

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DE MÉDECINE

ÉCOLE DOCTORALE CHIMIE BIOLOGIE

Année 2006

Remodelage de l'expression des canaux ioniques cardiaques : rôle dans le phénotype électrophysiologique

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Sciences de la vie et de la santé
Spécialité : Biologie moléculaire

Présentée et soutenue publiquement par

Nathalie GABORIT

Le 25 octobre 2006, devant le jury ci-dessous

<i>Président</i>	M ^{me} LEMARCHAND Patricia, Professeur, Université de Nantes, <i>l'institut du thorax</i> , Inserm U533, Nantes
<i>Rapporteurs</i>	M ^{me} POTIER Marie-Claude, Directeur de recherche, CNRS UMR 7637, ESPCI, Paris M ^r HATEM Stéphane, Directeur de recherche, Inserm-UPMC 621, Paris
<i>Examineurs</i>	M ^{me} DEMOLOMBE Sophie, Chargée de recherche, <i>l'institut du thorax</i> , Inserm U533, Nantes M ^r LORY Philippe, Directeur de recherche, CNRS UMR5203 - INSERM U661, Montpellier M ^r ESCANDE Denis, Professeur, Université de Nantes, <i>l'institut du thorax</i> , Inserm U533, Nantes
<i>Directeur de thèse</i>	M ^{me} DEMOLOMBE Sophie, Chargée de recherche, <i>l'institut du thorax</i> , Inserm U533, Nantes

SOMMAIRE

INTRODUCTION	13
HYPOTHÈSE DE TRAVAIL	14
PLASTICITÉ ÉLECTRIQUE : MISES EN ÉVIDENCE FONCTIONNELLES	15
Hétérogénéité électrique intrinsèque du cœur	15
Mise en évidence à l'étage intégré : l'électrocardiogramme de surface	15
Mise en évidence à l'étage cellulaire : le potentiel d'action	17
Hétérogénéité électrique entre les tissus contractiles	17
Hétérogénéité électrique entre les tissus automatiques et contractiles	19
Mise en évidence au niveau de la cellule isolée : les courants ioniques	21
Hétérogénéité électrique entre les tissus contractiles	22
Hétérogénéité électrique entre les tissus automatiques et contractiles	25
Hétérogénéité électrique liée au sexe	27
Les hormones stéroïdiennes : bref rappel	27
La fréquence cardiaque	28
Hétérogénéité de repolarisation ventriculaire	29
Autres paramètres électrocardiographiques	30
Influence du sexe sur l'incidence des cardiopathies	31
Les syndromes du QT long acquis ou congénital	31
Le syndrome de Brugada	32
La mort subite	33
La fibrillation auriculaire	33
Apports des modèles animaux	34
Le lapin	34
Le chien	34
La souris	35
Le Cobaye	36
REMODELAGE ÉLECTRIQUE CARDIAQUE	37
Remodelage électrique associé à la fibrillation auriculaire	37
Historique	37
Description	37
Théories mécanistiques de la fibrillation auriculaire	39
Phénomènes initiateurs et substrats de la fibrillation auriculaire	40
Les veines pulmonaires : "gâchette" de la FA	40
Les substrats	40
Remodelage électrique associé à la fibrillation auriculaire chronique	42
L'électrocardiogramme	42
Le potentiel d'action	42
Les courants ioniques	43
Traitements	47
Hétérogénéité électrique associée au syndrome de Brugada	49
Historique	49
Description	50
L'électrocardiogramme	50
Le potentiel d'action	51

Mécanismes	51
L'origine génétique	51
Mécanismes responsables du sus-décalage du segment ST	52
Epidémiologie	53
Traitements	54
Remodelage électrique associé à l'insuffisance cardiaque chronique	54
Historique	54
Description	55
Etiologie, physiopathologie et diagnostic	56
Epidémiologie et pronostic	57
Remodelage électrique associé à l'insuffisance cardiaque	57
L'électrocardiogramme	57
Le potentiel d'action	57
Les courants ioniques	58
Traitements	60
 LE TRANSCRIPTOME DES CELLULES CARDIAQUES	 62
 MATÉRIELS ET MÉTHODES	 66
 LES DONNÉES DU GÉNOME	 67
 LES PUCES A ADN	 68
Principe général	68
Puces à ADN dédiées au muscle : MyoChip	69
Les lames	70
Microdépôt des sondes sur les lames	70
Extraction de l'ARNt	71
Marquage des cibles	71
Le traitement des lames	71
Analyse d'image	72
Les limites de la technique des puces à ADN	74
 LA RT-PCR QUANTITATIVE A HAUT DÉBIT	 75
Quantification individuelle	76
Quantification à haut débit	77
Les limites de la RT-PCR quantitative à haut débit	78
 CLASSIFICATION DES DONNÉES D'EXPRESSION	 79
Définition	79
Classification hiérarchique non-supervisée	79
Distances inter-groupes	80
Algorithmes ascendants	80
 LES MÉTHODES STATISTIQUES	 83
Tests paramétriques classiques ou tests t	83
Tests non paramétriques	84
Tests non paramétriques "classiques"	84
Analyses par ré-échantillonnage aléatoire	84
Approche bayésienne	85

RÉSULTATS ET DISCUSSION	87
PLASTICITÉ DE L'EXPRESSION DES CANAUX IONIQUES DU CŒUR HUMAIN SAIN	88
Spécificité d'expression des gènes codant les sous-unités des canaux ioniques en fonction des compartiments du cœur humain sain	88
Introduction	88
Résultats	88
Conclusion et discussion	90
Article 1	93
Hétérogénéité de l'expression des canaux ioniques entre le myocarde sous-épicaudique et sous-endocardique chez l'Homme, et sa modulation en fonction du sexe	124
Introduction	124
Résultats	124
Conclusion et discussion	128
Article 2	129
REMODELAGE IONIQUE CHEZ L'HOMME	158
Signature transcriptionnelle associée à la valvopathie et à la fibrillation auriculaire chez l'homme	158
Introduction	158
Résultats	159
Conclusion	160
Article 3	161
Signature transcriptionnelle associée au syndrome de Brugada chez l'homme	174
Introduction	174
Résultats	174
Conclusion et discussion	176
Article 4	177
Signature transcriptionnelle associée à l'insuffisance cardiaque chronique chez l'homme	198
Introduction	198
Résultats	198
Classification hiérarchique	198
Profil d'expression des canaux ioniques et des protéines de l'homéostasie calcique associé à l'insuffisance cardiaque	199
Discussion et conclusion	204
DISCUSSION GÉNÉRALE	207
JUSTIFICATION DE L'APPROCHE DÉDIÉE	208
CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES SUR LE REMODELAGE GLOBAL DES CANAUX IONIQUES CARDIAQUES	209
CONSIDÉRATIONS PARTICULIÈRES : DONNÉES EXPÉRIMENTALES ORIGINALES	210

LIMITES DE L'APPROCHE DÉDIÉE ET DE L'UTILISATION DE TISSUS HUMAINS	212
NOS OBJECTIFS FUTURS	214
La régulation transcriptionnelle des canaux ioniques	214
Etape 1 : Mise en évidence des corrélations facteurs de transcription – canaux ioniques	214
Etape 2 : Validation bioinformatique des corrélations facteurs de transcription – canaux ioniques	215
Etape 3 : Validation biologique des corrélations facteurs de transcription – canaux ioniques	215
Autres aspects de la régulation transcriptionnelle : modulation par des senseurs	216
La génomique : outil diagnostic	217
La modélisation mathématique des données de génomique	218
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	219
ARTICLE SUPPLÉMENTAIRE	248
Lamirault G, Gaborit N, Le Meur N, Chevalier C, Lande G, Demolombe S, Escande D, Nattel S, Leger JJ, Steenman M. Gene expression profile associated with chronic atrial fibrillation and underlying valvular heart disease in man. J Mol Cell Cardiol. 2006;40:173-184.	
ANNEXE	261
Liste des essais TaqMan et tableau des patients – article 1	262
Liste des essais TaqMan – article 2	267
Liste des essais TaqMan – article 4	271

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ECG	électrocardiogramme
PA	potentiel d'action
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ARNm	acide ribonucléique messager
RT-PCR	<i>reverse transcription-polymerase chain reaction</i>
<i>HPRT</i>	<i>hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase</i>
QTc	intervalle QT corrigé
TdP	torsades de pointes
LQTS	<i>Long QT Syndrome</i> / syndrome du QT long
FA	fibrillation auriculaire
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
ACE	enzyme de conversion de l'angiotensine

LISTE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

- Figure 1** **A** Enregistrement par Waller de l'ECG humain, à l'aide de l'Electromètre capillaire. **B** Tracé publié par Einthoven en 1902 enregistré avec l'Electromètre capillaire et sa correction mathématique. **C** Première publication d'ECG humain enregistré par le galvanomètre à cordes.
- Figure 2** Morphologie du PA myocardique humain.
- Figure 3** Potentiels d'action auriculaire et ventriculaire chez l'homme.
- Figure 4** Potentiels d'action épicaudique et endocardique chez l'homme.
- Figure 5** Potentiels d'action de la base et de l'apex ventriculaire chez le chien.
- Figure 6** Premier enregistrement de potentiel d'action myocardique, sur fibres de Purkinje de chien.
- Figure 7** Potentiels d'action de fibres de purkinje et de ventricule chez le chien.
- Figure 8** Enregistrement du courant I_{Kur} dans l'oreillette et le ventricule humain.
- Figure 9** Enregistrement du courant I_{K1} dans l'oreillette et le ventricule humain.
- Figure 10** Enregistrement du courant I_{to} dans l'épicarde et l'endocarde humain sain.
- Figure 11** Cinétiques d'inactivation de I_{to} dans l'épicarde et l'endocarde humain sain.
- Figure 12** Densité de I_{to} dans l'apex et la base du ventricule de chien.
- Figure 13** Densité de I_{Ks} dans l'apex et la base du ventricule de chien.
- Figure 14** Enregistrement du courant I_f dans le ventricule et les fibres de Purkinje chez le chien.
- Figure 15** Enregistrement du courant I_{to} dans le ventricule et les fibres de Purkinje chez l'homme.
- Figure 16** Représentation schématique du cycle des hormones ovariennes durant les phases du cycle ovarien.
- Figure 17** Rythme cardiaque minimum (**A**) et maximum (**B**) chez les hommes et les femmes.
- Figure 18** Durée moyenne **A** de l'intervalle QT, **B** de l'intervalle TpTf, et **C** du complexe QRS en fonction de la durée de l'intervalle RR chez les hommes et les femmes.
- Figure 19** Prolongation de la durée de FA après stimulation atriale pendant 24 heures et 2 semaines d'un modèle de chèvre.
- Figure 20** Théories mécanistiques de la FA, dans la première moitié du 20^{ème} siècle.

- Figure 21** Tracé d'un ECG de surface 12 dérivations : patient en FA.
- Figure 22** **A** PA enregistré à partir de cellules atriales droites de patients en rythme sinusal et en FA, à fréquence physiologique. **B** Durée du PA de cellules atriales de patients en rythme sinusal et en FA.
- Figure 23** Densité du courant calcique $I_{Ca,L}$ mesurée sur des cellules atriales de patients en rythme sinusal et en fibrillation auriculaire.
- Figure 24** Fonction de l'échangeur NCX (**A**) en condition normale et (**B**) lors d'une augmentation de son activité.
- Figure 25** Densité du courant potassique transitoire sortant I_{to} mesurée sur des cellules atriales de patients en rythme sinusal et en fibrillation auriculaire.
- Figure 26** Densité du courant potassique I_{K1} mesurée sur des cellules atriales de patients en rythme sinusal et en fibrillation auriculaire.
- Figure 27** Mécanisme général de la FA ; RS = Rythme sinusal.
- Figure 28** Tracé électrocardiographique caractéristique du syndrome de Brugada chez l'homme, en dérivations précordiales droites V1 à V3.
- Figure 29** Enregistrement simultané de PA monophasiques épicardique et endocardique d'un patient présentant un syndrome de Brugada.
- Figure 30** Bases cellulaires du syndrome de Brugada.
- Figure 31** Deux mécanismes d'insuffisance cardiaque dont l'origine est une dysfonction ventriculaire : diastolique et systolique.
- Figure 32** Enregistrement de PA de cellules ventriculaires de patients non malades et insuffisants cardiaques.
- Figure 33** Courant I_{to} enregistré dans des cellules ventriculaires humaines de patients non malades et insuffisants cardiaques.
- Figure 34** Courant I_{K1} enregistré dans des cellules ventriculaires de patients non malades et insuffisants cardiaques.
- Figure 35** Courant I_f enregistré dans des cellules ventriculaires de patients non malades et insuffisants cardiaques.
- Figure 36** Principe général des puces à ADN.
- Figure 37** Proportions des différentes catégories d'oligonucléotides présents sur la MyoChip.
- Figure 38** Recueil et traitement des images de puces à ADN.
- Figure 39** Principe de la technologie *TaqMan*.
- Figure 40** Représentation schématique de la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$.
- Figure 41** Photographie d'une carte microfluide ou *Low Density Array*®.
- Figure 42** Classification hiérarchique ascendante.

- Figure 43** Profils d'expression des gènes codant les sous-unités des canaux ioniques dans le ventricule et l'oreillette gauches et droites.
- Figure 44** Profils d'expression des gènes codant les sous-unités des canaux ioniques dans les fibres de Purkinje et le ventricule droit.
- Figure 45** Représentation schématique des potentiels d'action et des marqueurs moléculaires de l'oreillette, des fibres de Purkinje, de l'endocarde, du ventricule et de l'épicarde.
- Figure 46** Profils d'expression des gènes codant les sous-unités des canaux ioniques dans l'épicarde droit et dans l'endocarde droit, chez les femmes et chez les hommes.
- Figure 47** Profils d'expression des gènes codant les sous-unités des canaux ioniques chez les femmes et chez les hommes, dans l'épicarde droit et dans l'endocarde droit.
- Figure 48** Profils d'expression de KChIP2 et de deux facteurs de transcription Iroquois, dans l'épicarde et l'endocarde droits des hommes et des femmes.
- Figure 49** Profils d'expression des gènes codant les sous-unités des canaux ioniques obtenu pour le groupe de patients Brugada, le groupe contrôle 1 et le groupe contrôle 2.
- Figure 50** Classifications hiérarchiques appliquées à 81 canaux ioniques et protéines de l'homéostasie calcique et respectivement à 6 et 7 échantillons tissulaires insuffisants cardiaques et contrôles humains.
- Figure 51** Profil d'expression des gènes codant les sous-unités des canaux Na^+ et Ca^{2+} , obtenu pour les groupes contrôle et insuffisant cardiaque.
- Figure 52** Profil d'expression des gènes codant les sous-unités des canaux Cl^- et HCN ainsi que les connexines, obtenu pour les groupes contrôle et insuffisant cardiaque.
- Figure 53** Profil d'expression des gènes codant les sous-unités des canaux potassiques dépendants du voltage, obtenus pour les groupes contrôle et insuffisant cardiaque.
- Figure 54** Profil d'expression des gènes codant les sous-unités β des canaux potassiques et les canaux rectifiant entrants, obtenus pour les groupes contrôle et insuffisant cardiaque.
- Figure 55** Profil d'expression des gènes codant les protéines régulatrices de l'homéostasie calcique et les marqueurs de l'insuffisance cardiaque, obtenus pour les groupes contrôle et insuffisant cardiaque.
- Figure 56** Représentation des différentes voies de régulation du phénotype cellulaire électrophysiologique.

TABLEAUX

- Tableau 1** Valeurs physiologiques d'un tracé électrocardiographique sinusal humain.
- Tableau 2** Propriétés des potentiels d'action des différents compartiments du cœur humain.
- Tableau 3** Principaux courants du PA, enregistrés dans les différents compartiments du cœur humain.
- Tableau 4** Valeurs moyennes des paramètres ECG qui présentent une différence statistique entre les hommes et les femmes

INTRODUCTION

A. Hypothèse de travail

Les cellules cardiaques sont capables d'adapter leurs propriétés électrophysiologiques à des contraintes externes physiologiques ou pathologiques. On parle alors respectivement de plasticité et de remodelage électriques.

La plasticité et le remodelage électriques peuvent être caractérisés par l'enregistrement :

- au niveau de l'organe, d'un électrocardiogramme de surface ;
- au niveau cellulaire, d'un potentiel d'action et de courants ioniques.

Chez les mammifères, l'activité électrique cardiaque est sous la dépendance de plus de 30 courants ioniques différents (Boyett *et al.*, 1996). Ces courants sont générés par des canaux ioniques formés par l'association de sous-unités α , ou sous-unités "canal", et de sous-unités auxiliaires régulatrices (sous-unité β). Une cellule spécialisée comme la cellule cardiaque exprime une centaine de sous-unités α et β . La plasticité électrique résulte de la modification du nombre et/ou des propriétés des canaux ioniques à la membrane. Les variations du nombre peuvent être dues à une modification de leur transcription, de leur traduction, de leur adressage ou de leur dégradation. **Parmi toutes ces étapes, notre hypothèse est que les modifications transcriptionnelles des gènes codant les canaux ioniques (ou remodelage ionique) jouent un rôle prépondérant dans la plasticité électrique.** En effet, la transcription est spécifique, finement régulée par une multitude de facteurs, économique et adaptée à des réponses moyen et long terme. Des études précédentes réalisées au sein du laboratoire nous ont déjà permis de valider cette hypothèse chez la souris, en définissant l'expression globale des canaux ioniques dans différentes situations physiologiques et pathologiques, et en montrant que les variations d'expression observées se répercutent au niveau fonctionnel.

Le premier objectif de ma thèse a consisté à déterminer dans le cœur humain sain, si la spécialisation régionale de la fonction électrique cardiaque s'accompagne d'une expression régionale de canaux ioniques. J'ai également voulu savoir si les différences liées au sexe dans l'électrophysiologie cardiaque prennent leur origine dans des différences d'expression moléculaire.

La deuxième partie de ma thèse a consisté à valider notre hypothèse dans des conditions pathologiques, à travers l'analyse du remodelage ionique associé à la fibrillation auriculaire, au syndrome de Brugada et à l'insuffisance cardiaque, chez l'homme.

Enfin, dans la dernière partie de mon travail, et dans l'avenir, notre objectif est d'identifier les facteurs de transcription qui régulent la transcription des canaux ioniques et les mécanismes de feed-back entre le phénotype électrophysiologique et la machinerie de transcription.

B. plasticité Électrique : mises en Évidence fonctionnelles

1. Hétérogénéité électrique intrinsèque du cœur

La spécialisation régionale de la fonction électrique a été reconnue en 1852 par les travaux de Stannius. Il a observé par ligature entre le sinus veineux et l'auricule du cœur de grenouille, que l'oreillette et le ventricule ont un rythme spontané et indépendant (Stannius, 1852). Nous savons maintenant que l'activité contractile du cœur est coordonnée dans le temps et dans l'espace, et qu'elle est précédée et déclenchée par une activité électrique spécifique à chaque région. Cette première partie introductive décrira les principaux acteurs de l'hétérogénéité électrique régionale du cœur à deux niveaux : cellulaire et intégré. De brefs rappels historiques permettront de comprendre l'évolution des connaissances. Dans un souci de cohérence avec mon travail, les données seront principalement tirées d'études chez l'homme.

a. Mise en évidence à l'étage intégré : l'électrocardiogramme de surface

L'électrocardiogramme (ECG) de surface est la technique la plus ancienne qui permet de révéler, à l'échelle de l'organe, les différents phénomènes électriques associés aux battements cardiaques. Il représente l'intégration spatio-temporelle la plus achevée et la plus complexe du fonctionnement répétitif de protéines-canal. Le premier ECG humain, enregistré par Waller en 1887 à l'aide de l'électromètre capillaire, ne met en évidence que deux déflexions produites par deux événements ventriculaires (Waller, 1887 ; Figure 1 A, page 16). Cette technique était relativement sensible mais lente. Les enregistrements ont été, dans un premier temps, améliorés par Einthoven (Figure 1 B, page 16), qui a par la suite mis au point le galvanomètre à cordes. Il publia en 1903 le premier ECG humain comportant 5 déflexions désignées PQRST (Einthoven, 1903 ; Figure 1 C, page 16), caractéristiques d'un tracé actuel : une onde lente (P), désignant l'activité électrique auriculaire, suivie par une série rapide de changements (QRS) et une autre onde lente (T), représentant les différents événements ventriculaires.

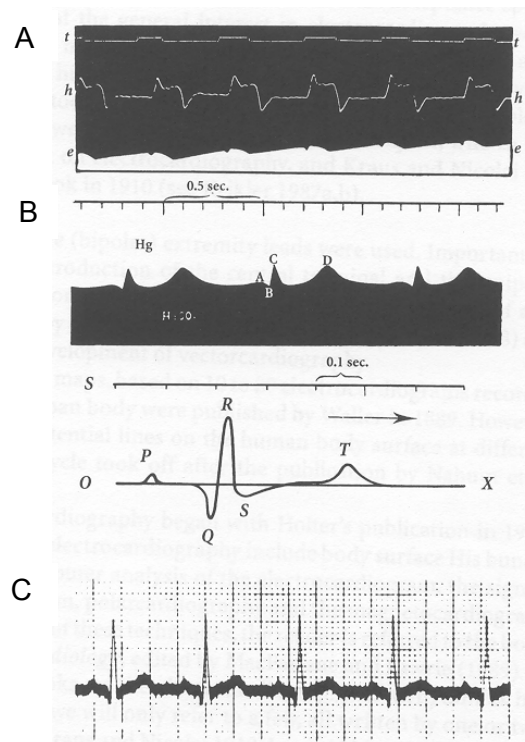


Figure 1 **A** Enregistrement par Waller de l'ECG humain, à l'aide de l'Electromètre capillaire. *t*, temps ; *h*, pulsation externe du cœur ; *e*, électrocardiogramme. **B** Tracé publié par Einthoven en 1902 enregistré avec l'Electromètre capillaire. Les ondes sont nommées A, B, C et D. Le tracé inférieur est

une correction mathématique de ce tracé par Einthoven. La terminologie utilisée est alors P, Q, R, S, et T. **C** Première publication d'ECG humain enregistré par le galvanomètre à cordes (1903) (cité dans Janse & Rosen, 2006).

L'électrocardiogramme reflète donc la séquence d'événements électriques associée au cycle de contraction (dépolérisation) et de relaxation (repolarisation) de chaque région du cœur. L'activité électrique myocardique est initiée spontanément au niveau des cellules *pacemaker* du nœud sinoatrial. La vague d'excitation qui en émerge se propage rapidement à travers l'oreillette et la dépolérisation auriculaire qui en résulte donne lieu à l'onde P de l'ECG. La première partie de l'onde P est produite par la dépolérisation de l'oreillette droite et la seconde, par la dépolérisation de l'oreillette gauche. Après un délai au niveau du nœud auriculo-ventriculaire, reflété par l'intervalle PR, l'excitation se propage aux ventricules par l'intermédiaire du système His-Purkinje. La dépolérisation ventriculaire, reflétée par le complexe QRS, se propage depuis l'endocarde vers l'épicarde et depuis l'apex vers la base. La repolarisation des oreillettes est masquée par le complexe QRS. L'intervalle ST correspond à la période d'excitation des ventricules jusqu'à leur phase de relaxation. La forme de l'onde T de l'ECG illustre l'hétérogénéité de repolarisation qui existe au sein de la paroi ventriculaire. Le complexe QRS et l'onde T ayant la même polarité, les régions du ventricule qui se dépolérisent en dernier sont donc également celles qui se repolarisent en premier. Ainsi, l'épicarde est repolarisé avant l'endocarde et, la base avant l'apex.

Le tableau 1 récapitule les valeurs physiologiques des paramètres mesurés à partir d'un tracé électrocardiographique enregistré chez l'homme.

Tableau 1 Valeurs physiologiques d'un tracé électrocardiographique humain.

Analyse générale de l'ECG :	Analyse spécifique de l'ECG :	
- Autant d'ondes P que de QRS	- onde P	durée < 0.12sec _ amplitude < 2.5mm
- Fréquence entre 60 et 100/min	- intervalle PR	constant, d'une durée de 0.12 à 0.20sec
- Axe moyen gauche (-30 à +90°)	- complexe QRS	durée < 0.1sec
	- segment ST	isoélectrique
	- intervalle QTc	durée < 0.45sec
	- onde T	asymétrique _ amplitude < 2mm

b. Mise en évidence à l'échelle cellulaire : le potentiel d'action

Au niveau cellulaire, l'avènement des techniques électrophysiologiques au début des années 1950 a permis d'enregistrer l'activité électrique du cœur sous la forme de potentiels d'action (PA). La sommation dans le temps et dans l'espace de ces potentiels d'action est responsable des différentes ondes de l'ECG. Les PA myocardiques s'inscrivent en cinq phases successives : (i) une phase 0 de dépolérisation rapide, (ii) une phase 1 de repolarisation précoce, (iii) une phase de plateau (phase 2) suivie (iv) d'une phase 3 de repolarisation qui ramène le potentiel de membrane vers sa valeur de repos et enfin (v) une phase 4 qui correspond à une stabilisation du potentiel de repos au niveau du potentiel d'équilibre du potassium (E_K) (Figure 2). L'étude des spécificités régionales des PA a permis de révéler, à une nouvelle échelle, l'hétérogénéité électrique cardiaque (Schram *et al.*, 2002).

Figure 2 Morphologie du potentiel d'action myocardique humain. Les différentes phases du PA sont notées de 0 à 4 (Nerbonne & Kass, 2005).

i. Hétérogénéité électrique entre les tissus contractiles

Bien que des tissus soient de même fonction, les caractéristiques de leur activité électrique sont hétérogènes. C'est le cas par exemple entre l'oreillette et le ventricule, les deux composantes du myocarde contractile (Lauribe *et al.*, 1989 ; Jost *et al.*, 2005 ; Figure 3). Le potentiel de repos des cellules auriculaires (≈ -70 à -80 mV) est environ 5 à 10 mV plus dépolarisé que celui des ventricules (Schram *et al.*, 2002). Leur PA est caractérisé par une phase 3 de repolarisation lente par rapport au ventricule.

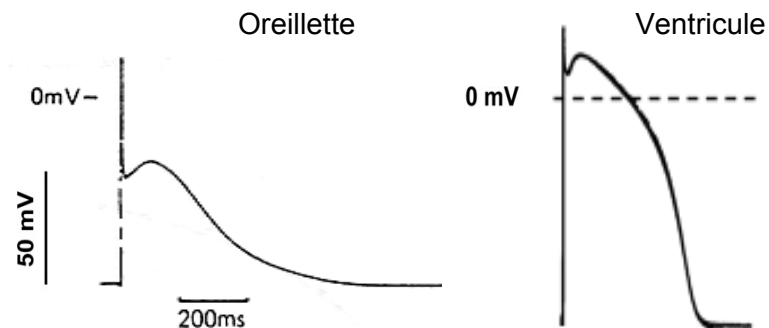


Figure 3 Potentiels d'action auriculaire (Lauribe *et al.*, 1989) et ventriculaire (Jost *et al.*, 2005) chez l'homme.

Au sein des oreillettes, des différences régionales dans la morphologie des PA ont également été observées. La durée du PA des cellules auriculaires qui bordent le nœud sinusal est la plus longue et diminue progressivement vers la périphérie (Spach *et al.*, 1989a), facilitant la propagation de l'influx électrique depuis le nœud sinusal vers le nœud auriculo-ventriculaire (Spach *et al.*, 1989b). Cette hétérogénéité joue un rôle dans la survenue des arythmies par réentrées. Par ailleurs, la durée du PA et de la période effective réfractaire dans l'oreillette gauche est plus courte que dans l'oreillette droite (Li *et al.*, 2001a).

L'hétérogénéité régionale des PA ventriculaires a été bien établie. Au niveau transmural tout d'abord, comparé à l'endocarde, le PA épicardique est caractérisé par une durée plus courte et une phase 1 de repolarisation proéminente suivie par une encoche (*spike and dome* ; Ravens & Wettwer, 1998 ; Figure 4).

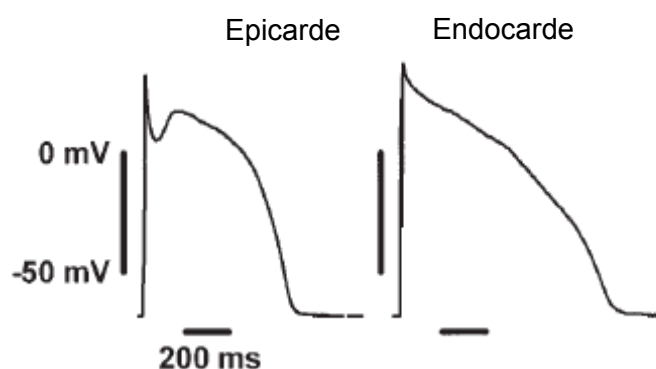
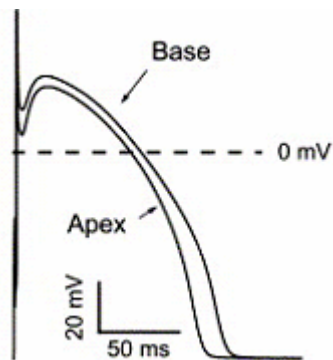


Figure 4 Potentiels d'action épicaudique et endocaudique chez l'homme (Ravens & Wettwer, 1998).

S'ajoute à ce gradient transmural, une hétérogénéité électrique le long de l'axe apico-basal du cœur. En effet, une étude chez le chien a montré que la durée du PA est significativement plus longue au niveau de la base par rapport à l'apex du myocarde ventriculaire. De plus, la phase 1 de repolarisation est plus marquée au niveau de l'apex



(Szentadrassy *et al.*, 2005 ; Figure 5).

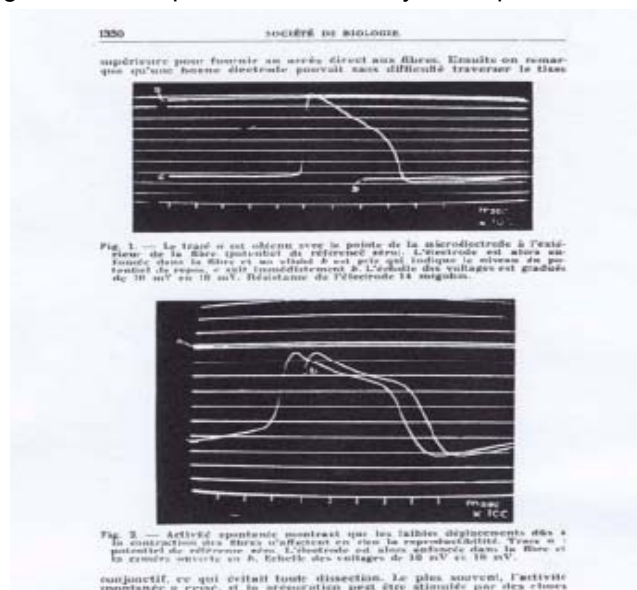
Figure 5 Potentiels d'action de la base et de l'apex ventriculaire chez le chien (Szentadrassy *et al.*, 2005).

Par ailleurs, une différence majeure a été décrite chez le chien entre l'épicarde droit et gauche, au niveau de la phase de repolarisation précoce du PA. L'amplitude de cette phase 1 dans l'épicarde droit est environ trois fois supérieure à celle du gauche (Di Diego *et al.*, 1996).

ii. Hétérogénéité électrique entre les tissus automatiques et contractiles

C'est en 1949 que Coraboeuf et Weidmann enregistrent le premier potentiel d'action, sur des fibres de Purkinje isolées à partir du cœur de chien, par la technique de micro-électrode (Coraboeuf & Weidmann, 1949 ; Figure 6).

Figure 6 Premier enregistrement de potentiel d'action myocardique, sur fibres de Purkinje de chien



(Coraboeuf & Weidmann, 1949).

Les fibres de Purkinje sont responsables de la propagation rapide de l'influx électrique du nœud auriculo-ventriculaire vers les ventricules (Schram *et al.*, 2002). Elles constituent également des foyers jonctionnels automatiques responsables de rythmes d'échappement en cas de blocs auriculo-ventriculaires.

Le PA des fibres de Purkinje se distingue de celui des ventricules (Mérot *et al.*, 2000 ; Schram *et al.*, 2002 ; Figure 7) par (i) un potentiel membranaire (≈ -90 mV) plus hyperpolarisé de 5 à 10 mV, (ii) une phase de plateau du potentiel d'action qui a lieu à des potentiels négatifs alors que celle des ventricules est relativement positive ($\approx +10$ à $+20$ mV ; Han *et al.*, 2002), (iii) une durée plus longue et (iv) la présence d'une phase 4 de dépolarisation diastolique spontanée qui est à la base de l'automatisme de leur activité électrique (Hauswirth *et al.*, 1968 ; Shih, 1994). Pour des fréquences cardiaques faibles, la durée du potentiel d'action des fibres de Purkinje augmente plus que celle des ventricules (Moore *et al.*, 1965 ; Carmeliet, 1977), générant préférentiellement des post-dépolarisations précoces (EAD, *early afterdepolarisations* ; Nattel & Quantz, 1988). Chez l'homme, ces post-dépolarisations précoces sont responsables de réentrées dans le tissu endocardique adjacent aux fibres de Purkinje, à l'origine notamment des troubles du rythme ventriculaire associés aux syndromes du QT Long.

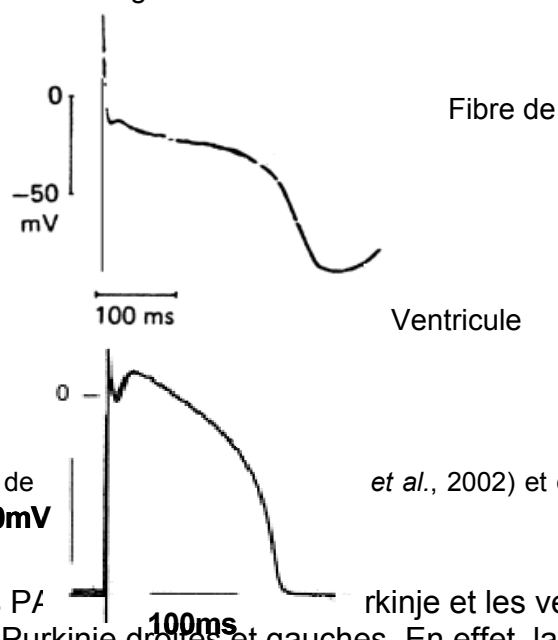


Figure 7 Potentiels d'action de fibres de Purkinje (Mérot *et al.*, 2000) et de ventricule (Mérot *et al.*, 2000) chez le chien.

A l'hétérogénéité des PA des fibres de Purkinje et les ventricules, s'ajoute celle entre les fibres de Purkinje droites et gauches. En effet, la durée du PA dans les fibres de Purkinje du ventricule droit est plus longue que dans celles du ventricule gauche.

A titre indicatif, le tableau 2 récapitule différents paramètres qui caractérisent les PA des compartiments auriculaire, ventriculaire, des fibres de Purkinje, de l'épicaarde et de l'endocarde du cœur humain.

Tableau 2 Propriétés des potentiels d'action des différents compartiments du cœur humain.

	cellules atriales	cellules ventriculaires	fibres de Purkinje	cellules épicaardiques	cellules endocardiques
Potentiel de membrane (mV)	-74	-80	-90	-86	-87
Potentiel d'action					
- Amplitude (mV)	93	108	107	104	105
- Durée à 90% de repolarisation (msec)	225	257	339	351	330
- Vmax (V/sec)	158	178	387	228	234
- Amplitude maximale (mV)	19	28	27	18	18

c. Mise en évidence au niveau de la cellule isolée : les courants ioniques

Chacune des cinq phases successives des PA correspond à des mouvements d'ions spécifiques. Les méthodes d'analyse de courants ioniques, introduites par Hodgkin et Huxley en 1952, ont permis d'identifier leur rôle dans la genèse du potentiel d'action (Hodgkin & Huxley, 1952). Ils ont en effet établi des équations mathématiques décrivant les propriétés d'activation, de désactivation et d'inactivation des conductances potassiques et sodiques de l'axone géant de calmar. Ces équations ont ensuite été utilisées pour l'analyse des cinétiques des autres courants.

La majorité des connaissances actuelles concernant les courants ioniques cardiaques ont été obtenues grâce à la méthode de voltage-clamp. En 1967, Reuter enregistra sur des fibres de Purkinje de mouton le premier courant calcique grâce à la technique de potentiel imposé en double-sucrose-gap (Reuter, 1967). Ce courant entrant présent lors de la dépolarisation de la membrane des fibres de Purkinje, se caractérisait par un pic vers 100ms et une durée d'inactivation longue. Le rôle d'un courant dans le PA étant déterminé par ses cinétiques, selon Reuter ces observations suggéraient qu'une entrée massive de calcium associée à l'activité de ce courant pouvait jouer un rôle important dans le maintien du plateau du PA. Par la suite, le développement de techniques plus sensibles comme le patch-clamp dans les années 1980 (Hamill *et al.*, 1981) a permis d'enregistrer de nouveaux courants tels que les deux composantes du courant calcique, $I_{Ca,L}$ et $I_{Ca,T}$, dans les cellules atriales de chien (Bean, 1985).

La phase de dépolarisation rapide du PA résulte de l'activation du courant sodique (I_{Na}). Cette phase est suivie par une repolarisation transitoire (phase 1), reflétant l'inactivation des canaux sodiques et l'activation du courant potassique transitoire sortant (I_{to}). Cette repolarisation transitoire ou "notch" influence le niveau de dépolarisation et la durée du plateau du PA (phase 2). La dépolarisation membranaire active également les courants calciques voltage-dépendants. L'influx de calcium à travers les canaux de type L ($I_{Ca,L}$) durant la phase de plateau est le principal activateur du couplage excitation-contraction du myocarde de travail. Durant cette phase la sortie de potassium est élevée et au fur et à mesure que les canaux calciques s'inactivent, les courants potassiques sortants deviennent prédominants. Il en résulte une repolarisation (phase 3) qui ramène le potentiel de membrane au niveau du potentiel de repos. Contrairement aux canaux calciques et sodiques, il y existe de multiples types de courants potassiques voltage-dépendants et voltage-indépendants, qui contribuent à la repolarisation du PA myocardique. La plus grande diversité fonctionnelle se trouve parmi la famille des courants voltage-dépendants. Il existe deux types de courants sortants transitoires, $I_{to,fast}$ et $I_{to,slow}$ ainsi que plusieurs courants à rectification retardée, dont I_{Kr} ($I_{K(rapide)}$), I_{Ks} ($I_{K(slow)}$) et I_{Kur} ($I_{K(ultrarapide)}$). La famille des courants voltage-indépendants comprend les courants à rectification entrante I_{K1} , $I_{K,ACh}$ et $I_{K,ATP}$. La durée du potentiel d'action cardiaque est déterminée par la balance entre les courants entrants dépolarisants et les courants sortants repolarisants, notamment durant les phases de plateau (phase 2) et de repolarisation (phase 3). La résistance membranaire étant forte durant ces deux phases, des changements subtils de densité des courants ioniques correspondants peuvent induire des variations importantes de la durée du PA. Durant la phase 4 du PA, le courant I_{K1} permet la stabilisation du potentiel de repos vers le potentiel d'équilibre du potassium (E_K).

i. Hétérogénéité électrique entre les tissus contractiles

L'hétérogénéité des PA auriculaires et ventriculaires est associée à des différences dans la nature et dans les propriétés de différents courants ioniques. Chez le chien, le courant calcique de type T, $I_{Ca,T}$, est détecté dans les oreillettes mais pas dans les ventricules (Nuss & Houser, 1993 ; Yue *et al.*, 1997). Parmi les courants ioniques responsables de la phase 3 de repolarisation du PA, le courant potassique ultrarapide à

rectification retardée I_{Kur} est présent dans les cellules auriculaires mais pas ventriculaires (Li *et al.*, 1996 ; Figure 8, page 23). Au contraire, la densité du courant I_{K1} est plus faible dans les oreillettes, expliquant la phase 3 de repolarisation plus lente par rapport aux ventricules et le potentiel de repos plus dépolarisé (Varro *et al.*, 1993 ; Wang *et al.*, 1998 ; Figure 9, page 23). Une étude chez le rat a montré que la densité du courant $I_{K,ACh}$ auriculaire est environ 6 fois supérieure à celle du ventricule (McMorn *et al.*, 1993). Lors de la stimulation parasympathique du courant $I_{K,ACh}$, le raccourcissement des PA au sein du tissu auriculaire est hétérogène (Ninomiya, 1966), pouvant contribuer aux troubles du rythme supraventriculaires (Liu & Nattel, 1997).

