immunitaire (Das *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2009; Matza & Flavell, 2009). C'est le cas dans le syndrome de Timothy où les patients présentent une forte augmentation du risque d'infection (+75%) démontrant un rôle important du canal dans le système immunitaire (Splawski *et al.*, 2004; Splawski *et al.*, 2005).

II.3 – Les canaux sodiques voltage-dépendants cardiaques

II.3.1 – Rôle physiologique

Les canaux sodiques voltage-dépendants cardiaques permettent l'initiation et la propagation du PA dans les cellules excitables par la génération d'un courant électrique dépolarisant (Catterall, 2000b). Ils sont présents dans les cardiomyocytes ventriculaires et auriculaires où ils sont préférentiellement distribués au niveau des disques intercalaires mais aussi au niveau du sarcolemme et des tubules T (Scriven *et al.*, 2000; Brette & Orchard, 2006). On les retrouve également dans le NS et le NAV où ils contribuent à la conduction intranodale (Lei *et al.*, 2005; Mangoni & Nargeot, 2008). Dans les cellules de Purkinje, ils jouent un rôle dans la propagation de l'influx électrique à travers le système de conduction.

II.3.2 – Structure

Les canaux sodiques voltage-dépendants sont des hétéromultimères protéiques composés de deux sous-unités : la sous-unité α qui constitue le pore du canal et la sous-unité accessoire β .

II.3.2.1 – Sous unité alpha

Différents types de canaux sodiques voltage-dépendants ont été identifiés par des études électrophysiologiques, des purifications et du clonage (Goldin, 2001). Ils appartiennent à la superfamille des canaux ioniques dépendants du potentiel incluant les LCCVD. Une nomenclature basée sur le même principe que celle établie pour les canaux potassiques et calciques voltage-dépendants a été développée pour les canaux sodiques (Goldin *et al.*, 2000). Chez les mammifères, il existe 9 isoformes de la sous-unité α donnant le nom au canal. Dans le cœur, 5 types d'ARNm codant pour $Na_v1.1$, $Na_v1.3$, $Na_v1.4$, $Na_v1.5$ et $Na_v1.6$ ont été identifiés (Haufe *et al.*, 2005). Ces derniers, préférentiellement exprimés dans les neurones, sont retrouvés dans le NS où ils participent à la genèse de l'activité automatique et dans le NAV (Maier *et al.*, 2003; Marionneau *et al.*, 2005). Les cardiomyocytes expriment également une protéine appelée Na_x ($Na_v2.1/2.3$, *SCN7A*) dont la structure est proche des canaux sodiques mais qui ne produit pas de courant en système de réexpression (George *et al.*, 1992). Sa fonction est encore inconnue. L'isoforme cardiaque majoritaire est $Na_v1.5$, exprimé également dans le cerveau, le muscle squelettique au stade néonatal ou lors de myopathies, le muscle lisse gastro-intestinal et dans les cellules mammaires cancéreuses (Kallen *et al.*, 1990; Hartmann *et al.*, 1999; Donahue *et al.*, 2000; Filatov & Rich, 2004; Catterall *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008; Gillet *et al.*, 2009). Le canal $Na_v1.5$ a été identifié pour la première fois dans le ventricule cardiaque en 1992 (Gellens *et al.*, 1992). Il est encodé par le gène *SCN5A* localisé sur le bras court du chromosome 3p21

(George *et al.*, 1995). C'est une protéine de 260 kDa constituée comme le canal $\text{Ca}_v1.2$ de 4 domaines répétés (I à IV) de 6 segments transmembranaires (S1 à S6). La structure cristallisée d'un canal sodique bactérien, obtenue récemment par Payandeh *et coll.* (Payandeh *et al.*, 2011), a permis de mettre en évidence les bases structurales de l'activation voltage-dépendante, de la sélectivité ionique, ainsi que de la sensibilité aux drogues pharmacologiques de ce canal. Les extrémités N- et C-terminales sont intracellulaires. Le segment S4 est l'élément clé de la régulation par le potentiel du canal et la boucle S5-S6 des 4 domaines constitue le pore du canal (Chiamvimonvat *et al.*, 1996; Yamagishi *et al.*, 1997). Chaque boucle P contient un acide-aminé essentiel à la sélectivité du canal aux ions Na^+ (Hilber *et al.*, 2005). Ces 4 résidus forment le motif DEKA (Asp-Glu-Lys-Ala). La boucle reliant les domaines III et IV est essentielle à l'inactivation du canal. En effet, elle se lie au site intracellulaire du pore pour l'inactiver (Vassilev *et al.*, 1988). Le motif IFM (Ile-Phe-Met) localisé dans l'interdomaine III-IV est essentiel à l'inactivation du courant sodique (Eaholtz *et al.*, 1994). L'extrémité C-terminale joue également un rôle important dans cette inactivation (Deschenes *et al.*, 2001; Cormier *et al.*, 2002). Il a notamment été rapporté qu'elle stabilise l'état inactivé du canal en interagissant avec l'interdomaine III-IV (Motoike *et al.*, 2004). De plus, dans une étude réalisée en 2001, Mantegazza *et coll.* montrent que la substitution de la région C-terminale de $\text{Na}_v1.5$ par l'extrémité C-terminale du canal $\text{Na}_v1.2a$ (exprimé dans le cerveau) provoque une accélération de l'inactivation de $\text{Na}_v1.5$, la rendant similaire à l'inactivation de $\text{Na}_v1.2a$ (Mantegazza *et al.*, 2001).

Le canal $\text{Na}_v1.5$ subit des modifications post-traductionnelles, il est notamment fortement glycosylé avant d'être exporté à la surface cellulaire. Ce canal peut également être endocyté pour être dégradé par la suite. Cependant peu d'informations sont connues à l'heure actuelle quant à la durée de vie fonctionnelle du canal à la membrane. Une étude réalisée sur des cardiomyocytes de chien adulte estime la demi-vie de $\text{Na}_v1.5$ aux alentours de 32 à 36h (Maltsev *et al.*, 2008).

II.3.2.2 – sous unité bêta

La famille des sous-unités β comprend 4 membres ($\beta1$ à $\beta4$) tous exprimés dans le cœur. Ces protéines de 30 à 40kDa sont encodées par les gènes *SCN1B* à *SCN4B* respectivement, localisés sur le chromosome 19q13 pour $\beta1$ et sur le chromosome 11q23 pour $\beta2$, 3 et 4. La sous-unité β est formée d'une hélice α transmembranaire, d'une longue extrémité N-terminale extracellulaire contenant un domaine de type immunoglobuline, et d'une courte extrémité C-terminale intracellulaire. Son rôle est essentiel puisque de plus en plus de mutations de l'une ou l'autre des isoformes sont décrites comme provoquant des arythmies cardiaques telles que des troubles de la conduction (TdC), le SBr ou le SQTl par

exemple (Medeiros-Domingo *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2009; Watanabe *et al.*, 2009; Valdivia *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; Olesen *et al.*, 2011). En effet, la sous-unité β module l'expression à la surface cellulaire du canal sodique et permet l'ouverture du canal (Abriel, 2010; Wilde & Brugada, 2011). De nombreuses études ont décrit le rôle précis de chacun des isoformes β sur le courant sodique lié à $\text{Na}_v1.5$. La sous-unité $\beta1$ a été la plus étudiée. En système de réexpression (oocytes de xénope, cellules CHO) et sur cardiomyocytes de rat et de souris, elle provoque une augmentation de la densité de courant sodique et décale les courbes d'activation et d'inactivation vers des potentiels plus négatifs (Nuss *et al.*, 1995; Qu *et al.*, 1995; An *et al.*, 1998; Dhar Malhotra *et al.*, 2001; Ko *et al.*, 2005). Concernant les 3 autres isoformes, leurs rôles précis n'ont pas encore été clairement établis. Une étude montre que dans les cellules HEK tsA-201, $\beta3$ augmenterait la densité de courant sodique et décalerait la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs (Hu *et al.*, 2009). Pour les deux autres sous-unités, il apparaîtrait qu'elles n'aient pas d'effets significatifs sur le courant sodique lié à $\text{Na}_v1.5$ dans les cellules HEK 293 et CHO (Medeiros-Domingo *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2009). La sous-unité β permet également l'adhésion cellulaire par interaction avec le cytosquelette et la matrice extracellulaire entre autres (Srinivasan *et al.*, 1998; Malhotra *et al.*, 2000; Chioni *et al.*, 2009). De plus, il a été suggéré qu'elle pourrait réguler la migration cellulaire et l'agrégation (Srinivasan *et al.*, 1998; Malhotra *et al.*, 2000; Brackenbury *et al.*, 2008). Les isoformes $\beta1$ et $\beta3$ se lient à $\text{Na}_v1.5$ de manière non-covalente et sont préférentiellement localisés au niveau des tubules T (Messner & Catterall, 1985; Morgan *et al.*, 2000; Dhar Malhotra *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2003). Les isoformes $\beta2$ et $\beta4$, quant à elles, se lient à $\text{Na}_v1.5$ par des ponts disulfures et sont localisées au niveau des disques intercalaires (Messner & Catterall, 1985; Yu *et al.*, 2003; Maier *et al.*, 2004). Récemment, des mutations des gènes codant pour les sous-unités β ont été identifiées chez les patients atteints de troubles du rythme (syndrome de Brugada, fibrillation auriculaire, syndrome du QT long), soulignant ainsi l'importance de ces sous-unités (Abriel, 2010).

II.3.3 – Régulation des canaux sodiques

II.3.3.1 – Par le voltage

La dépolarisation membranaire de la cellule va provoquer le mouvement des segments S4 des canaux sodiques et induire leur ouverture. Le courant sodique I_{Na} s'active à partir de -70 mV de manière très rapide lors de la phase 0 du PA ventriculaire pour arriver à son activation maximale pour des potentiels d'environ -30 mV. Le courant I_{Na} s'inactive simultanément avec une cinétique légèrement plus lente que la cinétique d'activation. La conductance unitaire du canal $\text{Na}_v1.5$ est d'environ 10 à 25 pS. Dans les cellules de Purkinje,

la densité de canaux $\text{Na}_v1.5$ est de 100 par μm^2 , alors qu'elle est de 10 par μm^2 dans les cellules ventriculaires. La conductance maximale des canaux sodiques est donc plus grande dans les cellules de Purkinje que dans les myocytes ventriculaires. Il existe différents états d'inactivation du courant I_{Na} : une inactivation rapide, lente et intermédiaire. L'inactivation rapide est couplée à l'activation. Elle fait intervenir le motif IFM de l'interdomaine III-IV qui vient boucher le pore du canal par interaction avec les boucles S4-S5 des domaines III et IV (Balser, 2001). L'inactivation lente, quant à elle, est moins connue. Elle fait intervenir la boucle P, les segments S6 et l'extrémité C-terminale.

A la fin de la phase 1 du PA ventriculaire, 99% des canaux sodiques sont inactivés et ne seront réactivables que lors de la phase 4. Cependant, un faible pourcentage de canaux peut se réactiver dès la phase 2 du PA et contribuent au maintien de la dépolarisation. Le courant généré est appelé courant sodique tardif ou $I_{\text{Na,late}}$ et représente moins de 1% du courant maximal sodique cardiaque. Il s'explique par l'existence d'une zone fenêtre qui, dans une gamme de potentiels restreinte, permet la réactivation du courant sans qu'il y ait une inactivation complète de celui-ci. Malgré le fait que le courant $I_{\text{Na,late}}$ soit beaucoup plus petit que le courant I_{Na} , son augmentation entraîne un retard de la phase de repolarisation du PA et est à l'origine d'arythmies cardiaques telles que des torsades de pointes chez les patients atteints d'un syndrome du QT long par exemple (Amin *et al.*, 2010). Les mécanismes moléculaires responsables du courant $I_{\text{Na,late}}$ ne sont pas entièrement compris, mais peuvent être liée à une ouverture tardive des canaux sodiques (Moreno & Clancy, 2012). Les traitements pharmacologiques visant à réduire le courant $I_{\text{Na,late}}$ ont échoué en raison de la toxicité des médicaments ainsi que de l'absence de spécificité (Moreno & Clancy, 2012). La ranolazine est le premier composé utilisé en clinique montrant une plus grande spécificité pour le courant $I_{\text{Na,late}}$ que pour le courant I_{Na} (Antzelevitch *et al.*, 2011 b).

La particularité du canal $\text{Na}_v1.5$ par rapport à d'autres canaux sodiques est sa résistance à la tétrodotoxine (TTX). Son IC_{50} est supérieure à 1 nM alors que pour les autres canaux sodiques, elle est de l'ordre de 10 nM (Zimmer, 2010). Dans un article publié en 1979 par E. Coraboeuf et coll. sur le PA du système de conduction dans le cœur de chien, il a été montré que la TTX raccourci le PA des fibres de Purkinje à des doses plus faibles que nécessaire suggérant la contribution des autres canaux sodiques au courant $I_{\text{Na,late}}$ (Coraboeuf *et al.*, 1979).

II.3.3.2 – Par des protéines régulatrices

De nombreuses protéines régulatrices sont capables de moduler l'expression à la surface cellulaire, les cinétiques d'(in)activation et la dépendance au potentiel du canal sodique $\text{Na}_v1.5$. Le tableau VII résume ces différents partenaires régulateurs.

Tableau VII - Partenaires régulateurs du canal sodique Na_v1.5

Protéines	Effets sur le canal Na _v 1.5	Références
14-3-3	- Interaction avec l'interdomaine I-II - Décale la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs et ralentit la levée d'inactivation	(Allouis <i>et al.</i> , 2006)
α actinine 2	- Augmente l'expression à la surface cellulaire - Augmente la densité de courant I_{Na}	(Ziane <i>et al.</i> , 2010)
Ankyrine G	- Interaction avec l'interdomaine II-III - Ancrage à la membrane et au cytosquelette - Diminue la densité de courant I_{Na}	(Lemaitre <i>et al.</i> , 2003; Mohler <i>et al.</i> , 2004; Cunha & Mohler, 2006; Lowe <i>et al.</i> , 2008)
CaM	- Interaction avec le domaine IQ en C-terminal et avec l'interdomaine III-IV - Médie la sensibilité au Ca^{2+} - Effets controversés	(Deschenes <i>et al.</i> , 2002; Tan <i>et al.</i> , 2004; Kim <i>et al.</i> , 2004; Young & Caldwell, 2005)
CaMKII	- Décale la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs, ralentit la levée d'inactivation et augmente le courant sodique persistant dans les cardiomyocytes de lapin - Décale la courbe d'inactivation vers des potentiels plus positifs, accélère la levée d'inactivation et augmente le courant de pic et persistant dans les cardiomyocytes de rat et de cobaye	(Wagner <i>et al.</i> , 2006; Yoon <i>et al.</i> , 2009; Aiba <i>et al.</i> , 2010)
Cavéoline 3	- Dépendant de la stimulation β -adrénergique - Mutant impliqué dans le SQTAL : augmentation du courant sodique persistant	(Yarbrough <i>et al.</i> , 2002; Vatta <i>et al.</i> , 2006; Cronk <i>et al.</i> , 2007)
Connexine 43	-	(Malhotra <i>et al.</i> , 2004)
FHF1B / FGF12-1b	- Interaction avec l'extrémité C-terminale - Décale la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs	(Liu <i>et al.</i> , 2003; Goetz <i>et al.</i> , 2009)
Fyn	- Protéine tyrosine phosphatase - Décale la courbe d'inactivation vers des potentiels plus positifs et accélère la levée d'inactivation	(Ahern <i>et al.</i> , 2005)
GPD1L	- Mutants : diminuent densité I_{Na}	(London <i>et al.</i> , 2007; Van Norstrand <i>et al.</i> , 2007; Valdivia <i>et al.</i> , 2009)
MOG1	- Augmente l'expression à la surface cellulaire et la densité de courant I_{Na}	(Wu <i>et al.</i> , 2008)
N-cadherine	-	(Malhotra <i>et al.</i> , 2004)
Nedd-4-2	- Interaction avec l'extrémité C-terminale - Ubiquitylation et internalisation - Diminue l'expression à la surface cellulaire	(Abriel <i>et al.</i> , 2000; van Bemmelen <i>et al.</i> , 2004; Rougier <i>et al.</i> , 2005)
Plakophiline 2	- Extinction par un siRNA : décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs, diminution I_{Na} et ralentissement de la levée d'inactivation	(Sato <i>et al.</i> , 2009)
PTPH1	- Protéine tyrosine phosphatase - Interaction avec le domaine PDZ de l'extrémité C-terminale - Décale la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs	(Jespersen <i>et al.</i> , 2006)
SAP 97	- Diminue la densité d' I_{Na}	(Petitprez <i>et al.</i> , 2011)
Syntrophine	- Interaction avec le domaine PDZ de l'extrémité C-terminale - Ancrage à la membrane et au cytosquelette - Associe Na _v 1.5 au complexe multiprotéique de la dystrophine - Décale la courbe d'activation vers des potentiels plus positifs et ralentit les cinétiques d'(in)activation	(Gee <i>et al.</i> , 1998; Ou <i>et al.</i> , 2003; Gavillet <i>et al.</i> , 2006)
Telethonine	- Extinction par un siRNA : décalage de la courbe d'activation vers des potentiels plus positifs	(Mazzone <i>et al.</i> , 2008)

I_{Na} , courant sodique ; CaM, calmoduline ; Ca^{2+} , calcium ; CaMKII, protéine kinase dépendante de l'interaction calcium-calmoduline de type II ; SQTAL, syndrome du QT long ; FHF1B, fibroblast growth factor homologous factor 1B ; FGF12-1b, fibroblast growth factor 12-1b ; GPD1L, glycerol-3-phosphate deshydrogenase like protein ; MOG1, multicopy suppressor of *gsp1* ; Nedd-4-2, neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-2 ; ARN, acide ribonucléique ; siRNA, petit ARN interférent ; PTPH1, protein tyrosine phosphatase H1 ; SAP 97, Synapse-associated protein 97.

II.3.4 – Pathologies cardiaques associées

L'importance des canaux sodiques $\text{Na}_v1.5$ dans l'activité électrique cardiaque est accentuée par leur implication dans des pathologies arythmiques liées à des mutations du gène *SCN5A*. En effet, plusieurs centaines de mutations de ce gène ont été décrites à ce jour provoquant des troubles cardiaques variés. Plus de 80 de ces mutations sont associées au SQTl de type 3. Comme son nom l'indique, cette pathologie provoque un allongement de l'intervalle QT à l'ECG, associé à une augmentation des risques de mort subite cardiaque par tachycardie ventriculaire. Il existe différentes classes de SQTl liées à des mutations de canaux ioniques ou de l'un de leur partenaire régulateur. Le SQTl a tout d'abord été associé à des mutations des gènes codant pour les canaux potassiques $\text{K}_v\text{LQT1}$ et *HERG* (*human ether go go related gene*), puis à des mutations des canaux sodiques et calciques. La plupart des mutations du gène *SCN5A* provoque un gain-de-fonction de la protéine entraînant une augmentation du courant I_{Na} via une amélioration des propriétés biophysiques du canal entre autres (Amin *et al.*, 2010). Des mutations dans les gènes codant pour certaines des protéines régulatrices de $\text{Na}_v1.5$ ont également été associées au SQTl telles que la sous-unité $\beta 4$, la cavéoline-3 ou encore la syntrophine (Vatta *et al.*, 2006; Medeiros-Domingo *et al.*, 2007; Ueda *et al.*, 2008).

Dix à 30% des patients atteints du SBr sont porteurs d'une mutation du gène *SCN5A* (plus de 100 décrites à ce jour). Ces mutations provoquent toutes une perte de fonction du canal $\text{Na}_v1.5$ provoquant une diminution de l'entrée d'ions Na^+ lors du PA cardiaque (diminution de l'expression du canal, canaux non fonctionnels, altération des propriétés biophysiques) (Amin *et al.*, 2010). Comme pour le SQTl, les protéines régulatrices de $\text{Na}_v1.5$ peuvent être associées au SBr comme par exemple les sous-unités $\beta 1$ et $\beta 3$, et la protéine GPD1L qui provoquent une diminution de la densité de courant I_{Na} (London *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2009).

De nombreuses mutations du gène *SCN5A* ont également été associées aux TdC progressifs (ou maladie de Lenègre-Lev, cf § III.3 – Troubles de la conduction auriculo-ventriculaire). Cette pathologie provoque un allongement des paramètres de conduction cardiaques (onde P, intervalle PR et complexe QRS) associé à un bloc de branche (BB) gauche ou droit. Au niveau protéique, une perte de fonction du canal $\text{Na}_v1.5$ est observée par diminution de l'expression à la surface cellulaire, altération des propriétés biophysiques du canal ou par l'expression de canaux non fonctionnels (Amin *et al.*, 2010). Deux mutations du gène codant pour la sous-unité $\beta 1$ ont également été mises en évidence (Watanabe *et al.*, 2008).

D'autres pathologies cardiaques ont également été associées à des mutations du canal sodique comme la pathologie du NS, la fibrillation auriculaire, la mort subite du nourrisson ou encore les cardiomyopathies dilatées. Les effets de ces mutations sur le courant sodique varient d'une pathologie à l'autre et au sein d'une même pathologie.

III – Les troubles arythmiques et de la conduction cardiaques

Toute modification fonctionnelle ou structurale d'un ou plusieurs des éléments participant à la genèse et/ou à la propagation de l'influx électrique peut conduire à l'émergence d'un trouble du rythme cardiaque. Une arythmie cardiaque peut être définie comme une variation du rythme cardiaque normal sans justification physiologique. Ces dernières années, de nombreux travaux ont permis d'avancer dans la compréhension des mécanismes génétiques, moléculaires et électrophysiologiques conduisant au développement d'un large panel de troubles du rythme et de la conduction cardiaques. Les arythmies cardiaques sont classées en 2 catégories : les arythmies passives dues par exemple à un BAV et les arythmies actives. Celles-ci sont elles-mêmes subdivisées en 2 catégories majeures : celles dues à la formation d'un influx électrique anormal (post-dépolarisations précoces par exemple) et celles dues à un mécanisme de réentrées (fibrillation atriale par exemple). Le traitement de ces arythmies nécessite de connaître leurs mécanismes (tableau VIII).

Tableau VIII – Classification des mécanismes des arythmies cardiaques

Anomalies de l'excitabilité	Automatisme	Automatisme normal Automatisme anormal
Anomalies de l'excitabilité	Activités déclenchées	Post-dépolarisations précoces Post-dépolarisations tardives
Troubles de la conduction		Réentrée Réflexion Parasystolie

Les anomalies de l'excitabilité conduisant à un automatisme cardiaque anormal peuvent être responsables d'arythmies auriculaires et de certaines arythmies ventriculaires. Dans les pathologies conduisant à un automatisme cardiaque anormal, la membrane cellulaire est dépolarisée au repos (potentiel > -60 mV) entraînant la génération de nouveaux PA isolés ou répétés au cours de la phase diastolique. Les anomalies de l'excitabilité conduisant à des activités déclenchées sont liées à la présence de post-dépolarisations qui sont des oscillations du potentiel de membrane au-delà de la phase de dépolarisation initiale de la cellule. Elles n'apparaissent que suite à une dépolarisation préalable de la cellule. Il existe deux types de post-dépolarisations : (i) les post-dépolarisations précoces (EAD, *early after depolarizations*) qui interviennent lors des phases 2 ou 3 du PA ; (ii) les post-dépolarisations tardives (DAD, *delayed after depolarizations*) qui interviennent lors de la phase 4 du PA (figure 14). Les post-dépolarisations précoces nécessitent des PA longs et sont favorisés par une baisse des courants potassiques sortants. Elles sont associées à une

surcharge calcique, avec des courants calciques entrants supports des post-dépolarisations précoces. Elles seraient impliquées dans le mécanisme des torsades de pointes du syndrome du QT long (Viskin *et al.*, 2000). Les post-dépolarisations tardives sont toujours induites par des fréquences rapides. Elles correspondent à la libération oscillante du calcium à partir du réticulum sarcoplasmique et s'observent dans des conditions de surcharge du calcium intracellulaire.

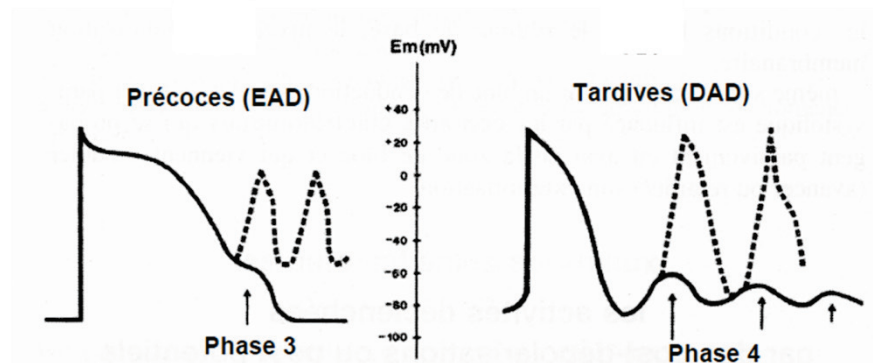


Figure 14 – Post-dépolarisations précoces et tardives

D'après

[http://facmed.univ-](http://facmed.univ-rennes1.fr/wkf/stock/RENNES20090403114531lessardMecArythmMabo1.pdf)

[rennes1.fr/wkf/stock/RENNES20090403114531lessardMecArythmMabo1.pdf](http://facmed.univ-rennes1.fr/wkf/stock/RENNES20090403114531lessardMecArythmMabo1.pdf)

Les anomalies de la conduction sont à l'origine de réentrées, mécanisme fréquent des arythmies cardiaques. Une réentrée survient lorsqu'une impulsion électrique se propage à travers un tissu qui a déjà été activé par la même impulsion mais a récupéré son excitabilité. Deux conditions sont nécessaires à la constitution d'une réentrée : une zone de bloc unidirectionnel et une vitesse de conduction lente. Les SQTS et SBr peuvent tous deux conduire à la genèse de réentrées pouvant conduire à la mort subite cardiaque.

III.1 – Le syndrome de Brugada

III.1.1 – Historique

En 1953, Osher et Wolff décrivent un aspect électrocardiographique particulier comprenant un aspect de BB droit, un sus-décalage du segment ST et une inversion de l'onde T dans les dérivations précordiales droites, ceci en l'absence de cardiopathie sous-jacente (Osher & Wolff, 1953). L'ECG publié correspond à un SBr mais il n'est pas rattaché à cette époque, à un risque de mort subite. En 1987, le CDC (*Centers for disease control and prevention*), un organisme de santé américain, rapporte une incidence importante de décès par mort subite cardiaque survenant pendant la nuit chez des hommes âgés de 16 à 63 ans réfugiés d'Asie du Sud-est (Parish RG, 1987). Cette affection était déjà connue depuis longtemps au Japon et en Asie du Sud-est (Thaïlande, Laos, Cambodge, Viet Nam,

Philippines). En Thaïlande, elle a été nommée *Lai Tai* (« mort pendant le sommeil »), *Bangungut* (« le cri suivi de la mort brutale pendant le sommeil ») aux Philippines et *Pokkuri* (« mort inexplicable nocturne ») au Japon. De même, dans une étude réalisée en 1989, Martini et coll décrivent 3 patients présentant une élévation du segment ST en V1-V2 à l'ECG accompagné d'un BB droit (Martini *et al.*, 1989). Ils concluent à une cardiomyopathie familiale sous-jacente associant mort subite, BB droit et élévation du segment ST. Il faudra attendre 1992 et les frères Brugada pour que cette signature électrocardiographique soit détaillée comme une entité clinique associée à un fort risque de mort subite (Brugada & Brugada, 1992), aujourd'hui nommée SBr. Dans cette étude multicentrique, les frères Brugada décrivent 8 patients présentant à la fois un BB droit, un sus-décalage du segment ST persistant à l'ECG ainsi que des morts subites cardiaques. En revanche, ces patients ne présentent pas de raccourcissement de l'intervalle QT ni de cardiopathie. Chez 4 d'entre eux, les auteurs ont suspectés une origine familiale.

III.1.2 – Epidémiologie, description clinique et tests pharmacologiques

Le SBr est responsable de 4 à 12% des morts subites cardiaques, voire 20% chez les patients n'ayant aucune anomalie structurelle cardiaque (Antzelevitch *et al.*, 2002). Il touche 1 individu sur 2000 soit 0.05% de la population générale avec une incidence plus élevée en Asie qu'en Europe de l'Ouest ou qu'en Amérique du nord (Antzelevitch *et al.*, 2005). C'est une pathologie à prédominance masculine, avec un ratio de 8 hommes pour une femme touchés. L'âge moyen de dépistage de cette pathologie est situé autour de 40 ans avec une distribution très hétérogène (de 2 jours à 84 ans). Le SBr peut entraîner la mort subite cardiaque survenant préférentiellement la nuit.

Au niveau électrocardiographique, le SBr est diagnostiqué si une élévation du segment ST est présente sur au moins deux des trois dérivations précordiales droites (V1-V3) (Antzelevitch *et al.*, 2005). Il existe 3 types de SBr, classés selon l'intensité du sus-décalage et la morphologie du segment ST (figure 15). Le type I est associé à un segment ST convexe, dit « en dôme », sus-décalé d'au moins 0.2 mV et d'une onde T négative. Le type II présente un segment ST concave vers le haut, dit « en selle de cheval », sus décalé d'au moins 0.2 mV au niveau du point J, puis pouvant décroître jusqu'à 0.1 mV en fin de segment ST. Le SBr de type II possède une onde T positive ou biphasique. Enfin le SBr de type III peut être associé à l'une ou l'autre des morphologies du segment ST (concave ou convexe). Celui-ci est sus-décalé d'au moins 0.2 mV au niveau du point J puis se termine par une élévation de moins de 0.1 mV. L'onde T est positive.

D'un point de vue clinique, les patients peuvent présenter en plus de la signature à l'ECG, un BB droit et un intervalle QT raccourci mais en revanche ne sont pas atteints d'une maladie structurale du cœur. La plupart des patients sont asymptomatiques cependant 17 à 42 % d'entre eux subiront au moins un épisode de syncope ou de mort subite cardiaque due à une arythmie ventriculaire au cours de leur vie (Brugada *et al.*, 2002; Priori *et al.*, 2002; Brugada *et al.*, 2003; Eckardt *et al.*, 2005). Quelques signes cliniques ont de plus été reportés dans cette pathologie tels que des malaises d'allure « vagale », une respiration stertoreuse et une perte d'urine survenant la nuit (Antzelevitch *et al.*, 2002).

Seul le SBr de type I permet d'établir le diagnostic, mais il doit être associé à un autre élément : une fibrillation ou une tachycardie ventriculaire, la survenue d'une arythmie ventriculaire lors du test pharmacologique, une syncope ou respiration irrégulière, une histoire familiale de mort subite chez une personne âgée de moins de 45 ans ou la présence d'un SBr de type I chez d'autres membres de la famille (Antzelevitch *et al.*, 2005). Cependant, le diagnostic de cette pathologie est souvent difficile car les anomalies électrocardiographiques sont variables au cours du temps. Le système nerveux autonome ainsi que certains médicaments peuvent moduler l'aspect du segment ST. Le diagnostic peut également être effectué à l'aide d'un test pharmacologique qui permet de démasquer l'aspect de type I chez des personnes ne présentant aucun des signes électrocardiographiques typiques ou quand l'ECG montre un aspect de type II ou III.

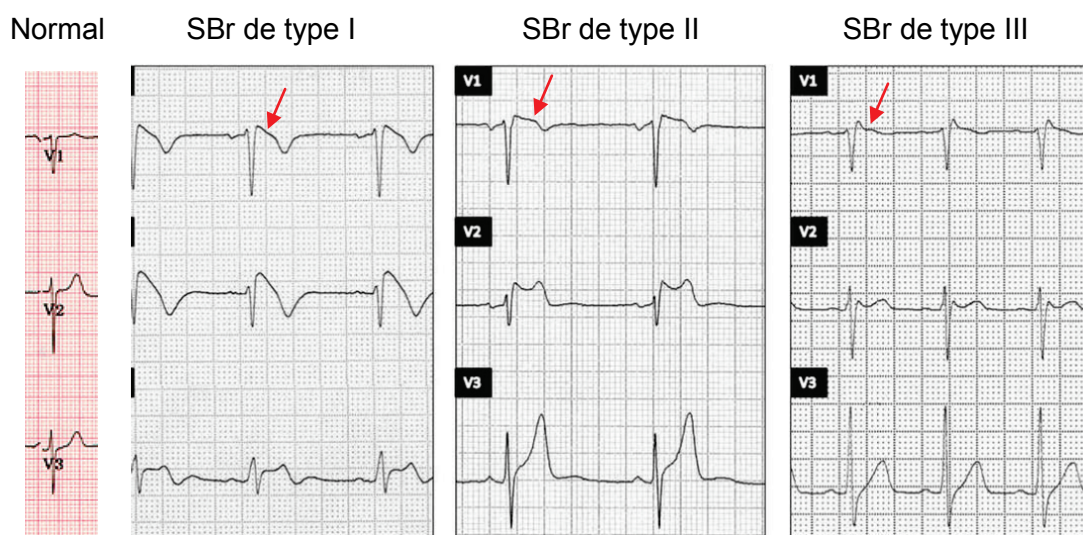


Figure 15 - Electrocardiogrammes des trois formes de syndrome de Brugada.

D'après (Benito et al., 2009)

Pour réaliser ce test pharmacologique, les cliniciens utilisent des bloqueurs des canaux sodiques (ajmaline, flécaïnide, procainamide, pilsicainide) qui ont l'avantage d'être très efficaces, facilement disponibles et d'une activité rapide (Brugada *et al.*, 2000). L'ajmaline et la flécaïnide sont les deux bloqueurs les plus utilisés lors de ces tests (tableau

IX). Chacune de ces molécules a ses inconvénients : l'ajmaline serait plus efficace mais produirait des faux-positifs alors que la flécainide produirait des faux-négatifs (Hong *et al.*, 2004; Meregalli *et al.*, 2006). Une étude électrophysiologique a mis en évidence une diminution du courant transitoire potassique I_{to} lors d'un traitement par la flécainide (Wolpert *et al.*, 2005). Ces observations permettraient d'expliquer la moins bonne efficacité de cette molécule vis-à-vis de l'ajmaline. Le SBr est diagnostiqué si, au cours du test pharmacologique un aspect de type I est observé à l'ECG.

Tableau IX - Drogues utilisées pour démasquer le syndrome de Brugada.

Drogue	Dose	Mode d'administration	Spécificité	Sensibilité	Faux-positifs	Faux-négatifs
Ajmaline	1mg/kg	IV lente, 5 min	94,4 %	80 %	6,7 %	17,1 %
Flécainide	2 mg/kg 400 mg	IV lente, 10 min <i>Per os</i>	80 %	77 %	4 %	64 %

IV, intraveineuse. D'après les travaux de (Hong et al., 2004; Antzelevitch et al., 2005; Meregalli et al., 2006)

III.1.4 – Facteurs génétiques

Le SBr est une pathologie pouvant être sporadique ou d'origine familiale. Dans les formes familiales, la pathologie est à transmission autosomique dominante avec expressivité variable et pénétrance incomplète (Naccarelli & Antzelevitch, 2001). Le SBr est une pathologie hétérogène puisqu'à l'heure actuelle il est associé à des mutations de 11 gènes différents tous impliqués de près ou de loin dans la genèse et la propagation du PA cardiaque (tableau X). Le premier gène mis en évidence fut le gène *SCN5A*, sur lequel plus de 300 mutations sont décrites aujourd'hui (Chen *et al.*, 1998). Ces mutations provoquent une perte-de-fonction du courant I_{Na} par une diminution de l'expression membranaire de la protéine $Na_v1.5$ ou bien par son dysfonctionnement (cf § II.3.4 – Pathologies cardiaques associées). Cependant, seuls 20 à 25% des cas sont expliqués par la présence d'une mutation de *SCN5A*, suggérant l'existence d'autres gènes morbides et de l'hétérogénéité de ce syndrome (Antzelevitch *et al.*, 2005). En 2009, une étude réalisée par notre laboratoire montre que les variants perte-de-fonction du gène *SCN5A* ne permettent pas à eux seuls d'expliquer le SBr (Probst *et al.*, 2009). En effet, dans les 13 familles étudiées, un défaut de ségrégation de la mutation de *SCN5A* avec le phénotype est observé conduisant à penser qu'un modèle monogénique ne permet pas de comprendre les mécanismes du SBr. Dans cette étude, Probst et coll. soulèvent l'importance du fond génétique dans la physiopathologie du SBr. Outre les mutations décrites sur le gène *SCN5A*, des mutations

des gènes codant pour les 3 sous-unités du complexe canalaire $Ca_v1.2$ peuvent être responsables d'environ 13% des cas de SBr (Antzelevitch *et al.*, 2007; Burashnikov *et al.*, 2010). D'autres gènes ont ensuite été associés à cette pathologie mais leurs fréquences sont nettement plus faibles. L'ensemble des mutations décrites provoque un déséquilibre de la balance « courants entrants-courants sortants » lors de la phase 1 du PA ventriculaire conduisant à l'apparition d'une encoche caractéristique et à la perte du dôme. Ce déséquilibre offre une possibilité d'apparition de réentrées lors de la phase 2 du PA et donc conduire à la genèse d'arythmies ventriculaires.

Tableau X - Les différentes formes de SBr et leurs gènes associés.

Type	Gène	Protéine	Courant ionique affecté	Fréquence	Référence
1	<i>SCN5A</i>	$Na_v1.5$	p-f I_{Na}	11-28 %	(Chen <i>et al.</i> , 1998)
2	<i>GPD1L</i>	G3PD1L	p-f I_{Na}	Rare	(London <i>et al.</i> , 2007)
3	<i>CACNA1C</i>	$Ca_v1.2$	p-f $I_{Ca,L}$	6.6 %	(Antzelevitch <i>et al.</i> , 2007)
4	<i>CACNB2</i>	$Ca_v\beta2$	p-f $I_{Ca,L}$	4.8 %	(Antzelevitch <i>et al.</i> , 2007)
5	<i>SCN1B</i>	$Na_v\beta1$	p-f I_{Na}	1.1 %	(Watanabe <i>et al.</i> , 2008)
6	<i>KCNE3</i>	MIRP2	g-f I_{to} et I_{Ks}	Rare	(Delpon <i>et al.</i> , 2008)
7	<i>SCN3B</i>	$Na_v\beta3$	p-f I_{Na}	Rare	(Hu <i>et al.</i> , 2009)
8	<i>HCN4</i>	HCN4	p-f I_f		(Ueda <i>et al.</i> , 2004)
?	<i>KCNJ8</i>	$K_{ir}6.1$	g-f $I_{K,ATP}$	2 %	(Medeiros-Domingo <i>et al.</i> , 2010)
?	<i>CACNA2D1</i>	$Ca_v\alpha2\delta1$	p-f $I_{Ca,L}$	1.8 %	(Burashnikov <i>et al.</i> , 2010)
?	<i>KCND3</i>	$K_v4.3$	g-f I_{to}	Rare	(Giudicessi <i>et al.</i> , 2011)
?	<i>MOG1</i>	MOG1	p-f I_{Na}	Rare	(Kattygnarath <i>et al.</i> , 2011)
?	<i>KCNH2</i>	HERG	g-f I_{Kr}		(Verkerk <i>et al.</i> , 2005)
?	<i>KCNE5</i>	KCNE like	g-f I_{to}		(Ohno <i>et al.</i> , 2011)

p-f, perte-de-fonction ; *g-f*, gain-de-fonction ; *I* signifie courant.

III.1.5 – Mécanismes ioniques et cellulaires impliqués

Malgré le grand nombre de mutations décrites dans le SBr, le mécanisme physiopathologique responsable de la pathologie reste sujet à controverses. Les différents travaux s'accordent tout de même sur l'origine ventriculaire droite de la pathologie ainsi que sur l'association d'un SBr de type I avec la survenue d'arythmies ventriculaires. Deux hypothèses majeures sont actuellement proposées pour expliquer les mécanismes ioniques et cellulaires de ce syndrome : « l'hypothèse de la repolarisation », menée par Charles Antzelevitch (Yan & Antzelevitch, 1999), et « l'hypothèse de la dépolarisation » menée par Arthur Wilde (Meregalli *et al.*, 2005).

III.1.5.1 – L'hypothèse de la repolarisation

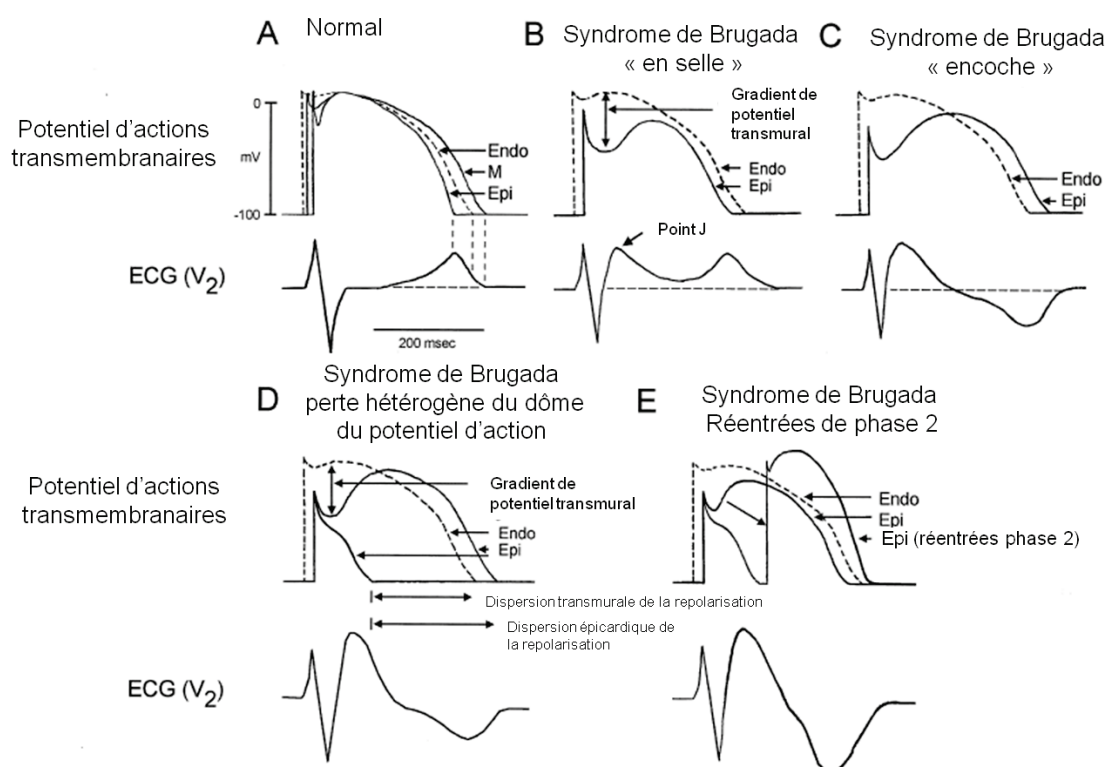


Figure 16 - Bases cellulaires du syndrome de Brugada selon l'hypothèse de la repolarisation

PA, potentiel d'action ; Epi, épicarde ; Endo, endocarde. (A), PA normaux des cellules épicardiques, M et endocardiques. La perte de la phase de plateau du PA endocardique crée un gradient transmurale à l'origine de l'élévation du segment ST (B à E). (C), l'inversion de l'onde T peut être expliquée par une repolarisation tardive des cellules épicardiques par rapport aux cellules endocardiques. (D et E), la dispersion épicardique de la repolarisation génère un gradient transmurale de repolarisation pouvant être à l'origine de réentrées de phase 2. Modifié d'après (Naccarelli & Antzelevitch, 2001)

Selon cette hypothèse, l'élévation du segment ST dans les dérivations précordiales droites serait due à l'existence d'un gradient transmurale lors de la repolarisation ventriculaire. En effet, la forme et l'amplitude des phases 1 et 2 du PA varient entre les différentes couches de la paroi ventriculaire droite. Les cellules épicardiques à la différence des cellules endocardiques possèdent une phase 1 du PA caractéristique dite « en encoche » (figure 16). C'est le courant I_{to} qui serait le principal responsable de cette morphologie particulière (Antzelevitch *et al.*, 1991; Nabauer *et al.*, 1996). En effet, celui-ci est quasi nul dans les cellules endocardiques alors qu'il est beaucoup plus grand dans les cellules épicardiques, créant ainsi le gradient transmurale (figure 7). Comme vu précédemment, la perte du plateau

du PA et donc l'élévation du segment ST à l'ECG sont dues essentiellement à un déséquilibre entre les courants ioniques entrants et sortants (figure 17).

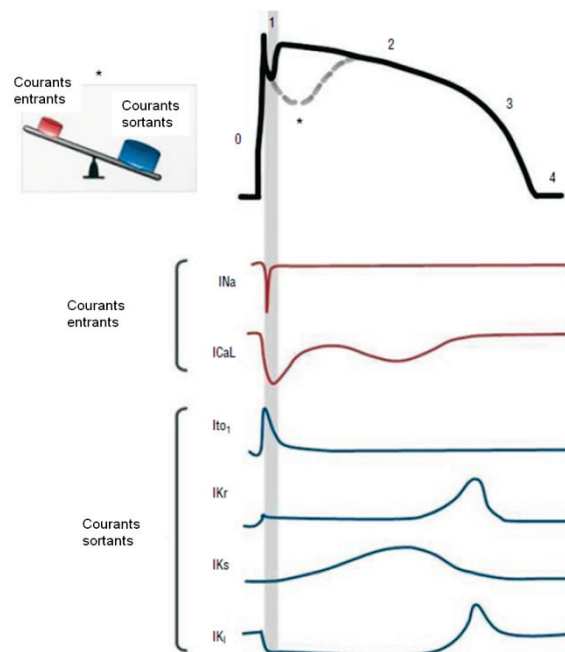


Figure 17 - Potentiel d'action ventriculaire et implication des courants ioniques de la phase 1 dans le syndrome de Brugada.

La surface grisée correspond à la phase 1 du PA ventriculaire due à une balance entre les courants entrants I_{Na} et $I_{Ca,L}$ et le courant sortant I_{to} . () Quand les courants sortants prédominent sur les courants entrants, on voit l'apparition d'une encoche caractéristique sur le PA (ligne pointillée). Modifié d'après (Benito et al., 2009).*

III.1.5.2 – L'hypothèse de la dépolarisation

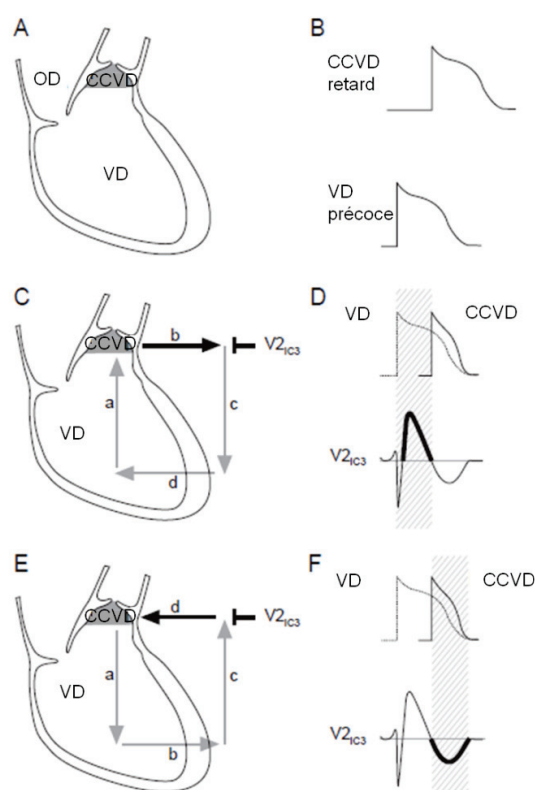


Figure 18 - Bases cellulaires du syndrome de Brugada selon l'hypothèse de la dépolarisation

Voir texte. OD, oreillette droite, VD, ventricule droit, CCVD, chambre de chasse du ventricule droit. Modifié d'après (Meregalli et al., 2005).

Cette deuxième hypothèse explique l'origine du profil électrocardiographique du SBr par un ralentissement de la dépolarisation au niveau de la chambre de chasse du ventricule droit (figure 18A) (Meregalli et al., 2005). La chambre de chasse du ventricule droit est le lieu d'insertion du système artériel vasculaire dans le ventricule droit. Le PA de la chambre de chasse du ventricule droit est retardé par rapport au PA du ventricule droit (figure 18B). Lors du décours de l'onde S à l'ECG, le potentiel de membrane du ventricule droit est plus positif que celui de la chambre de chasse du ventricule droit (Figure 18D). Puis lors du décours de l'onde T, c'est l'inverse qui se produit, le potentiel de membrane de la chambre de chasse du ventricule droit est plus positif que celui du VD provoquant ainsi l'inversion de l'onde T à l'ECG (figure 18F).

A l'heure actuelle, ces deux hypothèses sont largement discutées dans les travaux traitant du SBr. De nombreux arguments ont été donnés en faveur de l'une ou l'autre des hypothèses (Wilde et al., 2010). Par exemple, l'effet de la quinidine dans le traitement du SBr. La quinidine est connue pour son inhibition du courant I_{to} et conduit à la normalisation

du segment ST à l'ECG, observation en faveur de l'hypothèse de la repolarisation (Belhassen *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 2006). D'un autre côté, l'utilisation de bloqueurs sodiques lors du test pharmacologique de dépistage du SBr évoque un ralentissement de la conduction entre les oreillettes et les ventricules, observation en faveur de l'hypothèse de la dépolarisation (Brugada *et al.*, 2000; Shimizu *et al.*, 2000). Le mécanisme physiopathologique responsable du SBr pourrait être une combinaison de ces hypothèses qui ne sont pas contradictoires mais plutôt complémentaires. Il n'existe probablement pas qu'un seul et unique mécanisme mais certainement plusieurs en fonction du fond génétique des patients.

III.1.6 – Traitements

Actuellement, aucun traitement n'a montré une efficacité totale face à la prévention de la mort subite suite à un SBr. Il existe cependant des traitements pharmacologiques capables d'atténuer les risques de mort subite. Plusieurs études montrent que l'hydroquinidine diminue le risque de FV spontanées ou induites dans le SBr (Belhassen *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 2005). Cette molécule est un bloqueur non spécifique du courant I_{to} . Elle est capable d'inhiber également le courant sodique et les courants potassiques I_{Kr} et I_{Kur} (Marquez *et al.*, 2007). L'isoprotérénol, un β -mimétique augmentant la densité de courant $I_{Ca,L}$, a également fait ses preuves dans les cas « d'orages arythmiques » dus au SBr (Ohgo *et al.*, 2007). Enfin, le cilostazol, un inhibiteur de la phosphodiesterase III diminuant le courant I_{to} et augmentant le courant $I_{Ca,L}$ pourrait également être proposé en thérapie du SBr. En effet, cette molécule émerge parmi les traitements prometteurs du SBr, mais les cas cliniques étudiés à ce jour sont encore trop peu nombreux et présentent des résultats variables (Benito *et al.*, 2009).

L'implantation d'un défibrillateur automatique (DEF) chez les patients présentant un fort risque de développer des arythmies cardiaques reste nécessaire car les traitements pharmacologiques ne sont pas suffisamment efficaces. Le DEF est aujourd'hui la seule thérapeutique capable de protéger les patients de tachycardies ventriculaires mortelles (Antzelevitch *et al.*, 2005). L'implantation d'un DEF est recommandée chez les patients symptomatiques, c'est-à-dire ayant déjà présenté un arrêt cardiaque ou une syncope ; chez les patients asymptomatiques présentant un ECG basal typique du SBr et une histoire familiale de mort subite et chez les patients asymptomatiques présentant un ECG basal typique du SBr et inductible lors d'une stimulation ventriculaire programmée (figure 19).

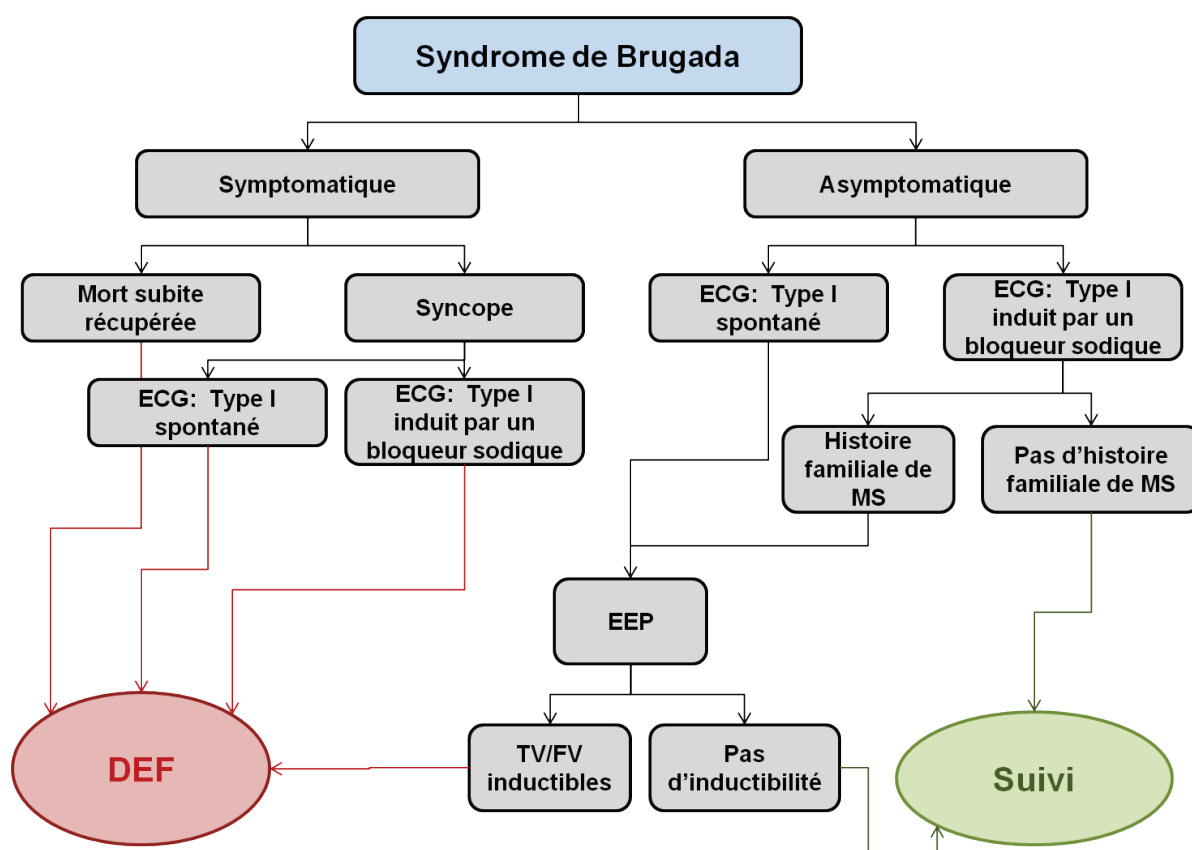


Figure 19 - Indications pour l'implantation d'un défibrillateur automatique chez des patients atteints du syndrome de Brugada

DEF, défibrillateur automatique ; ECG, électrocardiogramme ; EEP, étude électrophysiologique ; TV, tachycardie ventriculaire ; FV, fibrillation ventriculaire ; MS, mort subite. Modifié d'après (Benito et al., 2009)

III.2 – Le syndrome du QT court

III.2.1 – Historique

L'allongement de l'intervalle QT à l'ECG est depuis longtemps connu pour augmenter les risques de mort subite cardiaque. Le raccourcissement de l'intervalle QT n'a quant à lui pas été considéré comme potentiellement arythmogénique jusqu'en 2000. Il était jusque là surtout mis en relation avec une hypercalcémie (Nierenberg & Ransil, 1979). Pourtant, en 1993, une étude clinique montrait que les individus présentant un intervalle QT inférieur à 400 ms avaient 2,4 fois plus de risques de mort subite par rapport aux individus ayant un intervalle QT compris entre 400 et 440 ms (Algra et al., 1993). Dans une autre étude réalisée en 1995, Fei et Camm montrèrent que l'intervalle QT est raccourci lors de l'apparition de FV idiopathiques (Fei & Camm, 1995). Gussak et coll. ont été les premiers à décrire le raccourcissement de l'intervalle QT comme une entité clinique dans une étude réalisée sur 3 patients issus d'une même famille (Gussak et al., 2000). En 2003, le lien définitif entre

l'intervalle QT raccourci et la mort subite cardiaque était démontré dans une étude réalisée sur 6 patients issus de deux familles présentant des intervalles QT courts, des syncopes et une histoire familiale de mort subite (Gaita *et al.*, 2003).

III.2.2 – Epidémiologie et description clinique

Le SQTC est défini comme un désordre héréditaire de l'activité électrique cardiaque caractérisé par un raccourcissement de l'intervalle QT à l'ECG et par l'augmentation des risques de tachyarythmies ventriculaires et/ou auriculaires. Physiologiquement, la durée de l'intervalle QT diminue avec l'augmentation de la fréquence cardiaque. Les patients atteints du SQTC n'ont plus cette adaptabilité et l'utilisation de la formule de Bazett ($QT_c = QT / \sqrt{RR}$) pour le calcul de l'intervalle QT corrigé est inadaptée. En effet, quand la fréquence cardiaque d'un patient est élevée, les cliniciens utilisant la formule de Bazett auront tendance à surestimer la valeur de l'intervalle QT, alors qu'ils la sous-estimeront pour des fréquences cardiaques faibles. Même si aucun consensus n'a été établi, on parle d'intervalle QT raccourci quand celui-ci devient inférieur à 360 ms et d'intervalle QT court lorsqu'il est inférieur à 320 ms (Viskin, 2009). La présence d'un intervalle QT court à l'ECG ne suffit pas à elle seule à diagnostiquer un SQTC. En effet, le raccourcissement de l'intervalle QT peut être secondaire à d'autres facteurs que des facteurs génétiques tels que l'acidose, l'hyperkaliémie, l'hypercalcémie, l'hyperthermie, la tachycardie, le surdosage en digitalique ou encore de l'administration d'acétylcholine ou de catécholamines. Il faut que l'intervalle QT court soit accompagné de fibrillations atriales ou ventriculaires, de syncopes ou d'une histoire familiale de mort subite pour diagnostiquer un SQTC. En plus de l'intervalle QT raccourci, les patients présentent un ECG particulier avec une onde T haute, étroite et symétrique dans les dérivations précordiales qui peut débiter dès la fin du complexe QRS, effaçant ainsi le segment ST (figure 20). Le SQTC est une pathologie extrêmement rare puisque seuls 41 cas ont été référencés dans la littérature jusqu'à ce jour. L'incidence d'un intervalle QT raccourci (<350 ms) est estimée entre 0.01% et 2.5% dans la population générale (Anttonen *et al.*, 2007; Moriya *et al.*, 2007).

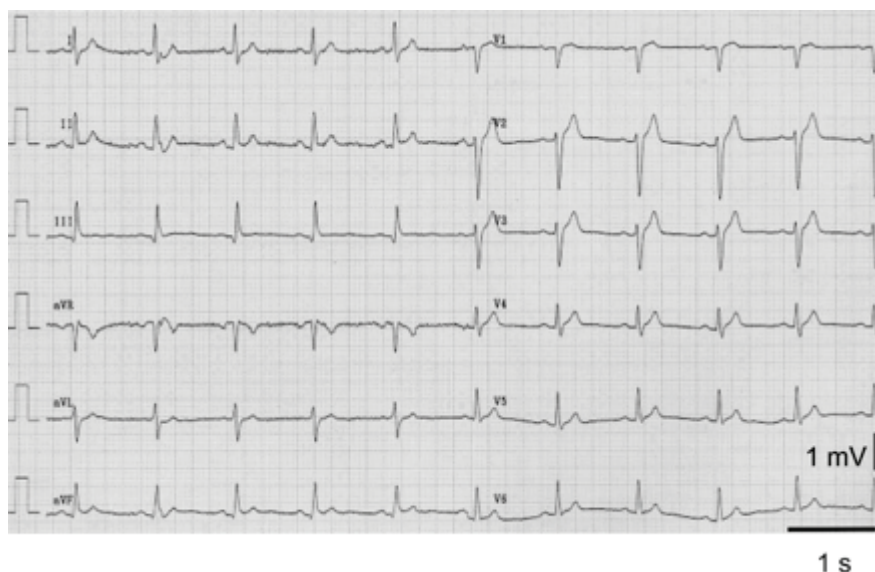


Figure 20 - Electrocardiogramme d'un patient atteint du syndrome du QT court

D'après (Bellocq et al., 2004)

III.2.3 – Facteurs génétiques

Le SQTC est une pathologie génétique hétérogène. Des mutations de 6 gènes différents ont été associées au SQTC donnant lieu à une classification des différentes formes de SQTC nommées SQT1 à SQT6 dans l'ordre chronologique de leur découverte (tableau XI). Le mode de transmission de la pathologie est autosomique dominant.

Tableau XI - Gènes responsables du syndrome du QT court

Type	Gène	Protéine	Courant ionique affecté	Référence
SQT1	<i>KCNH2</i>	HERG	g-f I_{Kr}	(Brugada <i>et al.</i> , 2004)
SQT2	<i>KCNQ1</i>	K_vLQT1	g-f I_{Ks}	(Bellocq <i>et al.</i> , 2004)
SQT3	<i>KCNJ2</i>	$K_{ir2.1}$	g-f I_{K1}	(Priori <i>et al.</i> , 2005)
SQT4	<i>CACNA1C</i>	Cav1.2	p-f $I_{Ca,L}$	(Antzelevitch <i>et al.</i> , 2007)
SQT5	<i>CACNB2b</i>	$Ca_v\beta 2b$	p-f $I_{Ca,L}$	(Antzelevitch <i>et al.</i> , 2007)
SQT6	<i>CACNA2D1</i>	$Ca_v\alpha 2\delta 1$	p-f $I_{Ca,L}$	(Templin <i>et al.</i> , 2011)

g-f, gain-de-fonction ; p-f, perte-de-fonction ; I signifie courant.

Le gène *KCNH2* code pour la sous-unité α du canal HERG (*human-ether-go-go-related-gene*) responsable du courant rectifiant à activation retardée I_{Kr} . C'est dans ce gène que la première mutation responsable du SQTC a été identifiée (Brugada *et al.*, 2004). Par une approche gène-candidat, Brugada et coll. ont reporté deux mutations conduisant au même changement d'acide-aminé (N588K) dans ce gène. Cette mutation provoque un gain de fonction du courant I_{Kr} par une modification des propriétés biophysiques du canal HERG.

La conséquence est un raccourcissement du PA ventriculaire et de la période réfractaire. La même année, une étude menée en collaboration l'équipe d'A. Wilde à Amsterdam et notre laboratoire a permis de lier un deuxième gène au SQTC par l'identification de la mutation V307L de la protéine canal K_vLQT1 (Bellocq *et al.*, 2004). Cette mutation provoque un gain de fonction du courant I_{Ks} par une modification de ses propriétés biophysiques (décalage de la courbe d'activation vers des potentiels plus négatifs, accélération des cinétiques d'activation). Le troisième gène lié au SQTC a été identifié en 2005 par la mise en évidence de la mutation gain de fonction D172N du canal rectifiant entrant $K_{ir}2.1$ responsable du courant I_{K1} (Priori *et al.*, 2005).

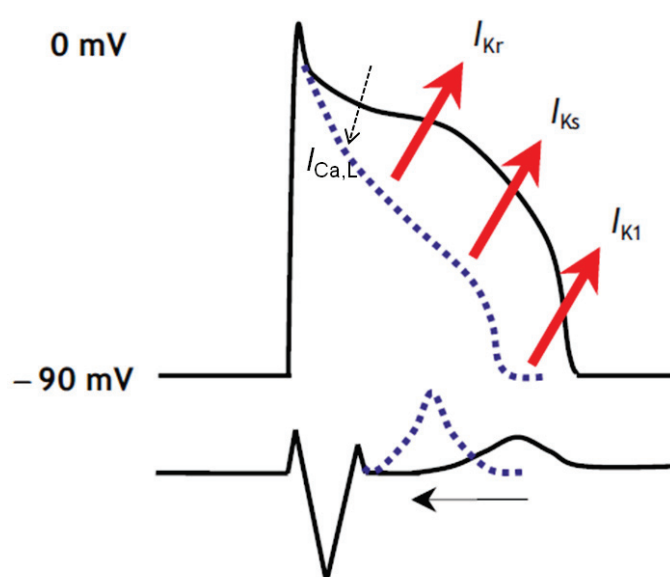


Figure 21 – Potentiel d'action ventriculaire d'un patient atteint du syndrome du QT court

Les flèches rouges représentent le gain-de-fonction des courants potassiques et la flèche pointillée la perte de fonction du courant calcique. La durée du PA se raccourcit et l'intervalle QT diminue. *I* signifie courant. Modifié d'après (Brugada *et al.*, 2005).

Ces trois premières études ont permis de mettre en évidence le rôle majeur des canaux potassiques dans le maintien de la durée de l'intervalle QT. En 2007, un autre canal a été associé au SQTC, il s'agit du complexe canalaire calcique $Ca_v1.2$ (Antzelevitch *et al.*, 2007). Dans cette étude, 3 mutations sur les gènes *CACNA1C* (p.A39V et p.G490R) et *CACNB2b* (p.S481L) ont été rapportées chez des patients présentant un SBr en plus du raccourcissement de l'intervalle QT. Ces trois mutations causent une perte de fonction du courant $I_{Ca,L}$ responsable du raccourcissement de la durée du PA. La mutation A39V provoque de plus un défaut de trafic du canal à la surface cellulaire. Enfin, récemment, une autre des sous-unités régulatrices du canal $Ca_v1.2$ a été associée au SQTC, la sous-unité

$\alpha 2\delta 1$ (Templin *et al.*, 2011). La mutation S755T provoque une perte de fonction du courant $I_{Ca,L}$.

L'augmentation d'un courant potassique sortant ou la diminution du courant calcique entrant conduit à l'accélération de la repolarisation du PA ventriculaire et ainsi à la diminution de l'intervalle QT à l'ECG (figure 21).

III.2.4 – Traitements

Le SQTC étant une pathologie hétérogène avec une variation des symptômes et du risque de mort subite, il est encore difficile de proposer une thérapie efficace. Etant donné la forte incidence de mort subite cardiaque chez les patients atteints du syndrome, il est fortement recommandé d'implanter un DEF. Cependant, les patients sont parfois de très jeunes enfants chez lesquels l'implantation d'un DEF devient un défi pour 2 raisons : leurs cœurs sont très petits, l'accès vasculaire est difficile et il faut prévoir la croissance de l'enfant (Boriani *et al.*, 2006). De plus, la grande amplitude de l'onde T conduit le DEF implanté à délivrer des chocs inadaptés au patient constituant un risque proarythmique majeur et un stress psychologique potentiel chez la personne implantée. De ce fait, la thérapie pharmacologique apparaît comme une bonne alternative. La quinidine est le seul agent pharmacologique capable de réadapter la durée de l'intervalle QT au rythme cardiaque (Gaita *et al.*, 2004). De nombreuses autres molécules (bloqueurs des courant I_{Kr} , I_{Ks} , bloqueurs des canaux sodiques...) ont été testées mais sans succès. Malgré le faible nombre de patients et le manque de compréhension du mécanisme d'action de la quinidine, son utilisation semble être un bon complément à l'implantation d'un DEF.

III.3 – Les troubles de la conduction auriculo-ventriculaire

III.3.1 - Description clinique

Les troubles de la conduction appartiennent à un groupe de pathologies provoquant une altération de la conduction cardiaque au niveau du NAV ou du réseau de Purkinje par la présence d'un bloc de branche gauche ou droit et d'un allongement du complexe QRS à l'ECG. Les TdC peuvent être d'une gravité variable allant d'un simple ralentissement (bloc incomplet) à une interruption complète de la dépolarisation des cellules (bloc complet). La présence d'un bloc complet peut conduire à des épisodes de syncope voire à la mort subite de l'individu. En effet, les ventricules sont alors isolés des oreillettes, et ce sont donc les cellules du NAV qui prennent le relai pour imposer le rythme aux ventricules, on parle alors d'échappement jonctionnel ou ventriculaire selon la localisation du bloc ou de l'échappement. Une bradycardie inadaptée est alors observée nécessitant l'implantation d'un stimulateur cardiaque (« *pacemaker* ») afin de prévenir les risques de syncope et de mort

subite. Les BAV peuvent siéger au niveau du NAV (bloc nodal), du tronc du faisceau de His (bloc infra-hissien), ou des branches droites et gauches du faisceau de His (BB). Plus le bloc complet siègera bas, plus le rythme sera faible et le BAV sévère. Les principales complications sont l'insuffisance cardiaque due à la bradycardie, les syncopes pouvant aller jusqu'à la mort de l'individu dues aux pauses ventriculaires prolongées ou aux torsades de pointes pouvant dégénérer en FV.