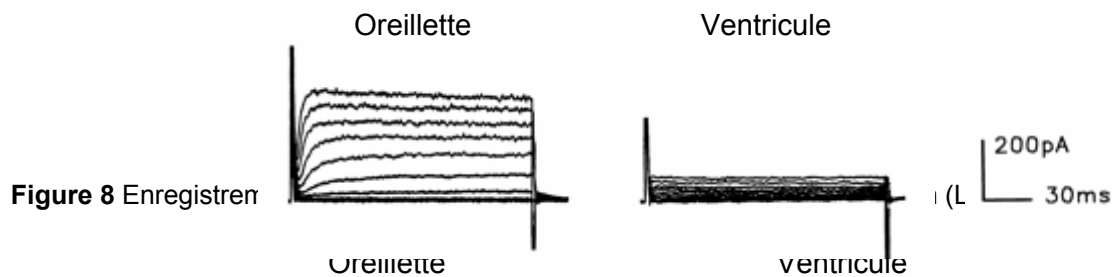


Figure 8 Enregistrer

Figure 9 Enre

Les b
attribuées à l

Chez l'homme, il semble que l'hétérogénéité de repolarisation de la paroi ventriculaire soit principalement liée au courant potassique transitoire sortant I_{to} , qui présente une densité environ 4 fois plus importante dans l'épicaire par rapport à l'endocarde (Näbauer *et al.*, 1996 ; Figure 10). Cette différence de densité est un élément clé de l'hétérogénéité de repolarisation transmurale puisqu'elle est associée à la présence spécifique du *spike and dome* au niveau du PA épicaire.

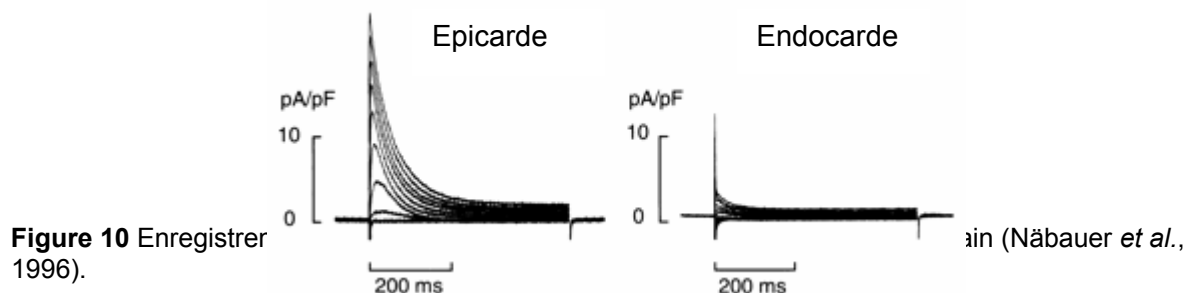


Figure 10 Enregistrer

I_{to} se caractérise par deux variants en terme de cinétique : $I_{to,fast}$ présente une cinétique d'inactivation rapide, alors que celle de $I_{to,slow}$ est lente (Näbauer *et al.*, 1996 ; Figure 11). $I_{to,fast}$ est majoritairement présent dans l'épicaire ventriculaire alors que la composante lente caractérise l'endocarde (Käbb & Näbauer, 2001).

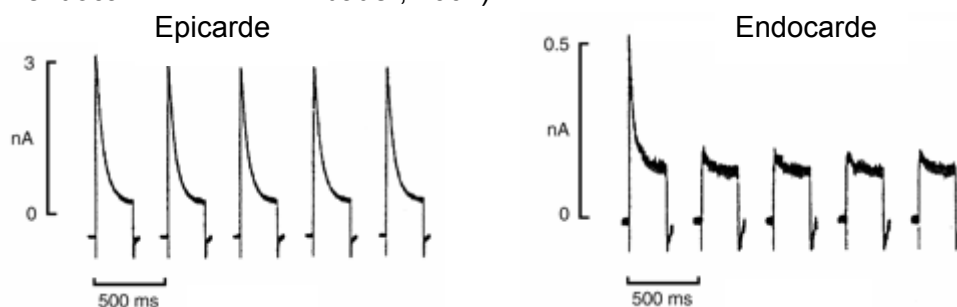


Figure 11 Cinétiques d'inactivation de I_{to} dans l'épicaarde et l'endocarde humain sain (Näbauer *et al.*, 1996).

Des travaux chez l'animal ont permis d'observer d'autres différences électrophysiologiques au sein de la paroi ventriculaire. Chez le rat, le courant sodique I_{Na} présente lui aussi un gradient transmural avec une densité supérieure dans l'endocarde (Ashamalla *et al.*, 2001). Par ailleurs, une étude chez le cobaye a montré une densité plus forte de I_{Kr} et I_{Ks} dans l'épicaarde par rapport à l'endocarde (Bryant *et al.*, 1998).

En accord avec une phase de repolarisation précoce plus marquée dans l'épicaarde ventriculaire droit par rapport au gauche, la densité du courant $I_{to,fast}$ y est plus importante (Di Diego *et al.*, 1996).

Les données concernant les différences apico-basal dans l'amplitude des courants ioniques sont limitées aux modèles animaux. Chez le chien, les cellules apicales présentent une densité du courant potassique I_{to} plus importante que les cellules de la base (Figure 12). Ce résultat est en accord avec une phase précoce de repolarisation proéminente dans l'apex. Par ailleurs, l'amplitude importante du courant I_{Ks} dans les cellules l'apex (environ 2 fois plus forte), pourrait permettre d'expliquer la durée plus courte de leur PA (Szentadrassy *et al.*, 2005 ; Figure 13, page 25).

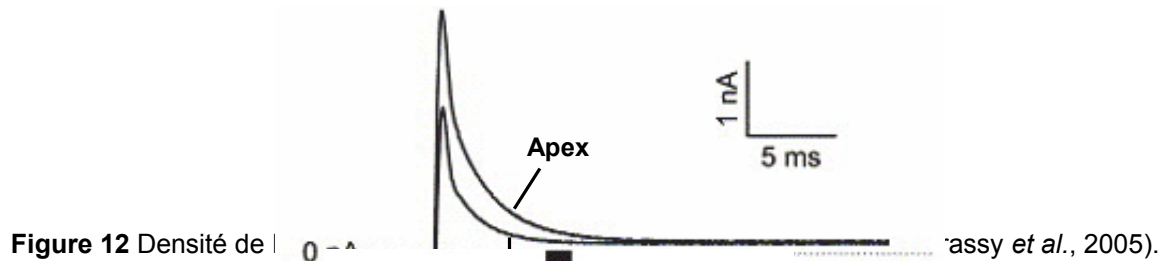


Figure 12 Densité de I_{to} dans l'apex du ventricule droit du chien (Szentadrassy *et al.*, 2005).

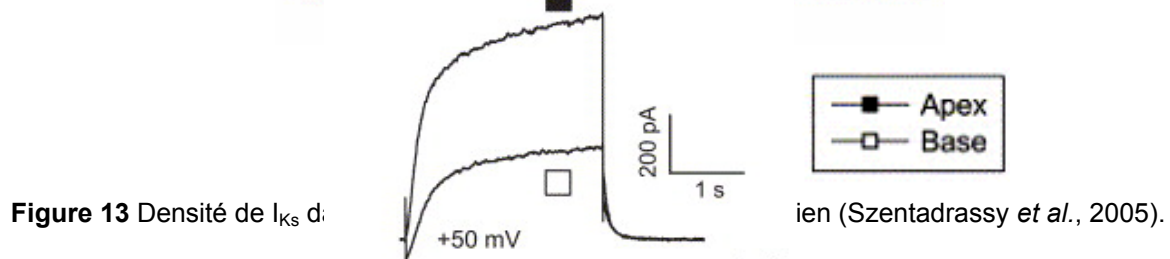


Figure 13 Densité de I_{Ks} dans l'apex et la base du ventricule droit du chien (Szentadrassy *et al.*, 2005).

ii. Hétérogénéité des propriétés électrophysiologiques des cellules pacemaker, contractiles et conductrices

Plusieurs différences dans les propriétés électrophysiologiques des fibres de Purkinje et du ventricule ont été observées. Les caractéristiques du courant I_f dans ces deux compartiments cardiaques est en accord avec l'activité automatique des fibres de Purkinje. En effet, une étude chez le chien montre que l'activation du courant I_f ventriculaire se fait à des potentiels plus négatifs que dans les fibres de Purkinje (Figure 14), et qui ne sont pas dans les gammes physiologiques (Yu *et al.*, 1995).

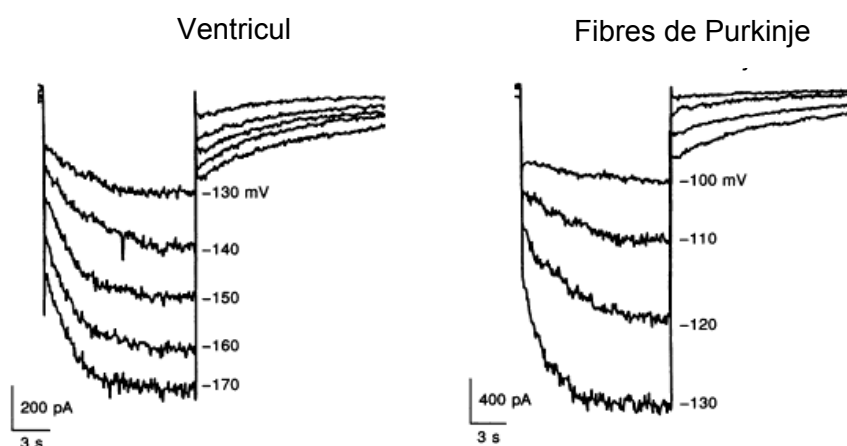
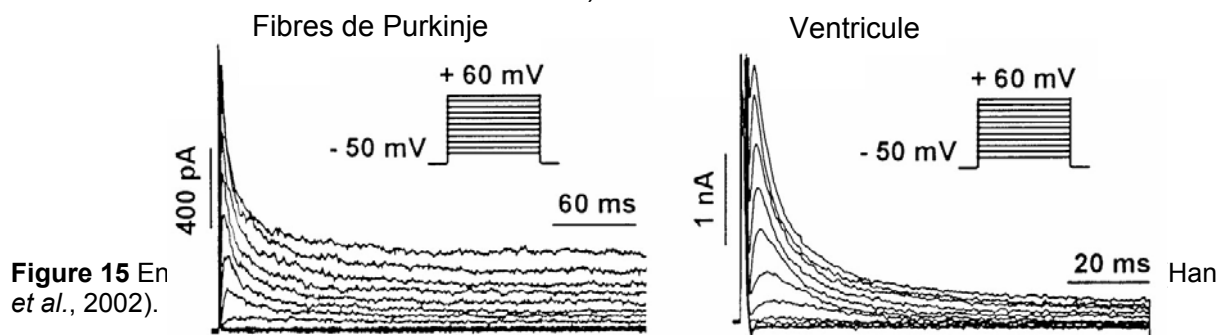


Figure 14 Enregistrement du courant I_f dans le ventricule et les fibres de Purkinje chez le chien (Yu *et al.*, 1995).

Une étude récente réalisée chez le chien a montré une hétérogénéité dans les caractéristiques du courant sodique. En effet, la contribution de la composante neuronale du courant I_{Na} est plus importante dans les fibres de Purkinje par rapport au ventricule (Haufe *et al.*, 2005). Deux classes de courants calciques ont été décrites dans le cœur : le type L (*long-lasting*) et le type T (*transient*). La densité de $I_{Ca,L}$ est plus importante dans le ventricule par rapport aux fibres de Purkinje. Ainsi, $I_{Ca,L}$ est le principal courant calcique des cellules ventriculaires alors que dans les fibres de Purkinje, $I_{Ca,T}$ contribue également significativement à l'activité électrique membranaire (Tseng & Boyden, 1989). Chez l'homme, la densité du courant I_{to} responsable de la première phase de repolarisation du PA est inférieure dans le ventricule par rapport aux fibres de Purkinje, en raison d'une cinétique d'inactivation plus rapide (Han *et al.*, 2002 ; Figure 15). D'autre part, les caractéristiques fonctionnelles et pharmacologiques de I_{to} dans ces deux compartiments sont différentes : ses cinétiques d'inactivation et de levée d'inactivation sont plus lentes dans les fibres de Purkinje, et sa sensibilité au 4-Aminopyridine (4-AP) et au tétraéthylammonium (TEA) est plus faible dans le ventricule. En effet, alors que le 4-AP supprime presque totalement le courant I_{to} des fibres de Purkinje, seulement 50% d'inhibition est observé au niveau ventriculaire. Le TEA ne modifie pas le courant I_{to} ventriculaire alors qu'il inhibe fortement celui des fibres de Purkinje (Han *et al.*, 2002).



Etant donné les difficultés d'isolement, seule une étude a décrit l'enregistrement de plusieurs courants (I_{K1} et I_{to}) dans les fibres de Purkinje chez l'homme (Han *et al.*, 2002).

Le tableau 3 récapitule les principaux courants ioniques enregistrés chez l'homme dans les compartiments auriculaire et ventriculaire, dans les fibres de Purkinje ainsi que dans l'épicaarde et l'endocarde.

Tableau 3 Principaux courants ioniques du PA, enregistrés dans les différents compartiments du cœur humain. +++ ; ++ ; + : représentation décroissante de la densité des courants. ? : pas de donnée disponible chez l'homme.

		cellules atriales	cellules ventriculaires	fibres de Purkinje	cellules épicaardiques	cellules endocardiques
Courant majeur de la phase 0	I_{Na}	+++	+++	?	?	?
Courant majeur de la phase 1	I_{to}	++	++	+	+++	+
Courant majeur de la phase 2	$I_{Ca,L}$	++	++	?	?	
Courants majeurs de la phase 3	I_{Kur}	+++	+	?	?	?
	I_{Ks}	++	++	?	?	?
	I_{Kr}	++	++	?	?	?
	$I_{K,ACh}$	+++	+	?	?	?
Courants majeurs de la phase 4	I_{K1}	+	++	++	?	?
	I_f	+	+	?	+	+

2. Hétérogénéité électrique liée au sexe

Les méthodes d'enregistrement de l'activité électrique du cœur ont permis d'identifier des différences entre les hommes et les femmes dans la physiologie et la pathologie du système cardiovasculaire. La première observation d'une hétérogénéité liée au sexe au niveau de l'ECG a été faite par Bazett il y a 86 ans (Bazett, 1920). Il nota que les femmes ont un intervalle QT corrigé (QTc) significativement plus long que celui des hommes, bien qu'elles aient également une fréquence cardiaque plus élevée. De nombreuses études ont par la suite confirmé ces observations (Levinson *et al.*, 1985 ; Merri *et al.*, 1989 ; Rautaharju *et al.*, 1992 ; Burke *et al.*, 1996 ; Huikuri *et al.*, 1996 ; Burke *et al.*, 1997 ; Stramba-Badiale *et al.*, 1997 ; Yang *et al.*, 1997 ; Bidoggia *et al.*, 2000 ; Rodriguez *et al.*, 2001 ; Smetana *et al.*, 2002 ; Smetana *et al.*, 2003).

a. Les hormones stéroïdiennes : bref rappel

Il existe trois grandes catégories d'hormones stéroïdiennes : (i) les androgènes, (ii) les œstrogènes et (iii) les progestagènes :

- Androgènes
 - o Testostérone
 - o Androstènedione
 - o Dihydrotestostérone
 - o Déhydroépiandrostérone
 - o Stéroïdes anabolisants
- Œstrogènes
 - o Œstradiol
 - o Œstrol
 - o Œstriol
- Progestagène
 - o Progestérone

Les androgènes, ou hormones masculines, permettent le développement des caractères sexuels mâles. Ainsi, la production de testostérone, principale hormone masculine, augmente au cours de la puberté puis reste constante.

L'œstrogène et la progestérone sont deux hormones féminines sécrétées par les ovaires. On parle donc d'hormones ovariennes. Les œstrogènes sont responsables du développement des caractères sexuels féminins et, avec la progestérone, ils régulent les fonctions reproductrices chez la femme. Durant les 28 jours du cycle menstruel, leurs taux évoluent : la production d'œstrogènes domine pendant la phase folliculaire alors que c'est celle de progestérone qui est majoritaire durant la phase lutéale (Figure 16). La ménopause correspond à la réduction de la production d'œstrogènes et de progestérone.

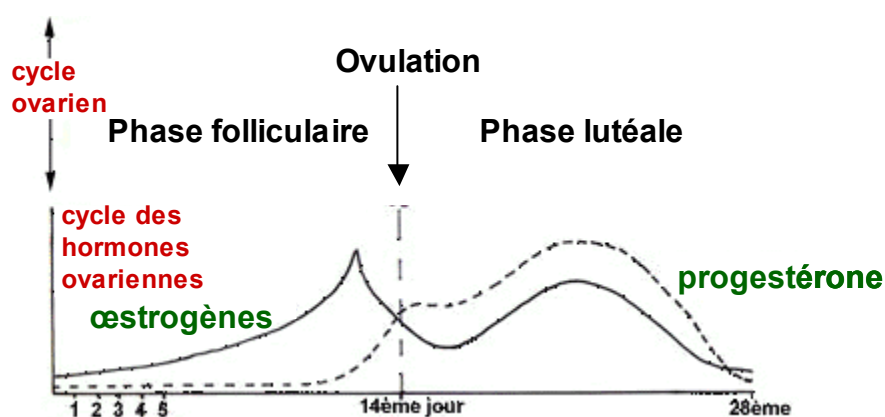


Figure 16 Représentation schématique du cycle des hormones ovariennes durant les phases du cycle ovarien.

b. La fréquence cardiaque

Les femmes ont un rythme cardiaque plus rapide que celui des hommes (Silva de Paula *et al.*, 2005 ; Figure 17). Cette différence de fréquence des battements cardiaques en fonction du sexe apparaît durant l'adolescence et persiste à l'âge adulte (Taneja *et al.*, 2001). Bien que le mécanisme responsable de cette hétérogénéité n'ait pas été complètement défini, des études suggèrent qu'elle pourrait être liée à une différence dans la fonction du système nerveux autonome (Jose & Collison, 1970 ; Burke *et al.*, 1996). Par ailleurs, les légères fluctuations de ce rythme au cours du cycle menstruel chez la femme suggèrent une influence directe des hormones sexuelles sur la fréquence cardiaque (Burke *et al.*, 1996).

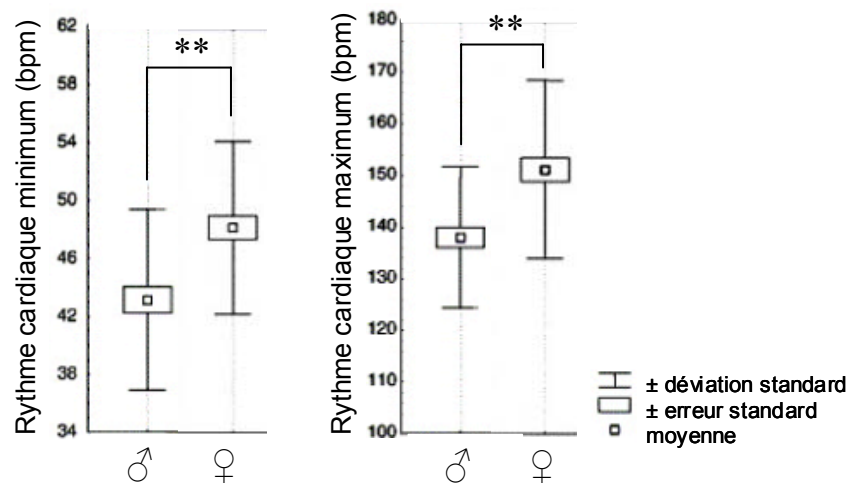


Figure 17 Rythme cardiaque minimum (A) et maximum (B) chez les hommes (♂, n=46) et les femmes (♀, n=58). ** $p < 0.01$ (modifié d'après Silva de Paula *et al.*, 2005).

c. Hétérogénéité de repolarisation ventriculaire

Plusieurs différences dans l'activité électrique cardiaque ventriculaire ont été observées en fonction du sexe : (i) une différence de durée d'intervalle QTc, (ii) une différence dans l'adaptation de l'intervalle QT au rythme cardiaque, et enfin (iii) une différence de morphologie de l'onde T.

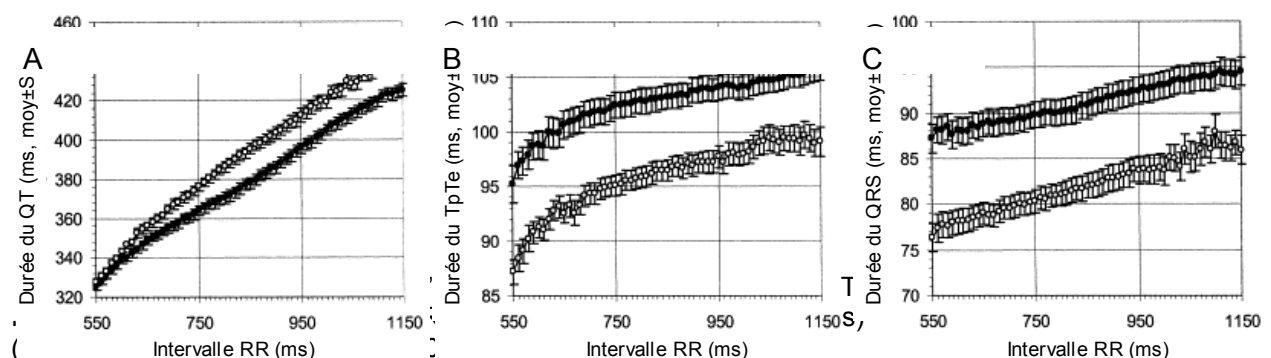
La durée de l'intervalle QTc est plus longue d'environ 24 ms (6%) chez les femmes par rapport aux hommes (Bazett, 1920 ; Benton *et al.*, 2000 ; Pham & Rosen, 2002). Plusieurs études ont permis de mieux comprendre le mécanisme responsable de cette hétérogénéité. Tout d'abord, après blocage du système autonome alors que la durée de l'intervalle QTc augmente, cette différence liée au sexe persiste, suggérant qu'un processus intrinsèque en est responsable (Burke *et al.*, 1997). Par ailleurs, cette différence, qui n'apparaît qu'au moment de la puberté (McCammon, 1961 ; Rautaharju *et al.*, 1992 ; Stramba-Badiale *et al.*, 1995), semble être due à un raccourcissement du QT chez les hommes plutôt qu'à un allongement chez les femmes (Rautaharju *et al.*, 1992). L'intervalle QTc reste ensuite plus court chez les hommes par rapport aux femmes jusqu'à l'âge d'environ 50 ans (Rautaharju *et al.*, 1992). La puberté coïncide avec les plus forts niveaux d'hormones androgènes circulantes chez les hommes. Il semble donc que ces hormones masculines jouent un rôle majeur dans le raccourcissement de l'intervalle QT. Des études de populations d'hommes castrés et de femmes virilisées semblent confirmer cette idée. En effet, les hommes castrés présentent une durée d'intervalle QTc similaire à celle des

femmes. De la même manière, la durée de cet intervalle est similaire entre les femmes virilisées et les hommes (Bidoggia *et al.*, 2000). A l'inverse, il semble que l'influence des hormones ovariennes sur la durée de l'intervalle QT soit moins claire, puisque la durée de cet intervalle ne varie pas au cours du cycle menstruel (Burke *et al.*, 1997 ; Rodriguez *et al.*, 2001 ; Hulot *et al.*, 2003).

L'adaptation de la durée de l'intervalle QT à la fréquence est différente entre les deux sexes. La relation QT:RR est plus marquée chez les femmes que chez les hommes et les différences de durée d'intervalle QT sont plus visibles à faible fréquence (Lepeschkin, 1956 ; Kligfield *et al.*, 1996 ; Stramba-Badiale *et al.*, 1997 ; Smetana *et al.*, 2003 ; Figure 18 A, page 30). Les hommes ont par ailleurs une plus forte dispersion de leur intervalle QT par rapport aux femmes et donc une plus grande variabilité du temps de relaxation ventriculaire (Kassotis *et al.*, 2000). Plusieurs études ont rapporté un rôle des hormones ovariennes sur la dispersion de l'intervalle QT. En effet, celle-ci augmenterait au cours de la ménopause (Saba *et al.*, 2001) et réduirait sous l'effet d'une thérapie combinée d'œstrogène et de progestagène (Haseroth *et al.*, 2000 ; Yildiri *et al.*, 2001).

Les hommes présentent également une durée d'intervalle plus longue entre le pic et la fin de l'onde T ($T_{peak-Tend}$, $TpTe$), suggérant une plus grande hétérogénéité transmurale de repolarisation ventriculaire (Nakagawa *et al.*, 2003 ; Smetana *et al.*, 2003 ; Figure 18 B). Une étude montre que à la suite d'une ovariectomie, les femmes en pré-ménopause présentent un allongement de la durée de l'onde T et donc une augmentation de la variabilité de la repolarisation transmurale. Cet effet est réversible lors de l'administration d'œstradiol (De Leo *et al.*, 2000).

L'ensemble de ces données témoignent donc de différences liées au sexe dans l'adaptation au rythme et dans l'hétérogénéité régionale de la repolarisation ventriculaire. Elles semblent également suggérer un rôle des hormones ovariennes sur l'homogénéité de la repolarisation ventriculaire chez la femme.



d. Autres paramètres électrocardiographiques.

L'onde P de l'ECG est significativement plus longue chez les hommes par rapport aux femmes (Dhala *et al.*, 2002). Une étude a montré que la période réfractaire effective auriculaire est plus courte chez les femmes en pré-ménopause par rapport aux hommes de même âge ou aux femmes post-ménopausées (Tse *et al.*, 2001). L'effet de la ménopause sur ce paramètre suggère un rôle des hormones stéroïdiennes dans la modulation des propriétés électrophysiologiques atriales. Plusieurs études ont également montré des différences en fonction du sexe dans la fonction du nœud auriculo-ventriculaire et du système de conduction. L'intervalle PR, fortement influencé par le délai de conduction dans le nœud auriculo-ventriculaire, est plus long chez les hommes par rapport aux femmes (Liu *et al.*, 2001). Les intervalles entre les oreillettes et le faisceau de His (intervalle HA) et entre le faisceau de His et les ventricules (intervalle HV) sont également significativement plus longs chez les hommes par rapport aux femmes (Liu *et al.*, 2001). Enfin, une durée plus

longue du complexe QRS chez les hommes par rapport aux femmes a également été décrite (Taneja *et al.*, 2001 ; Smetana *et al.*, 2003 ; Figure 18 C, page 30). Ces résultats montrent donc que la vitesse de conduction est globalement plus lente chez les hommes.

Le tableau 4 récapitule les valeurs moyennes obtenues pour les paramètres électrocardiographiques qui présentent une différence statistique entre les hommes et les femmes.

Tableau 4 Valeurs moyennes des paramètres ECG qui présentent une différence statistique entre les hommes et les femmes

	Hommes	Femmes
Fréquence cardiaque (bat/min)	74 +/- 9.5	78.2 +/- 9.4
Durée onde P (ms)	133 +/- 6	130 +/- 9
Intervalle PR (ms)	160 +/- 17	152 +/- 13
Intervalle AH (ms)	83 +/- 15	78 +/- 14
Intervalle HV (ms)	42 +/- 6	38 +/- 6
Durée du QRS (ms)	95 +/- 8	86 +/- 6
Intervalle QTc (ms)	407 +/- 7	395 +/- 9
Durée TpTe (ms)	106 +/- 6	99 +/- 5

congénitale (ou familiale) et induite par des traitements pharmacologiques (ou acquise). Il est associé à un risque d'arythmie ventriculaire dont la prévalence varie en fonction du sexe. En effet, il a été largement décrit que l'incidence des torsades de pointes (TdP) est plus importante chez les femmes, dans le contexte de formes familiales et acquises du LQTS (Makkar *et al.*, 1993 ; Ebert *et al.*, 1998 ; Pham & Rosen, 2002 ; Wolbrette, 2002 ; Abi-Gerges *et al.*, 2004a). Il est difficile d'expliquer cette prédominance des TdP chez les femmes étant donné que ce sont les hommes qui présentent une forte dispersion de repolarisation ventriculaire (Yang *et al.*, 1997 ; Kassotis *et al.*, 2000 ; Smetana *et al.*, 2002 ; Nakagawa *et al.*, 2003 ; Smetana *et al.*, 2003). Cependant, chez les femmes la durée minimum de l'intervalle QTc est plus longue que chez les hommes. C'est cette dernière caractéristique qui semble prédisposer les femmes au risque élevé de survenue de TdP (Kassotis *et al.*, 2000). Parallèlement, une étude récente a montré que les femmes ont une plus grande hétérogénéité localisée de leur repolarisation ("*T wave residuum*"). Les auteurs suggèrent que l'augmentation de cette hétérogénéité par des traitements pharmacologiques ou des mutations, modifiant les propriétés des canaux ioniques, pourrait également participer à la différence de susceptibilité aux TdP en fonction du sexe (Smetana *et al.*, 2002).

L'hétérogénéité en fonction du sexe de l'incidence d'évènements cardiaques, tels que des épisodes de syncope ou de mort subite, varie selon le type de LQTS congénital. Il semble que cette influence du sexe ne concerne que les formes associées à la mutation d'un canal potassique. En effet, les femmes présentant un LQT1 (mutations sur *KCNQ1*) ou un LQT2 (mutations sur *KCNH2*) sont plus exposées à la survenue de ces évènements cardiaques, ainsi qu'à la prolongation de la durée de l'intervalle QTc par rapport aux hommes (Pietila *et al.*, 2002 ; Zareba *et al.*, 2003). Au contraire, ces différences n'existent pas entre les patients en LQT3 (mutations sur *SCN5A*) (Lehmann *et al.*, 1997 ; Zareba *et al.*, 2003). Une mutation du gène *KCNJ2* (R67W) associée au syndrome d'Andersen et au LQT7 se caractérise également par des phénotypes spécifiques en fonction du sexe : les femmes présentent des arythmies ventriculaires et les hommes une paralysie périodique du muscle squelettique. Ces résultats renforcent donc l'idée d'un effet protecteur du genre masculin contre les arythmies associées au LQTS congénital (Andelfinger *et al.*, 2002).

Les traitements pharmacologiques qui prolongent la repolarisation cardiaque induisent plus fréquemment des TdP chez les femmes que chez les hommes (Makkar *et al.*, 1993). Les données concernant le rôle potentiel des hormones sexuelles dans ce mécanisme sont limitées. Cependant, l'étude récente d'une population saine a montré que sous traitement par un anti-arythmique de classe III (ibutilide), la prolongation de l'intervalle QTc et la susceptibilité aux torsades de pointes est plus faible chez les hommes (Gowda *et al.*, 2004). Ainsi, comme pour les LQTS familiaux, les hormones androgènes semblent avoir un effet protecteur en limitant la prolongation de l'intervalle QTc (Rodriguez *et al.*, 2001).

ii. Le syndrome de Brugada

Le syndrome de Brugada est caractérisé par une tachycardie ventriculaire pouvant mener à la mort subite (Antzelevitch & Fisch, 2001 ; Brugada *et al.*, 2002 ; Antzelevitch *et al.*, 2003). Il se traduit par un profil électrocardiographique particulier reflétant des anomalies de repolarisation ventriculaire : accentuation de l'onde J (onde qui suit le complexe QRS), élévation du segment ST, inversion de l'onde T (Osher & Wolff, 1953). 20% des patients sont porteurs d'une mutation. La grande majorité des mutations ont été jusqu'à maintenant identifiées dans le gène *SCN5A*, codant un canal sodique.

Bien que la transmission du syndrome de Brugada soit identique entre les hommes et les femmes, il existe une prédominance du phénotype chez les hommes (Remme *et al.*, 2001 ; Priori *et al.*, 2002 ; Wilde *et al.*, 2002). Par exemple, dans l'est de l'Asie où le syndrome est le plus répandu, 8 hommes sont diagnostiqués pour 1 femme (Miyazaki *et al.*, 1996 ; Nademanee *et al.*, 1997 ; Wilde *et al.*, 2002). La prédominance masculine de cette pathologie n'est pas complètement comprise mais elle semble impliquer un rôle de la testostérone. En effet, chez deux patients Brugada, la castration chirurgicale a entraîné la normalisation du segment ST (Matsuo *et al.*, 2003).

iii. La mort subite

La cause la plus fréquente de décès dans les pays industrialisés demeure la mort subite liée à la maladie coronarienne ou à l'insuffisance cardiaque (40000 décès par an en France). Dans ce contexte, la prévalence de la mort subite est plus importante chez les hommes que chez les femmes (Schatzkin *et al.*, 1984 ; Kannel *et al.*, 1998a). Chez les patients insuffisants cardiaques, la plus forte dispersion de repolarisation ventriculaire chez les hommes pourrait permettre d'expliquer cette différence en fonction du sexe dans la prévalence de la mort subite (Manttari *et al.*, 1997 ; Zabel *et al.*, 2000 ; Crow *et al.*, 2003 ; Kearney *et al.*, 2004). L'ensemble de ces données semblent donc suggérer que la plus forte dispersion de repolarisation chez les hommes pourrait contribuer à l'initiation et au maintien des arythmies ventriculaires pouvant mener à la mort subite (Smetana *et al.*, 2002 ; Nakagawa *et al.*, 2003 ; Smetana *et al.*, 2003).

iv. La fibrillation auriculaire

La fibrillation auriculaire (FA) est l'arythmie cardiaque la plus fréquente. Elle se caractérise par une activation rapide et irrégulière des oreillettes. L'étiologie de la FA est complexe, puisqu'elle est associée à de multiples causes (Nattel, 2002a). Deux études à large échelle ont montré une prédominance de la FA chez les hommes (Kannel *et al.*, 1998b ; Friberg *et al.*, 2003). La taille de l'oreillette gauche est aussi un facteur prédisposant à la FA, probablement de part les larges surfaces dans lesquelles des circuits de réentrée peuvent s'installer (Vaziri *et al.*, 1994). La taille de l'oreillette gauche, en moyenne supérieure chez les hommes, pourrait donc également contribuer à la différence en fonction du sexe dans la prévalence de la FA (Friberg *et al.*, 2003). Par ailleurs étant donné que les traitements qui prolongent la durée de la repolarisation induisent plus d'arythmies ventriculaires chez les femmes, il est difficile de traiter leur FA par des antiarythmiques de classe I (qui prolongent la durée du PA), traitements classiques de la FA. Il semble donc nécessaire d'optimiser des thérapeutiques spécifiques à chaque sexe (Wolbrette, 2003).

f. Apports des modèles animaux

Chez l'Homme, les différences en fonction du sexe dans l'incidence de certaines arythmies cardiaques semblent donc être associées à des différences dans la repolarisation ventriculaire plus longue chez les femmes et plus dispersée chez les hommes. Il semble également que les hormones sexuelles aient une influence sur les caractéristiques de la repolarisation ventriculaire et sur la survenue d'arythmies. La plupart des informations concernant les mécanismes de ces différences en fonction du sexe proviennent d'études de modèles animaux.

i. Le lapin

Ce modèle présente un certain nombre d'analogies par rapport à l'Homme : les femelles présentent (i) une durée de l'intervalle QTc supérieure aux mâles (Lu *et al.*, 2001), (ii) une susceptibilité plus forte à la prolongation de l'intervalle QTc et à la survenue d'arythmies après un traitement pharmacologique (Pham & Rosen, 2002) et (iii) une meilleure adaptabilité de l'intervalle QT au rythme cardiaque (Ebert *et al.*, 1998 ; Liu *et al.*, 1998 ; Lu *et al.*, 2001 ; Liu *et al.*, 2003). Ainsi, les femelles sont actuellement utilisées pour identifier les molécules pharmacologiques qui pourraient prolonger la durée de l'intervalle QT (Hondeghe *et al.*, 2003 ; Hondeghe & Hoffmann, 2003).

Le QT plus court chez les mâles pourrait être dû à une densité supérieure des courants I_{Kr} et I_{K1} (Liu *et al.*, 1998). Dans une étude sur mâles castrés puis traités à la testostérone, leur densité augmente. Ce résultat suggère donc un rôle de cette hormone dans les différences en fonction du sexe, dans la repolarisation ventriculaire, par modulation de ces courants (Liu *et al.*, 2003 ; Cheng, 2006). Par ailleurs, l'ovariectomie chez les femelles réduit la survenue d'arythmies induites par un traitement pharmacologique, suggérant une action pro-arythmique de certains facteurs ovariens (Pham *et al.*, 2001).

Pham *et al.*, ont observé des différences transmurales dans la durée du PA à 30% de repolarisation chez les femelles mais pas chez les mâles. Par ailleurs, seules les femelles présentent un gradient transmural du courant $I_{Ca,L}$, avec une densité plus importante dans l'épicaarde. Ce gradient pourrait donc participer à la forte dispersion transmurale de durée du PA chez les femelles et prédisposer à l'arythmogénèse. Etant donné que l'ovariectomie supprime l'hétérogénéité transmurale de densité du courant $I_{Ca,L}$ (Pham *et al.*, 2002), on peut suggérer que les hormones femelles pourraient contribuer, via la modulation de $I_{Ca,L}$, à la susceptibilité aux TdP (Cheng, 2006).

ii. Le chien

Une étude récente a permis de montrer que les chiens présentent des différences électrophysiologiques liées au sexe similaires à celles observées chez l'Homme et le lapin : les femelles présentent (i) une durée de repolarisation plus longue que les mâles et (ii) une plus forte susceptibilité à sa prolongation et à la survenue d'arythmies sous l'effet d'un traitement pharmacologique (Abi-Gerges *et al.*, 2004b). Ainsi, le modèle de chien est couramment utilisé pour identifier les agents thérapeutiques susceptibles d'induire une prolongation du QT et des TdP (Eckardt *et al.*, 1998 ; Redfern *et al.*, 2003).