L'étiologie des TdC est dans la majorité des cas inconnue. Ils peuvent être acquis ou secondaires à une cardiopathie, à une valvulopathie, à une chirurgie cardiaque ou idiopathiques. Parmi les formes idiopathiques, on distingue les BAV congénitaux et la forme progressive des TdC.

Les TdC progressifs sont également connus sous le nom de maladie de Lenegre (Lenegre, 1964) ou maladie de Lev (Lev, 1964) qui ont été les premiers à faire une description complète de cette pathologie (ECG, observations cliniques, étude *post-mortem* des cœurs des patients). La maladie de Lenegre-Lev provoque une altération progressive de la conduction cardiaque par une atteinte du réseau de His-Purkinje. Les patients présentent un BB droit ou gauche et un élargissement du complexe QRS à l'ECG évoluant vers un bloc complet. Cette pathologie est la cause majeure d'implantation de *pacemaker* dans le monde (0.15 implantations pour 1000 personnes par an dans les pays développés). D'origine inconnue, elle est considérée comme une maladie dégénérative exagérée avec le vieillissement provoquant la fibrose du tissu de conduction.

III.3.2 – Facteurs génétiques

Même si la maladie de Lenegre-Lev est considérée comme une pathologie du vieillissement, plusieurs formes familiales ont été décrites et suggèrent l'intervention de facteurs héréditaires. A l'heure actuelle, 3 gènes ont été décrits dans les TdC. Ce sont les gènes *TRPM4*, codant pour un canal cationique non sélectif calcium-dépendant, *SCN5A* et *SCN1B*, décrits précédemment. En 1995, un premier locus a été lié à un phénotype de TdC retrouvé chez deux familles libanaise et sud-africaine (Brink *et al.*, 1995; de Meeus *et al.*, 1995). Il s'agit du locus 19q13.3 auquel aucune mutation de gène n'a été associée à l'époque. Il a fallu attendre 2009 pour qu'une mutation du gène *TRPM4* soit mise en évidence dans la famille sud-africaine (Kruse *et al.*, 2009), puis 2010 pour la famille libanaise (Liu *et al.*, 2010). Ces deux études montrent un gain de fonction de la protéine TRPM4. L'étude de 2009 montre également une expression plus abondante de TRPM4 WT dans les fibres de Purkinje que dans les autres tissus cardiaques, appuyant ainsi l'implication de ce canal dans la conduction cardiaque.

Le premier gène lié aux TdC a été identifié en 1999 par l'équipe de génétique de notre laboratoire dans une forme familiale autosomique dominante dégénérative (Schott *et al.*, 1999). Il s'agit du gène *SCN5A* déjà connu à l'époque pour son implication dans le SQTL et le SBr. L'étude a été réalisée sur deux familles dont une grande famille française (d'environ 150 personnes) présentant 15 membres atteints de TdC. La mutation du gène *SCN5A* mise en évidence ségrège chez tous les patients de la famille. Cette mutation provoque une perte de fonction du canal sodique par l'expression d'un canal non fonctionnel à la surface cellulaire. La deuxième famille étudiée dans ces travaux est une famille néerlandaise chez laquelle une autre mutation du gène *SCN5A*, ségrégeant parfaitement avec le phénotype, a été mise en évidence. Suite à cette première étude, de nombreux autres travaux sont venus renforcer le rôle de *SCN5A* dans les TdC cardiaques (Schott *et al.*, 1999; Tan *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002; Bezzina *et al.*, 2003; Probst *et al.*, 2003). Toutes les mutations décrites provoquent une perte de fonction du canal $\text{Na}_v1.5$ due soit à une diminution de son expression à la surface cellulaire, soit à son absence de fonction, soit à une modification de ses propriétés biophysiques.

Enfin, deux mutations ont été mises en évidence dans le gène *SCN1B* (codant pour la sous-unité $\beta 1$ des canaux sodiques cardiaques) chez trois familles présentant des TdC (Watanabe *et al.*, 2008). Les deux mutations provoquent une diminution du courant I_{Na} . Cette étude montre également une expression préférentielle de la sous-unité $\beta 1$ dans les fibres de Purkinje appuyant le rôle primordial du canal $\text{Na}_v1.5$ dans la physiopathologie des TdC.

III.4 – Les syndromes chevauchants

Le SBr, les TdC et le SQTC ont initialement été considérés comme des entités cliniques séparées. Cependant, sur un plan moléculaire ils possèdent des zones de chevauchement. Plusieurs études portant sur le gène *SCN5A* font état de différents phénotypes pour une même mutation. Plus surprenant encore, ce phénomène peut se rencontrer au sein d'une même famille (Kyndt *et al.*, 2001).

L'association phénotypique la plus surprenante est celle du SBr et du syndrome du QT long de type 3 (SQTL3). En effet, les mutations *SCN5A* décrites dans le SBr provoquent toutes une perte de fonction du courant I_{Na} alors que dans le cas du SQTL3, ce sont des mutations gain-de-fonction qui ont été décrites. Plusieurs études portant sur la mutation provoquant l'insertion d'un acide aspartique (D) en position 1795 dans la séquence protéique du canal $\text{Na}_v1.5$ (1795insD) ont montré qu'à elle seule la mutation est suffisante pour expliquer les différents phénotypes (Bezzina *et al.*, 1999; Veldkamp *et al.*, 2000; Clancy & Rudy, 2002; Remme *et al.*, 2006). En utilisant un modèle informatique de PA cardiaques, Clancy et Rudy ont suggéré que pour des fréquences basses de stimulation, la durée du PA

des cellules M mutées est allongée, ce qui peut expliquer l'apparition d'un SQTL à basse fréquence cardiaque. En augmentant la fréquence de stimulation, ils observent alors une diminution de la disponibilité des canaux sodiques et donc une diminution du courant I_{Na} provoquant une perte du plateau du PA. Ce phénomène va augmenter l'hétérogénéité de la repolarisation entre les différentes couches musculaires cardiaques et pourra donc être responsable d'un aspect de SBr à l'ECG (Clancy & Rudy, 2002). Un peu plus tard, Remme et coll. ont utilisé un modèle de souris transgéniques hétérozygotes pour la mutation 1795insD de $Na_v1.5$ (Remme *et al.*, 2006). Ils observent une dysfonction sinusale chez ces souris, un allongement des intervalles PQ, QT et du complexe QRS ainsi qu'un ralentissement de la conduction dans le ventricule droit. Par des expériences de patch-clamp réalisées sur les cardiomyocytes ventriculaires de ces souris, ils mettent en évidence une prolongation de la phase de repolarisation du PA surtout à faible fréquence de stimulation et une diminution de la disponibilité des canaux sodiques à haute fréquence. Ils montrent de plus une diminution de la densité de courant I_{Na} , un retard de l'inactivation rapide ainsi que la présence d'un petit courant sodique persistant. Ces différentes observations permettent d'expliquer la coexistence des 2 phénotypes SBr et SQTL chez les patients porteurs de la mutation 1795insD du canal $Na_v1.5$.

Cette association phénotypique n'est pas la seule connue pour le gène *SCN5A*. En effet de nombreuses mutations de ce gène ont été liées à une association de phénotypes chevauchants comme par exemple :

- SBr + SQTL3 + dysfonction sinusale
- SBr + SQTL3 + TdC
- SBr + SQTL3 + dysfonction sinusale + TdC
- SBr + dysfonction sinusale
- SBr + paralysie atriale
- SBr + TdC
- SQTL3 + TdC

Lorsque l'on regarde la répartition des mutations du canal $Na_v1.5$, on constate qu'il n'existe pas de région spécifiquement associée à un phénotype. Ceci rend la prédiction du risque cardiaque associé à la mutation difficile (Figure 22).

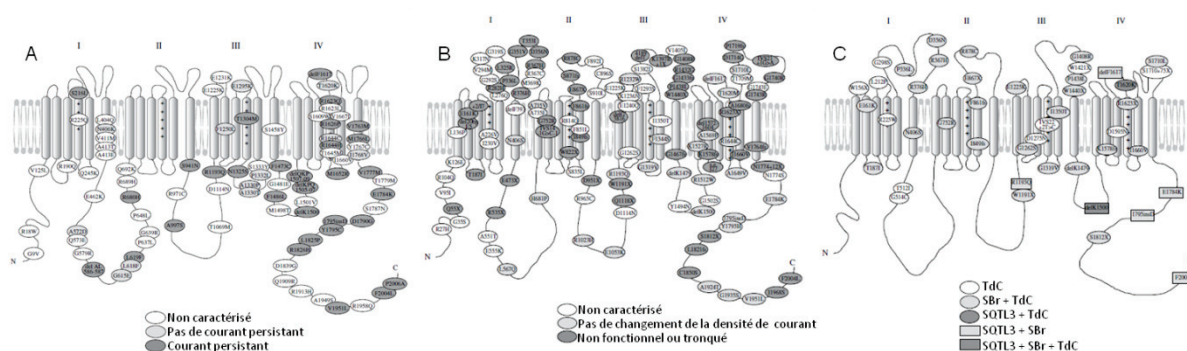


Figure 22 - Représentation schématique du canal sodique $Na_v1.5$ et de ses mutations associées à leurs phénotypes

(A) Mutations du canal sodique $Na_v1.5$ associées au syndrome du QT long de type 3. (B) Mutations du canal sodique $Na_v1.5$ associées au syndrome de Brugada. (C) Mutations du canal sodique $Na_v1.5$ associées aux troubles de la conduction et à des syndromes chevauchants. SBr, syndrome de Brugada, TdC, troubles de la conduction, SQT3, syndrome du QT long de type 3. Modifié d'après (Zimmer & Surber, 2008).

L'étude menée par Antzelevitch en 2007 sur le canal calcique $Ca_v1.2$ a également montré l'implication du gène *CACNA1C* chez des patients présentant un SBr seul ou accompagné d'un raccourcissement de l'intervalle QT à l'ECG (Antzelevitch *et al.*, 2007).

L'ensemble de ces observations met en avant le risque de surinterprétation des propriétés biophysiques de certaines mutations quand elles se basent seulement sur des études en systèmes de réexpression hétérologue. De plus l'existence de ces syndromes chevauchants augmente la difficulté pour les cliniciens à choisir un traitement adapté. En effet, un traitement à la flécainide (antiarythmique de classe Ic, bloqueur des canaux sodiques) pour diminuer la durée de l'intervalle QT chez des patients atteints d'un SQT3 peut déclencher une surélévation du segment ST caractéristique du SBr et en conséquence augmenter le risque pour le patient de développer des arythmies ventriculaires (Priori *et al.*, 2000).

IV – Objectifs de la thèse

Ces dernières années, de grandes avancées ont été faites dans la compréhension des arythmies cardiaques et la prise en charge des patients. Cependant, dans 30 à 45% des cas, le mécanisme physiopathologique reste à mettre en évidence. Que ce soit dans le cas du syndrome de Brugada ou du syndrome du QT court, une forte hétérogénéité génétique a été décrite. De même, un même gène peut être responsable de différentes pathologies. C'est dans ce contexte, qu'au cours de mon travail de thèse, je me suis intéressée à la mise en évidence de nouveaux mécanismes dans la physiopathologie des troubles du rythme et de la conduction cardiaques.

Mon premier travail a porté sur l'étude d'une nouvelle arythmie cardiaque provoquant des contractions ventriculaires prématurées ayant pour origine des foyers ectopiques au niveau des fibres de Purkinje. Dans les trois familles étudiées, le variant R222Q de la protéine $Na_v1.5$ a été identifié. Le projet a consisté à évaluer l'effet du variant sur l'activité du canal $Na_v1.5$ et d'étudier son implication dans l'apparition de cette nouvelle arythmie par la mise au point d'un nouveau modèle multicellulaire informatique.

Dans un deuxième projet, j'ai travaillé sur l'étude d'une famille associant des mutations des gènes *SCN5A*, codant pour le canal sodique $Na_v1.5$, et *CACNA1C*, codant pour le canal calcique $Ca_v1.2$ et les phénotypes de syndrome de Brugada, syndrome du QT court et troubles de la conduction. Cette étude a permis d'évaluer la morbidité de la mutation du canal $Ca_v1.2$ et d'étudier sa corrélation avec les phénotypes observés dans la famille.

Enfin, dans un dernier projet, j'ai travaillé sur une famille atteinte du syndrome du QT court associé à un déficit primaire en carnitine. Dans cette famille, des variants des gènes *OCTN2*, codant pour un transporteur de la carnitine et *CACNA1C* ont été mis en évidence, suggérant un nouveau mécanisme moléculaire. Ce projet a permis d'évaluer l'effet du variant du canal $Ca_v1.2$ et d'étudier sa régulation par la carnitine.

II. MATERIEL ET METHODES

Dans cette partie sont exposés les protocoles des différentes techniques que j'ai utilisées au cours de ma thèse. Les protocoles relatifs aux autres techniques (analyse de mutation, analyse d'haplotype, modélisation mathématique...) sont présentés plus succinctement dans les manuscrits des articles.

I – Biologie moléculaire

I.1 – Mutagenèse dirigée

I.1.1 – Principe général

La mutagenèse dirigée permet d'induire une ou plusieurs mutations dans un gène de façon précise et volontaire. Dans un premier temps, la séquence à modifier est insérée dans un plasmide. Par PCR, le couple d'amorces contenant la (ou les) mutation(s) désirée(s) vont être allongées, et permettront ainsi d'obtenir des plasmides "linéarisés", identiques au plasmide parental mais contenant la (ou les) mutations. La PCR va ensuite permettre d'amplifier le plasmide muté.

La mutagenèse dirigée basée sur la PCR présente différents avantages : (i) un haut rendement ; (ii) le faible risque de former des structures secondaires (grâce aux températures élevées) qui pourraient réduire l'efficacité de la polymérisation de l'ADN. Les limites principales de cette technique sont : (i) le risque que certaines polymérases fassent des fautes, pour cela il est préférable d'utiliser la Pfu plutôt que la Taq ; (ii) les conditions de la PCR doivent être mises au point pour chaque nouveau couple d'amorces et pour chaque nouvelle matrice ; (iii) les fragments longs sont parfois difficiles à amplifier (> 2-3 kb).

I.1.2 - Protocole

Des expériences de mutagenèse dirigée ont été réalisées afin d'obtenir les mutations ponctuelles à étudier sur la protéine Ca_v1.2 dans le cadre des projets 1 et 2. Les mutations réalisées sont c.898A>G (p.N300D) pour le projet 1 et c.667G>C (p.A223P) pour le projet 2, sur les plasmides pCDNA3-hCACNA1C et pCDNA3-CACNA1C-(eYFP)N α 1c,77. La mutagenèse dirigée a été effectuée selon le protocole du kit « QuickChange II XL site-directed » (Stratagene, USA). Les constructions ont ensuite été complètement séquencées afin de s'assurer qu'aucune autre mutation n'ait été introduite (plateforme génomique de Nantes, SFR Santé F Bonamy).

Tableau XII – Primers utilisés lors de la mutagenèse dirigée du gène *CACNA1C*

	Primers séquence (5' → 3')	
	Sens	Antisens
Mutation p.N300D (C.898 A>G)	882- GCACAAGACCTGCTAC G ACCAGGAGGG CATAGC -914	914- GCTATGCCCTCCTGGT C GTAGCAGGTCTT GTGC -882
Mutation p.A223P (C.667 G>C)	648- CAAAGCAGATGGGGCAAAC C CTCTCGGA GGGAAAGGGGC -686	686- GCCCCTTCCCTCCGAGAG G GTTTGCCCC ATCTGCTTTG- 648

I.2 – Transformation bactérienne et purification de l'ADN plasmidique

I.2.1 – Principe général

La transformation de bactéries sensibles à un antibiotique par des plasmides portant un gène de résistance au même antibiotique aboutit à l'apparition d'une résistance uniquement pour les bactéries ayant incorporé les plasmides. Cette technique permet de séparer les bactéries comportant les plasmides d'intérêt des bactéries sans plasmides car ces dernières sont tuées.

I.2.2 - Protocole

Un aliquot de 40 µl de bactéries XL1 compétentes est décongelé sur glace. Un volume de 2 µl de solution contenant 50 ng de plasmide est ajouté et le mélange est déposé dans une cuve d'électroporation que l'on insère ensuite dans un électroporateur (Biorad). Un choc électrique de 1,5 kV est appliqué. La suspension bactérienne est ensuite récupérée et 1ml de milieu LB est ajouté. Pour une préculture d'1 h sous agitation à 37°C, 150 et 800 µl de la préculture sont ensuite étalés sur boîtes de pétri contenant du milieu LB solide et l'antibiotique de sélection puis sont incubées pendant une nuit à 37°C. Seules les bactéries ayant intégré le plasmide contenant le gène de sélection pourront pousser et former des colonies.

Afin de purifier l'ADN plasmidique, le lendemain, une colonie est prélevée et ensemencée dans 100 ml de LB puis incubée à 37°C sous agitation pendant 8 heures. La culture est ensuite centrifugée à 3800 rpm pendant 15 mn à 4°C. Nous utilisons ensuite les kits prêts à l'emploi de Macherey-Nagel : Nucleobond® Xtra pour les Midi-prep et Nucleospin® plasmid pour les Mini-prep.

Afin de vérifier la pureté du mélange plasmidique obtenu après une Mini-prep ou une Midi-prep, nous réalisons une électrophorèse sur gel d'agarose 1% dans le TAE 0,5%. Les

préparations sont ensuite complètement séquencées afin de s'assurer qu'aucune mutation n'ait été introduite (plateforme génomique de Nantes, SFR Santé F Bonamy).

II - Modèles biologiques

Au cours de ma thèse, j'ai travaillé sur 2 types de lignées cellulaires : la lignée COS-7 et la lignée HEK-tsA 201. Dans le cadre du projet « Syndrome du QT court associé à un déficit primaire en carnitine : nouveau mécanisme », j'ai d'abord utilisé la lignée HEK-tsA 201 comme modèle cellulaire pour exprimer des plasmides codant pour les protéines du complexe canalaire $Ca_v1.2$ de rat. Au cours de cette étude, cette lignée et le mode de transfection au JetPEI (Polyplus Transfection) donnaient les meilleurs résultats. Suite à de nombreuses difficultés rencontrées lors des expériences de patch clamp et de biochimie, nous avons décidé d'opter pour les plasmides codant pour les protéines du complexe canalaire $Ca_v1.2$ humaines. Après une mise au point expérimentale, ce sont la lignée COS-7 et la transfection au FuGENE® 6 (Promega) qui ont été les plus efficaces et qui ont donc été sélectionnés pour la suite des expérimentations. Dans le cadre des projets 1 et 2, j'ai également utilisé la lignée cellulaire COS-7 et la transfection au FuGENE® 6.

II.1 – Lignées cellulaires

Les expériences sont réalisées sur des lignées cellulaires de mammifères transfectées. Elles présentent l'avantage d'une multiplication presque infinie et peuvent ainsi être cultivées en permanence au laboratoire à partir d'un échantillon. Au cours de ma thèse, j'ai utilisé deux types de lignées cellulaires : la lignée COS-7 et la lignée HEK-tsA-201.

La lignée COS-7 est issue de fibroblastes de rein de singe vert d'Afrique immortalisés par transformation avec l'antigène T d'un mutant du virus simien SV40 (Gluzman, 1981). Cette lignée constitue un système d'étude plus simple qu'un organe ou un organisme entier permettant de s'affranchir de toute influence venant de l'environnement des cellules (hormones, neurotransmetteurs...). Du fait de l'absence ou du très faible niveau de courants sodique et calcique dépendants du potentiel endogènes, cette lignée est utilisée comme système d'expression hétérologue des canaux Ca^{2+} et Na^+ .

La lignée HEK-tsA-201 est issue de cellules embryonnaires humaines de rein, qui comme pour la lignée COS-7 est immortalisée par transformation avec l'antigène T d'un mutant du virus simien SV40. Cette lignée est utilisée comme système d'expression hétérologue des canaux calciques du fait de l'absence de courant calcique dépendant du potentiel endogène.

II.2 – Milieux de culture

Chaque lignée est entretenue dans des flasques en plastique de 25 cm² dans un incubateur humidifié à 37°C, en présence de 5% de CO₂. Le milieu de culture de la lignée HEK-tsA-201 est composé de DMEM (*Dubelco's Modified Eagle Medium*, Gibco BRL) supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal et de 2 mM de L-Glutamine. Pour la lignée COS-7, 100 UI/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine sont ajoutés au milieu de culture utilisé pour la lignée HEK-tsA-201. Le milieu de culture est changé tous les 2 jours.

II.3 – Repiquage

Chaque lignée cellulaire est repiquée quand les cellules ont atteint 80 à 90% de confluence. Le repiquage est réalisé suivant 5 étapes :

- Le milieu de culture de la flasque est remplacé par 2 ml de tampon PBS/EDTA (Phosphate Buffered Saline/ EthyleneDiamine Tetraacetic Acid) contenant du NaCl (137 mM), KCl (2,7 mM), Na₂HPO₄ (8 mM), KH₂PO₄ (1,5 mM), 0,1% d'EDTA.
- Afin de détacher les cellules de leur support, le tampon est remplacé par 1 ml d'une solution à 0,25% de trypsine, solubilisée dans le tampon PBS/EDTA, laissée pendant 2 minutes à l'incubateur. L'action enzymatique est arrêtée par addition de 4 ml de milieu de culture.
- Après centrifugation à 9 000 tr/min pendant 3 minutes, les cellules sont mécaniquement individualisées grâce au cisaillement crée par l'aspiration et l'éjection à l'aide d'une pipette.
- La concentration en cellules de cette suspension est estimée sur une lame de Malassez après coloration au bleu trypan 0.05%. Le taux d'ensemencement est ensuite adapté au type d'expérience et au support.

Repiquage après repiquage, les cellules perdent certaines caractéristiques morphologiques et fonctionnelles. Il faut alors renouveler la culture à partir de stocks conservés dans l'azote liquide.

II.4 – Transfection

II.4.1 – Par la polyéthylénimine

Les cellules de la lignée HEK-tsA-201 sont transfectées lorsqu'elles atteignent 50 à 60% de confluence. Cette lignée a été utilisée pour le projet 3 (Syndrome du QT court associé à un déficit primaire en carnitine : nouveau mécanisme). Les plasmides utilisés sont :

- pcDNA3-rCav1.2-HA codant pour le canal calcique sauvage (WT, *Wild type*) Ca_v1.2 de rat tagué HA.

- pCDNA3-rCav1.2-A253P-HA. Ce plasmide code pour le canal calcique $Ca_v1.2$ du rat muté A253P. Cette mutation est similaire à la mutation A223P retrouvée chez l'homme.
- pMT2- $\alpha 2\delta 1b$ codant pour la sous-unité $\alpha 2\delta 1b$ de rat.
- pMT2-r $\beta 2a$ codant pour la sous-unité $\beta 2a$ de rat.
- pIRES-CD8 qui permet le repérage des cellules transfectées à l'aide de billes couplées à des anticorps anti-CD8 (Dynabeads CD8, Invitrogen) au cours des expériences de patch-clamp.

Les cellules sont transfectées en utilisant le JetPEI (Polyplus Transfection). L'agent actif est une polyéthylénimine qui s'associe aux molécules d'ADN et forme des particules susceptibles d'être endocytées par les cellules. Pour une boîte de Pétri de 35 mm de diamètre contenant des cellules HEK-tsA-201 à une confluence de 60%, deux tubes Eppendorf sont préparés séparément, ils contiennent :

- 1) 6.8 μ L de JetPEI + 78.2 μ L de NaCl (150 mM)
- 2) 3.4 μ g de plasmides *qsp* 85 μ L de solution NaCl (150 mM)

Les deux tubes sont mélangés. Afin de permettre le compactage de l'ADN par le JetPEI, le mélange est laissé 20 minutes environ à température ambiante puis déposé sur les cellules dans 2 mL de milieu de culture et laissé pendant 48 heures dans l'incubateur. Pour certaines expériences (patch-clamp, biologie cellulaire), les cellules doivent être isolées, un repiquage est donc réalisé selon le protocole présenté précédemment. Elles sont ensuite utilisées 3 à 4 jours après la transfection. Les proportions plasmidiques utilisées dans cette étude sont les suivantes :

- 1 μ g de plasmide pCDNA3-rCav1.2-HA ou pCDNA3-rCav1.2-A253P-HA. La séquence du peptide codant un tag HA a été insérée au niveau de la séquence de la boucle extracellulaire de $Ca_v1.2$ entre le domaine S5 et S6 du domaine II :
681-EMQTA**HYPYDVPDY**AVTFDE-700 (la séquence du tag HA est signalée en gras ; donné par Emmanuel Bourinet, CNRS UMR 5203, INSERM U661, université de Montpellier 1 et 2);
- 1 μ g de plasmide pMT2-r $\beta 2a$;
- 1 μ g de plasmide pMT2- $\alpha 2\delta 1$;
- 0,4 μ g de plasmide pIRES-CD8.

II.4.2 – Par le FuGENE® 6

Les cellules de la lignée COS-7 sont transfectées lorsqu'elles atteignent 50 à 60% de confluence. Cette lignée a été utilisée pour les 3 projets réalisés au cours de ma thèse. Les plasmides utilisés ainsi que les proportions utilisées sont résumés dans le tableau XIII. Les

cellules sont transfectées par le FuGENE ® 6 (Promega) qui est un mélange de lipides cationiques. Comme pour le JetPEI, les lipides cationiques vont s'associer aux molécules d'ADN et former des particules qui seront susceptibles d'être endocytées par les cellules. Pour une boîte de Pétri de 35 mm de diamètre contenant des cellules COS-7 à une confluence de 60%, deux tubes Eppendorf sont préparés séparément, ils contiennent :

- 1) 2 μ L de FuGENE par μ g d'ADN *qsp* 100 μ L de NaCl (150 mM)
- 2) 3,4 μ g de plasmides *qsp* 100 μ L de NaCl (150 mM)

Les deux tubes sont mélangés. Afin de permettre le compactage de l'ADN par le FuGENE, le mélange est laissé 20 minutes environ à température ambiante puis déposé sur les cellules dans 2 mL de milieu de culture et laissé pendant 48 heures dans l'incubateur. Pour certaines expériences (patch-clamp, biologie cellulaire), les cellules doivent être isolées, un repiquage est donc réalisé selon le protocole présenté précédemment. Elles sont ensuite utilisées 3 à 4 jours après la transfection.

Tableau XIII – Proportions plasmidiques utilisées pour les transfections par le FuGENE ® 6 au cours de mes projets de thèses

Plasmide	Protéine	Projet 1		Projet 2	Projet 3
		FRAP	Autres techniques		
pCDNA3-hCACNA1C	Ca _v 1.2 humain WT		30%	30%	
pCDNA3-hCACNA1C-N300D	Ca _v 1.2 humain muté N300D		30%		
pCDNA3-hCACNA1C-A223P	Ca _v 1.2 humain muté A223P			30%	
pCDNA3-CACNA1C-(eYFP)Na _{1c} ,77	Ca _v 1.2 humain fusionné en N-terminal à une YFP	33%			
pCDNA3-CACNA1C-N300D-(eYFP)Na _{1c} ,77	Ca _v 1.2 humain muté N300D, fusionné en N-terminal à une YFP	33%			
pCDNA3-hCACNB2b	Ca _v 1.2 β 2b humain	33%	30%	30%	
pCDNA3-hCACNA2D1	Ca _v 1.2 α 2 δ 1 humain	33%	30%	30%	
pIRES-CD8	CD8, gène rapporteur		10%	10%	
pCI-hSCN5A	Na _v 1.5 humain WT				5 ou 10%
pCI-hSCN5A-R222Q	Na _v 1.5 humain R222Q				5 ou 10%
pRC-h β 1	Na _v 1.5 β 1 humain				10%
pEGFP	GFP, gène rapporteur				80%

WT, wild type ; YFP, yellow fluorescent protein ; GFP, green fluorescent protein. En rouge signifie l'un ou l'autre des plasmides par projet et technique.

III - Patch-clamp

III.1 – Principe et dispositif expérimental

Les trois projets sur lesquels j'ai travaillé ont utilisé la technique de patch-clamp en configuration cellule entière. Cette technique permet d'enregistrer l'ensemble des courants de la cellule. Elle consiste à poser la pointe d'une pipette en verre, dont l'extrémité a un diamètre d'environ 1 μm , sur une membrane cellulaire de telle sorte que le contact pipette/membrane soit électriquement très résistant. Ce contact est augmenté par une légère aspiration exercée à l'intérieur de la pipette. Lorsque la résistance du contact atteint le gigaOhm, le contact est alors appelé "giga-seal". Cette très grande résistance permet une isolation électrique parfaite de l'ensemble pipette-cellule. Le fragment de membrane isolé sous la pipette est ensuite aspiré à l'aide d'une seringue. Après avoir percé la cellule, la résistance entre le milieu intra-pipette et le milieu intracellulaire est très fortement diminué, permettant l'accès électrique au milieu intracellulaire. Le potentiel de membrane est alors imposé et les courants transmembranaires sont enregistrés entre l'électrode placée dans la pipette et celle de référence dans le bain, à l'aide d'un amplificateur de patch-clamp (AxoPatch 200A, Axon Instruments) relié à un ordinateur et en utilisant le logiciel d'acquisition et d'analyse Acquis-1 (Bio-Logic).

III.2 – Solutions

Les cellules transfectées sont immergées dans une solution de Tyrode (en mM : NaCl 145, KCl 4, HEPES 5, MgCl_2 1, CaCl_2 1, glucose 5, pH 7.4 à l'aide du NaOH) renouvelée constamment par un système de perfusion générale et d'aspiration. Cette solution contient les ions du milieu extracellulaire physiologique des cellules.

Pour l'enregistrement des courants calciques, les cellules transfectées sont repérées à l'aide de billes couplées à des anticorps anti-CD8. La cellule sélectionnée est baignée dans une solution extracellulaire (en mM : NaCl 135, TEACl 20, HEPES 10, MgCl_2 1, mannitol 20, pH 7.3 à l'aide du NaOH) calcique (en mM : CaCl_2 2) ou barium (en mM : BaCl_2 5). Le système de micro-perfusion, placé au-dessus de la cellule à analyser permet d'apporter ces solutions sans modifier le milieu dans lequel se trouvent les autres cellules. Le potassium du milieu intracellulaire est substitué par du césium dans le milieu pipette pour supprimer les courants potassiques endogènes (en mM : CsCl 130, HEPES 10, EGTA 10, CaCl_2 2, MgCl_2 1, MgATP 4, TrisGTP 0.3, pH à 7,2 à l'aide du CsOH).

Pour l'enregistrement des courants sodiques, les cellules transfectées sont repérées à l'aide de la GFP (*Green Fluorescent Protein*). La cellule choisie est baignée dans une solution extracellulaire (en mM : NaCl 145, CsCl 4, HEPES 5, MgCl_2 1, CaCl_2 1, glucose 5,

pH 7.4 à l'aide du NaOH, avec 30 μ M de tétródotoxine ou 30 μ M de quinidine selon les expériences). Le potassium du milieu intracellulaire est substitué par du césium dans le milieu pipette pour supprimer les courants potassiques endogènes (en mM : CsCl 64.5, NaCl 10, HEPES 5, acide aspartique 70.5, pH à 7,2 à l'aide du CsOH).

Tous les courants mesurés sont normalisés par la capacitance membranaire. La résistance série et la capacitance sont compensées entre 60 et 70% pour diminuer au maximum leur contribution lors de la mesure du courant.

III.3 – Analyses

Les séquences de stimulation permettant la mesure des courants sont présentées dans les manuscrits et les figures des articles. Les courbes d'activation des courants calciques et sodiques (conductance relative en fonction du potentiel) suivent le décours d'une sigmoïde. Les paramètres $V_{1/2}$ d'activation ($V_{1/2 \text{ act}}$) et k sont calculés par régression non-linéaire de la courbe d'activation selon la fonction de Boltzman :

$$G/G_{\max} = 1 / (1 + \exp(-(V_p - V_{1/2 \text{ act}})/k))$$

Où :

- G , conductance mesurée au potentiel imposé V_p ; $G = I / E_m - E_x$;
- $G_{\max}$, conductance maximale ;
- I , courant mesuré au pic ;
- E_m , potentiel imposé ;
- E_x , potentiel d'inversion de l'ion X.
- V_p , potentiel du pulse ;
- $V_{1/2 \text{ act}}$, potentiel pour lequel la moitié des canaux sont activés ;
- k , constante de Boltzman.

Les courbes d'inactivation ou de disponibilité (courant relatif en fonction du potentiel de la préstimulation) suivent également une sigmoïde. Les paramètres $V_{1/2 \text{ inact}}$ et k sont calculés par régression non-linéaire de la courbe de disponibilité selon la fonction de Boltzman :

$$I/I_{\max} = 1 / (1 + \exp(-(V_{pp} - V_{1/2 \text{ inact}})/k))$$

Où :

- k , constante de Boltzman ;
- V_{pp} , potentiel du prépulse ;
- $V_{1/2 \text{ inact}}$, potentiel pour lequel la moitié des canaux sont inactivés.

IV – Biochimie

Les techniques de Western blot et de biotinylation des protéines de surface permettent d'évaluer l'expression totale et membranaire d'une protéine dans un échantillon biologique à l'aide d'un marquage par un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt. Ces techniques sont semiquantitatives et permettent seulement d'évaluer l'expression d'une protéine par rapport à une autre. Elles ne permettent pas de déterminer précisément la quantité de protéines présente dans l'échantillon biologique étudié.

IV.1 – Western blot

La technique de Western blot est utilisée afin d'évaluer l'expression totale de la protéine Ca_v1.2 dans les cellules HEK-tsA-201 et COS-7 dans le cadre des projets 1 et 2. Les cellules sont, dans un premier temps, lysées dans un tampon contenant du NaCl à 150mM, du Tris pH 7.2 à 20mM, de l'EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique) à 1mM, du Triton 1%, du PMSF (phenylmethanesulfonylfluoride) à 1mM repris dans l'éthanol absolu ainsi qu'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche diagnostics). Les lysats cellulaires sont mis en rotation pendant 20 min à 4°C puis centrifugés à 14 000 G, 20 min à 4°C également. Un dosage protéique est ensuite effectué contre une gamme étalon d'albumine sérique bovine (BSA) afin de charger une quantité de protéines équivalente dans chaque puits. Les lysats sont dénaturés 10 min à 50°C dans un tampon LAEMMLI contenant : 2% de SDS (dodécylsulfate de sodium), 10% de glycérol, 10mM de DTT (dithiothréitol), 65mM de Tris à pH 6.8 et une pointe de bleu de bromophénol. Quinze ou 25 µg de chaque échantillon sont déposés sur un gel de polyacrylamide 8 ou 10% et les protéines sont séparées par électrophorèse en présence de SDS. Après environ 1h30 de migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose à 4°C pendant 2h à 100V dans un tampon contenant : de la glycine à 192mM, du Tris à 25mM, du SDS à 0.1% et de l'éthanol à 20%. Afin de vérifier la qualité de la migration et du transfert, les protéines sont colorées avec du rouge ponceau. Après rinçage, la membrane est saturée pendant une heure dans un tampon TBS-T (Tris 10mM, NaCl 0.5mM et Tween 0.1%) contenant 5% de lait écrémé lyophilisé. La membrane est ensuite incubée en présence des anticorps primaires pendant toute une nuit à 4°C dans du TBS-T lait. Trois lavages de 5 minutes dans le TBS-T lait sont ensuite effectués puis la membrane est incubée avec les anticorps secondaires pendant 2 heures à température ambiante dans le TBS-T lait. Après 3 rinçages avec du TBS-T de 10 minutes chacun, la révélation est effectuée à l'aide d'un kit de détection de chémiluminescence (Western C, Biorad, pour le projet 2 ; ou super signal west femto maximum sensitivity substrate (Pierce) et ECL plus western blotting detection system (Amersham) pour le projet

1) et visualisée à l'aide d'un imageur ImageQuant RT ECL (GE Healthcare). Le tableau XIV répertorie les différents anticorps utilisés lors des expériences de biochimie.

Tableau XIV – Anticorps utilisés pour les expériences de biochimie

Anticorps	Fournisseur	Espèce	Concentration	Dilution	Référence	Projet 1	Projet 2	
							Rat	Humain
Anti-HA	Roche	Rat	100 µg/ml	1/1000	12CA5		x	
Anti-β actine	Sigma	Souris		1/1000	A5441		x	
Anti-Ca _v 1.2	Millipore	Lapin	850 µg/ml	1/1000	AB5156	x		x
Anti-TR	Invitrogen	Souris	500 µg/ml	1/1000	13-6890	x	x	x
Anti-GAPDH	Santa-Cruz	Souris	100 µg/ml	1/1000	SC322333	x		x
Anti-rat-HRP	Sigma			1/2000			x	
Anti-souris-HRP	Santa-Cruz	Chèvre	400 µg/ml	1/5000	SC2055	x		x
Anti-lapin-HRP	Santa-Cruz	Chèvre	400 µg/ml	1/5000	SC2054	x		x

TR, récepteur à la transferrine ; GAPDH, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase ; HRP, horseradish peroxidase. En bleu, les anticorps primaires ; en vert, les anticorps secondaires. En rouge, anticorps utilisé seulement dans les expériences de biotinylation des protéines de surface cellulaire.

IV.2 – Biotinylation des protéines de surface cellulaire

La technique de biotinylation des protéines de surface cellulaire est utilisée afin d'évaluer l'expression de la protéine Ca_v1.2 à la surface des cellules HEK tsA-201 ou COS-7 (figure 23). Les cellules sont rincées avec du PBS additionné de Ca²⁺ et Mg²⁺ (PBS, *Phosphate Buffer Saline*) puis incubées avec de la biotine (à 0,5 mg/ml) couplée à un groupement ester sulfonique par un pont disulfure (sulfo-NHS-SS-biotine, Pierce) diluée dans le PBS contenant du Ca²⁺ et Mg²⁺ pendant 30 minutes à 4°C sous agitation douce. Les cellules sont ensuite rincées une fois 10 minutes avec du PBS contenant 200mM de glycine, puis deux fois 10 minutes avec du PBS. Puis, les cellules sont lysées, centrifugées et dosées selon le même protocole que le Western blot. Huit cents microgrammes de lysat protéique sont incubés avec 50 µL de streptavidine couplée à des billes d'agarose (Pierce) pendant une nuit à 4°C et sous agitation. Les protéines biotinylées liées à la streptavidine sont purifiées par centrifugation (1000 rpm, 1 minute) et lavées 3 fois avec le tampon de lyse utilisé précédemment. Les protéines biotinylées ainsi isolées sont dénaturées 30 minutes à

37°C dans un tampon contenant : 4% de SDS, 20% de glycérol, 200mM de DTT, 145mM de tris pH6.8 et une pointe de bleu de bromophénol.

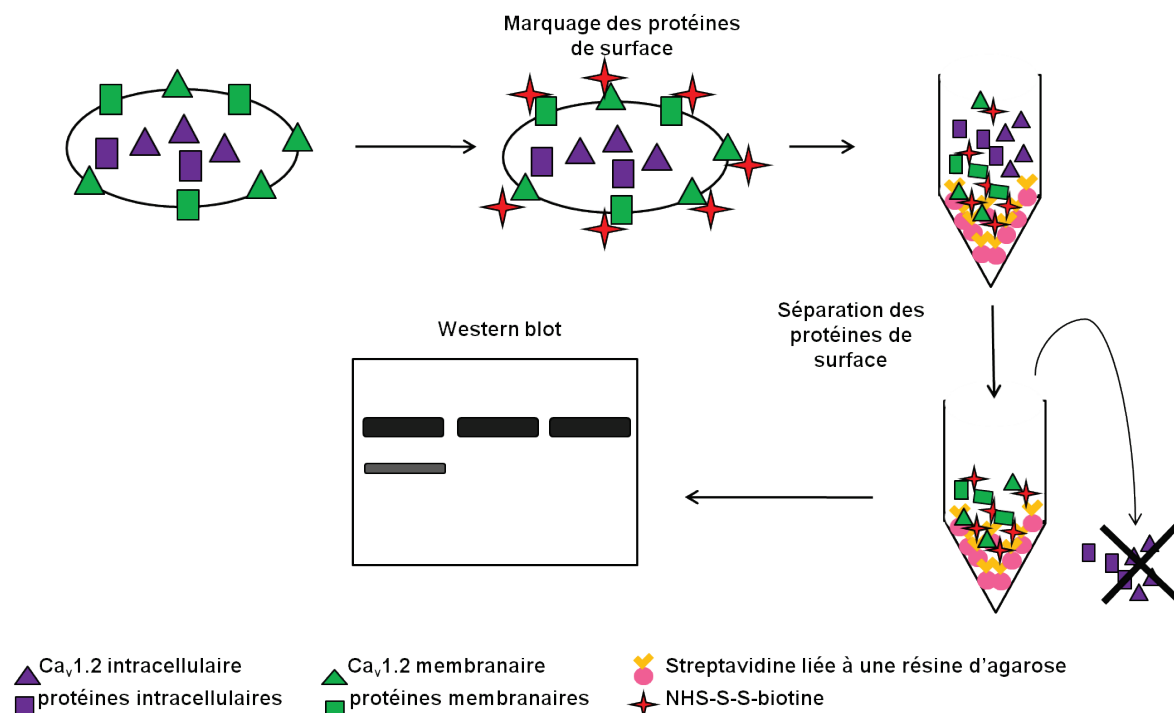


Figure 23 – Technique de biotinylation des protéines de surface cellulaire.

Les cellules sont incubées avec la NHS-S-S-biotine qui va interagir avec les protéines de surface. Les cellules sont ensuite lysées puis précipitées sur une colonne contenant des billes d'agarose couplées à la streptavidine. Enfin, les protéines intracellulaires sont ensuite éliminées et les protéines de surface sont chargées sur un gel d'acrylamide.

L'expression des protéines totales et à la surface cellulaire est enfin évaluée par Western blot. Les anticorps utilisés sont répertoriés dans le tableau XII.

V – Biologie cellulaire

V.1 - Immunocytochimie

La technique d'immunocytochimie permet grâce à un marquage par un anticorps spécifique d'étudier, à l'aide d'un microscope à fluorescence, la localisation d'une protéine dans la cellule.

Dans le cadre des expériences utilisant les plasmides codant pour la protéine $Ca_v1.2$ de rat, du projet 2 (Syndrome du QT court associé à un déficit primaire en carnitine : nouveau mécanisme), j'ai évalué le niveau d'expression de la protéine $Ca_v1.2$ à la surface cellulaire, par la technique d'immunocytochimie. Cette expérience est effectuée sur des cellules HEK tsA-201 transfectées puis ensemencées sur des lamelles de verre. Deux types

de marquages ont été réalisés : le premier sans perméabilisation préalable des cellules afin de visualiser les protéines exprimées à la surface cellulaire ; le deuxième après perméabilisation des membranes afin de visualiser les protéines totales.

Pour le marquage de surface, les cellules sont incubées avec des anticorps primaires dirigés contre le tag HA extracellulaire (Roche, fait chez le rat, 100µg/mL), à 4°C pendant une heure. Ces anticorps sont dilués au 1/200ème dans le PBS-BSA 1% (Albumine sérique bovine). Après cette incubation, les cellules sont rincées trois fois avec du PBS contenant du calcium et du magnésium à 1 mM. Puis, les cellules sont fixées à l'aide de paraformaldéhyde (PAF) 2 % (Invitrogen) pendant 15 minutes. Les cellules sont ensuite incubées avec l'anticorps secondaire anti-rat couplé à un fluorochrome (Alexa fluor 488, fait chez la chèvre, longueur d'onde d'émission 519 nm) dilué au 1/1000ème pendant 1 heure à température ambiante.

Pour visualiser le canal localisé dans les compartiments intracellulaires, les cellules sont tout d'abord fixées au PAF 2 %, pendant 15 minutes. Ensuite, les cellules sont perméabilisées avec 0.1% de Triton (Sigma) pendant 15 minutes. Puis, elles sont incubées avec l'anticorps primaire dirigé contre le tag HA extracellulaire pendant 1 heure à 4°C selon le même protocole que le marquage extracellulaire. Enfin, une incubation d'1 heure à température ambiante est réalisée avec l'anticorps secondaire utilisé pour le marquage de surface.

Les lamelles sont montées sur lame avec le milieu vectashield contenant du DAPI pour marquer les noyaux (Vector). L'acquisition des images est effectuée grâce à un microscope inversé équipé d'épifluorescence (Zeiss Axiover).

V.2 - FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)

Le retour de fluorescence après photoblanchiment, plus communément appelé FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) est une technique qui consiste à illuminer temporairement avec une forte intensité, une zone particulière d'une cellule, de manière à provoquer une extinction localisée de la fluorescence (photoblanchiment ou *photobleaching*) puis à mesurer la réapparition de la fluorescence dans la zone concernée. Cette technique permet d'évaluer la diffusion d'une protéine à la surface cellulaire.

La technique de FRAP a été utilisée dans le cadre du projet 1 (Mutations associées des gènes *SCN5A* et *CACNA1C* dans une famille atteinte du syndrome de Brugada et de troubles de la conduction cardiaque). Le FRAP est effectué sur des cellules COS-7, 48 à 72h après transfection, (cf I.4.2 – Par le FuGENE ®6) à l'aide d'un microscope confocal Nikon A1-R-Si (Champigny, France) équipé d'un objectif à immersion d'huile (x60 N.A.1.4).

L'environnement est contrôlé dans une enceinte LIS (Bâle, Suisse) à 37°C et 5% de CO₂. Les cellules sont cultivées en chambre Lab-Tek™, 4 compartiments dont le milieu est remplacé juste avant le début de l'expérience par de l'Opti-MEM® (Invitrogen) qui permet de s'affranchir de l'autofluorescence liée à la présence de rouge phénol et du sérum de veau foetal. Une zone d'intérêt (ROI, *region of interest*) d'1 µm² est dessinée au niveau de la surface cellulaire et est excitée par un laser argon à 488 nm. Les séquences d'acquisition des images réalisées sont résumées dans le tableau XV.

Tableau XV – Séquences d'acquisition des images lors des expériences de FRAP

	Durée	Fréquence	Puissance laser
Pre-blanchiment	30 s	1 toutes les 5 s	5 %
Photoblanchiment	1 s		100%
Retour de fluorescence	1 mn	1 toutes les 5 s	5 %
	1 mn	1 toutes les 10 s	5%

L'analyse est effectuée à l'aide des logiciels NIS element 3.2 et MetaMorph. Pour obtenir la valeur de la fluorescence moyenne dans la ROI, le bruit de fond est soustrait et la diminution naturelle de la fluorescence au cours du temps est prise en compte. Nous réalisons une double normalisation de la valeur de retour de fluorescence : l'intensité de fluorescence avant le photoblanchiment est fixé à 1, et la première séquence d'acquisition après le photoblanchiment est fixée à 0 (le pourcentage d'extinction de la fluorescence lors du photoblanchiment étant similaire entre les différentes cellules). A partir de ces mesures, la courbe représentant le retour de fluorescence en fonction du temps est tracée. Cette courbe suit le décours d'une biexponentielle d'équation :

$$y = a \times (1 - e^{-bx}) + c \times (1 - e^{-dx})$$

Où :

- a et c sont les coefficients de chacune des exponentielles ;
- b et d sont les vitesses de chacune des exponentielles ;
- x est le temps ;
- y est l'intensité de fluorescence.

A partir de cette équation, nous avons déterminé les valeurs des constantes de temps (1/b et 1/d), des coefficients (a et c) de chaque exponentielle ainsi que la valeur de la fraction immobile à t=126 s. La fraction immobile correspond à la proportion de protéine Ca_v1.2 n'ayant pas diffusé au cours des 126 s d'acquisition.

$$Fi = 1 - Fm$$

Où :

- Fi est la fraction immobile
- Fm est la fraction mobile (correspond à la valeur de y lorsque x est égal à 126s)

VI – Modélisation mathématique (Iyer et al, 2004)

Afin d'évaluer l'effet des mutations des gènes *CACNA1C* et *SCN5A* dans le cadre du projet « Mutations associées des gènes *SCN5A* et *CACNA1C* dans une famille atteinte du syndrome de Brugada et de troubles de la conduction cardiaque », nous avons utilisé le modèle épicardique gauche humain décrit par Iyer et coll. en 2004 (Iyer *et al.*, 2004). Ce modèle intègre chacun des grands courants ioniques présents dans les cellules. Les équations ont été formulées et validées à l'aide des données expérimentales obtenues sur myocytes isolés épicardiques humains gauches. Pour les courants $I_{Ca,L}$, I_{Na} , I_{to} , I_{Kr} et I_{Ks} , un modèle cinétique de Markov a été utilisé. Le modèle permet entre autres de reproduire et de prévoir la morphologie du potentiel d'action, les courants ioniques et les transitoires de calcium intracellulaire. Ce modèle sert donc d'outil pour étudier les mécanismes arythmiques dans le myocyte ventriculaire gauche humain.

Dans le cadre de notre étude, ce modèle a été légèrement modifié afin de minimiser l'artefact lié à la stimulation (amplitude de stimulation : -50 $\mu A/\mu F$; durée de stimulation : 0.5 ms; G_{Na} 100 ms/ μF). Les équations correspondant aux courants $I_{Ca,L}$ et I_{Na} ont été modifiées afin de reproduire les données expérimentales obtenues lors de l'étude de chaque mutation. Le courant $I_{Ca,L}$ est diminué de 44%, car lors de nos expériences de patch clamp, sur cellules COS-7 transfectées à l'état homozygote avec le canal muté p.N300D, nous avons observé une diminution de 88% de l'amplitude du courant $I_{Ca,L}$. Le courant I_{Na} est diminué de 50% pour mimer l'effet de la mutation stop $Na_v1.5$ p.Q1695X. Les autres courants n'ont pas été modifiés.

VII – Statistiques

Les résultats sont présentés sous la forme de moyenne $\pm$ erreur standard à la moyenne. Les différences sont statistiquement testées en utilisant les tests de Mann-Whitney, t de Student ou l'analyse de variances à 2 voies (ANOVA) suivi d'un test de Tukey quand les comparaisons multiples sont nécessaires. Une valeur de $P < 0.05$ est considérée comme significative.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

I – Arythmies multifocales du tissu de Purkinje (Multifocal ectopic Purkinje-related premature contractions) : une nouvelle canalopathie cardiaque liée à
SCN5A

I.1 – Introduction

Le canal sodique cardiaque Na_v1.5 joue un rôle fondamental dans les cellules cardiaques comme le démontrent les nombreuses pathologies arythmiques d'origine héréditaire auxquelles il est associé lorsqu'il est muté (Zimmer & Surber, 2008). Dans le cas du syndrome de Brugada et des troubles progressifs de la conduction cardiaques, il s'agit de mutations perte-de-fonction (Chen *et al.*, 1998; Schott *et al.*, 1999), alors que dans le cas du syndrome du QT long, ce sont des mutations gain-de-fonction qui ont été décrites (Amin *et al.*, 2010). De plus, plusieurs études portant sur le gène *SCN5A* font état de phénotypes différents pour une même mutation de ce gène (Bezzina *et al.*, 1999; Kyndt *et al.*, 2001). Ces pathologies sont nommées syndromes chevauchants.

Un enfant de 10 ans a été admis au service de cardiologie du CHU de Dijon suite à une syncope. Chez cet enfant, il a de plus été diagnostiqué des contractions ventriculaires prématurées associées à une cardiomyopathie dilatée. Ces troubles du rythme ont pour origine des foyers ectopiques au niveau des fibres de Purkinje et sont sensiblement réduits par un traitement à la quinidine. Une enquête familiale a été réalisée et a permis d'identifier 10 autres personnes atteintes de ces mêmes symptômes. Parallèlement, 2 autres familles non apparentées ont été recrutées et ont permis d'identifier au total 21 patients atteints de contractions ventriculaires prématurées. L'âge de diagnostic est variable allant de 24 semaines de gestation à 62 ans. Malgré cela, le phénotype observé est constant dans l'ensemble des familles avec : des complexes jonctionnels à QRS fins (17 individus) montrant des blocs de branches droit ou gauche (15 individus) responsables des contractions ventriculaires prématurées. De plus, 5 personnes sont décédées suite à une mort subite. L'ensemble de ces symptômes a permis de décrire une nouvelle pathologie arythmique cardiaque nommée « arythmies multifocales du tissu de Purkinje » (*Multifocal ectopic Purkinje-related premature contractions*).

Comme le propositus de la première famille étudiée présentait une cardiomyopathie dilatée, les gènes connus comme étant associés à cette pathologie ont été séquencés. Il s'agit des gènes *LMNA* codant pour la lamine A/C, *ABCC9* codant pour la sous-unité régulatrice des canaux K_{ATP} SUR2 et le gène *SCN5A*. Le variant c.665G>A a été mis en évidence dans le gène *SCN5A*. Au niveau protéique, il provoque la substitution d'une arginine en position 222 par une glutamine. Cet acide aminé constitue la deuxième charge du segment S4 du domaine I de Nav1.5. Il s'agit d'un résidu très conservé à travers les espèces qui n'a pas été retrouvé chez 300 sujets contrôles. Cette mutation ségrège à 100% avec le phénotype dans les 3 familles étudiées, suggérant un rôle important de la mutation dans cette pathologie nouvellement décrite.

Pour évaluer l'incidence de cette mutation et éventuellement l'associer au phénotype observé dans ces familles, une étude électrophysiologique du canal R222Q Na_v1.5 a été entreprise. Afin de compléter ce travail, nous avons également étudié l'effet de la quinidine sur le canal et réalisé des simulations informatiques de potentiels d'action cardiaques à l'aide de modèles mathématiques.

I.2 - Article

Multifocal Ectopic Purkinje-Related Premature Contractions, A New SCN5A-Related Cardiac Channelopathy

Gabriel Laurent^{*,1}, Samuel Saal^{*,2}, Mohamed Yassine Amarouch^{*,3,4,5}, Delphine M. Béziau^{3,4,5}, Ross F. J. Marsman⁶, Laurence Faivre², Julien Barc^{3,5}, Christian Dina^{3,5}, Geraldine Bertaux¹, Olivier Barthez¹, Christel Thauvin-Robinet², Philippe Charron⁷, Véronique Fressart⁸, Alice Maltret⁹, Elisabeth Villain¹⁰, Estelle Baron^{3,5}, Jean Mérot^{3,4,5}, Rodolphe Turpault^{5,10}, Yves Coudière^{5,10}, Flavien Charpentier^{3,4,5,11}, Jean-Jacques Schott^{3,5,11}, Gildas Loussouarn^{3,4,5}, Arthur A. M. Wilde⁶, Jean-Eric Wolf¹, Isabelle Baro^{*,3,4,5}, Florence Kyndt^{*,3,5,12}, Vincent Probst^{*,3,5,11}

Journal of the American College of Cardiology, 2012, Vol. 60, N°2, 144-156

*Contribution équivalente en tant que premier auteur

+Contribution équivalente en tant que dernier auteur

¹CHU Dijon, Service de Cardiologie, Hôpital le Bocage, Dijon, France

²CHU Dijon, Centre de Génétique, Hôpital d'Enfants, Dijon, France

³INSERM, UMR1087, l'institut du thorax, Nantes, France

⁴CNRS, UMR6291, Nantes, France

⁵Université de Nantes, Nantes, France

⁶Department of Experimental Cardiology, Heart Failure Research Center, Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands

⁷AP-HP, GH Pitié Salpêtrière, Département de Cardiologie et UPMC Univ Paris 6, Département de Génétique, INSERM UMR-S956, Paris, France

⁸AP-HP, GH Pitié Salpêtrière, UF Cardiogénétique et Myogénétique Moléculaire et Cellulaire, Service de Biochimie Métabolique et Centre de Génétique, Paris, France

⁹Cardiologie Pédiatrique, Université Paris V René Descartes, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France

¹⁰CNRS, UMR6629, Laboratoire de Mathématiques Jean Leray, Nantes, France

¹¹CHU Nantes, l'institut du thorax, France

¹²CHU Nantes, Service de génétique médicale, Nantes, France

Multifocal Ectopic Purkinje-Related Premature Contractions

A New *SCN5A*-Related Cardiac Channelopathy

Gabriel Laurent, MD, PhD,* Samuel Saal, MD,† Mohamed Yassine Amarouch, PhD,‡§|| Delphine M. Béziau, MSc,‡§|| Roos F. J. Marsman, MSc,¶|| Laurence Faivre, MD, PhD,† Julien Barc, PhD,‡|| Christian Dina, PhD,‡|| Geraldine Bertaux, MD,* Olivier Barthez, MD,* Christel Thauvin-Robinet, MD, PhD,† Philippe Charron, MD, PhD,# Véronique Fressart, MD, PhD,** Alice Maltret, MD,†† Elisabeth Villain, MD,†† Estelle Baron, BA,‡|| Jean Mérot, PhD,‡§|| Rodolphe Turpault, PhD,‡§|| Yves Coudière, PhD,‡§|| Flavien Charpentier, PhD,‡§§ Jean-Jacques Schott, PhD,‡§§ Gildas Loussouarn, PhD,‡§|| Arthur A. M. Wilde, MD, PhD,¶|| Jean-Eric Wolf, MD, PhD,* Isabelle Baró, PhD,‡§|| Florence Kyndt, PHARM D, PhD,‡|| Vincent Probst, MD, PhD,‡§§

Dijon, Nantes, and Paris, France; and Amsterdam, the Netherlands

Objectives

The aim of this study was to describe a new familial cardiac phenotype and to elucidate the electrophysiological mechanism responsible for the disease.

Background

Mutations in several genes encoding ion channels, especially *SCN5A*, have emerged as the basis for a variety of inherited cardiac arrhythmias.

Methods

Three unrelated families comprising 21 individuals affected by multifocal ectopic Purkinje-related premature contractions (MEPPC) characterized by narrow junctional and rare sinus beats competing with numerous premature ventricular contractions with right and/or left bundle branch block patterns were identified.

Results

Dilated cardiomyopathy was identified in 6 patients, atrial arrhythmias were detected in 9 patients, and sudden death was reported in 5 individuals. Invasive electrophysiological studies demonstrated that premature ventricular complexes originated from the Purkinje tissue. Hydroquinidine treatment dramatically decreased the number of premature ventricular complexes. It normalized the contractile function in 2 patients. All the affected subjects carried the c.665G>A transition in the *SCN5A* gene. Patch-clamp studies of resulting p.Arg222Gln (R222Q) Nav1.5 revealed a net gain of function of the sodium channel, leading, in silico, to incomplete repolarization in Purkinje cells responsible for premature ventricular action potentials. In vitro and in silico studies recapitulated the normalization of the ventricular action potentials in the presence of quinidine.

Conclusions

A new *SCN5A*-related cardiac syndrome, MEPPC, was identified. The *SCN5A* mutation leads to a gain of function of the sodium channel responsible for hyperexcitability of the fascicular-Purkinje system. The MEPPC syndrome is responsive to hydroquinidine. (J Am Coll Cardiol 2012;60:144–56) © 2012 by the American College of Cardiology Foundation

From the *CHU Dijon, Service de Cardiologie, Hôpital le Bocage, Dijon, France; †CHU Dijon, Centre de Génétique, Hôpital d'Enfants, Dijon, France; ‡INSERM, UMR1087, l'institut du thorax, Nantes, France; §CNRS, UMR6291, Nantes, France; ||Université de Nantes, Nantes, France; ¶Department of Experimental Cardiology, Heart Failure Research Center, Academic Medical Center, Amsterdam, the Netherlands; #AP-HP, GH Pitié Salpêtrière, Département de Cardiologie, and UPMC Univ Paris 6, Département de Génétique, INSERM UMR-S956, Paris, France; **AP-HP, GH Pitié Salpêtrière, UF Cardiogénétique et Myogénétique Moléculaire et Cellulaire, Service de Biochimie Métabolique et Centre de Génétique, Paris, France; ††Cardiologie Pédiatrique, Université Paris V René Descartes, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France; ‡‡CNRS, UMR6629, Laboratoire de

Mathématiques Jean Leray, Nantes, France; §§CHU Nantes, l'institut du thorax, France; and the ||CHU Nantes, Service de génétique médicale, Nantes, France. Dr. Amarouch is currently at the University of Bern, Department of Clinical Research, Bern, Switzerland. Dr. Barc is currently at the University of Amsterdam, Department of Experimental Cardiology, Academic Medical Center, Amsterdam, the Netherlands. The Agence Nationale de la Recherche financially supported Drs. Turpault and Coudière (ANR-07-JCJC-0141), Dr. Baró (ANR-09-GENO-003-01), and Dr. Schott (ANR-05-MRAR-028-01). Dr. Schott was also supported by a Leducq Foundation Trans-Atlantic Network of Excellence grant (05 CVD 01). The research leading to these results has also received funding from the European Community's Seventh Framework Programme FP7/2007–2013 under grant agreement

Primary arrhythmogenic disorders of the heart are a major cause of sudden cardiac death in otherwise healthy individuals with structurally normal hearts. Mutations in several genes encoding ion channels and channel-interacting proteins have emerged over the last decade as the basis for a variety of inherited cardiac arrhythmias (1–3). Different mutations in a single gene may account for various disorders depending on the position of the mutation, the nature of the amino acid substituted, the type of the mutation (non-sense, false-sense. . .), and its functional consequences (4,5).

The *SCN5A* gene encodes the pore-forming subunit of the voltage-gated Na⁺ channel Nav1.5. In the heart, this channel plays a key role in rapid impulse propagation through the conduction system and in the excitability of atrial and ventricular cardiomyocytes. Mutations in *SCN5A* are responsible for a spectrum of hereditary arrhythmias, including type-3 long QT (LQT3) syndrome, the Brugada syndrome, cardiac conduction disease, sinus node dysfunction, atrial fibrillation, and dilated cardiomyopathy (see Tfelt-Hansen et al. [6] for a review) (5,7–13). In addition to these syndromes, originally regarded as independent entities, recent evidence shows considerable clinical overlap, implying new disease entities known as overlap syndromes of the cardiac Na⁺ channel (14).

In this article, we report a novel autosomal dominant form of cardiac arrhythmia identified in 3 unrelated families and characterized by multifocal ectopic Purkinje-related premature contractions (MEPPC). This arrhythmia is due to the c.665G>A *SCN5A* mutation leading to a shift in p.Arg222Gln (R222Q) Nav1.5 voltage dependency.

Methods

An expanded Methods section is available in the Online Appendix.

Clinical evaluation. This study was in agreement with the local guidelines for genetic research and has been approved by the local ethical committees. Informed, written consent was obtained from each family member who agreed to participate to the study. Standard 12-lead electrocardiography, Holter recording, and echocardiography were proposed to all participating family members. We also proposed electrophysiological studies to some patients.

Patients were considered affected when ventricular arrhythmia corresponding to MEPPC was detected.

Mutation analysis. Genomic DNA was extracted from peripheral blood lymphocytes using standard protocols. The

proband (III.1) of Family 1 was screened for mutations in known genes responsible for dilated cardiomyopathy (DCM) and arrhythmia, including *LMNA* encoding lamin A/C, *ABCC9* encoding SUR2A, and *SCN5A* (10,15,16).

Haplotype analysis. Ten microsatellite markers around the *SCN5A* gene (D3S1759, D3S2432, D3S3047, D3S3512, D3S1298, intragenic *SCN5A* marker, D3S3521, D3S3527, D3S3522, and D3S3559) were genotyped. We estimated the age of the mutation using the Genin et al.'s method (17).

Cellularelectrophysiology. Patch-clamp studies were performed on COS-7 cells transiently expressing human wild-type (WT) or R222Q Nav1.5 (NG_008934) and human β 1 subunits, using the whole-cell configuration at room temperature (18).

Mathematical modeling. Single-cell models of the human Purkinje cells (19) and left ventricular myocytes (20) were used. Both models were incorporated in a multicellular model and the propagation of the electrical waves in the cardiac tissues was described by a monodomain model (21). The numerical simulations were performed on a simplified 2D slice model described previously (22).

Statistics. All data are presented as mean $\pm$ SEM. The statistical significance of the observed effects was assessed by the Student *t* test or 2-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey test for multiple comparisons when needed. A *p* value <0.05 was considered significant.

Results

We identified 3 families affected by the same phenotype, segregating with an autosomal dominant pattern over 3 generations (Fig. 1A). In Family 1, 11 of 18 family members were affected, 4 of 5 members were affected in Family 2, and 6 of 8 members were affected in Family 3. Patient characteristics are summarized in Tables 1 and 2.

Clinical results. CLINICAL PHENOTYPE OF THE FAMILY 1 PROBAND (PATIENT III.1). Patient III.1 was identified at the age of 10 years after mild dyspnea while exercising. Her 12-lead surface electrocardiogram (ECG) showed a chaotic

Abbreviations and Acronyms

AF	= atrial fibrillation
ANOVA	= analysis of variance
AP	= action potential
DCM	= dilated cardiomyopathy
ECG	= electrocardiogram
ICD	= implantable cardioverter-defibrillator
LBBB	= left bundle branch block
LQT	= long QT syndrome
LVDd	= left ventricular diastolic diameter
LVEF	= left ventricular ejection fraction
MEPPC	= multifocal ectopic Purkinje-related premature contractions
NSVT	= nonsustained ventricular tachyarrhythmia
PAC	= premature atrial complex
PVC	= premature ventricular complex
RBBB	= right bundle branch block
TTE	= transthoracic echocardiogram
VT	= ventricular tachycardia

n°FP7-HEALTH-2009-single-stage 241526 (Drs. Baró and Charpentier). Dr. Loussouarn was financially supported by the Association Française contre les Myopathies (n° 14120) and Dr. Charpentier by the Fondation pour la Recherche Médicale (DVC20070409253). All other authors have reported that they have no relationships relevant to the contents of this paper to disclose. Drs. Laurent, Saal, and Amarouch contributed equally to this work. Drs. Baró, Kyndt, and Probst contributed equally to this work as senior authors.

Manuscript received October 13, 2011; revised manuscript received January 19, 2012, accepted February 14, 2012.

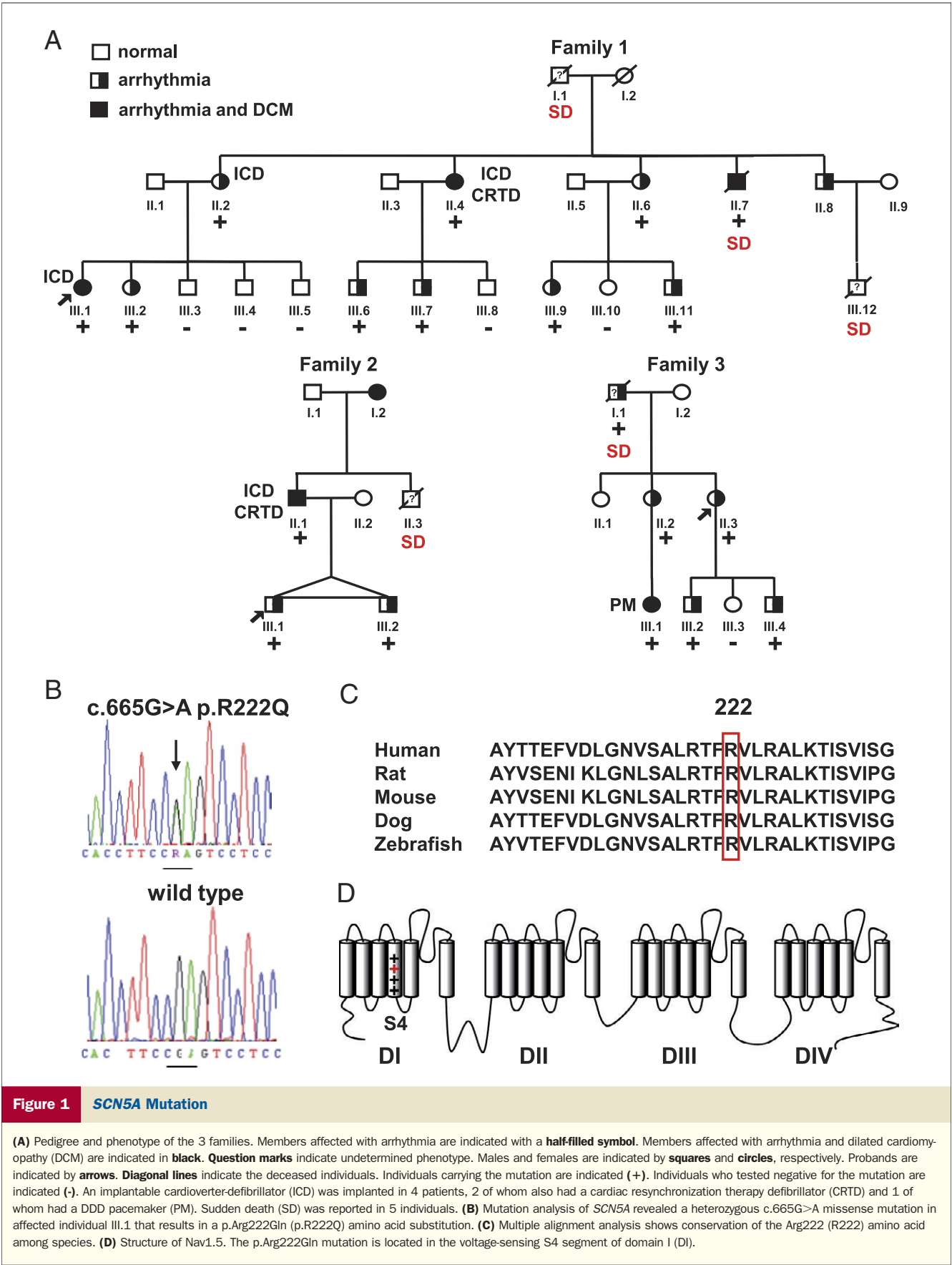


Figure 1 *SCN5A* Mutation

(A) Pedigree and phenotype of the 3 families. Members affected with arrhythmia are indicated with a half-filled symbol. Members affected with arrhythmia and dilated cardiomyopathy (DCM) are indicated in black. Question marks indicate undetermined phenotype. Males and females are indicated by squares and circles, respectively. Probands are indicated by arrows. Diagonal lines indicate the deceased individuals. Individuals carrying the mutation are indicated (+). Individuals who tested negative for the mutation are indicated (-). An implantable cardioverter-defibrillator (ICD) was implanted in 4 patients, 2 of whom also had a cardiac resynchronization therapy defibrillator (CRTD) and 1 of whom had a DDD pacemaker (PM). Sudden death (SD) was reported in 5 individuals. (B) Mutation analysis of *SCN5A* revealed a heterozygous c.665G>A missense mutation in affected individual III.1 that results in a p.Arg222Gln (p.R222Q) amino acid substitution. (C) Multiple alignment analysis shows conservation of the Arg222 (R222) amino acid among species. (D) Structure of Nav1.5. The p.Arg222Gln mutation is located in the voltage-sensing S4 segment of domain I (DI).

Table 1 Clinical Data of the Family Members

Patient #	Age at Diagnosis (yrs)	Mean Follow-Up (yrs)	QTc (ms)*	Gender	Symptoms	LVDd (mm/m ²)	LVEF Before Medication (%)	Atrial Arrhythmia	PVC Morpho†	PVC Axis	Junction Rhythm	NSVT‡	Total PVC/24 h	EPS	PVC Regression at Exercise
Family 1															
I.1	29	—	—	M	SD	—	—	—	—	—	—	—	—	No	—
II.2	29	17	423	F	Syncope	55	73	Paroxysmal atrial arrhythmia	R	R and L	Yes	No	62,000	No	Yes
II.4	37	8	358	F	Dyspnea	61	35	No	R and L	R and L	Yes	Yes	>25,000	Yes	Yes
II.6	25	20	426	F	Dyspnea	48	59	No	—	R and L	No	No	—	No	—
II.7	23	27	362	M	Dyspnea, SD	60	47	No	—	R and L	Yes	No	—	No	—
II.8	17	19	391	M	Syncope	55	60	No	—	—	No	No	—	No	—
III.1	10	7	361	F	Syncope	40	32	Paroxysmal atrial arrhythmia	R and L	R and L	Yes	Yes	>50,000	Yes	Yes
III.2	0§	5	365	F	No	33	60	No	—	—	Yes	No	—	No	—
III.6	12	9	380	M	Palpitations	51	47	No	R and L	R and L	Yes	Yes	>25,000	Yes	Yes
III.7	17	5	360	M	Dyspnea	46	67	No	R and L	R and L	Yes	No	>25,000	No	Yes
III.9	25	3	407	F	No	—	—	No	no	no	Yes	No	200	No	—
III.11	15	3	413	M	No	—	—	No	no	no	Yes	No	11	No	—
III.12	4 months	—	—	M	SD	—	—	No	—	—	—	—	—	No	—
Family 2															
I.2	—	—	—	F	—	—	—	—	—	—	—	—	—	No	—
II.1	35	8	410	M	Palpitations	—	—	No	—	no	No	—	—	Yes	—
II.3	11	0	420	M	SD	—	—	Atrial flutter	—	—	—	—	—	No	—
III.1	6	7	405	M	No	36	60	No	L	R and L	Yes	No	18,000	No	Yes
III.2	12	0.5	408	M	Presyncope	33	60	No	L	R and L	Yes	No	86,000	Yes	Yes
Family 3															
I.1	62	9	—	M	SD	—	—	Atrial bigeminy	R and L	—	Yes	Yes	—	—	—
II.2	29	26	414	F	Palpitations	28	58	Paroxysmal atrial arrhythmia	R and L	R and L	Yes	Yes	60,000	No	Yes
II.3	18	36	431	F	Palpitations	28	>50	Atrial fibrillation	R and L	R and L	Yes	Yes	7,134	Yes	Yes
III.1	7	12	399	F	Dyspnea	36	35	Paroxysmal atrial arrhythmia	R and L	R and L	Yes	Yes	35,650	No	Yes
III.2	14	6	415	M	Near collapse	31	>50	Atrial flutter	R and L	L	Yes	No	17,706	Yes	Yes
III.4	14	2	430	M	Palpitations	29	>50	Paroxysmal atrial arrhythmia	—	—	Yes	Yes	3,516	No	—

*Bazett-corrected QT interval (QTc) measured on lead II of most recent electrocardiogram under sinus rhythm. †Premature ventricular contractions (PVCs) with right (R) and left (L) bundle branch block patterns. ‡Nonsustained ventricular tachyarrhythmia (<30 s). §Gestation of 24 weeks.

EPS = electrophysiological study; LVDd = left ventricular diastolic diameter; LVEF = left ventricular ejection fraction; SD = sudden death.

Table 2 Follow-Up and Treatment of the Family Members

Patient #	Treatment	ICD	CRTD	Symptoms on Treatment	PVC/24 h on Medication	LVEF on (Before) Medication (%)	Sudden Death	SCN5A Mutation
Family 1								
I.1	—	No	No	—	—	—	Yes	—
II.2	Hydroquinidine	Yes	No	No	<5,000	60 (73)	No	Yes
II.4	Hydroquinidine	Yes	Yes	No	<5,000	50 (35)	No	Yes
II.6	Amiodarone	No	No	Yes	4	—	No	Yes
II.7	None	No	No	—	—	—	Yes	Yes
II.8	None	No	No	—	—	—	No	—
III.1	Hydroquinidine	Yes	No	No	<5,000	56 (32)	No	Yes
III.2	None	No	No	—	—	—	No	Yes
III.6	*	No	No	Yes	—	—	No	Yes
III.7	None	No	No	—	—	—	No	Yes
III.9	None	No	No	—	—	—	No	Yes
III.11	None	No	No	—	—	—	No	Yes
III.12	—	No	No	—	—	—	Yes	—
Family 2								
I.2	None	No	No	—	—	—	No	—
II.1	Amiodarone	Yes	Yes	Yes	—	45 (20)	No	Yes
II.3	—	No	No	—	—	—	Yes (11)	—
III.1	Hydroquinidine	No	No	No	2,500	60 (60)	No	Yes
III.2	Hydroquinidine	No	No	No	7,700	60 (60)	No	Yes
Family 3								
I.1	—	—	—	—	—	—	Yes (71)	Yes
II.2	Flecainide	No	—	No	125	58	No	Yes
II.3	Flecainide	No	—	No	5,791	>50 (>50)	No	Yes
III.1	Propafenone†	DDD PM	—	Yes	31,894	50 (35)	No	Yes
III.2	Flecainide	No	—	Yes	486	52 (>50)	No	Yes
III.4	Flecainide	No	—	No	21	>50 (>50)	No	Yes

*Flecainide, nadolol, sotalol, or verapamil. Hydroquinidine treatment and ICD implantation were proposed but refused by the patient. †Patient III.1 started on flecainide as well, however, she did not tolerate this drug. The patient is currently treated with propafenone, on subtherapeutic doses.

CRTD = cardiac resynchronization therapy defibrillator; DDD PM = DDD pacemaker; ICD = implantable cardioverter-defibrillator; LVEF = left ventricular ejection fraction; PVC = premature ventricular contractions.

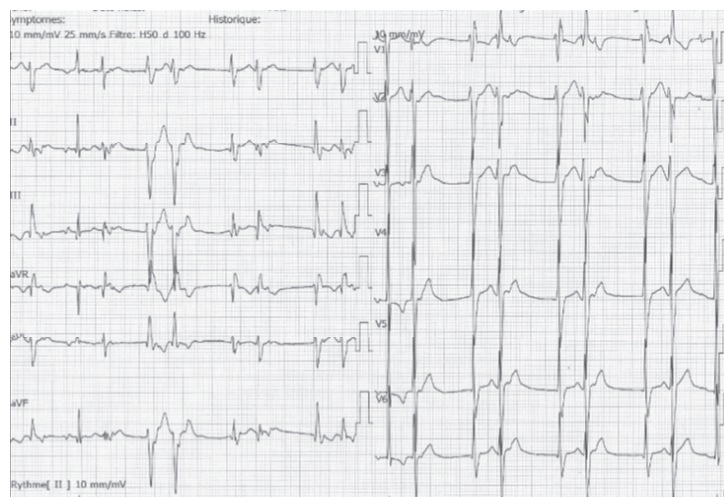
cardiac rhythm comprising narrow junctional and rare sinus beats competing with premature ventricular complexes (PVCs) showing various right bundle branch block (RBBB) patterns (Fig. 2A). There was an overdrive suppression of the PVCs during treadmill exercising. Signal-averaged ECG did not show late potentials. A Holter monitoring device recorded more than 50,000 PVCs per 24 h. The transthoracic echocardiogram (TTE) revealed a mild dilation of the left ventricle (left ventricular diastolic diameter [LVDd] 54 mm or 40 mm/m², above 97th percentile) (23), but a normal left ventricular ejection fraction (LVEF) (62%). She remained asymptomatic until the age of 13 years, when she was referred for brief sudden loss of consciousness at rest. The ECG exhibited recurrent nonsustained ventricular tachyarrhythmias (NSVTs) with RBBB patterns, which were concomitant with several fainting episodes (Fig. 2B). Several nonsustained supraventricular arrhythmias have been identified during the follow-up. New TTE showed a markedly enlarged LVDd (62 mm), and a decreased LVEF (32%). A dual-chamber implantable cardioverter-defibrillator (ICD) was then implanted associated with oral hydroquinidine treatment. Once the measured plasma level of the drug reached 1 mg/l (normal range 1 to 3 mg/l), this medication succeeded in

markedly reducing the number of PVCs (Table 2). After 1 year under hydroquinidine treatment, the PVC burden was <1% and her heart was considered normal in TTE (LVDd 54 mm, LVEF 56%).

Clinical investigation of family members allowed the identification of 10 other affected individuals with similar ECG characteristics (Online Fig. 1).

CLINICAL PHENOTYPE OF THE FAMILY 2 PROBAND (PATIENT III.1) AND HIS TWIN BROTHER (PATIENT III.2). Patient III.1 was identified at age 6 years because of an irregular heart rate without any other symptoms. His twin brother was diagnosed at 12 years with the same arrhythmia after experiencing syncope while cycling. A complete clinical evaluation including a TTE and magnetic resonance imaging was normal, but his ECG showed frequent PVCs with a left bundle branch block (LBBB) pattern, and superior and inferior axial deviation (Fig. 2C). In both patients, the Holter ECG recorded tens of thousands of PVCs per 24 h (Table 1). Exercise allowed a clear decrease of their number. Both patients were finally treated with hydroquinidine, leading to a dramatic decrease of the PVC number (Table 2).

A patient III.1 family 1 at 10 years old



B patient III.1 family 1 at 13 years old



C patient III.1 family 2

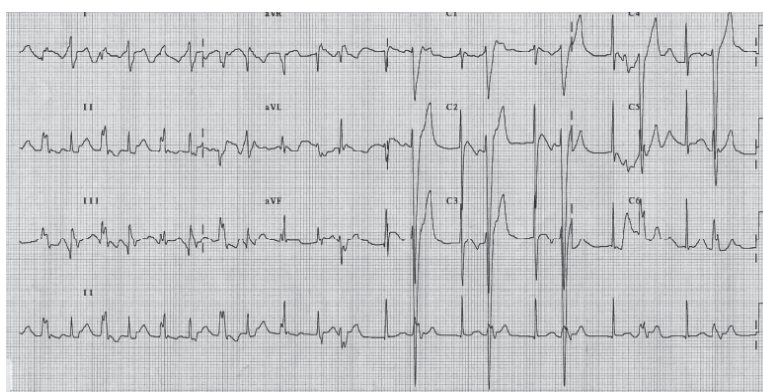


Figure 2 Representative ECG Tracings of the Families

(A) Representative 12-lead surface electrocardiogram (ECG) of Family 1, 10-year-old proband (Patient III.1), showing a chaotic cardiac rhythm including normal sinus and junctional QRS complexes competing with various right bundle branch block pattern complexes corresponding to PVCs. **(B)** Symptomatic nonsustained ventricular tachyarrhythmia recorded on the same patient as in **(A)**, at 13 years old (right bundle branch block pattern, QRS axis variation). QRS morphologies are changing from one beat to another. **(C)** Twelve-lead surface ECG of Patient III.1 of Family 2 showing a chaotic cardiac rhythm with rare sinus beats and alternant junctional rhythms with ventricular bigeminisms. Premature ventricular complexes had left bundle branch block pattern with slight variations in shape and axis.

Their father and grandmother had both been affected with DCM associated with frequent PVCs, and 1 uncle, known as affected by atrial flutter, had died suddenly at age 11 years.

CLINICAL PHENOTYPE OF THE FAMILY 3 PROBAND (PATIENT II.3). The index patient II.3 was identified at the age of 18 years during a routine medical examination. Her 12-lead ECG showed premature atrial complexes (PACs), atrial fibrillation (AF), pre-excitation on the ECG, and frequent relatively narrow PVCs with both LBBB and RBBB patterns. Electrophysiological testing revealed ectopic foci from the atria, the atrioventricular junction, and the bundle branches. The accessory pathway was located at the right septal site. At the age of 48 years, Holter monitoring recorded a permanent chaotic supraventricular rhythm with >48,900 PACs and >7,000 isolated and bigeminal PVCs (35% and 5% of total QRS complexes, respectively). Flecainide therapy marginally reduced ventricular ectopies; however, it completely suppressed supraventricular arrhythmia (Holter monitoring recorded <150 PACs, representing <1% of total QRS complexes). Flecainide therapy was maintained because hydroquinidine is not available in the Netherlands, where Family 3 lives.

A REMARKABLY CONSTANT PHENOTYPE. Within these 3 families, 21 individuals were affected by PVCs. Patient characteristics are summarized in Tables 1 and 2. Despite the various ages at diagnosis, from 24 weeks of gestation to 62 years (mean age 20 years; $n = 20$), the phenotype was remarkably constant: narrow sinus and junctional QRS complexes ($n = 17$) competing with various complexes showing an RBBB or LBBB patterns ($n = 15$), corresponding to PVCs with superior or inferior axes. We did not observe any QT prolongation (Table 1) or ST-segment elevation.

PVCs were isolated, or paired (bigeminism) with sinus or junctional QRS complexes. NSVTs were identified in 8 individuals. Five patients were affected by syncope or presyncope. Sudden death was reported in one 4-month-old boy (Patient III.12 in Family 1), an 11-year-old boy (Patient II.3 in Family 2), and 3 adult males (29, 50, and 71 years old; Patients II.7 and I.1 in Family 1 and Patient I.1 in Family 3). However, PVCs were clearly identified in only 2 of these cases (Patient II.7 in Family 1 and Patient I.1 in Family 3) before sudden death. Episodes of syncope or fainting during polymorphic ventricular tachycardia (VT) episodes (Holter or ICD monitorings) were reported in 3 females (Fig. 2B). Two individuals in Family 1, 1 in Family 2, and 6 in Family 3 presented with atrial arrhythmia (PACs, nonsustained atrial tachyarrhythmia, or AF). One patient had AV conduction disturbances. Only 1 patient in Family 3 had an accessory pathway.

ELECTROPHYSIOLOGICAL STUDY. Electrophysiological testing was performed in 7 cases (Fig. 3, Online Fig. 2). Pre-systolic potentials recorded at ectopic sites during PVCs either corresponded to Purkinje potentials during normal sinus beats or to the proximal extension of the left

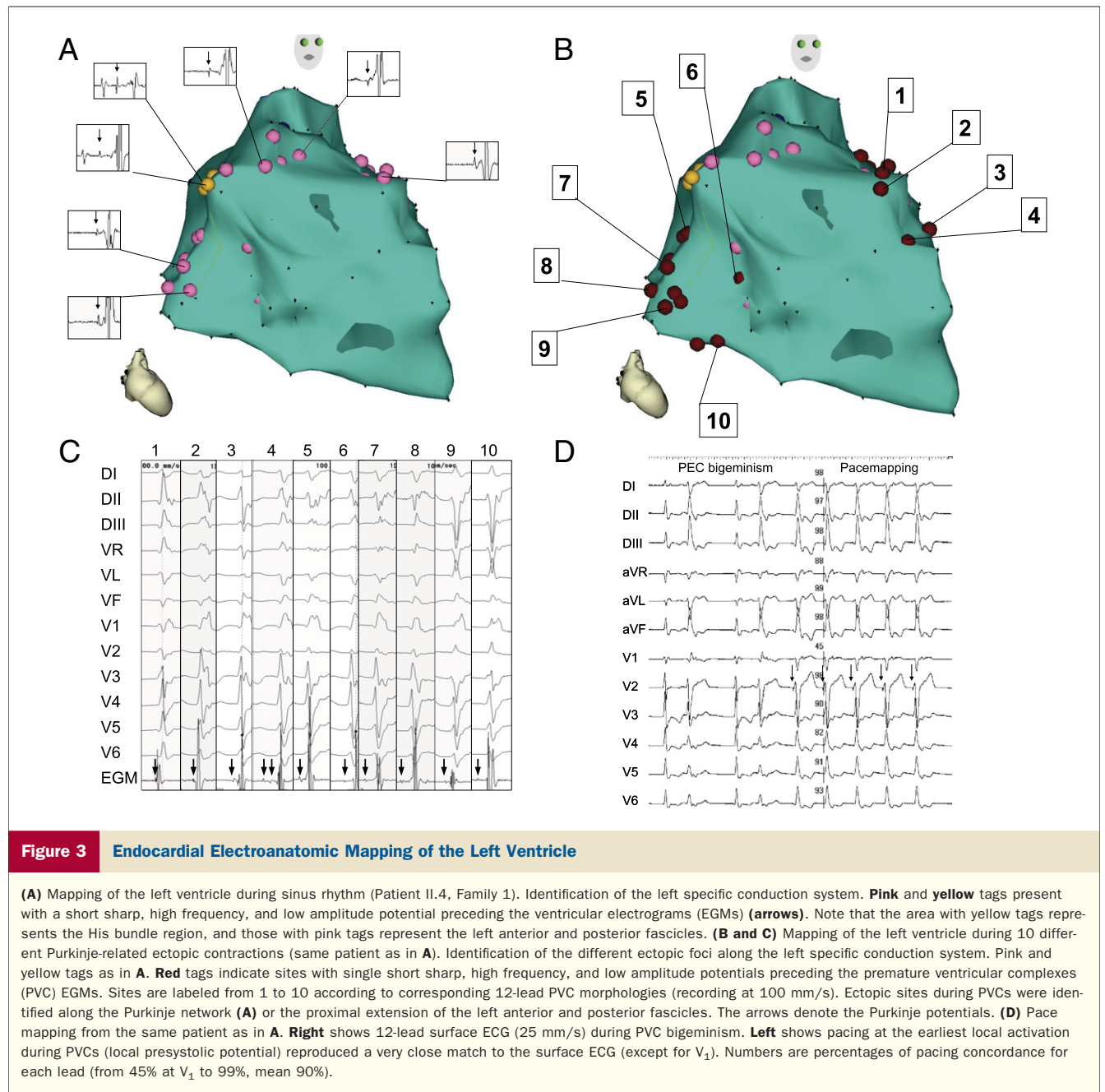
anterior and posterior fascicles (Figs. 3B and 3C). In all tested patients, numerous ectopic foci were identified along the left conduction system and its proximal extension. We did not record any PVCs from the myocardium itself as the local ventricular electrograms were always preceded by a Purkinje potential and we did not record any retrograde Purkinje potential activation or slow conduction area in the Purkinje network. Reentrant mechanisms were excluded because no PVCs or VTs could be pacing induced and no mid diastolic potentials were recorded during VT (24–26).

When tried on Patient II.4 of Family 1, radiofrequency applications did not eradicate PVCs as the whole Purkinje tissue was involved in triggering PVCs from varying sites. Whereas we proposed electrophysiological studies to most of the patients, not all of them accepted. Among affected members in the 3 families, PVC features were very similar with a sharp slope of the first ventricular deflection and close characteristics to authentic LBBB or RBBB patterns with right or left axis. In patients who underwent an electrophysiological study, we identified those PVC morphologies as being triggered from Purkinje fibers. We therefore inferred that similar PVC patterns may originate from similar Purkinje regions in the other patients.

EVOLUTION OF THE LEFT VENTRICULAR FUNCTION ON ANTI-ARRHYTHMIC TREATMENT. Transthoracic echocardiograms were performed in all affected patients and magnetic resonance imaging was performed in 3 cases. Low LVEF with dilation of the left ventricle was identified in 7 patients. Several antiarrhythmic treatments were attempted within the families (Table 2). Amiodarone treatment was partially successful in 2 cases (Patient II.6 in Family 1 and Patient II.1 in Family 2). For patient II.1 in Family 2, amiodarone and cardiac resynchronization therapy defibrillator treatment were introduced simultaneously, partially normalizing the LVEF (from 20% to 45%). Hydroquinidine was successful in 5 cases with a dramatic decrease in the number of PVCs per 24 h (Table 2), and dramatically decreased the PVC number and improved the ventricular function in all cases. Patient III.1 was the first person to be treated by hydroquinidine in Family 1 and no adverse effects were noticed after 4 years of follow-up. Flecainide therapy was used in 5 patients and greatly reduced supraventricular and ventricular arrhythmias, with a clear decline in ventricular tachycardia episodes, in 3 of them. Other antiarrhythmic drugs were used in 4 patients but were successful in 3 cases only (Table 2).

An ICD was implanted in 4 patients, 2 of which had a cardiac resynchronization therapy defibrillator. Only 1 patient (Family 3) had atrioventricular conduction disturbances and was implanted with a double chamber pacemaker (Table 2).

Genetic results. MUTATION ANALYSIS. Because the first proband identified (Family 1, Patient III.1) had DCM, mutations in *LMNA* encoding lamin A/C and *ABCC9* encoding SUR2A, genes reported to be associated with DCM, were searched in this patient although unsuccessful.



fully. The *SCN5A* gene, reported to be associated with DCM and various arrhythmogenic diseases, was also sequenced. Genetic testing of Family 1's proband revealed that she was heterozygous for a c.665G>A transition in *SCN5A* exon 6 (Fig. 1B), resulting in the substitution of an arginine for a glutamine at position 222 (R222Q). This substitution is located in the voltage-sensing S4 segment of domain I of the cardiac Na⁺ channel Nav1.5 (Fig. 1D). Subsequently, the mutation was detected in Family 2's (Patient III.1) and Family 3's (Patient II.3) probands who did not present DCM. The mutation was 100% penetrant and strictly segregated with the cardiac arrhythmia in all the families, consistent with a mutation-related disease (Fig.

1A). It was absent in 600 control chromosomes. The Arg222 (R222) amino acid is highly conserved across species (Fig. 1C). This mutation is reported on dbSNP (rs45546039) but at 0% in all populations and is not reported in the National Heart, Lung, and Blood Institute Exome variant server.

HAPLOTYPE ANALYSIS. To investigate whether a common ancestral chromosome accounted for the recurrence of the R222Q mutation in unrelated Families 1, 2, and 3, we constructed mutation-associated haplotypes by genotyping family members for 10 microsatellite markers (Online Fig. 3, Online Appendix: Results).

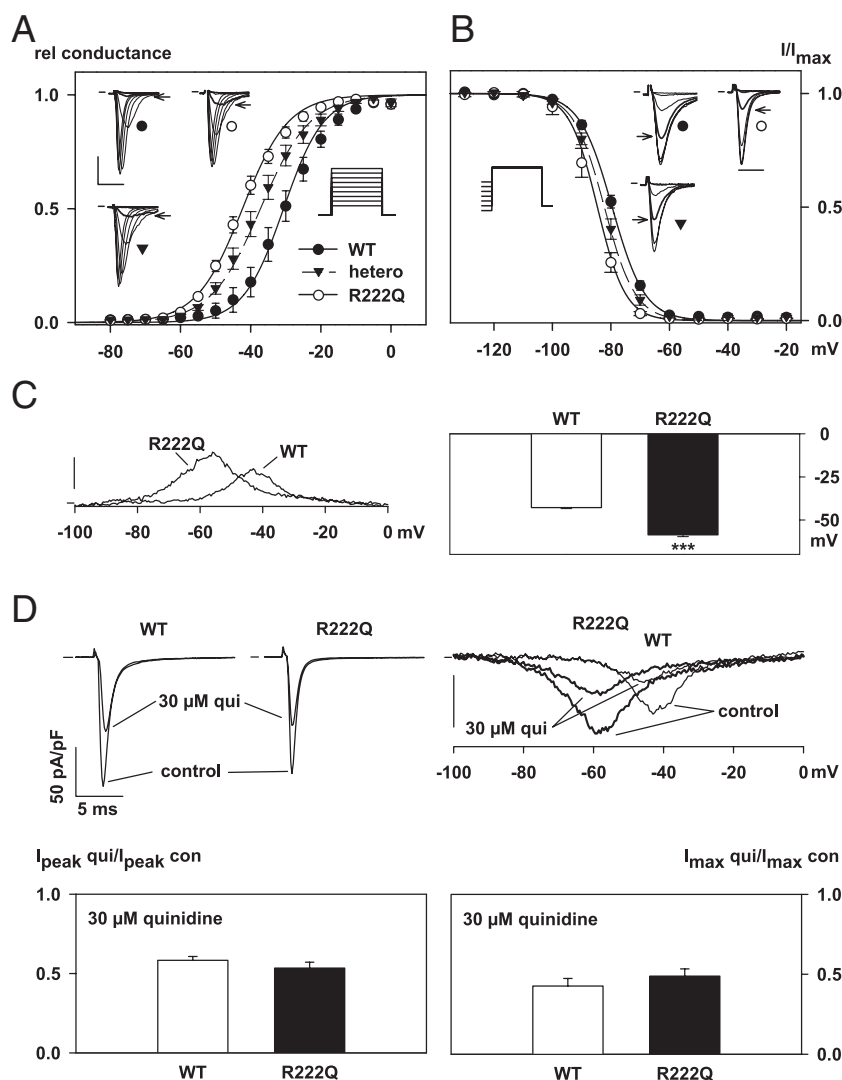


Figure 4 Experimental Effects of R222Q Mutation on Nav1.5 Channel in COS-7 Cells

(A) Relative peak conductance versus membrane potential curves for Nav1.5 channels in COS-7 cells transfected with wild-type (WT), R222Q Nav1.5 or both, in the presence of WT β 1 subunit. Curves are Boltzmann fits to the data show the mutation-dependent activation shift. Inset shows stimulation protocol and superimposed Na^+ current recordings during 20-ms depolarizations to various potentials from -80 to $+0$ mV (holding potential -100 mV; 10-mV increment; frequency 0.5 Hz). Scale bars are 2 ms, 1,000 pA. Bold trace and arrow are Na^+ current at -50 mV. (B) Steady-state channel availability curves for Nav1.5 channels. Data are mean normalized peak current (I/I_{max}) measured at -20 mV versus pre-pulse voltage. Curves show Boltzmann fits to the data. Inset shows stimulation protocol and superimposed Na^+ current recordings at -20 mV after 500-ms polarization to various potentials from -110 to -50 mV (holding potential -100 mV; 10-mV increment; frequency 0.25 Hz) in COS-7 cells transfected as in A. Scale bar is 2 ms. Bold trace and arrow show Na^+ current at -80 mV. (C) Mean WT ($n = 13$) and R222Q ($n = 14$) tetrodotoxin-sensitive window currents (30 μ M TTX) obtained with a depolarizing-voltage ramp (0.5 mV/ms, frequency 0.5 Hz), normalized to the peak current at -20 mV (I_{peak}) recorded in the same cell (scale bar 1% I_{peak}), and mean voltage at which the measured conductance was maximal ($n = 12$ and 14 for WT and R222Q, respectively). *** $p < 0.001$. (D) Effects of quinidine on WT and R222Q Nav1.5 currents. (Left) Representative WT and R222Q Na^+ currents recordings during 20-ms depolarizations to -20 mV (holding potential -100 mV; frequency 0.5 Hz) in the absence (control) and presence of 30 μ M quinidine (qui), and mean residual current ratio ($I_{peak\ qui}/I_{peak\ con}$) in each condition (bottom; $n = 12$ and 10 for WT and R222Q, respectively). (Right) Mean window tetrodotoxin-sensitive current density (30 μ M TTX), in the absence and presence of 30 μ M quinidine, of WT (thin line) and R222Q (bold line) channels and mean residual current ratio ($I_{max\ qui}/I_{max\ con}$) measured when the conductance was maximal, in each condition (at -43 mV, $n = 6$; and at -59 mV, $n = 7$, for WT and R222Q, respectively). Scale bar is 2 pA/pF, same voltage protocol as in C.

Our data demonstrate that a founder effect for the R222Q mutation in these 3 families is very unlikely.

EFFECTS OF R222Q MUTATION ON NAV1.5 CHANNEL FUNCTION IN COS-7 CELLS. To investigate the functional consequences of the R222Q mutation on the Na^+ channel activity, we used the whole-cell configuration of the patch-

clamp technique (Online Appendix: Results). The presence of the mutation did not modify the Na^+ current density (Figs. 4A and 4B, Online Table 1). The activation curve was shifted toward more negative potentials in the presence of the mutation (Fig. 4A, Online Table 1). Activation kinetics were accelerated in the mutant (Online Fig. 4A)

(2-way ANOVA, $p < 0.001$ vs. WT). Inactivation voltage sensitivity was also changed (Fig. 4B, Online Table 1), which, combined with the activation curve shift, predicted an increase of the window current availability (Online Fig. 5A). The maximum conductance of the tetrodotoxin-sensitive window current elicited by depolarizing-voltage ramps was not significantly different in R222Q Nav1.5 expressing cells, but the voltage at which the maximum conductance was measured was significantly shifted toward more negative values and the window current availability was increased when expressed as the area under the current-voltage curve (t test $p < 0.001$ and $p < 0.01$, respectively) (Online Table 1, Fig. 4C). Each of these changes caused a gain of function of the mutant channel. However, inactivation onset kinetics were also accelerated, causing a loss of function (Online Fig. 4B) (2-way ANOVA $p < 0.001$ vs. WT). Finally, kinetics of recovery from inactivation were not significantly modified by the R222Q mutation (Online Fig. 4C).

In order to understand the effects of hydroquinidine treatment on PVCs occurrence, we evaluated the WT and R222Q Na⁺ current sensitivity to quinidine, its active form. At a concentration at which the WT peak I_{Na} was about half-reduced (30 μ M in our conditions) (Online Table 2, Fig. 4D), WT and R222Q peak currents were similarly inhibited (2-way ANOVA $p < 0.001$ vs. control). When quinidine was tested on the window current, the inhibition was also similar in both groups when measured at the maximum conductance potential of each group (Fig. 4D, Online Table 2) (2-way ANOVA $p < 0.001$ vs. control). Therefore, WT and R222Q Na⁺ currents were equally sensitive to quinidine.

A MULTICELLULAR COMPUTER MODEL TO CHARACTERIZE THE MOLECULAR AND CELLULAR EVENTS LEADING TO PREMATURE VENTRICULAR CONTRACTIONS. Because of the multiple and opposite effects of the mutation on channel activation and inactivation, its net effect on the action potential (AP) is not straightforward. To get insights on this effect, we carried out computer simulations and evaluated the impact of the mutation on AP in single-cell models of human Purkinje fibers and ventricles. Single-cell models of Purkinje and ventricular cell AP were run in WT and heterozygous conditions. In heterozygous conditions, incomplete repolarization occurred in Purkinje cell AP, correlated with an increased late Na⁺ current (Online Fig. 6). The ventricular AP was much less affected (Online Fig. 6).

To evaluate the possibility of a causal role of the mutation on the generation of PVCs, we built a multicellular model incorporating both human cell models. In the WT condition, 1-Hz stimulation of the Purkinje fibers generated AP that propagated to the ventricle (Fig. 5Ba, Online Video 1A). Interestingly, in the heterozygous condition, incomplete repolarization in the Purkinje fibers triggered premature APs, propagating into the ventricles (Fig. 5Bb, Online Video 1B). Consistent with the disappearance of clinically observed PVCs during exercise, the triggered ventricular APs disappeared at higher pacing frequencies (2 Hz) (Fig. 2B, Online Video 2B).

Altogether, these results: 1) strongly suggest that the gain of function of the Na⁺ current predominantly affects the Purkinje cells; 2) explain the fact that the entire Purkinje system was affected resulting in a wide variety of ectopic foci; and 3) explain the frequency dependency of the PVCs.

Finally, the effects of quinidine were tested on the multicellular model. Clinically relevant effects of this drug are thought to be due to alteration of the Na⁺ current, the transient outward current I_{to} (27,28), and the repolarizing delayed rectifier current I_{Kr} (29,30). In addition, quinidine also inhibits Ca²⁺ and other K⁺ currents, although in a lower extent (31,32). Therefore, inhibition of these latter currents was not considered. In the model, the K⁺ currents were reduced in parallel with the heterozygous Na⁺ current. For the first test, we chose 10 μ M quinidine, the maximal therapeutic dose (i.e., preserving 50% I_{Na} , 30% I_{Kr} [33], and 30% I_{to} [28]). In this case, we observed a normalization of the Purkinje and ventricular AP course at 1 Hz (not shown). To evaluate the effects of a more “therapeutic” dose of quinidine, we ran the model with lower current inhibition levels. As illustrated for the ventricular AP in Figure 5B, the normalization was still observed when the computed quinidine dose was reduced to preserve 75% I_{Na} and 45% I_{Kr} and I_{to} . However, when the computed quinidine dose was further reduced to preserve 85% I_{Na} and 50% I_{Kr} and I_{to} , triggered APs reappeared. Qualitatively, if not quantitatively, the multicellular model mimics the cardiac response to hydroquinidine treatment.

Discussion

We report a novel autosomal dominant form of cardiac arrhythmia showing MEPPC. MEPPC syndrome is characterized by frequent PVCs originating from various ectopic foci along the fascicular-Purkinje system occasionally associated with NSVTs and sudden death. Some patients ($n = 9$) also presented with PACs, nonsustained atrial tachyarrhythmias, or paroxysmal AF. In some patients, arrhythmias were associated with mild DCM. Hydroquinidine markedly reduced the number of PVCs and normalized the left ventricular function in patients with DCM. We demonstrate that a fully penetrant *SCN5A* gain-of-function mutation is responsible for this new syndrome.

Specificity of MEPPC. Ventricular arrhythmias originating from left ventricular fascicles have been described previously in patients with or without structural heart disease (ischemic or idiopathic cardiomyopathies) (24,25,34,35). Accounting for up to 30% to 50% of arrhythmias in nonischemic DCM, bundle branch re-entrant VTs usually have an LBBB pattern and enlarged QRS complexes with a prolonged H-to-V interval during sinus rhythm (34). Such conduction abnormalities were not identified in any of our patients.

Fascicular VT is the most common form of idiopathic left ventricular tachycardia occurring more frequently in young males without structural heart disease and with a particular sensitivity to verapamil (24). The ECG characteristics of

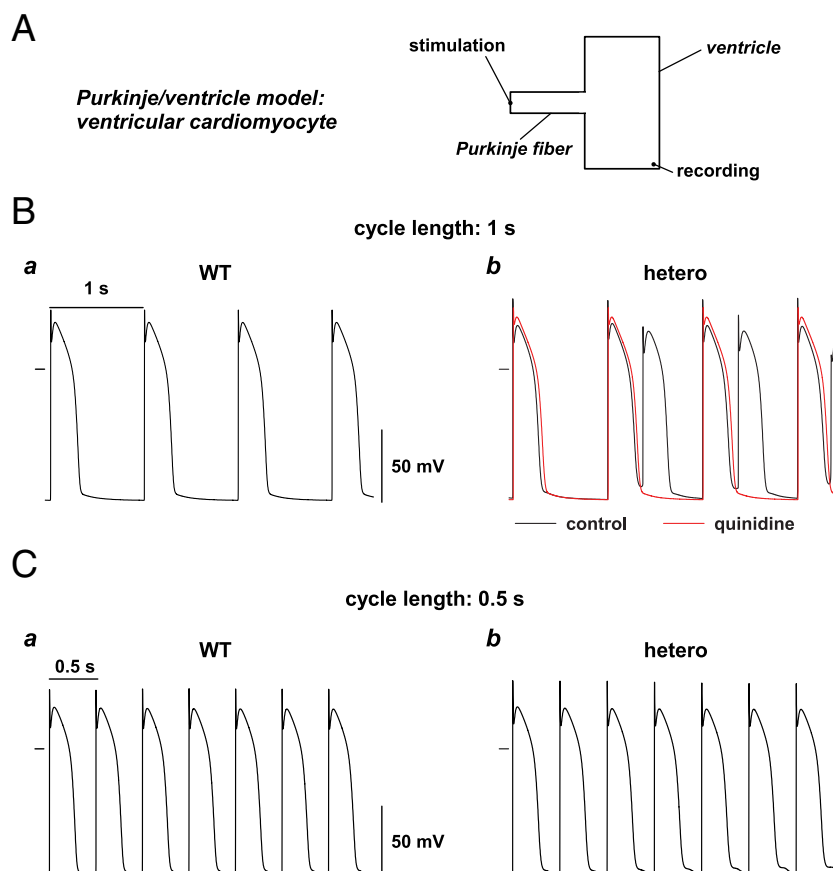


Figure 5 Effects of the R222Q Mutation on a Ventricular Cardiomyocyte AP Obtained in the Purkinje/Ventricle Model

(A) Dimensions of the calculation domain: Purkinje system 5×17.5 mm; ventricle 35×17.5 mm. Stimulation and recording sites are indicated. (B and C) Simulated action potential in a distal part of the ventricle in wild-type (WT) (a) and heterozygous (b) conditions with stimulation of a Purkinje cell at cycle length of 1 s (B) and 0.5 s (C); and in the presence of quinidine (Bb; i.e., remaining 75% heterozygous I_{Na} , 45% WT I_{to} and 45% WT I_{Kr} ; red) at 1 Hz. Also see Online Videos 1A, 1B, 2A, and 2B.

our patients were different. MEPPC syndrome was distinguished from PVCs originating from the posterior papillary muscle in the left ventricle (36) mainly by the presence of high-frequency potentials preceding local myocardial activation suggesting that Purkinje system was involved. Idiopathic VTs and bundle branch VTs typically present a single ECG morphology originating either near the posterior or the anterior left fascicle. In our patients, ECG characteristics demonstrated the varying origins of the PVCs, in either the left or right ventricle. Electrophysiological testing using a 3D endocardial navigation system clearly demonstrated that the PVCs originated from more than 10 different foci along the extension of the left anterior and posterior fascicles. This phenomenon was responsible for important changes in PVCs morphology (shape and axis) from one beat to another. Similar to triggered activities, the firing was fairly increased by isoproterenol infusion despite the increase in sinus rhythm at a lesser extent. As opposed to idiopathic fascicular VTs, which are well known to be highly sensitive to verapamil, this treatment had no effect on

the tested affected family members. Atrial arrhythmias were less frequently observed than PVCs.

R222Q mutation causes the syndrome in 3 unrelated families. Several findings support the causative role of the R222Q *SCN5A* mutation in the pathogenesis of the disease in the 3 reported families: 1) the complete cosegregation of the mutation with the disease phenotype; 2) the identification of the same mutation in 3 unrelated families with a remarkably uniform phenotype; 3) the absence of the mutation in 300 ethnically matched control individuals; and 4) the high conservation of the R222 residue across species (Fig. 1C).

R222Q has been reported in a single patient with a Brugada syndrome (37). With the help of Dr. Xavier Waintraub (Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France) and the kind permission of Dr. Pascale Guicheney (INSERM UMR S956, Paris, France), we had the opportunity to re-evaluate the phenotype of this patient. He was clearly not affected by the Brugada syndrome, his ECG presenting no ST-segment elevation in the precordial leads. His phenotype appeared to be very closed to that of MEPPC syn-

drome with permanent junctional activity, very frequent multifocal ventricular premature beats (57,000 thin ventricular premature beats per day coming from left anterior and posterior fascicles), atrial arrhythmias, and dilated cardiomyopathy with moderated alteration of the ventricular contraction (LVEF 56%) (X. Waintraub, personal communication, September 2011). His familial history found that his mother and grandmother were also affected by DCM associated with frequent PVCs. None of the ECGs performed in patients harboring the *SCN5A* R222Q mutation met the ST-segment criteria for a Brugada syndrome.

The same *SCN5A* mutation was also detected in a cohort of 2,500 unrelated cases referred for LQTS genetic testing (38). However, none of the patients from the 3 families here presented a prolonged QTc. This may be explained by the relatively less impaired biophysical properties of the R222Q channel, mostly a negative shift of the window current, when compared with that of already reported LQT3-related mutants (5,39).

R222Q effects that we report on channel parameters were similar to those measured by Cheng *et al.* (40). In addition, we show that these effects are intermediate in the heterozygous state and that they also impair the window current, crucial during the AP plateau phase.

Looking for a mechanistic link between the genotype and the phenotype, we simulated the effect of the mutated channel activity on the Purkinje and ventricular electrical activity. Two points suggest that the shift in Nav1.5 voltage dependency is responsible for the premature ventricular contractions originating from the fascicular-Purkinje system. First of all, 1 of the particularities of this arrhythmia is that ectopic foci were observed in erratic locations of the Purkinje system, which made radiofrequency applications ineffective. The multicellular model shows that the impaired function of the Na⁺ channels, anywhere in the Purkinje system, is sufficient enough to trigger premature APs in the surrounding ventricular tissue. Second of all, consistent with the disappearance of MEPPC clinically observed during exercise, the triggered ventricular APs disappeared at higher pacing frequencies.

Therefore, the model confirms the mechanism by which the Na⁺ channel alteration is responsible for the patients' phenotype.

Dilated cardiomyopathy is a secondary consequence of the mutation. *SCN5A* R222Q mutation was already detected in a few patients referred for familial or idiopathic DCM (13,40–42). However, in all previously reported R222Q carriers, DCM was always associated with MEPPC-related ECG patterns. McNair *et al.* (13) identified 5 *SCN5A* mutations among 338 patients affected by DCM (13). Among them, 2 were carriers of the R222Q mutation and in both cases patients were affected by frequent PVCs (>1,000/h) and NSVT. Morales *et al.* (42) investigated patients affected by peripartum cardiomyopathy and identified a family carrying the R222Q mutation, affected by DCM (42). In this family, 4 of 6 carriers were also affected by ventricular or supraventricular tachycardia

(for 1 patient no information was available). In the families reported here, DCM was diagnosed in 6 individuals, and is very likely a consequence of the arrhythmia, and not directly linked to the mutation. Indeed, 13 patients affected by MEPPC, carriers of the R222Q *SCN5A* mutation, were not affected by DCM. Most importantly, the cardiomyopathy recovered at least partially under antiarrhythmic treatment after having reduced the number of PVCs. The low penetrance of the associated DCM phenotype in these families suggests that the genetic background may play a role in the clinical evolution of the disease as now admitted even for monogenic cardiac arrhythmias (43).

Several other *SCN5A* mutations associated with familial DCM-arrhythmia syndrome have also been described (R814W, D1275N, T220I, and D1595H) (10–12). In these mutation carriers, predominant clinical findings were mainly sinus bradycardia, atrioventricular block, atrial fibrillation, and/or atrial flutter, phenotypes quite different from the MEPPC syndrome. Therefore, our work does not rule out that DCM may be a primary consequence of other *SCN5A* mutations.

Hydroquinidine-based therapy. Because the treatment of the affected patients with hydroquinidine has been proven to be effective on PVCs, we investigated the effects of quinidine on the Na⁺ currents and observed equivalent inhibition of WT- and R222Q Nav1.5-mediated currents. Despite the fact that we did not consider the use dependence of quinidine activity (44,45), the multicellular model recapitulates the effects of quinidine on PVCs suppression. Altogether, these results reinforce our hypothesis of MEPPC being the primary consequence of *SCN5A* R222Q mutation. Furthermore, it offers a potentially efficient therapy to limit the symptoms for *SCN5A* R222Q carriers. However, it remains to be shown that the treatment may limit the risk of sudden death.

Acknowledgments

The authors thank André Terzic, University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota, for *ABCC9* sequencing and Béatrice Leray, l'institut du thorax, Nantes, France, for expert technical assistance with cell culture.

Reprint requests and correspondence: Dr. Gabriel Laurent, Service de Cardiologie, 2 Boulevard Maréchal De Lattre de Tassigny, 21079 Dijon Cedex, France. E-mail: gabriel.laurent@chu-dijon.fr.

REFERENCES

1. Kaufman ES. Mechanisms and clinical management of inherited channelopathies: long QT syndrome, Brugada syndrome, catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, and short QT syndrome. *Heart Rhythm* 2009;6:S51–5.
2. Mohler PJ, Schott JJ, Gramolini AO, *et al.* Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature* 2003;421:634–9.
3. Watanabe H, Koopmann TT, Le Scouarnec S, *et al.* Sodium channel beta1 subunit mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans. *J Clin Invest* 2008;118:2260–8.

4. Hedley PL, Jorgensen P, Schlamowitz S, et al. The genetic basis of long QT and short QT syndromes: a mutation update. *Hum Mutat* 2009;30:1486–511.
5. Zimmer T, Surber R. SCN5A channelopathies—an update on mutations and mechanisms. *Prog Biophys Mol Biol* 2008;98:120–36.
6. Tfelt-Hansen J, Winkel BG, Grunnet M, Jespersen T. Inherited cardiac diseases caused by mutations in the Nav1.5 sodium channel. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2010;21:107–15.
7. Rook MB, Bezzina AC, Groenewegen WA, et al. Human SCN5A gene mutations alter cardiac sodium channel kinetics and are associated with the Brugada syndrome. *Cardiovasc Res* 1999;44:507–17.
8. Schott JJ, Alshinawi C, Kyndt F, et al. Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A. *Nat Genet* 1999;23:20–1.
9. Probst V, Kyndt F, Potet F, et al. Haploinsufficiency in combination with aging causes SCN5A-linked hereditary Lenegre disease. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:643–52.
10. Olson TM, Michels VV, Ballew JD, et al. Sodium channel mutations and susceptibility to heart failure and atrial fibrillation. *JAMA* 2005;293:447–54.
11. McNair WP, Ku L, Taylor MR, et al. SCN5A mutation associated with dilated cardiomyopathy, conduction disorder, and arrhythmia. *Circulation* 2004;110:2163–7.
12. Nguyen TP, Wang DW, Rhodes TH, George AL, Jr. Divergent biophysical defects caused by mutant sodium channels in dilated cardiomyopathy with arrhythmia. *Circ Res* 2008;102:364–71.
13. McNair WP, Sinagra G, Taylor MR, et al. SCN5A mutations associate with arrhythmic dilated cardiomyopathy and commonly localize to the voltage-sensing mechanism. *J Am Coll Cardiol* 2011;57:2160–8.
14. Remme CA, Wilde AA, Bezzina CR. Cardiac sodium channel overlap syndromes: different faces of SCN5A mutations. *Trends Cardiovasc Med* 2008;18:78–87.
15. Wolf CM, Wang L, Alcalai R, et al. Lamin A/C haploinsufficiency causes dilated cardiomyopathy and apoptosis-triggered cardiac conduction system disease. *J Mol Cell Cardiol* 2008;44:293–303.
16. Bienengraeber M, Olson TM, Selivanov VA, et al. ABCC9 mutations identified in human dilated cardiomyopathy disrupt catalytic KATP channel gating. *Nat Genet* 2004;36:382–7.
17. Genin E, Tullio-Pelet A, Begout F, Lyonnet S, Abel L. Estimating the age of rare disease mutations: the example of Triple-A syndrome. *J Med Genet* 2004;41:445–9.
18. Allouis M, Le Bouffant F, Wilders R, et al. 14-3-3 is a regulator of the cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5. *Circ Res* 2006;98:1538–46.
19. DiFrancesco D, Noble D. A model of cardiac electrical activity incorporating ionic pumps and concentration changes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1985;307:353–98.
20. Iyer V, Mazhari R, Winslow RL. A computational model of the human left-ventricular epicardial myocyte. *Biophys J* 2004;87:1507–25.
21. Keener J, Sneyd J. *Mathematical Physiology*. 2nd edition. New York, NY: Springer, 2001.
22. Aslanidi OV, Stewart P, Boyett MR, Zhang H. Optimal velocity and safety of discontinuous conduction through the heterogeneous Purkinje-ventricular junction. *Biophys J* 2009;97:20–39.
23. Kampmann C, Wiethoff CM, Wenzel A, et al. Normal values of M mode echocardiographic measurements of more than 2000 healthy infants and children in central Europe. *Heart* 2000;83:667–72.
24. Nogami A, Naito S, Tada H, et al. Demonstration of diastolic and presystolic Purkinje potentials as critical potentials in a macroreentry circuit of verapamil-sensitive idiopathic left ventricular tachycardia. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:811–23.
25. Reithmann C, Hahnefeld A, Ulbrich M, Matis T, Steinbeck G. Different forms of ventricular tachycardia involving the left anterior fascicle in nonischemic cardiomyopathy: critical sites of the reentrant circuit in low-voltage areas. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2009;20:841–9.
26. Tanner H, Hindricks G, Volkmer M, et al. Catheter ablation of recurrent scar-related ventricular tachycardia using electroanatomical mapping and irrigated ablation technology: results of the prospective multicenter Euro-VT-study. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2010;21:47–53.
27. Imaizumi Y, Giles WR. Quinidine-induced inhibition of transient outward current in cardiac muscle. *Am J Physiol* 1987;253:H704–8.
28. Wang Z, Ferrini B, Nattel S. Effects of flecainide, quinidine, and 4-aminopyridine on transient outward and ultrarapid delayed rectifier currents in human atrial myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;272:184–96.
29. Roden DM, Bennett PB, Snyders DJ, Balser JR, Hondeghem LM. Quinidine delays IK activation in guinea pig ventricular myocytes. *Circ Res* 1988;62:1055–8.
30. Sanchez-Chapula JA, Ferrer T, Navarro-Polanco RA, Sanguinetti MC. Voltage-dependent profile of human ether-a-go-go-related gene channel block is influenced by a single residue in the S6 transmembrane domain. *Mol Pharmacol* 2003;63:1051–8.
31. Salata JJ, Wasserstrom JA. Effects of quinidine on action potentials and ionic currents in isolated canine ventricular myocytes. *Circ Res* 1988;62:324–37.
32. Iost N, Virag L, Varro A, Papp JG. Comparison of the effect of class IA antiarrhythmic drugs on transmembrane potassium currents in rabbit ventricular myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2003;8:31–41.
33. Wu L, Guo D, Li H, et al. Role of late sodium current in modulating the proarrhythmic and antiarrhythmic effects of quinidine. *Heart Rhythm* 2008;5:1726–34.
34. Lopera G, Stevenson WG, Soejima K, et al. Identification and ablation of three types of ventricular tachycardia involving the His-Purkinje system in patients with heart disease. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2004;15:52–8.
35. Rodriguez LM, Smeets JL, Timmermans C, Trappe HJ, Wellens HJ. Radiofrequency catheter ablation of idiopathic ventricular tachycardia originating in the anterior fascicle of the left bundle branch. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1996;7:1211–6.
36. Doppalapudi H, Yamada T, McElderry HT, Plumb VJ, Epstein AE, Kay GN. Ventricular tachycardia originating from the posterior papillary muscle in the left ventricle: a distinct clinical syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2008;1:23–9.
37. Kapplinger JD, Tester DJ, Alders M, et al. An international compendium of mutations in the SCN5A-encoded cardiac sodium channel in patients referred for Brugada syndrome genetic testing. *Heart Rhythm* 2010;7:33–46.
38. Kapplinger JD, Tester DJ, Salisbury BA, et al. Spectrum and prevalence of mutations from the first 2,500 consecutive unrelated patients referred for the FAMILION long QT syndrome genetic test. *Heart Rhythm* 2009;6:1297–303.
39. Makita N. Phenotypic overlap of cardiac sodium channelopathies: individual-specific or mutation-specific? *Circ J* 2009;73:810–7.
40. Cheng J, Morales A, Siegfried JD, et al. SCN5A rare variants in familial dilated cardiomyopathy decrease peak sodium current depending on the common polymorphism H558R and common splice variant Q1077del. *Clin Transl Sci* 2010;3:287–94.
41. Hershberger RE, Parks SB, Kushner JD, et al. Coding sequence mutations identified in MYH7, TNNT2, SCN5A, CSRP3, LBD3, and TCAP from 313 patients with familial or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Clin Transl Sci* 2008;1:21–6.
42. Morales A, Painter T, Li R, et al. Rare variant mutations in pregnancy-associated or peripartum cardiomyopathy. *Circulation* 2010;121:2176–82.
43. Roden DM. Human genomics and its impact on arrhythmias. *Trends Cardiovasc Med* 2004;14:112–6.
44. Snyders DJ, Hondeghem LM. Effects of quinidine on the sodium current of guinea pig ventricular myocytes. Evidence for a drug-associated rested state with altered kinetics. *Circ Res* 1990;66:565–79.
45. Yang T, Roden DM. Extracellular potassium modulation of drug block of IKr. Implications for torsade de pointes and reverse use-dependence. *Circulation* 1996;93:407–11.

Key Words: arrhythmia ■ Purkinje fibers ■ SCN5A ■ ventricular tachycardia.

APPENDIX

For expanded Methods and Results sections, as well as supplemental tables, figures, and videos, please see the online version of this article.

Multifocal Ectopic Purkinje Premature Contractions: a new SCN5A-related cardiac channelopathy

Gabriel Laurent, MD, PhD, Samuel Saal, MD, Mohamed Yassine Amarouch, PhD, Delphine M Beziau, MSc, Roos FJ Marsman, MSc, Laurence Faivre, MD, PhD, Julien Barc, PhD, Christian Dina, PhD, Geraldine Bertaux, MD, Olivier Barthez, MD, Christel Thauvin-Robinet, MD, PhD, Philippe Charron, MD, PhD, Véronique Fressart, MD, PhD, Alice Maltret, MD, Elisabeth Villain, MD, Estelle Baron, BA, Jean Mérot, PhD, Rodolphe Turpault, PhD, Yves Coudière, PhD, Flavien Charpentier, PhD, Jean Jacques Schott, PhD, Gildas Loussouarn, PhD, Arthur A. M. Wilde, MD, PhD, Jean Eric Wolf, MD, PhD, Isabelle Baró, PhD, Florence Kyndt, PharmD, PhD, Vincent Probst, MD, PhD.

ONLINE DATA SUPPLEMENT

SUPPLEMENTAL METHODS

Mutation analysis

The proband (III.1) of family 1 was screened for mutations in *LMNA* encoding lamin A/C, *ABCC9* encoding SUR2A and *SCN5A*. All 12 coding exons and intronic junctions of *LMNA* were amplified and scanned using an HRMA/sequencing method (conditions available under request) using the Light-Cycler® 480 High Resolution Melting Master kit according to the manufacturer's instructions (Roche Applied Science, Meylan, France) and further scanned by HRM analysis. PCR products showing divergent HRM profiles were purified and directly sequenced on both strands using the BigDye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Forster City, CA). After purification, sequencing products were applied onto an ABI 3730 automatic sequencer (Applied Biosystems). Screening for mutation in *ABCC9* gene was performed as previously described (1).

Screening for mutation in *SCN5A* was performed by a polymerase chain reaction amplification of coding regions and flanking intronic sequences (primers sequences available under requests) followed by bidirectional sequencing of amplicons using the BigDye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Forster City, CA). After purification, sequencing products were applied onto on an ABI PRISM 3730 DNA sequence detection system (Applied Biosystems).

Exon 6 of *SCN5A*, which includes the c.665G>A transition, was amplified from genomic DNA of family 1 and 2 members with primers CACCCCCTTTCCTCCTCT and CCAGGCATATCCCTCTAGCC. The purified PCR product was sequenced using BigDye Terminator 3.1 (Applied Biosystems) chemistry.

For family 3, exon 6 of *SCN5A* was amplified from genomic DNA of the proband II-3 and the purified PCR product similarly sequenced. The sequence variant present in all affected family members was further confirmed by digestion with *HinfI* (New England BioLabs, Beverly, MA). *HinfI* digests the fragment containing c.665G but does not digest that with c.665A.

Six hundred Caucasian control chromosomes from Human Random Control (HRC) panels were screened for the presence of the c.665G>A transition using HRM (High Resolution Melting) assay on the LightCycler 480 System (Roche) and the same primers.

Haplotype Analysis

To ascertain whether there is a common disease haplotype for the R222Q mutation of the *SCN5A* gene in the two families with MEPT, and estimate the low limit of the most recent common ancestor, 10 microsatellite markers around the *SCN5A* gene (D3S1759, D3S2432, D3S3047, D3S3512, D3S1298, intragenic *SCN5A* marker, D3S3521, D3S3527, D3S3522 and D3S3559) were genotyped in individuals from the 3 families. Haplotype analysis was performed in 12 members of family 1 (9 affected), 3 members of family 2 (2 affected) and 3 members of family 3 (3 affected).

The primer sequences were obtained from Ensembl (www.ensembl.org) except for the intragenic marker. Each marker was amplified by PCR and the sense primers were 5'-end labeled with fluorescence (R6G and R110-dCTP, Perkin Elmer).

PCR was performed under the following conditions: denaturation at 94°C for 3 min; 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 55°C for 30 sec, and extension at 72°C for 1 min; final extension at 72°C for 10 min. Alleles were submitted to electrophoresis using an ABI PRISM 3730 DNA analyser, (PE Applied Biosystems), with ROX-500 size standard (PE Applied Biosystems). Genotype

analysis was automated using GeneMapper software, version 4.0 (PE Applied Biosystems).

We estimated the age of the mutation using the Genin and collaborators method (2), based on the length of identity by state segments around the mutation. This method identifies the closest markers at which the two affected individuals do not share any allele on either side. The likelihood is built on the number of recombination events between the mutation and the neighboring genetic markers, with a correction through the possibility of mutation. Because we did not have even a single common allele in the haplotypic background of families 1 and 2, we created two dummy markers, with shared common allele by both affected individuals at a recombination fraction $\theta=0.0001$ both upstream and downstream the mutation. Thus, we were aiming at finding a lower threshold to the number of generations to the most recent common ancestor. We adopted a micro-satellite mutation rate of $m=3.10^{-3}$ (using the Stepwise Mutation Model), as proposed in the literature (3). It is noteworthy that the time to the Most Recent Common Ancestor is not necessarily the time to the mutation occurrence. Therefore, our number of generations is also a lower bound for the age of the allele.

Site-directed mutagenesis

Site-directed mutagenesis was performed on pCI-SCN5A (4) using the Quick-Change site-directed mutagenesis kit (Stratagene) according to the manufacturer's instructions. The construct was completely sequenced to ensure that there was no other mutation.

Cellular electrophysiology

The African green monkey kidney fibroblast-like cell line (COS-7) was obtained from the American Type Culture Collection and cultured as previously described (5). Cells were transfected with DNA complexed to JetPEI (Polyplus-transfection) according to the manufacturer's instructions. Relative DNA concentrations were 10% pCI-Nav1.5 (RefSeq NG_008934.1) WT or R222Q, or 5% of each for the heterozygous condition), 10% pRC-h β 1 (4) and 80% pEGFP (Clontech). The resulting Nav1.5 protein is the splice variant containing H 558 and Q1077 amino acids. At eight hours post-transfection, the cells were isolated and seeded in plastic Petri dishes at low density. At twenty-four hours post-transfection, whole-cell currents were recorded at room temperature using the patch-clamp technique. The cells were continuously superfused with Tyrode solution containing (in mmol/L): NaCl 145, KCl 4, MgCl₂ 1, CaCl₂ 1, HEPES 5, glucose 5, pH adjusted to 7.4 with NaOH. Wax-coated pipettes (tip resistance: 1.8 to 3 M Ω) were filled with intracellular medium containing (in mmol/L): NaCl 10, CsCl 64.5, aspartic acid 70.5, HEPES 5, pH adjusted to 7.2 with CsOH. During data recording, the studied cell was locally superfused with extracellular medium containing (in mmol/L): NaCl 145, CsCl 4, CaCl₂ 1, MgCl₂ 1, HEPES 5, glucose 5, pH adjusted to 7.4 with NaOH with 30 μ M quinidine or 30 μ M tetrodotoxin (TTX) when needed. All products were purchased from Sigma, except TTX, provided by Tocris Bioscience. Stimulation, data recording through an A/D converter (Tecmar TM100 Labmaster, Scientific Solutions; 5 kHz filtering), and analysis were performed with Acquis1 software (Bio-Logic). All current measurements were normalized using the cell capacitance. Capacitance and series resistances were compensated (60-70% compensation) to obtain minimal contribution of capacitive transients using an Axopatch 200A amplifier (Axon Instruments, Inc).

Mathematical modeling of ventricular and Purkinje action potentials

Single-cell models

The same strategy was used for both models of the human Purkinje cells (6) and left-ventricular myocytes (7). The equations corresponding to the Na^+ current were iteratively modified to reproduce the relative variation of 8 parameters due to the R222Q mutation (i.e. peak amplitude at -20 mV, half-activation potential, activation slope, time to peak at -20 mV, half-inactivation potential, inactivation slope and the kinetics of inactivation at -35 mV and recovery from inactivation at -100 mV). The other currents generating the action potential were not modified.

In the Purkinje cell model, the effects of the R222Q mutation were simulated by (i) modifying α_m and β_m to recapitulate the shift in the activation curve and (ii) modifying β_h to recapitulate the shift in the inactivation with no change in the recovery from inactivation. The WT and R222Q Na^+ current formulations followed the DiFrancesco and Noble model (6) as such:

WT	R222Q
$\alpha_h = 20 \times \exp(-0.125 \times (V + 75))$	$\alpha_h = 20 \times \exp(-0.125 \times (V + 75))$
$\beta_h = 2000 / (320 \times \exp(-0.1 \times (V + 75)) + 1)$	$\beta_h = 2000 / (320 \times \exp(-0.1 \times (V + 75 + \mathbf{10})) + 1)$
$\alpha_m = 200 \times (V + 41) / (1 - \exp(-0.1 \times (V + 41)))$	$\alpha_m = 200 \times (V + 41 + \mathbf{shift}) / (1 - \exp(-0.1 \times (V + 41 + \mathbf{shift})))$
$\beta_m = 8000 \times \exp(-0.056 \times (V + 66))$	$\beta_m = 8000 \times \exp(-0.056 \times (V + 66 + \mathbf{shift}))$

where “shift” was set to 12 to best fit the shift in the activation curve. This value was also used in the multicellular model. But interestingly, in the unicellular model, an excessive Na^+ window current prevented repolarization and the value had to be decreased to 9 to observe an action potential.

To mimic the heterozygous condition, the Na^+ current resulted from the summation of half the WT current and half the R222Q current.

In the ventricular cell model, the effects of the R222Q mutation were simulated (i) by modifying all the forward transitions ($\alpha, \beta, \gamma, \gamma\gamma, \eta$) to recapitulate the shift in the activation curve and (ii) by decreasing the inactivation/activation coupling factor to recapitulate the smaller shift in the inactivation curve with no change in the recovery from inactivation kinetics. The WT and R222Q Na⁺ current formulation followed model (7) as such:

WT	R222Q
$\alpha = 26 \times \exp(0.011 \times V)$	$\eta = 26 \times \exp(0.011 \times (V+11))$
$\beta = 0.036 \times \exp(-0.090 \times V)$	$\beta = 0.036 \times \exp(-0.090 \times (V+11))$
$\gamma = 590 \times \exp(0.110 \times V)$	$\gamma = 590 \times \exp(0.110 \times (V+11))$
$\gamma\gamma = 2.6 \times \exp(0.030 \times V)$	$\gamma\gamma = 2.6 \times \exp(0.030 \times (V+11))$
$\eta = 26 \times \exp(0.084 \times V)$	$\eta = 26 \times \exp(0.084 \times (V+11))$
$a = 1.4004$	$a = \mathbf{1.21}$

The other transition constants were not changed.

Both the Purkinje and ventricular Na⁺ currents were modeled with Model Maker v4.0 (AP Benson, Wallingford, UK) and with a home-made program running on C++. The action potentials (APs) were modeled with a home-made program running on C++.

Multicellular model

Both models of the human left-ventricular subepicardial myocytes and Purkinje cells were incorporated in a multicellular model. In this model, the propagation of the electrical waves in the cardiac tissues was described by a monodomain model (8).

The membrane potential is described by a variable V following the partial differential equation:

$$A_m C_m \frac{\partial V}{\partial t} - \nabla \cdot (D \nabla V) = A_m I_{ion}$$

Where t is the time in s, V is the transmembrane potential in mV, A_m is the ratio of membrane surface per cell volume unit [$1e3 \text{ cm}^{-1}$], C_m is the membrane capacitance per surface unit [$1e-3 \text{ mF.cm}^{-2}$], and D is the average electrical conductivity of the tissue [20 mS.cm^{-1} in Purkinje cells, and 1.3 mS.cm^{-1} in ventricular cells]. The ionic current per surface unit I_{ion} [$\mu\text{A.cm}^{-2}$] was computed according to the models introduced above. The values of D were adjusted to obtain a propagation speed in the range of around 180 cm/s in the Purkinje system, and 90 cm/s in the ventricle. The numerical simulations were performed on a simplified 2D slice model described previously (9). The pacing site was located at the proximal part of the Purkinje fiber (see Figure. 5). The ordinary differential equations of the ionic model were integrated by a mixed explicit-implicit method, with a $1\text{-}\mu\text{s}$ step. To mimic the quinidine effects, I_{Na} , I_{to} and I_{Kr} were reduced based on the results of Wu (10;11;12) for I_{Na} and I_{Kr} , and Wang (13) for I_{to} . For the first test, we chose $10 \text{ }\mu\text{M}$ quinidine, the maximal therapeutic dose *i.e.* preserving 50% I_{Na} , 30% I_{Kr} (12) and 30% I_{to} (13). Assuming that the mimicked doses were in the linear zone of the concentration-dose relationship for inhibition of the different ion currents, we also computed the consequences of preserving 75% I_{Na} and 45% I_{Kr} and I_{to} and of 85% and 50%, respectively. The computations were performed on a mesh with 2225 vertices using the cluster from the *Centre de Calcul Intensif des Pays de Loire*.