Chez le chien, le "notch" en phase 1 de repolarisation est plus marqué dans l'épicaarde ventriculaire droit des mâles par rapport aux femelles. Cette hétérogénéité liée au sexe est associée à une différence de densité du courant I_{to} dans l'épicaarde droit : elle est supérieure chez les mâles par rapport aux femelles (Di Diego *et al.*, 2002). Ces différences n'existent pas dans le ventricule gauche (Di Diego *et al.*, 2002). Toute condition modifiant la balance entre les courants entrants et sortants durant la phase 1 de repolarisation peut induire une repolarisation précoce, une augmentation de la dispersion de repolarisation et des arythmies (Antzelevitch & Fish, 2001). Ainsi, cette hétérogénéité électrique caractéristique des mâles pourrait participer à leur dispersion de repolarisation, générant ainsi une incidence supérieure des arythmies dans le ventricule droit des mâles par rapport aux femelles (Di Diego *et al.*, 2002).

iii. La souris

Bien que la souris présente des différences importantes par rapport à l'Homme, i.e. rythme cardiaque supérieur et durée du PA ventriculaire plus courte, d'un facteur d'environ dix, des différences comparables en fonction du sexe ont été décrites. En effet, la durée du PA ventriculaire est plus longue chez les femelles que chez les mâles de 34% en moyenne (Trépanier-Boulay *et al.*, 2001), et la susceptibilité aux arythmies induites par un traitement pharmacologique est significativement plus importante chez les femelles (Drici *et al.*, 2002). Une densité plus faible du courant I_{Kur} chez les femelles par rapport aux mâles a par ailleurs été observée (Trépanier-Boulay *et al.*, 2001). De plus, chez la souris une déficience en androgènes mène à la réduction de la densité de I_{Kur} et à la prolongation de la durée du PA ventriculaire, suggérant un rôle des hormones sexuelles dans les différences en fonction du sexe dans la repolarisation (Brouillette *et al.*, 2003). La validité des résultats doit cependant être considérée avec précaution étant donnée 1) que l'enregistrement de PA a été réalisé *in vitro* sur cellules isolées, et 2) que les résultats sont contradictoires en fonction de la souche de souris utilisée. En effet, les différences mâle-femelle décrites ci-dessus ont été observées sur des souches non-consanguines comme les CD-1 ou OF1, or l'utilisation de souches consanguines à fond génétique stable telles que les C57BL6 ou FVB ne permet pas de les observer (Brunet *et al.*, 2004).

iv. Le cobaye

Durant la phase lutéale du cycle ovarien, les femelles cobayes présentent, comme chez la femme, des variations de concentration en œstrogène et progestérone circulants : un niveau élevé d'œstrogène en début de phase et un pic de progestérone après 4 jours (Shi *et*

al., 1999 ; Petanceska *et al.*, 2000). De plus, la durée du PA chez les femelles est plus longue que chez les mâles.

Plusieurs études ont permis de démontrer des différences dans la densité de courants ioniques en fonction du sexe qui varient avec le statut ovarien des femelles. Bien que la densité du courant $I_{Ca,L}$ soit plus faible chez les femelles par rapport aux mâles, elle présente des fluctuations au cours du cycle ovarien : elle est la plus importante au moment du pic d'œstrogène et réduit avec celui de progestérone (James *et al.*, 2004). Ce résultat suggère donc un rôle des hormones ovariennes dans la modulation de la densité de ce courant. A l'inverse, la densité du courant I_{K1} ne varie pas avec les différentes phases du cycle ovarien, cependant elle est plus importante chez les mâles, en accord avec une durée de PA plus courte (James *et al.*, 2004). La densité du courant I_{Kr} semble également varier en fonction du cycle. En effet, lors du pic de progestérone elle est plus importante chez les mâles, alors qu'il n'y a pas de différence au moment du pic d'œstrogène (James *et al.*, 2004). Ces résultats semblent donc suggérer que les variations cycliques des niveaux des hormones ovariennes peut moduler l'électrophysiologie cardiaque (Cheng, 2006).

C. REMODELAGE ÉLECTRIQUE CARDIAQUE

Après avoir décrit l'hétérogénéité électrique intrinsèque au cœur et liée au sexe, la deuxième partie introductive s'intéressera au remodelage électrique dans la FA, dans le syndrome de Brugada et dans l'insuffisance cardiaque.

L'étude des troubles de l'activité rythmique du cœur a démarré autour du cinquième siècle avant J.C. en Chine, et en Egypte autour de 3000 ans avant J.C. avec l'analyse du pouls (pour revue, Snellen, 1984 ; Acierno, 1994 ; Lüderitz, 1995 ; Ziskind & Halioua, 2004). C'est en 1872 que Heidenhain introduisit le terme d'arythmie pour désigner toute perturbation du rythme cardiaque. Le diagnostic des arythmies cardiaques dépend de la capacité à enregistrer l'activité électrique du cœur. Ainsi, à la suite de la mise au point du galvanomètre à cordes (Einthoven, 1901), l'étude des arythmies s'est très rapidement développée.

1. Remodelage électrique associé à la fibrillation auriculaire

a. Historique

Il a été proposé que la première description de la fibrillation auriculaire (FA) puisse avoir été faite en 1611 par William Shakespeare lorsqu'il écrivit dans sa pièce *The Winter's*

Tale : "J'ai des palpitations en moi : mon cœur danse ; Mais pas pour la joie, pas la joie" (*I have tremor cordis on me: my heart dances; But not for joy, not joy*) (Lüderitz, 2003).

Les premiers enregistrements électrocardiographiques de la FA ont été réalisés par Einthoven (1906 ; 1908) et par Hering (1908). C'est en 1909 que Rothberger et Winterberg ont donné son nom à cette arythmie supraventriculaire. Au niveau électrocardiographique, des ondes f ont été décrites comme caractérisant l'activité fibrillatoire des oreillettes (Hering, 1908 ; Lewis, 1909). Deux mécanismes d'induction de la FA ont également été décrits à cette époque : un foyer unique à activité rapide (Rotherberger & Winterberg, 1909 ; Rotherberger & Winterberg, 1915) et un mécanisme multifocal (Lewis & Schleiter, 1912).

b. Description

La fibrillation auriculaire est l'arythmie cardiaque la plus fréquente en pratique clinique (environ 1% de la population des pays développés ; Benjamin *et al.*, 1998) et son incidence augmente avec l'âge, de 0.5% des quinquagénaires, à 10% au delà de 80 ans (Gutierrez & Lopez, 2004). Elle est, par ailleurs, en nette augmentation du fait du vieillissement de la population dans les pays développés.

La FA se caractérise par une activité rapide et irrégulière des oreillettes. Alors que la fréquence cardiaque sous le contrôle du nœud sinusal est d'environ 60 battements par minute, la fréquence atriale peut être de 400 à 600 par minute lors d'épisodes de FA. Si chaque excitation auriculaire était conduite aux ventricules, la contraction ventriculaire serait complètement inefficace et mènerait rapidement au décès. Le nœud auriculo-ventriculaire joue le rôle de filtre, limitant le nombre d'excitations conduites aux ventricules mais de manière inconstante. Par conséquent, le rythme ventriculaire lors d'un épisode de FA est irrégulier et d'environ 150 contractions par minute.

Il existe 3 types évolutifs de FA : 1) la FA paroxystique dans laquelle les épisodes d'arythmie s'arrêtent spontanément en quelques minutes à quelques jours, 2) la FA persistante qui dure plus d'une semaine, ne présente pas de régularisation spontanée mais peut-être traitée par cardioversion et 3) la FA permanente ou chronique qui se maintient sur le long terme (> 1 mois) et pour laquelle le retour en rythme sinusal n'est plus possible. Un patient en FA paroxystique progresse souvent vers une FA chronique. Une étude a montré que la durée de la FA paroxystique semble être importante puisque lorsqu'elle est inférieure à 2 jours, la transition vers la FA chronique se produit chez 31% des patients, contre 46% pour une durée plus longue (Godtfredsen, 1975). Cette progression est due au fait que la FA est capable de s'auto-entretenir. Ce mécanisme a été mis en évidence par l'équipe d'Alessie, grâce au modèle de fibrillation auriculaire induit par stimulation atriale rapide chez la chèvre. Dans ce modèle, le temps passé en FA avant le retour en rythme sinusal est proportionnel au temps de fibrillation imposé par la stimulation, jusqu'à devenir permanent. Cette étude a donc permis de mettre en évidence que la FA modifie le substrat atrial conduisant elle-même à son induction et à son maintien ("AF begets AF") (Wijffels *et al.*, 1995 ; Figure 19).

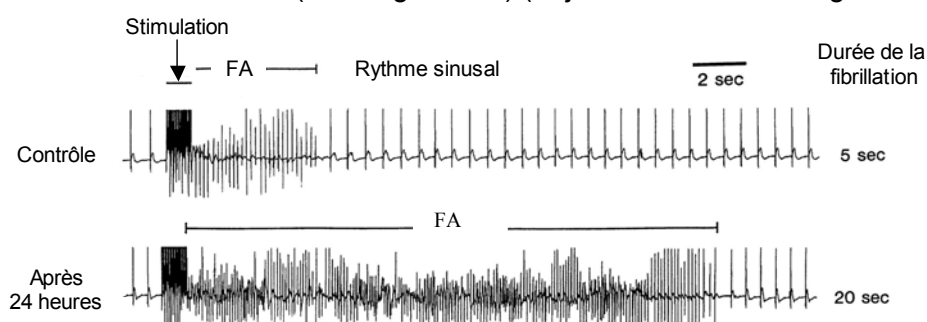


Figure 19 Prolongation de la durée de FA après stimulation atriale pendant 24 heures et 2 semaines d'un modèle de chèvre (modifié d'après Wijffels *et al.*, 1995).

Une autre classification de la FA peut être réalisée sur la base de son étiologie. Dans les cas les plus fréquents, la FA vient compliquer une cardiopathie structurale déjà présente, telle qu'une pathologie valvulaire, une hypertension artérielle ou une insuffisance cardiaque. Au contraire, dans 15% des cas, aucun substrat pathologique n'est diagnostiqué. On parle alors de FA idiopathique. Les FA d'origine génétique sont très rares en comparaison des formes acquises (environ 5 %, Darbar *et al.*, 2003). Dix loci impliqués dans cette forme familiale ont été à ce jour identifiés. Un premier locus a été rapporté sur le chromosome 10 mais sans qu'un gène responsable ait été à ce jour mis en évidence (Brugada *et al.*, 1997). Depuis, neuf autres loci ont été révélés et sept gènes identifiés. Six d'entre eux codent pour des sous-unités des canaux potassiques et le dernier pour une protéine d'ancrage à la membrane. Une mutation dans le gène *KCNQ1* (Chen *et al.*, 2003) a été la première identifiée, puis la même équipe a mis en évidence une mutation dans le gène *KCNE2* (Yang *et al.*, 2004). Plus récemment, une mutation dans le gène *KCNJ2* (Xia *et al.*, 2005), une autre sur le gène *KCNH2* (Hong *et al.*, 2005) et enfin une mutation sur le gène *KCNE3* (Zhang *et al.*, 2005) ont été décrites. Ces cinq mutations sont à l'origine d'un gain de fonction des courants potassiques correspondants. Récemment, une mutation par perte de fonction sur le gène *KCNA5* a été décrite (Olson *et al.*, 2006). Enfin, une mutation par perte de fonction du gène ankyrin-B a aussi été impliquée dans la FA (Mohler *et al.*, 2003). Ces études ont fourni la preuve que la FA peut être une canalopathie.

La tachycardie atriale entraîne une perte de la systole mécanique des oreillettes, menant à une stase du sang, source de thrombose. La FA est de ce fait une des principales causes de thromboembolie cérébrale. Par ailleurs, du fait de son impact sur le rythme ventriculaire, la FA peut conduire à une insuffisance cardiaque diastolique ou au développement d'une cardiopathie rythmique (altération de la fonction systolique et dilatation ventriculaire ; Nattel, 2002a).

c. Théories mécanistiques de la fibrillation auriculaire

Dans la première moitié du 20^{ème} siècle, trois mécanismes ont été décrits pour l'initiation et le maintien de la FA : 1) les foyers ectopiques auriculaires, généralement situés au niveau des veines pulmonaires, 2) le circuit unique de réentrée et 3) les circuits multiples



de réentrée (Garrey, 1924 ; Nattel, 2002a ; Nattel, 2002b ; Figure 20). Il semblerait que les trois phénomènes interagissent et qu'ils s'induisent les uns les autres (Dobrev, 2006).

Figure 20 Théories mécanistiques de la FA, dans la première moitié du 20^{ème} siècle. OD, oreillette droite ; OG, oreillette gauche (Nattel, 2002a).

Actuellement, le modèle le plus répandu est celui des ondelettes multiples. Il a été imaginé par Moe & Abildskov en 1959, puis évalué par modélisation informatique (Moe *et al.*, 1964). Il s'agit de multiples circuits de réentrée qui évoluent conjointement, peuvent se mouvoir de manière aléatoire dans les oreillettes, se diviser ou au contraire s'annihiler au gré du déplacement des zones de bloc fonctionnel. Si l'espace dans lequel évoluent les ondelettes est petit, il ne peut se former que quelques circuits à la fois, et la probabilité qu'ils disparaissent, au profit d'un retour en rythme sinusal, est importante. Si par contre l'espace est grand, il peut se former un nombre conséquent de circuits de réentrée, ce qui laisse une probabilité moindre de résolution spontanée.

d. Phénomènes initiateurs et substrats de la fibrillation auriculaire

L'idée qui prédomine actuellement est que la pathogénèse de la FA implique l'interaction entre un phénomène initiateur ou "gâchette" et un substrat atrial qui détermine la persistance de l'arythmie. La "gâchette" se présente généralement sous la forme de foyers ectopiques localisés au niveau des veines pulmonaires et le substrat peut être structural ou électrique.

i. Les veines pulmonaires : "gâchette" de la FA

L'importance des veines pulmonaires dans l'initiation de la FA a été révélée par Haïssaguerre *et al.* en 1998. Elles peuvent être le site d'initiation d'une tachycardie atriale rapide qui favorise la transition vers des circuits de réentrée. Une étude a montré en effet que le tissu cardiaque au niveau des veines pulmonaires présente des propriétés électriques arythmogènes, dont une fonction pacemaker et une tendance à générer des post-dépolarisations (Cheung, 1981). Par ailleurs, il a été montré que cette région se caractérise par des zones localisées de conduction lente, pouvant favoriser des réentrées atriales (Hocini *et al.*, 2002 ; Hamabe *et al.*, 2003).

ii. Les substrats

La fibrose semble être un substrat significatif de la FA, générant des anomalies localisées de la conduction et jouant un rôle dans la stabilisation d'arythmies focales et de circuits de microréentrées (Spach *et al.*, 1988 ; Nattel *et al.*, 2000 ; Derakhchan *et al.*, 2001 ; Rücker-Martin *et al.*, 2002 ; Fenelon *et al.*, 2003). Des zones de fibrose sont couramment retrouvées chez les patients en FA associée à une pathologie valvulaire mitrale, à une

insuffisance cardiaque ainsi que chez les patients en FA idiopathique (Sanders *et al.*, 2003). Une étude a permis de montrer, chez le rat, que dans le cadre de l'insuffisance cardiaque, des Métalloprotéinases de Matrice sont impliquées dans le développement de la fibrose (Boixel *et al.*, 2003).

Des facteurs moléculaires sont connus pour être initiateurs de la FA. Il a été montré que les patients présentent des taux élevés de la kinase ERK (extracellular signal regulated kinase) et d'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) (Goette *et al.*, 2000a ; Dai *et al.*, 2004 ; Ehrlich *et al.*, 2006) pouvant favoriser le remodelage structural de la FA sous forme de fibrose (Li *et al.*, 2001b). La FA est également associée à une diminution de la densité des récepteurs de type 1 à l'angiotensine II et une augmentation des récepteurs de type 2 (Goette *et al.*, 2000b), d'une réduction de l'activité de la carboxypeptidase (Lendeckel *et al.*, 2001) et d'une hausse de la concentration en enzyme proapoptotique caspase-3 (Aime-Sampe *et al.*, 1999). L'étude d'un modèle de FA induite par insuffisance cardiaque chez le chien, a montré que la survenue de l'arythmie est précédée par l'augmentation des concentrations atriales d'angiotensine II et par l'activation de protéines kinases comme l'ERK (Li *et al.*, 2001b). Dans ce même modèle, une hausse de la concentration en caspase-3 associée à de l'apoptose est suivie par une fibrose progressive (Cardin *et al.*, 2003).

En 1955, Fraser et Turner ont montré qu'une augmentation de la taille des oreillettes droite et gauche corrèle avec l'incidence de la FA chez les patients présentant une pathologie valvulaire. L'importance de la dilatation atriale dans la survenue de la FA a par la suite été validée par diverses études (Henry *et al.*, 1976 ; Vaziri *et al.*, 1994 ; Psaty *et al.*, 1997 ; Vasan *et al.*, 1997 ; Grigioni *et al.*, 2002) mais le mécanisme n'est pas complètement élucidé. En effet, les résultats concernant la durée de la période réfractaire dans une oreillette dilatée sont contradictoires, révélant soit une réduction (Solti *et al.*, 1989 ; Ravelli & Allessie, 1997), soit aucun changement (Wijffels *et al.*, 1997).

L'importance du système nerveux autonome dans la survenue de la FA a été reconnue en 1887 (McWilliam, 1887) et confirmée par la suite, par plusieurs études (Zipes *et al.*, 1974 ; Coumel *et al.*, 1978 ; Rosenshtraukh *et al.*, 1989 ; Liu & Nattel, 1997 ; Chang *et al.*, 2001). On peut par exemple citer les travaux de Rothberger et Winterberg qui ont montré que la stimulation vagale convertit le flutter atrial en fibrillation (Rothberger & Winterberg, 1914). L'induction de la FA par le système vagal est liée à la réduction hétérogène dans l'espace de la durée de la période réfractaire du PA atrial (Wang *et al.*, 1996).

La tachycardie atriale elle-même peut induire la FA en modifiant l'homéostasie calcique. En effet, le niveau de Ca^{2+} intracellulaire est d'autant plus élevé que le rythme est rapide, menaçant la viabilité cellulaire. Les mécanismes de défense à court terme passent

par l'inactivation du courant $I_{Ca,L}$, basée sur sa dépendance au voltage et à la concentration en Ca^{2+} intracellulaire (Courtemanche *et al.*, 1998). Cependant, le courant calcique étant un élément clé de la phase de plateau, sa diminution va également entraîner une réduction de la durée du PA et donc de celle de la période réfractaire, favorisant l'induction et le maintien de la FA par réentrées (Gaspo *et al.*, 1997a).

Enfin, la FA peut dans certains cas avoir une cause génétique. Cinq mutations de canaux ioniques décrits à ce jour (page 39) étant des gains de fonction, on peut supposer qu'il induisent la FA par raccourcissement de la durée du PA et de la période réfractaire atriale (Roberts, 2006).

e. Remodelage électrique associé à la fibrillation auriculaire chronique

i. L'électrocardiogramme

L'enregistrement électrocardiographique de la FA est caractérisé par la substitution des ondes P, représentatives de la dépolarisation atriale, par des ondes f rapides et irrégulières.

Le rythme ventriculaire rapide et irrégulier se traduit sur l'enregistrement électrocardiographique par des complexes QRS non équidistants et de fréquence élevée (Figure 21).

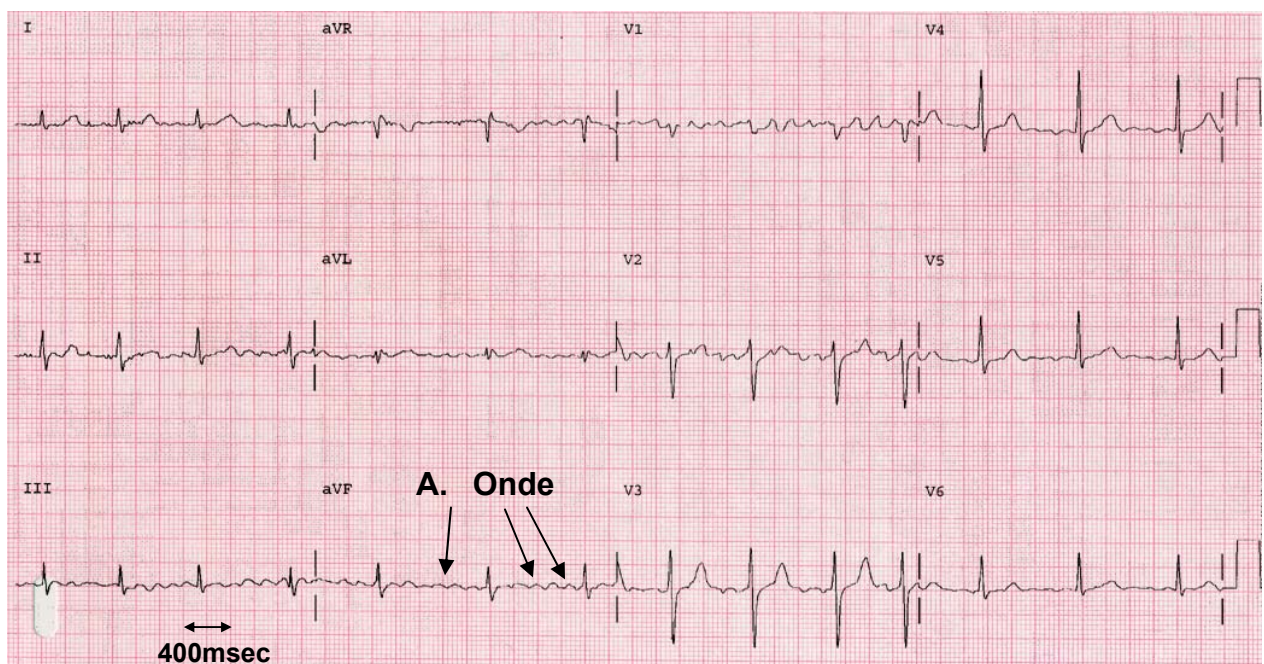


Figure 21 Trace d'un électrocardiogramme de surface 12 dérivations : patient en FA.

ii. Le potentiel d'action

La FA est associée à une diminution de la durée du PA atrial et de sa période réfractaire, ainsi qu'à la perte de sa phase de plateau (Dobrev & Ravens, 2003 ; Figure 22 A, page 43). Le potentiel de repos est par ailleurs plus polarisé. Ces modifications étant hétérogènes dans l'espace, la FA se caractérise par une augmentation de la dispersion de la repolarisation atriale (Hertvig *et al.*, 2003). Par ailleurs, ni la durée du PA atrial ni celle de

sa période réfractaire ne présentent d'adaptation au rythme (Boutjdir *et al.*, 1986 ; Bosch *et al.*, 1999 ; Figure 22 B). La vitesse de conduction est également altérée dans le tissu atrial des patients en FA (Daoud *et al.*, 1996 ; Gaspo *et al.*, 1997b), pouvant aussi favoriser les réentrées.

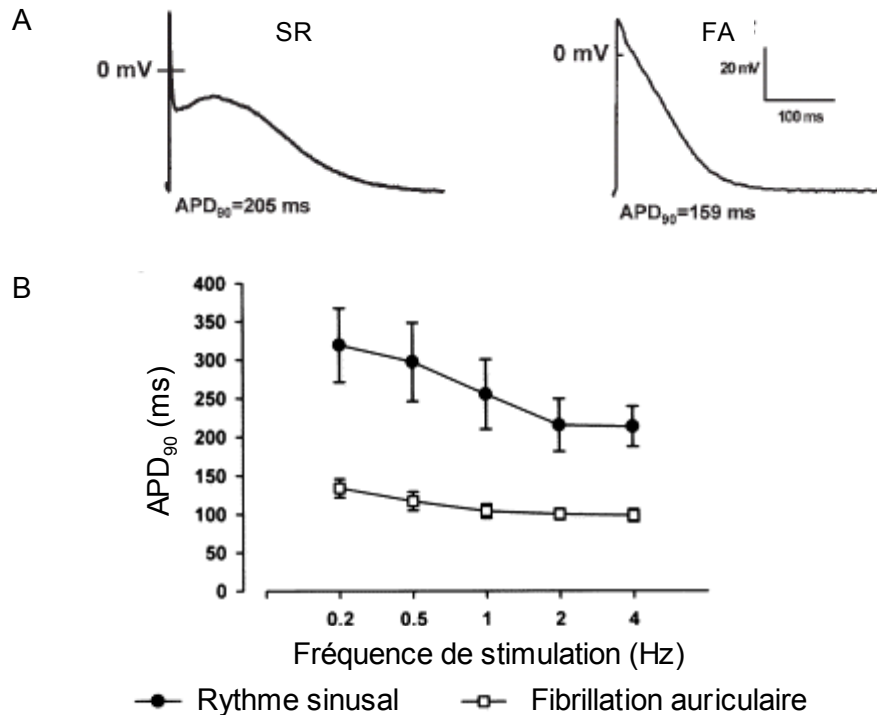


Figure 22 **A** PA enregistré à partir de cellules atriales droites de patients en rythme sinusal et en FA, à fréquence physiologique (Dobrev & Ravens, 2003). **B** Durée du PA (APD, *Action Potential Duration*) mesurée à 90% de la repolarisation, de cellules atriales de patients en rythme sinusal et en FA, en fonction de la fréquence de stimulation (modifié d'après Bosch *et al.*, 1999).

iii. Les courants ioniques

Les courants entrants

L'amplitude du courant majeur de la phase de plateau du PA, $I_{Ca,L}$, est diminuée d'environ 70 % chez les patients en FA chronique (Bosch *et al.*, 1999 ; Van Wagoner *et al.*, 1999 ; Skasa *et al.*, 2001 ; Workman *et al.*, 2001 ; Figure 23, page 44). De plus, l'inhibition de ce courant calcique dans les cellules atriales de patients en rythme sinusal produit un PA de morphologie homologue à celui de patients en FA (Van Wagoner *et al.*, 1999). Ainsi, il semble que la diminution du courant $I_{Ca,L}$ soit un élément central du remodelage électrique associé à la FA. Les données obtenues chez l'animal semblent confirmer cette hypothèse. En effet, une réduction de la densité du courant $I_{Ca,L}$ a également été observée chez un modèle de mouton de dilatation atriale (Deroubaix *et al.*, 2004) ainsi que chez un modèle de chien insuffisant cardiaque (Li *et al.*, 2000), associés à une prédisposition à la survenue de la FA. Par ailleurs, une étude a par la suite permis de montrer, chez le rat, que la diminution de

$I_{Ca,L}$ associée à l'insuffisance cardiaque est liée à une modification de sa régulation par un second messenger, l'AMP cyclique (Boixel *et al.*, 2001).

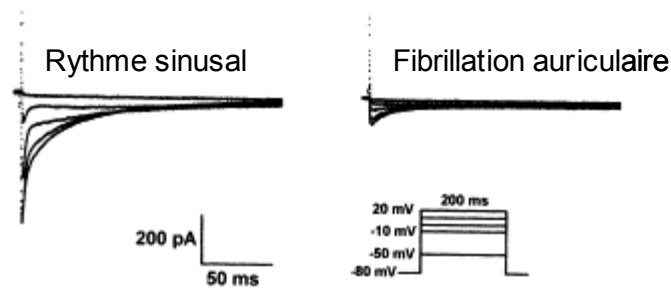


Figure 23 Densité du courant calcique $I_{Ca,L}$ mesurée sur des cellules atriales de patients en rythme sinusal et en fibrillation auriculaire (Bosch *et al.*, 1999).

L'échangeur transmembranaire sodium-calcium (NCX) est un régulateur essentiel de l'homéostasie calcique des cardiomyocytes. En effet, durant la diastole il participe à la sortie du Ca^{2+} intracytoplasmique. L'activité de NCX est électrogénique (sortie d'un ion calcium et entrée de trois ions sodium) produisant un courant positif net entrant. Une augmentation de son activité, peut être à l'origine de post-dépolarisations retardées (Shigekawa & Iwamoto, 2001 ; Shiroshita-Takeshita *et al.*, 2005 ; Figure 24). Si elles sont de forte amplitude, elles peuvent être à l'origine de la formation d'un foyer ectopique. Bien que l'expression protéique de NCX soit augmentée chez les patients en FA (Schotten *et al.*, 2002), les conséquences fonctionnelles sur le courant I_{NCX} n'ont à ce jour pas été élucidées.

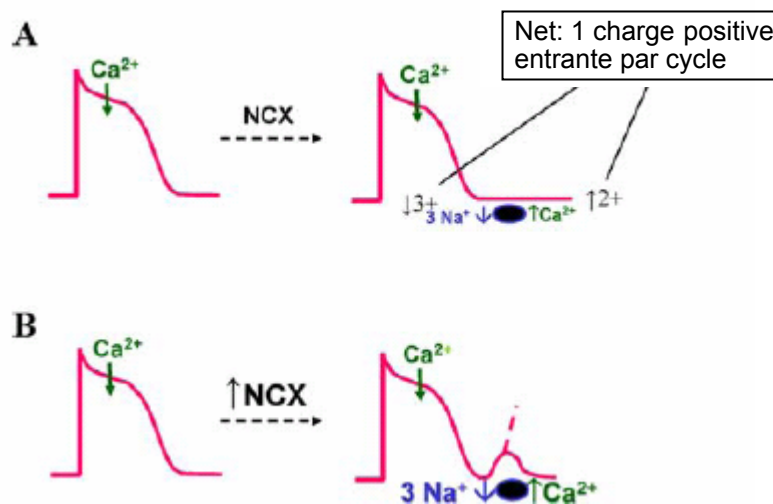


Figure 24 Fonction de l'échangeur NCX (A) en condition normale et (B) lors d'une augmentation de son activité (Shiroshita-Takeshita *et al.*, 2005).

La conduction des impulsions électriques dépend du courant sodique I_{Na} et du couplage cellulaire, assuré par les connexines. En condition normale, les connexines sont majoritairement localisées au niveau des extrémités de chaque cellule. La FA chronique s'accompagne d'une modification de la distribution des jonctions gap, Cx40 et Cx43, qui se

répartissent également au niveau des parois latérales des cellules (Polontchouk *et al.*, 2001 ; Rücker-Martin *et al.*, 2006). On peut supposer que cette redistribution spatiale participe à la réduction de la vitesse de propagation de l'influx électrique chez les patients en FA créant ainsi un substrat pour les réentrées.

Les courants potassiques sortants

La FA chronique est associée à une réduction de la densité du courant transitoire I_{to} (Van Wagoner *et al.*, 1997 ; Yue *et al.*, 1997 ; Bosch *et al.*, 1999 ; Brandt *et al.*, 2000 ; Workman *et al.*, 2001 ; Figure 25). Par ailleurs, il semble que celle du courant I_{Kur} soit également diminuée (Van Wagoner *et al.*, 1997 ; Brandt *et al.*, 2000), bien que ce résultat n'ait pas été confirmé par toutes les études (Bosch *et al.*, 1999 ; Grammer *et al.*, 2000 ; Workman *et al.*, 2001). On peut supposer que ces discordances dans les résultats reflètent les différences dans les proportions des diverses pathologies sous-jacentes des patients en FA chronique étudiés (valvulopathie mitrale, aortique ou pathologie coronarienne). La signification physiologique de ces modifications reste confuse étant donné qu'une diminution de la densité des courants potassiques sortants prolonge la durée du PA et de la période réfractaire. On peut cependant penser qu'il s'agit d'un mécanisme adaptatif face à l'augmentation de la charge des cellules en calcium. En effet, une étude a permis de faire l'hypothèse que l'augmentation de la calmoduline kinase dépendante du Ca^{2+} (CaMKII), chez les patients en FA, serait à l'origine d'une réduction de la durée d'inactivation du courant I_{to} (Tessier *et al.*, 1999). L'influx de calcium serait alors réduit, limitant ainsi la surcharge calcique des cellules.

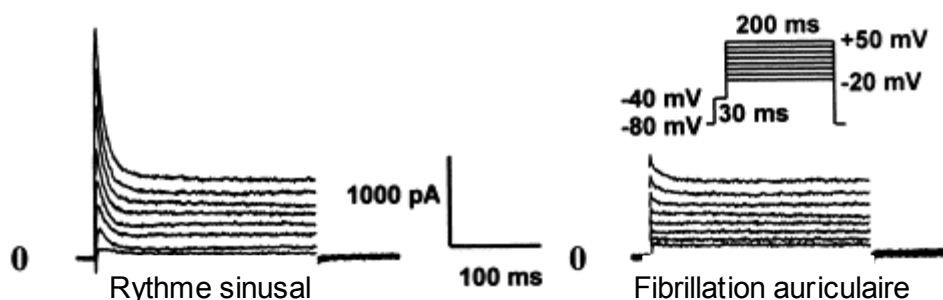


Figure 25 Densité du courant potassique transitoire sortant I_{to} mesurée sur des cellules atriales de patients en rythme sinusal et en fibrillation auriculaire (Bosch *et al.*, 1999).

Les courants potassiques à rectification entrante

La FA chronique est associée à une augmentation de la densité du courant I_{K1} (Van Wagoner *et al.*, 1997 ; Bosch *et al.*, 1999 ; Workman *et al.*, 2001 ; Dobrev *et al.*, 2001 ; Dobrev *et al.*, 2002 ; Figure 26, page 46). Ce courant joue un rôle dans la phase 3 de repolarisation du PA et dans le maintien du potentiel de repos. Cette augmentation est cohérente avec les données suivantes : 1) le potentiel de repos des myocytes des patients

en FA chronique est plus hyperpolarisé que celui des patients en rythme sinusal (Dobrev *et al.*, 2001 ; Dobrev *et al.*, 2002) ; 2) une mutation dans le gène *KCNJ2* (canal Kir2.1 participant à la génèse du courant I_{K1}) identifiée au sein d'une famille atteinte de FA et qui crée un gain de fonction ; 3) la souris transgénique surexprimant Kir2.1 présente une réduction de la durée du PA atrial et de sa période réfractaire par rapport aux souris sauvages, ainsi qu'une forte susceptibilité à la survenue de la FA (Li *et al.*, 2004a). On peut donc suggérer que l'augmentation de la densité du courant I_{K1} dans la FA chez l'homme hyperpolarise le potentiel de repos et réduit la durée de la phase de repolarisation du PA, et donc de sa période réfractaire. Cette variation pourrait donc créer un substrat favorable à la survenue de réentrées (Xia *et al.*, 2005).

L'activation anormale du système nerveux autonome peut initier la FA et favoriser sa persistance. En effet, l'acétylcholine libérée par stimulation vagale active le courant potassique atrial $I_{K,ACh}$ (Yamada *et al.*, 1998), entraînant une réduction hétérogène dans l'espace de la durée du PA et de sa période réfractaire et induisant des réentrées (Allessie *et al.*, 1958 ; Allessie *et al.*, 1984 ; Wang *et al.*, 1996 ; Prystowsky *et al.*, 1983 ; Liu & Nattel, 1997 ; Kneller *et al.*, 2002). Un argument supplémentaire provient d'un modèle de souris transgéniques invalidées pour le canal responsable de ce courant : la stimulation par l'acétylcholine n'induit alors pas la FA (Kovoor *et al.*, 2001). Chez l'homme, les résultats sont contradictoires. Des études ont décrit une réduction du courant $I_{K,ACh}$, pouvant être interprétée comme une adaptation des myocytes atriaux à la réduction de la durée du PA (Dobrev *et al.*, 2001 ; Dobrev *et al.*, 2002). A l'inverse, d'autres travaux ont montré que sous l'effet d'une stimulation cholinergique, l'augmentation de l'amplitude du courant $I_{K,ACh}$ est plus forte dans les cellules atriales des patients en FA (Bosch *et al.*, 1999). Par ailleurs, une forme constitutivement active de ce courant a également été observée chez les patients en FA chronique (Dobrev *et al.*, 2005).

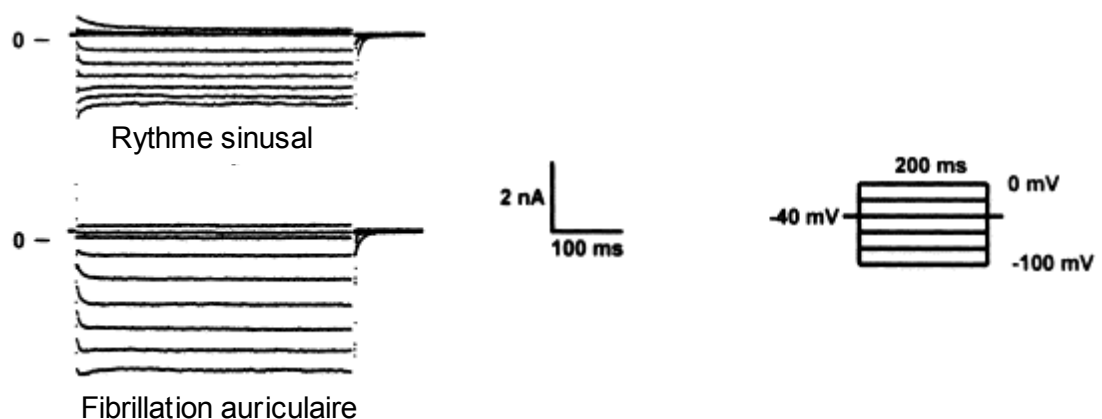


Figure 26 Densité du courant potassique I_{K1} mesurée sur des cellules atriales de patients en rythme sinusal et en fibrillation auriculaire (modifié d'après Bosch *et al.*, 1999).

La FA chronique est donc associée à des modifications de l'activité de plusieurs courants ioniques (Figure 27, page 47). Cependant, à ce jour, il n'a pas été déterminé si ces altérations sont des causes ou des conséquences de la FA. D'après Dobrev *et al.*, la surcharge calcique jouerait un rôle majeur dans l'initiation du remodelage électrique (Dobrev *et al.*, 2006 ; Figure 27, page 47).

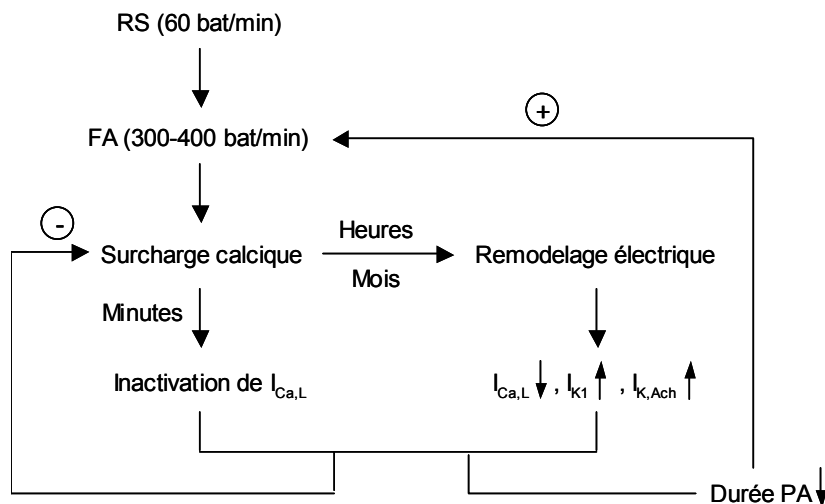


Figure 27 Mécanisme général de la FA ; RS = Rythme sinusal (modifié d'après Dobrev *et al.*, 2006)

f. Traitements

Pour les patients en FA paroxystique ou persistante la stratégie thérapeutique consiste généralement à restaurer et maintenir le rythme sinusal. Au contraire, en FA permanente, alors qu'aucun traitement ne permet de supprimer l'arythmie, l'alternative consiste à contrôler le rythme ventriculaire.