SUPPLEMENTAL RESULTS

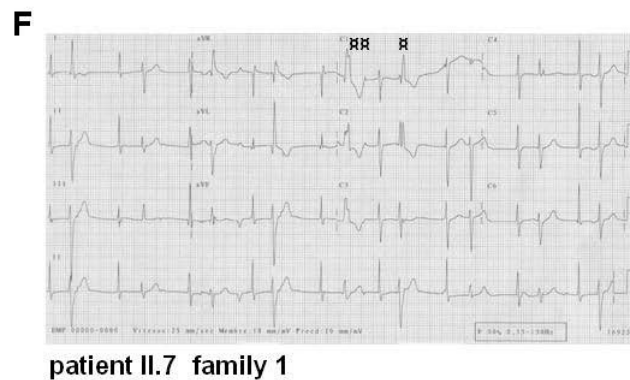
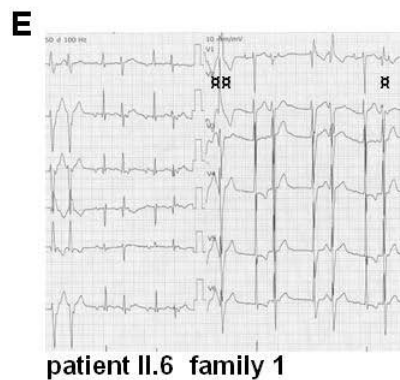
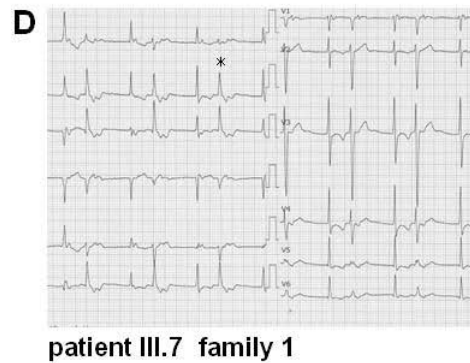
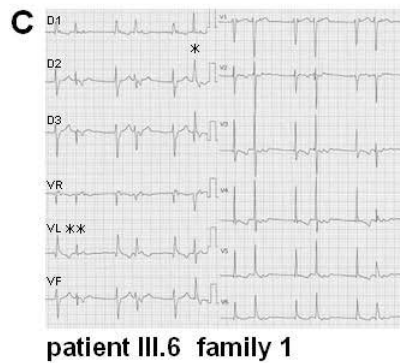
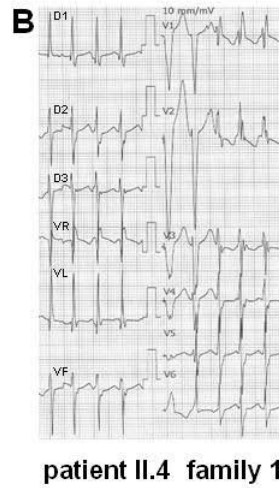
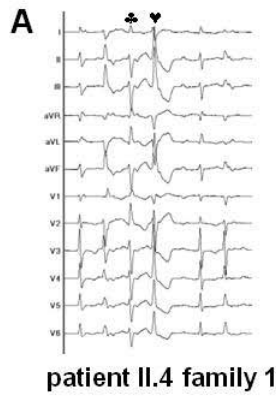
Haplotype analysis

The alleles of 4 SCN5A flanking markers (D3S3512, D3S1298, D3S3521, D3S3527) and of the intragenic SCN5A marker were shared by the affected individuals in each family, but differed between the families 1 and 2, and 2 and 3. These results indicate that the cosegregating haplotype was different in each of these families, suggesting independent mutations origin. Using the method of Genin and collaborators, we found at least 126 generations from a hypothetical most recent common ancestor (95% confidence interval from 37 to 464 generations) for families 1 and 2. Such an ancient common origin does not fit with the fact that the observed mutation allele frequency is below 9.10^{-3} (higher bound confidence interval for no observation in 300 control individuals). The probands of families 1 and 3 shared at least two frequent microsatellite alleles (D3S1298 and D3S3512) but not the rare intragenic one. As a conclusion, families 1 and 3 may be at least 28-generation distantly related.

Computer modeling shows that ventricular cells better tolerate the mutation than Purkinje cells.

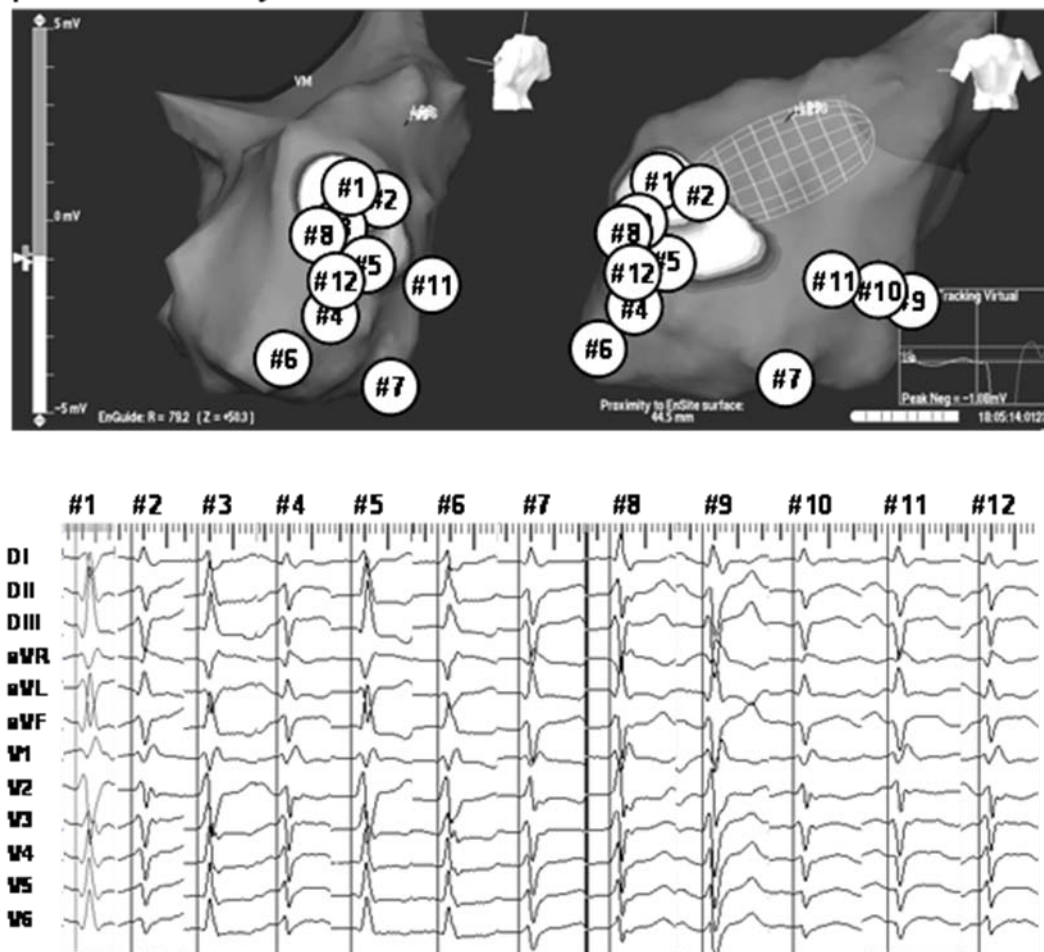
To get insights on the R222Q mutation effect on the action potentials (APs) at a cellular scale, we carried out computer simulations to evaluate the impact of the mutation on the Na^+ current in unicellular models of Purkinje and ventricular cells (6-7). The models modifications operated to mimic the mutation-induced changes in the Na^+ current have been detailed in the Supplemental Methods section. The relative shift in activation and inactivation curves in the heterozygous state, as well as all other changes of the biophysical parameters were compared to those experimentally measured in heterozygous state. Despite that the transfected cell population may be a mixture of cells expressing mainly WT, R222Q or both Nav1.5 channels, the experimental 'heterozygous' parameters were successfully reproduced in both the Purkinje (Supplemental Figure 5B) and ventricular (Supplemental Figure 5C) cell

models. Interestingly, when the equations mimicking the heterozygous state of the patients were introduced into the ventricular cell model, minor changes in AP morphology were observed (Supplemental Figure 6). Conversely, when the equations mimicking the heterozygous state were introduced in the Purkinje cell model, the effect was drastic: AP could not be induced (not shown). AP could be generated only if the shift in the activation curve was reduced (4 instead of 6 mV), in order to limit the Na^+ current increase (Supplemental Figure 6). But AP morphology was still highly affected. This disappeared at higher pacing rates, consistent with PVCs disappearing during exercise (Supplemental Figure 6).



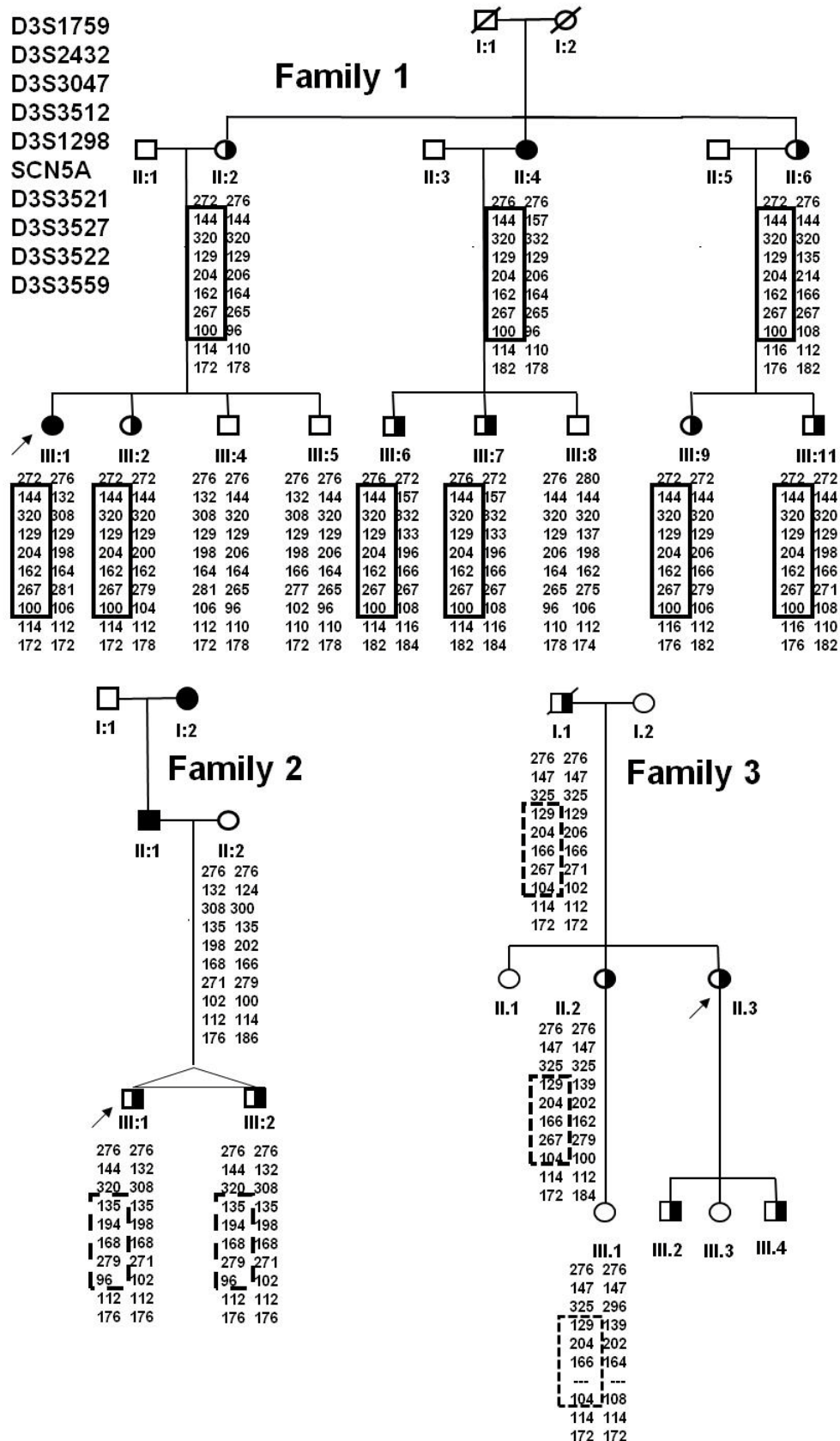
Supplemental Figure 1. Representative ECGs of family 1. Some patients (**A**) had PVC with RBBB patterns and alternant extreme variations in the axis from right (♣) to left (♥), from beat to beat. Recurrent monomorphic non-sustained ventricular tachyarrhythmia (NSVT) (**B**), and slightly polymorphic NSVT were also observed. In some patients, PVCs were relatively narrow QRS complexes (**C-D**), very similar to either sinus or junctional complexes with slight variations in the left axis from $+60^\circ$ (*) to -30° (**). In some patients (**E-F**), PVCs had RBBB patterns with various widths from relatively narrow (⊠) to wide QRS complexes (⊠⊠).

patient III.1 family 1



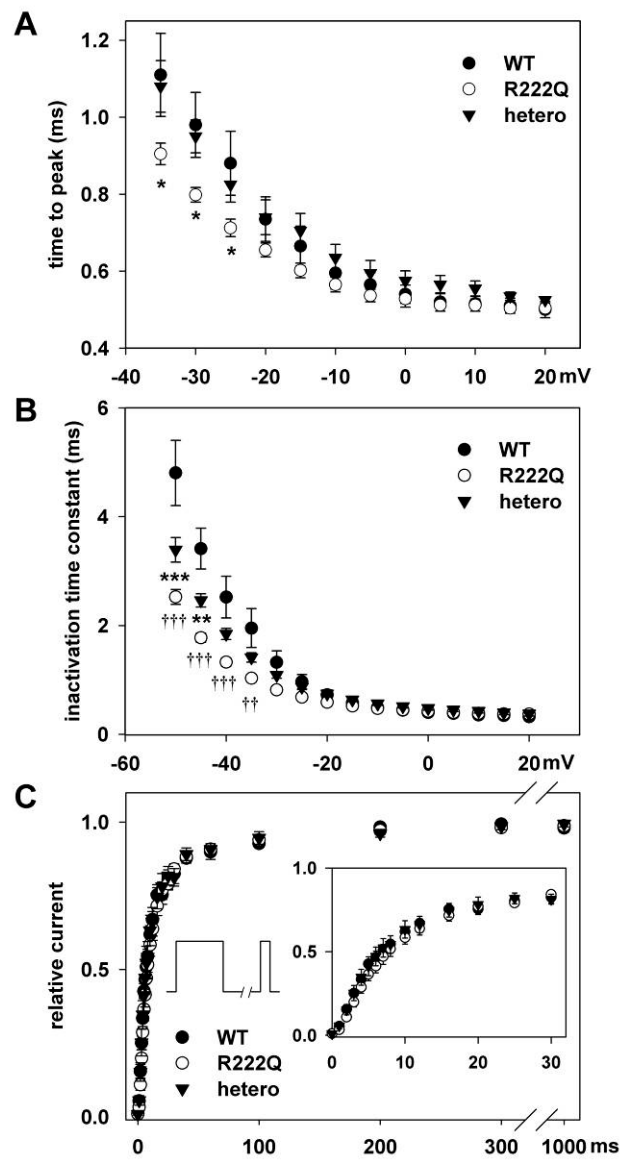
Supplemental Figure 2. Endocardial electroanatomic mapping of the left ventricle.

Activation mapping of 12 different PVCs in patient III.1 (family 1). A Multi-array balloon (NavX system) helped us to pinpoint the precise location of ectopic foci along the anterior and posterior regions of the left ventricle corresponding to the extension of the left anterior and posterior fascicles.

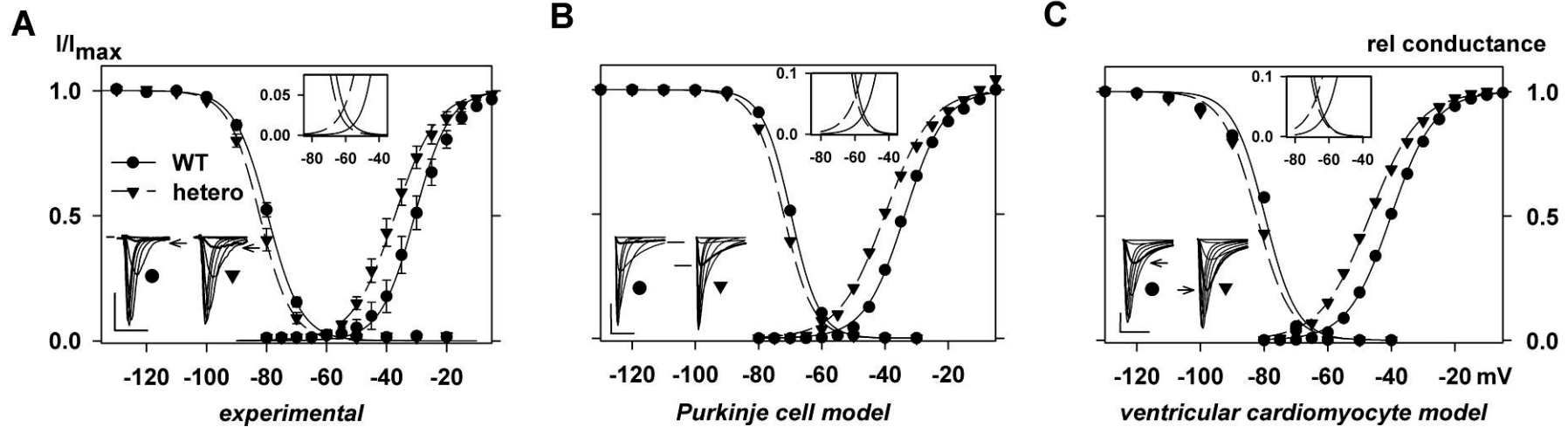


Supplemental Figure 3. Haplotype analysis of chromosome 3 in selected members for families 1, 2 and 3. Females are represented by circles and males are

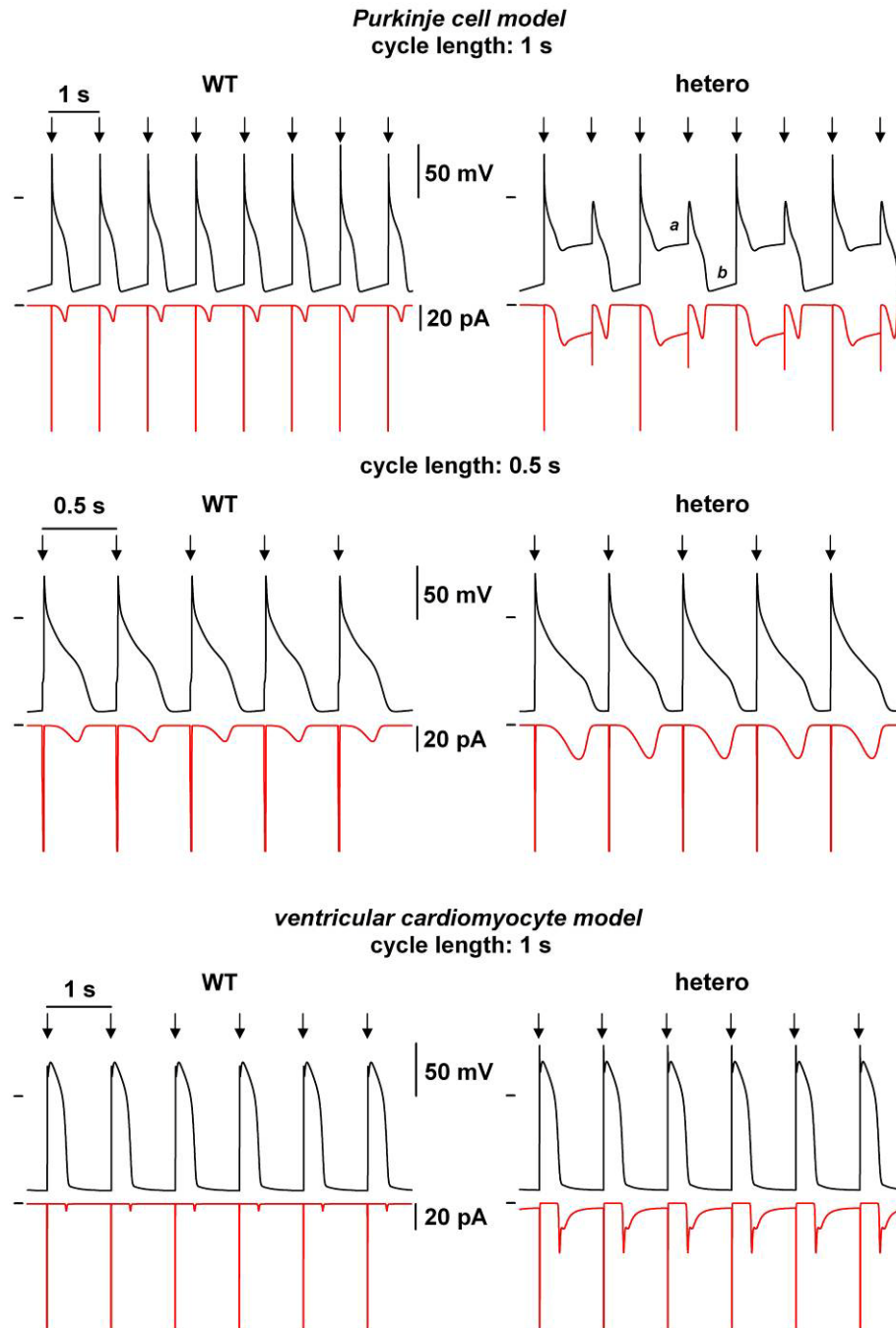
represented by squares. Members affected with arrhythmia are indicated with a half-filled symbol. Members affected with arrhythmia and dilated cardiomyopathy (DCM) are indicated in black. Ten microsatellite markers (D3S1759, D3S2432, D3S3047, D3S3512, D3S1298, intragenic *SCN5A* marker, D3S3521, D3S3527, D3S3522 and D3S3559) spanning the region of chromosome 3 where the *SCN5A* gene lies, were analyzed. The disease-associated haplotype is indicated by a black frame. The disease haplotype in family 2 differed from that in family 1, showing that the R222Q mutation has arisen independently in these two families. Common alleles of two microsatellites are shared by families 1 and 3 implying a possible most recent common ancestor at least 28 generations earlier.



Supplemental Figure 4. Experimental effects of R222Q mutation on Nav1.5 channel in COS-7 cells. **(A)** Na^+ current time-to-peak values were used to evaluate the activation kinetics. Same transfection and voltage protocol as in Figure 4A. Tukey test: *, $p < 0.05$ vs WT. **(B)** Accelerated inactivation in the presence of the R222Q mutation. Inactivation time constants were measured by fitting the inactivation phase of the Na^+ current to a single exponential equation. Tukey test: Heterozygous vs. WT, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$; R222Q vs WT, †: $p < 0.05$, †††: $p < 0.001$. **(C)** Recovery from inactivation was measured using a twin-pulse protocol (left inset: holding potential: -100 mV, 100-ms depolarization to -20 mV, back to -100 mV for 0 to 1000-ms delay before test pulse to -20 mV, frequency: 0.1 Hz). Right inset: same as main graph for short delays.



Supplemental Figure 5. (A) Superimposed activation and inactivation curves of WT (circles, solid line) and heterozygous (triangles, dashed line) channels obtained experimentally. Bottom inset: superimposed Na⁺ current recordings using the same voltage protocol as in figure 4. Scale bars: 2 ms, 1000 pA. Top inset: increase of the predicted voltage window current in the presence of the mutation. (B) and (C) Simulated curves of WT (circles, solid line) and heterozygous (triangles, dashed line) channels; activation and inactivation in Purkinje cell (B) and (C) ventricular cardiomyocyte models. Bottom insets, simulated Na⁺ currents as in A. Scale bars: 1 ms, 100 pA (B) and 5 ms, 100 pA (C). Top insets, as in A.



Supplemental Figure 6. Effects of the R222Q mutation on Purkinje (top) and ventricular (bottom) cell action potentials (APs) and Na^+ current obtained in the single-cell model. Simulated AP (black) and late Na^+ current (red) in WT (left) and heterozygous (right) conditions at the indicated cycle lengths. Arrows: external stimulus.

Supplemental movies

Simulation of the AP propagation from a Purkinje fiber to ventricular tissue (dimensions and stimulation shown in Figure 4), in WT (a) and heterozygous (b) conditions at cycle length of 1 s (A) and 0.5 s (B).

Supplemental Table 1: Effects of R222Q mutation on Nav1.5 biophysical parameters.

	current density	activation		inactivation		recovery from inactivation	window current		
	peak at -20 mV (pA/pF)	$V_{1/2}$ (mV)	k (mV)	$V_{1/2}$ (mV)	k (mV)	$t_{1/2}$ (ms)	$g_{\max}$ (pS/pF)	$E_{\max}$ (mV)	AUC (a.u.)
WT	-205.8±29.3 (36)	-30.6±2.1 (9)	5.7±0.3 (9)	-79.6±0.7 (10)	5.6±0.2 (10)	7.6±0.6 (6)	15.9±2.6 (13)	-42.8±0.5 (12)	29.9±3.9 (13)
heterozygous	-196.5±17.6 (48)	-37.2±1.6* (9)	7.1±0.3** (9)	-82.2±1* (9)	5.3±0.1 (9)	7.9±1.1 (8)	-	-	-
R222Q	-250.4±24.8 (44)	-42.3±1.0*** (11)	6.5±0.4 (11)	-84.6±0.7*** (8)	4.8±0.2** (8)	8.8±0.9 (8)	19.1±2.0 (14)	-58.6±1.1*** (14)	55.2±7.6** (14)

(n): number of cells; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$ vs. WT; $V_{1/2}$ and k; voltage for half-activation or -inactivation of the Na^+ current and slope; $t_{1/2}$: time to reach 50% recovery of the Na^+ current; $g_{\max}$: maximal TTX-sensitive conductance recorded during a depolarizing-voltage ramp as in Supplemental Figure 4; $E_{\max}$: potential at which the maximum conductance was measured. AUC: area under curve calculated on current density/membrane potential relationship; a.u.: arbitrary unit.

Supplemental Table 2: Effects of quinidine on WT and R222Q Nav1.5 currents.

		current density	window current
		peak at -20 mV (pA/pF)	I _{max} (pA/pF)
WT	control	-136.0±28.5 (12)	-1.87±0.42 (7)
	30 μM quinidine	-76.7±15.2***	-0.74±0.16*
R222Q	control	-123.3±20.1 (10)	-2.54±0.41 (6)
	30 μM quinidine	-63.9±10.5***	-1.17±0.12**

(n): number of cells; paired t-test: *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001 vs. control; window current: TTX-sensitive (30 μM) current elicited by a depolarizing-voltage ramp; I_{max}: current density measured when the TTX-sensitive conductance is maximal (*i.e.* at -43 mV and -59 mV for WT and R222Q, respectively).

SUPPLEMENTAL REFERENCES

- 1 Bienengraeber M, Olson TM, Selivanov VA, Kathmann EC, O'Coirlain F, Gao F, Karger AB, Ballew JD, Hodgson DM, Zingman LV, Pang YP, Alekseev AE, Terzic A. ABCC9 mutations identified in human dilated cardiomyopathy disrupt catalytic KATP channel gating. *Nat Genet.* 2004;36:382-387.
- 2 Genin E, Tullio-Pelet A, Begeot F et al. Estimating the age of rare disease mutations: the example of Triple-A syndrome. *J Med Genet* 2004;41:445-449.
- 3 Brinkmann B, Klitschar M, Neuheuer F et al. Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *Am J Hum Genet* 1998;62:1408-1415.
- 4 Kyndt F, Probst V, Potet F et al. Novel SCN5A mutation leading either to isolated cardiac conduction defect or Brugada syndrome in a large French family. *Circulation* 2001;104:3081-3086.
- 5 Loussouarn G, Park KH, Bellocq C et al. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PIP₂, controls KCNQ1/KCNE1 voltage-gated potassium channels: a functional homology between voltage-gated and inward rectifier K⁺ channels. *EMBO J* 2003;22:5412-5421.
- 6 DiFrancesco D, Noble D. A model of cardiac electrical activity incorporating ionic pumps and concentration changes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1985;307:353-398.
- 7 Iyer V, Mazhari R, Winslow RL. A computational model of the human left-ventricular epicardial myocyte. *Biophys J* 2004;87:1507-1525.
- 8 Keener J, Sneyd J. *Mathematical Physiology*, 2nd edition. Springer, 2001.
- 9 Aslanidi OV, Stewart P, Boyett MR et al. Optimal velocity and safety of discontinuous conduction through the heterogeneous Purkinje-ventricular junction. *Biophys J* 2009;97:20-39.
- 10 Roden DM, Bennett PB, Snyders DJ et al. Quinidine delays IK activation in guinea pig ventricular myocytes. *Circ Res* 1988;62:1055-1058.
- 11 Sanchez-Chapula JA, Ferrer T, Navarro-Polanco RA et al. Voltage-dependent profile of human ether-a-go-go-related gene channel block is influenced by a

- single residue in the S6 transmembrane domain. *Mol Pharmacol* 2003;63:1051-1058.
- 12 Wu L, Guo D, Li H et al. Role of late sodium current in modulating the proarrhythmic and antiarrhythmic effects of quinidine. *Heart Rhythm* 2008;5:1726-1734.
 - 13 Wang Z, Fermini B, Nattel S. Effects of flecainide, quinidine, and 4-aminopyridine on transient outward and ultrarapid delayed rectifier currents in human atrial myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;272:184-196.

Dans le cadre de ce projet, j'ai réalisé l'étude pharmacologique de la quinidine sur le courant I_{Na} muté p.R222Q.

I.3 – Discussion

Dans cette étude, nous mettons en évidence une nouvelle pathologie arythmique cardiaque à transmission autosomique dominante nommée arythmies multifocales du tissu de Purkinje (*Multifocal ectopic Purkinje-related premature contractions*). Cette pathologie provoque l'apparition de contractions ventriculaires prématurées originaires de foyers ectopiques situés dans le tissu de Purkinje. Elle est associée chez certains patients à des épisodes de tachycardie ventriculaire, de tachycardie auriculaire, de fibrillation auriculaire, de cardiomyopathie dilatée ainsi qu'à la mort subite. L'étude de 3 familles non apparentées présentant toutes le phénotype décrit ci-dessus, nous a permis d'identifier le variant p.R222Q dans le gène *SCN5A* qui ségrège parfaitement chez tous les patients. Le traitement par l'hydroquinidine des patients diminue l'occurrence des contractions ventriculaires prématurées et normalise la fonction ventriculaire gauche chez les patients présentant une cardiomyopathie dilatée.

Plusieurs arguments suggèrent l'implication de la mutation Na_v1.5 p.R222Q dans l'apparition d'arythmies multifocales du tissu de Purkinje :

- (i) La corrélation parfaite génotype/phénotype. Les 21 individus (11 hommes et 10 femmes) identifiés dans 3 familles non apparentées sont tous porteurs de la mutation Na_v1.5 p.R222Q.
- (ii) La mutation affecte un acide aminé très conservé au travers des espèces et n'a pas été retrouvée chez 300 individus contrôles.
- (iii) L'expression de la mutation Na_v1.5 p.R222Q en cellules COS-7 conduit à un décalage vers des potentiels plus négatifs des courbes d'activation et d'inactivation de manière non proportionnelle créant ainsi une augmentation du courant de fenêtre, crucial lors de la phase de plateau du PA ventriculaire.
- (iv) Le traitement par la quinidine réduit de manière drastique l'apparition de contractions ventriculaires prématurées.

La mutation Na_v1.5 p.R222Q a déjà été associée à des pathologies cardiaques dans différentes études. Quatre de ces études associent la mutation Na_v1.5 p.R222Q au développement d'une cardiomyopathie dilatée (Hershberger *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2010; Morales *et al.*, 2010; McNair *et al.*, 2011). Les travaux de Cheng et coll. et de Morales et coll. ont porté sur la même famille présentant une histoire familiale de cardiomyopathie dilatée

(Cheng *et al.*, 2010; Morales *et al.*, 2010). La description clinique de ces patients montre qu'ils présentent en plus de la cardiomyopathie dilatée, des contractions ventriculaires ou auriculaires prématurées, du bigéminisme, ou encore des blocs de branche. L'étude de McNair *et coll.* fait la même description clinique chez 2 patients atteints d'une cardiomyopathie dilatée et porteurs du variant Na_v1.5 p.R222Q (McNair *et al.*, 2011). Le phénotype des patients de ces 3 études est très proche de celui retrouvé dans le syndrome d'arythmies multifocales du tissu de Purkinje. Dans une grande étude de cohorte de patients atteints du SBr, le variant Na_v1.5 p.R222Q a également été identifié chez un patient isolé (Kapplinger *et al.*, 2010). Après réévaluation du phénotype de ce patient, il s'est avéré que celui-ci ne présentait pas d'élévation du segment ST dans les dérivations précordiales droites (aspect typique d'un SBr) mais en revanche un phénotype proche de celui retrouvé dans l'arythmie multifocale du tissu de Purkinje (contractions ventriculaires prématurées, arythmies auriculaires, cardiomyopathie dilatée). De plus, l'enquête familiale a révélé que sa mère et sa grand-mère présentaient toutes deux un phénotype similaire. Dans une autre grande étude de cohorte de patients atteints du syndrome de QT long, le variant Na_v1.5 p.R222Q a été répertorié chez un patient isolé (Kapplinger *et al.*, 2009). L'étude ne donne aucune description clinique électrophysiologique du patient. Enfin, simultanément à la parution du travail présenté ici, les travaux de Nair *et coll.* ont été publiés (Nair *et al.*, 2012). Ils portent sur l'association entre le variant Na_v1.5 p.R222Q et un phénotype de bigéminisme. L'ensemble de ces travaux est en accord avec le phénotype décrit dans notre étude. Toutes les familles décrites présentent un phénotype très proche de celui retrouvé dans l'arythmie multifocale du tissu de Purkinje.

La mutation p.R222Q est localisée dans le segment S4 est essentiel à la régulation par le potentiel de l'ouverture du canal. Ce segment S4 contient des acides aminés chargés positivement donnant la sensibilité au potentiel du canal et lui permettant de passer de l'état fermé à l'état ouvert (Chanda *et al.*, 2004). La mutation affecte la 2^{ème} charge positive du segment S4 du domaine I de Na_v1.5 qui est substituée par un acide aminé neutre. Il semble donc qu'à l'image des études réalisées sur les charges des segments S4 de Na_v1.2, la mutation de cet acide aminé modifie la dépendance au potentiel des canaux Na_v (Stuhmer *et al.*, 1989; Kontis & Goldin, 1997). La modification de la dépendance au potentiel de Na_v1.5 p.R222Q va probablement conduire à l'augmentation de l'excitabilité du canal cardiaque expliquant ainsi le phénotype observé chez ces 3 familles. Cette augmentation de l'excitabilité du canal peut expliquer les troubles arythmiques auriculaires observés chez 9 des patients. Deux mécanismes ont déjà été décrits pour expliquer le développement de fibrillations auriculaires consécutives à des mutations gain-de-fonction du canal Na_v1.5 (Makiyama *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009). Le premier fait intervenir une réactivation des canaux

calciques de type L pouvant conduire à l'apparition de post-dépolarisations précoces (Makiyama *et al.*, 2008). Le deuxième explique la survenue de post-dépolarisations retardées par un abaissement du seuil de déclenchement du PA lié à des mutations gain-de-fonction de Na_v1.5 (Li *et al.*, 2009). Ces deux mécanismes conduisent à augmenter l'excitabilité auriculaire et augmentent le risque de fibrillations auriculaires.

D'autre part, les simulations informatiques réalisées dans cette étude reproduisent le mécanisme par lequel l'altération des propriétés de dépendance au potentiel du canal sodique est responsable du phénotype observé chez les patients. Trois types de modèles ont été utilisés : un modèle unicellulaire de potentiel d'action de cellules de Purkinje (DiFrancesco & Noble, 1985), un modèle unicellulaire de potentiels d'action ventriculaire (Iyer *et al.*, 2004) et un nouveau modèle multicellulaire regroupant les modèles unicellulaires ventriculaires et de Purkinje. Le modèle multicellulaire montre que la mutation Na_v1.5 p.R222Q provoque l'apparition de PA prématurés au niveau ventriculaire qui disparaissent lorsque le rythme cardiaque est accéléré reproduisant ainsi le phénotype observé lors du test à l'effort réalisé pendant l'examen clinique des patients.

Comme détaillé un peu plus haut, plusieurs études ont associés la mutation Na_v1.5 p.R222Q à des cas de cardiomyopathies dilatées familiales (Hershberger *et al.*, 2008; Morales *et al.*, 2010; McNair *et al.*, 2011). Cependant, les familles étudiées présentaient toutes en plus d'une cardiomyopathie dilatée, un phénotype d'arythmies multifocales du tissu de Purkinje. Dans le cas de cette nouvelle arythmie, la cardiomyopathie pourrait être la conséquence des troubles du rythme observés chez les patients. En effet, il n'existe aucun cas de cardiomyopathie isolée chez ces 3 familles, et le traitement à la quinidine permet l'amélioration de la fonction cardiaque. L'augmentation de l'entrée de Na⁺ dans la cellule pourrait conduire à une augmentation de l'entrée de Ca²⁺ par l'échangeur Na⁺/Ca²⁺ et ainsi induire une cardiomyopathie dilatée par augmentation de la surcharge calcique dans la cellule à l'image de ce qui est observé lors d'un infarctus du myocarde (Maltsev & Undrovinas, 2006).

Le traitement par l'hydroquinidine, qui est l'analogue actif de la quinidine, réduit fortement l'apparition de contractions ventriculaires prématurées. La quinidine est un antiarythmique de classe Ia qui agit sur de multiples courants ioniques impliqués dans la genèse du PA cardiaque (Imaizumi & Giles, 1987; Roden *et al.*, 1988; Salata & Wasserstrom, 1988; Grace & Camm, 1998; Iost *et al.*, 2003). En effet, la quinidine est, entre autre, capable de diminuer le courant sodique I_{Na}, le courant potassique transitoire I_{to} et le courant repolarisant potassique I_{Kr}. C'est pourquoi son utilisation reste difficile en clinique car à faible concentration (<3.8μM), elle devient proarythmique par son action ciblée sur le courant I_{Kr}.

(Sokolow, 1956; Wu *et al.*, 2008 b). Dans notre étude, l'effet bénéfique de la quinidine pourrait venir de son action de bloqueur du courant Na⁺, qui limiterait l'entrée de Na⁺ dans la cellule et ainsi diminuerait l'excitabilité cellulaire. Même si son mécanisme d'action n'est pas clairement établi, le traitement par la quinidine des patients de 2 des 3 familles présentées ici semble efficace en limitant les symptômes liés à la mutation Na_v1.5 p.R222Q.

II – Mutations associées des gènes *SCN5A* et *CACNA1C* dans une famille atteinte du syndrome de Brugada et de troubles de la conduction cardiaque

II.1 – Introduction

Le canal sodique Na_v1.5 joue un rôle primordial dans les cellules cardiaques où il est responsable de la phase de dépolarisation rapide du potentiel d'action. De nombreuses études ont associé des mutations du gène *SCN5A* à différents troubles du rythme ou de la conduction cardiaque héréditaires. Dans 20 à 25% des cas de syndrome de Brugada, des mutations perte-de-fonction du canal Na_v1.5 ont été décrites (Antzelevitch *et al.*, 2005). Récemment, une étude de Probst *et coll.* a montré que les mutations du gène *SCN5A* pouvaient ne pas être directement responsables du phénotype de syndrome de Brugada, et suggère l'importance du fond génétique du patient pour expliquer cette pathologie (Probst *et al.*, 2009).

Dans ce travail, nous décrivons une famille atypique présentant 3 phénotypes isolés ou associés selon les patients : le syndrome de Brugada, les troubles de la conduction et/ou un intervalle QT raccourci à l'électrocardiogramme. Le *propositus* de la famille a été admis au CHU de Rennes suite à un arrêt cardiaque après fibrillation ventriculaire et tachycardie ventriculaire monomorphe. Le test à l'ajmaline a permis de démasquer chez ce patient un aspect de type I de syndrome de Brugada. Une enquête familiale a par la suite été menée et a révélé la présence de la pathologie chez 4 autres membres de la famille. L'analyse des différents électrocardiogrammes de cette famille a mis en évidence chez 4 individus la présence d'intervalles QT raccourcis (<360 ms) et d'ondes T étroites et triangulaires ainsi que des troubles de la conduction chez 3 d'entre eux.

L'analyse moléculaire du gène *SCN5A* a révélé une mutation non-sens sur le canal Na_v1.5 (c.5277C>T) provoquant l'apparition d'un codon stop prématuré au niveau de la boucle S5-S6 du domaine IV du canal (p.Q1695X). Cette même mutation a été retrouvée chez deux autres membres de la famille dont 1 atteint du syndrome de Brugada. De manière surprenante, cette mutation ne ségrège pas avec le phénotype de syndrome de Brugada mais est parfaitement corrélée aux troubles de la conduction dans cette famille. Cette discordance suggère l'existence d'autres bases moléculaires à l'origine du syndrome de Brugada et de l'intervalle QT raccourci.

La présence dans cette famille d'individus atteints d'un double phénotype syndrome de Brugada et intervalle QT raccourci nous a conduits à séquencer les gènes codant pour les sous-unités du canal calcique Ca_v1.2 déjà associées à ce double phénotype dans une étude d'Antzelevitch *et coll.* en 2007 (Antzelevitch *et al.*, 2007). L'analyse moléculaire a révélé la présence de la mutation p.N300D sur la sous-unité canal Ca_v1.2 (c.898A>G) au niveau de la boucle S5-S6 du domaine I. Ce variant est rare puisqu'il n'a pas été retrouvé

chez les 300 individus contrôles. Aucun des individus négatifs pour ce variant ne présente l'aspect typique du syndrome de Brugada à l'électrocardiogramme

Pour évaluer l'incidence de la mutation p.N300D et éventuellement l'associer au phénotype observé, des études électrophysiologique et biochimique du canal Ca_v1.2 muté ainsi que des simulations informatiques à l'aide de modèles mathématiques de potentiels d'action ont été réalisées.

II.2 – Article

Compound *SCN5A* and *CACNA1C* mutations in a conduction defect and Brugada family

Delphine M. Béziau^{1,2,3*}, *Julien Barc*^{1,2,3*}, *Lauriane Le Gloann*^{1,2,3,4}, *Mohamed Yassine Amarouch*^{1,2,3}, *Aude Solnon*^{5,6,7}, *Dominique Pavin*^{5,6,7}, *Patricia Bouillet*^{5,6,7}, *Philippe Mabo*^{5,6,7}, *Hervé le Marec*^{1,2,3,4}, *Gildas Loussouarn*^{1,2,3}, *Florence Kyndt*^{1,2,3,8}, *Jean-Jacques Schott*^{1,2,3,4}, *Vincent Probst*^{1,2,3,4}, *Isabelle Baró*^{1,2,3,†}.

En cours de soumission

*Contribution équivalente en tant que premier auteur

¹INSERM, UMR1087, l'institut du thorax, Nantes, France

²CNRS, UMR6291, Nantes, France

³Université de Nantes, Nantes, France

⁴CHU Nantes, l'institut du thorax, France

⁵Département de cardiologie et des maladies vasculaires, centre hospitalo-universitaire de Rennes, Rennes, France

⁶Université de Rennes-1, Rennes, France

⁷INSERM U642, Rennes, France

⁸CHU Nantes, Service de génétique médicale, Nantes, France

Compound *SCN5A* and *CACNA1C* mutations in a conduction defect and Brugada family

Delphine M. Béziau^{1,2,3*}, Julien Barc^{1,2,3*}, Lauriane Le Gloann^{1,2,3,4}, Mohamed Yassine Amarouch^{1,2,3}, Aude Solnon^{5,6,7}, Dominique Pavin^{5,6,7}, Patricia Bouillet^{5,6,7}, Philippe Mabo^{5,6,7}, Hervé le Marec^{1,2,3,4}, Gildas Loussouarn^{1,2,3}, Florence Kyndt^{1,2,3,8}, Jean-Jacques Schott^{1,2,3,4,‡}, Vincent Probst^{1,2,3,4,‡}, Isabelle Baró^{1,2,3,‡,†}.

*These authors contributed equally to this work and are shared first authors

‡These authors contributed equally to this work as senior authors

¹INSERM, UMR1087, l'institut du thorax, Nantes, France; ²CNRS, UMR6291, Nantes, France; ³Université de Nantes, Nantes, France; ⁴CHU Nantes, l'institut du thorax, France; ⁵Département de cardiologie et des maladies vasculaires, centre hospitalo-universitaire de Rennes, Rennes, France; ⁶Université de Rennes-1, Rennes, France; ⁷INSERM U642, Rennes, France; ⁸CHU Nantes, Service de génétique médicale, Nantes, France. Dr Barc is currently at the University of Amsterdam, Department of Experimental Cardiology, Academic Medical Center, Amsterdam, the Netherlands. Dr Amarouch is currently at the University of Bern, Department of Clinical Research, Bern, Switzerland.

†Corresponding author. Tel: +33 2 28 08 01 50, Fax: +33 2 28 08 01 30, Email: isabelle.baro@inserm.fr

ABSTRACT

Aims: Brugada syndrome (BrS) is characterized by an ST-segment elevation in the right precordial leads unrelated to ischemic or structural heart disease. Despite that it is well established that mutations in *SCN5A* are linked to the development of BrS in 20-25% of the cases, we identify a family where a *SCN5A* mutation cannot explain the BrS phenotype.

Methods and results: We detected 2 mutations in a family affected by BrS (5 affected individuals), cardiac conduction defects (CCD, 3 affected individuals) and/or short QT syndrome (SQTS, 4 affected individuals). The first is localized on *SCN5A* gene, which codes for the α -subunit $\text{Na}_v1.5$ of the cardiac Na^+ channel, and leads to the substitution Q1695X. The second is a missense variant of *CACNA1C*, which codes for the α -subunit $\text{Ca}_v1.2$ of the L-type cardiac Ca^{2+} channel, leading to the substitution N300D. The *SCN5A* mutation strictly segregated with conduction defects and SQTS and/or BrS were observed in the patients carrying $\text{Ca}_v1.2$ -N300D only. Patch-clamp studies of p.N300D $\text{Ca}_v1.2$ in transfected COS-7 cells revealed a net loss of function of the calcium channel. Western blot of total lysates and cell membrane fractions of transfected cells showed a global expression defect. Finally, FRAP experiments showed that the mobility of $\text{Ca}_v1.2$ channels on cell surface was increased by the N300D variant.

Conclusion: This study identifies a pathogenic variant in the *CACNA1C* gene, as cause of BrS and/or SQTS, in a family carrying stop mutation in the *SCN5A* gene which does not segregate with the phenotype.

KEYWORDS

Brugada Syndrome, Short QT syndrome, *SCN5A*, *CACNA1C*, sudden cardiac death, cardiac conduction disease

INTRODUCTION

Cardiovascular diseases are currently the first cause of death in developed countries. Among them, cardiac arrhythmias are responsible for an estimated one million cases of syncope and sudden cardiac death (SCD) on the world each year¹. Twenty-five percent of all unexplained SCD may be due to inherited cardiac disease such as Brugada Syndrome (BrS), Long QT Syndrome (LQTS) or Short QT Syndrome (SQTS)². During the past years, a lot of inherited cardiac arrhythmia syndromes have been linked to cardiac channel mutations such as in *SCN5A* which encodes the Na_v1.5 protein forming the α subunit of the sodium channel or in *CACNA1C* which encodes the Ca_v1.2 protein forming the α subunit of the L-type calcium channel (LTCC).

In cardiomyocytes, the pore-forming subunit Ca_v1.2 associates with Ca_v β 2 and Ca_v α 2 δ 1 subunits and are responsible for the Ca²⁺ influx ($I_{Ca,L}$) essential for excitation-contraction coupling. Recent studies have shown that inherited cardiac arrhythmias may be caused by mutations found in the genes coding for the subunits of the LTCC. Loss-of-function missense mutations in *CACNA1C* and Ca_v β 2-encoding *CACNB2* genes have been associated with BrS and short QT intervals³.

BrS is characterized by an ST-segment elevation in the right precordial ECG leads unrelated to ischemic or structural heart disease⁴. It shows familial segregation and is associated with malignant arrhythmias which may lead to sudden death. The pathophysiological mechanism and the molecular basis of BrS are poorly understood^{5, 6}. Indeed, despite that it is well established that mutations in *SCN5A* are linked to the development of BrS in 20-25% of the cases⁷, Probst and al. showed that *SCN5A* mutations could not be directly causal of the BrS ECG pattern and suggested

that genetic background may play a powerful role in the occurrence of BrS⁸. Then, 10 other genes have been linked to the BrS to date, including *CACNA1C*³, *CACNB2b*³. Mutations of these genes lead to a loss-of-function of either sodium (I_{Na}) or LTTC current ($I_{Ca,L}$). It has been shown that inhibition of either I_{Na} or $I_{Ca,L}$ can induce a BrS phenotype^{9, 10}.

Loss-of-function mutations in *SCN5A* can also result on a cardiac conduction disease (CCD)¹¹. CCD is characterized by an alteration of cardiac conduction through the atrioventricular (AV) node, the His-Purkinje system with right or left bundle branch block, and widening of QRS complexes. CCD can lead to complete AV block without BrS-like ST-segment elevation and cause syncope and sudden death^{12, 13}.

Recently, Templin et al/ described a new loss-of-function mutation in the $\alpha 2\delta 1$ subunit of $Ca_v1.2$ associated with short QT syndrome¹⁴. This is the third described mutation that associates $Ca_v1.2$ subunits to the SQTS⁵. SQTS is a genetically determined ion-channel disorder, which may cause malignant tachyarrhythmias and SCD. Finally, short QT interval is generally defined as a QTc interval below 330ms^{3, 15}. To date, 6 genes have been identified to be responsible of SQTS that demonstrate a genetically heterogeneous disease^{3, 14, 16-18}.

In this study, we investigated other molecular basis for a BrS family in which a stop *SCN5A* mutation did not segregate with the phenotype. We identified a loss-of-function *CACNA1C* mutation carried by all the Brugada patients of the family that may explain the inheritance of the syndrome.

METHODS

Brugada patient phenotyping

This study was conducted in accordance with the local guidelines for genetic research and with the approval of the local medical ethics committees. Informed written consent was obtained from all patients. An individual was defined as affected by BrS if he/she displayed a BrS-ECG at baseline or after provocation with a class I antiarrhythmic drug (BrS-ECG+)⁷. A BrS-ECG+ was defined as a coved-type ST-segment elevation >0.2mV at its peak followed (without isoelectric separation) by a negative T-wave in two or more right precordial leads⁷. Ajmaline (1 mg/kg body weight at a rate of 10 mg/min) was used for drug testing. Underlying structural heart disease was excluded by echocardiography, chest roentgenogram, and exercise testing. Laboratory tests excluded acute ischemia and metabolic or electrolyte disturbances. ECG parameters that were analyzed before were: heart rate (HR), PQ interval (in lead II), QRS duration, maximal ST elevation (right precordial leads) and QTc duration in V4 (Bazett's formula).

Genetic analysis

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using standard protocols. All *SCN5A* and *CACNA1C* coding regions and exon boundaries were screened by PCR and Sanger sequencing (primer sequences and PCR condition available on request). DNA variants were disease causing mutations, rather than polymorphisms, if they were present in highly conserved regions of *SCN5A*, absent in 288 caucasian control individuals and below in the 1000 Genomes exome database (<http://www.1000genomes.org>) and <1% in Exome Variant Server, NHLBI Exome Sequencing Project (ESP) which contained cardiac patients

(<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) [07-2012 accessed]. Annotation of mutations was based on the cDNA reference sequence Ensembl ENST00000413689 for *SCN5A* and on ENST00000399655 for *CACNA1C*.

cDNA constructs

Human *CACNA1C* containing exon 8, *CACNA1C* clone (EYFP) $N_{\alpha 1c,77}$ containing exon 8A, *CACNB2b* and *CACNA2D1* inserted in pcDNA3 were gifts from Drs Nikolai Soldatov and Charles Antzelevitch (Baltimore, Maryland, USA and Utica, New York, USA, respectively). Site-directed mutagenesis was performed with QuickChange II XL site-directed (Stratagene, USA) on pcDNA3-*CACNA1C* and pcDNA3-*CACNA1C* clone (EYFP) $N_{\alpha 1c,77}$ according to the manufacturer's instructions. The construct was completely sequenced to ensure that there was no other mutation.

Transfections

The African green monkey kidney fibroblast-like cell line (COS-7) was obtained from the American Type Culture Collection and cultured as previously described¹⁹. For electrophysiology and biochemistry experiments, the cells were cotransfected with FuGene6 (Roche Diagnostics, USA) with a 1:1:1 molar ratio of WT or mutant human *CACNA1C*, WT *CACNB2b* and WT *CACNA2D1* (1 μ g of each Ca_v channel subunit). In addition, 0.4 μ g of cDNA encoding CD8 antigen was added to all transfections as a reporter gene. For confocal microscopy, the cells were cotransfected with FuGene6 with a 1:1:1 molar ratio of WT or mutant human *CACNA1C* clone (EYFP) $N_{\alpha 1c,77}$, WT *CACNB2b* and WT *CACNA2D1* (1 μ g of each Ca_v channel subunit). Cells were used 72-96 h after transfection. The ratio cDNAs/FuGene6 was 3.4 μ g cDNA/7.5 μ L FuGene6. Previous studies have shown that the fusion yellow fluorescent protein [(EYFP) $N_{\alpha 1c,77}$] did not influence $Ca_v1.2$ channel expression²⁰.

Electrophysiology

Whole-cell currents were recorded at room temperature (22°C) using the patch-clamp technique. The cells were continuously superfused with Tyrode solution containing (in mmol/L): NaCl 145, KCl 4, MgCl₂ 1, CaCl₂ 1, HEPES 5, glucose 5, pH adjusted to 7.4 with NaOH. Wax-coated pipettes (tip resistance: 1.8 to 3 MΩ) were filled with intracellular medium containing (in mmol/L): CsCl 130, HEPES 10, EGTA 10, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1, MgATP 4, Tris GTP 0.3, pH adjusted to 7.2 with CsOH. During data recording, the studied cell was locally superfused with extracellular medium containing (in mmol/L): NaCl 135, TEACl 20, HEPES 10, MgCl₂ 1, CaCl₂ 2, mannitol 20, pH adjusted to 7.3 with NaOH. All products were purchased from Sigma. Stimulation, data recording through an A/D converter (Tecmar TM100 Labmaster, Scientific Solutions; 5 kHz filtering), and analysis were performed with Acquis1 software (Bio-Logic). All current measurements were normalized using the cell capacitance. Capacitance and series resistances were compensated (60-70% compensation) to obtain minimal contribution of capacitive transients using a VE-2 amplifier (Alembic Instrument, USA).

Western blots

Two 60-mm dishes of COS-7 cells were lysed in 500 µL of lysis buffer (150mM NaCl, 20mM Tris pH 7.5, 1mM EDTA, 1% Triton X-100 supplemented with complete protease inhibitor mixture (Roche Diagnostics). The cellular lysate was centrifuged 10 min at 1000 g. Protein concentration was systematically determined by performing a Bradford assay (Biorad). Fifteen micrograms of protein were denatured for 10 min at 50°C in Laemli sample buffer, separated by SDS-PAGE on 8% gels and transferred to nitrocellulose membranes (Amersham). 5% fat-free milk was used to block the

membrane. The blots were probed with anti-Ca_v1.2 (1:1000) and anti-GAPDH (1:1000) and secondary HRP-coupled antibody (mouse: 1/10000, rabbit: 1/5000). The blots were then revealed using 2 different enhanced chemi-luminescence kits (super signal west femto maximum sensitivity substrate (Pierce) for the Ca_v1.2 revelation, and ECL plus western blotting detection system (Amersham) for the other proteins revelation) and camera ImageQuant RT ECL (GE Healthcare). The ImageQuantL software (GE Healthcare) was used for image quantification. Signals were normalized with respect to GAPDH and are expressed as a ratio of the control condition.

Cell membrane biotinylation

Cells were treated for 1 hour at 4°C with 1mL biotin per 60-mm dish (1mg/mL; EZ link Sulfo-NHS-SS-Biotin; Pierce), washed once with cold PBS 1X containing 100mM glycine, then twice with cold PBS 1X only and lysed with 500μL/dish of lysis buffer. Hundred μL of streptavidin agarose beads (Pierce) were added to 800μg of COS-7 cell lysate and incubated overnight on a wheel at 4°C. The beads were washed three times with lysis buffer and were cleaved and denaturated for 30 min at 37°C in Laemmli sample buffer containing DTT. Eluted proteins were analysed by western blot.

Antibodies

Anti-Ca_v1.2 Ab was obtained from Millipore (rabbit, AB5156) ; anti-GAPDH Ab (mouse, SC-32233), anti-rabbit horseradish peroxidase Ab (SC-2054), and anti-mouse horseradish peroxidase Ab (SC-2055) were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) ; anti-transferrine receptor Ab was obtained from Invitrogen (mouse, 13-6890).

FRAP Analysis

FRAP was performed on 2 to 3 days old eYFP-Ca_v1.2 WT or N300D transfected COS-7 cells using an confocal microscope Nikon A1R-Si (Nikon, France) equipped with a x60, N.A. 1.4 oil-immersion lens. Environment is controlled in an incubation chamber (Life Imaging Service, Switzerland) at 37°C and 5% of CO₂. Cells were mounted in a 4-wells Lab-Tek chamber in Opti-MEM (Invitrogen). One rectangular 1 μm² ROI along the cell surface was photobleached by scanning with the 488 nm line of the argon laser and recorded at a bandwidth of 500-550 nm. For the pre-bleach phases, 1 image all 5 seconds while 30 seconds are recorded and the laser was set to 5%. The bleach is performed for 1 second at 100%. For the post-bleach phases, 1 image all 5 seconds while 1 minute and then 1 image all 10 seconds while 1 minute are recorded at 5%. The analysis of fluorescence was performed using NIS element 3.2 and MetaMorph softwares. Average fluorescence in ROIs was measured, background subtracted, and corrected for overall photobleaching in each time frame. The average fluorescence within the ROI was double normalized so that the pre-bleach intensity was set to 1 and the first frame after photobleaching to 0 (equally rates of fluorescence are presents in all the cells after photobleach) and plotted as function of time. The fluorescence recovery can be fitted by a double-exponential and allows determining immobile fraction and time constants.

Statistical analysis

All data are presented as mean ± SEM. The statistical significance of the observed effects was assessed by the Student *t* test, or by the Mann-Whitney test. A P value < 0.05 was considered significant.

RESULTS

Family recruitment

A 22-year-old male experienced aborted sudden cardiac death from ventricular fibrillation and was diagnosed with Brugada syndrome after a class I sodium blocker channels test. Monomorphic ventricular tachycardia was documented during the hospitalization phase (Figure 1A). An ICD has been implanted. His ECG showed a normal QTc (377ms), a slightly prolonged PR interval (206 ms), and a borderline QRS duration (108 ms). Those ECGs characteristics are reminiscent of an incomplete right bundle branch block. Familial investigation identified 4 family members (II-3, II-4, III-2 and III-4) showing a BrS-ECG pattern after drug challenge. Among them, III-4 ECG presents a ST elevation but without reaching the diagnostic criteria established by the BrS consensus reference⁷. Additionally II-1, II-4, III-4 and III-5 show a shortened QTc duration. Left anterior hemiblock and incomplete right bundle block have been also observed on ECGs of II-5 and III-2, respectively (Figure 1, Table 1).

Molecular genetics analysis

BrS-ECG pattern associated with an incomplete right bundle branch block found within the proband (III-3) led us to the screening of the coding regions of *SCN5A* gene. A substitution of a C to a T at the genomic position chr3: 38592780 (c.5087 C>T) was identified predicting a premature stop codon (p.Q1695X, ENST00000413689). Two other carriers were detected (II-5 and III-2 ; figure 2 A, B and C). The *SCN5A* c.5087 C>T variant could neither be found in 96 control alleles nor in Exome Variant Server, NHLBI Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA (URL: <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) [07/2012 accessed]. However BrS patient

II-3, II-4, III-4 and potentially III-5 did not present any mutation in *SCN5A* coding regions. The known association between the BrS and a shortened QTc interval with mutations in the calcium channel $\text{Ca}_v1.2$ led us to screen $\text{Ca}_v1.2$ α and β subunits. A substitution of a A to a G on chr12 at the genomic position 2595410 (c.898 A>G) was found in *CACNA1C* gene causing a amino acid substitution from an asparagine to an aspartic acid (p.N300D, ENST00000399655). The screening of the family members showed 5 extra carriers II-1, II-4, III-2, III-4 and III-5 (Figure 2 A, D and E). This variant could not be found in 576 control alleles matched for geographic origin and at an allele frequency of 0.03% (4/12974 alleles) in Exome Variant Server, NHLBI Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA (URL: <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) [07/2012 accessed].

Functional analysis

In order to investigate the possible pathogenic role of the N300D variant in the *CACNA1C* gene product, functional analyses were performed using co-expression with $\text{Ca}_v\beta2b$ and $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$, in COS-7 cells. Calcium currents ($I_{\text{Ca,L}}$) were recorded in these cells under voltage-clamp conditions using the whole-cell configuration. The N300D $\text{Ca}_v1.2$ current density was drastically reduced by more than 90% when compared with the WT current (Figure 3A). Since N300D Ca^{2+} currents were hardly measurable, Ba^{2+} was substituted to Ca^{2+} as permeant ion to further investigate $\text{Ca}_v1.2$ -mediated currents. We compared the current-voltage (I-V) relationship of WT and N300D channels. Strongly reduced N300D Ba^{2+} current densities were recorded, with no change of the voltage sensitivity (Figure 3B). The results indicate that the mutation causes a major loss of function in $\text{Ca}_v1.2$ activity.

In order to determine the mechanisms underlying the reduction in I_{Ca} caused by N300D mutation, we analysed the global expression of $Ca_v1.2$ and its expression at the cell surface by performing Western blot and membrane protein biotinylation assays. As shown in figure 4 A and B, the global expression of N300D channel was reduced by more than 50% when compared with the WT channel. The expression at the cell surface of N300D was also reduced in a lesser extent though, when compared with the global expression (30% reduction of N300D cell surface expression compared with WT ; figure 4 C and D).

To determine the mobility of WT or N300D $Ca_v1.2$ channels on cell surface, we used FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) and eYFP-tagged proteins. We photobleached the tagged proteins and measured the rate of fluorescence recovery, which we used as an index of the net movement of the unbleached $Ca_v1.2$ eYFP proteins in the plasma membrane (Figure 5). Figure 5A shows representative images of COS-7 cells expressing $Ca_v1.2$, acquired 33 s before, 0 s, and 126 s after the photobleaching at 37°C. Quantitative FRAP analysis at 126s revealed a decrease of the immobile fraction for the N300D $Ca_v1.2$ compared with the WT ($29\% \pm 4\%$ and $45\% \pm 3\%$, $n=15-9$, for WT and N300D, respectively, figure 5 B and C). These results suggest the existence of a larger mobile population at the cell surface of N300D $Ca_v1.2$ than WT $Ca_v1.2$. The fluorescence recovery included 2 phases, the rapid phase contributing equally to the fluorescence recovery for the WT and N300D (0.15 ± 0.03 and 0.19 ± 0.05 for WT and N300D, respectively ; figure 5D), as well as the slow phase (0.79 ± 0.05 and 0.71 ± 0.06 for WT and N300D, respectively). The rapid time constants were also similar in the 2 conditions (12.3 ± 3.3 s and 9.9 ± 2.3 s, for WT and N300D, respectively ; figure 5E). The slow time constant was accelerated in

cells expressing Ca_v1.2 N300D compared with the Ca_v1.2 WT (103.0 ± 15.4 s and 200.0 ± 25.9 s for N300D and WT, respectively ; Figure 5E).

DISCUSSION

In this study, we have identified two variants, p.Q1695X of the *SCN5A* gene, and p.N300D of the *CACNA1C* gene, in a family presenting various phenotypes as BrS, SQTS and CCD. Albeit BrS was often linked to loss-of-function mutations of the cardiac sodium channel, in this family, the *CACNA1C* mutation seems to be responsible for the Brugada and short QT syndromes. However, *SCN5A* mutation is associated with CCD.

We observed a segregation defect of the *SCN5A* mutation with the BrS phenotype. Indeed, only 2 of the 5 affected individuals carried the mutation. However the correlation genotype-phenotype between the *CACNA1C* variant and BrS and/or SQTS phenotypes support the hypothesis that variant in the calcium channel $Ca_v1.2$ is sufficient to cause BrS. This observation is in line with the conclusion of Probst *et al.* study⁸.

The *CACNA1C* mutation most likely plays a critical role in development of BrS and/or SQTS. Numerous argument supports its implication : (1) the good segregation between the phenotype and the mutation ; (2) heterologous expression of mutant channels in COS-7 cells leads to a major loss of function consistent with the BrS phenotype and with a shorter-than-normal QT interval ; (3) the mutation affects a highly conserved amino-acid among species and was not found in 288 healthy individuals.

The *CACNA1C* mutation has been identified in 4 patients out of 6489 (MAF: 0.12%) from the NHLBI GO Exome Sequencing Project aimed "to discover novel genes and mechanisms contributing to heart, lung and blood disorders". Hence, we can

speculate that the *CACNA1C* mutation may have a significant prevalence in this cardiopathies-dedicated database.

In BrS, imbalance of inward (I_{Na} , $I_{Ca,L}$) and outward (I_{to} , I_{Kr} , I_{Ks}) currents causes apparition of a characteristic notch on the right ventricular AP. This provides a possibility of phase 2 reentry and to the genesis of ventricular arrhythmias. The identified mutation in *CACNA1C* gene affects L-type Ca^{2+} current which is responsible for the ventricular action potential plateau phase. The L-type Ca^{2+} current decrease can explain the BrS and SQTS phenotypes in the studied family. The lower global expression of $Ca_v1.2$ and the larger channel mobility on the cell surface suggest acceleration of $Ca_v1.2$ turn-over by destabilization which may lead to a quicker degradation of the protein. However, further experiments are needed to unveil the molecular mechanism responsible for these effects.

The *SCN5A* mutation, leading probably to haploinsufficiency, was found in 3 patients of this family presenting CCD. The genotype-phenotype correlation reached 100% of penetrance. The *SCN5A* mutation carriers present all a significant prolongation of PR and QRS intervals. This observation is in line with the 2 other stop mutations, p.S1710+75X¹¹ and p.S1812X²¹ which have been described in the same region of $Na_v1.5$ and associated with CCD without BrS phenotype.

In summary, this study identifies a pathogenic variant in the *CACNA1C* gene, as cause of BrS and/or SQTS, in a family carrying stop mutation in the *SCN5A* gene which not segregates with the phenotype. As in this family, we may need to revisit molecular diagnostics of patients with BrS and search new variants in other candidate genes in order to improve the genotype/phenotype relationship of this syndrome and the treatment of other family members.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Béatrice Leray and Aurore Girardeau, l'institut du thorax, Nantes, France, for expert technical assistance with cell culture, and Philippe Hulin, Cellular and Tissular Imaging Core Facility of Nantes University (MicroPICell, SFR François Bonamy), France, for expert technical assistance with FRAP.

Patient	Baseline ECG			T wave morphology (V2)	Symptoms	Ajmaline challenge	ST segment (mm)	ST morphology	Na _v 1.5 mutation	Ca _v 1.2 mutation	Background
	QTc (ms)	PR (ms)	QRS (ms)								
II.1	369	180	80	Proeminent, narrow, symmetric	0	-	0	0	none	N300D	0
II.4	347	220	100	Narrow, symmetric	0	+	3	Coved type	none	N300D	VF during programmed ventricular stimulation
II.5	382	197	108	Normal	LAHB	0	TV	0	Q1695X	none	Monomorphic VT during ajmaline challenge. MI
II.6	410	160	80	Normal	0	0	0	0	none	none	0
III.2	394	201	121	Normal	RBBB	+	3	Coved type	Q1695X	N300D	0
III.3	377	206	108	Proeminent, widening	IRBBB	+	3	Coved type	Q1695X	N300D	Syncope at rest
III.4	337	143	99	Proeminent, narrow, symmetric	0	+	9	Coved type	none	N300D	0
III.5	348	150	75	Proeminent, narrow, symmetric	0	-	2	Saddleback	none	N300D	0
III.6	425	157	85	Normal	0	-	0	0	none	none	0
III.7	381	149	87	Normal	0	-	0	0	none	none	0

Table 1 – Clinical data of the family members.

RBBB : right bundle branch block; IRBBB : incomplete right bundle branch block, LAHB : left anterior hemiblock ; MI : myocardial infarction ; + : positive ; - : négative ; 0 : unknown ; VT : ventricular tachycardia ; VF : ventricular fibrillation.

LEGENDS

Figure 1:

(A) Representative ECG tracing of 22-year old proband (proband III.3), showing monomorphic ventricular tachycardia. (B) Representative 3-lead (V1 to V3) surface ECG of individuals II.1, II.4, II.5, III.3 and III.5 before (left) and during (right) ajmaline challenge.

Figure 2:

(A) Pedigree and phenotype of the family. Males and females are indicated by squares and circles, respectively. The arrow shows the proband. Diagonal line indicates the deceased individuals. ICD= implantable cardioverter defibrillator. (B) Mutation analysis of *SCN5A* revealed heterozygous c.5277 C>T missense mutation in proband that results in a p.Q1695X amino-acid substitution. (C) Structure of the cardiac Na⁺ channel Na_v1.5. The Q1695 is located in the DIV-S5-S6 loop. (D) Mutation analysis of *CACNA1C* revealed heterozygous c.898 A>G missense mutation in proband that results in a p.N300D amino-acid substitution. (E) Structure of the cardiac Ca²⁺ channel Ca_v1.2. The N300D mutation is located in the DI-S5-S6 loop.

Figure 3:

The calcium current is reduced by the Ca_v1.2 p.N300D mutation. (A) Mean effect of the mutation on the calcium current at 0 mV. Inset: stimulation protocol for 200 ms from -80 (0.2 Hz) and representative whole-cell Ca²⁺ current traces recorded in COS-7 cells transfected with WT *CACNA1C* (top) or N300D-*CACNA1C* (bottom), *CACNB2b*, *CACNA2D1* and *CD8* cDNAs. (B) Current-voltage (I-V) relationships for WT (filled circle) and N300D (open circle) Ca_v1.2 channels. Inset: stimulation protocol

for 200 ms to various potentials from -60 to 60 mV (holding potential: -80 mV; 10 mV increment; 0.2 Hz) and representative whole-cell Ba^{2+} currents for WT (top) and N300D (bottom). Red traces: Ba^{2+} currents at 0 mV. The number of independent experiments is indicated in brackets; *** $P < 0.001$.

Figure 4:

Biochemical assays were performed using WT $\text{Ca}_v1.2\alpha1c/\text{Ca}_v\beta2b/\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ and $\text{Ca}_v1.2\alpha1c$ N300D/ $\text{Ca}_v\beta2b/\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ subunit transfected COS-7 cells. (A) Western blots showing $\text{Ca}_v1.2$ detected in the whole-cell lysates. (B) Mean effect of the mutation on the global expression of Ca_v1 . (C) Western blot of biotinylated fraction showing $\text{Ca}_v1.2$. (D) Mean effect of the mutation on the cell surface expression of $\text{Ca}_v1.2$. TransfR, transferrine receptor; the number of independent experiments is indicated in brackets; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 5:

(A) Representative images of COS-7 cells expressing eYFP- $\text{Ca}_v1.2$ WT acquired 33 s before (a), 0 s (b), and 126 s after the photobleaching at 37°C (c). The red rectangle shows the photobleached region. (B) Mean normalized fluorescence recovery after photobleach for WT (filled circle) and N300D (open circle) eYFP-tagged $\text{Ca}_v1.2$. (C) Mean effect of the mutation on the immobile fraction at 126 s. (D) Effect of the mutation on the rapid (left) and slow (right) phases contributions to the fluorescence recovery. (E) Effect of the mutation on rapid (right) and slow (left) time constants. The number of independent experiments is indicated in brackets; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ns, non significant.

REFERENCES

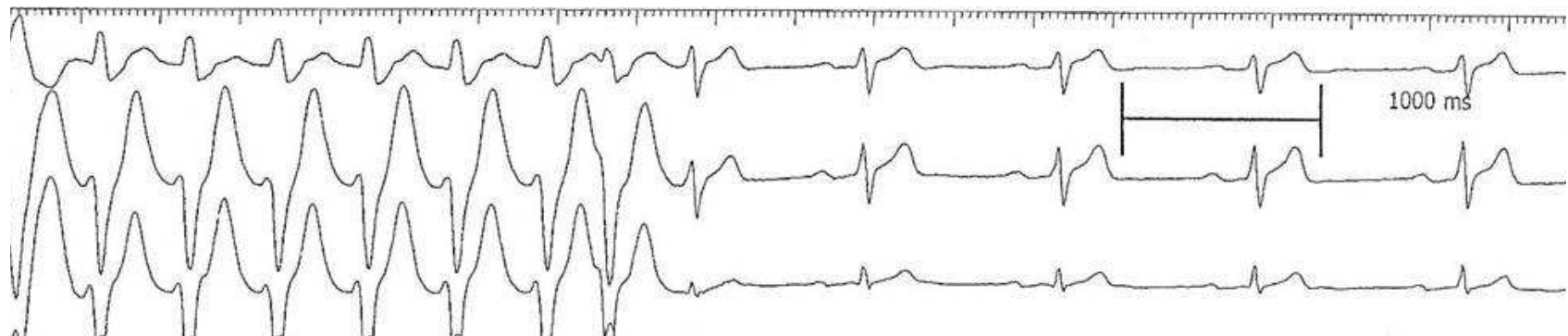
1. Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, Carnethon M, Dai S, De Simone G, Ferguson TB, Ford E, Furie K, Gillespie C, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern S, Ho PM, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lackland D, Lisabeth L, Marelli A, McDermott MM, Meigs J, Mozaffarian D, Mussolino M, Nichol G, Roger VL, Rosamond W, Sacco R, Sorlie P, Stafford R, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Wong ND, Wylie-Rosett J. Executive summary: heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2010; 121(7):948-954.
2. Behr ER, Dalageorgou C, Christiansen M, Syrris P, Hughes S, Tome Esteban MT, Rowland E, Jeffery S, McKenna WJ. Sudden arrhythmic death syndrome: familial evaluation identifies inheritable heart disease in the majority of families. *Eur Heart J* 2008; 29(13):1670-1680.
3. Antzelevitch C, Pollevick GD, Cordeiro JM, Casis O, Sanguinetti MC, Aizawa Y, Guerchicoff A, Pfeiffer R, Oliva A, Wollnik B, Gelber P, Bonaros EP, Jr., Burashnikov E, Wu Y, Sargent JD, Schickel S, Oberheiden R, Bhatia A, Hsu LF, Haissaguerre M, Schimpf R, Borggrefe M, Wolpert C. Loss-of-function mutations in the cardiac calcium channel underlie a new clinical entity characterized by ST-segment elevation, short QT intervals, and sudden cardiac death. *Circulation* 2007; 115(4):442-449.
4. Brugada P, Brugada J. Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report. *J Am Coll Cardiol* 1992; 20(6):1391-1396.
5. Antzelevitch C. Brugada syndrome. *Pacing Clin Electrophysiol* 2006; 29(10):1130-1159.

6. Meregalli PG, Wilde AA, Tan HL. Pathophysiological mechanisms of Brugada syndrome: depolarization disorder, repolarization disorder, or more? *Cardiovasc Res* 2005; 67(3):367-378.
7. Antzelevitch C, Brugada P, Borggrefe M, Brugada J, Brugada R, Corrado D, Gussak I, LeMarec H, Nademanee K, Perez Riera AR, Shimizu W, Schulze-Bahr E, Tan H, Wilde A. Brugada syndrome: report of the second consensus conference: endorsed by the Heart Rhythm Society and the European Heart Rhythm Association. *Circulation* 2005; 111(5):659-670.
8. Probst V, Wilde AA, Barc J, Sacher F, Babuty D, Mabo P, Mansourati J, Le Scouarnec S, Kyndt F, Le Caignec C, Guicheney P, Gouas L, Albuissou J, Meregalli PG, Le Marec H, Tan HL, Schott JJ. SCN5A mutations and the role of genetic background in the pathophysiology of Brugada syndrome. *Circ Cardiovasc Genet* 2009; 2(6):552-557.
9. Fish JM, Antzelevitch C. Role of sodium and calcium channel block in unmasking the Brugada syndrome. *Heart Rhythm* 2004; 1(2):210-217.
10. Yan GX, Antzelevitch C. Cellular basis for the Brugada syndrome and other mechanisms of arrhythmogenesis associated with ST-segment elevation. *Circulation* 1999; 100(15):1660-1666.
11. Schott JJ, Alshinawi C, Kyndt F, Probst V, Hoorntje TM, Hulsbeek M, Wilde AA, Escande D, Mannens MM, Le Marec H. Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A. *Nat Genet* 1999; 23(1):20-21.
12. Balmer C, Fasnacht M, Rahn M, Molinari L, Bauersfeld U. Long-term follow up of children with congenital complete atrioventricular block and the impact of pacemaker therapy. *Europace* 2002; 4(4):345-349.

13. Michaelsson M, Jonzon A, Riesenfeld T. Isolated congenital complete atrioventricular block in adult life. A prospective study. *Circulation* 1995; 92(3):442-449.
14. Templin C, Ghadri JR, Rougier JS, Baumer A, Kaplan V, Albesa M, Sticht H, Rauch A, Puleo C, Hu D, Barajas-Martinez H, Antzelevitch C, Luscher TF, Abriel H, Duru F. Identification of a novel loss-of-function calcium channel gene mutation in short QT syndrome (SQTs6). *Eur Heart J* 2011; 32(9):1077-1088.
15. Patel C, Yan GX, Antzelevitch C. Short QT syndrome: from bench to bedside. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2010; 3(4):401-408.
16. Bellocq C, van Ginneken AC, Bezzina CR, Alders M, Escande D, Mannens MM, Baro I, Wilde AA. Mutation in the KCNQ1 gene leading to the short QT-interval syndrome. *Circulation* 2004; 109(20):2394-2397.
17. Brugada R, Hong K, Dumaine R, Cordeiro J, Gaita F, Borggrefe M, Menendez TM, Brugada J, Pollevick GD, Wolpert C, Burashnikov E, Matsuo K, Wu YS, Guerchicoff A, Bianchi F, Giustetto C, Schimpf R, Brugada P, Antzelevitch C. Sudden death associated with short-QT syndrome linked to mutations in HERG. *Circulation* 2004; 109(1):30-35.
18. Priori SG, Pandit SV, Rivolta I, Berenfeld O, Ronchetti E, Dhamoon A, Napolitano C, Anumonwo J, di Barletta MR, Gudapakkam S, Bosi G, Stramba-Badiale M, Jalife J. A novel form of short QT syndrome (SQT3) is caused by a mutation in the KCNJ2 gene. *Circ Res* 2005; 96(7):800-807.
19. Bellocq C, Wilders R, Schott JJ, Louerat-Oriou B, Boisseau P, Le Marec H, Escande D, Baro I. A common antitussive drug, clobutinol, precipitates the long QT syndrome 2. *Mol Pharmacol* 2004; 66(5):1093-1102.

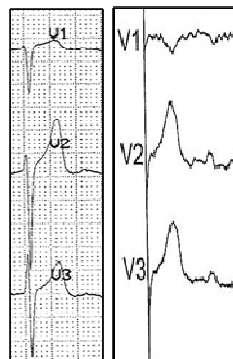
20. Kobrinsky E, Tiwari S, Maltsev VA, Harry JB, Lakatta E, Abernethy DR, Soldatov NM. Differential role of the alpha1C subunit tails in regulation of the Cav1.2 channel by membrane potential, beta subunits, and Ca²⁺ ions. *J Biol Chem* 2005; 280(13):12474-12485.
21. Schulze-Bahr E, Eckardt L, Breithardt G, Seidl K, Wichter T, Wolpert C, Borggrefe M, Haverkamp W. Sodium channel gene (SCN5A) mutations in 44 index patients with Brugada syndrome: different incidences in familial and sporadic disease. *Hum Mutat* 2003; 21(6):651-652.

A

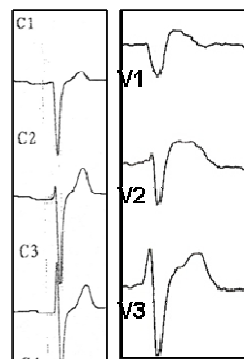


B

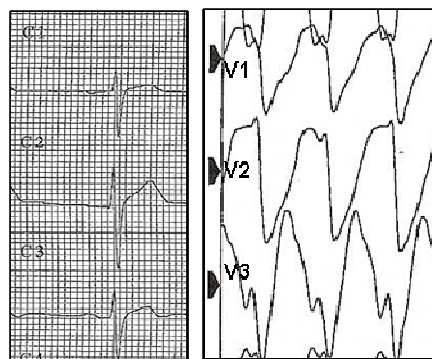
III.3



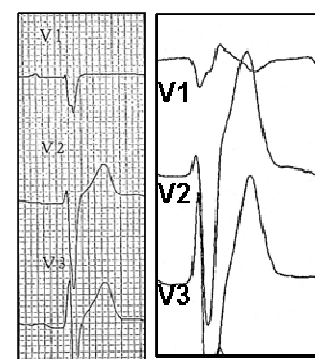
II.1



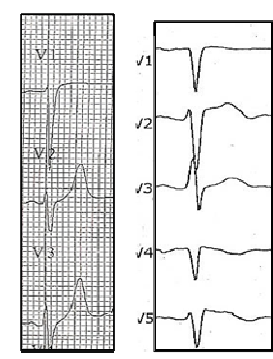
II.4



II.5



III.3



III.5

Figure 1

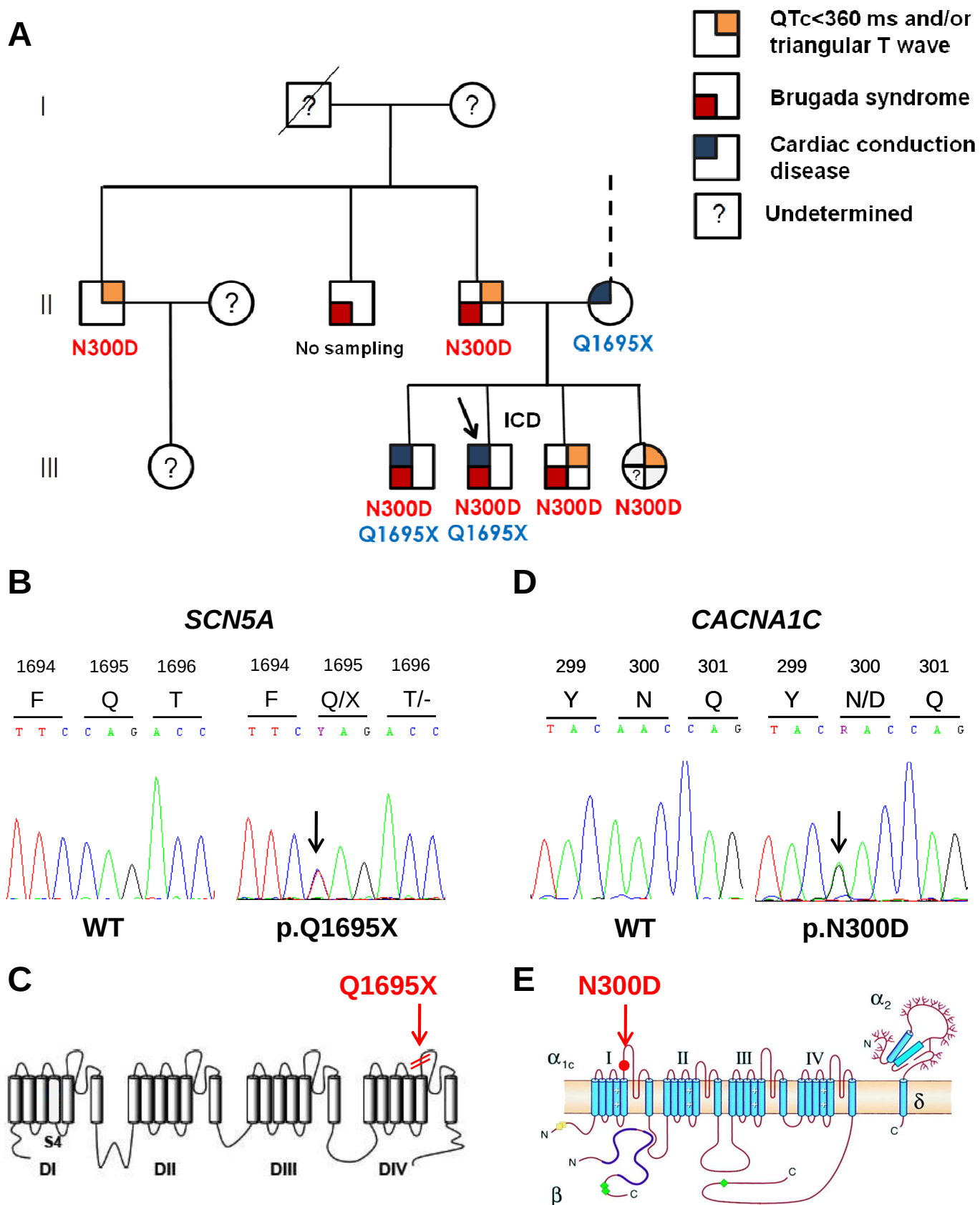
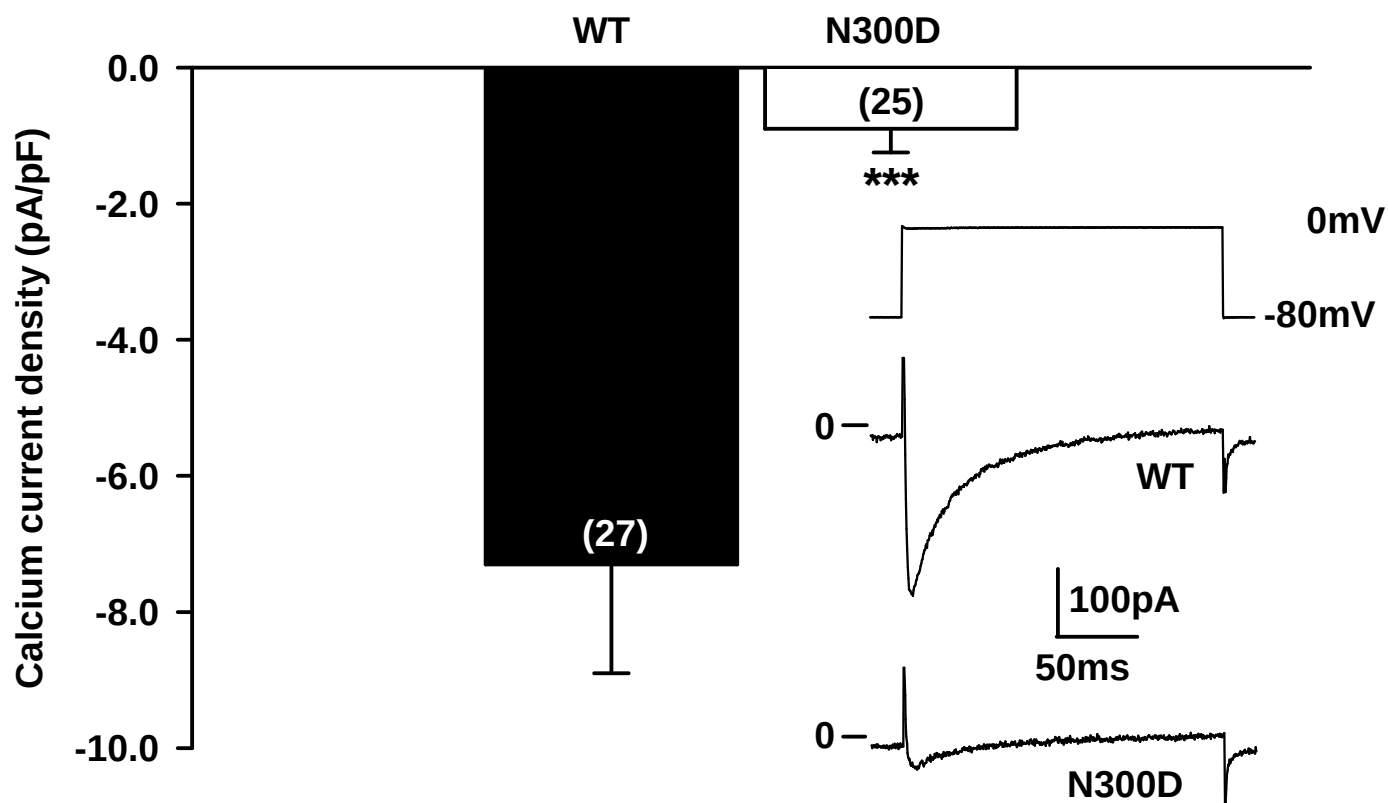
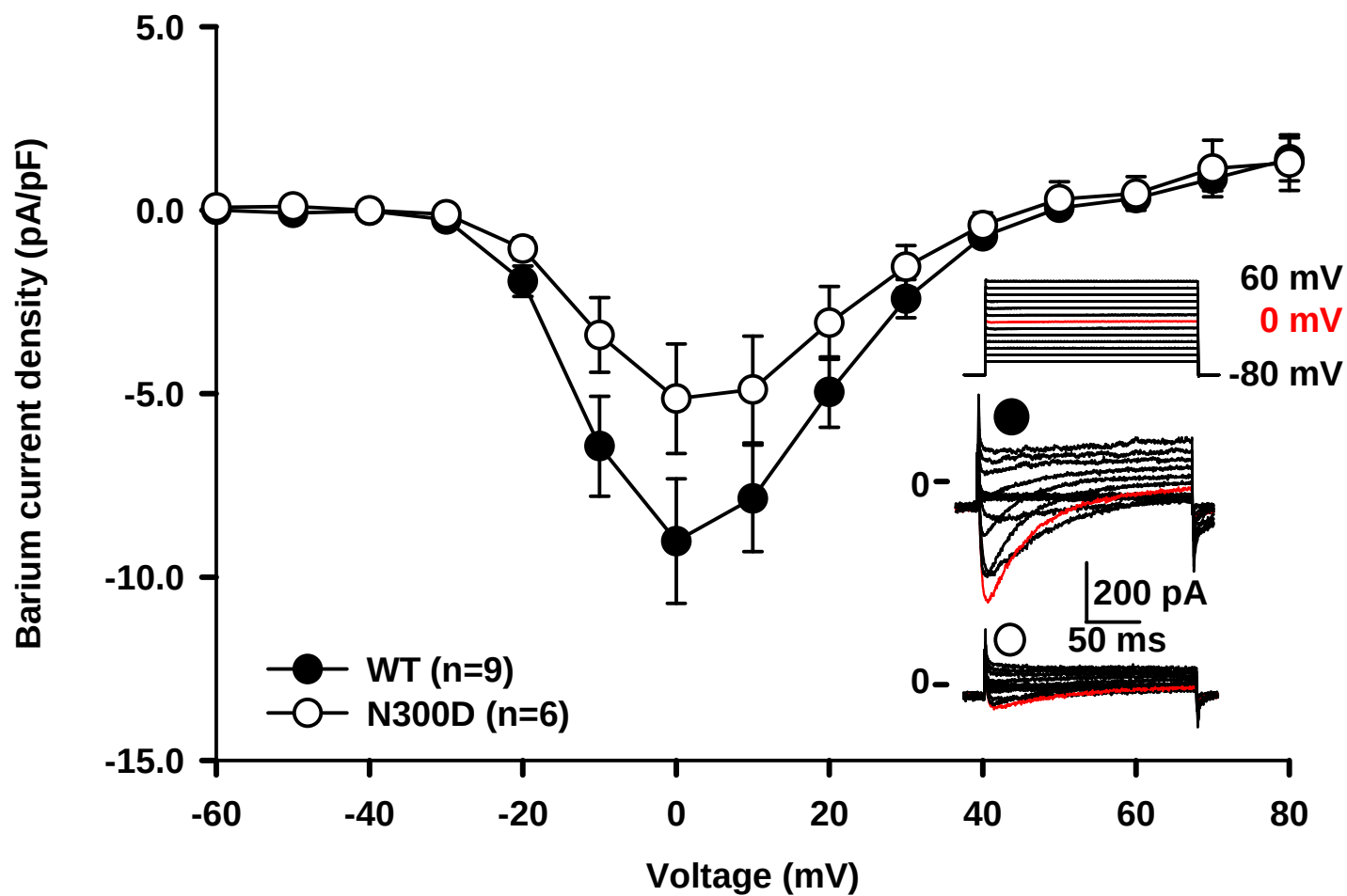


Figure 2

A**B****Figure 3**

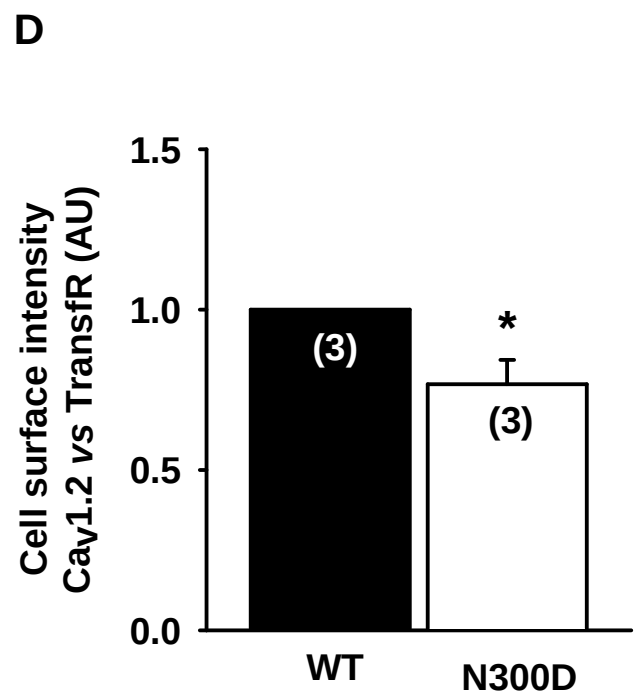
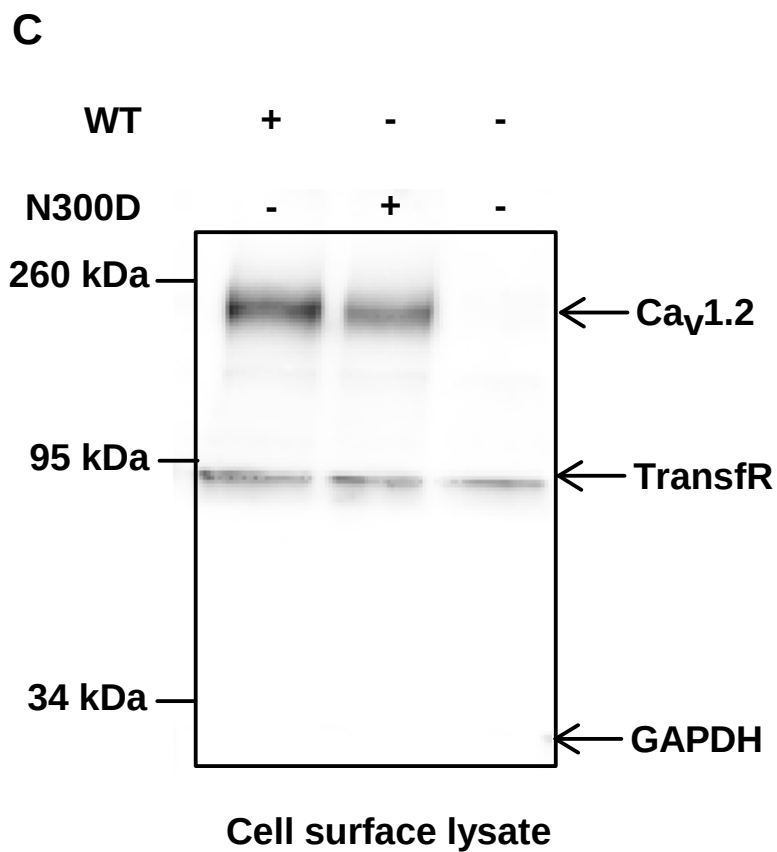
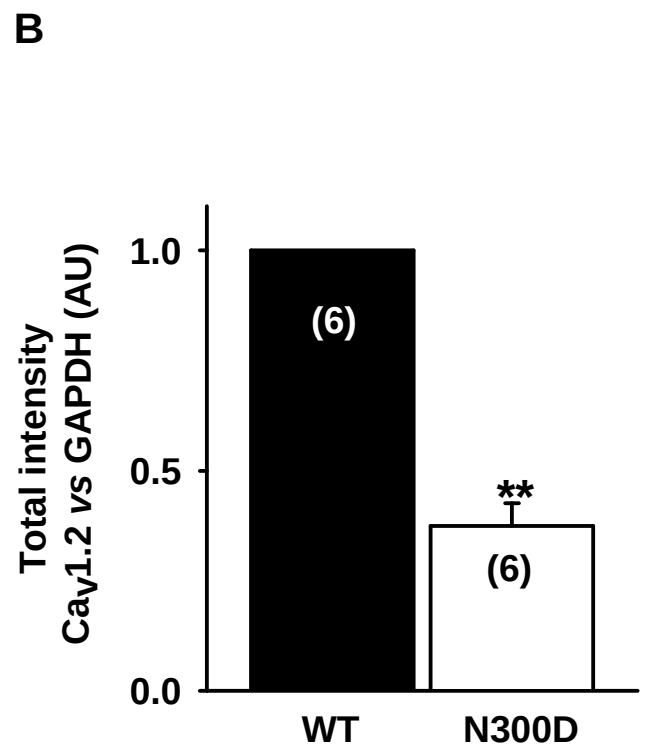
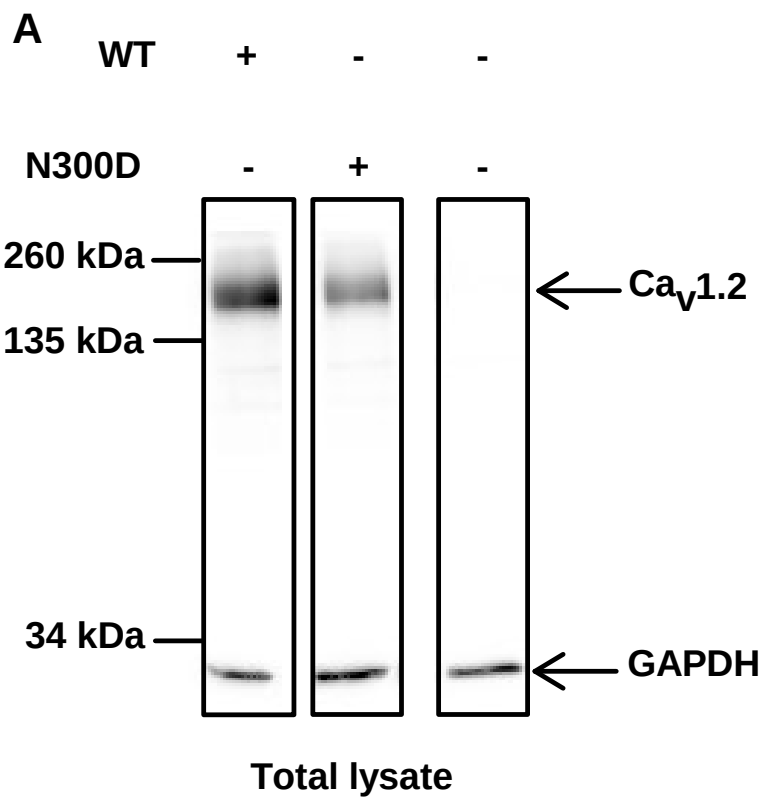


Figure 4

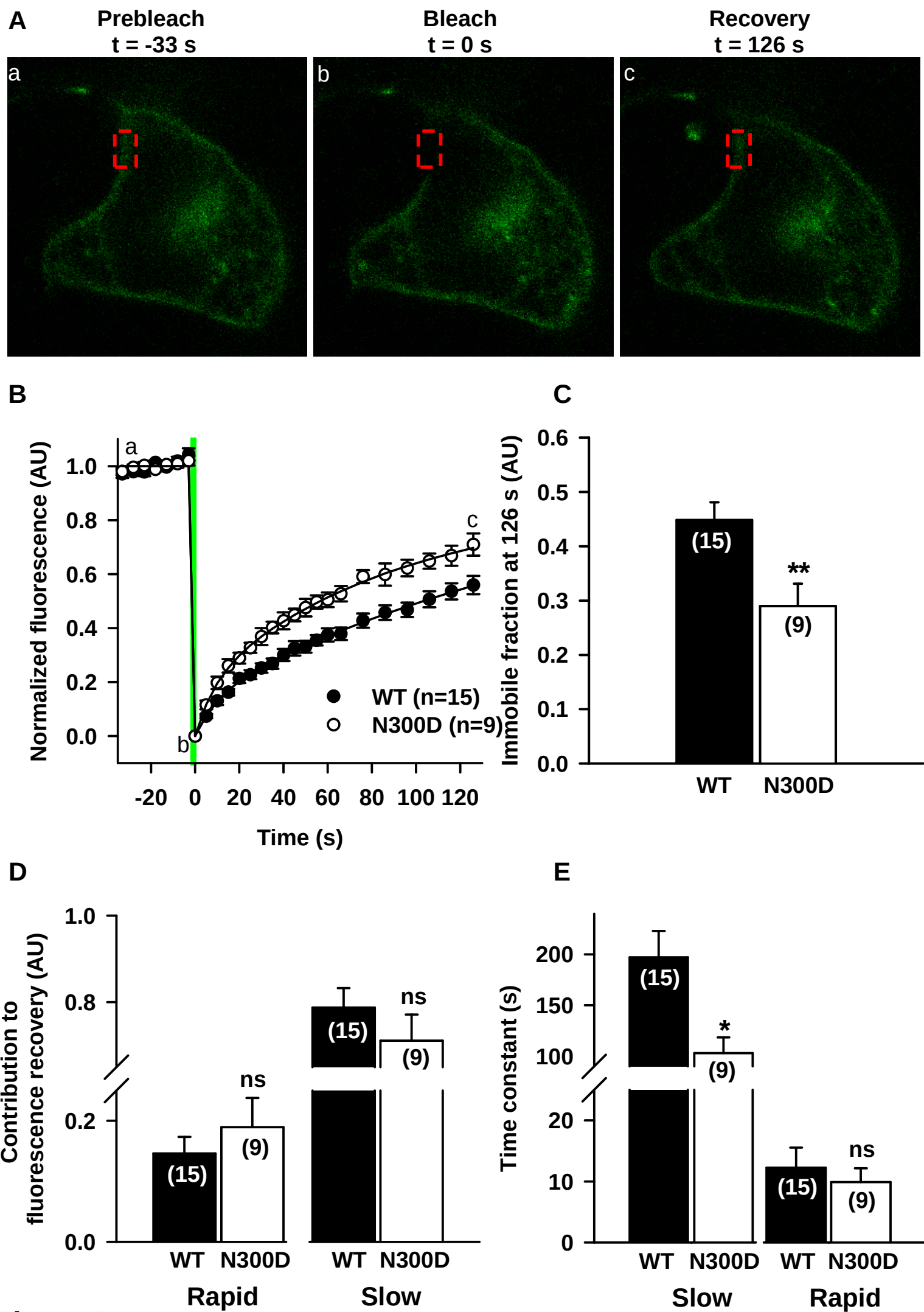


Figure 5

II.3 – Analyse des résultats

Au cours de ce projet, j'ai réalisé les mutagénèses dirigées, les expériences de patch-clamp, de western-blot, de biotinylation des protéines de surface, de FRAP ainsi que la modélisation mathématique.

Après avoir testé plusieurs modèles cellulaires et types de transfection, nous avons sélectionné la lignée cellulaire COS-7 et le mode de transfection au FuGENE ®6 suite à une mise au point réalisée par des études de patch-clamp et de Western-blot. L'étude électrophysiologique de la mutation Ca_v1.2 p.N300D a permis de mettre en évidence une diminution de 88% de la densité de courant $I_{Ca,L}$ à 0 mV. Nous avons ensuite souhaité étudier les paramètres biophysiques du courant $I_{Ca,L}$, notamment l'activation et l'inactivation. Les cellules transfectées avec le canal Ca_v1.2 p.N300D ne présentent pas ou peu de courant $I_{Ca,L}$ enregistrable lorsque nous utilisons le Ca²⁺ comme ion perméant. Afin de pouvoir étudier les paramètres d'activation et d'inactivation, nous avons choisi d'utiliser le barium comme ion perméant. Même si la proportion de cellules présentant un courant enregistrable a augmenté, elle restait tout de même insuffisante pour réaliser l'étude de l'inactivation. Les courbes courant-potential obtenues ne montrant aucune modification de cinétique entre la condition WT et mutée p.N300D, nous nous sommes alors intéressés au mécanisme conduisant à la diminution de la densité du courant $I_{Ca,L}$. Les expériences de Western-blot et de biotinylation des protéines de surface cellulaire ont montré une diminution significative de l'expression du canal dans la cellule et à la surface cellulaire. Cependant, cette technique est semi-quantitative et nous souhaitons confirmer ces résultats par une technique d'immunocytochimie. Au cours, de l'étude en microscopie confocale, nous avons eu la possibilité de tester la technique de FRAP dans le cadre de ce projet. Suite à des résultats préliminaires encourageants, nous avons poursuivi l'étude et pu mettre en évidence une augmentation de la diffusion à la surface cellulaire des cellules transfectées avec le canal Ca_v1.2 p.N300D.

II.4 – Discussion

Nous avons identifié 2 variants : le variant p.N300D du gène *CACNA1C* et le variant p.Q1695X du gène *SCN5A* dans une famille présentant plusieurs phénotypes de syndrome de Brugada, troubles de la conduction et raccourcissement de l'intervalle QT. Bien que dans 25% des cas, le SBr est associé à une mutation du canal Na_v1.5, nous avons observé, dans cette famille, un défaut de ségrégation de la mutation Na_v1.5 p.Q1695X avec le phénotype de SBr. Seuls deux individus atteints de la pathologie sont porteurs de la mutation. En revanche, nous avons observé une corrélation parfaite entre la présence de la mutation Na_v1.5 p.Q1695X et le phénotype de troubles de la conduction cardiaque. Par ailleurs, le

variant Ca_v1.2 p.N300D possède une bonne ségrégation chez les individus présentant un SBr et/ou un raccourcissement de l'intervalle QT (4/5 individus SBr, 4/4 individus SQTC).

Les 3 patients atteints de TdC sont tous porteurs de la mutation Na_v1.5 p.Q1695X. Cette mutation provoque l'apparition prématurée d'un codon stop dans la séquence protéique de Na_v1.5 qui est alors tronqué à partir de la boucle S5-S6 du domaine IV. Des études décrivent l'association de mutations stop situées dans cette même région aux TdC. Dans un travail publié en 1999, Schott et coll. décrivent 3 familles atteintes de TdC. Chez l'une de ces familles, ils ont identifié chez tous les patients, une mutation conduisant à l'apparition d'un codon stop prématuré : p.S1711+76X (Schott *et al.*, 1999). Cette protéine mutée exprimée dans différents systèmes de réexpression (COS-7, HEK-293, oocytes de xénope) est retenue dans le réticulum endoplasmique (Herfst *et al.*, 2003). Dans une autre étude, Schulze-Bahr et coll. ont identifié la mutation p.S1812X conduisant également à l'apparition d'un codon stop prématuré associé à des TdC (Schulze-Bahr *et al.*, 2003). Cette mutation provoque la troncation de l'ensemble de l'extrémité C-terminale de Na_v1.5. Aucune étude fonctionnelle de cette mutation n'a été réalisée. Ces différents travaux ajoutés à la corrélation parfaite entre le génotype et le phénotype de TdC observée dans la famille que nous étudions ici, appuient l'effet causal du variant Na_v1.5 p.Q1695X. De plus, les allongements significatifs des intervalles PR et QRS des porteurs de la mutation Na_v1.5 p.Q1695X suggèrent l'implication de cette mutation dans les troubles de la conduction.

La bonne ségrégation entre le variant Ca_v1.2 p.N300D et les phénotypes de SBr associé ou non au SQTC conforte l'hypothèse que des mutations de Ca_v1.2 peuvent être responsables du SBr (Antzelevitch *et al.*, 2007). Ici, la mutation Na_v1.5 p.Q1695X ne semble pas être causale du SBr. Une étude de Probst et coll. a montré des défauts de ségrégation similaires dans 13 familles indépendantes (Probst *et al.*, 2009). Il est maintenant clair que des mutations du gène *SCN5A* ne suffisent pas à expliquer la transmission de la pathologie. Par ailleurs, dans une étude réalisée en 2004, sur une préparation tissulaire ventriculaire droite de chien, Fish et Antzelevitch ont montré que l'addition de vérapamil (bloqueur des canaux calciques de type L) à l'ajmaline lors du test pharmacologique de dépistage du SBr permet de démasquer ce syndrome à l'ECG de manière plus efficace (Fish & Antzelevitch, 2004). Par ailleurs, Shimizu a montré que les bloqueurs des canaux calciques de type L (nifedipine, diltiazem) induisent une élévation du segment ST et sont responsables de formes acquises de SBr (Shimizu, 2005). En accord avec ces observations, plusieurs arguments suggèrent l'implication de la mutation Ca_v1.2 p.N300D dans l'apparition du SBr et/ou de SQTC :

- (i) La bonne corrélation génotype-phénotype observée dans cette famille. Quatre des 5 individus atteints du SBr sont porteurs de la mutation Ca_v1.2 p.N300D. L'individu II-2 présente un aspect de SBr de type I lors du test provocatif à l'ajmaline mais nous n'avons pas encore les résultats de l'analyse moléculaire. Ce patient est intégré dans une étude de séquençage haut débit nouvelle génération en cours de développement (HaloPlex, Agilent + MySeq, Illumina), permettant de séquencer simultanément environ 150 gènes : gènes-candidats ou régions-cibles.
- (ii) La mutation affecte un acide aminé très conservé au travers des espèces et n'a pas été retrouvée dans la population contrôle.
- (iii) L'expression de la mutation Ca_v1.2 p.N300D en cellules COS-7 conduit à une perte de fonction du courant calcique $I_{Ca,L}$.

Le syndrome de Brugada peut être causé par un déséquilibre de la balance courants entrants (I_{Na} , $I_{Ca,L}$)-courants sortants (I_{to} , I_{Kr} , I_{Ks}) lors de la phase de repolarisation précoce du PA (phase 1) entraînant la perte de la phase de plateau du PA ventriculaire droit. La diminution de la densité de courant calcique de type L observée peut donc être à l'origine du phénotype de SBr présent dans la famille étudiée.

Le variant Ca_v1.2 p.N300D affecte le courant calcique de type L intervenant dans le maintien de la dépolarisation lors de la phase de plateau du PA ventriculaire. En condition homozygote, la mutation provoque une diminution de 90% de la densité de courant maximum. Nous avons dans la suite de ce travail cherché à mettre en évidence le mécanisme menant à cette perte de fonction. Les expériences de Western blot et de FRAP ont révélé un défaut d'expression globale de la protéine mutée accompagné d'une augmentation de la mobilité de la protéine à la surface cellulaire. Une étude récente réalisée sur les dendrites de neurones hippocampaux a montré que Ca_v1.2 est exprimé en groupes ou « clusters » stables à la surface cellulaire (Di Biase *et al.*, 2011). Le renouvellement de Ca_v1.2 à la surface cellulaire suit une cinétique lente, tout comme les mouvements de diffusion latérale qui sont faibles voire inexistantes. A l'image de ce qui est observé dans les dendrites, on peut suspecter les mêmes mécanismes dans les cardiomyocytes. La mutation Ca_v1.2 p.N300D pourrait être à l'origine d'une déstabilisation de la protéine à la surface cellulaire et conduire à sa dégradation. Des expériences de pulse-chase pourraient permettre de tester cette hypothèse et d'estimer le renouvellement de la protéine à la surface cellulaire.

Une autre particularité mise en évidence dans cette étude, est le raccourcissement plus modéré de l'intervalle QT à l'ECG ainsi que la normalisation de la morphologie de l'onde T des patients sont porteurs des deux mutations. Afin de comprendre le mécanisme conduisant à la normalisation de l'intervalle QT chez les patients double porteurs, nous avons réalisé des simulations informatiques à l'aide d'un modèle unicellulaire ventriculaire gauche (Iyer *et al.*, 2004). La figure 24 illustre l'effet, à l'état hétérozygote, des mutations Ca_v1.2 p.N300D (56% du courant $I_{Ca,L}$ WT) et Na_v1.5 p.Q1695X (50% du courant I_{Na} WT) sur le potentiel d'action et les courants I_{Na} , $I_{Ca,L}$, $I_{to,f}$, $I_{to,s}$, I_{Kr} , I_{Ks} et I_{K1} . Cette stimulation suggère que :

- (i) Le PA ventriculaire étant déclenché par l'augmentation de la conductance sodique générant un courant dépolarisant de grande intensité, l'introduction de la mutation Na_v1.5 p.Q1695X provoque une diminution de la variation maximale de potentiel (dV/dt max) lors de la phase 0 du PA, amenant le potentiel de membrane à une valeur d'environ 0 mV au lieu de 30 mV en condition WT. Ce changement de la dV/dt max induit une diminution de l'intensité des courants $I_{to,f}$, $I_{to,s}$, un léger allongement de la durée des courants I_{Kr} , I_{Ks} , I_{K1} ainsi que du courant $I_{Ca,L}$ qui est augmenté. La disparition de l'encoche de la phase 1 du PA ventriculaire, s'explique par les modifications cumulées des courants $I_{Ca,L}$, $I_{to,f}$, $I_{to,s}$. En effet, en fin de phase 0 du PA, le potentiel membranaire est proche de 0 mV, valeur à laquelle le courant I_{to} est très faible (car peu de canaux sont activés) expliquant ainsi la diminution observée. De plus, à 0 mV, le courant $I_{Ca,L}$ est maximal. Prises ensemble, ces modifications conduisent à la disparition de la phase de repolarisation précoce. Le léger allongement des courants I_{Kr} , I_{Ks} , I_{K1} va conduire à un léger allongement du PA ventriculaire.
- (ii) L'introduction de la mutation Ca_v1.2 p.N300D modifie peu les courants I_{Na} , $I_{to,f}$ et $I_{to,s}$. Elle va, en revanche, fortement diminuer l'amplitude du courant $I_{Ca,L}$ et les courants I_{Kr} , I_{Ks} , I_{K1} repolariseront la cellule plus rapidement qu'en condition WT, conduisant à un raccourcissement du PA ventriculaire qui se traduit au niveau de l'ECG par un intervalle QT court.
- (iii) Lorsque les deux mutations Ca_v1.2 p.N300D et Na_v1.5 p.Q1695X sont introduites dans le modèle, on observe un allongement de la durée du PA par rapport à la condition Ca_v1.2 p.N300D seule. La diminution des courants I_{Na} , $I_{to,f}$ et $I_{to,s}$ ajoutée aux modifications décrites pour la mutation Ca_v1.2 p.N300D conduisent à la « réapparition » de l'encoche lors de la phase 1 du PA. En

effet, la diminution d' $I_{Ca,L}$ contre-balance les diminutions des courants $I_{to,f}$ et $I_{to,s}$ permettant ainsi une légère repolarisation avant le début de la phase 2 de plateau. Selon le modèle, la mutation Na_v1.5 p.Q1695X permet d'augmenter l'intensité du courant $I_{Ca,L}$, ce qui se traduit au niveau du PA par un léger allongement de la phase de plateau par rapport à la condition Ca_v1.2 p.N300D. Les courants potassiques repolarisants interviennent donc avec un retard, provoquant ainsi un allongement de la durée du PA.

Le modèle utilisé confirme notre hypothèse selon laquelle la mutation Na_v1.5 p.Q1695X est capable de diminuer l'impact de la mutation Ca_v1.2 p.N300D sur la durée du PA et ainsi conduire à la normalisation de l'intervalle QT des patients doubles porteurs par rapport aux patients porteurs de la mutation Ca_v1.2 p.N300D seule. Pour compléter cette étude, il serait intéressant d'étudier la durée des intervalles QT lors des tests à l'ajmaline des patients porteurs de la mutation Ca_v1.2 p.N300D.

Chez le propositus, la mutation du gène *SCN5A* a été associée au SBr. Ce n'est qu'après le diagnostic moléculaire des autres membres de la famille que la mutation du gène *CACNA1C* a été associée à la pathologie. A l'image de cette famille, la recherche de variants dans d'autres gènes est à prévoir dans les familles de patients SBr afin d'identifier la relation génotype/phénotype de ce syndrome ainsi que la prise en charge présymptomatique des apparentés. Il est en effet probable qu'une proportion de ces nouveaux variants se combine ou s'additionne à ceux préalablement identifiés formant ainsi un nouveau modèle génétique pour le SBr du type oligogénique. -

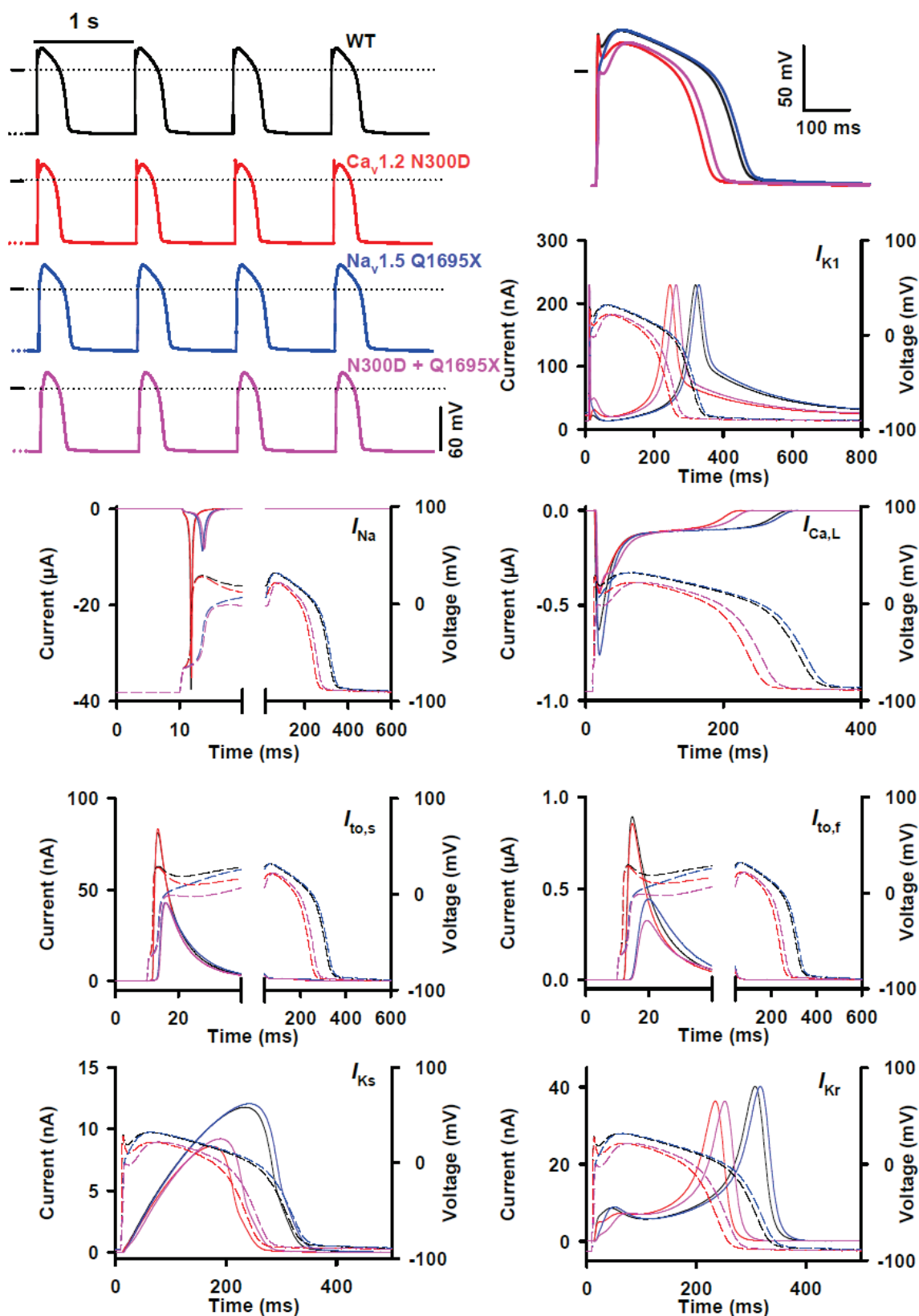


Figure 24 – Effets des mutations Ca_v1.2 p.N300D et Na_v1.5 p.Q1695X sur le potentiel d'action ventriculaire gauche et sur les courants qui le composent à partir d'un modèle unicellulaire (Iyer *et al.*, 2004).

En haut, PA ventriculaires gauches WT (noir), mutés Ca_v1.2 p.N300D (rouge), mutés Na_v1.5 p.Q1695X (bleu) et mutés Ca_v1.2 p.N300D et Na_v1.5 p.Q1695X (rose) stimulés toutes les secondes. En bas, courants I_{Na} , $I_{Ca,L}$, $I_{to,f}$, $I_{to,s}$, I_{Kr} , I_{Ks} et I_{K1} (ligne solide) superposés avec les PA ventriculaires gauches (ligne pointillée) dans les 4 conditions. Le modèle utilisé a été légèrement modifié afin de minimiser l'artefact lié à la stimulation (amplitude de stimulation : -50 $\mu A/\mu F$; durée de stimulation : 0.5 ms; GNa 100 ms/ μF). Les équations correspondantes aux courants Na⁺ et Ca²⁺ de type L ont été modifiées afin de reproduire les variations dues à chaque mutation (56% du courant $I_{Ca,L}$ WT pour la mutation Ca_v1.2 p.N300D et 50% du courant I_{Na} pour la mutation Na_v1.5 p.Q1695X). Les autres courants n'ont pas été modifiés.

**III – Syndrome du QT court associé à un déficit primaire en carnitine : nouveau
mécanisme**

III.1- Introduction

Les acides gras libres sont la source majeure d'énergie dans le cœur, le foie et le muscle squelettique. Ils sont transportés jusqu'aux mitochondries, site de leur β -oxydation. La carnitine, petit amine quaternaire, est le cofacteur essentiel pour le transport des acides gras à longues chaînes à travers la membrane mitochondriale interne (Bremer, 1983). Dans le cœur, les enzymes de synthèse nécessaires à la production de carnitine sont absentes. La présence de carnitine dans ce tissu est donc dépendante de sa captation dans le sang par une protéine de transport actif : la protéine OCTN2 (Tamai *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1998). La littérature montre qu'un déficit en transporteur OCTN2 conduit à une réduction du taux plasmatique de carnitine et d'acylcarnitine causée par un défaut de réabsorption rénale (Tein, 2003). Il s'agit d'une maladie à transmission autosomique récessive associée le plus souvent à une cardiomyopathie et/ou à la survenue de fibrillation ventriculaire et à la mort subite (Rahbeeni *et al.*, 2002; Tein, 2003; Melegh *et al.*, 2004; Amat di San Filippo *et al.*, 2008).

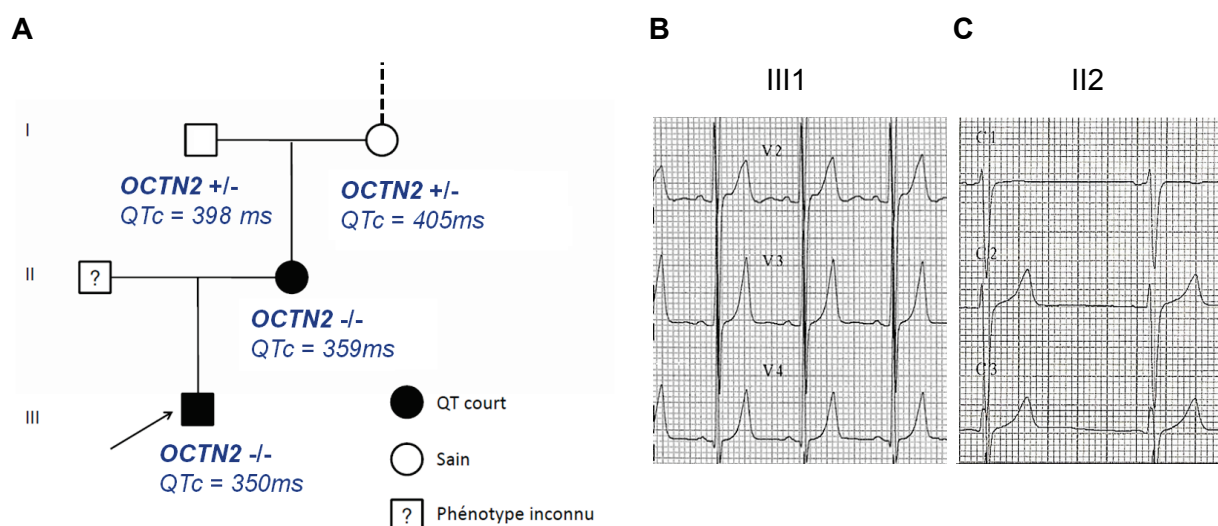


Figure 25 – Famille atteinte du syndrome du QT court et d'un déficit primaire en carnitine

(A) Arbre généalogique de la famille montrant la ségrégation des mutations du gène *SLC22A5* codant pour le transporteur OCTN2, (B) et (C) électrocardiogrammes des dérivations précordiales V1 à V3 montrant un aspect compatible avec un syndrome du QT court, respectivement celui du propositus (III1) et de sa mère (II2). Les carrés représentent les hommes, les ronds, les femmes. Le propositus est indiqué par une flèche. La durée de l'intervalle QTc est indiquée sous chaque individu. -/- *OCTN2* signifie mutation hétérozygote composite d'*OCTN2* et +/- *OCTN2* signifie mutation hétérozygote d'*OCTN2*.

Un enfant de 22 mois a été hospitalisé au CHU de Tours suite à une syncope. La réalisation d'un holter a permis de mettre en évidence des durées d'intervalle QTc se raccourcissant jusqu'à 270 ms. L'enquête familiale réalisée à Tours a permis de diagnostiquer un raccourcissement de l'intervalle QT chez la mère du propositus qui est également symptomatique (fibrillation ventriculaire) alors que les grands parents sont asymptomatiques (figure 25). De plus, le propositus et sa mère présentent un déficit primaire en carnitine. Le séquençage du gène *SLC22A5*, codant pour la protéine OCTN2 a permis l'identification de variants hétérozygotes. Chacun des parents du propositus ayant transmis un variant du gène *SLC22A5*, le propositus est donc hétérozygote composite. De façon surprenante, la mère du propositus a également hérité de deux allèles mutés de ces deux parents. Dans cette famille, le propositus et sa mère présentent tous deux un intervalle QT raccourci associé à des troubles du rythme cardiaque mais étonnamment ils ne développent pas de cardiomyopathie. La supplémentation orale en carnitine permet de normaliser la durée de l'intervalle QT et d'éviter la survenue de nouveaux troubles du rythme cardiaque.

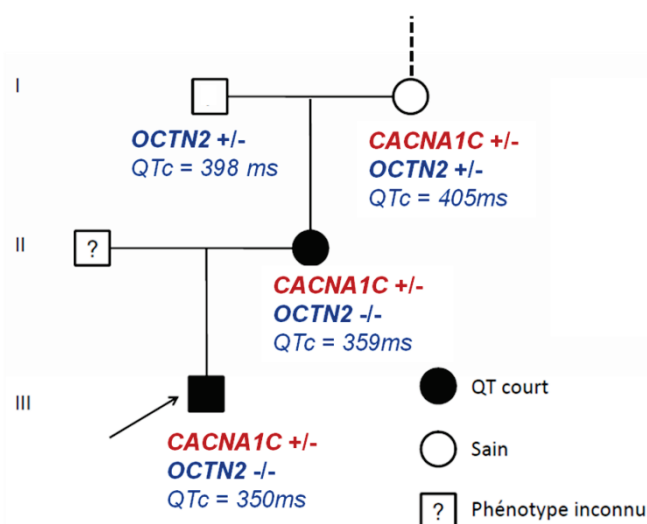


Figure 26 – Arbre généalogique de la famille QT court - déficit primaire en carnitine

Arbre généalogique de la famille montrant la ségrégation des mutations des gènes *SLC22A5* codant pour le transporteur OCTN2, et *CACNA1C*. Les carrés représentent les hommes, les ronds les femmes. Le propositus est indiqué par une flèche. La durée de l'intervalle QTc est indiquée sous chaque individu. OCTN2 -/- signifie mutation hétérozygote composite d'OCTN2, OCTN2 +/- signifie mutation hétérozygote d'OCTN2 et CACNA1C +/- signifie mutation hétérozygote de CACNA1C.

En parallèle de ce travail réalisé à Tours, nous avons réalisé au laboratoire le séquençage d'une cohorte de 15 patients atteints du syndrome du QT court par une approche gène-candidat. Les gènes *KCNJ2*, *KCNQ1*, *KCNH2*, *CACNA1C* et *CACNB* déjà mis en évidence dans cette pathologie ont tout d'abord été séquencés et la substitution

c.667G>C a été identifiée dans le gène *CACNA1C* chez un individu, qui s'est révélé être le propositus de la famille tourangelle atteinte également du déficit primaire en carnitine. La mère (II2) et la grand-mère (I2) du propositus sont également porteuses de ce variant (figure 26) qui conduit au niveau protéique à la substitution d'une alanine en position 223 par une proline. Ce résidu est situé sur la boucle extracellulaire S3-S4 du domaine I du canal Ca_v1.2. Il s'agit d'un variant rare puisqu'il n'a pas été retrouvé chez 312 sujets contrôles et que cet acide aminé est très conservé à travers les espèces (figure 27). L'ensemble de ces données nous a permis d'émettre l'hypothèse : Le variant du gène *CACNA1C* n'est pas causal pour le SQTC, mais il pourrait contribuer à l'absence de cardiomyopathie habituellement observée chez les patients ayant une perte de fonction du gène *SLC22A5*.

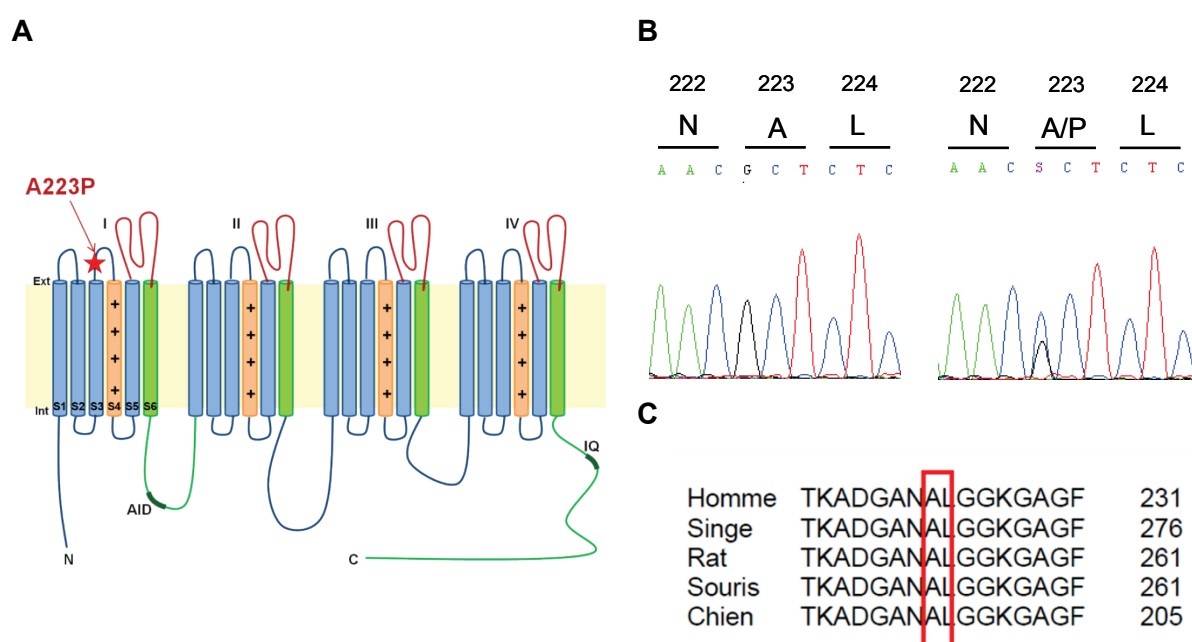


Figure 27 – Le variant faux-sens A223P du canal calcique Ca_v1.2

(A) Représentation schématique du canal Ca_v1.2 et du variant faux-sens A223P. (B) Electrophorégramme de la séquence d'un individu contrôle (gauche) et du propositus de la famille muté p.A223P (droite). (C) Conservation de l'acide aminé alanine (A) en position 223 du gène *CACNA1C* (NM_000719) au travers des espèces de mammifères.

Des études fonctionnelles sont actuellement en cours à Tours et dans notre laboratoire afin de caractériser les effets de chaque variant. A Tours, l'unité INSERM U1069, *Nutrition Croissance et Cancer*, évalue l'effet de différentes doses de L-palmitoyl carnitine sur les canaux ioniques impliqués dans le potentiel d'action cardiaque. Ces travaux permettront de comprendre l'effet de mutations du gène codant pour le transporteur de la carnitine OCTN2 ainsi que la diminution plasmatique en acylcarnitine sur la durée de l'intervalle QT. Parallèlement, j'ai débuté l'étude fonctionnelle du variant A223P Ca_v1.2 ainsi que de sa régulation potentielle par l'acylcarnitine.

III.2 – Résultats

Lors de ma première année de thèse, j'ai évalué la fonction, l'expression et le trafic du variant p.A253P du canal Cav1.2 de rat (substitution exprimée chez le rat équivalente à la substitution p.A223P humaine). Nous avons rencontré de nombreuses difficultés d'expression des plasmides, et nous avons donc cherché à contourner ce problème en travaillant par la suite avec les plasmides codant pour les sous unités du complexe canalaire Ca_v1.2 humain.

III.2.1 – Etude fonctionnelle à partir d'un plasmide codant pour le canal calcique Ca_v1.2 de rat

III.2.1.1 – Effet du variant Ca_v1.2 p.A253P sur le courant I_{Ca,L}

Nous avons comparé les effets de la mutation p.A253P sur l'activité électrique du canal Ca_v1.2 enregistrée dans des cellules HEK tsA-201 co-transfectées avec Ca_v1.2 et ses sous unités régulatrices (figure 28). Le canal calcique Ca_v1.2 de rat est une protéine difficile à exprimer en système d'expression hétérologue. En effet, seules 75% des cellules exprimant Ca_v1.2 WT présentent un courant calcique d'une amplitude moyenne de $-11,13 \pm 1,42$ pA/pF ($n = 70$; Figure 28A). En condition mutée, seulement 55% des cellules présentent un courant mesurable et dont la densité est significativement plus faible que celle du canal WT ($-5,19 \pm 0,71$ pA/pF, $n = 82$, $P < 0.001$; Figure 28B). Cependant, la présence de ce variant n'affecte pas les cinétiques d'activation et d'inactivation du canal Ca_v1.2 (temps au pic à 0 mV : $4,8 \pm 0,2$ ms, $n=52$ pour le WT, $5,3 \pm 0,3$ ms, $n=47$ pour le variant p.A253P ; constante de temps d'inactivation à 0 mV : $49,2 \pm 2$ ms et $53,1 \pm 4.5$ ms respectivement).