Les approches thérapeutiques classiques de la FA ont pour objectif le contrôle du rythme sinusal par modification des propriétés électriques cardiaques. Cependant, les traitements disponibles actuellement ne sont généralement pas spécifiques de l'activité électrique atriale. Ils peuvent donc avoir de lourds effets sur l'électrophysiologie ventriculaire et paradoxalement être proarythmiques (Nattel, 1998). A l'heure actuelle, l'amiodarone est l'antiarythmique le plus efficace et le plus utilisé dans le traitement de la FA (Chan *et al.*, 2006). Elle n'est pas spécifique et touche toutes les familles de courants ioniques. Son action est basée sur la prolongation de la période réfractaire atriale afin de supprimer les réentrées (Nattel, 2003). I_{Kr} étant un courant de repolarisation majeur, son blocage pharmacologique permet d'augmenter la durée du PA, mais des torsades de pointes sont parallèlement induites (Saliba, 2001). Des études chez l'animal ont montré que la cinétique d'activation lente du courant potassique I_{Ks} pourrait permettre à ses bloqueurs d'être efficaces au cours de la tachycardie, cependant des études cliniques seront nécessaires pour valider son efficacité chez les patients en FA (Bauer *et al.*, 2002 ; Nakashima *et al.*, 2004). Les bloqueurs du courant I_{Kur} ont pour effet la prolongation de la durée du PA atrial, permettant donc de prévenir et de traiter la FA (Wang *et al.*, 1993 ; Feng *et al.*, 1997 ; Peukert *et al.*, 2003). Etant donné le rôle exclusivement atrial de I_{Kur} dans la repolarisation, l'avantage majeur de ce

traitement est qu'il n'a pas d'effet sur la durée de la repolarisation ventriculaire ni sur celle de l'intervalle QT (Decher *et al.*, 2006).

Les avancées dans la connaissance des substrats de la FA ont fourni de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. Plusieurs essais cliniques ont permis de montrer que l'utilisation des inhibiteurs de l'ACE permet de prévenir le développement de la FA. En effet, ce traitement diminue l'activation de ERK et donc la formation de fibrose, réduisant par conséquent les effets inducteurs de la FA (Levy, 2006). Par ailleurs, une étude réalisée chez le rat, a permis de montrer qu'un traitement par spironolactone, permet de réduire la fibrose atriale. Cet effet passe par une inhibition de la voie profibrotique de l'aldostérone (Milliez *et al.*, 2005). Le courant I_{Na} et les connexines sont des cibles potentiellement intéressantes. Leur stimulation pourrait permettre d'accélérer la vitesse de conduction atriale et donc d'interrompre les circuits de réentrée, cependant à ce jour aucune molécule n'est disponible.

Actuellement, les agents bêta-bloquants, les antagonistes des canaux calciques et les digitaliques sont les traitements les plus efficaces dans le contrôle du rythme ventriculaire.

Parallèlement, les thérapeutiques non-pharmacologiques occupent une large part dans le traitement de la FA. Il s'agit par exemple de la radio-fréquence qui consiste soit à isoler les foyers ectopiques du reste des oreillettes (déconnexion des foyers veineux pulmonaires), soit à supprimer le substrat arythmogène en divisant fonctionnellement l'oreillette (segmentation atriale). Les bénéfices escomptés d'une procédure d'ablation sont la ré-apparition de la contraction auriculaire avec amélioration de l'état hémodynamique du patient, la disparition des symptômes cliniques, et l'espoir d'arrêter le traitement antiarythmique, voire anticoagulant. Une diminution du risque thromboembolique semble également être observée (Scavée *et al.*, 2004). Des expériences d'ablation par radio-fréquence chez le chien ont montré que la dénervation vagale pourrait participer à la suppression de la FA au cours de cette procédure (Elvan *et al.*, 1995), et ce rôle a été par la suite confirmé chez l'homme (Pappone *et al.*, 2004).

Alors que pendant des années, l'attention s'est focalisée sur les arythmies ventriculaires, l'identification de la sévérité du pronostic de la FA et de sa fréquence croissante du fait du vieillissement de la population, font de son traitement un défi pour les approches pharmacologiques et chirurgicales. Une des hypothèses est qu'une meilleure compréhension des mécanismes fondamentaux de la FA pourrait mener à l'élaboration d'approches thérapeutiques plus efficaces et plus sûres (Nattel, 2002a).

La fibrillation auriculaire est donc associée à un remodelage électrique. Plusieurs études gène à gène ont montré que des variations de l'expression transcriptionnelle de canaux ioniques accompagnent ces modifications fonctionnelles.

2. Hétérogénéité électrique associée au syndrome de Brugada

a. Historique

Osher et Wolff ont été les premiers à identifier une signature électrocardiographique particulière, caractérisée par des anomalies de la repolarisation ventriculaire (Osher & Wolff, 1953). Deux théories sur la physiopathologie du syndrome de Brugada ont ensuite été élaborées. Martini *et al.* ont tout d'abord proposé une base structurale à l'origine de ce syndrome (Martini *et al.*, 1989 ; Martini *et al.*, 1993). Ils ont retrouvé le profil ECG particulier chez trois patients ayant fait des morts subites et ont suggéré un lien possible entre ces anomalies de la repolarisation ventriculaire et la mort subite (Martini *et al.*, 1993). De plus, chez ces patients, une forme subclinique de cardiomyopathie du ventricule droit fut diagnostiquée à partir des résultats de biopsie chez un patient et de l'échographie chez deux autres patients.

Les frères Pedro et Josep Brugada en 1992 furent les premiers à faire l'hypothèse qu'il s'agit d'une maladie cardiaque fonctionnelle, excluant du diagnostic les anomalies structurales ou morphologiques. Ils ont décrit les anomalies électrocardiographiques particulières dans un sous-groupe de patients atteints de fibrillation ventriculaire idiopathique. Parmi eux, huit patients avaient fait des épisodes de syncope ou de mort subite ressuscitée, causées par des arythmies ventriculaires polymorphes rapides, mais ils ne présentaient pas d'anomalies structurales. Chez 4 des 8 patients décrits, une histoire familiale était suspectée (Brugada & Brugada, 1992). Les frères Brugada ont également suggéré que le mécanisme physiopathologique responsable des arythmies ventriculaires était une réentrée fonctionnelle due à une dispersion de repolarisation du myocarde ventriculaire.

L'idée d'une origine fonctionnelle de ce syndrome a été renforcée par la description de la présence parfois intermittente des anomalies électrocardiographiques (Nademanee *et al.*, 1997 ; Brugada *et al.*, 1998). Un rapport plus récent de Remme *et al.* renforce également la théorie de l'origine fonctionnelle puisque la grande majorité des patients étudiés ne semble pas présenter d'anomalies structurales (Remme *et al.*, 2001).

b. Description

i. L'électrocardiogramme

L'ECG typique du syndrome de Brugada présente une onde J accentuée (déflexion qui suit le complexe QRS), un sus-décalage du segment ST et une inversion de l'onde T dans les dérivations précordiales droites V1 à V3 chez des sujets asymptomatiques (Osher & Wolff, 1953 ; Vanzini & Brugada, 2000 ; Brugada *et al.*, 2005 ; Figure 28, page 50). L'accentuation de l'onde J simule une onde R', donnant donc un aspect de bloc de branche droit. Il semble cependant que le R' dans le syndrome du Brugada soit dû à une

repolarisation précoce de l'épicaarde du ventricule droit plutôt qu'à un bloc de branche (Gussak *et al.*, 1999).

Par ailleurs, une récente étude électrocardiographique a révélé que les patients porteurs d'une mutation sur le gène *SCN5A* se caractérisent également par une durée plus longue de leur intervalle PR et de leur complexe QRS. Ils présentent donc davantage de troubles de la conduction par rapport aux patients non porteurs. En effet, ces anomalies ont été identifiées chez 59 sur 78 patients porteurs d'une mutation (76%) et seulement chez 14% des non mutés (Probst *et al.*, 2006a).

Le diagnostic est facile lorsque le tracé de l'ECG est typique, mais c'est peu fréquent. Les manifestations électrocardiographiques du syndrome de Brugada sont souvent dynamiques, rendant le diagnostic difficile : l'importance de l'élévation du segment ST est variable et les signes sont même souvent cachés. Il est cependant possible de démasquer cette caractéristique par utilisation de bloqueurs des canaux sodiques comme la flécaïnide, l'ajmaline ou la procainamide (Antzelevitch *et al.*, 2002). Le profil ECG peut également varier selon l'équilibre du système nerveux autonome, la température corporelle, la glycémie, et la prise de médicaments antiarythmiques, neuroleptiques et antipaludéens (Nademanee *et al.*, 1997). La stimulation bêta-adrénergique peut normaliser l'ECG. Ainsi, on estime que seul le tiers des patients est diagnostiqué.

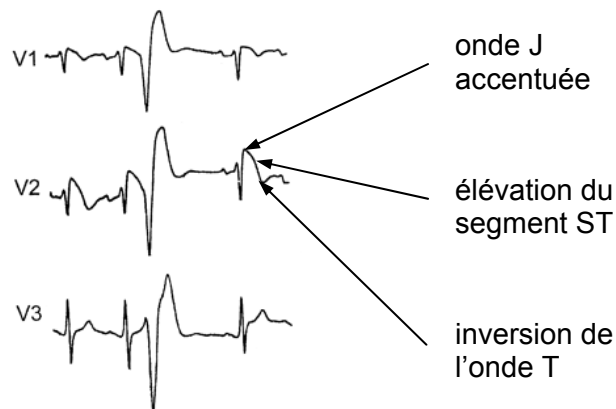


Figure 28 Tracé électrocardiographique caractéristique du syndrome de Brugada chez l'Homme, en dérivations précordiales droites V1 à V3 (Vanzini & Brugada, 2000).

ii. Le potentiel d'action

Une étude a permis l'enregistrement simultané de PA monophasiques épicaardique et endocardique droits de 3 patients Brugada, au cours de l'implantation de leur défibrillateur. Le PA épicaardique présente une phase 0 de dépolarisation incomplète, une encoche proéminente en phase 1, et un dôme décalé durant la phase de plateau, reflétant un déséquilibre de la balance des courants ioniques. Au contraire, la morphologie du PA endocardique est normale (Kurita *et al.*, 2002 ; Figure 29).

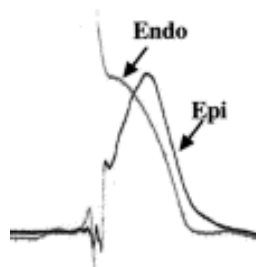


Figure 29 Enregistrement simultané de PA monophasiques épicaudique et endocaudique, au cours de l'implantation d'un défibrillateur sur un patient présentant un syndrome de Brugada (Kurita *et al.*, 2002).

Le substrat arythmogène du syndrome de Brugada est favorisé par un déséquilibre supplémentaire de la balance des courants ioniques, qui mène à une perte du dôme du PA dans certaines régions épicaudiques du ventricule droit, et donc à une repolarisation précoce.

e. Mécanismes

1. L'origine génétique

Ce syndrome héréditaire se transmet selon un mode autosomique dominant de faible pénétrance. A ce jour, seule l'implication de deux gènes, *SCN5A* (Grant *et al.*, 2002) et *GPD1L* (Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase 1-Like ; London *et al.*, 2006) a été démontrée. Un troisième locus 3q22-25 co-ségrégant d'une façon autosomique dominante, a été identifié dans une famille par analyse de liaison (Weiss *et al.*, 2002). Chez les membres de cette famille atteints du syndrome de Brugada les gènes *SCN5A*, *SCN10A* et *SCN12A* localisés sur le chromosome 3 ne portent aucune mutation. Par ailleurs, les mutations qui modifient l'intensité ou les cinétiques des courants ioniques I_{to} , I_{Kr} , I_{Ks} , $I_{K,ATP}$, I_{Ca} ou $I_{Cl(Ca)}$, de manière à augmenter l'activité des courants sortants ou à diminuer celle des courants entrants sont des candidates du syndrome de Brugada.

L'implication de *SCN5A* dans le syndrome de Brugada a été suggérée pour la première fois à la suite d'une approche gène candidat. Chen *et al.* en 1998 ont identifié dans trois familles atteintes du syndrome de Brugada, trois mutations perte de fonction. La démonstration génétique de l'implication de *SCN5A* dans ce syndrome fut réalisée lors de l'étude d'une grande famille atteinte du syndrome de Brugada sur quatre générations (Grant *et al.*, 2002). Ce syndrome se transmet de façon autosomique dominante puisque les mutations identifiées co-ségrègent avec le phénotype. Plus de 60 mutations différentes du gène *SCN5A* ont été identifiées jusqu'à ce jour. Environ un tiers a été caractérisé fonctionnellement par expression des canaux sodiques recombinants dans des systèmes hétérologues.

Le gène *SCN5A* code pour la sous-unité α du canal sodique cardiaque, responsable d'un courant I_{Na} présentant une activation et une inactivation rapide et une faible sensibilité à la tétrodoxtine (Gellens *et al.*, 1992). L'expression en système hétérologue des canaux sodiques mutés recombinants a permis d'étudier les mécanismes biophysiques et cellulaires par lesquels ils provoquent un syndrome de Brugada. Dans tous les cas il y a une diminution de l'amplitude du courant sodique, soit par réduction de l'expression et/ou du trafic du canal sodique *SCN5A*, soit par modification des cinétiques d'activation, d'inactivation ou de réactivation du canal (Bezzina *et al.*, 2001).

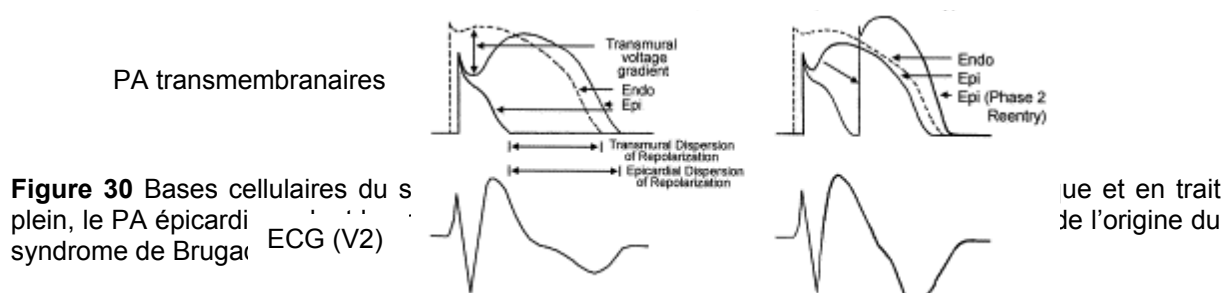
La caractérisation fonctionnelle de la mutation du gène *GPD1L* montre qu'elle génère une diminution du courant sodique (London *et al.*, 2006).

ii. Mécanismes responsables du sus-décalage du segment ST

Une première hypothèse est que le sus-décalage du segment ST serait lié à la perte de la phase de plateau du PA dans les cellules épocardiques du ventricule droit, générant un fort gradient de voltage transmural (Yan & Antzelevitch, 1996). En condition pathologique, telle que lors de la réduction du courant I_{Na} , la balance entre les courants ioniques durant les premières phase du PA est déséquilibrée en faveur du courant I_{to} , entraînant la perte du dôme et une repolarisation précoce (Yan *et al.*, 1996 ; Naccarelli & Antzelevitch, 2001 ; Figure 30, page 53). La densité du courant I_{to} est plus élevée dans l'épicaarde par rapport à l'endocarde d'une part, et dans l'épicaarde droit par rapport au gauche, d'autre part (Näbauer *et al.*, 1996 ; Di Diego *et al.*, 1996). De ce fait, le phénomène de repolarisation précoce est majoritairement observé dans certaines régions de l'épicaarde droit. Cette perte localisée du plateau dans l'épicaarde mais pas dans l'endocarde génère une dispersion à la fois transmurale et au sein même de l'épicaarde, de la repolarisation et de la période réfractaire des PA. Il se crée ainsi une fenêtre de vulnérabilité, et lors de la conduction du PA depuis des sites où le dôme est maintenu vers des sites où il ne l'est plus, l'induction de réentrée de phase 2 est facilitée, créant un substrat pour le développement de fibrillations ventriculaires (Figure 30, page 53).

Une étude chez le chien suggère que la différence d'incidence du syndrome de Brugada en fonction du sexe pourrait être liée à une différence au niveau de l'encoche du PA épicaardique droit. En effet, elle est plus marquée chez les mâles par rapport aux femelles, en accord avec une densité plus importante du courant I_{to} , favorisant d'autant plus, en situation pathologique, le déséquilibre de la balance des courants ioniques et une repolarisation précoce du PA (Di Diego *et al.*, 2002).

Il semble donc que la perte du plateau du PA soit liée à un déséquilibre du gradient de courant net, durant la phase 1 de repolarisation. Des études chez l'animal ont montré qu'une réduction de la densité des courants entrants I_{Na} ou $I_{Ca,L}$, ou une augmentation de celle des courants sortants tels que I_{to} , $I_{K,ATP}$ ou $I_{K,ACh}$ peut contribuer à la perte du plateau (Yan & Antzelevitch, 1999).



Une seconde hypothèse est qu'un retard de conduction dans le ventricule droit serait à l'origine du syndrome de Brugada (Tukkie *et al.*, 2004 ; Meregalli *et al.*, 2005). L'activation asynchrone de l'endocarde et de l'épicarde créerait un gradient de voltage responsable d'un courant électrotonique, entraînant une élévation du segment ST et des arythmies entretenues par des réentrées.

A ce jour, ces deux hypothèses sont discutées. Il s'avère que l'une n'exclut pas l'autre, et qu'une combinaison d'un retard de conduction associé à un raccourcissement des PA épicardiques du ventricule droit pourrait être à l'origine du syndrome de Brugada (Tukkie *et al.*, 2004).

f. Epidémiologie

Viskin *et al.* ont observé que la prévalence de ce syndrome parmi les patients atteints de la fibrillation ventriculaire était de 21% (Viskin *et al.*, 2000). Corrado *et al.* ont retrouvé le profil électrocardiographique particulier chez 14% des sujets jeunes ayant fait des épisodes de mort subite (Corrado *et al.*, 2001).

En 2005, Antzelevitch *et al.* ont fait le bilan d'une base de données de patients présentant le profil ECG caractéristique du syndrome de Brugada. Parmi les 690 cas décrits, le pourcentage d'hommes atteints ($\approx 81\%$) est nettement supérieur à celui des femmes (Antzelevitch *et al.*, 2005 ; développé page 32). La moyenne d'âge lors du premier événement arythmique est de 41 ans mais des troubles du rythme peuvent aussi se produire chez les enfants et les nouveaux-nés (Priori *et al.*, 2000 ; Probst *et al.*, 2006b). Une histoire familiale de syncope, de fibrillation ventriculaire documentée ou de mort subite d'origine cardiaque est rapportée chez 48% des patients. Le caractère apparemment héréditaire de cette entité pathologique suggère donc fortement l'implication de facteurs génétiques. Une étude réalisée sur 200 patients atteints du syndrome de Brugada a permis d'identifier chez 22% d'entre eux, des mutations sur le gène *SCN5A* (Priori *et al.*, 2002). Le génotypage des membres asymptomatiques de leurs familles révéla que 46% d'entre eux étaient également porteurs des mutations identifiées chez les patients. Enfin, une autre étude avait permis de montrer que 58% des patients étaient d'origine asiatique (Alings & Wilde, 1999).

g. Traitements

Alors qu'il y a eu d'importants progrès durant les dix dernières années dans l'identification et la caractérisation du syndrome de Brugada, les approches thérapeutiques ont peu évolué. L'implantation d'un défibrillateur est actuellement le seul traitement efficace. Cependant cette solution présente des inconvénients. En effet, elle n'est pas appropriée

pour les jeunes enfants, et pour des raisons économiques, ne peut être pratiquée dans tous les pays (Antzelevitch & Fish, 2006).

L'approche pharmacologique a pour objectif la réduction de l'amplitude de l'encoche du PA épicardique droit et/ou la restauration de son dôme, en rééquilibrant les courants impliqués dans ses premières phases. Des études suggèrent que le blocage du courant I_{to} ou l'augmentation des courants calciques permettent de normaliser l'élévation du segment ST et de contrôler les épisodes de tachycardie / fibrillation ventriculaire (Yan & Antzelevitch, 1999 ; Belhassen *et al.*, 2004 ; Antzelevitch & Fisch, 2006). Par contre l'efficacité sur le long terme dans la prévention de la mort subite reste à être démontrée.

Plusieurs études ont donc permis de montrer l'importance du remodelage électrique dans le syndrome du Brugada. On peut donc suggérer que des modifications d'expression transcriptionnelle des canaux ioniques puissent être associées à cette pathologie.

3. Remodelage électrique associé à l'insuffisance cardiaque chronique

a. Historique

L'évolution des idées dans le domaine de l'insuffisance cardiaque a connu une véritable révolution au cours des trente dernières années, tant au plan de la conception physiopathologique qu'à celui des thérapeutiques.

Il y a trente ans, l'insuffisance cardiaque était considérée comme une maladie portant exclusivement sur l'organe qui était à son origine, le myocarde. L'attention ne s'était pas encore portée sur l'importance des phénomènes périphériques qui entrent en jeu. C'est avec l'essor des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, qu'a été développée la théorie qui prévaut actuellement : l'insuffisance cardiaque est une maladie évolutive impliquant non seulement des anomalies hémodynamiques mais aussi la mise en jeu de phénomènes notamment neuro-hormonaux. Ils participent à l'aggravation du syndrome et créent une situation auto-entretenu, aboutissant à la déchéance progressive du myocarde et au décès (Katz, 2003 ; Futterman & Lemberg, 2001).

b. Description

L'insuffisance cardiaque se définit comme l'incapacité du cœur à assurer un débit sanguin suffisant aux différents tissus de l'organisme dans les conditions basales ou à l'effort. On considère que c'est une maladie évolutive. Elle est la conséquence ultime des différentes agressions et pathologies pouvant affecter la pompe cardiaque. L'agression initiale conduisant à l'insuffisance cardiaque est la perte de cellules myocardiques fonctionnelles. Pour compenser cette perte, des mécanismes hémodynamiques et neuro-endocrines sont mis en jeu qui augmentent la force de contraction du myocarde pour préserver la fonction cardiaque. Ainsi, malgré des lésions cardiaques, il n'apparaît pas au

départ de signes d'insuffisance cardiaque. L'insuffisance n'apparaît que lorsque les mécanismes compensateurs sont dépassés ou épuisés. La maladie s'aggrave donc à partir du moment où les processus endogènes exercent des effets délétères.

La connaissance de la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque a considérablement évolué ces dernières années. L'idée actuelle est qu'il existe un déséquilibre au profit de systèmes défavorables, vasoconstricteurs (système rénine-angiotensine-aldostérone, système sympathique, système des endothélines, système arginine-vasopressine), consommateurs d'énergie, au détriment des systèmes vasodilatateurs et natriurétiques (système des peptides natriurétiques, voies du monoxyde d'azote, prostacycline) (Akazawa & Komuro, 2006 ; Cohn, 1995). Les données expérimentales et cliniques laissent à penser que ce déséquilibre apparaît très précocement au cours de la maladie avant même que les symptômes cliniques de l'insuffisance cardiaque ne se manifestent. À terme, l'ensemble de ces mécanismes favorise l'ischémie myocardique et les arythmies ventriculaires, contribue à la dilatation progressive du cœur (remodelage ventriculaire) et accélère l'évolution de l'insuffisance cardiaque vers le décès (Cohn *et al.*, 2000).

c. Étiologie, physiopathologie et diagnostic

Dans les pays développés, la cause principale de l'insuffisance cardiaque est coronarienne. Les atteintes myocardiques liées notamment à une cardiomyopathie dilatée ou hypertrophique, et les pathologies valvulaires (principalement aortiques et mitrales) en sont également de très fréquentes causes. De manière plus anecdotique, l'insuffisance cardiaque peut également être la conséquence d'une maladie du péricarde, d'une cardiopathie congénitale ou encore d'un trouble du rythme ou de la conduction cardiaque.

Ces différentes étiologies peuvent être à l'origine d'une atteinte 1) systolique, correspondant à une perte de contractilité d'une partie du muscle cardiaque (infarctus du myocarde ou cardiomyopathie dilatée primitive, par exemple), 2) diastolique, et donc secondaire à une altération du remplissage cardiaque (par exemple, cardiomyopathie hypertrophique), ou 3) le plus souvent les deux (Jessup & Brozena, 2003 ; McMurray & Pfeffer, 2005 ; Figure 31).

L'évaluation de la fonction cardiaque renseigne sur la sévérité de la pathologie et le pronostic des patients, et permet de guider la thérapeutique et d'apprécier l'impact de nouveaux traitements. L'examen clinique, l'ECG et la radiographie du thorax sont les examens de base qui restent indispensables dans l'évaluation de l'insuffisance cardiaque. L'évaluation précise de la fonction cardiaque repose sur des techniques d'imagerie (échocardiographie) qui mesurent la taille des cavités, ainsi que l'épaisseur et l'épaississement des parois cardiaques, et apprécient l'état des structures valvulaires. Des techniques de cathétérisme et de doppler mesurent les pressions et les vitesses intracardiaques générées par la contraction et le remplissage. D'autres approches dynamiques permettant une évaluation à l'effort ou au cours d'un stress pharmacologique sont également très informatives. L'utilisation plus récente des marqueurs biologiques de la

dysfonction cardiaque (peptides natriurétiques) permet une évaluation simple de la pathologie. Cependant, la pertinence de cette technique dans une stratégie de dépistage et de suivi reste controversée (McMurray & Pfeffer, 2005).

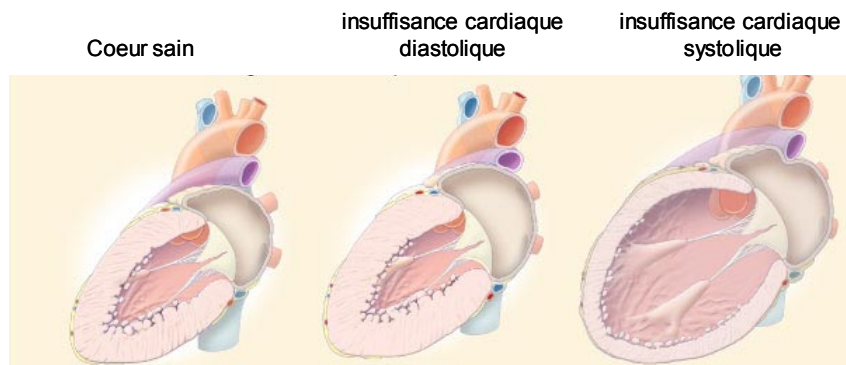


Figure 31 Deux mécanismes physiopathologiques de l'insuffisance cardiaque : atteinte diastolique et systolique (Jessup & Brozena, 2003).

d. Epidémiologie et pronostic

L'insuffisance cardiaque touche entre 1 et 2% de la population adulte. C'est une maladie du sujet âgé, dont la prévalence augmente du fait du vieillissement de la population. En effet, 6 à 10% des plus de 65 ans sont touchés par cette maladie (Mosterd *et al.*, 1999) et le risque de développer une insuffisance cardiaque est environ de 1 sur 5 chez une personne de 40 ans (Lloyd-Jones *et al.*, 2002).

Le pronostic de l'insuffisance cardiaque est globalement sombre avec un taux de mortalité élevé et de fréquentes hospitalisations. 30 à 40% des patients meurent pendant la première année suivant leur diagnostic, et 60 à 70%, au cours des 5 ans suivant leur diagnostic (Bleumink *et al.*, 2004).

e. Remodelage électrique associé à l'insuffisance cardiaque

i. L'électrocardiogramme

Plusieurs anomalies électrocardiographiques ont été décrites dans l'insuffisance cardiaque. La plus fréquente est la tachycardie sinusale, illustrée par la diminution de la durée de l'intervalle RR, mécanisme d'adaptation à la réduction du volume d'éjection systolique. Une diminution de la dispersion de l'intervalle RR a été également décrite chez des cas d'insuffisance cardiaque (Tsunakawa *et al.*, 1993). Elle traduit un déséquilibre du système nerveux autonome, en faveur du système sympathique. L'insuffisance cardiaque est également associée à une augmentation de la durée du complexe QRS, traduisant un ralentissement de la conduction intra-ventriculaire (Tomaselli *et al.*, 1994). Par ailleurs, une augmentation de la dispersion de l'intervalle QT semble être liée à un risque élevé de mort subite dans le cadre de l'insuffisance cardiaque (Barr *et al.*, 1994). La dilatation atriale gauche associée à l'insuffisance cardiaque induit une augmentation de la durée de l'onde P. Enfin, l'ECG peut révéler tous types de troubles du rythme (hyperexcitabilité auriculaire et

ventriculaire) et de la conduction (bloc de branche, bloc auriculo-ventriculaire et dysfonction sinusale) particulièrement fréquents dans l'insuffisance cardiaque.

ii. Le potentiel d'action

Il est admis que quelque soit la cause de l'insuffisance cardiaque, la caractéristique commune est l'augmentation de la durée du PA ventriculaire (Beuckelmann *et al.*, 1993 ; Figure 32, page 58).

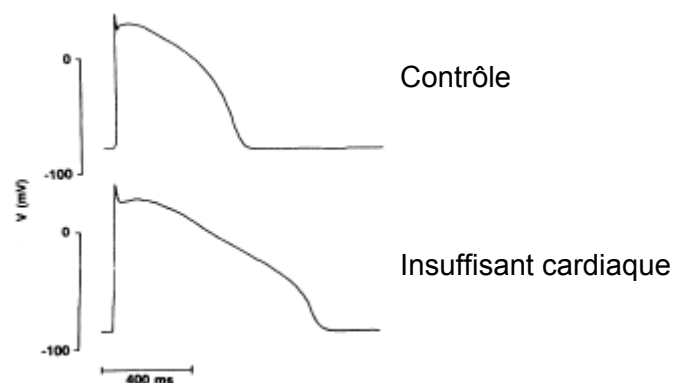


Figure 32 Enregistrement de PA de cellules ventriculaires de patients non malades et insuffisants cardiaques (Beuckelmann *et al.*, 1993).

Chez l'homme (Barr *et al.*, 1994 ; Berger *et al.*, 1997) comme chez l'animal insuffisant cardiaque (Pak *et al.*, 1997), une hétérogénéité spatiale et temporelle de la durée du PA et de sa période réfractaire a été décrite. Dans l'insuffisance cardiaque, cette augmentation de dispersion des PA prédispose aux arythmies ventriculaires par réentrée (Pak *et al.*, 1997).

iii. Les courants ioniques

Le résultat le plus consistant est la diminution de la densité du courant I_{to} chez l'homme (Beuckelmann *et al.*, 1993 ; Wettwer *et al.*, 1994 ; Nabauer *et al.*, 1996 ; Kääb *et al.*, 1998 ; Figure 33) et dans différents modèles animaux (Xu & Best, 1991 ; Lue & Boyden, 1992 ; Potreau *et al.*, 1995 ; Kääb *et al.*, 1996 ; Zicha *et al.*, 2004). Les conséquences fonctionnelles de cette diminution sont difficile à évaluer. En effet, du fait de son action très brève, le rôle de I_{to} dans la modulation de la durée du PA reste controversé.

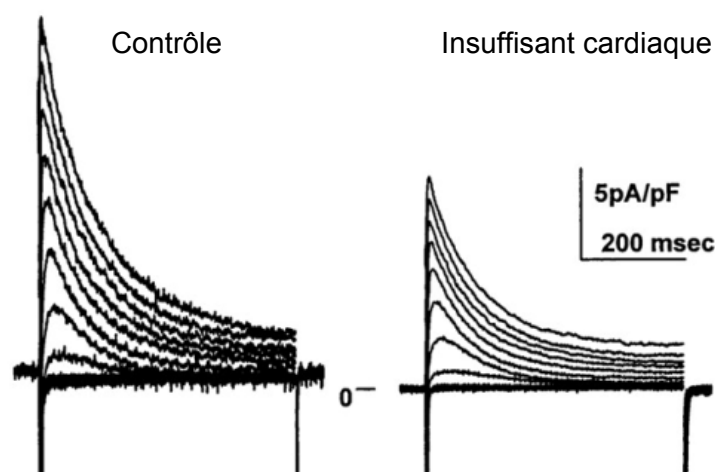


Figure 33 Courant I_{to} enregistré dans des cellules ventriculaires humaines de patients non malades et insuffisants cardiaques (Kääb *et al.*, 1998).

Chez l'homme, la densité du courant I_{K1} a également été montrée diminuée dans le cadre de l'insuffisance cardiaque (Beuckelmann *et al.*, 1993 ; Figure 34, page 59). Du fait de sa participation au maintien du potentiel de repos et à la phase terminale de repolarisation, la réduction de ce courant pourrait participer à l'allongement de la durée du PA.

Le courant pacemaker ou "funny" (I_f) non sélectif est décrit dans les tissus automatiques comme le nœud sino-atrial (Di Francesco, 1993 ; Irisawa *et al.*, 1993). Plus récemment, I_f a été mis en évidence dans les cellules ventriculaires humaines (Cerbai *et al.*, 1997 ; Hoppe *et al.*, 1998), avec une activation à des voltages très négatifs, en dehors des conditions physiologiques. L'insuffisance cardiaque s'accompagne d'une augmentation du courant I_f (Cerbai *et al.*, 2001 ; Figure 35) qui dans le cadre d'une diminution du courant I_{K1} pourrait prédisposer les cardiomyocytes ventriculaires à l'automatisme (Hoppe *et al.*, 1998).

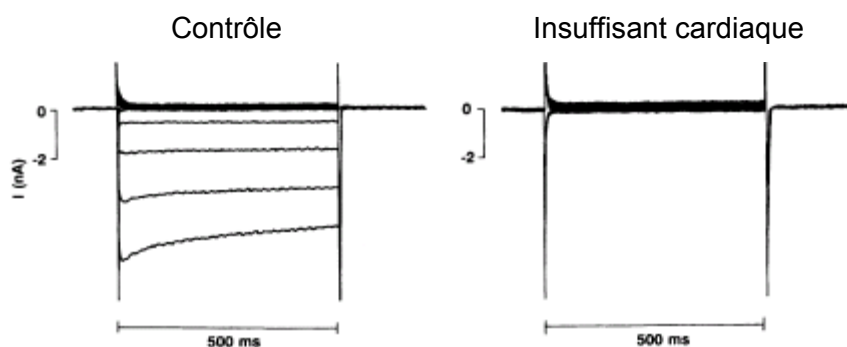


Figure 34 Courant I_{K1} enregistré dans des cellules ventriculaires de patients non malades et insuffisants cardiaques (Beuckelmann *et al.*, 1993).

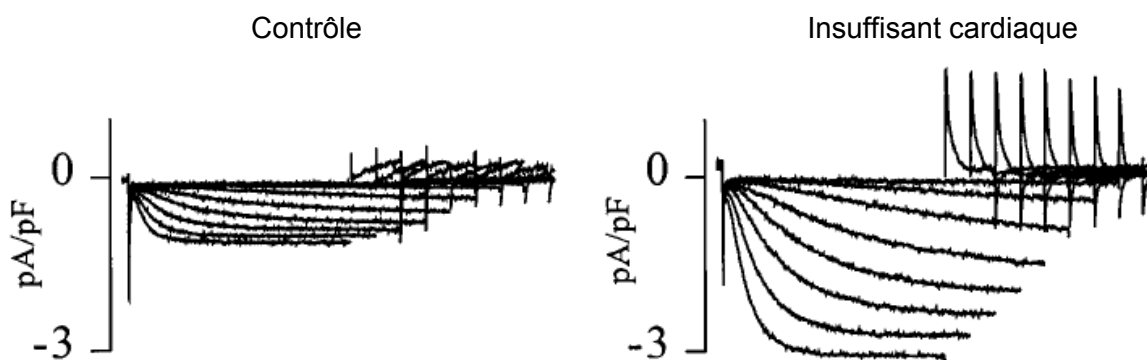


Figure 35 Courant I_f enregistré dans des cellules ventriculaires de patients non malades et insuffisants cardiaques (Cerbai *et al.*, 2001).

L'insuffisance cardiaque est caractérisée par des anomalies du couplage excitation-contraction : diminution de la force de contraction, prolongation de la relaxation, une adaptation moindre de la contraction à la fréquence cardiaque. Des changements dans l'homéostasie calcique pourraient participer à ces anomalies. Cependant, leurs bases fonctionnelles dans l'insuffisance cardiaque restent controversées. En effet, alors qu'il est reconnu que la séquestration du Ca^{2+} par le réticulum sarcoplasmique est défectueuse dans l'insuffisance cardiaque (Lindner *et al.*, 1998 ; Pieske *et al.*, 1999), la réduction de l'activité de la SERCA2, responsable du pompage du Ca^{2+} vers ce compartiment cellulaire, est encore discutée (Mercadier *et al.*, 1990 ; Hasenfuss *et al.*, 1994 ; Movsesian *et al.*, 1994 ; Maier *et al.*, 2002 ; Piacentino *et al.*, 2003). L'échangeur sodium-calcium (NCX) est le deuxième mécanisme responsable de la sortie du Ca^{2+} depuis le cytoplasme. Une étude réalisée chez le chien a montré que l'activité de NCX est augmentée dans l'insuffisance cardiaque, suggérant ainsi un rôle compensateur face à la diminution du repompage du Ca^{2+} par le réticulum sarcoplasmique (O'Rourke *et al.*, 1999). Chez l'homme, les données concernant NCX sont plus controversées (Reinecke *et al.*, 1996 ; Rose *et al.*, 1998).

Le courant $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ est la première source d'entrée du Ca^{2+} dans la cellule, amorçant sa sortie depuis le réticulum sarcoplasmique, et initiant donc la contraction cellulaire. Chez les patients insuffisants cardiaques, lorsqu'une variation de la densité du courant $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ a été observée, il s'agissait d'une diminution (Ouadid *et al.*, 1995). Le même type de résultats a été obtenu pour le nombre de sites de fixation à la dihydropyridine (Takahashi *et al.*, 1992), traduisant donc une diminution du nombre de canaux fonctionnels à la membrane.

f. Traitements

L'évolution des thérapeutiques depuis les trente dernières années est remarquable. Au début des années 1970, le traitement de l'insuffisance cardiaque se limitait aux diurétiques et aux digitaliques (Faris *et al.*, 2002). Par la suite, la compréhension de la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque a permis le développement d'approches thérapeutiques qui parviennent à diminuer les symptômes, à éviter les hospitalisations, et à prolonger la durée de vie. La mise en évidence du rôle de la circulation périphérique dans l'insuffisance cardiaque a conduit à la conception de vasodilatateurs dont les premiers essais remontent aux années 1970 (Tadei *et al.*, 1975). Un tournant évolutif a été marqué par l'introduction des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine. Ils sont considérés actuellement comme la pierre angulaire du traitement de l'insuffisance cardiaque, compte tenu de leur effet bénéfique sur la mortalité et la qualité de vie (CONSENSUS, 1987 ; SOLVD, 1991 ; McMurray *et al.*, 2001). Les quelques études, comme CHARM, menées sur les antagonistes des récepteurs de type I de l'angiotensine II ont démontré qu'ils étaient

aussi efficaces que les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (Pfeffer *et al.*, 2003). Longtemps considérés comme contre-indiqués en raison de leur effet inotrope négatif, l'efficacité des agents bêta-bloquants sur la diminution de la mortalité a été largement validée (étude CIBIS II, 1999 ; Eichhorn & Bristow, 2001, étude COPERNICUS). La troisième classe pharmacologique majeure du traitement de l'insuffisance cardiaque est représentée par les antagonistes des récepteurs de l'aldostérone. L'étude RALES a montré que l'utilisation de la spironolactone est associée à une diminution de 30% de la mortalité (Pitt *et al.*, 1999). Enfin, de nouvelles classes thérapeutiques visant à inhiber d'autres mécanismes compensateurs endogènes aux effets délétères, se profilent pour les années à venir. Les antagonistes de l'arginine vasopressine par exemple sont conceptuellement intéressants mais seuls les résultats des essais thérapeutiques de grande échelle permettront de savoir si ces nouvelles thérapeutiques ont leur place dans le traitement de l'insuffisance cardiaque (Lemmens-Gruber & Kamyar, 2006)

Si l'on ajoute à cette longue liste les essais de traitements substitutifs à la transplantation cardiaque tels que la stimulation bi-ventriculaire ou la chirurgie de remodelage ventriculaire (Landmesser & Drexler, 2005 ; Mancini & Burkhoff, 2005), il existe donc une véritable explosion des potentialités thérapeutiques de l'insuffisance cardiaque. Cet essor est une chance à une époque où les donneurs sont rares pour réaliser la transplantation cardiaque qui reste le seul traitement de l'insuffisance cardiaque au stade évolué (Trulock *et al.*, 2004 ; Ogata & Platt, 2004). Cette pénurie sévère de greffons a conduit à un effort de créativité pour des voies alternatives comme le cœur artificiel par exemple (Copeland *et al.*, 2004).