Suite à ces observations, différents paramètres biophysiques ont été étudiés. La sensibilité au potentiel des canaux Ca_v1.2 WT et muté p.A253P a été testée en imposant des créneaux de potentiels allant de -60 mV à +50 mV (figure 29A). Le décours de la relation courant-potentiel (figure 29B) n'est pas modifié par la présence du variant A253P. Le potentiel d'inversion du courant calcique reste similaire dans les deux conditions (62.76 ± 1.13 mV pour le WT et 58.73 ± 2.59 mV pour le mutant A253P). La dépendance au potentiel de l'activation du courant I_{Ca,L} est similaire dans les deux conditions ($V_{1/2}$: $-13,08 \pm 0,71$ mV, $n=13$ pour le canal WT, $-11,54 \pm 1,15$ mV, $n=9$ pour le variant p.A253P ; pente : $6,34 \pm 0,17$ mV et $6,37 \pm 0,28$ mV respectivement ; figure 29C). Ces données suggèrent que la mutation A253P n'affecte pas l'activation voltage dépendante du canal calcique Ca_v1.2, ni sa sélectivité.

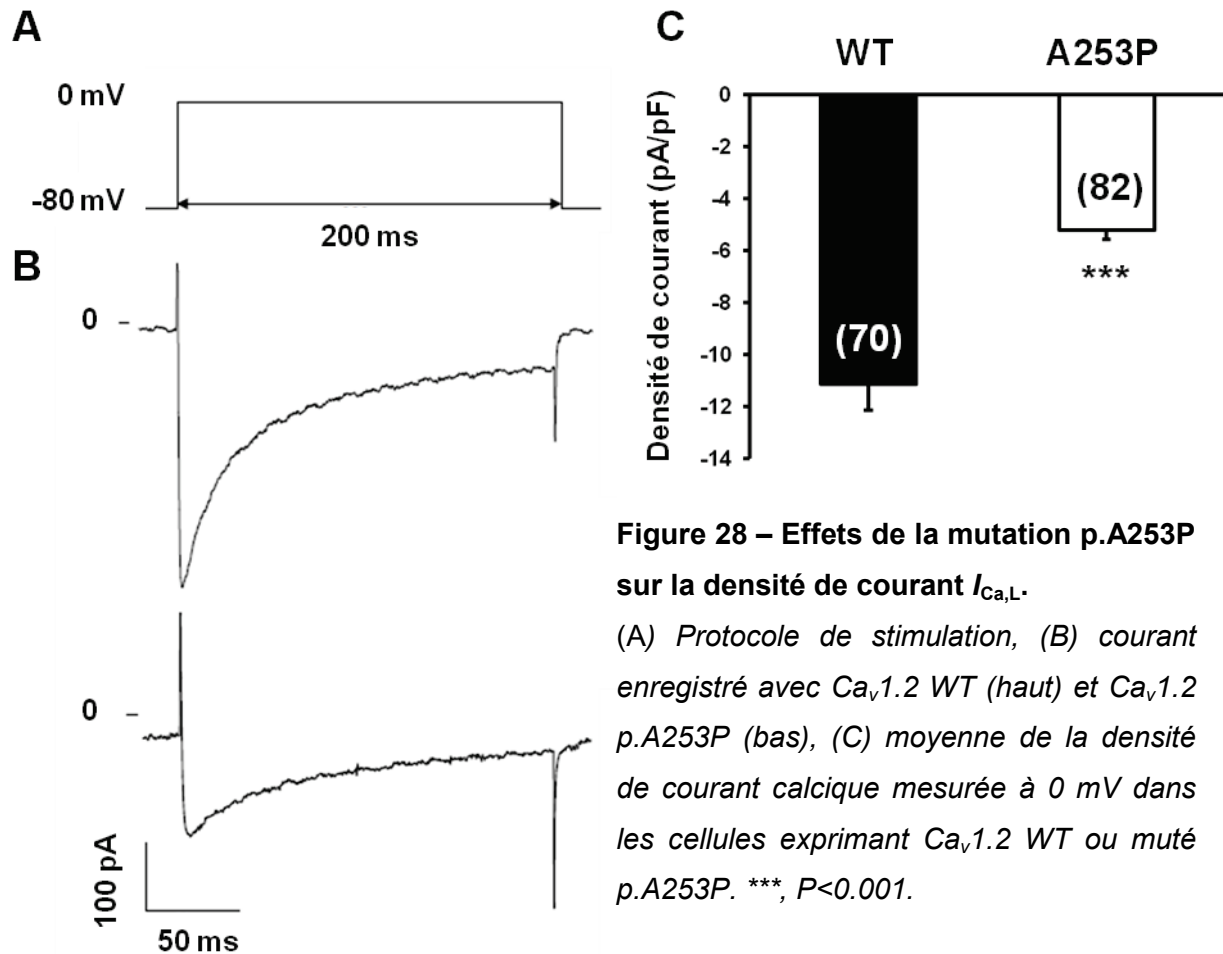


Figure 28 – Effets de la mutation p.A253P sur la densité de courant $I_{Ca,L}$.

(A) *Protocole de stimulation*, (B) *courant enregistré avec Ca_v1.2 WT (haut) et Ca_v1.2 p.A253P (bas)*, (C) *moyenne de la densité de courant calcique mesurée à 0 mV dans les cellules exprimant Ca_v1.2 WT ou muté p.A253P. ***, $P < 0.001$.*

Le courant calcique $I_{Ca,L}$ possède 2 types d'inactivation : une inactivation calcium dépendante et une inactivation dépendante du potentiel. L'inactivation dépendante du potentiel du courant $I_{Ca,L}$ a été étudiée dans les cellules exprimant Ca_v1.2 WT ou muté p.A253P (figure 29D). La disponibilité des canaux Ca_v1.2 en fonction du potentiel est similaire dans les deux conditions ($V_{1/2}$: $-15,24 \pm 1,2$ mV, $n=7$ pour le canal WT, $-14,88 \pm 1,39$ mV, $n=6$ pour le variant p.A253P ; pente: $-6,4 \pm 0,43$ mV et $-5,04 \pm 0,26$ mV respectivement).

L'ensemble de ces données suggère que le variant p.A253P provoque une baisse du courant $I_{Ca,L}$ sans altérer la dépendance au potentiel de l'activation et de l'inactivation.

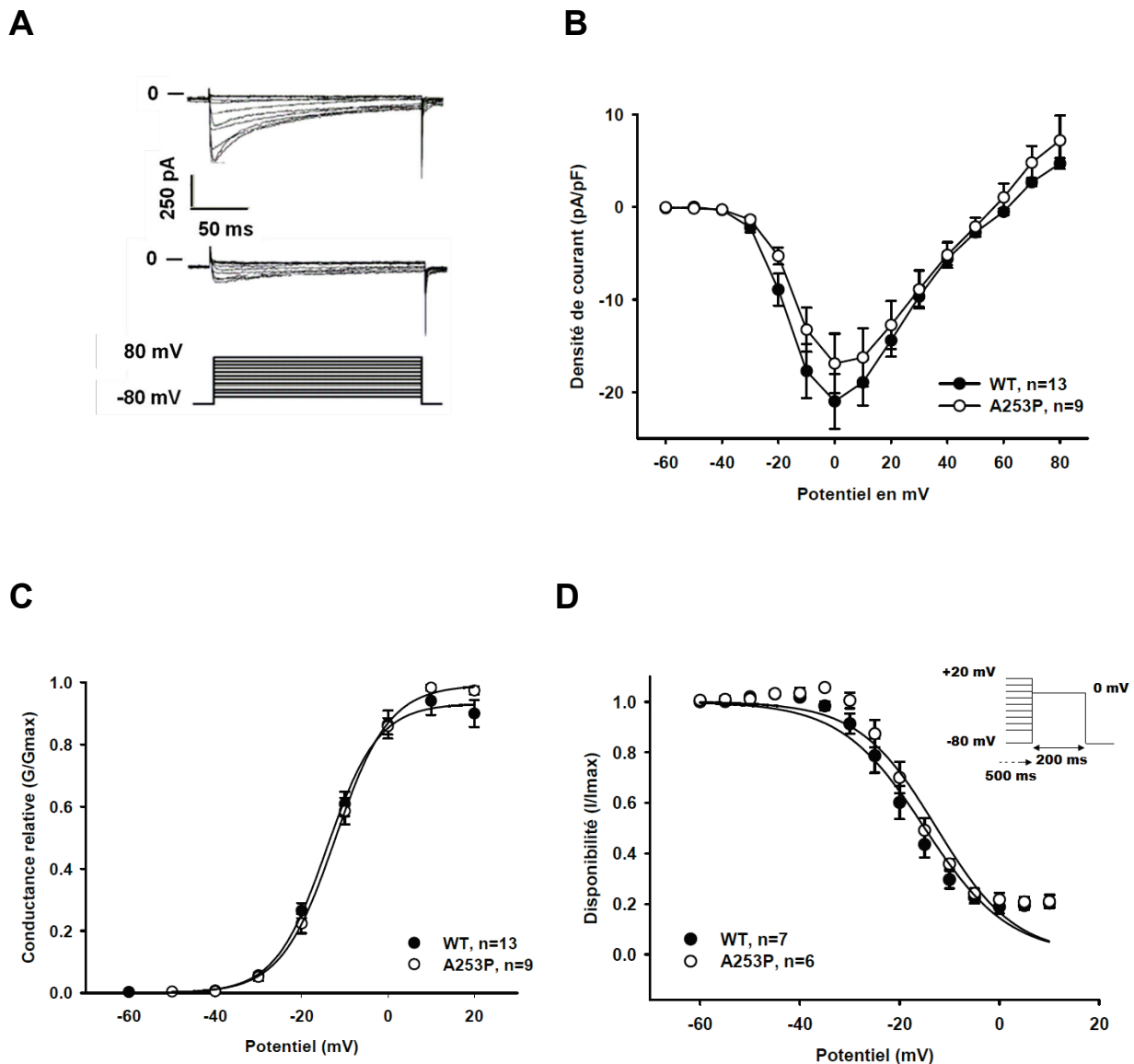


Figure 29 – Effet du variant A253P sur la dépendance au potentiel du canal Ca_v1.2.

(A) Exemples de courants enregistrés à différents potentiels (protocole de stimulation (bas) de -60 à +50 mV, incrément : 10 mV) dans une cellule exprimant Ca_v1.2 WT (haut) ou le variant p.A253P (milieu) ; (B) Courbes courant-potential en conditions WT et muté A253P ; (C) Courbes d'activation du courant $I_{Ca,L}$ en conditions WT et muté A253P ; (D) Courbes de disponibilité des canaux Ca_v1.2 WT et mutés A253P (encart : protocole de stimulation)

III.2.1.2 – Effet du variant A253P sur l'expression totale de Ca_v1.2

La diminution de la densité de courant $I_{Ca,L}$ dans les cellules exprimant le variant A253P peut avoir différentes origines : (i) un défaut d'expression du canal muté, (ii) un défaut de trafic à la membrane ou (iii) un canal dysfonctionnel. Pour tester l'hypothèse d'un défaut d'expression totale la protéine Ca_v1.2 p.A253P, des Western blot ont été réalisés.

Comme le montre la figure 30, un signal est détecté à 250 kDa dans les conditions WT et mutée A253P. Ce signal, absent dans le puits contenant les lysats cellulaires non transfectés, correspond à la protéine Ca_v1.2. L'intensité du signal est similaire dans les deux conditions reflétant un niveau d'expression totale similaire à celui du canal sauvage. La β -tubuline, détectée à 50 kDa, est utilisée comme protéine de référence car son niveau d'expression est en général, stable.

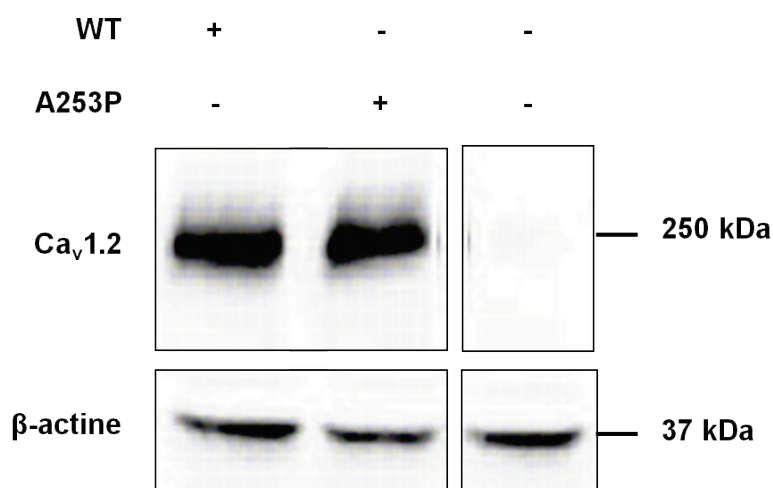


Figure 30 – Expression totale des protéines Ca_v1.2 WT et mutées A253P.

La bande à 250 kDa correspond à la protéine Ca_v1.2, la bande à 37 kDa correspond à la protéine β -actine.

Les résultats obtenus en Western blot ont été confirmés par la technique d'immunocytochimie. Comme illustré sur la figure 31, le marquage intracellulaire de Ca_v1.2 est homogène entre les conditions WT et mutée A253P.

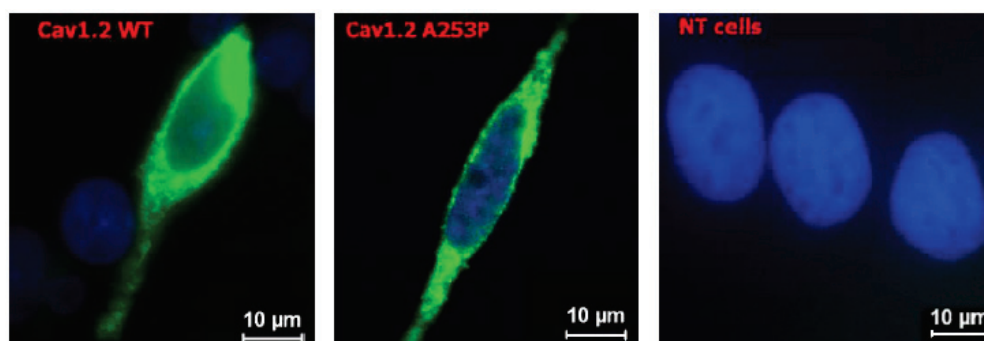


Figure 31 – Marquages intracellulaires de la protéine Ca_v1.2 sur cellules HEK-tSA-201.

A gauche, condition Ca_v1.2 WT ; au milieu, condition Ca_v1.2 p.A253P ; à droite, contrôle négatif sur cellules non transfectées.

Les résultats obtenus au cours des expériences de Western blot et d'immunocytochimie suggèrent que la mutation p.A253P n'affecte pas le niveau d'expression totale de la protéine Ca_v1.2 dans les cellules HEK-tSA-201.

III.2.1.3 – Effet du variant A253P sur l'expression à la surface cellulaire de Ca_v1.2

L'expression totale de Ca_v1.2 n'étant pas modifiée, nous nous sommes intéressés au trafic membranaire de la protéine en utilisant deux techniques distinctes, l'immunocytochimie par marquage extracellulaire de la protéine Ca_v1.2 et la biotinylation des protéines de surface.

En ce qui concerne les expériences d'immunocytochimie, les résultats obtenus après le marquage extracellulaire ne nous ont pas permis de conclure quant à l'expression membranaire de Ca_v1.2. La protéine semble être très peu exprimée à la membrane et est donc difficile à détecter par cette technique.

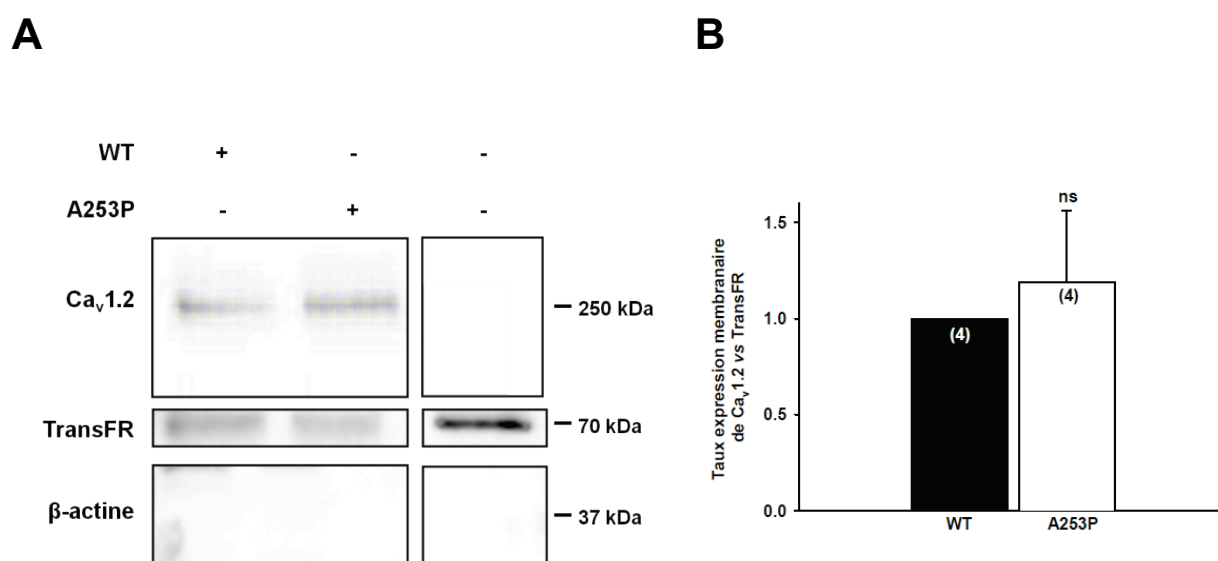


Figure 32 – Expression à la surface cellulaire des protéines Ca_v1.2 WT et mutées A253P.

(A) Gel représentatif. La bande à 250 kDa correspond à la protéine Ca_v1.2, la bande à 70 kDa correspond au récepteur à la transferrine (TransFR) et la bande à 37 kDa correspond à la protéine β-actine. (B) Taux d'expression à la surface cellulaire normalisé de Ca_v1.2. ns, non significatif.

Nous avons ensuite choisi d'étudier l'expression membranaire de Ca_v1.2 par la technique de biotinylation des protéines de la surface cellulaire. Cette technique permet de purifier l'ensemble des protéines de la surface cellulaire et d'obtenir une estimation semi-quantitative de l'expression du canal Ca_v1.2. Les premiers résultats indiquent la présence

d'un signal à 250 kDa dans les conditions WT et mutée A253P. Ce signal, absent dans les puits contenant les lysats cellulaires non transfectés correspond à la protéine Ca_v1.2 (figure 32A). L'intensité de ce signal est similaire dans les deux conditions. Le récepteur à la transferrine (TransFR), situé à la surface cellulaire, est utilisé comme protéine de référence, car son niveau d'expression est, en général, stable. β -actine est utilisée pour vérifier l'absence de protéines intracellulaires dans les puits contenant les lysats membranaires purifiés. L'intensité des signaux a ensuite été quantifiée, et suggère que le variant p.A253P n'affecte pas l'expression à la surface cellulaire de la protéine Ca_v1.2 (figure 32B, expression normalisée, 1 pour le WT et 1.19 ± 0.37 pour le variant A253P).

III.2.1 – Etude fonctionnelle à partir d'un plasmide codant pour le canal calcique Ca_v1.2 humain

Lors de l'étude fonctionnelle de la mutation p.A253P Ca_v1.2, j'ai rencontré de nombreux problèmes techniques. La première contrainte a été liée au modèle cellulaire utilisé. En effet, l'expression des plasmides codant pour les protéines de rat en cellules HEK tSA-201 nécessitait que celles-ci soient cultivées en l'absence d'antibiotiques. De ce fait, de nombreuses contaminations bactériennes sont venues interrompre les expériences. De plus, le modèle HEK tSA-201 est un modèle cellulaire difficile pour les expériences de biochimie et de biologie cellulaire. Les cellules perdent rapidement leur adhérence au support en cas de changement de milieu par exemple. Lors des expériences de biotinylation des protéines de surface, les cellules sont incubées 1 h en présence de biotine. Suite à cette incubation, plus de 75% des cellules sont éliminées par perte d'adhérence, introduisant ainsi un biais important pour l'analyse de l'expression de la protéine. Un autre des problèmes rencontrés a été le manque de reproductibilité dans les expériences de patch-clamp. D'une journée à l'autre, le pourcentage de cellules transfectées permettant d'enregistrer un courant pouvait varier de manière importante (de 0 à 80%). Enfin, une des contraintes majeures était l'espèce d'origine des gènes utilisés pour exprimer le canal Ca_v1.2. Les plasmides codent pour les protéines de rat. Pour se rapprocher au maximum des conditions physiologiques, il était souhaitable de travailler avec des plasmides codant pour la protéine Ca_v1.2 humaine. L'ensemble de ces problèmes nous a conduits à travailler avec les plasmides codant pour les protéines humaines. Ces plasmides nous ont été fournis par le Dr. Charles Antzelevitch (Masonic Medical Research Laboratory, Utica, NY)

Pour les mêmes raisons que dans le cadre du projet « Mutations associées des gènes *SCN5A* et *CACNA1C* dans une famille atteinte du syndrome de Brugada et de troubles de la conduction cardiaque », nous avons sélectionné la lignée cellulaire COS-7 et le mode de transfection au FuGENE ®6 pour réaliser l'ensemble des expériences suivantes.

L'étude fonctionnelle de la mutation p.A223P Ca_v1.2 en cellules COS-7 a débuté par des expériences de patch clamp en configuration cellule entière. Contrairement à ce qui a été observé avec les plasmides codant pour les protéines de rat, la densité de courant calcique maximum est, en moyenne, similaire dans les deux conditions WT et muté A223P ($-10,18 \pm 1,92$ pA/pF, $n=28$ pour le WT et $-7,45 \pm 2,08$ pA/pF, $n=18$ pour le variant A223P ; figure 33). La mutation n'affecte pas non plus la cinétique d'activation du canal Ca_v1.2 (temps au pic à 0 mV : $6,0 \pm 0,1$ ms, $n=22$ pour le WT, $5,8 \pm 0,2$ ms, $n=11$ pour le variant p.A223P).

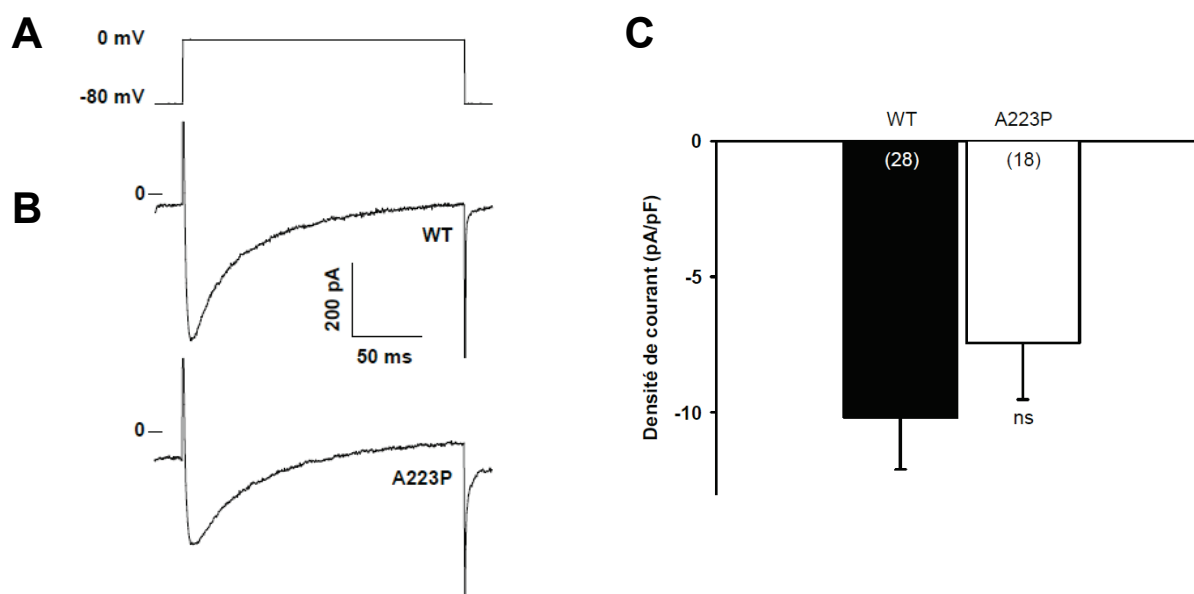


Figure 33 - Effets de la mutation p.A223P sur la densité de courant $I_{Ca,L}$.

(A) Protocole de stimulation, (B) courant enregistré avec Ca_v1.2 WT (haut) et Ca_v1.2 p.A223P (bas), (C) moyenne de la densité de courant calcique mesurée à 0 mV dans les cellules exprimant Ca_v1.2 WT ou muté p.A223P. ns, non significatif.

La sensibilité au potentiel des canaux Ca_v1.2 WT et muté p.A223P a été testée en imposant des créneaux de potentiels allant de -60 mV à +80 mV (figure 34A). Le déroulé de la relation courant-potentiel normalisée du variant pA223P Ca_v1.2 (figure 34B) est décalé vers des potentiels plus positifs sans modification du potentiel d'inversion du courant calcique qui reste similaire dans les deux conditions ($95,9 \pm 33,0$ mV pour le WT et $64,0 \pm 4,6$ mV pour le mutant A223P). La dépendance au potentiel de l'activation du courant $I_{Ca,L}$ est décalée vers des potentiels plus positifs lorsque le canal est muté p.A223P ($V_{1/2} : -19,2 \pm 0,7$ mV, $n=6$ pour le canal WT, $-10,1 \pm 1,5$ mV, $n=8$ pour le variant p.A223P ; figure 34C et D). Ces données suggèrent que la mutation A223P affecte l'activation voltage dépendante du canal calcique Ca_v1.2 sans modifier sa sélectivité.

Nous sommes actuellement en train d'étudier l'inactivation voltage dépendante ainsi que la réactivation du courant $I_{Ca,L}$ afin de mettre en évidence un éventuel effet du variant pA223P Ca_v1.2 sur ces deux paramètres.

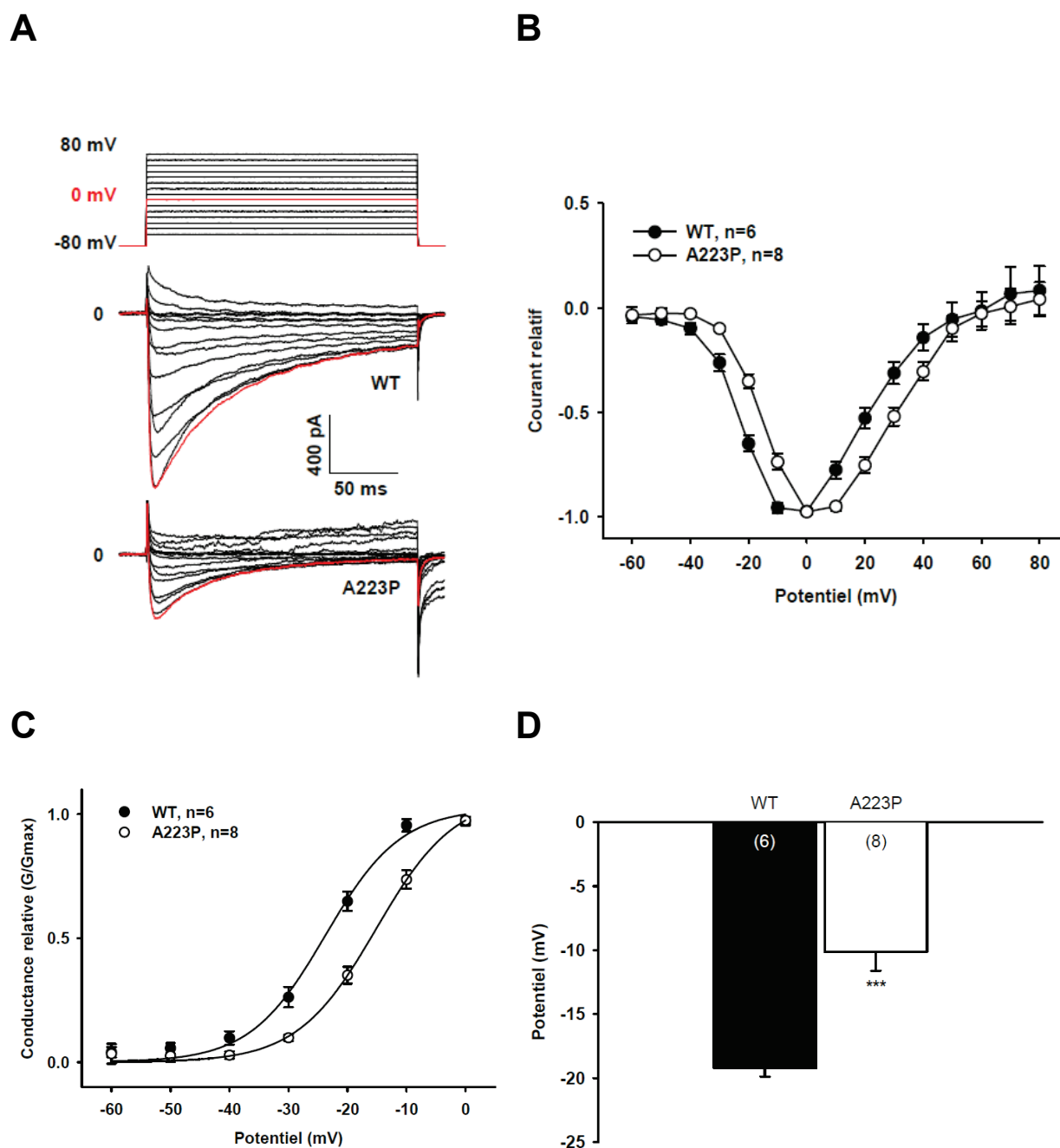


Figure 34 - Effet du variant A223P sur la dépendance au potentiel du canal Ca_v1.2

(A) Exemples de courants enregistrés à différents potentiels (protocole de stimulation (bas) de -60 à +80 mV, incrément : 10 mV) dans une cellule exprimant Ca_v1.2 WT (haut) ou le variant p.A223P (milieu). En rouge, courants enregistrés à 0 mV ; (B) Courbes courant-potentiel en conditions WT et muté A223P ; (C) Courbes d'activation du courant $I_{Ca,L}$ en

conditions WT et muté A223P ; (D) Potentiel de demi-activation des canaux Ca_v1.2 WT et p.A223P. ***, $p < 0.001$.

Les résultats obtenus suggèrent que le variant pA223P Ca_v1.2 provoque une perte de fonction de l'activation voltage dépendante du canal Ca_v1.2. Pour rappel, les patients identifiés dans cette famille sont atteints d'un déficit primaire en carnitine associé à un syndrome du QT court. L'absence chez ces patients de cardiomyopathie, généralement associée au déficit primaire en carnitine, nous a conduits à penser que la mutation p.A223P Ca_v1.2 pourrait protéger de l'apparition de cette complication. Par ailleurs, la mutation du gène codant pour la protéine OCTN2, transporteur de la carnitine, semble être à l'origine du raccourcissement de l'intervalle QT observé dans cette famille. En plus d'une corrélation parfaite entre la présence du variant et le phénotype, les patients retrouvent un intervalle QT normal suite à la supplémentation orale en carnitine. Ces différentes observations nous conduisent à penser que la carnitine pourrait avoir un effet sur le courant $I_{Ca,L}$ en particulier. Afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse, nous allons étudier l'effet de l'application extracellulaire de 30 μ M de L-palmitoyl-carnitine sur le courant calcique $I_{Ca,L}$ par des expériences de patch clamp en configuration cellule entière.

Dans le cadre de ce projet, j'ai réalisé les mutagénèses dirigées, les expériences de patch-clamp, de western-blot, de biotinylation des protéines de surface, et d'immunocytochimie.

III.3 – Discussion

Chez une famille présentant un phénotype de QT court associé à un déficit primaire en carnitine, nous avons identifié des variants sur deux gènes : le gène *CACNA1C* codant pour le canal Ca_v1.2 et le gène *SLC22A5* codant pour le transporteur de la carnitine OCTN2.

Le canal calcique Ca_v1.2 est impliqué dans différents troubles du rythme cardiaque tels que le SQT congénital de type 8 (Splawski *et al.*, 2004). Des mutations des gènes codant pour le canal Ca_v1.2 et ses sous-unités régulatrices ont également été associées au SQT (Antzelevitch *et al.*, 2007; Templin *et al.*, 2011). Dans la famille étudiée, la mutation p.A223P du gène *CACNA1C* a été identifiée chez trois individus. Cependant, l'individu I-2, grand-mère du propositus est porteuse de la mutation mais ne présente pas de raccourcissement de l'intervalle QT à l'ECG. La supplémentation orale en carnitine des individus atteints d'un SQT, provoque une normalisation de la durée de leur intervalle QT. Ces observations nous ont conduits à penser que la mutation Ca_v1.2 p.A223P seule ne pouvait pas être suffisante pour expliquer l'apparition d'un SQT dans cette famille.

A l'heure actuelle, aucune étude n'a associé le gène *SLC22A5* au SQTC. Dans la famille étudiée ici, les mutations du gène *SLC22A5* ségrégent parfaitement avec le phénotype de SQTC. De plus, la normalisation de la durée de l'intervalle QT suite à l'administration orale de carnitine appuie l'hypothèse d'un effet causal de ces mutations dans la pathologie. Par ailleurs, des mutations perte-de-fonction du transporteur OCTN2 au niveau des fibroblastes, des muscles, du cœur et des reins, conduisent à l'apparition d'un déficit primaire en carnitine (Stanley *et al.*, 1991; Pons *et al.*, 1997; Nezu *et al.*, 1999; Tein, 2003). La présence dans la famille étudiée ici, de variants du gène *SLC22A5* serait donc responsable de ce phénotype. De nombreuses études ont mis en évidence l'implication du transporteur OCTN2 dans le développement de cardiomyopathie dilatée ou hypertrophique et/ou à la survenue de fibrillation ventriculaire et à la mort subite (Rahbeeni *et al.*, 2002; Tein, 2003; Melegh *et al.*, 2004; Amat di San Filippo *et al.*, 2008; Grube *et al.*, 2011). Une étude récente réalisée sur un modèle de cardiomyopathie virale induite de la souris montre que l'expression des ARNm codant pour le transporteur OCTN2 est réduite de 50% (Grube *et al.*, 2011). Dans cette même étude, les auteurs mettent en évidence une corrélation entre le niveau d'expression en ARNm d'OCTN2 et la fraction d'éjection ventriculaire gauche. Par ailleurs, Koizumi et coll. montrent que les patients porteurs hétérozygotes de mutations du gène *SLC22A5* présentent une dysfonction cardiaque (Koizumi *et al.*, 1999). Les individus porteurs ont généralement un phénotype normal à la naissance jusqu'aux premiers signes de cardiomyopathie qui apparaissent dans les premières années de l'enfance (de 1 à 7 ans) (Tein *et al.*, 1990; Garavaglia *et al.*, 1991; Stanley *et al.*, 1991). La famille que nous décrivons dans cette étude, a la particularité de ne pas développer de cardiomyopathie malgré un âge tardif de dépistage pour la mère (29 ans). Ces observations nous ont conduits à émettre l'hypothèse que la mutation Ca_v1.2 p.A223P pourrait protéger les patients du développement d'une cardiomyopathie. En effet, dans des cas de cardiomyopathies dilatées par exemple, un déséquilibre de l'homéostasie calcique a été mis en évidence (Haghighi *et al.*, 2004; Ahmad *et al.*, 2005). Ce déséquilibre de l'homéostasie calcique conduit à une augmentation de la surcharge calcique dans la cellule, menant au développement d'une cardiomyopathie (Hill, 2003). Il a été montré dans différents travaux qu'au cours de l'hypertrophie cardiaque, la densité du courant $I_{Ca,L}$ serait dans un premier temps augmentée puis se normaliserait lors de la phase d'hypertrophie compensée, pour finalement diminuer lors de la défaillance cardiaque sévère. Dans le cas de la famille étudiée ici, notre hypothèse est que la mutation Ca_v1.2 p.A223P diminue l'entrée de calcium dans la cellule lors de la phase précoce de la cardiomyopathie dilatée, réduisant ainsi la surcharge calcique et empêchant le développement de cardiomyopathie chez les patients porteurs de variants sur les gènes *SLC22A5* et *CACNA1C*.

De nombreuses études ont montré un effet bénéfique de la carnitine dans le traitement de pathologies caractérisées par une augmentation du stress oxydatif, telles que l'insuffisance cardiaque (Singal *et al.*, 1998; Dhalla *et al.*, 2000). La L-carnitine et ses dérivés acylés ont été décrits comme antioxydants mais le mécanisme spécifique de cet effet n'est encore pas totalement éclairci (Arduini, 1992). Le stress oxydatif est un important stimulus apoptotique dans de nombreuses maladies cardio-vasculaires. Ce sont les espèces réactives de l'oxygène, inhibées par des antioxydants tels que la L-carnitine (Vescovo *et al.*, 2002), qui peuvent déclencher l'apoptose par activation de protéines pro-apoptotiques (Kumar & Jugdutt, 2003). L'élévation des espèces réactives à l'oxygène inhibe la pompe SERCA, augmente le relargage de Ca²⁺ du réticulum sarcoplasmique par les RyR, le courant entrant calcique de type L et l'activité des NCX pour augmenter le niveau de Ca²⁺ intracellulaire conduisant ainsi au développement de cardiomyopathies (Jeong *et al.*, 2012). Au cours d'un déficit primaire en carnitine, l'effet antioxydant de la L-carnitine diminue, pouvant ainsi conduire à une élévation des espèces réactives à l'oxygène dans la cellule, pouvant être responsable du développement de cardiomyopathie. Dans le cas de la famille étudiée ici, la perte de fonction du canal Ca_v1.2 p.N300D, conduirait à une diminution du calcium intracellulaire, protégeant ainsi les patients du développement de cardiomyopathie.

La caractérisation fonctionnelle du variant Ca_v1.2 p.A223P nous a donné des résultats différents selon le modèle cellulaire et l'ADNc utilisé. De nombreuses études sur l'effet de mutations ou de partenaires régulateurs montrent des résultats différents suivant les modèles utilisés. On peut citer par exemple, l'effet de la sorcine sur le courant calcique $I_{Ca,L}$ qui varie selon l'espèce étudiée. Les études effectuées sur des cardiomyocytes de souris et sur oocytes de xénope ont montré une accélération des cinétiques d'inactivation du courant $I_{Ca,L}$ sans modification de l'amplitude du courant maximum (Meyers *et al.*, 1998; Meyers *et al.*, 2003). En revanche, sur un modèle de cellules HEK-293 et sur cardiomyocytes de lapins adultes, la sorcine provoque une augmentation de l'amplitude du courant $I_{Ca,L}$ et un ralentissement des cinétiques d'inactivation (Fowler *et al.*, 2008; Fowler *et al.*, 2009). Notre étude réalisée sur cellules HEK tSA-201 transfectées à l'aide des ADNc codants pour les protéines Ca_v1.2 de rat a mis en évidence une diminution de la densité de courant calcique d'environ 50% sans changement des autres paramètres biophysiques du canal. Le mécanisme menant à la perte de fonction du canal Ca_v1.2 n'a, quant à lui, pas pu être établi. L'absence de modification de l'expression globale et à la surface cellulaire de Ca_v1.2 nous conduit à penser que la mutation pA253P Ca_v1.2 pourrait provoquer une modification des paramètres unitaires du canal Ca_v1.2. Cette hypothèse pourrait être testée par des expériences complémentaires de patch-clamp en configuration « *inside-out* ». Cependant, les difficultés rencontrées avec ce modèle cellulaire et cet ADNc nous a amené

à recommencer la caractérisation fonctionnelle du variant Ca_v1.2 p.A223P sur les cellules COS-7 transfectées avec l'ADNc codant pour les protéines humaines. Dans cette deuxième partie de l'étude, nous mettons en évidence un décalage de la courbe d'activation du canal calcique Ca_v1.2 p.A223P vers des potentiels plus positifs. La densité de courant n'est pas modifiée. Il nous reste maintenant à étudier les paramètres d'inactivation et de réactivation du canal afin d'obtenir une caractérisation biophysique complète du canal muté. Etant donné la contradiction des résultats obtenus sur les deux types de lignées cellulaires, il sera intéressant de réaliser l'étude sur des cardiomyocytes surexprimant le canal sauvage ou muté. Ceci nous permettrait de nous rapprocher un peu plus des conditions natives et d'établir une meilleure corrélation génotype/phénotype.

Même si le génotype hétérozygote composite pour le transporteur OCTN2 corrèle avec le phénotype de QT court dans la famille étudiée ici, la perte de fonction associée à la mutation Ca_v1.2 p.A223P apparaît également comme une bonne explication moléculaire et électrophysiologique. Des études portant sur l'effet de la carnitine sur le canal calcique Ca_v1.2 ainsi que sur les flux calciques intracellulaires ont déjà été réalisées. Liu et Rosenberg ont montré que la L-palmitoyl-carnitine augmentait la probabilité d'ouverture du canal Ca_v1.2 d'un facteur 8 dans les minutes qui suivent une application intra- ou extracellulaire (Liu & Rosenberg, 1996). Cette étude réalisée en bicouches lipidiques issues de sarcolemmes ventriculaires de porc montre également qu'après quelques minutes d'application de la L-palmitoyl-carnitine, la probabilité d'ouverture de Ca_v1.2 diminue. Dans une étude réalisée en bicouches lipidiques de réticulum sarcoplasmique jonctionnel issu de muscles squelettiques de lapin et de cochon, El Hayek montre que l'application de palmitoyl-carnitine est responsable d'une stimulation directe des récepteurs à la ryanodine provoquant une libération massive de Ca²⁺ dans la cellule (el-Hayek *et al.*, 1993). D'autres études montrent également un effet de l'acylcarnitine à longue chaîne sur l'homéostasie calcique dans des cardiomyocytes ventriculaires de chien et de cobaye (Adams *et al.*, 1979; Meszaros & Pappano, 1990). En nous appuyant sur ces différents résultats, nous allons donc nous intéresser à l'effet de la carnitine sur le courant $I_{Ca,L}$. En effet, le canal muté pourrait avoir une sensibilité différente à la carnitine qui pourrait limiter les effets d'une diminution d'entrée de calcium chez la grand-mère du propositus et/ou participer au raccourcissement de l'intervalle QT chez les patients atteints.

IV. DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

Les maladies cardiovasculaires sont actuellement la première cause de mortalité dans les pays développés. Parmi celles ci, les arythmies cardiaques sont responsables d'un million de cas de syncope et de mort subite cardiaque chaque année dans le monde (Lloyd-Jones *et al.*, 2010). La mort subite cardiaque représente plus de 50% des décès liés à une pathologie coronarienne et 15 à 20% des décès dans leur globalité (Myerburg *et al.*, 2004). La meilleure prévention de la mort subite cardiaque est un enjeu de santé publique majeur. Durant les dernières décennies, son incidence a fortement diminué. Un faible pourcentage de ces morts subites est d'origine génétique. Les nombreux travaux réalisés sur la mort subite cardiaque d'origine génétique ont permis de fortement progresser dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués. Ce sont les avancées technologiques en génomique, protéomique et épigénétique, notamment, qui ont permis d'accélérer l'identification de nouveaux mécanismes. Ces avancées en physiopathologie des troubles du rythme et de la conduction cardiaques incluent par exemple : (i) la découverte de nouveaux marqueurs génétiques non suspectés tels que l'ankyrine 2, premier gène ne codant pas pour une protéine canalaire identifiée comme responsable de l'allongement de l'intervalle QT (Schott *et al.*, 1995), (ii) la mise en évidence de la régulation des canaux ioniques cardiaques par les microARN (miARN) pouvant conduire aux troubles du rythme ou de la conduction (Luo *et al.*, 2010; Wang, 2010b), (iii) la généralisation des études d'association pan-génomiques (GWAS pour Genome Wide Association Studies) qui mettent en œuvre une stratégie permettant l'identification de nouveaux gènes et plus particulièrement de SNP (*single nucleotide polymorphism*) comme par exemple l'étude récente sur le syndrome de repolarisation précoce (Sinner *et al.*, 2012), (iv) le développement d'un nouveau modèle cellulaire, les cellules iPS ou cellules souches pluripotentes induites (induced Pluripotent Stem Cells) qui sont obtenues par reprogrammation génétique de cellules somatiques adultes. Tout comme les cellules souches embryonnaires, elles sont capables de s'autorenouveler et de se différencier en tous types cellulaires d'un organisme. La différenciation de ces cellules en cardiomyocytes a permis récemment de modéliser le phénotype de patients atteints d'un SQT2 et d'identifier des agents thérapeutiques potentiels (Itzhaki *et al.*, 2011). Ces cellules représentent un modèle prometteur pour étudier les mécanismes physiopathologiques et optimiser la prise en charge personnalisée des patients.

Mon travail de thèse se situe dans cette période charnière où l'explication monogénique de certains syndromes, l'approche gène-candidat, les modèles cellulaires de réexpression et les outils actuels montrent leurs limites et suggèrent le développement de nouvelles hypothèses afin d'améliorer la compréhension des troubles du rythme et de la conduction cardiaques à risque de mort subite. L'objectif de ma thèse a été à la fois de comprendre le

mode de fonctionnement et de régulation des canaux ioniques mais aussi de mettre en évidence de nouveaux mécanismes dans la physiopathologie des troubles du rythme et de la conduction cardiaques.

Différents travaux ont associées la mutation p.R222Q du canal sodique $\text{Na}_v1.5$ au développement de cardiomyopathie dilatée. Dans le premier travail présenté dans cette thèse, nous avons identifié une nouvelle canalopathie sodique. Cette nouvelle arythmie nommée arythmies multifocales du tissu de Purkinje est à transmission autosomique dominante. Nous mettons en évidence que la mutation gain de fonction $\text{Na}_v1.5$ p.R222Q est responsable de ce syndrome et le traitement par l'hydroquinidine réduit drastiquement le nombre de contractions ventriculaires prématurées. Les différentes études réalisées sur des familles porteuses de la mutation $\text{Na}_v1.5$ p.R222Q montrent également ce phénotype arythmique particulier associant des contractions ventriculaires prématurées d'origine ectopiques, des troubles arythmiques auriculaires et le développement de cardiomyopathie dilatée (Hershberger *et al.*, 2008; Morales *et al.*, 2010; McNair *et al.*, 2011). Les résultats obtenus au cours de notre étude suggèrent que le développement d'une cardiomyopathie dilatée chez certains des patients n'est que secondaire aux troubles du rythme. En perspective de ce travail, il serait intéressant de valider l'effet de la mutation R222Q sur le canal $\text{Na}_v1.5$ dans un modèle cellulaire où la majorité des partenaires régulateurs du canal est présente. Les cardiomyocytes dérivés de cellules iPS resteraient le modèle idéal.

Les concepts de la génétique ayant évolué ces dernières années, dans les arythmies cardiaques, le modèle monogénique est remis en cause par un modèle plus complexe de type oligogénique où plusieurs mutations géniques sont nécessaires au développement d'une pathologie. Le deuxième travail présenté dans cette thèse a permis d'identifier 2 variants : le variant p.N300D du gène *CACNA1C* et le variant p.Q1695X du gène *SCN5A* dans une famille présentant un phénotype mixte de syndrome de Brugada, troubles de la conduction et raccourcissement de l'intervalle QT. Dans cette étude nous avons mis en évidence une corrélation entre les troubles de la conduction et la présence du variant $\text{Na}_v1.5$ p.Q1695X chez les patients, et entre le syndrome de Brugada associé ou non à un intervalle QT raccourci et la présence de la mutation $\text{Ca}_v1.2$ p.N300D. Dans la première description du SBr, les frères Brugada ont décrit un phénotype associant un sus-décalage du segment ST à l'ECG et des troubles de la conduction (Brugada & Brugada, 1992). Un peu plus tard, notre laboratoire a montré que des mutations du gène *SCN5A* provoquaient une perte de fonction du canal $\text{Na}_v1.5$ pouvant être à l'origine de troubles de la conduction isolés (Schott *et al.*, 1999). En accord avec ces différents travaux, notre étude suggère que des mutations du gène *SCN5A* pourraient expliquer les troubles de la conduction mais seraient insuffisantes à elles seules pour provoquer un SBr. Nous montrons également dans cette étude que l'effet

fonctionnel des deux mutations n'est pas indépendant. En effet, un raccourcissement plus modéré de l'intervalle QT accompagné d'une normalisation de la morphologie de l'onde T est observé lorsque les patients sont porteurs des deux mutations. L'utilisation du modèle ventriculaire gauche de Iyer et coll. nous a suggéré les mécanismes électriques conduisant à ce phénotype. Il faut cependant rester prudent avec les conclusions que l'on peut en tirer. Ce modèle est un outil mathématique nous aidant à appréhender l'effet d'une mutation sur le décours du PA par exemple, mais il présente des limites. En effet, lors de ces simulations nous nous affranchissons : (i) des régulations parasymphatiques et sympathiques puisque la fréquence de stimulation est imposée, (ii) des mécanismes de régulation des canaux ioniques, une protéine partenaire peut voir son affinité pour le canal muté modifiée, (iii) d'un éventuel remodelage de l'expression des canaux ioniques du à la présence d'une mutation de l'un d'eux. Pour confirmer les résultats obtenus à l'aide du modèle, il serait intéressant de réaliser des expériences de dissection pharmacologique séquentielle de PA-clamp sur des cellules iPS de patients.

Le syndrome du QT court est considéré comme une pathologie monogénique où le phénotype observé peut être associé à la mutation d'un seul gène (Bellocq *et al.*, 2004; Brugada *et al.*, 2004; Priori *et al.*, 2005; Antzelevitch *et al.*, 2007; Templin *et al.*, 2011). Cependant, des cas restent encore inexpliqués à ce jour. Cette pathologie pourrait répondre à un modèle plus complexe de type oligogénique où le phénotype pathologique serait associé à une combinaison de variants sur un ou plusieurs gènes. Dans l'étude réalisée sur une famille atteinte du SQTC associé à un déficit primaire en carnitine, un modèle oligogénique pourrait expliquer le phénotype des patients. Dans ce travail, nous avons mis en évidence des mutations sur les gènes *CACNA1C* et *SLC22A5*. La pénétrance complète des mutations du transporteur de la carnitine *OCTN2* et l'effet bénéfique de la supplémentation orale en carnitine sur la durée de l'intervalle QT suggèrent une implication du gène *SLC22A5* dans cette pathologie. Cependant, l'étude fonctionnelle du mutant $\text{Ca}_v1.2$ p.A223P a permis de mettre en évidence une perte de fonction du canal $\text{Ca}_v1.2$. Des mutations perte de fonction du gène *CACNA1C* ayant déjà été mises en évidence dans ce syndrome, il apparaît que la mutation $\text{Ca}_v1.2$ p.A223P puisse être une bonne explication moléculaire et électrophysiologique au phénotype présent dans cette famille. Il est donc envisageable que ce soit l'association des mutations des gènes *CACNA1C* et *SLC22A5* qui conduise au développement du syndrome du QT court dans cette famille répondant ainsi à un modèle de type oligogénique. Notre collaboration avec l'unité INSERM U1069, *Nutrition Croissance et Cancer* de Tours, permettra d'étudier l'effet de la carnitine sur les différents courants ioniques composant le PA ventriculaire et ainsi de mieux comprendre le mécanisme physiopathologique mis en jeu chez ces patients. De plus, cette famille a la particularité de

ne pas développer de cardiomyopathie généralement associé au déficit primaire en carnitine causé par les mutations du transporteur OCTN2 (Amat di San Filippo *et al.*, 2008). La perte de fonction du canal $Ca_v1.2$ liée à la mutation p.A223P pourrait expliquer cette particularité par réduction de la surcharge calcique. Nos collaborateurs à Tours disposent de fibroblastes du propositus et de donneurs sains. A partir de ces échantillons, il serait intéressant de réaliser des expériences de mesure de calcium intracellulaire afin de mettre en évidence un éventuel lien entre la mutation p.A223P, la carnitine et l'absence de cardiomyopathie observée dans cette famille.

D'un point de vue fondamental, mon travail de thèse a permis d'améliorer la compréhension du mode de fonctionnement et de régulation des canaux ioniques. Les résultats de ces recherches permettent également de mieux comprendre les mécanismes arythmogènes pouvant conduire à la mort subite cardiaque du patient. A plus long terme, ils vont permettre une amélioration de la prise en charge des patients par une meilleure détection du risque rythmique et une adaptation des traitements en fonction du génotype.

V. ANNEXES

I – Evolution des concepts et des technologies en génétique

I.1 - Modèles génétiques : du modèle monogénique au modèle polygénique

Les mécanismes physiopathologiques des troubles du rythme, bien que complexes, voient leurs compréhensions s'améliorer grâce au développement de nouveaux outils cliniques et moléculaires. Pour certains troubles du rythme, une origine génétique est clairement établie. Les formes pathologiques où l'origine génétique a été établie peuvent être divisées en plusieurs types :

- Les pathologies monogéniques, où un gène majeur est à l'origine du mécanisme pathologique. C'est le cas du syndrome du QT court où le phénotype observé peut être associé à la mutation d'un seul gène (Bellocq *et al.*, 2004; Brugada *et al.*, 2004; Priori *et al.*, 2005; Antzelevitch *et al.*, 2007).
- Les pathologies oligogéniques, où l'association d'un nombre réduit de variants (compris entre 2 et quelques dizaines) est nécessaire pour développer une pathologie. Dans ce modèle, chaque variant pris séparément ne peut provoquer un phénotype pathologique. La maladie de Hirschsprung est un exemple de maladie oligogénique. C'est une anomalie du fonctionnement de la partie terminale de l'intestin se traduisant par une constipation ou une occlusion intestinale. Cette anomalie est le résultat de l'absence de développement congénital des cellules neuroganglionnaires assurant la transmission des informations nécessaires à la régulation intestinale. Une étude a montré que la présence de trois variants de facteurs de susceptibilité situés dans 3 zones différentes du génome était nécessaire et suffisants pour développer cette maladie (Gabriel *et al.*, 2002).
- Les pathologies polygéniques, où la présence combinée de dizaines voire de centaines de variants est nécessaire à l'apparition du phénotype. Une étude menée par le consortium international sur la schizophrénie a permis de révéler une composante polygénique de la susceptibilité à cette maladie psychiatrique (Purcell *et al.*, 2009).

On pensait auparavant que les maladies rares pouvaient être expliquées par l'identification de variants rares à effet fort et que les pathologies fréquentes comme l'hypertension artérielle, étaient associées à des variants retrouvés fréquemment dans la population générale (Doris, 2002). Cependant, il est difficile de classer les maladies génétiques en fonction de leur modèle génétique. On parle aujourd'hui plutôt d'un continuum entre les formes monogéniques, oligogéniques et polygéniques. En effet, au sein de la majorité des maladies monogéniques on constate des défauts de pénétrance et d'expressivité que l'on peut attribuer à la présence de variants à effet mineur (Kaab &

Schulze-Bahr, 2005). De même, un modèle polygénique d'une maladie fréquente, ne permet pas toujours d'expliquer tous les cas rencontrés.

Outre la cause génétique, l'environnement joue un rôle dans l'expression de la plupart de ces pathologies. L'étude des jumeaux peut être l'approche la plus pertinente pour déterminer l'impact du fond génétique et de l'environnement sur une maladie (Vanscoy *et al.*, 2007).

I.2 – Méthodes d'étude génétique

L'identification des gènes morbides est basée, à ce jour, sur deux approches principales : par l'approche d'analyse de liaison au niveau du génome entier (ou clonage positionnel) et par l'approche « gène candidat ».

- L'approche « génome entier » : elle permet d'identifier la région chromosomique, locus, à l'intérieur de laquelle se situe le gène responsable d'une maladie génétique monogénique. Le grand intérêt de cette technique est qu'elle fait abstraction de toute hypothèse physiopathologique initiale. L'analyse de liaison familiale a permis d'élucider les bases moléculaires à l'origine de certaines maladies monogéniques rares. Le gène Ank-2 est un exemple d'identification de gène morbide dans le syndrome du QT long de type 4 par cette méthode (Schott *et al.*, 1995; Mohler *et al.*, 2003). Cependant un nombre considérable de loci identifiés n'ont pas abouti à l'identification du gène en cause. Ceci peut s'expliquer par le fait (i) que la liaison peut être due au hasard (faux positif), (ii) que le nombre de gènes à explorer dans ces régions est trop important, (iii) que tous les gènes du locus ne sont pas encore identifiés ou (iv) que les régions non codantes et les petits réarrangements génomiques (délétions, duplications, inversions), non détectables par cette approche, pourraient avoir un rôle majeur dans le développement des pathologies. En effet, ce dernier argument s'illustre par le fait que l'approche génome entier est basée sur le suivi de la transmission de certains marqueurs génétiques, les microsatellites, entre les différentes générations. Certes, cette approche permet de mettre en évidence un ou plusieurs loci contenant des marqueurs retrouvés systématiquement chez les individus atteints et absents chez les individus sains. Cependant, n'étant pas quantitative, elle ne permet pas de détecter les réarrangements génomiques, telle que la duplication d'un gène, du fait de la transmission de marqueurs microsatellites identiques de ce gène.

La limite majeure de cette méthode, est qu'elle nécessite de disposer de familles suffisamment informatives et que la pathologie soit liée à un ou des gènes à effet majeur.

- L'approche « gène candidat » : selon le phénotype observé et les données de la littérature, on peut émettre des hypothèses sur la physiopathologie de la maladie et les voies

impliquées, et rechercher des variants dans des gènes « candidats » dont l'expression et la fonction présumée sont compatibles avec son implication. Par cette approche, un gène candidat est supposé être responsable d'une maladie, et l'hypothèse est ensuite testée pour confirmer le lien phénotype-génotype. Le gène *SCN5A* est un exemple d'identification de gène morbide par cette méthode, dans le syndrome de Brugada (Chen *et al.*, 1998). Cette approche est aussi utilisée pour les gènes connus comme codant pour des partenaires de protéines déjà impliquées dans des pathologies, ayant un rôle majeur dans une fonction particulière.

Pour les maladies communes, l'étude d'association, une alternative à l'analyse de liaison familiale et à l'approche « gène candidat » a été développée pour identifier des facteurs génétiques de susceptibilité. Le principe consiste à comparer la fréquence d'un marqueur génétique (« single nucleotide polymorphism » ou SNPs) chez les sujets atteints par une même pathologie mais non apparentés et chez les témoins.

II – Enseignements

En parallèle de mon travail de thèse au sein de l'institut du thorax, j'ai eu l'opportunité de réaliser des enseignements de travaux pratiques (TP) à la faculté des Sciences et des Techniques de Nantes en qualité de moniteur pendant trois ans. Ces enseignements étaient adressés à des étudiants en deuxième et troisième années de licence. Ma fonction de monitrice m'a permis de développer plusieurs compétences notamment apprendre à gérer seule un groupe d'étudiants ce qui implique, entre autres, prendre de l'aisance à l'oral, savoir gérer son temps face aux différents trîômes d'étudiants et faire des efforts de pédagogie afin de mieux transmettre son savoir.

II.1 – Initiation à la pharmacologie, 2ème année de licence

Ces TP sont en complément de cours magistraux de pharmacologie et permettent d'illustrer et d'assimiler la notion de transmission synaptique (synapses neuro-neuronique et neuro-musculaire) ainsi que les concepts de pharmacodynamie et pharmacocinétique. Un TP est consacré à évaluer les effets de substances pharmacologiques sur le système nerveux central grâce à une étude des activités exploratrices et motrices chez la souris. Ces TP sont répartis en quatre séances de trois heures. Lors de cet enseignement, j'ai co-encadré, avec un second enseignant, trois groupes (effectif moyen : 35 étudiants par séance) soit un total de 36 heures.

II.1.1 - Transmission synaptique

II.1.1.1 - Activité électrique des neurones et synapses neuro-neuroniques (logiciel SYNAPSE)

Le modèle expérimental est constitué de plusieurs neurones pré-synaptiques, dont un appartient à une cellule sensorielle, qui font synapse au niveau d'une dendrite ou du corps cellulaire d'un neurone post-synaptique. Ce logiciel permet aux étudiants d'évaluer les activités électriques des neurones et la transmission synaptique : activité électrique de surface, potentiels de repos, potentiels d'action, potentiels post-synaptiques excitateurs ou inhibiteurs, potentiels récepteurs. Il permet également d'aborder le rôle des neurotransmetteurs dans la transmission de l'information de neurone à neurone.

II.1.1.2 - Pharmacologie de la transmission neuro-musculaire du muscle squelettique (logiciel PHARMATUTOR)

Ce logiciel modélise une expérience réalisée sur une préparation de diaphragme (muscle squelettique) de souris couplé à son nerf moteur (le nerf phrénique), tous deux reliés à un générateur d'impulsions. Le muscle et le nerf sont stimulés alternativement et les

contractions musculaires sont recueillies par l'intermédiaire d'un capteur de tension connecté à un enregistreur. À partir de ce logiciel, les étudiants doivent décrire et interpréter les effets des stimulations directe et indirecte sur la contraction du muscle squelettique réalisées seules ou en présence de différentes substances pharmacologiques : D-tubocurarine (curarisant non dépolarisant), suxaméthonium (curarisant dépolarisant), néostigmine (inhibiteur des acétylcholinestérases). Les étudiants doivent ensuite conclure sur les mécanismes d'inhibition de la transmission neuromusculaire du muscle strié squelettique.

II.1.1.3 - Activité électrique de surface de la préparation « nerf sciatique – muscle gastrocnémien » isolée de grenouille

L'objectif de ce TP est (i) de caractériser et comparer les activités électriques globales du nerf sciatique et du muscle gastrocnémien, (ii) de comprendre le fonctionnement de la synapse neuromusculaire, et (iii) de déterminer le délai synaptique. Dans un premier temps, les étudiants isolent le nerf sciatique et le muscle semi-tendineux d'une grenouille décérébrée et déméduillée, puis placent leur préparation dans une cuve porte-électrodes où le muscle est maintenu dans des conditions isométriques. Deux électrodes de stimulation, reliées à un stimulateur, sont alors placées sur le nerf, suivies de quatre électrodes d'enregistrement (deux à la surface du nerf et deux à la surface du muscle) reliées à un oscilloscope à deux voies. En faisant progressivement varier l'intensité de stimulation sur le nerf, les étudiants abordent les notions d'intensité seuil de stimulation et de recrutement de fibres musculaires. Ensuite, ils doivent déterminer le délai synaptique neuromusculaire. Enfin, ils doivent mettre en évidence le type de récepteurs post-synaptiques impliqués en stimulant leur préparation nerf-muscle préalablement incubée dans de la D-tubocurarine.

II.1.2 - Pharmacodynamie et pharmacocinétique

II.1.2.1 - Pharmacodynamie : réalisation de courbes concentration-réponse (logiciel PHARMATUTOR)

Le logiciel modélise une expérience d'enregistrement de la contraction d'un fragment de muscle intestinal isolé. Celui-ci est placé dans une cuve à organe isolé remplie de liquide physiologique oxygéné. Un agoniste est ajouté dans la cuve à une concentration donnée et l'amplitude de la contraction est alors mesurée. À partir de ce logiciel, les étudiants doivent mimer l'ajout d'un agoniste à différentes concentrations et noter les amplitudes de contraction correspondantes pour ensuite établir, sur papier millimétré semi-logarithmique la courbe concentration-réponse des effets de l'agoniste. Les mêmes manipulations sont ensuite réalisées après ajout au préalable d'un antagoniste X ou Y. Les étudiants doivent

alors comparer les courbes ainsi obtenues avec la courbe précédente et conclure sur la nature des antagonistes X et Y.

II.1.2.2 - Simulation de pharmacocinétique (logiciel PHARMATUTOR)

Le logiciel présente un modèle animé de la disponibilité et de l'élimination d'une substance pharmacologique donnée dans un organisme. La substance pharmacologique peut être administrée de différentes manières : par injection intraveineuse (IV), par perfusion IV, par dose orale unique ou par injection IV avec un modèle à deux compartiments. Pour chacun des modes d'injection, les étudiants obtiennent la courbe de la concentration plasmatique de la substance pharmacologique en fonction du temps et doivent alors déterminer plusieurs paramètres de pharmacocinétique (volume de distribution, clairance, demi-vie de la substance pharmacologique). Les mêmes manipulations sont ensuite réalisées après avoir choisi l'option « insuffisance rénale ». Les étudiants doivent alors conclure sur l'importance de contrôler le taux plasmatique des substances pharmacologiques administrées chez un patient sain et un patient atteint d'une insuffisance rénale.

II.1.3 - Tests comportementaux chez la souris

Le but de ce TP est d'évaluer l'effet sur le système nerveux central chez la souris de deux molécules psychotropes, au moyen de différents tests comportementaux. Les étudiants ont quatre souris à leur disposition, chacune ayant reçu une injection intrapéritonéale de diazépam, de caféine, d'excipient, ou d'une solution X (correspondant à l'une des trois solutions précédentes, à déterminer par les étudiants). Chacune de ces quatre souris est soumise à trois tests comportementaux :

- le test de la barre fixe : les étudiants accrochent délicatement la souris par les membres antérieurs à un fil de fer tendu puis notent le temps qu'elle met à se rétablir sur le fil ;
- le test de curiosité : les étudiants placent la souris au centre d'une planche comportant 16 trous et notent son comportement pendant 5 minutes (cheminement parcouru, explorations, toilette, repos) ;
- le test de la nage forcée : les étudiants placent la souris dans un cylindre contenant 15 cm d'eau à température ambiante et notent, pendant 4 minutes, les temps de mobilité et d'immobilité de la souris.

À partir des résultats obtenus, les étudiants doivent rédiger un compte-rendu complet où les résultats sont analysés, interprétés et discutés à l'aide de leur cours et de la

littérature. Ils doivent alors être capables de déterminer la nature de la solution X puis doivent schématiser les modes d'action des différentes substances au niveau du système nerveux central.

II.2 – Physiologie animale intégrée – 3^{ème} année de licence

Ces TP représentent une unité d'enseignement à part entière et ont pour objectif l'acquisition de compétences pratiques et méthodologiques, d'une part, pour l'expérimentation en physiologie animale et, d'autre part, pour l'analyse des régulations des grandes fonctions physiologiques chez l'Homme et l'animal. Lors de ces TP, les étudiants sont également initiés aux bonnes pratiques de laboratoire en remplissant un cahier de laboratoire. Ils doivent pour chaque séance remettre un compte-rendu complet présenté sous la forme d'une publication scientifique.

Ces TP sont répartis en cinq séances de trois heures et cinq autres séances de quatre heures, soit un équivalent de 35 heures par groupe. Au cours de mes trois années de monitorat, j'ai encadré au total 3 groupes (effectif moyen : 15 étudiants par séance) soit un cumul de 105 heures.

II.2.1 - Étude de la consommation de dioxygène chez l'homme et chez la souris

Le but de ce TP est d'évaluer la consommation de dioxygène chez l'homme au repos et au cours d'un travail mécanique (flexions), suivi d'une période de récupération, et d'estimer la valeur du métabolisme énergétique de repos. Pour cela, les étudiants doivent respirer dans un embout buccal relié à une sonde à oxygène et un volumètre. Les valeurs obtenues sont comparées avec celles d'autres étudiants pour tenter d'établir une relation entre leurs caractéristiques personnelles (poids, sexe, taille, conditions physiques) et la valeur du métabolisme de repos correspondante. La mesure de la consommation de dioxygène est ensuite évaluée chez la souris à l'aide d'un respiromètre volumétrique à pression constante. Ce système permet de déterminer à la fois les volumes d'oxygène consommé et de dioxyde de carbone rejeté, et permet donc de calculer le quotient respiratoire de la souris. Les étudiants concluent ensuite sur une comparaison des résultats obtenus chez l'homme et chez la souris.

II.2.2 - Étude de la contraction du muscle squelettique de grenouille

L'objectif de ce TP est de comprendre le rôle des activités électriques nerveuse et musculaire dans la contraction du muscle squelettique ainsi que de mettre en évidence les

mécanismes siégeant au niveau des synapses neuromusculaires. Dans un premier temps les étudiants dissèquent le nerf sciatique et le muscle gastrocnémien d'une grenouille décérébrée et démyélinisée. L'extrémité sectionnée du muscle est ensuite reliée par son tendon au stylet d'un transducteur, lui-même relié à un système d'enregistrement. Enfin, des électrodes de stimulation sont apposées sur le nerf sciatique. À partir de ce montage, les étudiants doivent mettre en évidence (i) le phénomène de recrutement des fibres musculaires, et (ii) les phénomènes de sommation des contractions (fusion de deux contractions, phénomènes de téтанos imparfait et parfait). Le rôle du neurotransmetteur est mis en évidence par son épuisement après stimulation répétée du nerf jusqu'à l'arrêt des contractions du muscle, et la nature du neurotransmetteur est déterminée suite à l'injection de D-tubocurarine dans les sacs lymphatiques dorsaux de la grenouille. Enfin les étudiants stimulent directement le muscle de façon répétée jusqu'à l'arrêt des contractions et réalisent immédiatement une mesure du pH de ce muscle pour mettre en évidence le phénomène d'acidification du muscle au cours de la fatigue musculaire. Les étudiants doivent ensuite conclure quant au fonctionnement de la jonction neuromusculaire.