L'insuffisance cardiaque est donc associée à un large remodelage électrique. Plusieurs études gène à gène ont également décrit des modifications d'expression des transcrits des canaux ioniques dans cette pathologie.

D. LE TRANSCRIPTOME DES CELLULES CARDIAQUES

L'objectif des deux premières parties introductives a été de décrire les principales **caractéristiques fonctionnelles** qui déterminent l'hétérogénéité électrique cardiaque dans différentes conditions physiologiques et physiopathologiques. A ces différents déterminants fonctionnels s'ajoute un autre niveau de complexité : l'expression des gènes et sa régulation.

A l'issue du séquençage du génome humain, le nombre de gènes constituant notre génome a été estimé à 20 000 - 25 000 (Lander *et al.*, 2001 ; *International Human Genome Sequencing Consortium*, 2004). Chez l'homme, 10 000 à 20 000 ARNm différents sont exprimés dans une cellule spécialisée. Ils constituent le **transcriptome de la cellule**, *i.e.* la **totalité des transcrits présents dans un type cellulaire donné, à un moment donné et dans une condition biologique précise**.

Le projet de séquençage du génome de nombreux organismes, associé aux récents progrès en biologie moléculaire, ont conduit au développement d'une nouvelle approche technologique : la génomique. Celle-ci permet l'analyse globale et simultanée des modifications d'expression des gènes, autrement dit du remodelage moléculaire, en réponses à diverses variables environnementales ou expérimentales. Elle donne donc accès au transcriptome. La génomique fonctionnelle a pour objectif de corréler l'expression des gènes à leur fonction.

D'un point de vue méthodologique, la génomique repose à la fois sur des techniques de biologie moléculaire (les plus courantes sont les puces à ADN ; la plus récente est le TaqMan à haut débit) et sur des techniques de bio-informatique. Les expériences à haut débit, génèrent en effet des quantités d'informations colossales nécessitant le développement d'algorithmes mathématiques et statistiques adéquats pour leurs analyses.

L'application de ces méthodes systématiques a conduit à de nouvelles avancées aussi bien en recherche fondamentale qu'en médecine. D'un point de vue fondamental, du fait de son caractère exhaustif l'analyse globale du transcriptome autorise une vision intégrée des transcrits, c'est pourquoi on parle de **biologie intégrative**. Elle a ainsi permis une meilleure **compréhension des mécanismes moléculaires** impliqués dans l'adaptation à diverses situations, en particulier pathologiques (Cho & Campbell, 2000). Contrairement aux études dédiées à des gènes candidats, l'exploration simultanée de nombreux gènes (Yung *et al.*, 2004 ; Margulies *et al.*, 2005) permet de détecter des relations subtiles entre eux et de découvrir des **corrélations biologiques** auparavant difficiles à anticiper. Ainsi, une nouvelle fonction peut être attribuée à des gènes inconnus, mais également de

nouvelles voies de signalisation ou de nouveaux mécanismes de régulation peuvent être identifiés. Cette nouvelle approche technologique a également révolutionné la **recherche de cibles thérapeutiques** grâce à l'identification de nouveaux gènes candidats. La classification des pathologies et la médecine personnalisée constituent les objectifs ultimes de la génomique. En effet, le diagnostic et le pronostic d'une pathologie ainsi que l'efficacité d'un traitement thérapeutique reposent aujourd'hui sur notre habilité à évaluer un ensemble de signes cliniques et biologiques récurrents dans la pathologie. Cette évaluation présente cependant de nombreuses limites conduisant souvent à de fausses prédictions. Aussi, l'analyse globale des altérations d'expression des gènes associées à une pathologie peut fournir aujourd'hui des **signatures moléculaires spécifiques** et conduire notamment à l'identification de marqueurs moléculaires utiles à son diagnostic et pronostic. L'évaluation de la cinétique et de l'amplitude de ces variations d'expression offre de plus la possibilité de suivre la **progression de la pathologie**. La corrélation entre ces signatures moléculaires et les différents stades cliniques devrait permettre à long terme une meilleure prise en charge de la pathologie et une médication plus appropriée (Bittner *et al.*, 2000).

Cette approche "transcriptomique" présente cependant plusieurs limites. Les études à large échelle génèrent une quantité considérable de données, faisant naître un besoin bio-informatique important afin de les gérer et de les analyser (ou *data mining*) de manière pertinente. Ces outils *in silico* constituent une branche théorique et complémentaire de la biologie. C'est pourquoi, pour attribuer des rôles biologiques aux modifications d'expression observées, celles-ci doivent être intégrées et validées au niveau protéique et fonctionnel. La comparaison et l'intégration des résultats obtenus à partir de différentes études, à partir de différents modèles expérimentaux, et dans différents laboratoires, sont également cruciales à l'interprétation des modifications d'expression. Celles-ci demeurent cependant encore difficiles à entreprendre aujourd'hui. La génomique fournit une signature moléculaire, ou autrement dit une photo du transcriptome, dans un tissu donné à un instant donné. Elle ne rend en rien compte de la dynamique du métabolisme des transcrits. C'est pourquoi la réalisation d'études cinétiques est primordiale. Par ailleurs, il ne faut pas oublier que la régulation d'une fonction protéique dépend non seulement de la transcription des gènes et de la maturation de ses transcrits (accessibles par les techniques de puces à ADN), mais elle est également orchestrée par d'autres mécanismes de régulation complexes allant de la traduction à la maturation et à l'adressage sub-cellulaire des protéines. Le développement parallèle de la protéomique devrait participer à améliorer notre niveau de compréhension en fournissant une vision globale de l'expression des protéines.

Si la caractérisation fonctionnelle des courants ioniques cardiaques a fait l'objet de nombreuses études au cours des dernières années (Schram *et al.*, 2002), le profil d'expression des canaux ioniques et la régulation de leur expression restent encore aujourd'hui largement inconnus. Le rôle de la transcription dans la plasticité électrique a cependant déjà été suggéré par des approches gène à gène. On parle de plasticité ionique, c'est à dire de l'hétérogénéité de l'expression des canaux ioniques associée à une situation physiologique. Un bilan des bases ioniques de l'hétérogénéité électrique intrinsèque du cœur est décrit dans la revue de Schram *et al.* en 2002. James *et al.* ont publié un résumé de ce qui est connu concernant les différences d'expression de canaux ioniques en fonction du sexe (James *et al.*, 2005).

De multiples études gène à gène ont montré que les cardiopathies sévères s'accompagnent également de la modification de l'expression des canaux ioniques (remodelage ionique), qui constitue la cause et/ou la conséquence des troubles du rythme. On peut par exemple citer le résumé de Brundel *et al.*, de l'ensemble des données observées sur le remodelage ionique associé à la fibrillation auriculaire (Brundel *et al.*, 2002). Concernant l'insuffisance cardiaque, le même type de revue a été réalisée (Armoundas *et al.*, 2001). A l'inverse, aucune donnée sur le remodelage ionique associé au syndrome de Brugada n'a été publiée jusqu'à présent.

Ces approches gène à gène ont donc permis de montrer que les cellules cardiaques sont capables d'adapter leurs propriétés électrophysiologiques à des contraintes externes, en modifiant l'expression de leurs canaux ioniques. La génomique autorise aujourd'hui une approche globale du remodelage ionique et de ses conséquences fonctionnelles. Comment est distribué et régulé ce répertoire dans le myocarde normal et pathologique est une question centrale de la rythmologie moderne.

Les premières publications sur le séquençage du génome humain sont apparues en 2001. Aujourd'hui, le nombre de gènes du génome humain est estimé à $\approx 25\,000$. L'identification de plusieurs centaines de gènes codant les sous-unités des canaux ioniques suggère une importante diversité moléculaire et fonctionnelle.

Le projet de séquençage des génomes a été accompagné par d'importants progrès techniques et technologiques dans les domaines (i) de la manipulation de l'ADN, (ii) de la miniaturisation et de l'automatisation des expériences, qui a permis le développement des technologies dites de "haut débit", ainsi que (iii) dans les méthodes informatiques pour la gestion et l'analyse des données.

L'enjeu actuel est de comprendre comment est distribué et régulé le répertoire des canaux ioniques dans le myocarde en conditions physiologiques et pathologiques.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

A. LES DONNÉES DU GÉNOME

La génomique ayant pour objectif l'analyse du produit des gènes, une bonne connaissance du génome est fondamentale à l'élaboration d'outils performants dédiés à ce type d'étude.

En 1990, une initiative voit le jour : le Projet Génome Humain ou *Human Genome Project* (HGP). Ce projet international établit un plan sur plus de 10 ans pour décrypter le génome humain (séquençage et annotation), adresser les questions éthiques, légales et sociales issues du projet et analyser les génomes de nombreux autres organismes. En parallèle, en 1998, Craig Venter crée la société Celera Genomics® dont le but est de séquencer le génome humain en trois ans. La première version du génome humain est publiée en 2001, simultanément par Celera Genomics® et par le HGP (Venter *et al.*, 2001 ; Lander *et al.*, 2001). Le travail de finition s'est achevé en avril 2003 : une version complète et précise à 99,99% de la séquence du génome humain est aujourd'hui librement accessible (Schmutz *et al.*, 2004).

Le projet *International Nucleotide Sequence Databases Collaboration* (INSDC ; <http://www.insdc.org/>) est une collaboration internationale entre plusieurs banques de données publiques : GenBank aux Etats-Unis, EMBL en Europe et DNA Data Bank (DDBJ) au Japon, débutée en 1986. Son objectif est de concevoir un format commun de collecte et d'annotation des séquences. Cependant, le principal inconvénient de ce projet est la redondance des informations qui existe entre les différentes bases de données. Ainsi, depuis 2000, *The National Center for Biotechnology Information* (NCBI ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) développe la base de données RefSeq (Pruitt *et al.*, 2000) qui fait la synthèse des données de ces trois banques publiques. RefSeq constitue une collection non-redondante de séquences génomiques, rassemblant l'ensemble des références et annotations connues à ce jour.

Ces banques de données privées et publiques servent de base pour la mise au point des sondes de puces à ADN et des essais TaqMan. Les efforts réalisés pour l'évolution de la qualité des séquences et de leurs annotations sont donc indispensables à l'amélioration des techniques d'étude du transcriptome et donc de la fiabilité des résultats.

Pour des raisons de concision, dans les paragraphes suivants je ne développe que l'aspect technique des outils que j'ai utilisé pour aborder mes questions.

B. LES PUCES A ADN

1. Principe général

Les puces à ADN ont connu un essor rapide du fait du grand nombre d'applications proposées comme le génotypage et l'expression des gènes. L'adaptation de cette technique à l'analyse du transcriptome (ensemble des transcrits d'une cellule) permet **l'évaluation simultanée de l'expression de milliers de gènes** dans un échantillon de tissu. L'étude du transcriptome par cette méthode a d'abord été réalisée chez la levure puis chez l'homme, essentiellement dans les cancers et hémopathies (Alizadeh *et al.*, 2000 ; Bertucci *et al.*, 2000 ; Perou *et al.*, 2000 ; Ross *et al.*, 2000).

Les puces à ADN consistent en un support solide (petite lame de verre) sur lequel des milliers de fragment d'ADN sont déposés (*spottés*) de façon géométrique à l'aide d'une micropipette robotisée ou sont synthétisés *in situ*. Grâce à cette technique, chacun des fragments d'ADN (**sondes**) est représenté par un point sur le support. Les sondes peuvent être des ADN double brin de longueur de 200 à 2000 pb amplifiés par la technique de PCR ou des oligonucléotides courts (25 mers) ou longs (50-70 mers). Ces sondes permettent de fixer de façon spécifique les fragments d'ADN complémentaires des transcrits présents dans les échantillons biologiques à tester (**cibles**). Un système de marquage des cibles au moyen de traceurs fluorescents permet leur détection. La quantification des signaux obtenus et l'identification des fragments de gènes reconnus sont ensuite rendues possibles au moyen d'un système d'acquisition d'image puis d'analyse des données faisant appel à des logiciels informatiques spécialement conçus à cet effet. Les résultats obtenus sont validés sur le plan statistique et interprétés dans un contexte biologique. Une expérience standard de puce à ADN consiste définir si l'expression des gènes est similaire ou différente entre une situation contrôle et une situation test. En fonction de la technologie, deux types d'hybridation peuvent être réalisées : (i) les deux échantillons marqués par deux fluorochromes différents sont hybridés sur la même puce. L'hybridation est alors compétitive et fournit des valeurs d'expression relative ou ratios (Figure 36, page 69) ; (ii) chaque échantillon marqué est déposé individuellement sur la puce, fournissant ainsi deux séries de valeurs d'expression

absolues. Cette hybridation permet de **mesurer l'abondance relative de chacun des ARNm** présents dans chacun des échantillons biologiques étudiés.

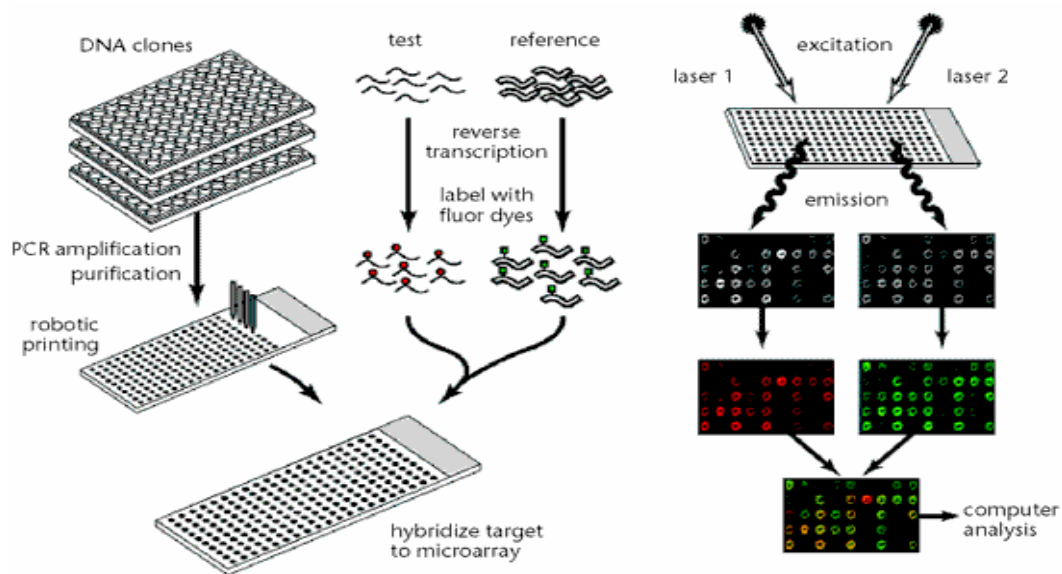


Figure 36 Principe général des puces à ADN. (" the Chipping Forecast ", *Supplement to Nature Genetics* 21, January 1999)

2. Puces à ADN dédiées au muscle : MyoChip

La technique des puces à oligonucléotides a déjà fait ses preuves dans le génotypage, les études d'expression génique, et l'établissement de diagnostics (El Atifi *et al.*, 2002 ; Nuwaysir *et al.*, 2002 ; Wang *et al.*, 2002). Les premiers résultats semblent montrer que dans le futur, les puces à oligonucléotides pourraient devenir la stratégie de choix en matière de puces.

La puce multidédiée ou MyoChip réalisée au laboratoire regroupe les populations de gènes d'intérêt identifiés par neuf thèmes différents, autour du domaine du muscle strié cardiaque et squelettique (Figure 37, page 70). Le criblage de ces gènes pertinents a été fait (i) par sélection expérimentale par criblage (*screening*) de puces à ADN pangénomiques, (ii) par connaissances biologiques *a priori*, par analyse de la littérature et/ou interrogation des bases de données publiques et (iii) par constitution de banques différentielles par approches

soustractives (SSH) (Diatchenko *et al.*, 1996 ; Tkatchenko *et al.*, 2000), séquençage systématique de banques d'EST et/ou analyse de banques SAGE (Velculescu *et al.*, 1995). Un oligonucléotide spécifique de chacun de ces gènes a ensuite été synthétisé par MWG. Les contraintes de choix des séquences sont les mêmes pour tous les oligonucléotides : une longueur de 50 oligomères, permettant d'avoir une stringence d'hybridation plus importante qu'avec des oligonucléotides courts, une localisation en région codante le plus près possible de l'extrémité 3' du gène, et donc du site de polyadénylation, un pourcentage en G-C d'environ 50% et un Tm (*melting Temperature*, température d'hybridation) compris entre 70 et 75°C. Chaque oligonucléotide est greffé en 5' par une séquence aminée. Une concentration identique de sondes peut être déposée dans chaque spot. Par une conception appropriée, les oligonucléotides longs peuvent permettre de distinguer les différentes formes d'épissage d'un ARNm et même différents polymorphismes d'un gène. Cette puce contient au total **3860 oligonucléotides dont 151 liés correspondent à des canaux ioniques et protéines régulatrices de l'homéostasie calcique** (Figure 37). 356 produits de PCR ont été ajoutés à la collection d'oligonucléotides.

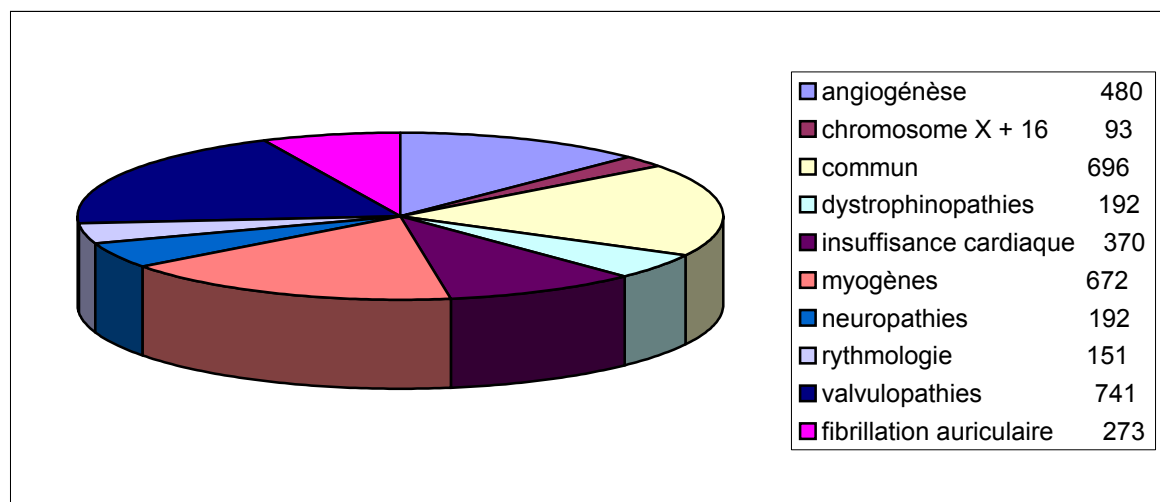


Figure 37 Proportions des différentes catégories d'oligonucléotides présents sur la MyoChip.

Les oligonucléotides et produits de PCR organisés en plaques de 96 puits, sont repris dans du Tampon A 1X (MWG). Ils sont alors tous à une concentration de 25 µM. Chaque oligonucléotide est spotted quatre fois sur la lame.

a. Les lames

Nous utilisons les lames commercialisées par MWG coatées d'époxy silane. Au cours du spotting, les groupements époxy chargés négativement réagissent avec le NH₂ des oligonucléotides aminés.

b. Microdépôt des sondes sur les lames

Les sondes amplifiées par PCR et stockées en plaques 96 puits sont déposées par un micropipeteur robotisé SDDC/C200 (Eurogentec). Un ordinateur (PC couplé au logiciel Chipwrighter) commande l'automate et permet de programmer la configuration du spotting. Le produit de PCR est prélevé par capillarité puis déposé, la pointe allant percuter successivement une série de lames. Chaque sonde déposée constitue ainsi une unité d'hybridation ou "spot" d'où le nom de spotting donné à cette étape. Chaque dépôt a une taille comprise entre 75 et 200 μm , et chaque sonde est présente en trois exemplaires sur la puce.

Les lames sont alors stockées à l'abri de la poussière, et utilisées au cours du mois suivant.

c. Extraction de l'ARNt

Pour extraire l'ARN total, les tissus sont traités selon la méthode de Chomczynski et Sacchi (1987), appliquée avec le Trizol (GIBCO BRL). Les ARN totaux sont ensuite traités à la DNase, afin d'éliminer l'ADN génomique contaminant, selon le protocole du *RNeasy Mini Kit* et du *RNase-Free Dnase Set* (Qiagen). La concentration des ARN totaux a été évaluée par mesure de l'absorbance à 260nm (DO 260nm, NanoDrop ND-1000, NanoDrop Technologies). Seuls les ARN pauvres en protéines (DO 260nm/280nm entre 1.8 et 2) ont été retenus pour la suite de l'expérimentation. L'absence d'ADN a été vérifiée par PCR. La qualité des ARN a été contrôlée par une technique de micro-électrophorèse en capillaire, sur gel d'acrylamide (Agilent 2100 Bioanalyser, Agilent).

d. Marquage des cibles

Les ARNt sont concentrés par précipitation, à une concentration de 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Le marquage des cibles est réalisé à l'aide du kit CyScribe Post Labelling (Amersham).

La transcription inverse est réalisée sur 20 μg d'ARNt avec des amorces oligo-dT. Des dUTP-aminoallyl (AA-dUTP) sont incorporés aux cDNA au cours de la réaction. Les cyanines ajoutées par la suite interagissent de manière covalente, par leur groupement thiol, avec le groupement amine des AA-dUTP. Les cibles de l'échantillon A sont marquées avec le fluorochrome, ou cyanine, Cy3, et celles de l'échantillon B, avec le Cy5. Ces molécules diffèrent par leur spectre d'absorption et d'émission : le Cy3 émet à 540nm (dans le vert), et le Cy5, à 650nm (dans le rouge).

e. Le traitement des lames

Les lames spottées sont incubées 15 min dans un bain à 50°C d'éthanolamine 50mM, Tris base 100mM, pH9, et SDS 0.1%. Cette étape permet le blocage des groupes époxy qui n'ont pas interagit avec les oligonucléotides. Après deux lavages dans l'eau, elle sont placées 15 min dans un bain à 50°C, SSC4X, SDS 0.1%. Après séchage, les lames sont préhybridées 1h à 42°C dans 150ml de SSC3.5X, SDS0.3%, BSA 1%, filtrées et préchauffées. Après lavages dans l'eau et séchage par centrifugation, les lames sont stockées à l'abri de la poussière et sont prêtes pour l'hybridation.

f. Analyse d'image

La fluorescence émise par les marqueurs est enregistrée. Le signal est recueilli sous forme d'une image segmentée de manière à circonscrire chaque spot. Les données sont extraites, permettant de définir pour chaque spot l'intensité d'hybridation correspondant à chaque cible. Le ratio des intensités est un paramètre interprétable de manière fiable. Il décrit le niveau d'expression relatif entre les deux cibles.

Recueil des images par le scanner

La lecture des lames est réalisée à l'aide d'un scanner composé d'un microscope confocal ScanArray (4000 GSI LUMONICS-USA) couplé à deux lasers, de longueurs d'ondes différentes, et à un photomultiplicateur (PMT). Les lames sont lues successivement par l'un puis l'autre des lasers permettant l'excitation des fluorochromes Cy3 et Cy5. Les molécules fluorescentes incorporées aux sondes absorbent alors l'énergie émise par le laser et émettent des photons qui sont captés par le PMT. Ce dernier convertit les photons en signal électrique et l'amplifie. Ce signal électrique est ensuite converti en signal digital. La fluorescence émise est enregistrée avec une résolution spatiale de 10 µm. On obtient ainsi deux images polychromes distinctes correspondant chacune à une **cartographie de l'intensité émise par les deux cyanines** (Figure 38, page 73). Les réglages d'intensité de chaque laser et du PMT permettent d'obtenir des niveaux globaux d'intensité équivalents pour les deux images.

Traitement de l'image et acquisition des données

Les images sont importées dans un logiciel de traitement d'image (GenePix Pro) dédié aux puces et développé par Axon.

Les deux images sont superposées et affichées suivant un code couleur artificiel : la cartographie Cy3 est représentée en intensités de vert, celle de Cy5 en intensités de rouge. Ces intensités sont croissantes avec le niveau du signal. Après superposition des deux

images, la majorité des spots, où les intensités des deux cyanines sont équivalentes, apparaissent en jaune (Figure 38, page 73).

La première étape consiste à positionner sur l'image des grilles de cercles. Chaque cercle est adapté autour d'un spot de manière à séparer au mieux l'unité d'hybridation du reste de la lame. Cette segmentation est fondamentale pour le calcul de l'intensité du signal et de l'intensité du bruit de fond autour de chaque spot. Par ailleurs, les spots présentant un aspect artéfactuel (poussières fluorescentes, spots arrachées,...) sont différenciés de manière à être écartés de l'analyse ultérieure. Les données sont extraites sous forme d'un fichier exploitable sous Excel. Pour chaque spot, on obtient la localisation sur la lame et l'intensité des signaux d'hybridation et de bruit de fond local pour chaque fluorochrome. Des critères de qualité de l'information recueillie, basés sur le rapport signal/bruit de fond sont également disponibles. Les intensités de signal utilisées, ou données brutes, correspondent au signal mesuré moins le bruit de fond local. Le ratio qui est utilisé par la suite est défini par le rapport d'intensité des signaux bruts.

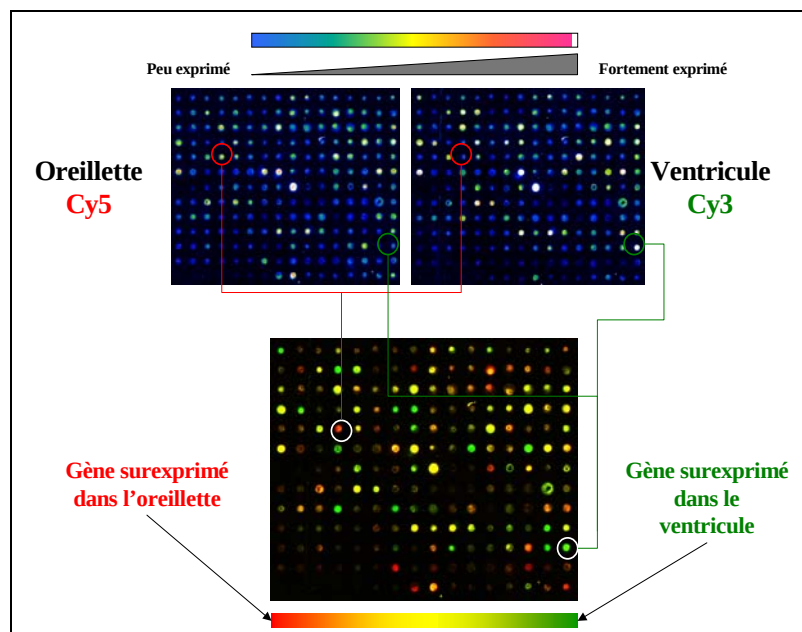


Figure 38 Recueil et traitement des images.

Traitement des données

Le programme de traitement des données, Madscan, a été développé dans notre laboratoire par Nolwenn LE MEUR. Il est disponible sur internet :

<http://cardioserve.nantes.inserm.fr/mad/madscan/login.php>

- *Analyse qualité des spots*

Un score compilant les critères de qualité et les niveaux d'intensité du signal permet de sélectionner les **clones valides pour l'interprétation des données**. La cohérence de l'ensemble des pixels composant le signal d'hybridation et des pixels composant le bruit de fond est prise en compte. Les dépôts comportant des défauts sont écartés de l'analyse.

- *Normalisation des données*

La normalisation permet d'**éliminer toute source de variations** due à la phase expérimentale, qui biaise la mesure du niveau d'expression. C'est le cas par exemple des variations de dépôt des sondes par les pointes, d'incorporation de cyanines, mais aussi des variations liées aux paramètres de scanner et à l'hétérogénéité du bruit de fond sur la lame. La normalisation dite de *Lowess fitness* est réalisée bloc par bloc : chaque groupe de spots sur la lame ou bloc contient un certain nombre de gènes invariants. Une somme de régressions locales est réalisée à partir de cette population de gènes. Les intensités de Cy3 et Cy5 sont normalisées au niveau de chacune des droites, de manière à les ramener le plus proche possible d'un ratio de 1.

Pour comparer l'ensemble des puces d'un même groupe d'échantillon, une **normalisation inter-lames (scaling)** ou standardisation est appliquée, afin de réduire l'écart de la variance des mesures entre les lames. Pour cela, MADSCAN propose de réduire la distribution des mesures d'expression de chaque lame répétée à la même déviation absolue de la médiane ou MAD (*Median Absolute Deviation*, écart type de la médiane), cette mesure étant moins sensible aux valeurs atypiques que l'écart-type. En effet, la MAD est un test *t* modifié où la déviation absolue de la médiane est utilisée à la place de la déviation standard dans le calcul du score Z (Wessel, 2000).

La dernière correction est la recherche des **valeurs aberrantes (outliers)** parmi les mesures répétées d'un même gène. Les valeurs aberrantes ont, par exemple, pour origine la faible spécificité des sondes et/ou un bruit de fond hétérogène à la surface des lames. Elles sont exclues par le calcul de la MAD (Barnett & Lewis, 1984).

3. Les limites de la technique des puces à ADN

- Le niveau de sensibilité des puces ne permet de détecter que difficilement les gènes faiblement exprimés tels que les canaux ioniques.
- Les quantités de matériel biologique nécessaires pour réaliser une puce à ADN sont assez élevées (20µg de d'ADN complémentaires) et donc ne permettent pas l'analyse de petits échantillons sans amplification préalable.

- La technique des puces à ADN connaît à l'heure actuelle une amélioration notable. En effet, une meilleure annotation des séquences exprimées ainsi que le développement d'une technologie de plus en plus performante chimiquement, standardisée par l'utilisation de kits et de machines sophistiquées, et contrôlée par des méthodes statistiques robustes (Le Meur *et al.*, 2004) contribuent progressivement à l'amélioration de la technique (pour revue : *Tumor Analysis Best Practices Working Group*, 2004). Par ailleurs, le développement de puces à ADN "isoformes spécifiques" permet aujourd'hui d'accéder à l'expression des différentes isoformes issues d'épissages alternatifs (Fehlbaum *et al.*, 2005).

C. LA RT-PCR QUANTITATIVE A HAUT DÉBIT

Le processus d'isolement des ARN totaux est le même que pour les puces à ADN (page 71). Pour les biopsies de l'étude du syndrome de Brugada (article 4), le traitement à la DNase est réalisé à l'aide du kit *RNeasy Fibrous Tissue Micro Kit* (Qiagen).

La synthèse du premier brin d'ADN complémentaire (ADNc) est réalisée à partir des ARN totaux (de 50 à 2000 ng) à l'aide du kit *High-Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems).

La quantification par PCR de l'expression des gènes a été réalisée à l'aide de la **technologie TaqMan**. Le principe de la technologie *TaqMan* repose sur la propriété exonucléasique 5'-3' de la Taq DNA polymérase (Figure 39). A chaque cycle PCR, la Taq DNA polymérase clive l'extrémité 5' de la sonde *TaqMan* et libère ainsi le rapporteur fluorescent. La fluorescence émise par celui-ci ne sera donc plus transférée au quencheur et pourra alors être mesurée à sa longueur d'onde spécifique. La fluorescence émise est proportionnelle à la quantité de produits PCR synthétisés. Cette technologie est commercialisée par la société Applied Biosystems sous la forme d'essais (*TaqMan Gene Expression Assays*) constitués d'un couple d'amorces (amorces sens et anti-sens) et d'une sonde *TaqMan* spécifiques d'un gène. Les sondes *TaqMan* sont marquées en 5' par le rapporteur fluorescent 6-carboxyfluorescéine (FAM, Applera Corp.) et en 3' par un quencheur non-fluorescent (Figure 39). Elles sont en majorité inter-exoniques et permettent de quantifier toutes les isoformes issues d'épissages alternatifs. L'efficacité de PCR des essais est de 100%, autrement dit, la quantité de produits PCR est doublée à chaque cycle. Les essais *TaqMan* utilisés pour chaque projet sont listés dans l'annexe.

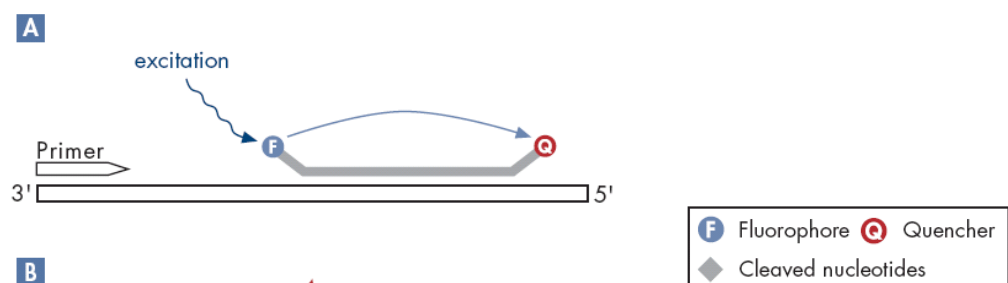


Figure 39 Principe de la technologie *TaqMan*. Représentation schématique en 2 étapes de la phase d'élongation de la réaction PCR.

La quantification relative utilise la **méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$** (Livak & Schmittgen, 2001 ; Figure 40). Le Ct (*threshold cycle*) correspond au nombre de cycles PCR nécessaires pour atteindre un seuil fixe (*threshold*) situé dans la phase linéaire de la courbe d'amplification sigmoïdale. Le Ct du gène x est normalisé par un gène de référence selon la formule $\Delta Ct = Ct_x - Ct_{référence}$. Le calcul du $\Delta\Delta Ct$ permet ensuite de comparer l'expression du gène x dans une condition B par rapport à une condition A ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_B - \Delta Ct_A$). La transformation des valeurs logarithmiques en échelle linéaire permet enfin d'obtenir les ratios $2^{-\Delta Ct}$ ou $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Le $2^{-\Delta Ct}$ correspond au ratio d'expression d'un gène x par rapport au gène de référence. Le $2^{-\Delta\Delta Ct}$ correspond au ratio d'expression du gène x dans une condition expérimentale B par rapport à une condition expérimentale A.

Dans toutes les études présentées, la normalisation des données d'expressions relative ou absolue est réalisée par le gène de référence *HPRT* (*hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase*).

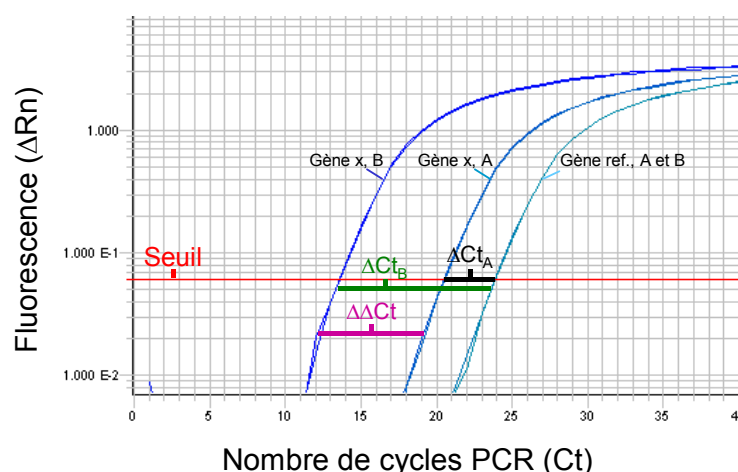


Figure 40 Représentation schématique de la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Pour chaque condition expérimentale (A et B), le ΔCt est calculé selon la formule: $\Delta Ct = Ct_x - Ct_{ref.}$, où x correspond au gène analysé, et ref. au gène de référence utilisé pour la normalisation. Le calcul du $\Delta\Delta Ct$ permet ensuite de comparer l'expression du gène x dans la condition B par rapport à la condition

A ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_B - \Delta Ct_A$). On notera ici que l'expression du gène de référence est stable entre les deux conditions A et B.

La quantification relative est effectuée en essais individuels, ou à haut débit, c'est à dire sur 96 gènes en simultané, grâce à l'utilisation des **cartes microfluides ou Low Density Arrays** (Applied Biosystems).

1. Quantification individuelle

Les amplifications PCR sont réalisées sur 10 ng d'ADNc à l'aide des essais *TaqMan* et des réactifs PCR *TaqMan Universal Master Mix* (1X, Applied Biosystems). L'amplification est réalisée en duplicat à 50°C, 2 min - 95°C, 10 min suivi de 40 cycles: 95°C, 15 sec - 60°C, 1 min dans un thermocycleur *ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System* (Applied Biosystems). Les données sont collectées à l'aide du logiciel SDS 2.1 (Applied Biosystems). L'expression des gènes est analysée selon la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

2. Quantification à haut débit

Une carte microfluide est constituée de 384 puits préalablement chargés par un essai *TaqMan* spécifique d'un gène (Figure 41). Huit réservoirs distribuent, via des micro-capillaires, les 384 puits disposés en 8 lignes de 48 puits. Nous avons choisi une configuration 96 gènes qui permet d'amplifier 96 gènes dans 4 échantillons en simultané. Les 96 gènes étudiés codent pour différentes sous-unités α et auxiliaires des canaux ioniques, des protéines impliquées dans l'homéostasie calcique, des facteurs de transcription, ainsi que pour des marqueurs spécifiques des compartiments cardiaques, des vaisseaux, des neurones, des fibroblastes, de l'inflammation et de l'hypertrophie cardiaque (voir Annexe). Cent nanogrammes d'ADNc combinés aux réactifs PCR *TaqMan Universal Master Mix* (1X) sont déposés dans chaque réservoir puis distribués par centrifugation via les micro-capillaires dans chacun des 48 puits. Chaque puits contient 1 ng d'ADNc dans un volume réactionnel de 1 μ l. Les puits sont scellés et les amplifications sont ensuite réalisées en simplicat à 50°C, 2 min - 94,5°C, 10 min suivi de 40 cycles: 97°C, 30 sec - 59,7°C, 1 min dans un thermocycleur *ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System*. Les données provenant de plusieurs *Low Density Arrays* sont analysées simultanément et extraites à l'aide du logiciel SDS 2.1. La méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ permet ensuite d'exprimer les résultats. Les gènes dont le Ct est supérieur à 32 sont éliminés pour leur manque de reproductibilité.