II.2.3 - Électromyographie – Réflexe myotatique chez l'homme

Les objectifs de ce TP sont de caractériser l'activité électrique globale (i) d'un muscle lors de contractions volontaires, (ii) de deux muscles antagonistes au cours de contractions volontaires alternées et (iii) d'un muscle lorsqu'il est le siège d'un réflexe myotatique. Pour cela les étudiants disposent d'électrodes adhésives qu'ils placent sur les muscles jambier antérieur et jumeau externe, et qui sont reliées à une station d'analyse puis à un ordinateur. Les étudiants doivent effectuer des contractions musculaires de différentes intensités, enregistrer les activités électriques correspondantes puis analyser et interpréter leurs résultats. L'activité électrique du muscle jumeau externe est également enregistrée suite à la percussion du tendon d'Achille à l'aide d'un marteau à réflexes pour mettre en évidence le réflexe myotatique. La même expérimentation est réalisée en effectuant la manœuvre de Jendrassik qui a pour but de stimuler le cortex cérébral et ainsi mettre en évidence la facilitation des motoneurones α par les motoneurones γ . Les étudiants doivent conclure sur le TP en réalisant un schéma complet des mécanismes étudiés.

II.2.4 - Enregistrement des mouvements spontanés de l'intestin de rat

L'objectif de ce TP est d'évaluer le rôle du système nerveux autonome sur les contractions intestinales. Pour cela, les étudiants prélèvent, chez un rat préalablement euthanasié, un segment de duodénum et le place dans une cuve à organe isolé. Après avoir enregistré les mouvements pendulaires normaux, les étudiants injectent dans la cuve des doses

croissantes cumulées d'acétylcholine, en présence ou non d'atropine, puis d'isoprénaline, en présence ou non de nadolol. À partir des tracés obtenus les étudiants doivent construire les courbes concentration-réponse correspondantes et conclure quant aux modes d'action cellulaire des substances utilisées puis réaliser un schéma général de la régulation de la motricité intestinale.

II.2.5 - Électrocardiographie chez l'homme

L'objectif de ce TP est d'illustrer plusieurs notions d'électrocardiographie abordées en cours que sont : connaître les différentes dérivations bipolaires et unipolaires du plan frontal, savoir définir la théorie d'Einthoven et son triangle, savoir calculer l'axe électrique du cœur à partir d'un électrocardiogramme. La relation entre activité électrique et activité mécanique du cœur est abordée grâce à l'enregistrement simultané de l'électrocardiogramme et du débit cardiaque (obtenu indirectement par un capteur de bout de doigt).

II.2.6 - Clairance de l'inuline chez le rat

L'objectif de ce TP est de déterminer le taux de filtration glomérulaire d'un rat anesthésié à partir de la clairance de l'inuline. Lors de ce TP, les étudiants doivent poser différents cathéters : sur la veine jugulaire de rat pour y perfuser un mélange de mannitol + inuline, un au niveau de l'artère carotide pour un prélèvement sanguin, et un au niveau de la vessie pour récolter les urines et déterminer la diurèse du rat. Les concentrations plasmatique et urinaire en inuline sont ensuite dosées par colorimétrie à partir d'une gamme étalon d'inuline préalablement préparée. Les étudiants doivent ainsi calculer la clairance de l'inuline du rat et déterminer le taux de filtration glomérulaire du rat, puis conclure sur la fonction rénale.

II.2.7 - Régulation de la sécrétion pancréatique chez le rat

L'objectif de ce TP est de mettre en évidence la double régulation, nerveuse et hormonale, de la sécrétion du suc pancréatique chez le rat. Pour ce faire, les étudiants placent un cathéter au niveau du canal cholédoque d'un rat anesthésié, à proximité de son embouchure avec l'intestin, et clampent l'arrivée de la bile pour ne recueillir que le suc pancréatique. Les étudiants déterminent la sécrétion de suc pancréatique dans des conditions basales et suite à des injections d'acétylcholine ou de sécrétine via un cathéter préalablement introduit dans la veine jugulaire de l'animal. Les étudiants doivent discuter et conclure quant au mode de régulation de la sécrétion pancréatique chez le rat.

II.2.8 - Régulation de la pression artérielle chez le lapin

L'objectif de ce TP est d'évaluer le rôle du système nerveux autonome sur la régulation de la pression artérielle. Lors de ce TP, les étudiants doivent mesurer les variations de pression artérielle chez un lapin préalablement anesthésié grâce à un capteur de pression introduit dans l'artère carotide du lapin.

Après avoir isolés et disséqués les nerfs vague, de Cyon et sympathique, les étudiants stimulent ces nerfs un à un, tout d'abord lorsque les nerfs sont entiers pour déterminer le rôle hypo ou hypertenseur du nerf, puis après section des nerfs pour déterminer si le nerf est moteur, sensitif ou mixte. Également, la notion d'intégration nerveuse est abordée en clamping la seconde artère carotide créant ainsi une hypertension au niveau cardiaque mais une hypotension au niveau cérébral. Les étudiants doivent alors conclure sur les rôles respectifs des différents nerfs et faire un schéma général sur la régulation de la pression artérielle.

II.2.9 - Cœur isolé perfusé de rat par la technique de Langendorff

L'objectif de ce TP est d'étudier la contractilité cardiaque intrinsèque par la technique de cœur isolé perfusé à pression constante chez le rat. Dans un premier temps, les étudiants sont familiarisés avec le montage expérimental puis préparent les différentes solutions de perfusion nécessaires à l'expérimentation. Le cœur de rat est ensuite prélevé et installé sur le montage de Langendorff par l'enseignant. Après avoir enregistré les paramètres inotrope, lusitrope et chronotrope de base, les étudiants doivent évaluer le rôle des ions potassium et calcium dans la contractilité cardiaque en perfusant le cœur par des solutions hypocalciques puis hyperpotassiques. Après retour aux paramètres de base, les étudiants perfusent le cœur par des solutions croissantes d'isoprénaline puis d'acétylcholine. Ils doivent alors construire des courbes concentration-réponse à l'isoprénaline et à l'acétylcholine pour chaque paramètre étudié. Enfin, les étudiants concluent sur le rôle des ions dans la contractilité cardiaque et sur le rôle du système nerveux autonome dans la régulation de la contractilité cardiaque.

II.2.10 - Étude des potentiels d'action cardiaques chez la grenouille enregistrés à l'aide de microélectrodes intracellulaires

L'objectif de ce TP est d'enregistrer des potentiels d'action cardiaques (auriculaires et ventriculaires) à l'aide de la technique des microélectrodes de verre et d'étudier l'influence de différentes substances pharmacologiques (neurotransmetteurs et inhibiteurs des canaux calciques) sur le déroulement et la fréquence des potentiels d'action. Dans un premier temps, les étudiants sont familiarisés avec le montage expérimental puis apprennent à fabriquer des

microélectrodes, au moyen d'une étireuse verticale, et à tester la résistance de ces électrodes. Les étudiants disposent ensuite d'une grenouille décérébrée et démyélinisée qu'ils dissèquent afin de bien dégager le cœur. Ils enregistrent alors les potentiels d'action cardiaques dans les conditions contrôles ou en présence de différentes substances pharmacologiques : acétylcholine, adrénaline, nifédipine. Pour chaque condition, les étudiants doivent déterminer le potentiel membranaire de repos, l'amplitude totale du potentiel d'action, la durée du potentiel d'action à 30 %, 50 % et 90 % de repolarisation ainsi que la fréquence des potentiels d'action. Les étudiants doivent ainsi conclure sur les effets des différentes substances pharmacologiques testées sur les potentiels d'action cardiaques.

III – Communication scientifique

Au cours de ma thèse, j'ai eu l'occasion de présenter mes travaux dans plusieurs congrès nationaux et internationaux. Voici la liste des congrès auxquels j'ai participé et le titre des travaux présentés :

- 1- **48 heures de l'unité (Batz-sur-Mer, France)** – 25 et 26 juin 2009 – *Communication orale*

Etude d'un mutant du canal calcique $Ca_v1.2$ impliqué dans le syndrome du QT court

- 2- **Denis Escande symposium II (Nantes, France)** – 29 et 30 juin 2009 – *Poster*

Loss-of-function Mutation of the Cardiac $Ca_v1.2$ Channel in the Short QT Syndrome

MY. Amarouch, J. Barc, **D. Béziau**, F. Kyndt, H. Le Marec, D. Babuty, V. Probst, JJ. Schott, I. Baró.

- 3- **5^{ème} Printemps de la Cardiologie (Nantes, France)** – 15 au 17 avril 2010 – *Poster*

$Ca_v1.2$ mutation associated with systemic carnitine deficiency and short QT syndrome without dilated cardiomyopathy

MY. Amarouch, J. Barc, **D. Béziau**, F. Kyndt, H. Le Marec, D. Babuty, V. Probst, JJ. Schott, I. Baró.

- 4- **Cardiomet (Lausanne, Suisse)** – 3 et 4 juin 2010 – *communication orale*

$Ca_v1.2$ mutation associated with systemic carnitine deficiency and short QT syndrome without dilated cardiomyopathy

- 5- **48 heures de l'unité (Batz sur mer, France)** – 24 et 25 juin 2010 – *Communication orale*

Etude d'une mutation du canal calcique $Ca_v1.2$ associée à une déficience en carnitine et au syndrome du QT court

- 6- **21^{ème} colloque des canaux ioniques (Giens, France)** – 12 au 15 septembre 2010 –
Poster

Ca_v1.2 mutation associated with systemic carnitine deficiency and short QT syndrome without dilated cardiomyopathy

MY. Amarouch, J. Barc, D. Béziau, F. Kyndt, H. Le Marec, D. Babuty, V. Probst, JJ. Schott, I. Baró.

- 7- **Denis Escande symposium III (Nantes, France)** – 16 et 17 juin 2011 – *Poster*

Multifocal Ectopic Purkinje-related Premature Contraction: a new SCN5A-related cardiac channelopathy

Gabriel Laurent, Samuel Saal*, Mohamed Yassine Amarouch*, Delphine Béziau, Laurence Faivre, Julien Barc, Christian Dina, Geraldine Bertaux, Sylvie Falcon-Eicher, Olivier Barthez, Christel Thauvin-Robinet, Philippe Charron, Pascale Richard, Alice Maltret, Elisabeth Villain, Estelle Baron, Jean Mérot, Rodolphe Turpault, Yves Coudière, Flavien Charpentier, Jean Jacques Schott, Isabelle Baró, Jean Eric Wolf, Gildas Loussouarn, Florence Kyndt, Vincent Probst, . * These authors contributed equally to this work.*

- 8- **1^{ères} Journées scientifiques de l'école doctorale (Talmont Saint Hilaire, France)** – 7 et 8 novembre 2011 – *Communication orale*

Variant du canal calcique Ca_v1.2 impliqué dans le syndrome de Brugada associé à un intervalle QT court »

- 9- **Biophysical society 56th annual meeting (San Diego, USA)** – 25 au 29 février 2012 – *Poster*

Ca_v1.2 mutation involved in Brugada syndrome associated with short QT interval

Béziau D, Barc J, Le Gloann L, Amarouch MY, Solnon A, Pavin D, Bouillet P, Mabo P, Probst V, Kyndt F, Le Marec H, Schott JJ, Baró I.

- 10- **7^{ème} Printemps de la Cardiologie (Bordeaux, France)** – 12 et 13 avril 2012 –
Poster et communication orale – Prix poster

Ca_v1.2 mutation involved in Brugada syndrome associated with a short QT interval

Béziau DM, Barc J, Le Gloann L, Amarouch MY, Solnon A, Pavin D, Bouillet P, Mabo P, Guicheney P, Kyndt F, Le Marec H, Schott JJ, Probst V, Baró I.

11- **36th Meeting of the European Working Group on Cardiac Cellular Electrophysiology (Nantes, France)** – 15 et 16 septembre 2012 – *Poster*

Compound *SCN5A* and *CACNA1C* mutations in a conduction defect and Brugada family

Delphine M. Béziau, Julien Barc, Lauriane Le Gloann, Mohamed Yassine Amarouch, Aude Solnon, Dominique Pavin, Patricia Bouillet, Philippe Mabo, Pascale Guicheney, Isabelle Denjoy, Hervé le Marec, Gildas Loussouarn, Jean-Jacques Schott, Florence Kyndt, Vincent Probst, Isabelle Baró.

VI. BIBLIOGRAPHIE

- Abrahams B S and Geschwind D H.** (2008). Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. *Nat Rev Genet.* 9, 341-355.
- Abriel H.** (2010). Cardiac sodium channel Na(v)1.5 and interacting proteins: Physiology and pathophysiology. *J Mol Cell Cardiol.* 48, 2-11.
- Abriel H, Kamynina E, Horisberger J D and Staub O.** (2000). Regulation of the cardiac voltage-gated Na⁺ channel (H1) by the ubiquitin-protein ligase Nedd4. *FEBS Lett.* 466, 377-380.
- Adams R J, Cohen D W, Gupte S, Johnson J D, Wallick E T, Wang T and Schwartz A.** (1979). In vitro effects of palmitylcarnitine on cardiac plasma membrane Na,K-ATPase, and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and Ca²⁺ transport. *J Biol Chem.* 254, 12404-12410.
- Ahern C A, Zhang J F, Wookalis M J and Horn R.** (2005). Modulation of the cardiac sodium channel Nav1.5 by Fyn, a Src family tyrosine kinase. *Circ Res.* 96, 991-998.
- Ahmad F, Seidman J G and Seidman C E.** (2005). The genetic basis for cardiac remodeling. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 6, 185-216.
- Aiba T, Hesketh G G, Liu T, Carlisle R, Villa-Abrille M C, O'Rourke B, Akar F G and Tomaselli G F.** (2010). Na⁺ channel regulation by Ca²⁺/calmodulin and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in guinea-pig ventricular myocytes. *Cardiovasc Res.* 85, 454-463.
- Algra A, Tijssen J G, Roelandt J R, Pool J and Lubsen J.** (1993). QT interval variables from 24 hour electrocardiography and the two year risk of sudden death. *Br Heart J.* 70, 43-48.
- Allouis M, Le Bouffant F, Wilders R, Peroz D, Schott J J, Noireaud J, Le Marec H, Merot J, Escande D and Baro I.** (2006). 14-3-3 is a regulator of the cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5. *Circ Res.* 98, 1538-1546.
- Amat di San Filippo C, Taylor M R, Mestroni L, Botto L D and Longo N.** (2008). Cardiomyopathy and carnitine deficiency. *Mol Genet Metab.* 94, 162-166.
- Amin A S, Asghari-Roodsari A and Tan H L.** (2010). Cardiac sodium channelopathies. *Pflugers Arch.* 460, 223-237.
- An R H, Wang X L, Kerem B, Benhorin J, Medina A, Goldmit M and Kass R S.** (1998). Novel LQT-3 mutation affects Na⁺ channel activity through interactions between alpha- and beta1-subunits. *Circ Res.* 83, 141-146.
- Anderson M E.** (2001). Ca²⁺-dependent regulation of cardiac L-type Ca²⁺ channels: is a unifying mechanism at hand? *J Mol Cell Cardiol.* 33, 639-650.
- Anderson M E.** (2004). Calmodulin kinase and L-type calcium channels; a recipe for arrhythmias? *Trends Cardiovasc Med.* 14, 152-161.
- Angelotti T and Hofmann F.** (1996). Tissue-specific expression of splice variants of the mouse voltage-gated calcium channel alpha2/delta subunit. *FEBS Lett.* 397, 331-337.
- Antoons G, Volders P G, Stankovicova T, Bito V, Stengl M, Vos M A and Sipido K R.** (2007). Window Ca²⁺ current and its modulation by Ca²⁺ release in hypertrophied cardiac myocytes from dogs with chronic atrioventricular block. *J Physiol.* 579, 147-160.
- Anttonen O, Junttila M J, Rissanen H, Reunanen A, Viitasalo M and Huikuri H V.** (2007). Prevalence and prognostic significance of short QT interval in a middle-aged Finnish population. *Circulation.* 116, 714-720.
- Antzelevitch C, Brugada P, Borggreffe M, Brugada J, Brugada R, Corrado D, Gussak I, LeMarec H, Nademanee K, Perez Riera A R, Shimizu W, Schulze-Bahr E, Tan H and Wilde A.** (2005). Brugada syndrome: report of the second consensus conference: endorsed by the Heart Rhythm Society and the European Heart Rhythm Association. *Circulation.* 111, 659-670.
- Antzelevitch C, Brugada P, Brugada J, Brugada R, Shimizu W, Gussak I and Perez Riera A R.** (2002). Brugada syndrome: a decade of progress. *Circ Res.* 91, 1114-1118.
- Antzelevitch C and Burashnikov A.** (2011). Overview of Basic Mechanisms of Cardiac Arrhythmia. *Card Electrophysiol Clin.* 3, 23-45.

- Antzelevitch C, Burashnikov A, Sicouri S and Belardinelli L.** (2011 b). Electrophysiologic basis for the antiarrhythmic actions of ranolazine. *Heart Rhythm*. 8, 1281-1290.
- Antzelevitch C, Pollevick G D, Cordeiro J M, Casis O, Sanguinetti M C, Aizawa Y, Guerchicoff A, Pfeiffer R, Oliva A, Wollnik B, Gelber P, Bonaros E P, Jr., Burashnikov E, Wu Y, Sargent J D, Schickel S, Oberheiden R, Bhatia A, Hsu L F, Haissaguerre M, Schimpf R, Borggreffe M and Wolpert C.** (2007). Loss-of-function mutations in the cardiac calcium channel underlie a new clinical entity characterized by ST-segment elevation, short QT intervals, and sudden cardiac death. *Circulation*. 115, 442-449.
- Antzelevitch C and Sicouri S.** (1994). Clinical relevance of cardiac arrhythmias generated by afterdepolarizations. Role of M cells in the generation of U waves, triggered activity and torsade de pointes. *J Am Coll Cardiol*. 23, 259-277.
- Antzelevitch C, Sicouri S, Litovsky S H, Lukas A, Krishnan S C, Di Diego J M, Gintant G A and Liu D W.** (1991). Heterogeneity within the ventricular wall. Electrophysiology and pharmacology of epicardial, endocardial, and M cells. *Circ Res*. 69, 1427-1449.
- Arduini A.** (1992). Carnitine and its acyl esters as secondary antioxidants? *Am Heart J*. 123, 1726-1727.
- Bading H, Ginty D D and Greenberg M E.** (1993). Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways. *Science*. 260, 181-186.
- Baig S M, Koschak A, Lieb A, Gebhart M, Dafinger C, Nurnberg G, Ali A, Ahmad I, Sinnegger-Brauns M J, Brandt N, Engel J, Mangoni M E, Farooq M, Khan H U, Nurnberg P, Striessnig J and Bolz H J.** (2011). Loss of Ca(v)1.3 (CACNA1D) function in a human channelopathy with bradycardia and congenital deafness. *Nat Neurosci*. 14, 77-84.
- Balijepalli R C, Foell J D, Hall D D, Hell J W and Kamp T J.** (2006). Localization of cardiac L-type Ca(2+) channels to a caveolar macromolecular signaling complex is required for beta(2)-adrenergic regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103, 7500-7505.
- Balser J R.** (2001). The cardiac sodium channel: gating function and molecular pharmacology. *J Mol Cell Cardiol*. 33, 599-613.
- Bangalore R, Mehrke G, Gingrich K, Hofmann F and Kass R S.** (1996). Influence of L-type Ca channel alpha 2/delta-subunit on ionic and gating current in transiently transfected HEK 293 cells. *Am J Physiol*. 270, H1521-1528.
- Barclay J, Balaguero N, Mione M, Ackerman S L, Letts V A, Brodbeck J, Canti C, Meir A, Page K M, Kusumi K, Perez-Reyes E, Lander E S, Frankel W N, Gardiner R M, Dolphin A C and Rees M.** (2001). Ducky mouse phenotype of epilepsy and ataxia is associated with mutations in the Cacna2d2 gene and decreased calcium channel current in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci*. 21, 6095-6104.
- Belhassen B, Glick A and Viskin S.** (2004). Efficacy of quinidine in high-risk patients with Brugada syndrome. *Circulation*. 110, 1731-1737.
- Bellocq C, van Ginneken A C, Bezzina C R, Alders M, Escande D, Mannens M M, Baro I and Wilde A A.** (2004). Mutation in the KCNQ1 gene leading to the short QT-interval syndrome. *Circulation*. 109, 2394-2397.
- Benitah J P, Alvarez J L and Gomez A M.** (2010). L-type Ca(2+) current in ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 48, 26-36.
- Benitah J P, Gomez A M, Delgado C, Lorente P and Lederer W J.** (1997). A chloride current component induced by hypertrophy in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol*. 272, H2500-2506.
- Benitah J P, Gomez A M, Fauconnier J, Kerfant B G, Perrier E, Vassort G and Richard S.** (2002). Voltage-gated Ca²⁺ currents in the human pathophysiologic heart: a review. *Basic Res Cardiol*. 97 Suppl 1, 111-18.
- Benito B, Brugada J, Brugada R and Brugada P.** (2009). Brugada syndrome. *Rev Esp Cardiol*. 62, 1297-1315.
- Bers D M.** (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 415, 198-205.
- Bezzina C, Veldkamp M W, van Den Berg M P, Postma A V, Rook M B, Viersma J W, van Langen I M, Tan-Sindhunata G, Bink-Boelkens M T, van Der Hout A H,**

- Mannens M M and Wilde A A.** (1999). A single Na(+) channel mutation causing both long-QT and Brugada syndromes. *Circ Res.* 85, 1206-1213.
- Bezzina C R, Rook M B, Groenewegen W A, Herfst L J, van der Wal A C, Lam J, Jongsma H J, Wilde A A and Mannens M M.** (2003). Compound heterozygosity for mutations (W156X and R225W) in SCN5A associated with severe cardiac conduction disturbances and degenerative changes in the conduction system. *Circ Res.* 92, 159-168.
- Bichet D, Cornet V, Geib S, Carlier E, Volsen S, Hoshi T, Mori Y and De Waard M.** (2000). The I-II loop of the Ca²⁺ channel alpha1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron.* 25, 177-190.
- Bito H, Deisseroth K and Tsien R W.** (1996). CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca(2+)- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell.* 87, 1203-1214.
- Bito V, Heinzel F R, Biesmans L, Antoons G and Sipido K R.** (2008). Crosstalk between L-type Ca²⁺ channels and the sarcoplasmic reticulum: alterations during cardiac remodelling. *Cardiovasc Res.* 77, 315-324.
- Boriani G, Biffi M, Valzania C, Bronzetti G and Martignani C.** (2006). Short QT syndrome and arrhythmogenic cardiac diseases in the young: the challenge of implantable cardioverter-defibrillator therapy for children. *Eur Heart J.* 27, 2382-2384.
- Bosse E, Regulla S, Biel M, Ruth P, Meyer H E, Flockerzi V and Hofmann F.** (1990). The cDNA and deduced amino acid sequence of the gamma subunit of the L-type calcium channel from rabbit skeletal muscle. *FEBS Lett.* 267, 153-156.
- Boyett M R, Honjo H, Harrison S M, Zang W J and Kirby M S.** (1994). Ultra-slow voltage-dependent inactivation of the calcium current in guinea-pig and ferret ventricular myocytes. *Pflugers Arch.* 428, 39-50.
- Brackenbury W J, Davis T H, Chen C, Slat E A, Detrow M J, Dickendesher T L, Ranscht B and Isom L L.** (2008). Voltage-gated Na⁺ channel beta1 subunit-mediated neurite outgrowth requires Fyn kinase and contributes to postnatal CNS development in vivo. *J Neurosci.* 28, 3246-3256.
- Bremer J.** (1983). Carnitine--metabolism and functions. *Physiol Rev.* 63, 1420-1480.
- Brette F and Orchard C H.** (2006). Density and sub-cellular distribution of cardiac and neuronal sodium channel isoforms in rat ventricular myocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 348, 1163-1166.
- Brink P A, Ferreira A, Moolman J C, Weymar H W, van der Merwe P L and Corfield V A.** (1995). Gene for progressive familial heart block type I maps to chromosome 19q13. *Circulation.* 91, 1633-1640.
- Brugada J, Brugada R, Antzelevitch C, Towbin J, Nademanee K and Brugada P.** (2002). Long-term follow-up of individuals with the electrocardiographic pattern of right bundle-branch block and ST-segment elevation in precordial leads V1 to V3. *Circulation.* 105, 73-78.
- Brugada J, Brugada R and Brugada P.** (2003). Determinants of sudden cardiac death in individuals with the electrocardiographic pattern of Brugada syndrome and no previous cardiac arrest. *Circulation.* 108, 3092-3096.
- Brugada P and Brugada J.** (1992). Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report. *J Am Coll Cardiol.* 20, 1391-1396.
- Brugada R, Brugada J, Antzelevitch C, Kirsch G E, Potenza D, Towbin J A and Brugada P.** (2000). Sodium channel blockers identify risk for sudden death in patients with ST-segment elevation and right bundle branch block but structurally normal hearts. *Circulation.* 101, 510-515.
- Brugada R, Hong K, Cordeiro J M and Dumaine R.** (2005). Short QT syndrome. *CMAJ.* 173, 1349-1354.
- Brugada R, Hong K, Dumaine R, Cordeiro J, Gaita F, Borggrefe M, Menendez T M, Brugada J, Pollevick G D, Wolpert C, Burashnikov E, Matsuo K, Wu Y S, Guerchicoff A, Bianchi F, Giustetto C, Schimpf R, Brugada P and Antzelevitch**

- C. (2004). Sudden death associated with short-QT syndrome linked to mutations in HERG. *Circulation*. 109, 30-35.
- Bufalari A, Furbetta D, Santucci F and Solinas P.** (1956). Abnormality of the U wave and of the T-U segment of the electrocardiogram; the syndrome of the papillary muscles. *Circulation*. 14, 1129-1137.
- Buraei Z and Yang J.** (2010). The ss subunit of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Physiol Rev*. 90, 1461-1506.
- Burashnikov E, Pfeiffer R, Barajas-Martinez H, Delpon E, Hu D, Desai M, Borggrefe M, Haissaguerre M, Kanter R, Pollevick G D, Guerchicoff A, Laino R, Marieb M, Nademanee K, Nam G B, Robles R, Schimpf R, Stapleton D D, Viskin S, Winters S, Wolpert C, Zimmern S, Veltmann C and Antzelevitch C.** (2010). Mutations in the cardiac L-type calcium channel associated with inherited J-wave syndromes and sudden cardiac death. *Heart Rhythm*. 7, 1872-1882.
- Burgess D L, Davis C F, Gefrides L A and Noebels J L.** (1999). Identification of three novel Ca(2+) channel gamma subunit genes reveals molecular diversification by tandem and chromosome duplication. *Genome Res*. 9, 1204-1213.
- Burgess D L, Jones J M, Meisler M H and Noebels J L.** (1997). Mutation of the Ca²⁺ channel beta subunit gene Cchb4 is associated with ataxia and seizures in the lethargic (lh) mouse. *Cell*. 88, 385-392.
- Cahill A L, Hurley J H and Fox A P.** (2000). Coexpression of cloned alpha(1B), beta(2a), and alpha(2)/delta subunits produces non-inactivating calcium currents similar to those found in bovine chromaffin cells. *J Neurosci*. 20, 1685-1693.
- Carl S L, Felix K, Caswell A H, Brandt N R, Ball W J, Jr., Vaghy P L, Meissner G and Ferguson D G.** (1995). Immunolocalization of sarcolemmal dihydropyridine receptor and sarcoplasmic reticular triadin and ryanodine receptor in rabbit ventricle and atrium. *J Cell Biol*. 129, 673-682.
- Castellano A, Wei X, Birnbaumer L and Perez-Reyes E.** (1993a). Cloning and expression of a neuronal calcium channel beta subunit. *J Biol Chem*. 268, 12359-12366.
- Castellano A, Wei X, Birnbaumer L and Perez-Reyes E.** (1993b). Cloning and expression of a third calcium channel beta subunit. *J Biol Chem*. 268, 3450-3455.
- Catterall W A.** (2000a). Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 16, 521-555.
- Catterall W A.** (2000b). From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*. 26, 13-25.
- Catterall W A.** (2011). Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 3, a003947.
- Catterall W A, Perez-Reyes E, Snutch T P and Striessnig J.** (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev*. 57, 411-425.
- Chanda B, Asamoah O K and Bezanilla F.** (2004). Coupling interactions between voltage sensors of the sodium channel as revealed by site-specific measurements. *J Gen Physiol*. 123, 217-230.
- Chandy K G.** (1991). Simplified gene nomenclature. *Nature*. 352, 26.
- Chen Q, Kirsch G E, Zhang D, Brugada R, Brugada J, Brugada P, Potenza D, Moya A, Borggrefe M, Breithardt G, Ortiz-Lopez R, Wang Z, Antzelevitch C, O'Brien R E, Schulze-Bahr E, Keating M T, Towbin J A and Wang Q.** (1998). Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature*. 392, 293-296.
- Chen X, Zhang X, Harris D M, Piacentino V, 3rd, Berretta R M, Margulies K B and Houser S R.** (2008). Reduced effects of BAY K 8644 on L-type Ca²⁺ current in failing human cardiac myocytes are related to abnormal adrenergic regulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 294, H2257-2267.
- Cheng J, Morales A, Siegfried J D, Li D, Norton N, Song J, Gonzalez-Quintana J, Makielski J C and Hershberger R E.** (2010). SCN5A rare variants in familial dilated cardiomyopathy decrease peak sodium current depending on the common

- polymorphism H558R and common splice variant Q1077del. *Clin Transl Sci.* 3, 287-294.
- Chiamvimonvat N, Perez-Garcia M T, Ranjan R, Marban E and Tomaselli G F.** (1996). Depth asymmetries of the pore-lining segments of the Na⁺ channel revealed by cysteine mutagenesis. *Neuron.* 16, 1037-1047.
- Chien A J, Zhao X, Shirokov R E, Puri T S, Chang C F, Sun D, Rios E and Hosey M M.** (1995). Roles of a membrane-localized beta subunit in the formation and targeting of functional L-type Ca²⁺ channels. *J Biol Chem.* 270, 30036-30044.
- Chioni A M, Brackenbury W J, Calhoun J D, Isom L L and Djamgoz M B.** (2009). A novel adhesion molecule in human breast cancer cells: voltage-gated Na⁺ channel beta1 subunit. *Int J Biochem Cell Biol.* 41, 1216-1227.
- Chu P J, Larsen J K, Chen C C and Best P M.** (2004). Distribution and relative expression levels of calcium channel beta subunits within the chambers of the rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 36, 423-434.
- Chu P J, Robertson H M and Best P M.** (2001). Calcium channel gamma subunits provide insights into the evolution of this gene family. *Gene.* 280, 37-48.
- Cingolani E, Ramirez Correa G A, Kizana E, Murata M, Cho H C and Marban E.** (2007). Gene therapy to inhibit the calcium channel beta subunit: physiological consequences and pathophysiological effects in models of cardiac hypertrophy. *Circ Res.* 101, 166-175.
- Clancy C E and Rudy Y.** (2002). Na(+) channel mutation that causes both Brugada and long-QT syndrome phenotypes: a simulation study of mechanism. *Circulation.* 105, 1208-1213.
- Clark R B, Bouchard R A, Salinas-Stefanon E, Sanchez-Chapula J and Giles W R.** (1993). Heterogeneity of action potential waveforms and potassium currents in rat ventricle. *Cardiovasc Res.* 27, 1795-1799.
- Cohen R M, Foell J D, Balijepalli R C, Shah V, Hell J W and Kamp T J.** (2005). Unique modulation of L-type Ca²⁺ channels by short auxiliary beta1d subunit present in cardiac muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 288, H2363-2374.
- Colecraft H M, Alseikhan B, Takahashi S X, Chaudhuri D, Mittman S, Yegnasubramanian V, Alvania R S, Johns D C, Marban E and Yue D T.** (2002). Novel functional properties of Ca(2+) channel beta subunits revealed by their expression in adult rat heart cells. *J Physiol.* 541, 435-452.
- Collin T, Wang J J, Nargeot J and Schwartz A.** (1993). Molecular cloning of three isoforms of the L-type voltage-dependent calcium channel beta subunit from normal human heart. *Circ Res.* 72, 1337-1344.
- Coraboeuf E, Deroubaix E and Coulombe A.** (1979). Effect of tetrodotoxin on action potentials of the conducting system in the dog heart. *Am J Physiol.* 236, H561-567.
- Cordeiro J M, Marieb M, Pfeiffer R, Calloe K, Burashnikov E and Antzelevitch C.** (2009). Accelerated inactivation of the L-type calcium current due to a mutation in CACNB2b underlies Brugada syndrome. *J Mol Cell Cardiol.* 46, 695-703.
- Cormier J W, Rivolta I, Tateyama M, Yang A S and Kass R S.** (2002). Secondary structure of the human cardiac Na⁺ channel C terminus: evidence for a role of helical structures in modulation of channel inactivation. *J Biol Chem.* 277, 9233-9241.
- Cronk L B, Ye B, Kaku T, Tester D J, Vatta M, Makielski J C and Ackerman M J.** (2007). Novel mechanism for sudden infant death syndrome: persistent late sodium current secondary to mutations in caveolin-3. *Heart Rhythm.* 4, 161-166.
- Cunha S R and Mohler P J.** (2006). Cardiac ankyrins: Essential components for development and maintenance of excitable membrane domains in heart. *Cardiovasc Res.* 71, 22-29.
- D'Arco M and Dolphin A C.** (2012). L-type calcium channels: on the fast track to nuclear signaling. *Sci Signal.* 5, pe34.
- Das R, Burke T, Van Wagoner D R and Plow E F.** (2009). L-type calcium channel blockers exert an antiinflammatory effect by suppressing expression of plasminogen receptors on macrophages. *Circ Res.* 105, 167-175.

- Davare M A, Horne M C and Hell J W.** (2000). Protein phosphatase 2A is associated with class C L-type calcium channels (Cav1.2) and antagonizes channel phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 275, 39710-39717.
- Davies A, Hendrich J, Van Minh A T, Wratten J, Douglas L and Dolphin A C.** (2007). Functional biology of the alpha(2)delta subunits of voltage-gated calcium channels. *Trends Pharmacol Sci.* 28, 220-228.
- Davies A, Kadurin I, Alvarez-Laviada A, Douglas L, Nieto-Rostro M, Bauer C S, Pratt W S and Dolphin A C.** (2010). The alpha2delta subunits of voltage-gated calcium channels form GPI-anchored proteins, a posttranslational modification essential for function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107, 1654-1659.
- de Meeus A, Stephan E, Debrus S, Jean M K, Loiselet J, Weissenbach J, Demaille J and Bouvagnet P.** (1995). An isolated cardiac conduction disease maps to chromosome 19q. *Circ Res.* 77, 735-740.
- De Waard M and Campbell K P.** (1995). Subunit regulation of the neuronal alpha 1A Ca²⁺ channel expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol.* 485 (Pt 3), 619-634.
- De Waard M, Pragnell M and Campbell K P.** (1994). Ca²⁺ channel regulation by a conserved beta subunit domain. *Neuron.* 13, 495-503.
- De Waard M, Witcher D R, Pragnell M, Liu H and Campbell K P.** (1995). Properties of the alpha 1-beta anchoring site in voltage-dependent Ca²⁺ channels. *J Biol Chem.* 270, 12056-12064.
- Deisseroth K, Bito H and Tsien R W.** (1996). Signaling from synapse to nucleus: postsynaptic CREB phosphorylation during multiple forms of hippocampal synaptic plasticity. *Neuron.* 16, 89-101.
- Deisseroth K, Mermelstein P G, Xia H and Tsien R W.** (2003). Signaling from synapse to nucleus: the logic behind the mechanisms. *Curr Opin Neurobiol.* 13, 354-365.
- Delpont E, Cordeiro J M, Nunez L, Thomsen P E, Guerchicoff A, Pollevick G D, Wu Y, Kanters J K, Larsen C T, Hofman-Bang J, Burashnikov E, Christiansen M and Antzelevitch C.** (2008). Functional effects of KCNE3 mutation and its role in the development of Brugada syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 1, 209-218.
- Deschenes I, Neyroud N, DiSilvestre D, Marban E, Yue D T and Tomaselli G F.** (2002). Isoform-specific modulation of voltage-gated Na(+) channels by calmodulin. *Circ Res.* 90, E49-57.
- Deschenes I, Trottier E and Chahine M.** (2001). Implication of the C-terminal region of the alpha-subunit of voltage-gated sodium channels in fast inactivation. *J Membr Biol.* 183, 103-114.
- Dhalla N S, Temsah R M and Netticadan T.** (2000). Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens.* 18, 655-673.
- Dhar Malhotra J, Chen C, Rivolta I, Abriel H, Malhotra R, Mattei L N, Brosius F C, Kass R S and Isom L L.** (2001). Characterization of sodium channel alpha- and beta-subunits in rat and mouse cardiac myocytes. *Circulation.* 103, 1303-1310.
- Di Biase V, Tuluc P, Campiglio M, Obermair G J, Heine M and Flucher B E.** (2011). Surface traffic of dendritic CaV1.2 calcium channels in hippocampal neurons. *J Neurosci.* 31, 13682-13694.
- DiFrancesco D and Noble D.** (1985). A model of cardiac electrical activity incorporating ionic pumps and concentration changes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 307, 353-398.
- Dolmetsch R E, Lewis R S, Goodnow C C and Healy J I.** (1997). Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature.* 386, 855-858.
- Dolmetsch R E, Pajvani U, Fife K, Spotts J M and Greenberg M E.** (2001). Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. *Science.* 294, 333-339.
- Dolphin A C.** (2003). Beta subunits of voltage-gated calcium channels. *J Bioenerg Biomembr.* 35, 599-620.

- Donahue L M, Coates P W, Lee V H, Ippensen D C, Arze S E and Poduslo S E.** (2000). The cardiac sodium channel mRNA is expressed in the developing and adult rat and human brain. *Brain Res.* 887, 335-343.
- Doris P A.** (2002). Hypertension genetics, single nucleotide polymorphisms, and the common disease:common variant hypothesis. *Hypertension.* 39, 323-331.
- duBell W H, Lederer W J and Rogers T B.** (1996). Dynamic modulation of excitation-contraction coupling by protein phosphatases in rat ventricular myocytes. *J Physiol.* 493 (Pt 3), 793-800.
- duBell W H and Rogers T B.** (2004). Protein phosphatase 1 and an opposing protein kinase regulate steady-state L-type Ca^{2+} current in mouse cardiac myocytes. *J Physiol.* 556, 79-93.
- Eaholtz G, Scheuer T and Catterall W A.** (1994). Restoration of inactivation and block of open sodium channels by an inactivation gate peptide. *Neuron.* 12, 1041-1048.
- Eberst R, Dai S, Klugbauer N and Hofmann F.** (1997). Identification and functional characterization of a calcium channel gamma subunit. *Pflugers Arch.* 433, 633-637.
- Eckardt L, Probst V, Smits J P, Bahr E S, Wolpert C, Schimpf R, Wichter T, Boisseau P, Heinecke A, Breithardt G, Borggrefe M, LeMarec H, Bocker D and Wilde A A.** (2005). Long-term prognosis of individuals with right precordial ST-segment-elevation Brugada syndrome. *Circulation.* 111, 257-263.
- Eder P and Molkentin J D.** (2011). TRPC channels as effectors of cardiac hypertrophy. *Circ Res.* 108, 265-272.
- el-Hayek R, Valdivia C, Valdivia H H, Hogan K and Coronado R.** (1993). Activation of the Ca^{2+} release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by palmitoyl carnitine. *Biophys J.* 65, 779-789.
- Ellis S B, Williams M E, Ways N R, Brenner R, Sharp A H, Leung A T, Campbell K P, McKenna E, Koch W J, Hui A and et al.** (1988). Sequence and expression of mRNAs encoding the alpha 1 and alpha 2 subunits of a DHP-sensitive calcium channel. *Science.* 241, 1661-1664.
- Endo M, Tanaka M and Ogawa Y.** (1970). Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres. *Nature.* 228, 34-36.
- Ertel E A, Campbell K P, Harpold M M, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch T P, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien R W and Catterall W A.** (2000). Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron.* 25, 533-535.
- Fabiato A and Fabiato F.** (1973). Activation of skinned cardiac cells. Subcellular effects of cardioactive drugs. *Eur J Cardiol.* 1, 143-155.
- Fabiato A and Fabiato F.** (1975). Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *J Physiol.* 249, 469-495.
- Fatt P and Katz B.** (1953). The electrical properties of crustacean muscle fibres. *J Physiol.* 120, 171-204.
- Fedida D and Giles W R.** (1991). Regional variations in action potentials and transient outward current in myocytes isolated from rabbit left ventricle. *J Physiol.* 442, 191-209.
- Fei L and Camm A J.** (1995). Shortening of the QT interval immediately preceding the onset of idiopathic spontaneous ventricular tachycardia. *Am Heart J.* 130, 915-917.
- Felix R, Gurnett C A, De Waard M and Campbell K P.** (1997). Dissection of functional domains of the voltage-dependent Ca^{2+} channel alpha2delta subunit. *J Neurosci.* 17, 6884-6891.
- Filatov G N and Rich M M.** (2004). Hyperpolarized shifts in the voltage dependence of fast inactivation of Nav1.4 and Nav1.5 in a rat model of critical illness myopathy. *J Physiol.* 559, 813-820.
- Fish J M and Antzelevitch C.** (2004). Role of sodium and calcium channel block in unmasking the Brugada syndrome. *Heart Rhythm.* 1, 210-217.
- Fishman G I, Chugh S S, Dimarco J P, Albert C M, Anderson M E, Bonow R O, Buxton A E, Chen P S, Estes M, Jouven X, Kwong R, Lathrop D A, Mascette A M,**

- Nerbonne J M, O'Rourke B, Page R L, Roden D M, Rosenbaum D S, Sotoodehnia N, Trayanova N A and Zheng Z J.** (2010). Sudden cardiac death prediction and prevention: report from a National Heart, Lung, and Blood Institute and Heart Rhythm Society Workshop. *Circulation*. 122, 2335-2348.
- Fleckenstein A.** (1983). History of calcium antagonists. *Circ Res*. 52, 13-16.
- Ford L E and Podolsky R J.** (1970). Regenerative calcium release within muscle cells. *Science*. 167, 58-59.
- Fowler M R, Colotti G, Chiancone E, Higuchi Y, Seidler T and Smith G L.** (2009). Complex modulation of L-type Ca^{2+} current inactivation by sorcin in isolated rabbit cardiomyocytes. *Pflügers Arch*. 457, 1049-1060.
- Fowler M R, Colotti G, Chiancone E, Smith G L and Fearon I M.** (2008). Sorcin modulates cardiac L-type Ca^{2+} current by functional interaction with the $\alpha_1\text{C}$ subunit in rabbits. *Exp Physiol*. 93, 1233-1238.
- Fox J A.** (1987). Ion channel subconductance states. *J Membr Biol*. 97, 1-8.
- Fozzard H A.** (1991). Excitation-contraction coupling in the heart. *Adv Exp Med Biol*. 308, 135-142.
- Franz M R and Bode F.** (2003). Mechano-electrical feedback underlying arrhythmias: the atrial fibrillation case. *Prog Biophys Mol Biol*. 82, 163-174.
- Fraser I D, Tavalin S J, Lester L B, Langeberg L K, Westphal A M, Dean R A, Marrion N V and Scott J D.** (1998). A novel lipid-anchored A-kinase Anchoring Protein facilitates cAMP-responsive membrane events. *EMBO J*. 17, 2261-2272.
- Fuller-Bicer G A, Varadi G, Koch S E, Ishii M, Bodi I, Kadeer N, Muth J N, Mikala G, Petrashevskaya N N, Jordan M A, Zhang S P, Qin N, Flores C M, Isaacsohn I, Varadi M, Mori Y, Jones W K and Schwartz A.** (2009). Targeted disruption of the voltage-dependent calcium channel α_2/δ_1 -subunit. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 297, H117-124.
- Furukawa T, Myerburg R J, Furukawa N, Bassett A L and Kimura S.** (1990). Differences in transient outward currents of feline endocardial and epicardial myocytes. *Circ Res*. 67, 1287-1291.
- Gaborit N, Le Bouter S, Szuts V, Varro A, Escande D, Nattel S and Demolombe S.** (2007). Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart. *J Physiol*. 582, 675-693.
- Gabriel S B, Salomon R, Pelet A, Angrist M, Amiel J, Fornage M, Attie-Bitach T, Olson J M, Hofstra R, Buys C, Steffann J, Munnich A, Lyonnet S and Chakravarti A.** (2002). Segregation at three loci explains familial and population risk in Hirschsprung disease. *Nat Genet*. 31, 89-93.
- Gaita F, Giustetto C, Bianchi F, Schimpf R, Haissaguerre M, Calo L, Brugada R, Antzelevitch C, Borggrefe M and Wolpert C.** (2004). Short QT syndrome: pharmacological treatment. *J Am Coll Cardiol*. 43, 1494-1499.
- Gaita F, Giustetto C, Bianchi F, Wolpert C, Schimpf R, Riccardi R, Grossi S, Richiardi E and Borggrefe M.** (2003). Short QT Syndrome: a familial cause of sudden death. *Circulation*. 108, 965-970.
- Garavaglia B, Uziel G, Dworzak F, Carrara F and DiDonato S.** (1991). Primary carnitine deficiency: heterozygote and intrafamilial phenotypic variation. *Neurology*. 41, 1691-1693.
- Gavillet B, Rougier J S, Domenighetti A A, Behar R, Boixel C, Ruchat P, Lehr H A, Pedrazzini T and Abriel H.** (2006). Cardiac sodium channel Nav1.5 is regulated by a multiprotein complex composed of syntrophins and dystrophin. *Circ Res*. 99, 407-414.
- Gee S H, Madhavan R, Levinson S R, Caldwell J H, Sealock R and Froehner S C.** (1998). Interaction of muscle and brain sodium channels with multiple members of the syntrophin family of dystrophin-associated proteins. *J Neurosci*. 18, 128-137.
- Gellens M E, George A L, Jr., Chen L Q, Chahine M, Horn R, Barchi R L and Kallen R G.** (1992). Primary structure and functional expression of the human cardiac

- tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89, 554-558.
- George A L, Jr., Knittle T J and Tamkun M M.** (1992). Molecular cloning of an atypical voltage-gated sodium channel expressed in human heart and uterus: evidence for a distinct gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89, 4893-4897.
- George A L, Jr., Varkony T A, Drabkin H A, Han J, Knops J F, Finley W H, Brown G B, Ward D C and Haas M.** (1995). Assignment of the human heart tetrodotoxin-resistant voltage-gated Na⁺ channel alpha-subunit gene (SCN5A) to band 3p21. *Cytogenet Cell Genet*. 68, 67-70.
- Gillet L, Roger S, Besson P, Lecaille F, Gore J, Bougnoux P, Lalmanach G and Le Guennec J Y.** (2009). Voltage-gated Sodium Channel Activity Promotes Cysteine Cathepsin-dependent Invasiveness and Colony Growth of Human Cancer Cells. *J Biol Chem*. 284, 8680-8691.
- Giudicessi J R, Ye D, Tester D J, Crotti L, Mugione A, Nesterenko V V, Albertson R M, Antzelevitch C, Schwartz P J and Ackerman M J.** (2011). Transient outward current (I_{to}) gain-of-function mutations in the KCND3-encoded Kv4.3 potassium channel and Brugada syndrome. *Heart Rhythm*. 8, 1024-1032.
- Glossmann H, Striessnig J, Hymel L and Schindler H.** (1987). Purified L-type calcium channels: only one single polypeptide (alpha 1-subunit) carries the drug receptor domains and is regulated by protein kinases. *Biomed Biochim Acta*. 46, S351-356.
- Gluzman Y.** (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*. 23, 175-182.
- Goetz R, Dover K, Laezza F, Shtraizent N, Huang X, Tchetchik D, Eliseenkova A V, Xu C F, Neubert T A, Ornitz D M, Goldfarb M and Mohammadi M.** (2009). Crystal structure of a fibroblast growth factor homologous factor (FHF) defines a conserved surface on FHF for binding and modulation of voltage-gated sodium channels. *J Biol Chem*. 284, 17883-17896.
- Goldin A L.** (2001). Resurgence of sodium channel research. *Annu Rev Physiol*. 63, 871-894.
- Goldin A L, Barchi R L, Caldwell J H, Hofmann F, Howe J R, Hunter J C, Kallen R G, Mandel G, Meisler M H, Netter Y B, Noda M, Tamkun M M, Waxman S G, Wood J N and Catterall W A.** (2000). Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron*. 28, 365-368.
- Goldman D E.** (1943). Potential, Impedance, and Rectification in Membranes. *J Gen Physiol*. 27, 37-60.
- Gollasch M, Ried C, Liebold M, Haller H, Hofmann F and Luft F C.** (1996). High permeation of L-type Ca²⁺ channels at physiological [Ca²⁺]: homogeneity and dependence on the alpha 1-subunit. *Am J Physiol*. 271, C842-850.
- Gomez-Ospina N, Tsuruta F, Barreto-Chang O, Hu L and Dolmetsch R.** (2006). The C terminus of the L-type voltage-gated calcium channel Ca(V)_{1.2} encodes a transcription factor. *Cell*. 127, 591-606.
- Gomez A M, Kerfant B G and Vassort G.** (2000). Microtubule disruption modulates Ca(2+) signaling in rat cardiac myocytes. *Circ Res*. 86, 30-36.
- Gong H C, Hang J, Kohler W, Li L and Su T Z.** (2001). Tissue-specific expression and gabapentin-binding properties of calcium channel alpha2delta subunit subtypes. *J Membr Biol*. 184, 35-43.
- Grace A A and Camm A J.** (1998). Quinidine. *N Engl J Med*. 338, 35-45.
- Graef I A, Mermelstein P G, Stankunas K, Neilson J R, Deisseroth K, Tsien R W and Crabtree G R.** (1999). L-type calcium channels and GSK-3 regulate the activity of NF-ATc4 in hippocampal neurons. *Nature*. 401, 703-708.
- Grantham C J and Cannell M B.** (1996). Ca²⁺ influx during the cardiac action potential in guinea pig ventricular myocytes. *Circ Res*. 79, 194-200.
- Gray P C, Johnson B D, Westenbroek R E, Hays L G, Yates J R, 3rd, Scheuer T, Catterall W A and Murphy B J.** (1998). Primary structure and function of an A kinase anchoring protein associated with calcium channels. *Neuron*. 20, 1017-1026.

- Green E K, Grozeva D, Jones I, Jones L, Kirov G, Caesar S, Gordon-Smith K, Fraser C, Forty L, Russell E, Hamshere M L, Moskvina V, Nikolov I, Farmer A, McGuffin P, Holmans P A, Owen M J, O'Donovan M C and Craddock N.** (2010). The bipolar disorder risk allele at CACNA1C also confers risk of recurrent major depression and of schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 15, 1016-1022.
- Green E M, Barrett C F, Bultynck G, Shamah S M and Dolmetsch R E.** (2007). The tumor suppressor eIF3e mediates calcium-dependent internalization of the L-type calcium channel CaV1.2. *Neuron*. 55, 615-632.
- Gregg R G, Powers P A and Hogan K.** (1993). Assignment of the human gene for the beta subunit of the voltage-dependent calcium channel (CACNLB1) to chromosome 17 using somatic cell hybrids and linkage mapping. *Genomics*. 15, 185-187.
- Grube M, Ameling S, Noutsias M, Kock K, Triebel I, Bonitz K, Meissner K, Jedlitschky G, Herda L R, Reinthaler M, Rohde M, Hoffmann W, Kuhl U, Schultheiss H P, Volker U, Felix S B, Klingel K, Kandolf R and Kroemer H K.** (2011). Selective regulation of cardiac organic cation transporter novel type 2 (OCTN2) in dilated cardiomyopathy. *Am J Pathol*. 178, 2547-2559.
- Grueter C E, Abiria S A, Dzhura I, Wu Y, Ham A J, Mohler P J, Anderson M E and Colbran R J.** (2006). L-type Ca²⁺ channel facilitation mediated by phosphorylation of the beta subunit by CaMKII. *Mol Cell*. 23, 641-650.
- Gupta S, Salam N, Srivastava V, Singla R, Behera D, Khayyam K U, Korde R, Malhotra P, Saxena R and Natarajan K.** (2009). Voltage gated calcium channels negatively regulate protective immunity to Mycobacterium tuberculosis. *PLoS One*. 4, e5305.
- Gurnett C A, De Waard M and Campbell K P.** (1996). Dual function of the voltage-dependent Ca²⁺ channel alpha 2 delta subunit in current stimulation and subunit interaction. *Neuron*. 16, 431-440.
- Gurnett C A, Felix R and Campbell K P.** (1997). Extracellular interaction of the voltage-dependent Ca²⁺ channel alpha2delta and alpha1 subunits. *J Biol Chem*. 272, 18508-18512.
- Gussak I, Brugada P, Brugada J, Wright R S, Kopecky S L, Chaitman B R and Bjerregaard P.** (2000). Idiopathic short QT interval: a new clinical syndrome? *Cardiology*. 94, 99-102.
- Haase H.** (2007). Ahnak, a new player in beta-adrenergic regulation of the cardiac L-type Ca²⁺ channel. *Cardiovasc Res*. 73, 19-25.
- Haase H, Alvarez J, Petzhold D, Doller A, Behlke J, Erdmann J, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V, Vassort G and Morano I.** (2005). Ahnak is critical for cardiac Ca(V)1.2 calcium channel function and its beta-adrenergic regulation. *FASEB J*. 19, 1969-1977.
- Haase H, Podzuweit T, Lutsch G, Hohaus A, Kostka S, Lindschau C, Kott M, Kraft R and Morano I.** (1999). Signaling from beta-adrenoceptor to L-type calcium channel: identification of a novel cardiac protein kinase A target possessing similarities to AHNAK. *FASEB J*. 13, 2161-2172.
- Hadley R W and Hume J R.** (1987). An intrinsic potential-dependent inactivation mechanism associated with calcium channels in guinea-pig myocytes. *J Physiol*. 389, 205-222.
- Haghighi K, Gregory K N and Kranias E G.** (2004). Sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase-phospholamban interactions and dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun*. 322, 1214-1222.
- Haissaguerre M.** 2010. Mort subite d'origine cardiaque : Traitement et prévention - Espoir ou chimère ? In *Les défis scientifiques du 21e siècle*.
- Haissaguerre M, Derval N, Sacher F, Jesel L, Deisenhofer I, de Roy L, Pasquie J L, Nogami A, Babuty D, Yli-Mayry S, De Chillou C, Scanu P, Mabo P, Matsuo S, Probst V, Le Scouarnec S, Defaye P, Schlaepfer J, Rostock T, Lacroix D, Lamaison D, Lavergne T, Aizawa Y, Englund A, Anselme F, O'Neill M, Hocini M, Lim K T, Knecht S, Veenhuyzen G D, Bordachar P, Chauvin M, Jais P, Coureau G, Chene G, Klein G J and Clementy J.** (2008). Sudden cardiac arrest associated with early repolarization. *N Engl J Med*. 358, 2016-2023.

- Halling D B, Aracena-Parks P and Hamilton S L.** (2005). Regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels by calmodulin. *Sci STKE*. 2005, re15.
- Halling D B, Aracena-Parks P and Hamilton S L.** (2006). Regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels by calmodulin. *Sci STKE*. 2006, er1.
- Hardingham G E, Chawla S, Johnson C M and Bading H.** (1997). Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature*. 385, 260-265.
- Hartmann H A, Colom L V, Sutherland M L and Noebels J L.** (1999). Selective localization of cardiac SCN5A sodium channels in limbic regions of rat brain. *Nat Neurosci*. 2, 593-595.
- Hartzell H C, Mery P F, Fischmeister R and Szabo G.** (1991). Sympathetic regulation of cardiac calcium current is due exclusively to cAMP-dependent phosphorylation. *Nature*. 351, 573-576.
- Haufe V, Camacho J A, Dumaine R, Gunther B, Bollensdorff C, von Banchet G S, Benndorf K and Zimmer T.** (2005). Expression pattern of neuronal and skeletal muscle voltage-gated Na^{+} channels in the developing mouse heart. *J Physiol*. 564, 683-696.
- Helton T D and Horne W A.** (2002). Alternative splicing of the beta 4 subunit has alpha1 subunit subtype-specific effects on Ca^{2+} channel gating. *J Neurosci*. 22, 1573-1582.
- Helton T D, Kojetin D J, Cavanagh J and Horne W A.** (2002). Alternative splicing of a beta4 subunit proline-rich motif regulates voltage-dependent gating and toxin block of Cav2.1 Ca^{2+} channels. *J Neurosci*. 22, 9331-9339.
- Herfst L J, Potet F, Bezzina C R, Groenewegen W A, Le Marec H, Hoorntje T M, Demolombe S, Baro I, Escande D, Jongsma H J, Wilde A A and Rook M B.** (2003). Na^{+} channel mutation leading to loss of function and non-progressive cardiac conduction defects. *J Mol Cell Cardiol*. 35, 549-557.
- Herlitze S, Xie M, Han J, Hummer A, Melnik-Martinez K V, Moreno R L and Mark M D.** (2003). Targeting mechanisms of high voltage-activated Ca^{2+} channels. *J Bioenerg Biomembr*. 35, 621-637.
- Hershberger R E, Parks S B, Kushner J D, Li D, Ludwigsen S, Jakobs P, Nauman D, Burgess D, Partain J and Litt M.** (2008). Coding sequence mutations identified in MYH7, TNNT2, SCN5A, CSRP3, LBD3, and TCAP from 313 patients with familial or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Clin Transl Sci*. 1, 21-26.
- Herzig S, Khan I F, Grundemann D, Matthes J, Ludwig A, Michels G, Hoppe U C, Chaudhuri D, Schwartz A, Yue D T and Hullin R.** (2007). Mechanism of Ca^{2+} channel modulation by the amino terminus of cardiac beta2-subunits. *FASEB J*. 21, 1527-1538.
- Hescheler J, Tang M, Jastorff B and Trautwein W.** (1987). On the mechanism of histamine induced enhancement of the cardiac Ca^{2+} current. *Pflügers Arch*. 410, 23-29.
- Hilber K, Sandtner W, Zarrabi T, Zebedin E, Kudlacek O, Fozzard H A and Todt H.** (2005). Selectivity filter residues contribute unequally to pore stabilization in voltage-gated sodium channels. *Biochemistry*. 44, 13874-13882.
- Hill J A.** (2003). Electrical remodeling in cardiac hypertrophy. *Trends Cardiovasc Med*. 13, 316-322.
- Hille B.** (1978). Ionic channels in excitable membranes. Current problems and biophysical approaches. *Biophys J*. 22, 283-294.
- Hobom M, Dai S, Marais E, Lacinova L, Hofmann F and Klugbauer N.** (2000). Neuronal distribution and functional characterization of the calcium channel alpha2delta-2 subunit. *Eur J Neurosci*. 12, 1217-1226.
- Hodgkin A L and Katz B.** (1949). The effect of sodium ions on the electrical activity of giant axon of the squid. *J Physiol*. 108, 37-77.
- Hoffmand B and Cranefield P.** 1960. Electrophysiology of the heart, pp. 201-202.
- Hohaus A, Person V, Behlke J, Schaper J, Morano I and Haase H.** (2002). The carboxyl-terminal region of ahnak provides a link between cardiac L-type Ca^{2+} channels and the actin-based cytoskeleton. *FASEB J*. 16, 1205-1216.

- Hong K, Brugada J, Oliva A, Berruezo-Sanchez A, Potenza D, Pollevick G D, Guerchicoff A, Matsuo K, Burashnikov E, Dumaine R, Towbin J A, Nesterenko V, Brugada P, Antzelevitch C and Brugada R.** (2004). Value of electrocardiographic parameters and ajmaline test in the diagnosis of Brugada syndrome caused by SCN5A mutations. *Circulation*. 110, 3023-3027.
- Horn R and Vandenberg C A.** (1984). Statistical properties of single sodium channels. *J Gen Physiol*. 84, 505-534.
- Hu D, Barajas-Martinez H, Burashnikov E, Springer M, Wu Y, Varro A, Pfeiffer R, Koopmann T T, Cordeiro J M, Guerchicoff A, Pollevick G D and Antzelevitch C.** (2009). A mutation in the beta 3 subunit of the cardiac sodium channel associated with Brugada ECG phenotype. *Circ Cardiovasc Genet*. 2, 270-278.
- Hudmon A, Schulman H, Kim J, Maltez J M, Tsien R W and Pitt G S.** (2005). CaMKII tethers to L-type Ca²⁺ channels, establishing a local and dedicated integrator of Ca²⁺ signals for facilitation. *J Cell Biol*. 171, 537-547.
- Hui K, Gardzinski P, Sun H S, Backx P H and Feng Z P.** (2005). Permeable ions differentially affect gating kinetics and unitary conductance of L-type calcium channels. *Biochem Biophys Res Commun*. 338, 783-792.
- Huikuri H V, Castellanos A and Myerburg R J.** (2001). Sudden death due to cardiac arrhythmias. *N Engl J Med*. 345, 1473-1482.
- Hullin R, Khan I F, Wirtz S, Mohacsi P, Varadi G, Schwartz A and Herzig S.** (2003). Cardiac L-type calcium channel beta-subunits expressed in human heart have differential effects on single channel characteristics. *J Biol Chem*. 278, 21623-21630.
- Hullin R, Matthes J, von Vietinghoff S, Bodi I, Rubio M, D'Souza K, Friedrich Khan I, Rottlander D, Hoppe U C, Mohacsi P, Schmitteckert E, Gilsbach R, Bunemann M, Hein L, Schwartz A and Herzig S.** (2007). Increased expression of the auxiliary beta(2)-subunit of ventricular L-type Ca(2)+ channels leads to single-channel activity characteristic of heart failure. *PLoS One*. 2, e292.
- Hullin R, Singer-Lahat D, Freichel M, Biel M, Dascal N, Hofmann F and Flockerzi V.** (1992). Calcium channel beta subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNA from heart, aorta and brain. *EMBO J*. 11, 885-890.
- Hulme J T, Lin T W, Westenbroek R E, Scheuer T and Catterall W A.** (2003). Beta-adrenergic regulation requires direct anchoring of PKA to cardiac CaV1.2 channels via a leucine zipper interaction with A kinase-anchoring protein 15. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100, 13093-13098.
- Hume J R, Duan D, Collier M L, Yamazaki J and Horowitz B.** (2000). Anion transport in heart. *Physiol Rev*. 80, 31-81.
- Imaizumi Y and Giles W R.** (1987). Quinidine-induced inhibition of transient outward current in cardiac muscle. *Am J Physiol*. 253, H704-708.
- Iost N, Virag L, Varro A and Papp J G.** (2003). Comparison of the effect of class IA antiarrhythmic drugs on transmembrane potassium currents in rabbit ventricular myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 8, 31-41.
- Itzhaki I, Maizels L, Huber I, Zwi-Dantsis L, Caspi O, Winterstern A, Feldman O, Gepstein A, Arbel G, Hammerman H, Boulos M and Gepstein L.** (2011). Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. *Nature*. 471, 225-229.
- Iyer V, Mazhari R and Winslow R L.** (2004). A computational model of the human left-ventricular epicardial myocyte. *Biophys J*. 87, 1507-1525.
- Jay S D, Ellis S B, McCue A F, Williams M E, Vedvick T S, Harpold M M and Campbell K P.** (1990). Primary structure of the gamma subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science*. 248, 490-492.
- Jeong E M, Liu M, Sturdy M, Gao G, Varghese S T, Sovari A A and Dudley S C, Jr.** (2012). Metabolic stress, reactive oxygen species, and arrhythmia. *J Mol Cell Cardiol*. 52, 454-463.
- Jespersen T, Gavillet B, van Bemmelen M X, Cordonier S, Thomas M A, Staub O and Abriel H.** (2006). Cardiac sodium channel Na(v)1.5 interacts with and is regulated by

- the protein tyrosine phosphatase PTPH1. *Biochem Biophys Res Commun.* 348, 1455-1462.
- Jones L P, Wei S K and Yue D T.** (1998). Mechanism of auxiliary subunit modulation of neuronal $\alpha 1E$ calcium channels. *J Gen Physiol.* 112, 125-143.
- Josephson I R and Varadi G.** (1996). The beta subunit increases Ca^{2+} currents and gating charge movements of human cardiac L-type Ca^{2+} channels. *Biophys J.* 70, 1285-1293.
- Kaab S and Schulze-Bahr E.** (2005). Susceptibility genes and modifiers for cardiac arrhythmias. *Cardiovasc Res.* 67, 397-413.
- Kallen R G, Sheng Z H, Yang J, Chen L Q, Rogart R B and Barchi R L.** (1990). Primary structure and expression of a sodium channel characteristic of denervated and immature rat skeletal muscle. *Neuron.* 4, 233-242.
- Kameda K, Fukao M, Kobayashi T, Tsutsuura M, Nagashima M, Yamada Y, Yamashita T and Tohse N.** (2006). CSN5/Jab1 inhibits cardiac L-type Ca^{2+} channel activity through protein-protein interactions. *J Mol Cell Cardiol.* 40, 562-569.
- Kang M G and Campbell K P.** (2003). Gamma subunit of voltage-activated calcium channels. *J Biol Chem.* 278, 21315-21318.
- Kapplinger J D, Tester D J, Alders M, Benito B, Berthet M, Brugada J, Brugada P, Fressart V, Guerchicoff A, Harris-Kerr C, Kamakura S, Kyndt F, Koopmann T T, Miyamoto Y, Pfeiffer R, Pollevick G D, Probst V, Zumhagen S, Vatta M, Towbin J A, Shimizu W, Schulze-Bahr E, Antzelevitch C, Salisbury B A, Guicheney P, Wilde A A, Brugada R, Schott J J and Ackerman M J.** (2010). An international compendium of mutations in the SCN5A-encoded cardiac sodium channel in patients referred for Brugada syndrome genetic testing. *Heart Rhythm.* 7, 33-46.
- Kapplinger J D, Tester D J, Salisbury B A, Carr J L, Harris-Kerr C, Pollevick G D, Wilde A A and Ackerman M J.** (2009). Spectrum and prevalence of mutations from the first 2,500 consecutive unrelated patients referred for the FAMILION long QT syndrome genetic test. *Heart Rhythm.* 6, 1297-1303.
- Kass R S and Sanguinetti M C.** (1984). Inactivation of calcium channel current in the calf cardiac Purkinje fiber. Evidence for voltage- and calcium-mediated mechanisms. *J Gen Physiol.* 84, 705-726.
- Kattygnarath D, Maugendre S, Neyroud N, Balse E, Ichai C, Denjoy I, Dilanian G, Martins R P, Fressart V, Berthet M, Schott J J, Leenhardt A, Probst V, Le Marec H, Hainque B, Coulombe A, Hatem S N and Guicheney P.** (2011). MOG1: a new susceptibility gene for Brugada syndrome. *Circ Cardiovasc Genet.* 4, 261-268.
- Kawai M, Hussain M and Orchard C H.** (1999). Excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes after formamide-induced detubulation. *Am J Physiol.* 277, H603-609.
- Kerfant B G, Vassort G and Gomez A M.** (2001). Microtubule disruption by colchicine reversibly enhances calcium signaling in intact rat cardiac myocytes. *Circ Res.* 88, E59-65.
- Kim J, Ghosh S, Liu H, Tateyama M, Kass R S and Pitt G S.** (2004). Calmodulin mediates Ca^{2+} sensitivity of sodium channels. *J Biol Chem.* 279, 45004-45012.
- Kleppisch T, Pedersen K, Strubing C, Bosse-Doenecke E, Flockerzi V, Hofmann F and Hescheler J.** (1994). Double-pulse facilitation of smooth muscle $\alpha 1$ -subunit Ca^{2+} channels expressed in CHO cells. *EMBO J.* 13, 2502-2507.
- Klockner U, Mikala G, Varadi M, Varadi G and Schwartz A.** (1995). Involvement of the carboxyl-terminal region of the $\alpha 1$ subunit in voltage-dependent inactivation of cardiac calcium channels. *J Biol Chem.* 270, 17306-17310.
- Klugbauer N, Lacinova L, Marais E, Hobom M and Hofmann F.** (1999). Molecular diversity of the calcium channel $\alpha 2\delta$ subunit. *J Neurosci.* 19, 684-691.
- Ko S H, Lenkowski P W, Lee H C, Mounsey J P and Patel M K.** (2005). Modulation of $Na(v)1.5$ by $\beta 1$ -- and $\beta 3$ -subunit co-expression in mammalian cells. *Pflugers Arch.* 449, 403-412.