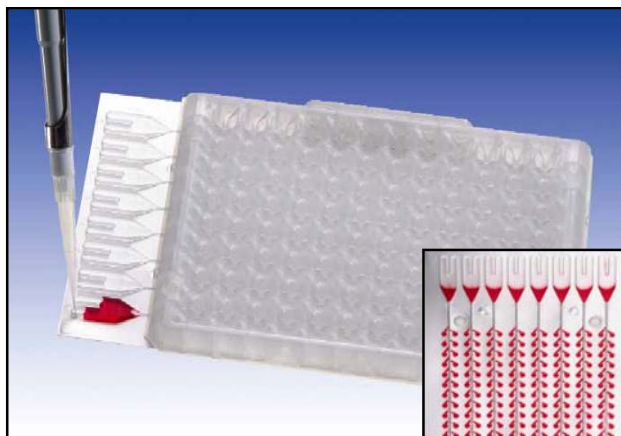


Figure 41 Photographie d'une carte microfluide ou *Low Density Array*. Chaque réservoir distribue, via un micro-capillaire, 48 puits.

3. Les limites de la RT-PCR quantitative à haut débit

- La société Applied Biosystems ne donne pas accès aux séquences des amorces et des sondes. Il n'est donc pas possible de les situer précisément sur le transcrit à amplifier.
- Bien que Applied Biosystems garantisse une efficacité de PCR de 100% pour chaque couple d'amorce, étant donné qu'il n'est pas possible de récupérer le produit de PCR à partir des *Low Density Arrays*, il n'est donc pas possible de le vérifier. Il n'est donc pas non plus possible de faire migrer le produit de PCR afin de vérifier la spécificité de l'amplification.
- L'analyse de l'expression de différents isoformes n'est possible que pour une partie des gènes. En effet, généralement les essais amplifient l'ensemble des isoformes d'un gène.
- Les *Low Density Arrays* ne permettent pas de réaliser une quantification absolue du nombre de copies d'ARNm des gènes. Seules les essais individuels y donnent accès.
- Seule une partie des essais commercialisés par Applied Biosystems peut être incluse dans une *Low Density Arrays*. Ce sont les essais inventoriés (*Inventoried*), c'est à dire disponibles en permanence dans les stocks de l'entreprise.
- Les choix possibles de configuration des *Low Density Arrays* sont également limités. Il n'est par exemple pas proposé de déposer deux fois la même série de 192 gènes. Il faut donc trouver, pour l'étude à réaliser, le meilleur compromis possible entre le nombre d'échantillons et le nombre de gènes à analyser.

D. CLASSIFICATION DES DONNÉES D'EXPRESSION

Suite à la mise en évidence des gènes différentiellement exprimés dans une matrice de données d'expression, il est intéressant de **rechercher et visualiser les éventuels regroupements de gènes et/ou d'échantillons d'après leur profil d'expression**. Les algorithmes de classification permettent notamment de répondre aux questions suivantes : Existe-il des regroupements selon les portraits moléculaires des échantillons, selon les profils d'expression des gènes? Qu'est ce qui distingue ces échantillons, ces gènes? Un grand nombre d'algorithmes de classification existe mais nous n'allons décrire que la classification hiérarchique non-supervisée.

1. Définition

Les algorithmes de classification sont des **méthodes de répartition d'un ensemble d'éléments** en plusieurs sous-ensembles, sur la base de leurs similarités ou dissimilarités (Gilbert *et al.*, 2000). Le but est de construire des groupes qui minimisent la variabilité intra-groupe tout en maximisant les distances inter-groupes. Plus précisément, ils visent à trouver l'ensemble des groupes (gènes ou échantillons) dont les membres sont très similaires mais distants des autres membres sur la base de leur profil d'expression. Une matrice de données d'expression se compose de n gènes et m échantillons. Ces matrices peuvent être étudiées selon les lignes (gènes) et/ou selon les colonnes (échantillons).

2. Classification hiérarchique non-supervisée

Les méthodes de classification non supervisée sont des techniques de regroupement (*clustering*) où un processus automatique sépare les données observées en groupes distincts sans aucune connaissance préalable des classes existantes. Les méthodes non supervisées regroupent les objets sans *a priori* (*data driven*). Ces techniques sont dites exploratoires (*exploratory techniques*) et sont essentiellement employées pour la découverte de classes (*class discovery*). Par exemple, l'application de ces techniques a montré que la taxonomie actuelle des cancers regroupe des maladies distinctes sur le plan moléculaire (Golub *et al.*, 1999 ; Alizadeh *et al.*, 2000).

D'abord utilisées en phylogénie, les méthodes de classification hiérarchique sont aujourd'hui les techniques de classification non supervisée les plus utilisées pour étudier les profils d'expression de gènes ou d'échantillons. Elles génèrent des **suites de classes emboîtées qui définissent une hiérarchie de partitions** encore appelée classification hiérarchique. Les algorithmes de classification travaillent à partir des matrices de distances issues des matrices de données d'expression. Actuellement, il existe trois principales modalités de calcul de distances entre les classes (distance inter-groupes) qui permettent de générer deux grands types d'algorithmes de classifications hiérarchiques : les algorithmes ascendants et les algorithmes descendants. Nous ne décrivons ici que les algorithmes ascendants qui nous ont permis de classer nos différentes matrices de données.

a. Distances inter-groupes

Des règles de calcul, encore appelées **règles d'agglomération**, sont nécessaires pour estimer les liaisons entre les groupes disjoints. Les principales distances inter-groupes sont actuellement le lien simple, le lien complet et le lien moyen. Le **lien moyen** (*average linkage*) est l'approche la plus utilisée. La distance entre deux groupes est la moyenne des distances entre toutes les paires d'objets (gènes ou échantillons biologiques) de ces deux groupes. Le **lien simple** ou lien du saut minimum (*single linkage*) est encore qualifié de lien du plus proche voisin (*nearest neighbor*). La distance entre deux groupes est déterminée par la distance entre les deux éléments les plus proches, appartenant à deux groupes différents. Lorsqu'il existe plusieurs distances minimales équivalentes entre des groupes, le lien simple est l'algorithme d'agrégation le plus approprié. En revanche, dans les autres cas, cette approche a tendance à générer des agglomérations de groupes très différents mais dont les voisins sont très proches (Yeung *et al.*, 2001). Cette méthode est généralement peu applicable aux données de génomique. Le **lien complet** (*complete linkage*) ou lien d'agrégation par le diamètre est encore qualifié de lien du voisin le plus distant (*furthest neighbor*). La distance entre deux groupes est déterminée par la distance entre les deux éléments les plus éloignés, appartenant à deux groupes différents. Généralement les

groupements générés sont de petites tailles et fusionnent très tard dans la hiérarchie. La méthode du lien complet est particulièrement efficace si les objets appartiennent naturellement à des groupes de données distants dans l'espace de données. Toutefois, cette approche est sensible aux valeurs manquantes, même en faible nombre.

Pour classer nos matrices de données nous appliquons l'approche du lien moyen utilisant le coefficient de Pearson non centré pour mesurer la similarité d'expression entre les groupes.

b. Algorithmes ascendants

Les algorithmes ascendants ou agglomératifs construisent des groupes par **agrégations successives** des éléments les plus proches deux à deux pour fournir une hiérarchie de partitions des objets (Figure 42, page 82). Le terme *élément* désigne donc à la fois les individus à classer et les regroupements d'individus générés par l'algorithme. Au départ, chaque élément constitue un groupe de taille 1. Puis, à chaque étape, les deux groupes les plus proches sont recherchés et fusionnés jusqu'à ce qu'il n'y ait plus qu'un seul groupe.

La hiérarchie obtenue est généralement représentée sous la forme d'un arbre planaire hiérarchique, également appelé dendrogramme (Figure 42, page 82). Ce dendrogramme décrit de façon explicite la structure finale de la hiérarchie. Les individus qui se ressemblent le plus se regroupent dans le bas de l'arbre. La longueur des branches témoigne de leur éloignement. Cette représentation graphique permet également d'estimer le nombre de classes existant effectivement dans la population. Enfin, il faut noter l'aspect isomorphe d'un dendrogramme : les nœuds de l'arbre pivotent. Seule la longueur des branches aide à définir la proximité entre les groupes. Associées à l'arbre, les matrices de données d'expression sont transformées en cartes "thermiques", colorées en fonction du niveau d'expression relatif des gènes. Généralement, les couleurs employées vont du vert (niveau bas) au rouge (niveau élevé) en passant par le noir (niveau médian). Finalement, la classification obtenue est représentée sous la forme de deux dendrogrammes (un pour les gènes, un pour les individus) et d'une carte "thermique".

La classification est réalisée à l'aide du programme *Cluster* et est visualisée à l'aide du programme *Treeview* (Eisen *et al.*, 1998).

Pour exemple, l'algorithme de classification hiérarchique ascendante a été appliqué à une étude réalisée au laboratoire (Gaborit *et al.*, Résultats et discussion - A - 1 ; Figure 42, page 82). Le travail visait à analyser l'expression des canaux ioniques dans les oreillettes et les ventricules droits et gauches. Les données analysées sont issues de *Low Density Array* représentant les canaux ioniques exprimés dans le cœur humain.

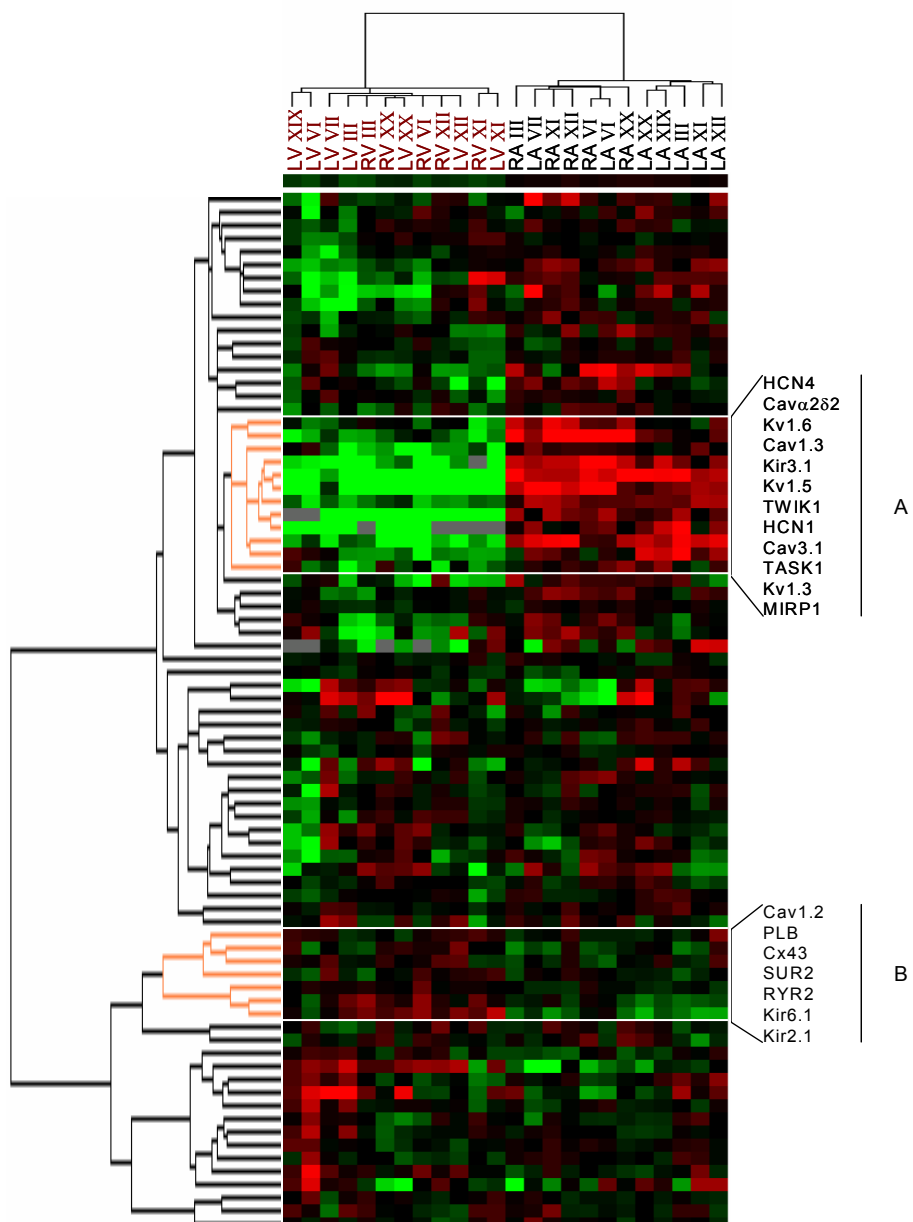


Figure 42 Classification hiérarchique ascendante utilisant le coefficient de Pearson non centré pour mesurer de similarité et la moyenne entre les groupes (lien moyen) pour algorithme d'agrégation. La classification répartit les échantillons principalement en 2 groupes : les oreillettes droites et gauches (noir) et les ventricules droits et gauches (rouge bordeaux). Deux groupes de gènes, annotés en orange, sont à l'origine de cette séparation des patients.

E. LES MÉTHODES STATISTIQUES

Les méthodes mathématiques et statistiques sont devenues incontournables **pour le traitement et l'interprétation des données** de génomique. En ce qui concerne les puces à ADN, les matrices de données d'expression présentent généralement des caractéristiques atypiques : les données sont le plus souvent bruitées et les matrices sont généralement dissymétriques (plus de gènes que d'échantillons). Aussi, la nécessité de valider la qualité des données et la difficulté d'analyser des matrices dissymétriques sont à l'origine de nombreuses recherches et d'un grand nombre de développements mathématiques et statistiques. De plus, compte tenu de la quantité d'informations générées, une analyse manuelle devient très rapidement fastidieuse et source d'erreurs. L'exploitation des données ne peut se faire sans l'aide de procédures automatiques, *i.e.* d'outils logiciels. Ainsi, de nombreux algorithmes sont développés pour l'analyse des données de puces à ADN. Concernant les données de TaqMan à haut débit, étant donné leur qualité (peu bruitées) et leur nombre assez limité, des tests plus "classiques" (Test t , Mann Withney) sont suffisants.

La mise en évidence des gènes "différentiels" par la simple analyse descriptive des amplitudes de variations d'expression (*fold change*) est insuffisante. Des approches statistiques sont nécessaires afin d'estimer et de distinguer la variabilité intra et inter-groupes. De nombreux tests statistiques ont ainsi été proposés. L'application des tests dépend de plusieurs paramètres. Tout d'abord, il faut savoir si les données analysées sont indépendantes (Golub *et al.*, 1999) ou appariées (Perou *et al.*, 2000). Ensuite, le mode de distribution des données doit être évalué : distribution gaussienne ou pas. En effet, les tests paramétriques tels que les tests t supposent une distribution normale des données. A

l'inverse, les tests non paramétriques sont moins sensibles au mode de distribution des données et aux valeurs atypiques. Enfin, la variance intra et inter-groupe doit être estimée. Les tests paramétriques sont sensibles à une mauvaise estimation de l'homogénéité des variances.

1. Tests paramétriques classiques ou tests t

Le test de Student ou test t est la méthode la plus couramment utilisée pour évaluer si la différence observée entre 2 échantillons est significative. Deux versions du test t existent suivant l'indépendance (*unpaired*) ou l'appariement (*paired*) des échantillons. **Le test t pour données appariées** (*paired t-test*) s'applique, par exemple, à la comparaison de 2 échantillons tissulaires provenant de 2 compartiments différents du cœur d'un même patient. **Le test t pour données non appariées** ou "test t 2 classes" permet la comparaison de deux populations différentes. Par exemple, une population de patients atteints d'insuffisance cardiaque peut être comparée à une population de patients contrôles pour mettre en évidence les modifications liées à la pathologie au niveau transcriptionnel. Bien qu'un test t puisse donner des résultats satisfaisants pour un nombre d'échantillons important, les résultats sont peu fiables pour un petit nombre de mesures répétées : il en faut 5 au minimum. De plus, l'application du test t requiert un jeu de données distribuées selon la loi normale. Aussi, l'utilisation d'un test t "classique" est rarement applicable aux données de puces à ADN compte tenu des contraintes d'application des tests paramétriques, par contre il est souvent utilisé pour les données de TaqMan (Pan, 2002).

2. Tests non paramétriques

Les tests non paramétriques sont généralement robustes face aux données bruitées comme dans le cas des données de puces à ADN. Deux grandes catégories de tests non paramétriques existent : (i) les tests dits "classiques", peu différents des tests paramétriques, et (ii) les tests par ré-échantillonnages ou permutations aléatoires, plus récents.

a. Tests non paramétriques "classiques"

Parmi les tests non paramétriques "classiques", l'équivalent du test t sur des données appariées est le **test des signes de Wilcoxon**. Ce test ordonne les ratios en fonction de leur amplitude de variation et attribue un rang à chacune des valeurs. La somme des rangs pour les valeurs positives des ratios est ensuite calculée et comparée à la table de Wilcoxon pour en déduire la p -value. Le **test de Mann Withney** (ou test de la somme des rangs de Mann

Withney) est, quant à lui, l'équivalent non paramétrique du test t sur les données non appariées. Les données des deux groupes sont combinées en un seul classement et classées dans un ordre croissant. Les rangs d'un groupe sont comparés à la distance des rangs de l'autre groupe. Cette valeur est alors comparée à la table de Mann-Withney pour obtenir une p -value. Ces tests possèdent l'avantage d'être applicables à des données dont la distribution ne suit pas la loi normale. Toutefois, ces tests sont globalement moins puissants que leur équivalent paramétrique ou que les méthodes par ré-échantillonnage aléatoire (Thomas *et al.*, 2001).

b. Analyses par ré-échantillonnage aléatoire

L'objectif des analyses par ré-échantillonnage aléatoire (*bootstrapping*) est de comparer un jeu de données observées expérimentalement à des jeux de données empiriques (générées) afin de déterminer si la distribution des données observées est liée au hasard. L'outil le plus utilisé actuellement pour ce type d'analyse est **SAM**, ou *Significance Analysis of Microarrays* de Tusher *et al.* (2001). Afin d'illustrer le principe des analyses par permutation, prenons l'exemple d'une analyse par SAM d'un jeu de données non appariées. Les données expérimentales sont extraites de l'analyse de 2 groupes de patients atteints de pathologies cardiaques différentes, notés AF-VHD et SR-VHD pour fibrillation auriculaire et valvulopathie (Gaborit *et al.*, 2005). Les jeux de données empiriques sont créés à partir des données d'origine par permutations aléatoires des individus entre les différents groupes. La base de comparaison des distributions est le test t . Les statistiques t des données réelles (observées) sont comparées à la distribution des statistiques t des données permutées au hasard (attendues). La p -value est calculée à partir de la distribution des statistiques t calculées sur les données permutées. Si la distribution des statistiques t des données réelles est identique à celle des données attendues, la différence entre les jeux de données est du au hasard. Inversement, un écart entre les distributions témoigne d'une différence significative entre les groupes.

Afin de répondre au problème de dimension des matrices d'expression, Tusher *et al.* (2001) proposent un test t modifié et une estimation du taux de faux positifs (FDR) par permutation. De nombreuses études ont montrées qu'un test t modifié diminue le taux de faux positifs et faux négatifs par rapport à un test t standard (Efron *et al.*, 2001 ; Tusher *et al.*, 2001; Lönnstedt & Speed, 2002 ; Smyth *et al.*, 2003 ; Broberg, 2003).

Les analyses par ré-échantillonnage font encore l'objet de nombreuses recherches (Kerr & Churchill, 2001 ; Tusher *et al.*, 2001 ; Dudoit *et al.*, 2002 ; Datta *et al.*, 2004). Ces techniques sont applicables à l'ensemble des dessins expérimentaux, *i.e.* données appariées ou non.

Tout comme les tests non paramétriques "classiques", elles ne nécessitent pas une distribution normale des données. Elles sont par conséquent robustes aux valeurs atypiques et aux données bruitées. Toutefois, ces approches, requièrent un certain nombre de répétitions et nécessitent de la ressource informatique. Elles sont donc généralement bien adaptées à l'analyse des données de puce à ADN.

c. Approche bayésienne

Une alternative aux tests statistiques "classiques" est l'approche bayésienne. Le théorème de Bayes vise à calculer les probabilités *a posteriori* d'un événement en fonction des probabilités *a priori* de cet événement. *A priori* et *a posteriori* s'entendent par rapport à la connaissance d'une information. Plus précisément, le principe de base du théorème de Bayes est de calculer la probabilité *a posteriori* d'un événement A, sachant qu'un événement B s'est produit, en fonction sa probabilité. Une variante de cette solution, nommée ***limma***, adaptée à la problématique des puces à ADN, a été développée par Smyth (2004 ; disponible sur le site du projet Bioconductor ; <http://bioconductor.org>).

A. PLASTICITÉ DE L'EXPRESSION DES CANAUX IONIQUES DU CŒUR HUMAIN SAIN

1. Spécificité d'expression des gènes codant les sous-unités des canaux ioniques en fonction des compartiments du cœur humain sain (*article 1, page 93*)

a. Introduction

Chaque région du cœur est caractérisée par une activité électrique spécifique, elle-même gouvernée par l'expression d'un répertoire spécifique de canaux ioniques et de connexines (Boyett *et al.*, 1996). La caractérisation de cette hétérogénéité électrique régionale dans diverses situations physiologiques et pathologiques a suscité l'intérêt de nombreuses études (Schram *et al.*, 2002). Cependant, la plupart de ces travaux se sont limités à l'expression moléculaire et fonctionnelle d'un nombre restreint de courants ioniques. L'objectif de ce travail a donc été de caractériser les profils d'expression globaux des gènes codant les différentes sous-unités des canaux ioniques dans différentes régions du cœur humain. L'identification des profils régionaux représente un atout considérable pour la compréhension du fonctionnement et du rôle des canaux ioniques dans les différentes régions du cœur dans des contextes physiologiques et pathologiques. Huit structures contractiles, les oreillettes, les ventricules et le myocarde sous-épicaudique et sous-endocardique droits et gauches, ainsi qu'une structure automatique, les fibres de Purkinje, isolés à partir de 15 donneurs ont été étudiées. L'analyse du profil d'expression de 89 gènes a été réalisée par RT-PCR quantitative à haut-débit grâce à l'utilisation de *Low Density Arrays*.

b. Résultats

La technique de classification hiérarchique à deux entrées a permis de séparer les oreillettes, les fibres de Purkinje et les compartiments ventriculaires. Par contre elle n'a pas permis de discriminer et donc de mettre en évidence un profil d'expression spécifique pour l'épicaudique et l'endocarde, ni pour les cavités droites et gauches (Figure 1 et 2, article 1).

Les radars des figures 43 et 44 insérées dans le texte (pages 89 et 90) comparent l'expression relative des gènes codant 64 sous-unités α et β de canaux ioniques, entre l'oreillette et le ventricule des cavités droites et gauches, ainsi que entre les fibres de

Purkinje et le ventricule droit. La figure 6 de l'article 1 présente les résultats obtenus pour les gènes codant 17 protéines de l'homéostasie calcique.

La méthode utilisée permet de comparer le niveau d'expression des gènes entre eux. Ainsi, on peut par exemple constater que parmi les sous-unités des canaux Na^+ , les gènes les plus fortement exprimés sont *SCN5A* (Nav1.5), *SCN6/7A* (Nav2.1) et *SCN1B* (Nav β 1 ; Figure 43). Par ailleurs, parmi les canaux calciques les gènes *CACNA1C* (Cav1.2) et *CACNA2D1* (Cav α 2 δ 1) sont majoritairement exprimés dans le cœur humain (Figure 43).

Les gènes qui caractérisent les oreillettes comprennent Cx40, Kv1.5 et Kir3.1 comme attendu, mais aussi Cav1.3, Cav3.1, Cav α 2 δ 2, Nav β 1, TWIK1, TASK1 et HCN4 (indiqués en orange sur la figure 43). Seuls les canaux ioniques Kir2.1, Kv1.4 et Cav α 2 δ 1 (indiqués en bleu sur la figure 43) et les gènes codant les protéines RYR2 et PLB impliquées dans l'homéostasie calcique, présentent une expression supérieure dans les ventricules par rapport aux oreillettes (Figure 6 C, article 1). Comme la classification hiérarchique, la forte similarité des radars de la figure 43 permettent d'illustrer les faibles différences d'expression entre les cavités droites et gauches.

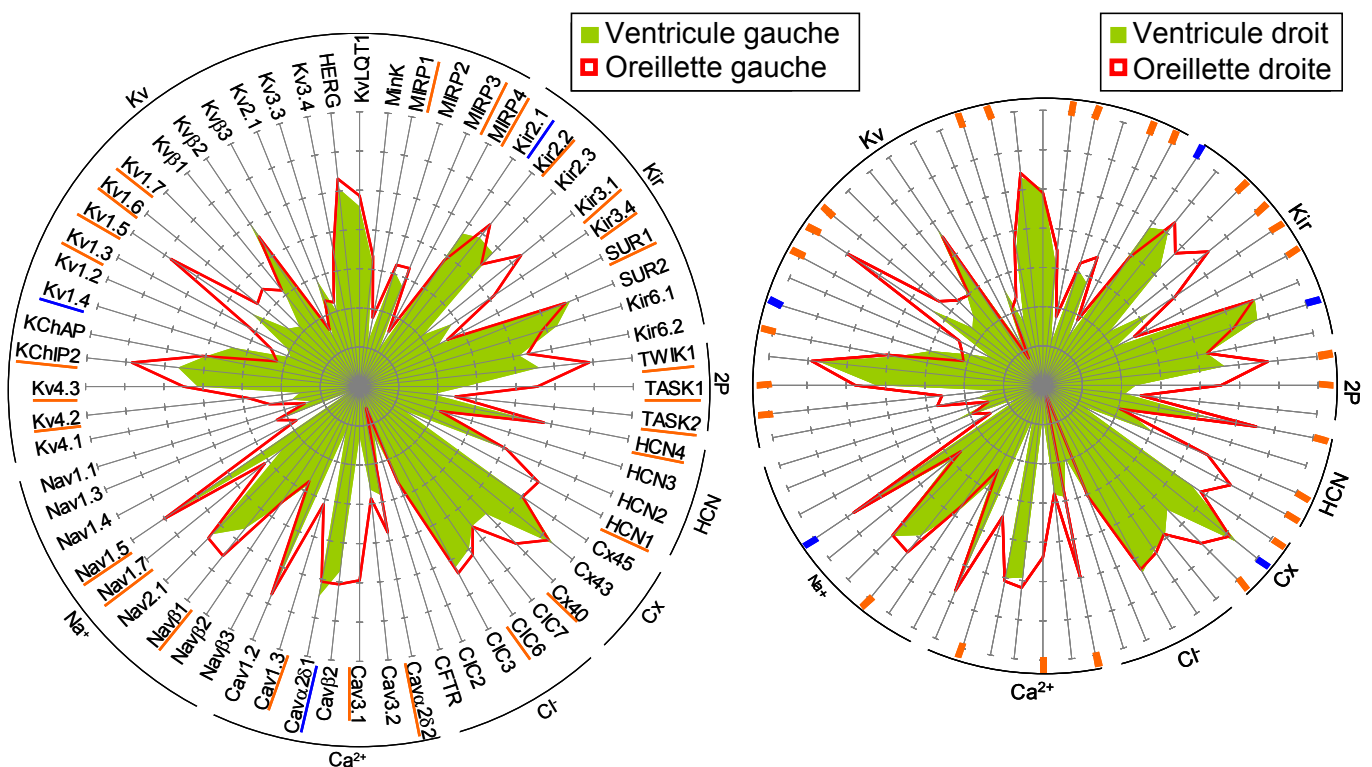


Figure 43 Profils d'expression des gènes codant les sous-unités des canaux ioniques dans le ventricule et l'oreillette gauches et droites. Sur chaque axe, l'expression relative d'un gène est exprimée en $-\Delta\text{Ct}$, représentant le ratio d'expression du gène par rapport au gène de référence *HPRT*, et correspondant à la moyenne calculée à partir de 7 échantillons ventriculaires et auriculaires gauches et de 5 échantillons ventriculaires et auriculaires droits. Les gènes indiqués en orange sont statistiquement plus exprimés dans les oreillettes par rapport aux ventricules. Les gènes indiqués en bleu sont statistiquement plus exprimés dans les ventricules par rapport aux oreillettes.

Le portrait des fibres de Purkinje, par comparaison aux ventricules, comprend une plus forte expression de Cav1.3, Cav3.1, Cav α 2 δ 2, Cx40, Kv4.3, Kir3.1, TWIK1, HCN4, CIC6 (indiqués en bleu sur la figure 44) et CALM1 (Figure 6 D, article 1).

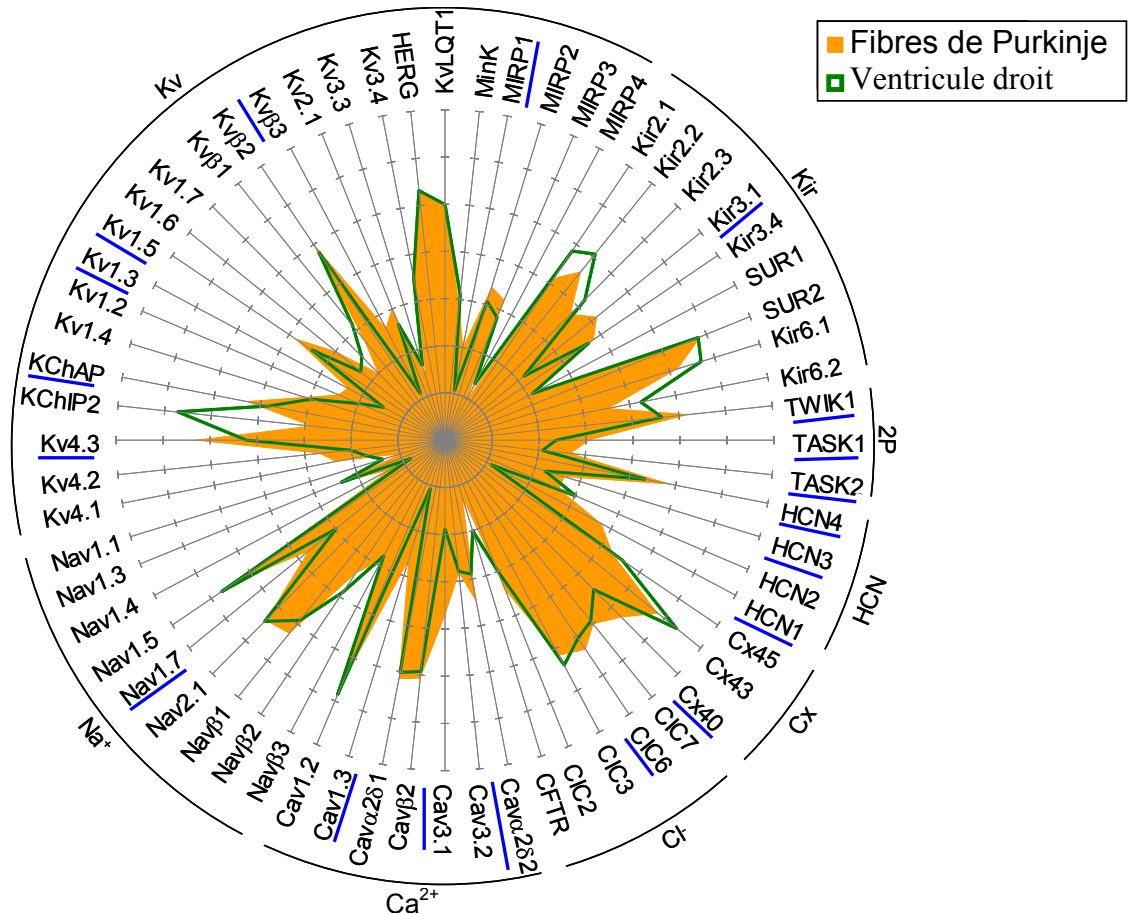


Figure 44 Profils d'expression des gènes codant les sous-unités des canaux ioniques dans les fibres de Purkinje (8 échantillons) et le ventricule droit (5 échantillons). Même format que pour la figure 43. Les gènes indiqués en bleu sont statistiquement plus exprimés dans les fibres de Purkinje par rapport au ventricule droit.

Parmi les transcrits qui sont plus fortement exprimés dans l'épicarde par rapport à l'endocarde se trouvent Cav1.2, KChIP2, SERCA2, CALM3 et la calcineurine- α . Nav1.5 et Nav β 1 sont à l'inverse plus largement représentés dans l'endocarde (Figure 3, 4 et 6 E, article 1). Ces différences d'expression transmuraux seront plus largement décrites dans l'article suivant.

Pour certains canaux, la corrélation entre les transcrits et les protéines a été explorée.

c. Conclusion et discussion

En conclusion, cette étude a permis pour la première fois de caractériser de manière globale les déterminants moléculaires de l'activité électrique de différentes régions du cœur

humain **sain**. Nos données révèlent des différences significatives d'expression des canaux ioniques entre les régions. Ces résultats peuvent donc fournir des éléments majeurs pour la compréhension du fonctionnement et du rôle des canaux ioniques à la fois dans des conditions physiologiques et physiopathologiques. La caractérisation de marqueurs moléculaires spécifiques de tissus automatiques (fibres de Purkinje) et contractiles (oreillettes, ventricules, myocarde sous-épicaudique et sous-endocardique) apporte des arguments forts pour l'identification de cibles spécifiques d'agents pharmacologiques dans le traitement des pathologies cardiaques (Figure 45).

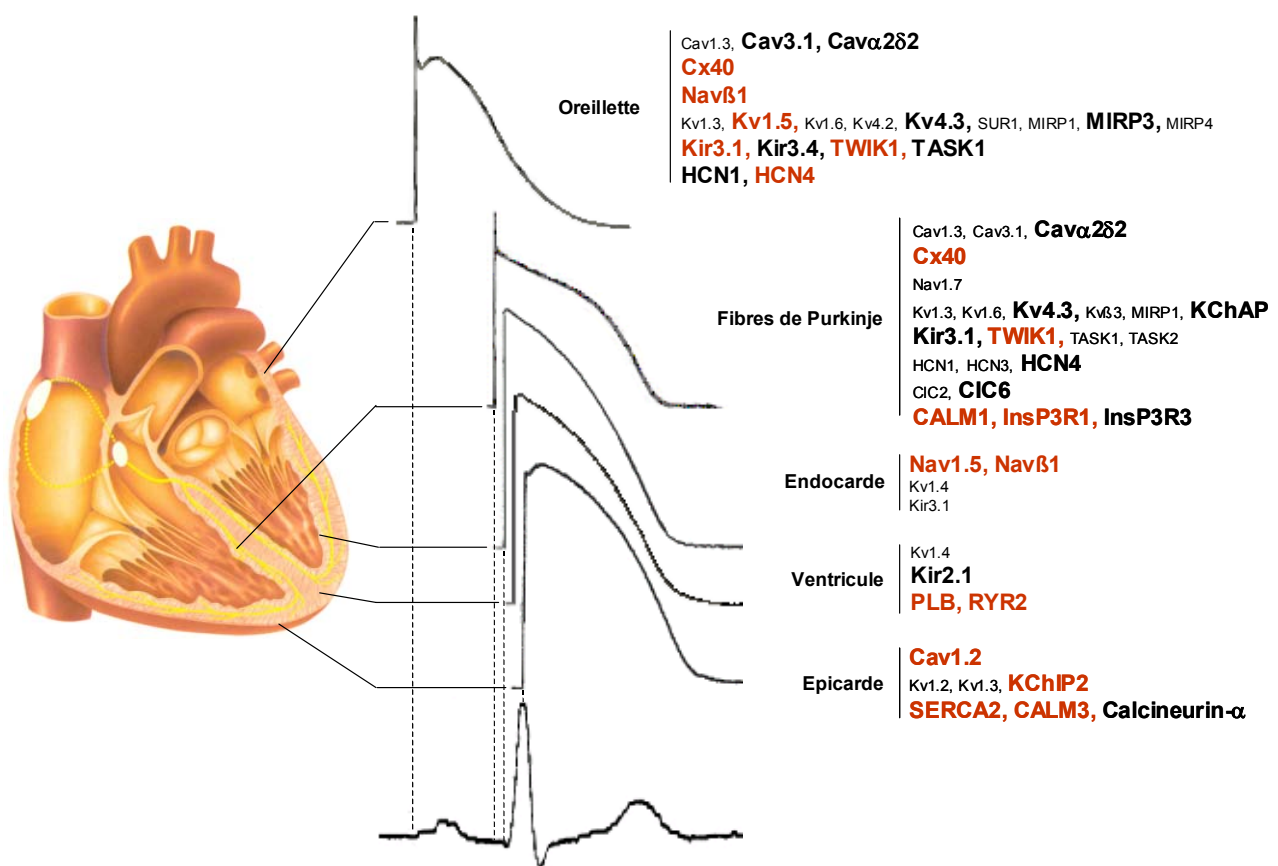


Figure 45 Représentation schématique des potentiels d'action et des marqueurs moléculaires de l'oreillette, des fibres de Purkinje, de l'endocarde, du ventricule et de l'épicarde. La partie droite du schéma indique les marqueurs moléculaires spécifiques de chaque région. En rouge sont indiqués les gènes les plus fortement exprimés, en noir et gras, les gènes d'expression intermédiaire et en noir, les gènes les plus faiblement exprimés.

Bien plus qu'une simple description moléculaire, l'approche globale de cette étude permet d'émettre des hypothèses concernant des possibles co-régulations des gènes. Il est en effet tentant de penser que les gènes présentant le même profil d'expression, regroupés dans un même cluster dans la classification hiérarchique, puissent être régulés par des voies de signalisation et/ou des facteurs de transcription communs. Cette perspective discutée à la

fin de la thèse (Discussion générale, page 214), sera plus précisément appréhendée par la caractérisation des profils d'expression des gènes codant pour des facteurs de transcription dans les différentes régions du cœur de souris. A un niveau plus fonctionnel, ces profils d'expression différentiels amènent fortement à suspecter la formation de complexes hétéromultimériques et permettent donc d'envisager des hypothèses de travail plus focalisées dans ce contexte. Ces résultats sont d'ailleurs d'une aide précieuse pour la caractérisation des sous-unités auxiliaires qui pourraient être utiles pour l'expression fonctionnelle d'un canal ionique dans des études d'expression hétérologue.

Annexe : liste des essais TaqMan utilisés pour ce projet et tableau des patients.

Cette étude suggère fortement que la spécificité de la fonction électrique de chaque compartiment cardiaque est la conséquence d'une expression régionale des canaux ioniques. Elle montre également que le profil d'expression des canaux ioniques discrimine chaque région cardiaque. Elle souligne ainsi l'importance de l'hétérogénéité de l'expression des canaux ioniques dans la spécialisation de la fonction électrique.

Ce travail établit le premier profil global de l'expression des canaux ioniques dans le cœur humain sain. Ce profil constitue une base pour l'étude du remodelage ionique et de ses conséquences hétérogènes dans les différentes régions du cœur humain.