- Koizumi A, Nozaki J, Ohura T, Kayo T, Wada Y, Nezu J, Ohashi R, Tamai I, Shoji Y, Takada G, Kibira S, Matsuishi T and Tsuji A.** (1999). Genetic epidemiology of the carnitine transporter OCTN2 gene in a Japanese population and phenotypic characterization in Japanese pedigrees with primary systemic carnitine deficiency. *Hum Mol Genet.* 8, 2247-2254.
- Kontis K J and Goldin A L.** (1997). Sodium channel inactivation is altered by substitution of voltage sensor positive charges. *J Gen Physiol.* 110, 403-413.
- Kruse M, Schulze-Bahr E, Corfield V, Beckmann A, Stallmeyer B, Kurtbay G, Ohmert I, Brink P and Pongs O.** (2009). Impaired endocytosis of the ion channel TRPM4 is associated with human progressive familial heart block type I. *J Clin Invest.* 119, 2737-2744.
- Kumar D and Jugdutt B I.** (2003). Apoptosis and oxidants in the heart. *J Lab Clin Med.* 142, 288-297.
- Kyndt F, Probst V, Potet F, Demolombe S, Chevallier J C, Baro I, Moisan J P, Boisseau P, Schott J J, Escande D and Le Marec H.** (2001). Novel SCN5A mutation leading either to isolated cardiac conduction defect or Brugada syndrome in a large French family. *Circulation.* 104, 3081-3086.
- Lacerda A E, Kim H S, Ruth P, Perez-Reyes E, Flockerzi V, Hofmann F, Birnbaumer L and Brown A M.** (1991). Normalization of current kinetics by interaction between the alpha 1 and beta subunits of the skeletal muscle dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ channel. *Nature.* 352, 527-530.
- Lee K S, Marban E and Tsien R W.** (1985). Inactivation of calcium channels in mammalian heart cells: joint dependence on membrane potential and intracellular calcium. *J Physiol.* 364, 395-411.
- Lee T S, Karl R, Moosmang S, Lenhardt P, Klugbauer N, Hofmann F, Kleppisch T and Welling A.** (2006). Calmodulin kinase II is involved in voltage-dependent facilitation of the L-type Cav1.2 calcium channel: Identification of the phosphorylation sites. *J Biol Chem.* 281, 25560-25567.
- Lei M, Goddard C, Liu J, Leoni A L, Royer A, Fung S S, Xiao G, Ma A, Zhang H, Charpentier F, Vandenberg J I, Colledge W H, Grace A A and Huang C L.** (2005). Sinus node dysfunction following targeted disruption of the murine cardiac sodium channel gene *Scn5a*. *J Physiol.* 567, 387-400.
- Lemaitre G, Walker B and Lambert S.** (2003). Identification of a conserved ankyrin-binding motif in the family of sodium channel alpha subunits. *J Biol Chem.* 278, 27333-27339.
- Lenegre J.** (1964). Etiology and Pathology of Bilateral Bundle Branch Block in Relation to Complete Heart Block. *Prog Cardiovasc Dis.* 6, 409-444.
- Lerche H, Klugbauer N, Lehmann-Horn F, Hofmann F and Melzer W.** (1996). Expression and functional characterization of the cardiac L-type calcium channel carrying a skeletal muscle DHP-receptor mutation causing hypokalaemic periodic paralysis. *Pflugers Arch.* 431, 461-463.
- Lev M.** (1964). Anatomic Basis for Atrioventricular Block. *Am J Med.* 37, 742-748.
- Li Q, Huang H, Liu G, Lam K, Rutberg J, Green M S, Birnie D H, Lemery R, Chahine M and Gollob M H.** (2009). Gain-of-function mutation of Nav1.5 in atrial fibrillation enhances cellular excitability and lowers the threshold for action potential firing. *Biochem Biophys Res Commun.* 380, 132-137.
- Liman E R, Hess P, Weaver F and Koren G.** (1991). Voltage-sensing residues in the S4 region of a mammalian K⁺ channel. *Nature.* 353, 752-756.
- Liu C J, Dib-Hajj S D, Renganathan M, Cummins T R and Waxman S G.** (2003). Modulation of the cardiac sodium channel Nav1.5 by fibroblast growth factor homologous factor 1B. *J Biol Chem.* 278, 1029-1036.
- Liu D W and Antzelevitch C.** (1995). Characteristics of the delayed rectifier current (IKr and IKs) in canine ventricular epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes. A weaker IKs contributes to the longer action potential of the M cell. *Circ Res.* 76, 351-365.

- Liu D W, Gintant G A and Antzelevitch C.** (1993). Ionic bases for electrophysiological distinctions among epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes from the free wall of the canine left ventricle. *Circ Res.* 72, 671-687.
- Liu H, El Zein L, Kruse M, Guinamard R, Beckmann A, Bozio A, Kurtbay G, Megarbane A, Ohmert I, Blaysat G, Villain E, Pongs O and Bouvagnet P.** (2010). Gain-of-function mutations in TRPM4 cause autosomal dominant isolated cardiac conduction disease. *Circ Cardiovasc Genet.* 3, 374-385.
- Liu Q Y and Rosenberg R L.** (1996). Activation and inhibition of reconstituted cardiac L-type calcium channels by palmitoyl-L-carnitine. *Biochem Biophys Res Commun.* 228, 252-258.
- Lloyd-Jones D, Adams R J, Brown T M, Carnethon M, Dai S, De Simone G, Ferguson T B, Ford E, Furie K, Gillespie C, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern S, Ho P M, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lackland D, Lisabeth L, Marelli A, McDermott M M, Meigs J, Mozaffarian D, Mussolino M, Nichol G, Roger V L, Rosamond W, Sacco R, Sorlie P, Stafford R, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Wong N D and Wylie-Rosett J.** (2010). Executive summary: heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 121, 948-954.
- London B, Michalec M, Mehdi H, Zhu X, Kerchner L, Sanyal S, Viswanathan P C, Pfahnl A E, Shang L L, Madhusudanan M, Baty C J, Lagana S, Aleong R, Gutmann R, Ackerman M J, McNamara D M, Weiss R and Dudley S C, Jr.** (2007). Mutation in glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like gene (GPD1-L) decreases cardiac Na⁺ current and causes inherited arrhythmias. *Circulation.* 116, 2260-2268.
- Lory P, Ophoff R A and Nahmias J.** (1997). Towards a unified nomenclature describing voltage-gated calcium channel genes. *Hum Genet.* 100, 149-150.
- Louch W E, Bito V, Heinzel F R, Macianskiene R, Vanhaecke J, Flameng W, Mubagwa K and Sipido K R.** (2004). Reduced synchrony of Ca²⁺ release with loss of T-tubules-a comparison to Ca²⁺ release in human failing cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 62, 63-73.
- Lowe J S, Palygin O, Bhasin N, Hund T J, Boyden P A, Shibata E, Anderson M E and Mohler P J.** (2008). Voltage-gated Nav channel targeting in the heart requires an ankyrin-G dependent cellular pathway. *J Cell Biol.* 180, 173-186.
- Ludwig A, Flockerzi V and Hofmann F.** (1997). Regional expression and cellular localization of the alpha1 and beta subunit of high voltage-activated calcium channels in rat brain. *J Neurosci.* 17, 1339-1349.
- Luo X, Zhang H, Xiao J and Wang Z.** (2010). Regulation of human cardiac ion channel genes by microRNAs: theoretical perspective and pathophysiological implications. *Cell Physiol Biochem.* 25, 571-586.
- Lyon A R, MacLeod K T, Zhang Y, Garcia E, Kanda G K, Lab M J, Korchev Y E, Harding S E and Gorelik J.** (2009). Loss of T-tubules and other changes to surface topography in ventricular myocytes from failing human and rat heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 6854-6859.
- Maier S K, Westenbroek R E, McCormick K A, Curtis R, Scheuer T and Catterall W A.** (2004). Distinct subcellular localization of different sodium channel alpha and beta subunits in single ventricular myocytes from mouse heart. *Circulation.* 109, 1421-1427.
- Maier S K, Westenbroek R E, Yamanushi T T, Dobrzynski H, Boyett M R, Catterall W A and Scheuer T.** (2003). An unexpected requirement for brain-type sodium channels for control of heart rate in the mouse sinoatrial node. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 3507-3512.
- Makiyama T, Akao M, Shizuta S, Doi T, Nishiyama K, Oka Y, Ohno S, Nishio Y, Tsuji K, Itoh H, Kimura T, Kita T and Horie M.** (2008). A novel SCN5A gain-of-function mutation M1875T associated with familial atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol.* 52, 1326-1334.

- Malhotra J D, Kazen-Gillespie K, Hortsch M and Isom L L.** (2000). Sodium channel beta subunits mediate homophilic cell adhesion and recruit ankyrin to points of cell-cell contact. *J Biol Chem.* 275, 11383-11388.
- Malhotra J D, Thyagarajan V, Chen C and Isom L L.** (2004). Tyrosine-phosphorylated and nonphosphorylated sodium channel beta1 subunits are differentially localized in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 279, 40748-40754.
- Maltsev V A, Kyle J W, Mishra S and Undrovinas A.** (2008). Molecular identity of the late sodium current in adult dog cardiomyocytes identified by Nav1.5 antisense inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 295, H667-676.
- Maltsev V A and Undrovinas A I.** (2006). A multi-modal composition of the late Na⁺ current in human ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 69, 116-127.
- Mangoni M E, Couette B, Bourinet E, Platzer J, Reimer D, Striessnig J and Nargeot J.** (2003). Functional role of L-type Cav1.3 Ca²⁺ channels in cardiac pacemaker activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 5543-5548.
- Mangoni M E and Nargeot J.** (2008). Genesis and regulation of the heart automaticity. *Physiol Rev.* 88, 919-982.
- Mantegazza M, Yu F H, Catterall W A and Scheuer T.** (2001). Role of the C-terminal domain in inactivation of brain and cardiac sodium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 15348-15353.
- Marais E, Klugbauer N and Hofmann F.** (2001). Calcium channel alpha(2)delta subunits-structure and Gabapentin binding. *Mol Pharmacol.* 59, 1243-1248.
- Marionneau C, Couette B, Liu J, Li H, Mangoni M E, Nargeot J, Lei M, Escande D and Demolombe S.** (2005). Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart. *J Physiol.* 562, 223-234.
- Marks M L, Trippel D L and Keating M T.** (1995b). Long QT syndrome associated with syndactyly identified in females. *Am J Cardiol.* 76, 744-745.
- Marks M L, Whisler S L, Clericuzio C and Keating M.** (1995a). A new form of long QT syndrome associated with syndactyly. *J Am Coll Cardiol.* 25, 59-64.
- Marquez M F, Salica G, Hermosillo A G, Pastelin G, Gomez-Flores J, Nava S and Cardenas M.** (2007). Ionic basis of pharmacological therapy in Brugada syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 18, 234-240.
- Martini B, Nava A, Thiene G, Buja G F, Canciani B, Scognamiglio R, Daliento L and Dalla Volta S.** (1989). Ventricular fibrillation without apparent heart disease: description of six cases. *Am Heart J.* 118, 1203-1209.
- Matza D and Flavell R A.** (2009). Roles of Ca(v) channels and AHNAK1 in T cells: the beauty and the beast. *Immunol Rev.* 231, 257-264.
- Mazzone A, Strege P R, Tester D J, Bernard C E, Faulkner G, De Giorgio R, Makielski J C, Stanghellini V, Gibbons S J, Ackerman M J and Farrugia G.** (2008). A mutation in telethonin alters Nav1.5 function. *J Biol Chem.* 283, 16537-16544.
- McDonald T F, Pelzer S, Trautwein W and Pelzer D J.** (1994). Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells. *Physiol Rev.* 74, 365-507.
- McEnery M W, Copeland T D and Vance C L.** (1998). Altered expression and assembly of N-type calcium channel alpha1B and beta subunits in epileptic lethargic (lh/lh) mouse. *J Biol Chem.* 273, 21435-21438.
- McEnery M W, Vance C L, Begg C M, Lee W L, Choi Y and Dubel S J.** (1998). Differential expression and association of calcium channel subunits in development and disease. *J Bioenerg Biomembr.* 30, 409-418.
- McMorn S O, Harrison S M, Zang W J and Boyett M R.** (1996). Comparison of ultra-slow, voltage-dependent inactivation of the cardiac L-type Ca²⁺ channel with Ca²⁺ or Ba²⁺ as the charge carrier in ferret ventricular myocytes. *Exp Physiol.* 81, 565-575.
- McNair W P, Sinagra G, Taylor M R, Di Lenarda A, Ferguson D A, Salcedo E E, Slavov D, Zhu X, Caldwell J H and Mestroni L.** (2011). SCN5A mutations associate with arrhythmic dilated cardiomyopathy and commonly localize to the voltage-sensing mechanism. *J Am Coll Cardiol.* 57, 2160-2168.

- Medeiros-Domingo A, Kaku T, Tester D J, Iturralde-Torres P, Itty A, Ye B, Valdivia C, Ueda K, Canizales-Quinteros S, Tusie-Luna M T, Makielski J C and Ackerman M J.** (2007). SCN4B-encoded sodium channel beta4 subunit in congenital long-QT syndrome. *Circulation*. 116, 134-142.
- Medeiros-Domingo A, Tan B H, Crotti L, Tester D J, Eckhardt L, Cuoretti A, Kroboth S L, Song C, Zhou Q, Kopp D, Schwartz P J, Makielski J C and Ackerman M J.** (2010). Gain-of-function mutation S422L in the KCNJ8-encoded cardiac K(ATP) channel Kir6.1 as a pathogenic substrate for J-wave syndromes. *Heart Rhythm*. 7, 1466-1471.
- Melegh B, Bene J, Mogyorosy G, Havasi V, Komlosi K, Pajor L, Olah E, Kispal G, Sumegi B and Mehes K.** (2004). Phenotypic manifestations of the OCTN2 V295X mutation: sudden infant death and carnitine-responsive cardiomyopathy in Roma families. *Am J Med Genet A*. 131, 121-126.
- Meregalli P G, Ruijter J M, Hofman N, Bezzina C R, Wilde A A and Tan H L.** (2006). Diagnostic value of flecainide testing in unmasking SCN5A-related Brugada syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 17, 857-864.
- Meregalli P G, Wilde A A and Tan H L.** (2005). Pathophysiological mechanisms of Brugada syndrome: depolarization disorder, repolarization disorder, or more? *Cardiovasc Res*. 67, 367-378.
- Messner D J and Catterall W A.** (1985). The sodium channel from rat brain. Separation and characterization of subunits. *J Biol Chem*. 260, 10597-10604.
- Meszaros J and Pappano A J.** (1990). Electrophysiological effects of L-palmitoylcarnitine in single ventricular myocytes. *Am J Physiol*. 258, H931-938.
- Meyers M B, Fischer A, Sun Y J, Lopes C M, Rohacs T, Nakamura T Y, Zhou Y Y, Lee P C, Altschuld R A, McCune S A, Coetzee W A and Fishman G I.** (2003). Sorcin regulates excitation-contraction coupling in the heart. *J Biol Chem*. 278, 28865-28871.
- Meyers M B, Puri T S, Chien A J, Gao T, Hsu P H, Hosey M M and Fishman G I.** (1998). Sorcin associates with the pore-forming subunit of voltage-dependent L-type Ca²⁺ channels. *J Biol Chem*. 273, 18930-18935.
- Mikami A, Imoto K, Tanabe T, Niidome T, Mori Y, Takeshima H, Narumiya S and Numa S.** (1989). Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature*. 340, 230-233.
- Mohler P J, Rivolta I, Napolitano C, LeMaillet G, Lambert S, Priori S G and Bennett V.** (2004). Nav1.5 E1053K mutation causing Brugada syndrome blocks binding to ankyrin-G and expression of Nav1.5 on the surface of cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101, 17533-17538.
- Mohler P J, Schott J J, Gramolini A O, Dilly K W, Guatimosim S, duBell W H, Song L S, Haurogne K, Kyndt F, Ali M E, Rogers T B, Lederer W J, Escande D, Le Marec H and Bennett V.** (2003). Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature*. 421, 634-639.
- Morales A, Painter T, Li R, Siegfried J D, Li D, Norton N and Hershberger R E.** (2010). Rare variant mutations in pregnancy-associated or peripartum cardiomyopathy. *Circulation*. 121, 2176-2182.
- Moreno J D and Clancy C E.** (2012). Pathophysiology of the cardiac late Na current and its potential as a drug target. *J Mol Cell Cardiol*. 52, 608-619.
- Morgan K, Stevens E B, Shah B, Cox P J, Dixon A K, Lee K, Pinnock R D, Hughes J, Richardson P J, Mizuguchi K and Jackson A P.** (2000). beta 3: an additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97, 2308-2313.
- Moriya M, Seto S, Yano K and Akahoshi M.** (2007). Two cases of short QT interval. *Pacing Clin Electrophysiol*. 30, 1522-1526.
- Motoike H K, Liu H, Glaaser I W, Yang A S, Tateyama M and Kass R S.** (2004). The Na⁺ channel inactivation gate is a molecular complex: a novel role of the COOH-terminal domain. *J Gen Physiol*. 123, 155-165.

- Murakami M, Yamamura H, Suzuki T, Kang M G, Ohya S, Murakami A, Miyoshi I, Sasano H, Muraki K, Hano T, Kasai N, Nakayama S, Campbell K P, Flockerzi V, Imaizumi Y, Yanagisawa T and Iijima T.** (2003). Modified cardiovascular L-type channels in mice lacking the voltage-dependent Ca²⁺ channel beta3 subunit. *J Biol Chem.* 278, 43261-43267.
- Myerburg R, Interian A, Simmons J and Castellanos A.** 2004. Sudden cardiac death. In *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside*, pp. 720-731.
- Nabauer M, Beuckelmann D J, Überfuhr P and Steinbeck G.** (1996). Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle. *Circulation.* 93, 168-177.
- Naccarelli G V and Antzelevitch C.** (2001). The Brugada syndrome: clinical, genetic, cellular, and molecular abnormalities. *Am J Med.* 110, 573-581.
- Nair K, Pekhletski R, Harris L, Care M, Morel C, Farid T, Backx P H, Szabo E and Nanthakumar K.** (2012). Escape capture bigeminy: Phenotypic marker of cardiac sodium channel voltage sensor mutation R222Q. *Heart Rhythm.*
- Nakayama H, Wilkin B J, Bodi I and Molkentin J D.** (2006). Calcineurin-dependent cardiomyopathy is activated by TRPC in the adult mouse heart. *FASEB J.* 20, 1660-1670.
- Napolitano C and Priori S G.** (2002). Genetics of ventricular tachycardia. *Curr Opin Cardiol.* 17, 222-228.
- Neely A, Wei X, Olcese R, Birnbaumer L and Stefani E.** (1993). Potentiation by the beta subunit of the ratio of the ionic current to the charge movement in the cardiac calcium channel. *Science.* 262, 575-578.
- Nerbonne J M and Kass R S.** (2005). Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev.* 85, 1205-1253.
- Nezu J, Tamai I, Oku A, Ohashi R, Yabuuchi H, Hashimoto N, Nikaido H, Sai Y, Koizumi A, Shoji Y, Takada G, Matsuishi T, Yoshino M, Kato H, Ohura T, Tsujimoto G, Hayakawa J, Shimane M and Tsuji A.** (1999). Primary systemic carnitine deficiency is caused by mutations in a gene encoding sodium ion-dependent carnitine transporter. *Nat Genet.* 21, 91-94.
- Nierenberg D W and Ransil B J.** (1979). Q-aTc interval as a clinical indicator of hypercalcemia. *Am J Cardiol.* 44, 243-248.
- Noble S and Shimoni Y.** (1981). Voltage-dependent potentiation of the slow inward current in frog atrium. *J Physiol.* 310, 77-95.
- Nuss H B, Chiamvimonvat N, Perez-Garcia M T, Tomaselli G F and Marban E.** (1995). Functional association of the beta 1 subunit with human cardiac (hH1) and rat skeletal muscle (mu 1) sodium channel alpha subunits expressed in *Xenopus* oocytes. *J Gen Physiol.* 106, 1171-1191.
- Ohgo T, Okamura H, Noda T, Satomi K, Suyama K, Kurita T, Aihara N, Kamakura S, Ohe T and Shimizu W.** (2007). Acute and chronic management in patients with Brugada syndrome associated with electrical storm of ventricular fibrillation. *Heart Rhythm.* 4, 695-700.
- Ohno S, Zankov D P, Ding W G, Itoh H, Makiyama T, Doi T, Shizuta S, Hattori T, Miyamoto A, Naiki N, Hancox J C, Matsuura H and Horie M.** (2011). KCNE5 (KCNE1L) variants are novel modulators of Brugada syndrome and idiopathic ventricular fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 4, 352-361.
- Olesen M S, Jespersen T, Nielsen J B, Liang B, Møller D V, Hedley P, Christiansen M, Varro A, Olesen S P, Haunso S, Schmitt N and Svendsen J H.** (2011). Mutations in sodium channel beta-subunit SCN3B are associated with early-onset lone atrial fibrillation. *Cardiovasc Res.* 89, 786-793.
- Orkand R K and Niedergierke R.** (1964). Heart Action Potential: Dependence on External Calcium and Sodium Ions. *Science.* 146, 1176-1177.
- Osher H L and Wolff L.** (1953). Electrocardiographic pattern simulating acute myocardial injury. *Am J Med Sci.* 226, 541-545.

- Ou Y, Strege P, Miller S M, Makielski J, Ackerman M, Gibbons S J and Farrugia G.** (2003). Syntrophin gamma 2 regulates SCN5A gating by a PDZ domain-mediated interaction. *J Biol Chem.* 278, 1915-1923.
- Ouadid H, Seguin J, Dumuis A, Bockaert J and Nargeot J.** (1992). Serotonin increases calcium current in human atrial myocytes via the newly described 5-hydroxytryptamine₄ receptors. *Mol Pharmacol.* 41, 346-351.
- Pagani R, Song M, McEnery M, Qin N, Tsien R W, Toro L, Stefani E and Uchitel O D.** (2004). Differential expression of alpha 1 and beta subunits of voltage dependent Ca²⁺ channel at the neuromuscular junction of normal and P/Q Ca²⁺ channel knockout mouse. *Neuroscience.* 123, 75-85.
- Papazian D M, Timpe L C, Jan Y N and Jan L Y.** (1991). Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature.* 349, 305-310.
- Parent L and Gopalakrishnan M.** (1995). Glutamate substitution in repeat IV alters divalent and monovalent cation permeation in the heart Ca²⁺ channel. *Biophys J.* 69, 1801-1813.
- Parent L, Schneider T, Moore C P and Talwar D.** (1997). Subunit regulation of the human brain alpha 1E calcium channel. *J Membr Biol.* 160, 127-140.
- Parish RG T M, Ing R, Encarnacion C, Eberhardt M.** (1987). Sudden unexplained death syndrome in southeast Asian refugees: a review of CDC surveillance. *MMWR.* 36, 43SS-53SS.
- Payandeh J, Scheuer T, Zheng N and Catterall W A.** (2011). The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature.* 475, 353-358.
- Pereon Y, Demolombe S, Baro I, Drouin E, Charpentier F and Escande D.** (2000). Differential expression of KvLQT1 isoforms across the human ventricular wall. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 278, H1908-1915.
- Perez-Reyes E, Castellano A, Kim H S, Bertrand P, Baggstrom E, Lacerda A E, Wei X Y and Birnbaumer L.** (1992). Cloning and expression of a cardiac/brain beta subunit of the L-type calcium channel. *J Biol Chem.* 267, 1792-1797.
- Perez Riera A R, Ferreira C, Filho C F, Ferreira M, Meneghini A, Uchida A H, Schapachnik E, Dubner S and Zhang L.** (2008). The enigmatic sixth wave of the electrocardiogram: the U wave. *Cardiol J.* 15, 408-421.
- Perrier E, Kerfant B G, Lalevee N, Bideaux P, Rossier M F, Richard S, Gomez A M and Benitah J P.** (2004). Mineralocorticoid receptor antagonism prevents the electrical remodeling that precedes cellular hypertrophy after myocardial infarction. *Circulation.* 110, 776-783.
- Peterson B Z, DeMaria C D, Adelman J P and Yue D T.** (1999). Calmodulin is the Ca²⁺ sensor for Ca²⁺-dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron.* 22, 549-558.
- Petitprez S, Zmoos A F, Ogrodnik J, Balse E, Raad N, El-Haou S, Albesa M, Bittihn P, Luther S, Lehnart S E, Hatem S N, Coulombe A and Abriel H.** (2011). SAP97 and dystrophin macromolecular complexes determine two pools of cardiac sodium channels Nav1.5 in cardiomyocytes. *Circ Res.* 108, 294-304.
- Piacentino V, 3rd, Weber C R, Chen X, Weisser-Thomas J, Margulies K B, Bers D M and Houser S R.** (2003). Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes. *Circ Res.* 92, 651-658.
- Pichler M, Cassidy T N, Reimer D, Haase H, Kraus R, Ostler D and Striessnig J.** (1997). Beta subunit heterogeneity in neuronal L-type Ca²⁺ channels. *J Biol Chem.* 272, 13877-13882.
- Pietrobon D and Hess P.** (1990). Novel mechanism of voltage-dependent gating in L-type calcium channels. *Nature.* 346, 651-655.
- Pitt G S, Zuhlke R D, Hudmon A, Schulman H, Reuter H and Tsien R W.** (2001). Molecular basis of calmodulin tethering and Ca²⁺-dependent inactivation of L-type Ca²⁺ channels. *J Biol Chem.* 276, 30794-30802.

- Platzer J, Engel J, Schrott-Fischer A, Stephan K, Bova S, Chen H, Zheng H and Striessnig J.** (2000). Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca^{2+} channels. *Cell*. 102, 89-97.
- Pons R, Carrozzo R, Tein I, Walker W F, Addonizio L J, Rhead W, Miranda A F, Dimauro S and De Vivo D C.** (1997). Deficient muscle carnitine transport in primary carnitine deficiency. *Pediatr Res*. 42, 583-587.
- Powers P A, Liu S, Hogan K and Gregg R G.** (1992). Skeletal muscle and brain isoforms of a beta-subunit of human voltage-dependent calcium channels are encoded by a single gene. *J Biol Chem*. 267, 22967-22972.
- Pragnell M, De Waard M, Mori Y, Tanabe T, Snutch T P and Campbell K P.** (1994). Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the alpha 1-subunit. *Nature*. 368, 67-70.
- Priori S G, Napolitano C, Gasparini M, Pappone C, Della Bella P, Giordano U, Bloise R, Giustetto C, De Nardis R, Grillo M, Ronchetti E, Faggiano G and Nastoli J.** (2002). Natural history of Brugada syndrome: insights for risk stratification and management. *Circulation*. 105, 1342-1347.
- Priori S G, Napolitano C, Schwartz P J, Bloise R, Crotti L and Ronchetti E.** (2000). The elusive link between LQT3 and Brugada syndrome: the role of flecainide challenge. *Circulation*. 102, 945-947.
- Priori S G, Pandit S V, Rivolta I, Berenfeld O, Ronchetti E, Dhamoon A, Napolitano C, Anumonwo J, di Barletta M R, Gudapakkam S, Bosi G, Stramba-Badiale M and Jalife J.** (2005). A novel form of short QT syndrome (SQT3) is caused by a mutation in the KCNJ2 gene. *Circ Res*. 96, 800-807.
- Probst V, Kyndt F, Potet F, Trochu J N, Mialet G, Demolombe S, Schott J J, Baro I, Escande D and Le Marec H.** (2003). Haploinsufficiency in combination with aging causes SCN5A-linked hereditary Lenegre disease. *J Am Coll Cardiol*. 41, 643-652.
- Probst V, Wilde A A, Barc J, Sacher F, Babuty D, Mabo P, Mansourati J, Le Scouarnec S, Kyndt F, Le Caignec C, Guicheney P, Gouas L, Albuisson J, Meregalli P G, Le Marec H, Tan H L and Schott J J.** (2009). SCN5A mutations and the role of genetic background in the pathophysiology of Brugada syndrome. *Circ Cardiovasc Genet*. 2, 552-557.
- Puglisi J L, Yuan W, Bassani J W and Bers D M.** (1999). Ca^{2+} influx through Ca^{2+} channels in rabbit ventricular myocytes during action potential clamp: influence of temperature. *Circ Res*. 85, e7-e16.
- Purcell S M, Wray N R, Stone J L, Visscher P M, O'Donovan M C, Sullivan P F and Sklar P.** (2009). Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder. *Nature*. 460, 748-752.
- Qin N, Olcese R, Bransby M, Lin T and Birnbaumer L.** (1999). Ca^{2+} -induced inhibition of the cardiac Ca^{2+} channel depends on calmodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96, 2435-2438.
- Qin N, Olcese R, Stefani E and Birnbaumer L.** (1998). Modulation of human neuronal alpha 1E-type calcium channel by alpha 2 delta-subunit. *Am J Physiol*. 274, C1324-1331.
- Qin N, Yagel S, Momplaisir M L, Codd E E and D'Andrea M R.** (2002). Molecular cloning and characterization of the human voltage-gated calcium channel alpha(2)delta-4 subunit. *Mol Pharmacol*. 62, 485-496.
- Qu Y, Baroudi G, Yue Y and Boutjdir M.** (2005). Novel molecular mechanism involving alpha1D (Cav1.3) L-type calcium channel in autoimmune-associated sinus bradycardia. *Circulation*. 111, 3034-3041.
- Qu Y, Isom L L, Westenbroek R E, Rogers J C, Tanada T N, McCormick K A, Scheuer T and Catterall W A.** (1995). Modulation of cardiac Na^{+} channel expression in *Xenopus* oocytes by beta 1 subunits. *J Biol Chem*. 270, 25696-25701.
- Rahbeeni Z, Vaz F M, Al-Hussein K, Bucknall M P, Ruiter J, Wanders R J and Rashed M S.** (2002). Identification of two novel mutations in OCTN2 from two Saudi patients with systemic carnitine deficiency. *J Inherit Metab Dis*. 25, 363-369.

- Ravindran A, Lao Q Z, Harry J B, Abrahimi P, Kobrinsky E and Soldatov N M.** (2008). Calmodulin-dependent gating of Ca(v)1.2 calcium channels in the absence of Ca(v)beta subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 8154-8159.
- Reichenbach H, Meister E M and Theile H.** (1992). [The heart-hand syndrome. A new variant of disorders of heart conduction and syndactylia including osseous changes in hands and feet]. *Kinderarztl Prax.* 60, 54-56.
- Remme C A, Verkerk A O, Nuyens D, van Ginneken A C, van Brunschot S, Belterman C N, Wilders R, van Roon M A, Tan H L, Wilde A A, Carmeliet P, de Bakker J M, Veldkamp M W and Bezzina C R.** (2006). Overlap syndrome of cardiac sodium channel disease in mice carrying the equivalent mutation of human SCN5A-1795insD. *Circulation.* 114, 2584-2594.
- Richard S, Leclercq F, Lemaire S, Piot C and Nargeot J.** (1998). Ca²⁺ currents in compensated hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res.* 37, 300-311.
- Richard S, Perrier E, Fauconnier J, Perrier R, Pereira L, Gomez A M and Benitah J P.** (2006). 'Ca(2+)-induced Ca(2+) entry' or how the L-type Ca(2+) channel remodels its own signalling pathway in cardiac cells. *Prog Biophys Mol Biol.* 90, 118-135.
- Ringer S.** (1883). A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart. *J Physiol.* 4, 29-42 23.
- Roden D M, Bennett P B, Snyders D J, Balser J R and Hondeghem L M.** (1988). Quinidine delays IK activation in guinea pig ventricular myocytes. *Circ Res.* 62, 1055-1058.
- Rottbauer W, Baker K, Wo Z G, Mohideen M A, Cantiello H F and Fishman M C.** (2001). Growth and function of the embryonic heart depend upon the cardiac-specific L-type calcium channel alpha1 subunit. *Dev Cell.* 1, 265-275.
- Rougier J S, van Bemmelen M X, Bruce M C, Jespersen T, Gavillet B, Apotheloz F, Cordonier S, Staub O, Rotin D and Abriel H.** (2005). Molecular determinants of voltage-gated sodium channel regulation by the Nedd4/Nedd4-like proteins. *Am J Physiol Cell Physiol.* 288, C692-701.
- Rozec B and Gauthier C.** (2006). beta3-adrenoceptors in the cardiovascular system: putative roles in human pathologies. *Pharmacol Ther.* 111, 652-673.
- Rueckschloss U and Isenberg G.** (2001). Cytochalasin D reduces Ca²⁺ currents via cofilin-activated depolymerization of F-actin in guinea-pig cardiomyocytes. *J Physiol.* 537, 363-370.
- Ruehr M L, Russell M A and Bond M.** (2004). A-kinase anchoring protein targeting of protein kinase A in the heart. *J Mol Cell Cardiol.* 37, 653-665.
- Ruth P, Rohrkasten A, Biel M, Bosse E, Regulla S, Meyer H E, Flockerzi V and Hofmann F.** (1989). Primary structure of the beta subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science.* 245, 1115-1118.
- Salata J J and Wasserstrom J A.** (1988). Effects of quinidine on action potentials and ionic currents in isolated canine ventricular myocytes. *Circ Res.* 62, 324-337.
- Sato P Y, Musa H, Coombs W, Guerrero-Serna G, Patino G A, Taffet S M, Isom L L and Delmar M.** (2009). Loss of plakophilin-2 expression leads to decreased sodium current and slower conduction velocity in cultured cardiac myocytes. *Circ Res.* 105, 523-526.
- Schlick B, Flucher B E and Obermair G J.** (2010). Voltage-activated calcium channel expression profiles in mouse brain and cultured hippocampal neurons. *Neuroscience.* 167, 786-798.
- Schott J J, Alshinawi C, Kyndt F, Probst V, Hoorntje T M, Hulsbeek M, Wilde A A, Escande D, Mannens M M and Le Marec H.** (1999). Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A. *Nat Genet.* 23, 20-21.
- Schott J J, Charpentier F, Peltier S, Foley P, Drouin E, Bouhour J B, Donnelly P, Vergnaud G, Bachner L, Moisan J P and et al.** (1995). Mapping of a gene for long QT syndrome to chromosome 4q25-27. *Am J Hum Genet.* 57, 1114-1122.

- Schram G, Pourrier M, Melnyk P and Nattel S.** (2002). Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. *Circ Res.* 90, 939-950.
- Schultz D, Mikala G, Yatani A, Engle D B, Iles D E, Segers B, Sinke R J, Weghuis D O, Klockner U, Wakamori M and et al.** (1993). Cloning, chromosomal localization, and functional expression of the alpha 1 subunit of the L-type voltage-dependent calcium channel from normal human heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90, 6228-6232.
- Schulze-Bahr E, Eckardt L, Breithardt G, Seidl K, Wichter T, Wolpert C, Borggreffe M and Haverkamp W.** (2003). Sodium channel gene (SCN5A) mutations in 44 index patients with Brugada syndrome: different incidences in familial and sporadic disease. *Hum Mutat.* 21, 651-652.
- Scott V E, De Waard M, Liu H, Gurnett C A, Venzke D P, Lennon V A and Campbell K P.** (1996). Beta subunit heterogeneity in N-type Ca²⁺ channels. *J Biol Chem.* 271, 3207-3212.
- Scriven D R, Dan P and Moore E D.** (2000). Distribution of proteins implicated in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Biophys J.* 79, 2682-2691.
- Seisenberger C, Specht V, Welling A, Platzer J, Pfeifer A, Kuhbandner S, Striessnig J, Klugbauer N, Feil R and Hofmann F.** (2000). Functional embryonic cardiomyocytes after disruption of the L-type alpha1C (Cav1.2) calcium channel gene in the mouse. *J Biol Chem.* 275, 39193-39199.
- Sham J S, Cleemann L and Morad M.** (1995). Functional coupling of Ca²⁺ channels and ryanodine receptors in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92, 121-125.
- Shao Y, Czymmek K J, Jones P A, Fomin V P, Akanbi K, Duncan R L and Farach-Carson M C.** (2009). Dynamic interactions between L-type voltage-sensitive calcium channel Cav1.2 subunits and ahnak in osteoblastic cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 296, C1067-1078.
- Shaywitz A J and Greenberg M E.** (1999). CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem.* 68, 821-861.
- Shimizu W.** (2005). Acquired forms of the Brugada syndrome. *J Electrocardiol.* 38, 22-25.
- Shimizu W, Antzelevitch C, Suyama K, Kurita T, Taguchi A, Aihara N, Takaki H, Sunagawa K and Kamakura S.** (2000). Effect of sodium channel blockers on ST segment, QRS duration, and corrected QT interval in patients with Brugada syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 11, 1320-1329.
- Shirokov R, Ferreira G, Yi J and Rios E.** (1998). Inactivation of gating currents of L-type calcium channels. Specific role of the alpha 2 delta subunit. *J Gen Physiol.* 111, 807-823.
- Shistik E, Ivanina T, Puri T, Hosey M and Dascal N.** (1995). Ca²⁺ current enhancement by alpha 2/delta and beta subunits in *Xenopus* oocytes: contribution of changes in channel gating and alpha 1 protein level. *J Physiol.* 489 (Pt 1), 55-62.
- Singal P K, Khaper N, Palace V and Kumar D.** (1998). The role of oxidative stress in the genesis of heart disease. *Cardiovasc Res.* 40, 426-432.
- Singer D, Biel M, Lotan I, Flockerzi V, Hofmann F and Dascal N.** (1991). The roles of the subunits in the function of the calcium channel. *Science.* 253, 1553-1557.
- Sinner M F, Porthan K, Noseworthy P A, Havulinna A S, Tikkanen J T, Muller-Nurasyid M, Peloso G, Ulivi S, Beckmann B M, Brockhaus A C, Cooper R R, Gasparini P, Hengstenberg C, Hwang S J, Iorio A, Junttila M J, Klopp N, Kahonen M, Laaksonen M A, Lehtimäki T, Lichtner P, Lyytikäinen L P, Martens E, Meisinger C, Meitinger T, Merchant F M, Nieminen M S, Peters A, Pietila A, Perz S, Oikarinen L, Raitakari O, Reinhard W, Silander K, Thorand B, Wichmann H E, Sinagra G, Viikari J, O'Donnell C J, Ellinor P T, Huikuri H V, Kaab S, Newton-Cheh C and Salomaa V.** (2012). A meta-analysis of genome-wide association studies of the electrocardiographic early repolarization pattern. *Heart Rhythm.*
- Sipido K R, Callewaert G and Carmeliet E.** (1995). Inhibition and rapid recovery of Ca²⁺ current during Ca²⁺ release from sarcoplasmic reticulum in guinea pig ventricular myocytes. *Circ Res.* 76, 102-109.

- Sklar P, Smoller J W, Fan J, Ferreira M A, Perlis R H, Chambert K, Nimgaonkar V L, McQueen M B, Faraone S V, Kirby A, de Bakker P I, Ogdie M N, Thase M E, Sachs G S, Todd-Brown K, Gabriel S B, Sougnez C, Gates C, Blumenstiel B, Defelice M, Ardlie K G, Franklin J, Muir W J, McGhee K A, MacIntyre D J, McLean A, VanBeck M, McQuillin A, Bass N J, Robinson M, Lawrence J, Anjorin A, Curtis D, Scolnick E M, Daly M J, Blackwood D H, Gurling H M and Purcell S M.** (2008). Whole-genome association study of bipolar disorder. *Mol Psychiatry*. 13, 558-569.
- Sokolow M.** (1956). Some quantitative aspects of treatment with quinidine. *Ann Intern Med*. 45, 582-588.
- Soldatov N M.** (1994). Genomic structure of human L-type Ca²⁺ channel. *Genomics*. 22, 77-87.
- Soldatov N M, Oz M, O'Brien K A, Abernethy D R and Morad M.** (1998). Molecular determinants of L-type Ca²⁺ channel inactivation. Segment exchange analysis of the carboxyl-terminal cytoplasmic motif encoded by exons 40-42 of the human α 1C subunit gene. *J Biol Chem*. 273, 957-963.
- Splawski I, Timothy K W, Decher N, Kumar P, Sachse F B, Beggs A H, Sanguinetti M C and Keating M T.** (2005). Severe arrhythmia disorder caused by cardiac L-type calcium channel mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102, 8089-8096; discussion 8086-8088.
- Splawski I, Timothy K W, Sharpe L M, Decher N, Kumar P, Bloise R, Napolitano C, Schwartz P J, Joseph R M, Condouris K, Tager-Flusberg H, Priori S G, Sanguinetti M C and Keating M T.** (2004). Ca(V)_{1.2} calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell*. 119, 19-31.
- Srinivasan J, Schachner M and Catterall W A.** (1998). Interaction of voltage-gated sodium channels with the extracellular matrix molecules tenascin-C and tenascin-R. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95, 15753-15757.
- Stanley C A, DeLeeuw S, Coates P M, Vianey-Liaud C, Divry P, Bonnefont J P, Saudubray J M, Haymond M, Trefz F K, Breningstall G N and et al.** (1991). Chronic cardiomyopathy and weakness or acute coma in children with a defect in carnitine uptake. *Ann Neurol*. 30, 709-716.
- Stokes L, Gordon J and Grafton G.** (2004). Non-voltage-gated L-type Ca²⁺ channels in human T cells: pharmacology and molecular characterization of the major α pore-forming and auxiliary β -subunits. *J Biol Chem*. 279, 19566-19573.
- Stotz S C, Hamid J, Spaetgens R L, Jarvis S E and Zamponi G W.** (2000). Fast inactivation of voltage-dependent calcium channels. A hinged-lid mechanism? *J Biol Chem*. 275, 24575-24582.
- Stotz S C and Zamponi G W.** (2001). Structural determinants of fast inactivation of high voltage-activated Ca(2+) channels. *Trends Neurosci*. 24, 176-181.
- Stuhmer W, Conti F, Suzuki H, Wang X D, Noda M, Yahagi N, Kubo H and Numa S.** (1989). Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature*. 339, 597-603.
- Surawicz B.** (1998). U wave: facts, hypotheses, misconceptions, and misnomers. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 9, 1117-1128.
- Szentadrassy N, Banyasz T, Biro T, Szabo G, Toth B I, Magyar J, Lazar J, Varro A, Kovacs L and Nanasi P P.** (2005). Apico-basal inhomogeneity in distribution of ion channels in canine and human ventricular myocardium. *Cardiovasc Res*. 65, 851-860.
- Takamatsu H, Nagao T, Ichijo H and Adachi-Akahane S.** (2003). L-type Ca²⁺ channels serve as a sensor of the SR Ca²⁺ for tuning the efficacy of Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in rat ventricular myocytes. *J Physiol*. 552, 415-424.
- Tamai I, Ohashi R, Nezu J, Yabuuchi H, Oku A, Shimane M, Sai Y and Tsuji A.** (1998). Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2. *J Biol Chem*. 273, 20378-20382.

- Tan H L, Bink-Boelkens M T, Bezzina C R, Viswanathan P C, Beaufort-Krol G C, van Tintelen P J, van den Berg M P, Wilde A A and Balser J R.** (2001). A sodium-channel mutation causes isolated cardiac conduction disease. *Nature*. 409, 1043-1047.
- Tan H L, Kupersmidt S, Zhang R, Stepanovic S, Roden D M, Wilde A A, Anderson M E and Balser J R.** (2002). A calcium sensor in the sodium channel modulates cardiac excitability. *Nature*. 415, 442-447.
- Tanabe T, Takeshima H, Mikami A, Flockerzi V, Takahashi H, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Hirose T and Numa S.** (1987). Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature*. 328, 313-318.
- Tanaka O, Sakagami H and Kondo H.** (1995). Localization of mRNAs of voltage-dependent Ca(2+)-channels: four subtypes of alpha 1- and beta-subunits in developing and mature rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*. 30, 1-16.
- Tang S, Mikala G, Bahinski A, Yatani A, Varadi G and Schwartz A.** (1993). Molecular localization of ion selectivity sites within the pore of a human L-type cardiac calcium channel. *J Biol Chem*. 268, 13026-13029.
- Tang Z, Scherer P E, Okamoto T, Song K, Chu C, Kohtz D S, Nishimoto I, Lodish H F and Lisanti M P.** (1996). Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem*. 271, 2255-2261.
- Taviaux S, Williams M E, Harpold M M, Nargeot J and Lory P.** (1997). Assignment of human genes for beta 2 and beta 4 subunits of voltage-dependent Ca²⁺ channels to chromosomes 10p12 and 2q22-q23. *Hum Genet*. 100, 151-154.
- Tein I.** (2003). Carnitine transport: pathophysiology and metabolism of known molecular defects. *J Inher Metab Dis*. 26, 147-169.
- Tein I, De Vivo D C, Bierman F, Pulver P, De Meirleir L J, Cvitanovic-Sojat L, Pagon R A, Bertini E, Dionisi-Vici C, Servidei S and et al.** (1990). Impaired skin fibroblast carnitine uptake in primary systemic carnitine deficiency manifested by childhood carnitine-responsive cardiomyopathy. *Pediatr Res*. 28, 247-255.
- Templin C, Ghadri J R, Rougier J S, Baumer A, Kaplan V, Albessa M, Sticht H, Rauch A, Puleo C, Hu D, Barajas-Martinez H, Antzelevitch C, Luscher T F, Abriel H and Duru F.** (2011). Identification of a novel loss-of-function calcium channel gene mutation in short QT syndrome (SQTS6). *Eur Heart J*. 32, 1077-1088.
- Thomsen M B, Wang C, Ozgen N, Wang H G, Rosen M R and Pitt G S.** (2009b). Accessory subunit KChIP2 modulates the cardiac L-type calcium current. *Circ Res*. 104, 1382-1389.
- Tsien R W, Bean B P, Hess P, Lansman J B, Nilius B and Nowycky M C.** (1986). Mechanisms of calcium channel modulation by beta-adrenergic agents and dihydropyridine calcium agonists. *J Mol Cell Cardiol*. 18, 691-710.
- Tsien R W, Hess P, McCleskey E W and Rosenberg R L.** (1987). Calcium channels: mechanisms of selectivity, permeation, and block. *Annu Rev Biophys Biophys Chem*. 16, 265-290.
- Ueda K, Nakamura K, Hayashi T, Inagaki N, Takahashi M, Arimura T, Morita H, Higashiuesato Y, Hirano Y, Yasunami M, Takishita S, Yamashina A, Ohe T, Sunamori M, Hiraoka M and Kimura A.** (2004). Functional characterization of a trafficking-defective HCN4 mutation, D553N, associated with cardiac arrhythmia. *J Biol Chem*. 279, 27194-27198.
- Ueda K, Valdivia C, Medeiros-Domingo A, Tester D J, Vatta M, Farrugia G, Ackerman M J and Makielski J C.** (2008). Syntrophin mutation associated with long QT syndrome through activation of the nNOS-SCN5A macromolecular complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105, 9355-9360.
- Valdivia C R, Medeiros-Domingo A, Ye B, Shen W K, Algiers T J, Ackerman M J and Makielski J C.** (2010). Loss-of-function mutation of the SCN3B-encoded sodium channel {beta}3 subunit associated with a case of idiopathic ventricular fibrillation. *Cardiovasc Res*. 86, 392-400.

- Valdivia C R, Ueda K, Ackerman M J and Makielski J C.** (2009). GPD1L links redox state to cardiac excitability by PKC-dependent phosphorylation of the sodium channel SCN5A. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 297, H1446-1452.
- van Bemmelen M X, Rougier J S, Gavillet B, Apotheloz F, Daidie D, Tateyama M, Rivolta I, Thomas M A, Kass R S, Staub O and Abriel H.** (2004). Cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5 is regulated by Nedd4-2 mediated ubiquitination. *Circ Res.* 95, 284-291.
- van der Heyden M A, Wijnhoven T J and Opthof T.** (2005). Molecular aspects of adrenergic modulation of cardiac L-type Ca²⁺ channels. *Cardiovasc Res.* 65, 28-39.
- Van Norstrand D W, Valdivia C R, Tester D J, Ueda K, London B, Makielski J C and Ackerman M J.** (2007). Molecular and functional characterization of novel glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like gene (GPD1-L) mutations in sudden infant death syndrome. *Circulation.* 116, 2253-2259.
- Vance C L, Begg C M, Lee W L, Haase H, Copeland T D and McEnery M W.** (1998). Differential expression and association of calcium channel alpha1B and beta subunits during rat brain ontogeny. *J Biol Chem.* 273, 14495-14502.
- Vanscoy L L, Blackman S M, Collaco J M, Bowers A, Lai T, Naughton K, Algire M, McWilliams R, Beck S, Hoover-Fong J, Hamosh A, Cutler D and Cutting G R.** (2007). Heritability of lung disease severity in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 175, 1036-1043.
- Varadi G, Lory P, Schultz D, Varadi M and Schwartz A.** (1991). Acceleration of activation and inactivation by the beta subunit of the skeletal muscle calcium channel. *Nature.* 352, 159-162.
- Vassilev P M, Scheuer T and Catterall W A.** (1988). Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. *Science.* 241, 1658-1661.
- Vatta M, Ackerman M J, Ye B, Makielski J C, Ughanze E E, Taylor E W, Tester D J, Balijepalli R C, Foell J D, Li Z, Kamp T J and Towbin J A.** (2006). Mutant caveolin-3 induces persistent late sodium current and is associated with long-QT syndrome. *Circulation.* 114, 2104-2112.
- Veldkamp M W, Viswanathan P C, Bezzina C, Baartscheer A, Wilde A A and Balser J R.** (2000). Two distinct congenital arrhythmias evoked by a multidysfunctional Na⁽⁺⁾ channel. *Circ Res.* 86, E91-97.
- Vendel A C, Terry M D, Striegel A R, Iverson N M, Leuranguer V, Rithner C D, Lyons B A, Pickard G E, Tobet S A and Horne W A.** (2006). Alternative splicing of the voltage-gated Ca²⁺ channel beta4 subunit creates a uniquely folded N-terminal protein binding domain with cell-specific expression in the cerebellar cortex. *J Neurosci.* 26, 2635-2644.
- Verkerk A O, Wilders R, Schulze-Bahr E, Beekman L, Bhuiyan Z A, Bertrand J, Eckardt L, Lin D, Borggreffe M, Breithardt G, Mannens M M, Tan H L, Wilde A A and Bezzina C R.** (2005). Role of sequence variations in the human ether-a-go-go-related gene (HERG, KCNH2) in the Brugada syndrome. *Cardiovasc Res.* 68, 441-453.
- Vescovo G, Ravara B, Gobbo V, Sandri M, Angelini A, Della Barbera M, Dona M, Peluso G, Calvani M, Mosconi L and Dalla Libera L.** (2002). L-Carnitine: a potential treatment for blocking apoptosis and preventing skeletal muscle myopathy in heart failure. *Am J Physiol Cell Physiol.* 283, C802-810.
- Viskin S.** (2009). The QT interval: too long, too short or just right. *Heart Rhythm.* 6, 711-715.
- Viskin S, Fish R, Zeltser D, Belhassen B, Heller K, Brosh D, Laniado S and Barron H V.** (2000). Arrhythmias in the congenital long QT syndrome: how often is torsade de pointes pause dependent? *Heart.* 83, 661-666.
- Volsen S G, Day N C, McCormack A L, Smith W, Craig P J, Beattie R E, Smith D, Ince P G, Shaw P J, Ellis S B, Mayne N, Burnett J P, Gillespie A and Harpold M M.** (1997). The expression of voltage-dependent calcium channel beta subunits in human cerebellum. *Neuroscience.* 80, 161-174.
- Wagner S, Dybkova N, Rasenack E C, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P, Maier S K, Zhang T, Hasenfuss G, Brown J H, Bers D M and Maier L S.** (2006).

- Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na⁺ channels. *J Clin Invest.* 116, 3127-3138.
- Wakamori M, Mikala G, Schwartz A and Yatani A.** (1993). Single-channel analysis of a cloned human heart L-type Ca²⁺ channel alpha 1 subunit and the effects of a cardiac beta subunit. *Biochem Biophys Res Commun.* 196, 1170-1176.
- Walker D and De Waard M.** (1998). Subunit interaction sites in voltage-dependent Ca²⁺ channels: role in channel function. *Trends Neurosci.* 21, 148-154.
- Wang D W, Viswanathan P C, Balser J R, George A L, Jr. and Benson D W.** (2002). Clinical, genetic, and biophysical characterization of SCN5A mutations associated with atrioventricular conduction block. *Circulation.* 105, 341-346.
- Wang J, Ou S W, Wang Y J, Zong Z H, Lin L, Kameyama M and Kameyama A.** (2008). New variants of Nav1.5/SCN5A encode Na⁺ channels in the brain. *J Neurogenet.* 22, 57-75.
- Wang K, Zhang H, Ma D, Bucan M, Glessner J T, Abrahams B S, Salyakina D, Imielinski M, Bradfield J P, Sleiman P M, Kim C E, Hou C, Frackelton E, Chiavacci R, Takahashi N, Sakurai T, Rappaport E, Lajonchere C M, Munson J, Estes A, Korvatska O, Piven J, Sonnenblick L I, Alvarez Retuerto A I, Herman E I, Dong H, Hutman T, Sigman M, Ozonoff S, Klin A, Owley T, Sweeney J A, Brune C W, Cantor R M, Bernier R, Gilbert J R, Cuccaro M L, McMahon W M, Miller J, State M W, Wassink T H, Coon H, Levy S E, Schultz R T, Nurnberger J I, Haines J L, Sutcliffe J S, Cook E H, Minshew N J, Buxbaum J D, Dawson G, Grant S F, Geschwind D H, Pericak-Vance M A, Schellenberg G D and Hakonarson H.** (2009). Common genetic variants on 5p14.1 associate with autism spectrum disorders. *Nature.* 459, 528-533.
- Wang P, Yang Q, Wu X, Yang Y, Shi L, Wang C, Wu G, Xia Y, Yang B, Zhang R, Xu C, Cheng X, Li S, Zhao Y, Fu F, Liao Y, Fang F, Chen Q, Tu X and Wang Q K.** (2010). Functional dominant-negative mutation of sodium channel subunit gene SCN3B associated with atrial fibrillation in a Chinese GeneID population. *Biochem Biophys Res Commun.* 398, 98-104.
- Wang Z.** (2010b). The role of microRNA in cardiac excitability. *J Cardiovasc Pharmacol.* 56, 460-470.
- Watanabe H, Chinushi M, Osaki A, Okamura K, Izumi D, Komura S, Hosaka Y, Tanabe Y, Furushima H, Washizuka T and Aizawa Y.** (2006). Elimination of late potentials by quinidine in a patient with Brugada syndrome. *J Electrocardiol.* 39, 63-66.
- Watanabe H, Chinushi M, Washizuka T, Sugiura H, Hirono T, Komura S, Hosaka Y, Yamaura M, Tanabe Y, Furushima H, Fujita S and Aizawa Y.** (2005). Variable electrocardiographic effects of short-term quinidine sulfate administration in Brugada syndrome. *Pacing Clin Electrophysiol.* 28, 372-377.
- Watanabe H, Darbar D, Kaiser D W, Jiramongkolchai K, Chopra S, Donahue B S, Kannankeril P J and Roden D M.** (2009). Mutations in sodium channel beta1- and beta2-subunits associated with atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2, 268-275.
- Watanabe H, Koopmann T T, Le Scouarnec S, Yang T, Ingram C R, Schott J J, Demolombe S, Probst V, Anselme F, Escande D, Wiesfeld A C, Pfeufer A, Kaab S, Wichmann H E, Hasdemir C, Aizawa Y, Wilde A A, Roden D M and Bezzina C R.** (2008). Sodium channel beta1 subunit mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans. *J Clin Invest.* 118, 2260-2268.
- Wei X Y, Perez-Reyes E, Lacerda A E, Schuster G, Brown A M and Birnbaumer L.** (1991). Heterologous regulation of the cardiac Ca²⁺ channel alpha 1 subunit by skeletal muscle beta and gamma subunits. Implications for the structure of cardiac L-type Ca²⁺ channels. *J Biol Chem.* 266, 21943-21947.
- Weissgerber P, Held B, Bloch W, Kaestner L, Chien K R, Fleischmann B K, Lipp P, Flockerzi V and Freichel M.** (2006). Reduced cardiac L-type Ca²⁺ current in Ca(V)beta2-/- embryos impairs cardiac development and contraction with secondary defects in vascular maturation. *Circ Res.* 99, 749-757.

- Welling A, Bosse E, Cavalie A, Bottlender R, Ludwig A, Nastainczyk W, Flockerzi V and Hofmann F.** (1993). Stable co-expression of calcium channel α 1, β and α 2/ δ subunits in a somatic cell line. *J Physiol.* 471, 749-765.
- Wettwer E, Amos G J, Posival H and Ravens U.** (1994). Transient outward current in human ventricular myocytes of subepicardial and subendocardial origin. *Circ Res.* 75, 473-482.
- Wheeler D G, Barrett C F, Groth R D, Safa P and Tsien R W.** (2008). CaMKII locally encodes L-type channel activity to signal to nuclear CREB in excitation-transcription coupling. *J Cell Biol.* 183, 849-863.
- Wilde A A and Brugada R.** (2011). Phenotypical manifestations of mutations in the genes encoding subunits of the cardiac sodium channel. *Circ Res.* 108, 884-897.
- Wilde A A, Postema P G, Di Diego J M, Viskin S, Morita H, Fish J M and Antzelevitch C.** (2010). The pathophysiological mechanism underlying Brugada syndrome: depolarization versus repolarization. *J Mol Cell Cardiol.* 49, 543-553.
- Williams I A and Allen D G.** (2007). Intracellular calcium handling in ventricular myocytes from mdx mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 292, H846-855.
- Witcher D R, De Waard M, Liu H, Pragnell M and Campbell K P.** (1995). Association of native Ca^{2+} channel β subunits with the α 1 subunit interaction domain. *J Biol Chem.* 270, 18088-18093.
- Witcher D R, De Waard M, Sakamoto J, Franzini-Armstrong C, Pragnell M, Kahl S D and Campbell K P.** (1993). Subunit identification and reconstitution of the N-type Ca^{2+} channel complex purified from brain. *Science.* 261, 486-489.
- Wolpert C, Echternach C, Veltmann C, Antzelevitch C, Thomas G P, Spehl S, Streitner F, Kuschyk J, Schimpf R, Haase K K and Borggrefe M.** (2005). Intravenous drug challenge using flecainide and ajmaline in patients with Brugada syndrome. *Heart Rhythm.* 2, 254-260.
- Wu L, Guo D, Li H, Hackett J, Yan G X, Jiao Z, Antzelevitch C, Shryock J C and Belardinelli L.** (2008 b). Role of late sodium current in modulating the proarrhythmic and antiarrhythmic effects of quinidine. *Heart Rhythm.* 5, 1726-1734.
- Wu L, Yong S L, Fan C, Ni Y, Yoo S, Zhang T, Zhang X, Obejero-Paz C A, Rho H J, Ke T, Szafranski P, Jones S W, Chen Q and Wang Q K.** (2008). Identification of a new co-factor, MOG1, required for the full function of cardiac sodium channel Nav 1.5. *J Biol Chem.* 283, 6968-6978.
- Wu X, Prasad P D, Leibach F H and Ganapathy V.** (1998). cDNA sequence, transport function, and genomic organization of human OCTN2, a new member of the organic cation transporter family. *Biochem Biophys Res Commun.* 246, 589-595.
- Xu J J, Hao L Y, Kameyama A and Kameyama M.** (2004). Calmodulin reverses rundown of L-type Ca^{2+} channels in guinea pig ventricular myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 287, C1717-1724.
- Yamagishi T, Janecki M, Marban E and Tomaselli G F.** (1997). Topology of the P segments in the sodium channel pore revealed by cysteine mutagenesis. *Biophys J.* 73, 195-204.
- Yamaguchi H, Okuda M, Mikala G, Fukasawa K and Varadi G.** (2000). Cloning of the β (2a) subunit of the voltage-dependent calcium channel from human heart: cooperative effect of α (2)/ δ and β (2a) on the membrane expression of the α (1C) subunit. *Biochem Biophys Res Commun.* 267, 156-163.
- Yan G X and Antzelevitch C.** (1999). Cellular basis for the Brugada syndrome and other mechanisms of arrhythmogenesis associated with ST-segment elevation. *Circulation.* 100, 1660-1666.
- Yang J, Ellinor P T, Sather W A, Zhang J F and Tsien R W.** (1993). Molecular determinants of Ca^{2+} selectivity and ion permeation in L-type Ca^{2+} channels. *Nature.* 366, 158-161.
- Yang L, Katchman A, Morrow J P, Doshi D and Marx S O.** (2011). Cardiac L-type calcium channel (Cav1.2) associates with γ subunits. *FASEB J.* 25, 928-936.

- Yang S N and Berggren P O.** (2006). The role of voltage-gated calcium channels in pancreatic beta-cell physiology and pathophysiology. *Endocr Rev.* 27, 621-676.
- Yarbrough T L, Lu T, Lee H C and Shibata E F.** (2002). Localization of cardiac sodium channels in caveolin-rich membrane domains: regulation of sodium current amplitude. *Circ Res.* 90, 443-449.
- Yazawa M, Hsueh B, Jia X, Pasca A M, Bernstein J A, Hallmayer J and Dolmetsch R E.** (2011). Using induced pluripotent stem cells to investigate cardiac phenotypes in Timothy syndrome. *Nature.* 471, 230-234.
- Yoon J Y, Ho W K, Kim S T and Cho H.** (2009). Constitutive CaMKII activity regulates Na⁺ channel in rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 47, 475-484.
- Young K A and Caldwell J H.** (2005). Modulation of skeletal and cardiac voltage-gated sodium channels by calmodulin. *J Physiol.* 565, 349-370.
- Yu F H, Westenbroek R E, Silos-Santiago I, McCormick K A, Lawson D, Ge P, Ferriera H, Lilly J, DiStefano P S, Catterall W A, Scheuer T and Curtis R.** (2003). Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2. *J Neurosci.* 23, 7577-7585.
- Yuan W and Bers D M.** (1994). Ca-dependent facilitation of cardiac Ca current is due to Ca-calmodulin-dependent protein kinase. *Am J Physiol.* 267, H982-993.
- Ziane R, Huang H, Moghadaszadeh B, Beggs A H, Levesque G and Chahine M.** (2010). Cell membrane expression of cardiac sodium channel Na(v)1.5 is modulated by alpha-actinin-2 interaction. *Biochemistry.* 49, 166-178.
- Zimmer T.** (2010). Effects of tetrodotoxin on the mammalian cardiovascular system. *Mar Drugs.* 8, 741-762.
- Zimmer T and Surber R.** (2008). SCN5A channelopathies--an update on mutations and mechanisms. *Prog Biophys Mol Biol.* 98, 120-136.
- Zuhlke R D, Pitt G S, Deisseroth K, Tsien R W and Reuter H.** (1999). Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature.* 399, 159-162.
- Zuhlke R D and Reuter H.** (1998). Ca²⁺-sensitive inactivation of L-type Ca²⁺ channels depends on multiple cytoplasmic amino acid sequences of the alpha1C subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 3287-3294.
- Zygmunt A C, Eddlestone G T, Thomas G P, Nesterenko V V and Antzelevitch C.** (2001). Larger late sodium conductance in M cells contributes to electrical heterogeneity in canine ventricle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 281, H689-697.
- Zygmunt A C, Goodrow R J and Antzelevitch C.** (2000). I(NaCa) contributes to electrical heterogeneity within the canine ventricle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 278, H1671-1678.

PHYSIOPATHOLOGIE DES TROUBLES DU RYTHME ET DE LA CONDUCTION CARDIAQUES : NOUVELLES PISTES

Les arythmies cardiaques sont responsables d'un million de cas de syncope et de mort subite cardiaque chaque année dans le monde. Pendant cette dernière décennie de nombreuses mutations de gènes codant pour des canaux ioniques ont été associées à différents syndromes cardiaques familiaux tels que le syndrome de Brugada (SBr) ou le syndrome du QT court (SQTC).

Dans 25 % des cas, le SBr est associé à des mutations du gène *SCN5A*, codant le canal Na^+ $\text{Na}_v1.5$. Dans une famille atteinte de SBr, SQTC et/ou troubles de la conduction, nous avons identifié 2 mutations de *SCN5A* et de *CACNA1C*, codant pour le canal Ca^{2+} $\text{Ca}_v1.2$. Nous montrons expérimentalement que la perte de fonction du canal $\text{Ca}_v1.2\text{-N300D}$ est due à un défaut d'expression et, par modélisation du potentiel d'action cardiaque que le phénotype des patients peut être expliqué par leur génotype personnel.

Dans une famille atteinte du SQTC, nous avons identifié des mutations de *CACNA1C* et du gène codant pour le transporteur de la carnitine *OCTN2* suggérant un nouveau mécanisme moléculaire. Nous montrons que la perte de fonction du canal $\text{Ca}_v1.2\text{-A223P}$ n'est pas causale mais qu'elle pourrait moduler la sévérité du phénotype.

Enfin, nous avons identifié une nouvelle arythmie nommée "Multifocal Ectopic Purkinje-related Premature Contractions" associée à la mutation R222Q du canal $\text{Na}_v1.5$. Nous montrons que le gain de fonction du canal $\text{Na}_v1.5$ muté est à l'origine de l'atteinte tissu-spécifique et la mise au point d'un nouveau modèle multicellulaire informatique nous permet d'appréhender les anomalies électriques complexes rencontrées.

Mots-Clés : Canaux ioniques – $\text{Ca}_v1.2$ – $\text{Na}_v1.5$ – Syndrome du QT court – Syndrome de Brugada – "Multifocal Ectopic Purkinje-related Premature Contractions"

PHYSIOPATHOLOGY OF CARDIAC ARRHYTHMIA AND CONDUCTION DISEASE: NEW INSIGHTS

Cardiac arrhythmias are responsible for one million cases of syncope and sudden cardiac death every year in the world. In the last decade, studies linking ion channel-related gene mutations and various cardiac familial syndromes as Brugada syndrome (BrS) or short QT syndrome (SQTS) have constantly increased.

In 25% of cases, BrS is associated with *SCN5A* mutation which encodes the $\text{Na}_v1.5$ Na^+ channel. In a family affected by BrS, SQTS and/or conduction defects, we identify 2 variants of *SCN5A* and *CACNA1C* encoding the $\text{Ca}_v1.2$ Ca^{2+} channel. We show that the loss-of-function of $\text{Ca}_v1.2\text{-N300D}$ is due to an expression defect, and by cardiac action potential modeling that the phenotype of the patients can be explain by their personal genotype.

In a family affected by SQTS, we have identified mutations on *CACNA1C* and on the gene encoding the membrane carnitine transporter *OCTN2*, suggesting a new molecular mechanism. We show that the loss-of-function of the $\text{Ca}_v1.2\text{-A223P}$ channel is not causal but could modulate the phenotype severity.

Finally, we have identified a new arrhythmia named "Multifocal Ectopic Purkinje-related Premature Contractions" associated with the R222Q variant of $\text{Na}_v1.5$ channel. We show that the gain-of-function mutation of $\text{Na}_v1.5$ is responsible for the tissue-specific effect. We designed a new multicellular model allowing us to understand the complex electrical abnormalities observed.

Keywords: ion channels – $\text{Na}_v1.5$ – $\text{Ca}_v1.2$ – Short QT syndrome – Brugada syndrome – "Multifocal Ectopic Purkinje-related Premature Contractions"