Mapping ion channel gene expression in the normal human heart

Nathalie Gaborit, MSc;¹ Sabrina Le Bouter, PhD;² Viktoria Szuts, PhD;³ Andras Varro, PhD;³ Stanley Nattel, MD;² Denis Escande, MD, PhD;¹ Sophie Demolombe, PhD.¹

¹*l'institut du thorax, INSERM U533, Faculté de Médecine, Nantes, France*

²*Montreal Heart Institute and University of Montreal, Montreal, Canada*

³*Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, University of Szeged, Szeged, Hungary*

Abstract

The various cardiac regions are characterized by specific action potential properties appropriate to their electrical specialization and presumably resulting from a specific pattern of ion-channel expression. The present study addressed regionally-defined differential ion-channel expression in the human heart with a genomic approach. High-throughput real-time RT-PCR was used to quantify the expression patterns of 89 ion-channel and related genes in atria, ventricle, epicardium, endocardium and Purkinje fibers (PFs) isolated from 15 human donor hearts. Two-way non-directed hierarchical clustering separated atria, PF and ventricular compartments, but did not show specific patterns for epicardium versus endocardium, nor left versus right-sided cavities. Genes that characterized the atria included Cx40, Kv1.5 and Kir3.1 as expected, but also Cav1.3, Cav3.1, Cav α 2 δ 2, Nav β 1, TWIK1, TASK1 and HCN4. Only Kir2.1, RYR2, PLB and Kv1.4 showed higher expression in the ventricles. The PF expression-portrait (versus ventricle) included stronger expression of Cx40, Kv4.3, Kir3.1, TWIK1, HCN4, CIC6 and CALM1. Transcripts that were more strongly expressed in epicardium (*versus* endocardium) included Cav1.2, KChIP2, SERCA2, CALM3 and calcineurin- α . Nav1.5 and Nav β 1 were more strongly expressed in the endocardium. For selected genes, RT-PCR data were confirmed at the protein level. *Conclusions*- This is the first report of the global portrait of regional ion-channel expression in the non-diseased human heart. Our data point to significant regionally-determined ion-channel expression differences, with important potential implications for understanding regional electrophysiology, arrhythmia mechanisms, and responses to ion-channel blocking drugs.

Key words: ion channels, molecular biology, heart, electrical heterogeneity.

Introduction

Cardiac function depends on the appropriate timing of contraction of each region, as well as on an appropriate beating rate. The various cardiac regions are characterized by specific action potential (AP) shapes, resulting from regionally-defined complements of ionic currents.¹ In addition to its role in normal cardiac electrical functioning, electrical heterogeneity contributes to a variety of cardiac arrhythmogenic mechanisms.^{1,2} For example, it is known that the density of the inward-rectifier K^+ -current I_{K1} is larger in ventricles than atria, whereas the density of the acetylcholine-activated K^+ -current I_{KAch} is larger in atria.¹ Accordingly, transcripts for the inwardly-rectifying K^+ -channel subunit Kir2.1 (mediating I_{K1}) are predominantly expressed in the ventricle,³ whereas transcripts for Kir3.1 (encoding I_{KAch} channels) are predominantly expressed in the atria.⁴ A higher density of the transient outward current, I_{to} , is characteristic of epicardium *versus* endocardium, in parallel with stronger expression of KChIP2 transcripts in the epicardium.⁵

To date, however, studies of ion-transporter subunit distribution within specific regions of the human heart have been limited to a small number of candidate subunits believed to be of importance. An additional important limitation to these studies related to limited access to healthy human cardiac tissue samples. Recent progress in genomics, particularly for mouse and man, has led to the identification of a complete repertoire of ion-channel genes. In parallel, recently-developed high-throughput molecular biology techniques now permit simultaneous measurement of the expression of hundreds of genes, thereby providing a global portrait of ion-channel expression. In the present study, we used a high-throughput quantitative approach to assess regionally-specific expression of genes encoding ion-channel and transporter subunits in the healthy heart.

Methods

Human tissue samples

The non-diseased human hearts were obtained from general organ donors whose hearts were also used for pulmonary and aortic valves transplant surgery. Before cardiac explantation, organ donor patients did not receive medication except dobutamine, furosemide and plasma expanders. The investigations conform to the principles outlined in the Helsinki Declaration of the World Medical Association. All experimental protocols were approved by the Ethical Review Board of the Medical Center of the University of Szeged (No. 51-57/1997 OEJ). Human cardiac tissue was dissected from 15 donors (44 ± 12 years; mean $\pm$ SD; min 18; max 65) and stored in cardioplegic solution at 4°C for 4~8 h before frozen in liquid nitrogen. Left and right ventricular (LV and RV) wall samples were obtained from the base. Left and right atrial (LA and RA) samples were dissected from the tip of the appendage. Left and right epicardial (Lepi and Repi) and endocardial (Lendo and Rendo) tissues were obtained by cutting 1 mm thick slices from the epicardial and endocardial surfaces, respectively.⁶ Purkinje fiber (PF) mRNA was extracted from false tendons dissected from the ventricles.

Comparisons of gene expression between cardiac compartments were conducted in samples from the same patient (except for PFs). Seven matching samples were available for LA *versus* LV comparison, 5 for RA *versus* RV, 7 for Lepi *versus* Lendo, 8 for Repi *versus* Rendo, 5 for LA *versus* RA, 5 for LV *versus* RV, 6 for Lepi *versus* Repi and 6 for Lendo *versus* Rendo. Purkinje fibers were obtained from 8 donors.

The sampled hearts were macroscopically and microscopically normal. Lack of hypertrophy was further confirmed by measuring the expression of atrial natriuretic factor (ANF) transcript (not shown).

A. RNA preparation

Total RNA from each cardiac sample was isolated and DNase-treated with the RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen) following manufacturer's instructions. The quality of total RNA was assessed with polyacrylamide-gel micro-electrophoresis (Agilent 2100 Bioanalyzer)

and by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Lack of genomic DNA-contamination was verified by PCR.

B. TaqMan real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction

TaqMan low-density arrays (MicroFluidic Cards, Applied Biosystems) were used in a two-step RT-PCR process, as previously reported.⁷ Briefly, first-strand cDNA was synthesized from 2 µg of total RNA using the High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). PCR reactions were then performed on MicroFluidic Cards with the ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). The 384 wells of each card were pre-loaded with 96 x 4 pre-designed fluorogenic TaqMan probes and primers. Probes were labelled with the fluorescent reporter 6-carboxyfluorescein (FAM®, Applera corp.) at the 5'-end and with non-fluorescent quencher on the 3'-end. The genes selected for their cardiac expression (listed at <http://www.nantes.inserm.fr/u533/INDEX/>) encode 72 α - and β -ion channel subunits, 17 Na⁺/K⁺-ATPase isoforms and proteins involved in calcium homeostasis, 3 hypertrophy markers (ANF, BNP, β -MHC) and 4 reference genes for normalization. Data were collected with instrument spectral compensation with Applied Biosystems SDS 2.1 software and analyzed with the threshold cycle (C_T) relative-quantification method.⁸ The hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (*HPRT*) reference gene was used for data normalization (ΔC_T indicates normalized data). Ten genes with $C_T > 32$ were eliminated for lack of reproducibility (Cav γ 4, Cav γ 5, Cav γ 6, CFTR, Kv1.1, Kv2.2, Kv3.1, Kv3.2, Kir1.1 and Nav1.4).

Data Analysis

Data were analyzed independently in 3 ways: (i) two-way hierarchical agglomerative clustering was applied to the gene-expression matrix consisting of grouped biopsies and the 79 genes with valid expression ($C_T < 32$) involved in electrical signaling. We applied average linkage clustering with uncentered correlation using the Cluster program.⁹ Clusters were visualized using the Treeview program; (ii) for each compartment, the relative expression of each gene *versus* HPRT ($2^{-\Delta C_T}$) was calculated and then averaged (data listed at <http://www.nantes.inserm.fr/u533/INDEX/>); (iii) for each gene and patient, the ratios between matching samples (atrium *versus* ventricle, epicardium *versus* endocardium, and left *versus* right compartments) were calculated and then averaged. For unmatched samples (PFs *versus* RV) the ratio for each gene *versus* the mean RV was calculated and then averaged. Pairwise comparisons between cardiac compartments were conducted on within-patient matched samples by paired *t*-test ($p < 0.05$ considered significant, $n = 5-8$). Unpaired *t*-tests were used for unmatched samples.

Western Blot

Membrane proteins were extracted from 4 additional donor tissue samples, as previously described.⁶ Proteins were fractionated on either 7.5% (Kv1.5, Kv4.3 and Cav1.3) or 10% (Cx40, KChIP2, and TWIK1) SDS-polyacrylamide gels and transferred electrophoretically to Immobilon-P polyvinylidene fluoride membranes (Millipore). Membranes were blocked and incubated with antibodies as previously described.⁶ Kv1.5 polyclonal antibody (1:500 dilution) was purchased from Upstate; Cx40 (1:1000), and Kv4.3 (1:500) polyclonal antibodies were purchased from Chemicon Laboratories; Cav1.3 polyclonal antibody (1:2000) was a kind gift from Dr. Hiroshi Hibino (Osaka; Japan); TWIK1 polyclonal antibody (1:3000) was a kind gift from Dr. Jacques Barhanin (Valbonne, France); and KChIP2 monoclonal antibody (1:1000) was a kind gift from Dr. James Trimmer (Davis, USA). Protein loading was controlled by probing with anti-GAPDH antibody (Research Diagnostics). After washing, membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit IgG secondary antibody (1:10000, Santa Cruz). Bound antibodies were detected with Western Lightening Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin-Elmer Life Sciences). For each antibody, time-exposure was similar for membranes containing atrial and ventricle samples and for membranes containing epicardial and endocardial samples.

Results

The relative expression levels of 72 α - and β -ion channel subunits and 17 Na⁺/K⁺-ATPase isoforms and proteins involved in calcium homeostasis were investigated by high-throughput real-time RT-PCR. A total of 96 transcripts (listed at <http://www.nantes.inserm.fr/u533/INDEX/>) were quantified by threshold-cycle quantification relative to HPRT.⁸ All fluorescent probes had 100% PCR efficiency. This standardized method permits comparison of expression levels among cardiac compartments and among genes. For 10/96 genes, expression was undetectable after 40 cycles of PCR amplification in any cardiac compartment. These were excluded from further analysis.

Hierarchical clustering of PF, atrial and ventricular tissues

Two-way hierarchical clustering analysis groups samples according to gene-expression differences, with the most similar expression patterns located closest to each other and the most different patterns furthest apart. For visual appreciation, the samples are linked to a tree. The size of tree branches indicates the distance between clusters: larger branch sizes indicate greater separation among clusters. Hierarchical clustering analysis was applied to 32 atrial, ventricular and PF samples (Figure 1). There was a first-order branch separation between atrial samples on one branch and ventricular and PF samples on the other, demonstrating full discrimination of atrial from ventricular compartments. In a second-order branch, PFs clustered separately from ventricular myocardium. There was no overlap between primary compartments, i.e. atrial, ventricular and PF samples clustered separately, indicating clearly different gene expression. The genes that were most relevant for clustering are listed in Figure 1. Group A contains genes that are more strongly expressed in PFs versus working atrial or ventricular myocardium. These include Kv4.3, Kv β 3, MIRP1, KChAP, TASK2, CIC6, CALM1 and InsP3R1. Group B contains genes that are more abundant in atria than ventricles, including, as expected, Cx40, Kv1.5 and Kir3.1,¹ but also Cav1.3, Cav3.1, Cav α 2 δ 2, Nav β 1, MIRP3, TWIK1 and TASK1. No gene clusters with stronger ventricular-myocardial expression *versus* atrium were observed: i.e., atrial samples were distinct by over- rather than under-expression of ion-channel genes. Group C contains genes with relatively weak expression in PFs, including KChIP2, SERCA2 and CASQ2. Within atrial and ventricular clusters, samples from the left- *versus* right-sided cavities did not separate.

The same approach was applied to epicardial and endocardial samples. As shown in Figure 2, epicardial and endocardial samples intermingled, with no distinct separation. Differences in ion-channel gene expression were thus not strong enough to discriminate the epi- from the endocardium. Since age and gender could affect cardiac electrophysiology by altering ion-channel gene expression, we performed hierarchical analysis with age and gender as covariates and saw no significant effects (data not shown).

Relative expression of ion-channel and transporter subunits

The method we used to quantify transcripts permits comparison of expression levels among genes (Figures 3-6, panels A and B). Among the Ca²⁺-channel genes, the L-type Ca²⁺-channel α -subunit Cav1.2 (α -1c) was the most strongly-expressed whereas the other L-type α -subunit (Cav1.3) showed much lower expression (Figure 3A). Expression of Ca²⁺-channel regulatory subunit transcripts

(Cav α 2 δ 1, Cav α 2 δ 2, Cav β 2) was also strong. The T-type Ca²⁺-channel subunit Cav3.1 (α -1G) was expressed predominantly in the atrium and Cav3.2 (α -1H) showed lower-level expression.

Among the voltage-gated sodium channel α -subunits, Nav1.5 (SCN5A) exhibited the highest expression (Figure 3B). Nav2.1 (SCN6A-SCN7A) transcripts were also abundant. Nav β 1 was by far the most abundant β -subunit. As expected, Cx43 was the predominant connexin subunit in the ventricle. Cx40 predominated in the atria, with significant expression in PFs. Cx45 transcripts were detectable, albeit at lower levels.

Within the Kv-channel α -subunit family, Kv1.5, Herg, Kv4.3 and KvLQT1 transcripts predominated (Figure 4A). Kv1.5 transcripts were ~45-fold more strongly expressed in atrial vs ventricular tissues. Among K⁺-channel β -subunits, KChIP2, MIRP3, SUR2, KChAP, MinK, and MIRP2 were the most abundant mRNA species (Figure 4B). KChIP2 exhibited the strongest regional expression gradient, with very low-level expression in PFs. SUR2 transcripts were much more abundant than SUR1.

Transcripts underlying the inwardly-rectifying potassium current I_{K1} (Kir2.1, Kir2.2 and Kir2.3) were expressed in every cardiac region, whereas Kir3.1 (responsible for the muscarinic-gated K⁺-channel I_{K-ACh}) predominated in the atria (Figure 5A). Both Kir6.2 and Kir6.1 subunits were detectable and most strongly expressed in ventricles. Among the tandem 2-pore domain K⁺-channels, TWIK1 was strongly expressed, particularly in atria, and TASK1 also showed atrial-selective expression.

Concerning Cl⁻-channel transcripts (Figure 5B), our data showed a rank order of expression CIC7>CIC6>CIC3>>CIC2. HCN4, HCN2 and HCN1 transcripts corresponding to the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated current (I_f), were detected in all tissues, with predominant atrial expression. As previously observed in the mouse,⁷ exchangers and intracellular Ca²⁺ handling proteins expressed at ~10-times higher levels than ion-channel subunits (Figure 6A and B). The expression of SERCA2, RYR2 and PLB predominated over the other Ca²⁺-regulators.

The specific molecular portrait of the atria

Detailed comparisons between LA and LV, as well as between RA and RV, gene-expression are depicted in panel C of Figures 3-6. Only genes with significant differential expression between sets of matched atrial and ventricular samples from the same donors are shown. To permit analysis of atrial-ventricular gene expression differences in the context of their relative expression within their gene subfamily, comparison graphs (panels C) are shown in the same figures as corresponding expression graphs (panels A, B).

Among the 46 ion-channel genes with significantly different expression between atria and ventricles, 37 were more strongly expressed in atria. All of the genes that were differential by hierarchical clustering (Cav1.3, Cav3.1, Cav α 2 δ 2, Cx40, Nav β 1, Kv1.3, Kv1.5, Kv1.6, MIRP3, Kir3.1, TWIK1, TASK1, HCN1 and HCN4) were significantly more strongly expressed in atria. Other subunits that were more strongly expressed in both atria than ventricles included Kv4.3 and Kir3.4. Kv4.2, SUR1, MIRP1 and MIRP4 were also more strongly expressed in atria than ventricles, but their absolute expression level was very low in all regions. Only three genes (Kir2.1, PLB and RYR2) exhibiting relatively high overall

expression were more weakly expressed in atria than ventricles, and only one with overall low-level expression (Kv1.4).

For some genes, significant atrial-ventricular expression differences were seen only for one atrium. Comparison between corresponding right vs left-sided chambers revealed a variety of statistically-significant differences. The LA was characterized by stronger expression of Nav1.5 (+27±5%, in comparison with the right atrium), Nav1.7 (+110±34%), Navβ3 (+77±25%), Kv4.2 (+141±60%), CALM1 (+37±13%) and InsP3R1 (+30±10%), whereas the RA was characterized by stronger expression of Cavα2δ2 (+338±85%, in comparison with the LA), Kv4.3 (+49±13%), Herg (+25±3%), MIRP3 (+54±17%), HCN2 (+135±35%), and HCN4 (+263±124%). The differential molecular portrait of RV versus LV involved 6 genes only. The LV showed stronger expression of Kir2.3 (+136±37%), HCN2 (+529±87%) and CASQ1 (+318±97%). Conversely, Navβ1 (+28±10%), KvLQT1 (+85±28%) and CIC2 (+58±21%) were more strongly expressed in RV samples.

The specific molecular portrait of PFs

Panels D in Figures 3-6 show significant differences between PFs and RV. Among the 38 differentially-expressed genes between RV and PFs, 23 (60%) were more strongly expressed in PFs. Interestingly, 17 ion-channel genes were similarly differentially expressed in PFs and atrium *versus* ventricle, indicating similarities between PF and atrium portraits. These particularly include Cav1.3, Cav3.1, Cavα2δ2, Cx40, Kv4.3, Kir3.1, TWIK1, TASK1, HCN1 and HCN4 (expression stronger than in ventricle) and Cx43, Kir2.1 and Kir6.1 (weaker expression). Differences specific to PFs were much weaker expression of KChIP2 (-96% vs ventricle), weaker expression of Kir2.2, Kir6.2 and stronger expression of Nav1.7 and HCN3. Differences in Ca²⁺-regulation genes also characterized PFs *versus* ventricular myocardium, including stronger PF expression of CALM1, InsP3R1 and InsP3R3 and weaker expression of Na⁺/K⁺-ATPase α3, SERCA2, CASQ2, RYR2 and NCX1.

Epicardium *versus* endocardium

Fourty genes were identified as statistically differing between epi- and endocardium (Panels E in Figures 3-6). As expected, KChIP2 exhibited the strongest transmural gradient, with ~51-fold stronger expression in left epicardium *versus* left endocardium. For both Lepi and Repi, Cav1.2, SERCA2, CALM3 and calcineurin-α transcripts were concordantly more strongly expressed. Conversely, Nav1.5, Navβ1, and Kir3.1 were more strongly expressed in the endocardium. Some genes showed differential expression only in right side (Cav3.1, Kir2.2, Kv4.2, RYR2 more strongly expressed in epicardium; Kvβ2 and Kir2.1 in endocardium). Similarly, KvLQT1, Kir6.1, and NCX1 were more strongly expressed in left

epicardium vs endocardium; whereas Cav α 2 δ 1, Cx40, Nav2.1, Kv1.5, TASK1, TASK2, HCN2, Na⁺/K⁺-ATPase β 1, and InsP3R1 showed stronger expression in left endocardium.

Protein correlate

Western-blot experiments (Figure 7) were conducted for selected ion-channel subunits. In agreement with transcriptional data, Cav1.3, Kv1.5, Kv4.3, KChIP2, TWIK1 and Cx40 were more strongly expressed in atria versus ventricular compartments. Cx40 and Kv1.5 expressed at very low levels in both endocardium and epicardium, whereas KChIP2 was strongly expressed in epicardium.

Discussion

We have performed the first detailed analysis of regional ion-channel gene expression in the non-diseased human heart. An arbitrary molecular portrait of each cardiac compartment is summarized in Figure 8. Our study shows that human atria, ventricles and PFs show distinct patterns of ion-channel and transporter expression. The inter-tissue differences are much greater than differences between left- and right-sided chambers and between endocardium and epicardium, which do not show distinct clustering on hierarchical analysis. This latter finding is consistent with only a very few genes exhibiting transmural gradient in pangenomics microarray experiments¹⁰

The molecular portrait of human atria

Many ion-channel α - and β -subunits are more abundantly expressed in the atria than in the ventricles. Among the voltage-gated Na^+ channel β -subunits, Nav β 1 transcripts predominate in the atria as previously reported.¹¹ The properties of I_{Na} in human atrial cells¹² correlate with the presence of Nav β 1 as a modulator of I_{Na} inactivation kinetics. The atrium strongly expresses Nav1.5, as well as Nav2.1. Nav2.1, first isolated by Al George *et al.*,¹³ does not produce sizeable currents when expressed alone, raising questions about its functional role and the potential role of potential partner subunits.

Among the Ca^{2+} -channel family, Cav1.3, and Cav3.1 α -subunits and the auxiliary subunits Cav α 2 δ 2 are more abundant in atria than ventricles. The atria also express Cav1.2 and Cav α 2 δ 1 non-differentially relative to ventricles. Cav α 2 δ 1 increases membrane expression of Cav1.2 subunits¹⁴ and is thus a potentially important regulator of Cav1.2. Predominant atrial expression of Cav1.3 was previously reported in mouse, rabbit and human hearts.^{7,15,16} Together with Cav1.2, Cav1.3 is the molecular basis for the L-type Ca^{2+} current, which is globally reduced during chronic atrial fibrillation.¹⁷ The α -subunit Cav3.1, encoding T-type Ca^{2+} channels, also largely predominates in the atria. Correspondingly, T-type Ca^{2+} currents are recorded in human atrium but not ventricles.¹⁸ Cav3.1 channels are regulated by Cav α 2 δ 2, which markedly increases their density at the cell membrane.¹⁹ Kv1.5 transcripts are known to predominate in the atria relative to the ventricles.¹ The corresponding ultra-rapid delayed rectifier K^+ -current (I_{Kur}), carried by Kv1.5 subunits, is only detected in the atria.^{20,21} Kv4.3 is the predominant I_{to} α -subunit in the atrium. Correspondingly, Kv4.3 but not Kv4.2 antisense significantly reduces I_{to} density in cultured human atrial myocytes.²² Despite their lower expression, Kv1.6, Kv1.3 and Kv4.2 could contribute to the atrial-specific action potential waveform, a hypothesis that remains to be tested. Predominant atrial expression of the acetylcholine-activated K^+ -channel subunits Kir3.1 and Kir3.4 has been previously demonstrated.¹ In the mouse, targeted disruption of

Kir3.1 severely decreases atrial I_{KACH} , without affecting Kir3.4 expression.²³ Apart from Kv1.5, the two-pore-domain K^+ -channel subunit TWIK1 is the most abundant potassium channel α -subunit transcript in the human atria. TWIK1 is up-regulated in chronic AF,¹⁷ and further work to understand its functional role is warranted. TASK1 is another twin-pore domain K^+ -channel subunit predominating in the atrium. TASK1 generates a background current regulated by external pH.²⁴ Among the known HCN subunits producing the hyperpolarization-activated pacemaker current, HCN1, HCN2 and HCN4 were much more abundant in atria than ventricles and are likely the molecular correlate for the I_f recorded in human atrium.²⁵ Predominant atrial expression was previously found for HCN4 in humans and for HCN1 and HCN4 in the mouse.^{26,7}

The molecular portrait of human PFs

Purkinje fibers are specialized in conduction of the cardiac impulse and are known to be particularly important in arrhythmias associated with abnormal repolarization and early afterdepolarizations. The present study is the first of which we are aware to characterize ion-channel subunit expression in human PFs. The neuronal sodium channel subunit Nav1.7 is more abundant in the PFs than in ventricle, although its expression remains much lower than Nav1.5 or Nav2.1. Cav1.3 and Cav3.1 α -subunits, which are associated with pacemaking activity,⁷ are more abundant in PFs, whereas Cav1.2 expression is lower in PFs versus ventricular muscle, in accordance with previous findings in dogs.²⁷ Human PF I_{to} shows clear differences from ventricular,²⁸ suggesting a different molecular origin. We found Kv4.3-subunit expression to be abundant in PFs, whereas KChIP2 is sparse, consistent with the very slow recovery of human PF I_{to} from inactivation.²⁸ Conversely, KChAP is more strongly expressed in PFs than muscle and predominates over KChIP2. KChAP acts as a chaperone to enhance expression and current-density of a subset of Kv channels, including Kv4.3, although unlike KChIP2, KChAP does not alter channel gating.²⁹ Consistent with previous findings in dogs,³⁰ we found stronger expression of MIRP1 in PFs than in ventricles, although MIRP1 expresses globally at very low levels in the human heart.

Kir2.1 and Kir2.2 express at lower levels in PFs than ventricular muscle, whereas Kir3.1 exhibits stronger expression in PFs. Sparse Kir2.1 expression is consistent with lower I_{K1} current in PFs vs muscle.³¹ A K^+ -current associated with acetylcholine stimulation has been described in rabbit PFs.³² Stimulation of muscarinic receptors in canine PFs reduces action potential duration,³³ consistent with our observation of Kir3.1 expression. As in atrial cells, TWIK1, TASK1 and TASK2 express more strongly in PFs than ventricles. Consistent with their pacemaking properties, human PFs express more HCN1, HCN3 and HCN4 transcripts than ventricular myocardium. Conversely, PFs show weaker expression of genes

encoding excitation-contraction coupling-related proteins, such as SERCA2, CASQ2, RYR2 and NCX1.

The molecular portrait of the human ventricle

Few genes expressed more strongly in ventricles compared with atria. Stronger ventricular Kir2.1 expression correlates with the more negative ventricular-myocyte resting potential.¹ Mutations in Kir2.1 cause the Andersen's syndrome,³⁴ a pathology associated with ventricular arrhythmias, thus highlighting the role of this channel in the ventricle.

We found few differences between endocardium and epicardium. Among Na⁺-channel subunits, Nav1.5 (+40% in the left endocardium, and +120% in the right endocardium) and Navβ1 (+71% in the left endocardium and +23% in the right endocardium) showed stronger endocardial expression. In accordance with these molecular data, I_{Na} density is larger in canine endocardium vs epicardium.³⁵ The dominant expression of Cav1.2 in the epicardium is associated with preferential expression of RYR2, consistent with specific contractile properties of epicardium versus endocardium related to different stress-strain relations during the cardiac cycle. When paced with AP waveforms, human epicardial cells display faster onset and peak of contraction than endocardial cells.³⁶ In agreement with this notion and previous findings,³⁷ we observed that the sarcoplasmic-reticulum calcium-ATPase 2 (SERCA2) responsible for intracellular Ca²⁺ uptake is predominantly expressed in the epicardium. Correspondingly, epicardial cells exhibit faster relaxation.³⁸ The transmural heterogeneity of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger that we observed has been reported in canine heart.³⁹ In agreement with previous findings,⁵ KChIP2 is far more strongly-expressed in epicardium, whereas Kv4.3 transcripts are homogeneously distributed. The fast transient outward current I_{tof} generated by these subunits is an important contributor to transmural electrophysiological heterogeneity.^{2,40} The α-subunit Kv1.4 associated with the slow component, I_{tos}, is more abundant in the endocardium. This molecular portrait correlates with functional studies showing larger I_{tof} current in human epicardial cells and larger I_{tos} in endocardial cells.⁴¹

Potential significance

This is the first large-scale quantitative study of ion-channel and transporter subunit expression in different cardiac tissues and regions, and the first detailed analysis of such expression in the non-diseased human heart. Furthermore, it represents the first analysis of ion-channel expression in human cardiac PFs. The results are potentially quite important for our understanding of the molecular basis of specialized electrical function in different regions of the human heart and therefore for our understanding of clinical electrophysiology, arrhythmogenesis and potential drug targets. They also highlight the importance of

evaluating the functional role of presently poorly-understood subunits like the 2-pore K⁺-channels TWIK1 and TASK1, Cav α 2 δ 2, Nav1.7, Nav2.1, Nav β 1, Kv1.3, Kv1.7, and MIRP3 in regional cardiac electrophysiology.

Study limitations

Transcripts do not necessarily translate into functional proteins and although transcriptional regulation of ion-channel expression is a key regulatory mechanism,⁴² translational and post-translational processes are also important variables. We confirmed corresponding changes for selected proteins of interest, but no technology is presently available to explore on a large scale the expression of a collection of membrane proteins such as those corresponding to the 79 genes we studied. Another limitation relates to the location of sampling.

Heterogeneous expression exists within the different parts of the atrium and the base and apex of the ventricle. However, it is encouraging to note that atrial-ventricular-PF differences were much greater than those between right and left-sided cavities or endocardium versus epicardium, suggesting that inter-tissue differences are likely to be robust across within-tissue regions. Finally, targeting of ion channel proteins to subcellular compartments is crucial for their function and cannot be approached by our global analysis. Despite these limitations, genomics represents a powerful means to improve our understanding of the complex mechanisms used by heart muscle to adapt to different functional requirements in diverse cardiac tissues and regions.

Conclusions:

This work has clarified the regional expression of a large number of ion-channel subunits in the non-diseased human heart. Our findings have significant potential

implications for understanding regional electrophysiology, arrhythmia mechanisms, and responses to ion-channel blocking drugs. In addition, they lay the groundwork for future investigations seeking to elucidate how ionic remodeling caused by heart disease alters the regional specificity of subunit-expression.

Acknowledgments

Supported by special grants from Ouest Genopole, Ministère Français de la Recherche (ACI), the Leducq Foundation, Canadian Institutes of Health Research and Bio-37 KPI. SD holds a tenure position from the French CNRS. The authors wish to thank Miklos Bitay, Jean-Marie Heslan and Marie-Jo Louerat for their excellent technical assistance.

References

1. Schram G, Pourrier M, Melnyk P, Nattel S. Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. *Circ Res.* 2002;90:939-950.
2. Antzelevitch C. Cellular basis and mechanism underlying normal and abnormal myocardial repolarization and arrhythmogenesis. *Ann Med.* 2004;36:5-14.
3. Dhamoon AS, Pandit SV, Sarmast F, Parisian KR, Guha P, Li Y, Bagwe S, Taffet SM, Anumonwo JM. Unique Kir2.x properties determine regional and species differences in the cardiac inward rectifier K⁺ current. *Circ Res.* 2004;94:1332-1339.
4. DePaoli AM, Bell GI, Stoffel M. G protein-activated inwardly rectifying potassium channel (GIRK1/KGA) mRNA in adult rat heart and brain by in situ hybridization histochemistry. *Mol Cell Neurosci.* 1994;5:515-522.
5. Rosati B, Pan Z, Lypen S, Wang HS, Cohen I, Dixon JE, McKinnon D. Regulation of KChIP2 potassium channel beta subunit gene expression underlies the gradient of transient outward current in canine and human ventricle. *J Physiol.* 2001;533:119-125.
6. Zicha S, Xiao L, Stafford S, Cha TJ, Han W, Varro A, Nattel S. Transmural expression of transient outward potassium current subunits in normal and failing canine and human hearts. *J Physiol.* 2004;561:735-748.
7. Marionneau C, Couette B, Liu J, Li H, Mangoni ME, Nargeot J, Lei M, Escande D, Demolombe S. Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart. *J Physiol.* 2005;562:223-234.
8. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods.* 2001;25:402-408.
9. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:14863-14868.
10. Rosati B, Grau F, Rodriguez S, Li H, Nerbonne JM, McKinnon D. Concordant expression of KChIP2 mRNA, protein and transient outward current throughout the canine ventricle. *J Physiol.* 2003;548:815-822.

11. Makita N, Bennett PB Jr, George AL Jr. Voltage-gated Na⁺ channel beta 1 subunit mRNA expressed in adult human skeletal muscle, heart, and brain is encoded by a single gene. *J Biol Chem*. 1994;269:7571-7578.
12. Sakakibara Y, Wasserstrom JA, Furukawa T, Jia H, Arentzen CE, Hartz RS, Singer DH. Characterization of the sodium current in single human atrial myocytes. *Circ Res*. 1992;71:535-546.
13. George AL , Knops JF, Han J, Finley WH, Knittle TJ, Tamkun MM, Brown GB. Assignment of a human voltage-dependent sodium channel alpha-subunit gene (SCN6A) to 2q21-q23. *Genomics*. 1994;19:395-397.
14. Yamaguchi H, Okuda M, Mikala G, Fukasawa K, Varadi G. Cloning of the beta(2a) subunit of the voltage-dependent calcium channel from human heart: cooperative effect of alpha(2)/delta and beta(2a) on the membrane expression of the alpha(1C) subunit. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;267:156-163.
15. Qu Y, Baroudi G, Yue Y, El-Sherif N, Boutjdir M. Localization and modulation of {alpha}1D (Cav1.3) L-type Ca channel by protein kinase A. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288:H2123-H2130.
16. Mangoni ME, Couette B, Bourinet E, Platzer J, Reimer D, Striessnig J, Nargeot J. Functional role of L-type Cav1.3 Ca²⁺ channels in cardiac pacemaker activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:5543-5548.
17. Gaborit N, Steenman M, Lamirault G, Le Meur N, Le Bouter S, Lande G, Leger J, Charpentier F, Christ T, Dobrev D, Escande D, Nattel S, Demolombe S. Human atrial ion channel and transporter subunit gene-expression remodeling associated with valvular heart disease and atrial fibrillation. *Circulation*. 2005;112:471-481.
18. Ouadid H, Seguin J, Richard S, Chaptal PA, Nargeot J. Properties and Modulation of Ca channels in adult human atrial cells. *J Mol Cell Cardiol*. 1991;23:41-54.
19. Gao B, Sekido Y, Maximov A, Saad M, Forgacs E, Latif F, Wei MH, Lerman M, Lee JH, Perez-Reyes E, Bezprozvanny I, Minna JD. Functional properties of a new voltage-

dependent calcium channel alpha(2)delta auxiliary subunit gene (CACNA2D2). *J Biol Chem*. 2000;275:12237-12242.

20. Li GR, Feng J, Yue L, Carrier M, Nattel S. Evidence for two components of delayed rectifier K⁺ current in human ventricular myocytes. *Circ Res*. 1996;78:689-696.

21. Feng J, Wible B, Li GR, Wang Z, Nattel S. Antisense oligodeoxynucleotides directed against Kv1.5 mRNA specifically inhibit ultrarapid delayed rectifier K⁺ current in cultured adult human atrial myocytes. *Circ Res*. 1997;80:572-579.

22. Wang Z, Feng J, Shi H, Pond A, Nerbonne JM, Nattel S. Potential molecular basis of different physiological properties of the transient outward K⁺ current in rabbit and human atrial myocytes. *Circ Res*. 1999;84:551-561.

23. Bettahi I, Marker CL, Roman MI, Wickman K. Contribution of the Kir3.1 subunit to the muscarinic-gated atrial potassium channel IK_{ACh}. *J Biol Chem*. 2002;277:48282-48288.

24. Duprat F, Lesage F, Fink M, Reyes R, Heurteaux C, Lazdunski M. TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO J*. 1997;16:5464-5471.

25. Thuringer D, Lauribe P, Escande D. A hyperpolarization-activated inward current in human myocardial cells. *J Mol Cell Cardiol*. 1992;24:451-455.

26. 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, Kimura A. Functional characterization of a trafficking-defective HCN4 mutation, D553N, associated with cardiac arrhythmia. *J Biol Chem*. 2004;279:27194-27198.

27. Han W, Bao W, Wang Z, Nattel S. Comparison of ion-channel subunit expression in canine cardiac Purkinje fibers and ventricular muscle. *Circ Res*. 2002;91:790-797.

28. Han W, Zhang L, Schram G, Nattel S. Properties of potassium currents in Purkinje cells of failing human hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283:H2495-H2503.

29. Kuryshv YA, Gudz TI, Brown AM, Wible BA. KChAP as a chaperone for specific K(+) channels. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000;278:C931-C941.

30. Pourrier M, Schram G, Nattel S. Properties, expression and potential roles of cardiac K⁺ channel accessory subunits: MinK, MiRPs, KChIP, and KChAP. *J Membr Biol.* 2003;194:141-152.
31. Verkerk AO, Veldkamp MW, Abbate F, Antoons G, Bouman LN, Ravesloot JH, van Ginneken AC. Two types of action potential configuration in single cardiac Purkinje cells of sheep. *Am J Physiol.* 1999;277:H1299-H1310.
32. Carmeliet E, Mubagwa K. Desensitization of the acetylcholine-induced increase of potassium conductance in rabbit cardiac Purkinje fibres. *J Physiol.* 1986;371:239-255.
33. Malfatto G, Zaza A, Vanoli E, Schwartz PJ. Muscarinic effects on action potential duration and its rate dependence in canine Purkinje fibers. *Pacing Clin Electrophysiol.* 1996;19:2023-2026.
34. Plaster NM, Tawil R, Tristani-Firouzi M, Canun S, Bendahhou S, Tsunoda A, Donaldson MR, Iannaccone ST, Brunt E, Barohn R, Clark J, Deymeer F, George AL Jr, Fish FA, Hahn A, Nitu A, Ozdemir C, Serdaroglu P, Subramony SH, Wolfe G, Fu YH, Ptacek LJ. Mutations in Kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen's syndrome. *Cell.* 2001;105:511-519.
35. Ueda N, Zipes DP, Wu J. Functional and transmural modulation of M cell behavior in canine ventricular wall. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;287:H2569-H2575.
36. Fulop L, Banyasz T, Magyar J, Szentandrassy N, Varro A, Nanasi PP. Reopening of L-type calcium channels in human ventricular myocytes during applied epicardial action potentials. *Acta Physiol Scand.* 2004;180:39-47.
37. Prestle J, Dieterich S, Preuss M, Bieligg U, Hasenfuss G. Heterogeneous transmural gene expression of calcium-handling proteins and natriuretic peptides in the failing human heart. *Cardiovasc Res.* 1999;43:323-331.
38. Cordeiro JM, Greene L, Heilmann C, Antzelevitch D, Antzelevitch C. Transmural heterogeneity of calcium activity and mechanical function in the canine left ventricle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286:H1471-H1479.

39. Xiong W, Tian Y, DiSilvestre D, Tomaselli GF. Transmural heterogeneity of Na⁺-Ca²⁺ exchange: evidence for differential expression in normal and failing hearts. *Circ Res*. 2005;97:207-209.
40. Nabauer M, Beuckelmann DJ, Überfuhr P, Steinbeck G. Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle. *Circulation*. 1996;93:168-177.
41. Kaab S, Nabauer M. Diversity of ion channel expression in health and disease. *Eur Heart J Supplements*. 2001;3:K31-K40.
42. Rosati B, McKinnon D. Regulation of ion channel expression. *Circ Res*. 2004;94:874-883.

Figure legends

Figure 1: **Two way hierarchical agglomerative clustering applied to 79 genes (vertically) and to 5 left and right atria (LA and RA), 7 left and right ventricles (LV and RV) and 8 Purkinje fibers (PF; horizontally).** The input consisted of the ratio for each patient and gene *versus* reference gene. Each gene is represented by a single row of colored boxes and each patient by a single column. The entire gene clustering is shown on the left. Three selected gene clusters are shown on the right (A, B, C) containing relevant genes for PFs and working myocardium discrimination (A, C), and for atrial-ventricular discrimination (B). Each color patch in the map represents the gene expression level in one sample from one patient, with expression levels ranging from dark green (lowest) to bright red (highest). Missing values are coded as silver.

Figure 2: **Two way hierarchical agglomerative clustering applied to 79 genes (vertically) and to 7 left epicardium (Lepi) and left endocardium (Lendo) and 8 right epicardium (Repi) and right endocardium (Rendo; horizontally).** Same format as in Figure 1.

Figure 3: **Expression profile of Ca^{2+} channels, connexins and Na^+ channels in the human heart.** **A, B.** Relative quantities (y-axis) of genes selected for their cardiac expression in three distinct compartments: RA, RV and PF. Genes are ranked according to their atrial expression. **C, D, E.** differentially expressed genes in atria *versus* ventricles (**C**); in PFs *versus* RV (**D**); and in epicardium *versus* endocardium (**E**). Data are expressed in percentage of variation. a, $p < 0.05$; b, $p < 0.01$; and c, $p < 0.001$

Figure 4: **Expression profile of K^+ channel α - and β -subunits in the human heart.** Same presentation and symbols as in Figure 3.

Figure 5: **Expression profile of Kir, HCN and Cl^- channels in the human heart.** Same presentation and symbols as in Figure 3.

Figure 6: **Expression profile of pumps, exchangers and Ca^{2+} handling proteins in the human heart.** Same presentation and symbols as in Figure 3.

Figure 7: **Western-blot analysis of key channel proteins.** Tissue membrane proteins probed with anti-Cav1.3, anti-Kv1.5, anti-Kv4.3, anti-KCHIP2, anti-TWIK1 and anti-Cx40 antibodies. Expected molecular masses are indicated.

Figure 8: **The remarkable molecular portrait of each cardiac compartment in the healthy human heart.** Transcripts that were differential in left and right-sided cavities and had a relative expression level ≥ 30 but ≤ 185 vs HPRT are shown in bold, or ≥ 185 vs HPRT are shown in red.

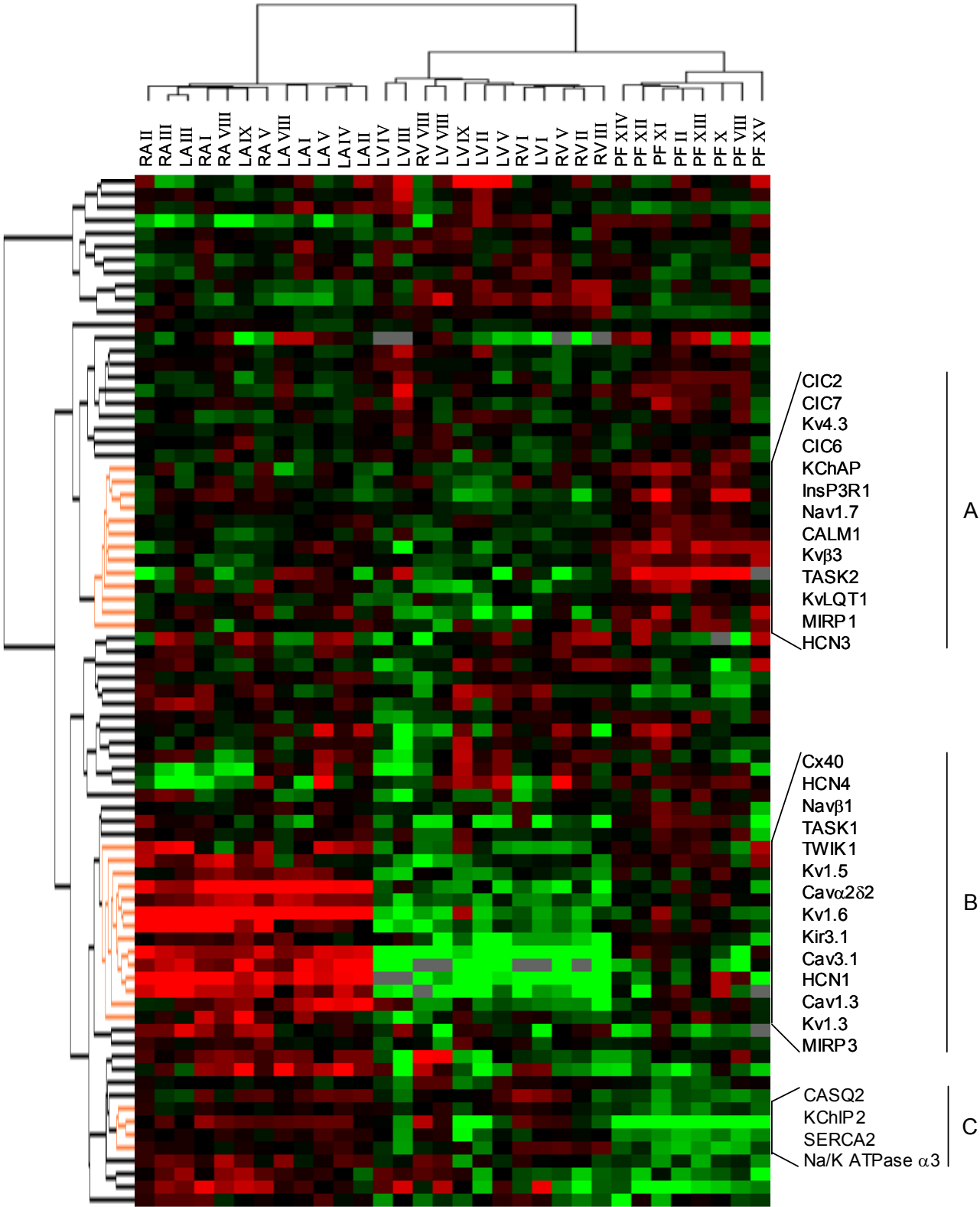


Figure 1

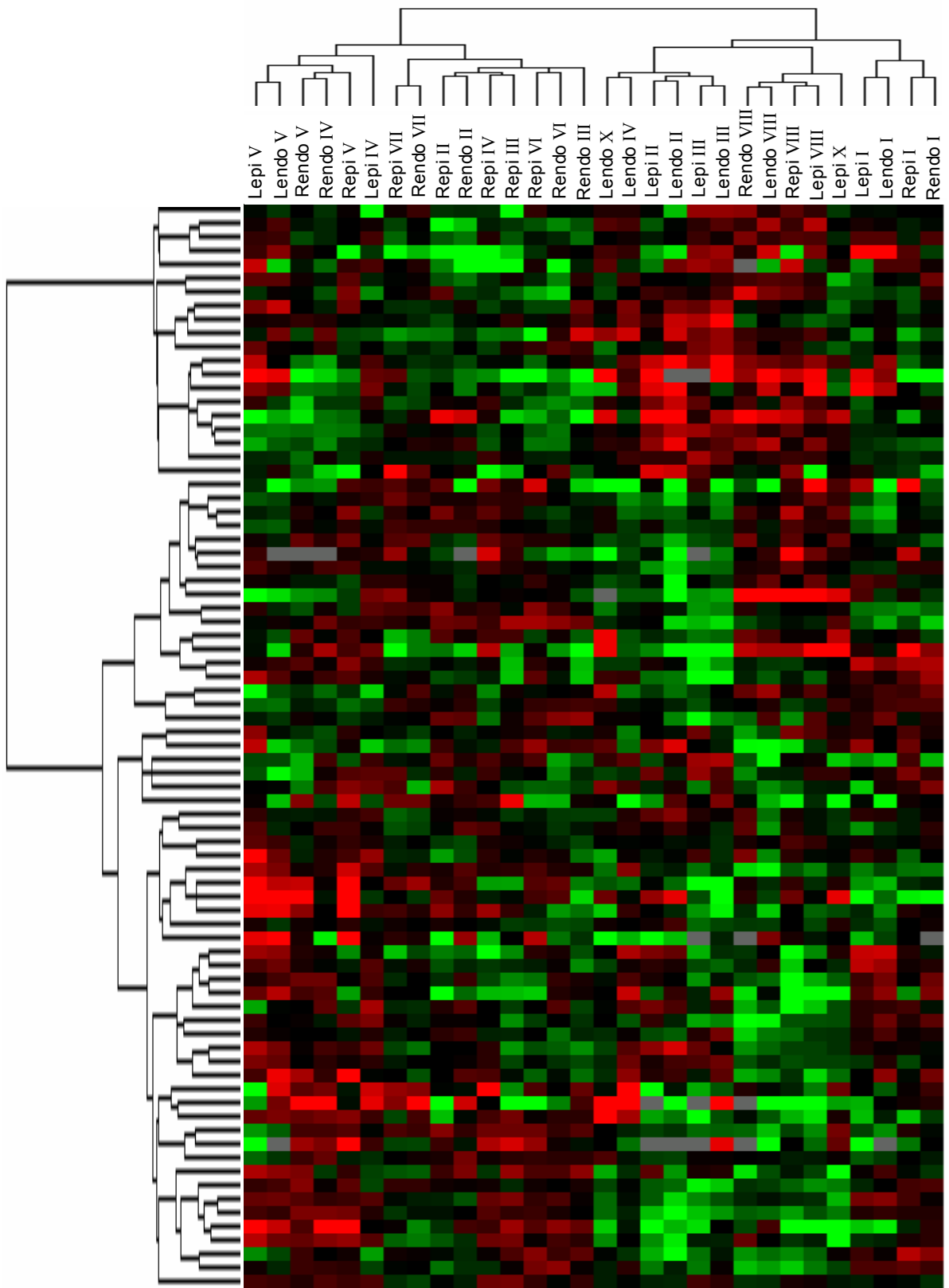


Figure 2

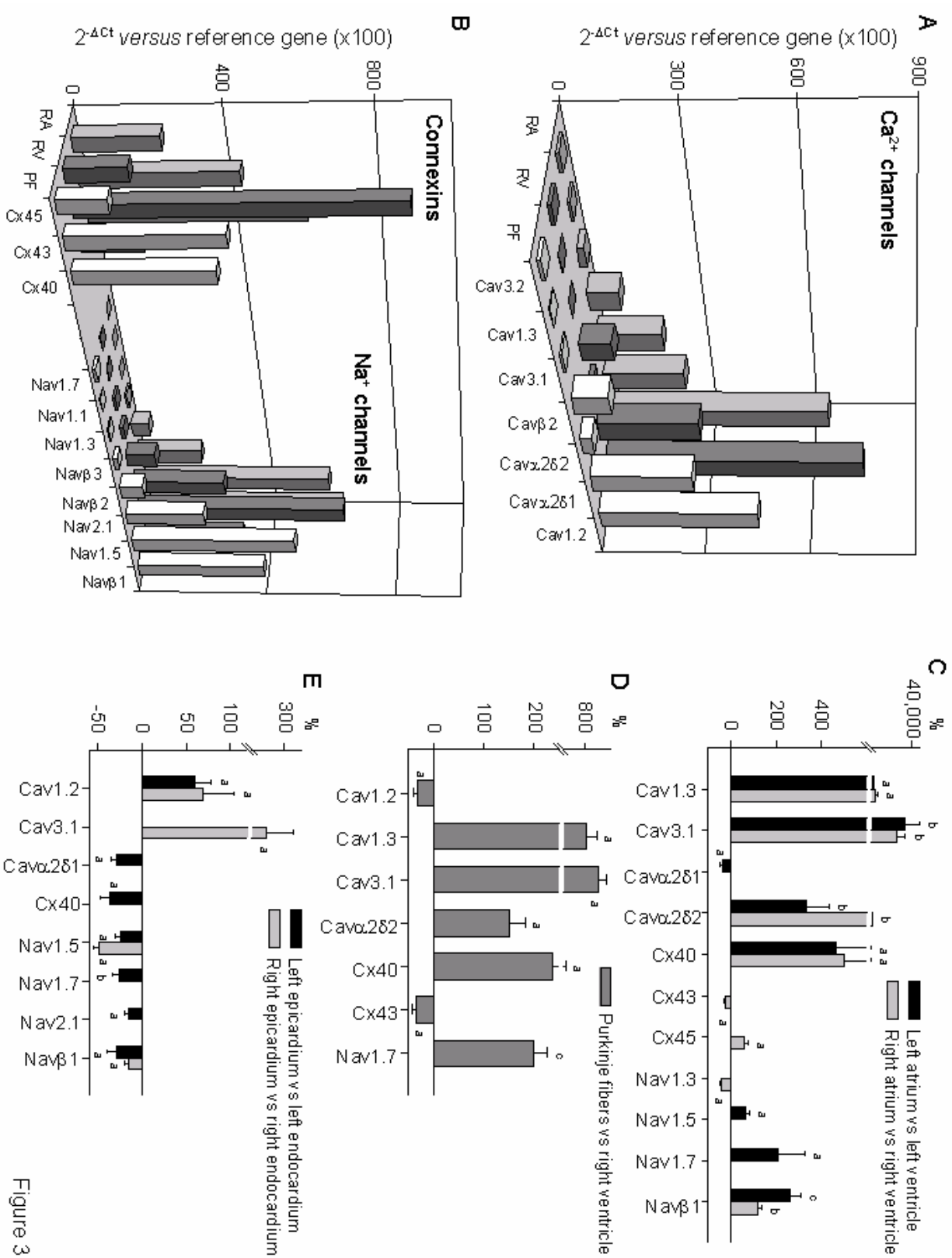


Figure 3

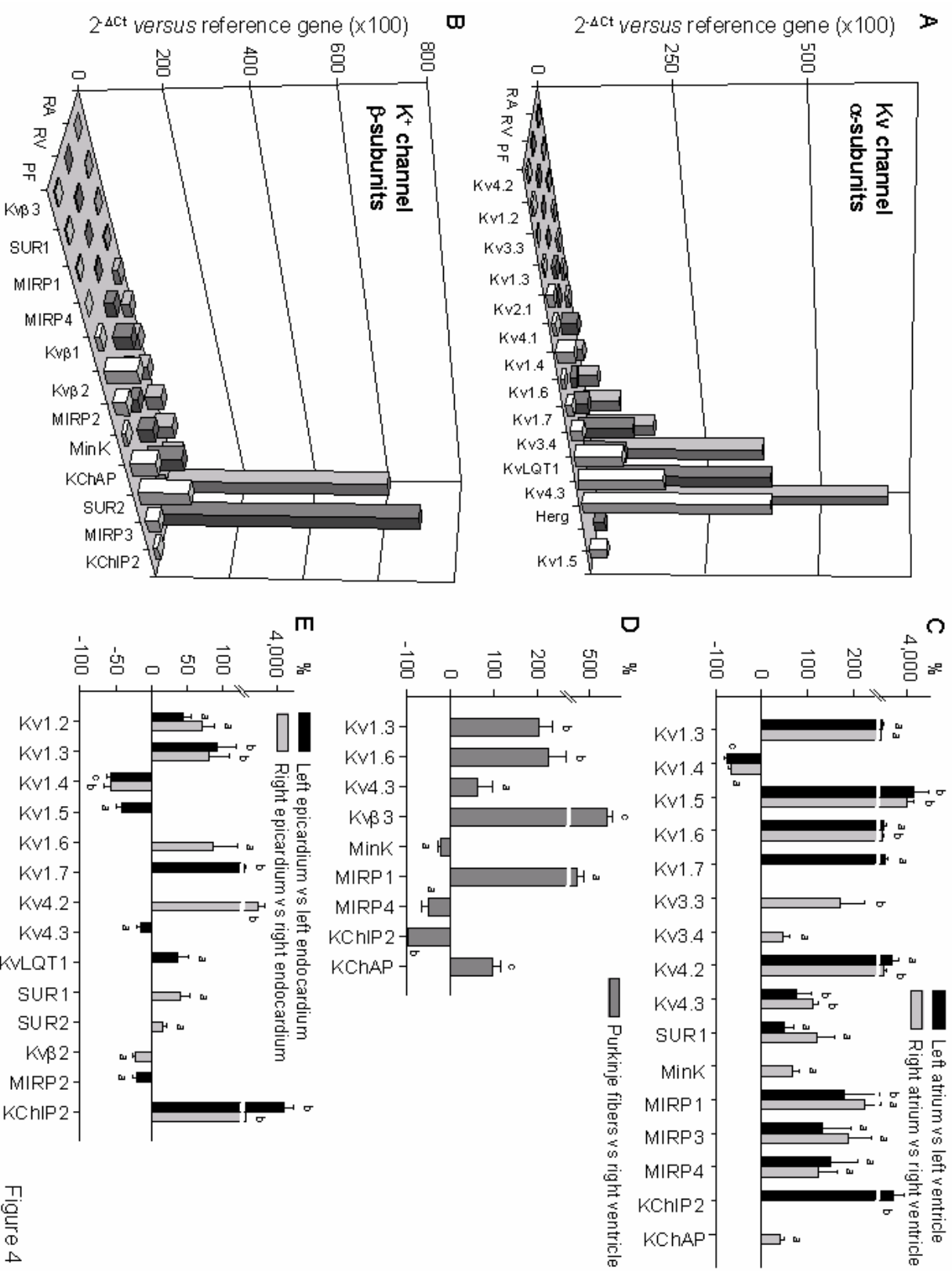


Figure 4

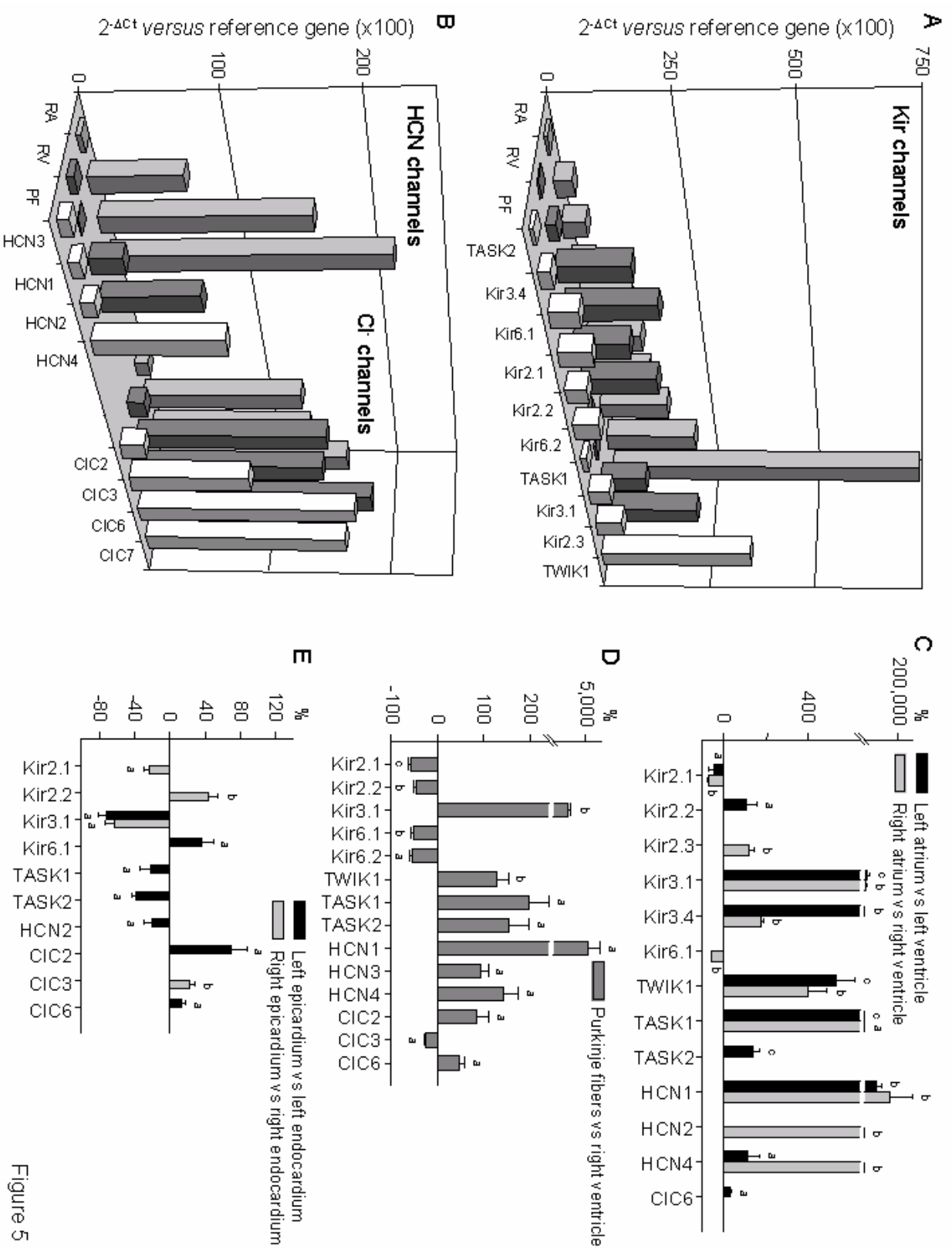


Figure 5

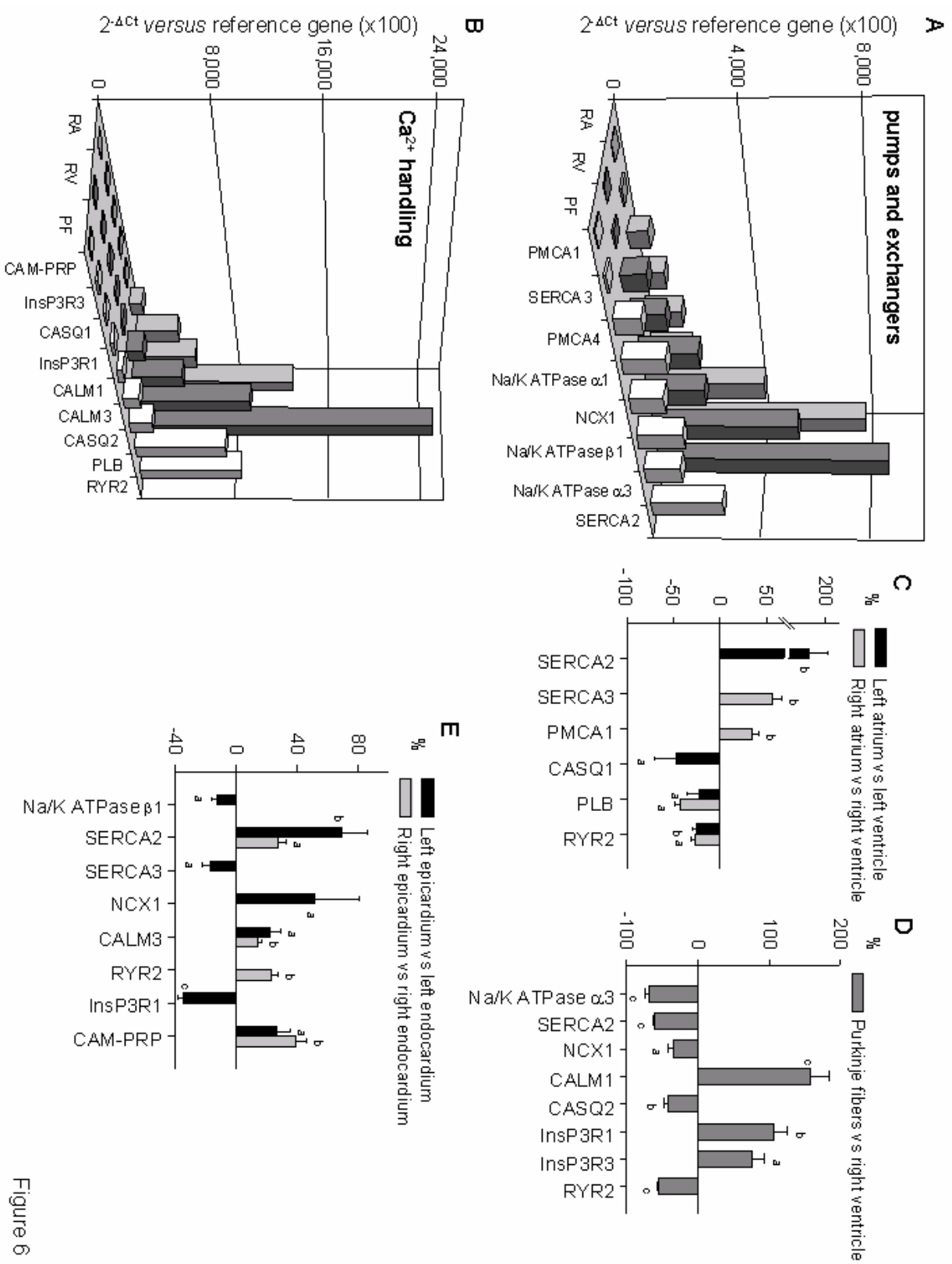


Figure 6

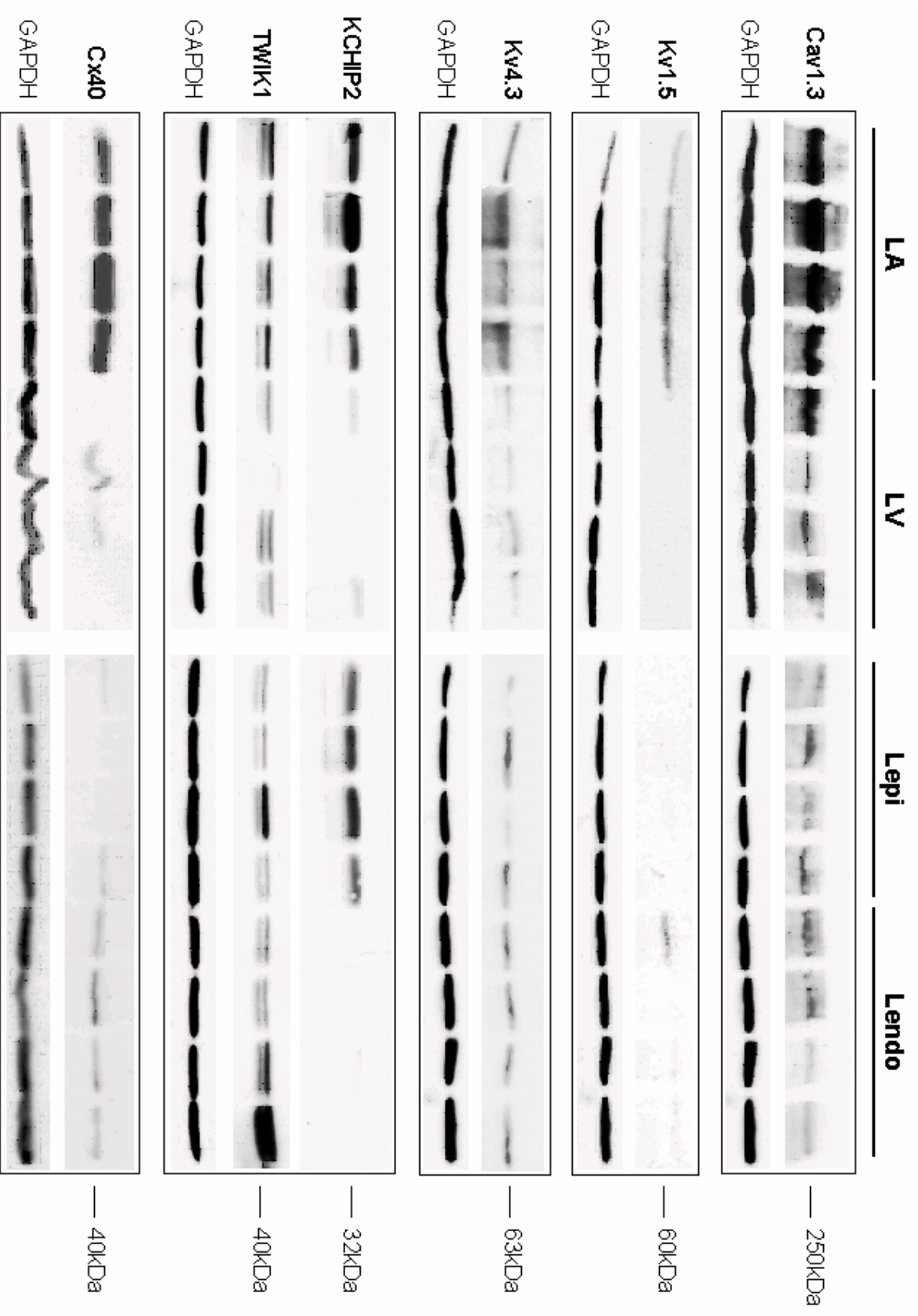


Figure 7

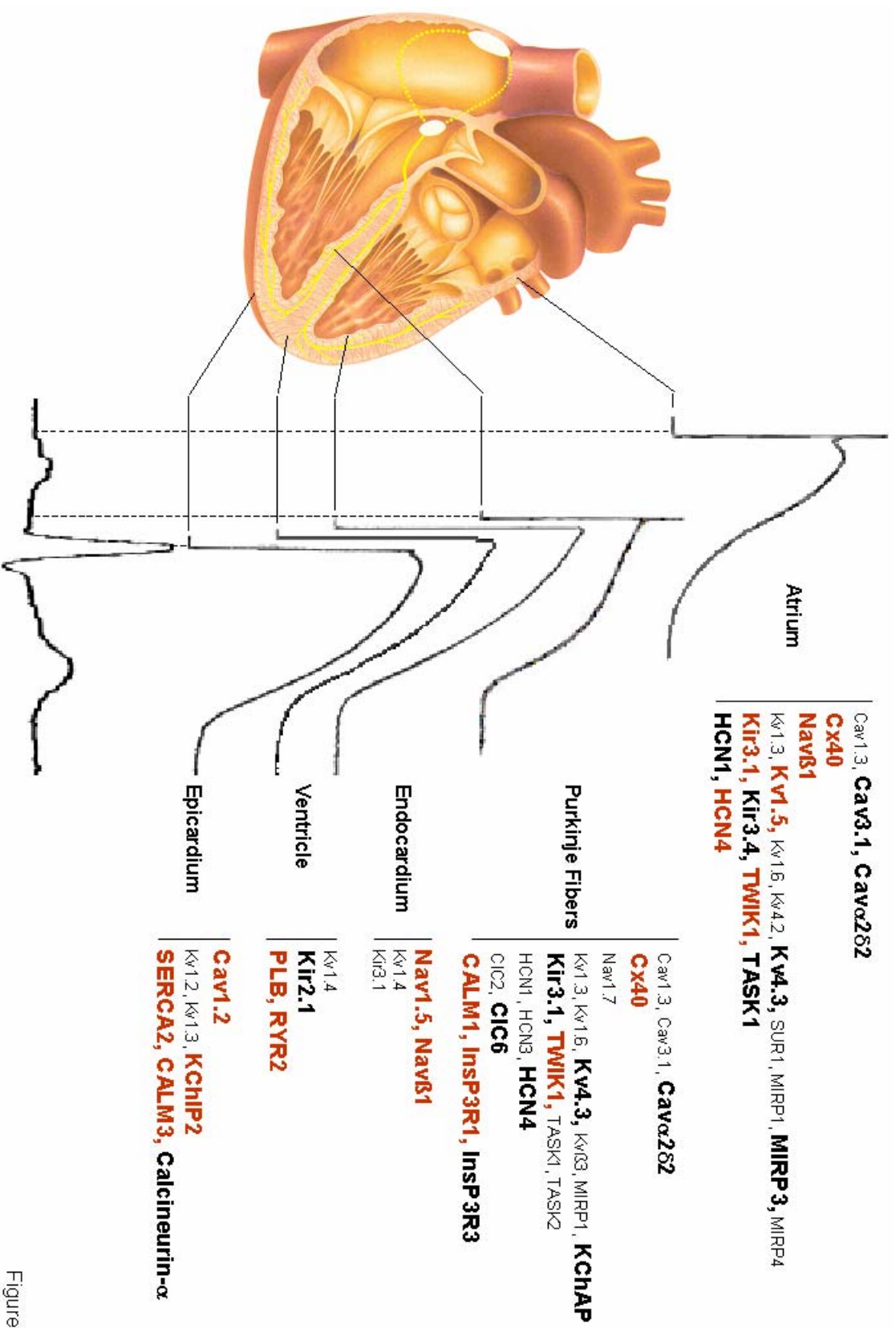


Figure 8

Gene Symbol	Gene Name		NCBI Gene Ref	Chromosome	Assay ID	Target Exons	Category
18S RNA	18S RNA	Eukaryotic 18s rRNA	X03205	9	4342379-18S	N/A	endogenous control
ABCC8	SUR1	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 8	NM_000352,U63421	11	Hs00165861_m1	16	K ⁺ channel
ABCC9	SUR2	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 9	NM_005691,NM_02	12	Hs00245832_m1	28	K ⁺ channel
ATP1A1	Na/K-ATPase α 1	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 1 polypeptide	NM_001001586,NM	1	Hs00167556_m1	15	Na ⁺ /K ⁺ ATPase
ATP1A3	Na/K-ATPase α 3	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 3 polypeptide	NM_152296,BC0092	19	Hs00265163_m1	N/A	Na ⁺ /K ⁺ ATPase
ATP1B1	Na/K-ATPase β 1	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 1 polypeptide	NM_001001787,NM	1	Hs00426868_g1	5	Na ⁺ /K ⁺ ATPase
ATP2A2	SERCA2	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2	NM_001681,M23115	12	Hs00155939_m1	20	Ca ⁺⁺ regulator
ATP2A3	SERCA3	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, ubiquitous	NM_174953,NM_17	17	Hs00193090_m1	17	Ca ⁺⁺ regulator
ATP2B1	PMCA1	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 1	NM_001001323,NM	12	Hs00155949_m1	11	Ca ⁺⁺ regulator
ATP2B4	PMCA4	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 4	NM_001001396,NM	1	Hs00608066_m1	1	Ca ⁺⁺ regulator
CACNA1C	Cav1.2	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit	NM_000719,L29529	12	Hs00167681_m1	2	Ca ⁺⁺ channel
CACNA1D	Cav1.3	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit	NM_000720,M83566	3	Hs00167753_m1	47	Ca ⁺⁺ channel
CACNA1G	Cav3.1	calcium channel, voltage-dependent, alpha 1G subunit	NM_018896,NM_19	17	Hs00367969_m1	4	Ca ⁺⁺ channel
CACNA1H	Cav3.2	calcium channel, voltage-dependent, alpha 1H subunit	NM_021098,AF0519	16	Hs00234934_m1	1	Ca ⁺⁺ channel
CACNA2D1	Cav α 2 δ 1	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 1	NM_000722,M76559	7	Hs00167808_m1	13	Ca ⁺⁺ channel
CACNA2D2	Cav α 2 δ 2	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 2	NM_006030,AB0111	3	Hs00195772_m1	6	Ca ⁺⁺ channel
CACNB2	Cav β 2	calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit	NM_201593,NM_20	10	Hs00167861_m1	9	Ca ⁺⁺ channel
CACNG4	Cav γ 4	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 4	NM_014405,AF1626	17	Hs00205244_m1	2	Ca ⁺⁺ channel
CACNG5	Cav γ 5	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 5	NM_145811,NM_14	17	Hs00274241_m1	1	Ca ⁺⁺ channel
CACNG6	Cav γ 6	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 6	NM_145814,NM_14	19	Hs00230428_m1	N/A	Ca ⁺⁺ channel
CALM1	CALM1	calmodulin 1 (phosphorylase kinase, delta)	NM_006888,BX5376	14	Hs00300085_s1	6	Ca ⁺⁺ regulator
CALM3	CALM3	calmodulin 3 (phosphorylase kinase, delta)	NM_005184,J04046	19	Hs00270914_m1	1	Ca ⁺⁺ regulator
CASQ1	CASQ1	calsequestrin 1 (fast-twitch, skeletal muscle)	NM_001231,S73775	1	Hs00154281_m1	6	Ca ⁺⁺ regulator
CASQ2	CASQ2	calsequestrin 2 (cardiac muscle)	NM_001232,D55655	1	Hs00415779_m1	N/A	Ca ⁺⁺ regulator
CFTR	CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, ATP-binding cassette	NM_000492,M28666	7	Hs00357011_m1	21	Cl ⁻ channel
CLCN2	CIC2	chloride channel 2	NM_004366,AF0260	3	Hs00189078_m1	1	Cl ⁻ channel
CLCN3	CIC3	chloride channel 3	NM_001829,X78520	4	Hs00156527_m1	12	Cl ⁻ channel
CLCN6	CIC6	chloride channel 6	NM_001286,NM_02	1	Hs00154518_m1	4	Cl ⁻ channel
CLCN7	CIC7	chloride channel 7	NM_001287,Z67743	16	Hs00241850_m1	1	Cl ⁻ channel
G6PD	G6PD	glucose-6-phosphate dehydrogenase	NM_000402,M21248	X	Hs00166169_m1	2	endogenous control
GJA1	Cx43	gap junction protein, alpha 1, 43kDa (connexin 43)	NM_000165,M65188	6	Hs00748445_s1	10	Connexin
GJA5	Cx40	gap junction protein, alpha 5, 40kDa (connexin 40)	NM_181703,NM_00	1	Hs00270952_s1	1	Connexin
GJA7	Cx45	gap junction protein, alpha 7, 45kDa (connexin 45)	NM_005497,AK1243	17	Hs00271416_s1	8	Connexin
HCN1	HCN1	hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 1	NM_021072,AF0648	5	Hs00395037_m1	1	Cation channel
HCN2	HCN2	hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 2	NM_001194,AJ0125	19	Hs00606903_m1	2	Cation channel
HCN3	HCN3	hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 3	NM_020897,AB0409	1	Hs00380018_m1	3	Cation channel
HCN4	HCN4	hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 4	NM_005477,AJ1324	15	Hs00175760_m1	1	Cation channel
HPRT1	HPRT	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (Lesch-Nyhan syndrome)	NM_000194,M31642	X	Hs99999909_m1	N/A	endogenous control
ISYNA1	ISYNA1	myo-inositol 1-phosphate synthase A1	NM_016368,AF2205	19	Hs00375021_g1	5	endogenous control

ITPR1	IP3R1	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 1	NM_002222,D26070	3	Hs00181881_m1	3	Ca ⁺⁺ regulator
ITPR3	IP3R3	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 3	NM_002224,D26351	6	Hs00609908_m1	1	Ca ⁺⁺ regulator
KCNA1	Kv1.1	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 1	NM_000217,L02750	12	Hs00264798_s1	8	K ⁺ channel
KCNA2	Kv1.2	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 2	NM_004974,L02752	1	Hs00270656_s1	8	K ⁺ channel
KCNA3	Kv1.3	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 3	NM_002232,M85217	1	Hs00704943_s1	22	K ⁺ channel
KCNA4	Kv1.4	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 4	NM_002233,M55514	11	Hs00357903_s1	1	K ⁺ channel
KCNA5	Kv1.5	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 5	NM_002234,M83254	12	Hs00266898_s1	7	K ⁺ channel
KCNA6	Kv1.6	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 6	NM_002235,X17622	12	Hs00266903_s1	4	K ⁺ channel
KCNA7	Kv1.7	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 7	NM_031886,AF3158	19	Hs00361015_m1	1	K ⁺ channel
KCNAB1	Kvβ1	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 1	NM_172159,NM_17	3	Hs00185764_m1	4	K ⁺ channel
KCNAB2	Kvβ2	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 2	NM_172130,NM_00	1	Hs00186308_m1	4	K ⁺ channel
KCNAB3	Kvβ3	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 3	NM_004732,AF0164	17	Hs00190986_m1	6	K ⁺ channel
KCNB1	Kv2.1	potassium voltage-gated channel, Shab-related subfamily, member 1	NM_004975,L02840	20	Hs00270657_m1	1	K ⁺ channel
KCNB2	Kv2.2	potassium voltage-gated channel, Shab-related subfamily, member 2	NM_004770,NM_00	8	Hs00191116_m1	1	K ⁺ channel
KCNC1	Kv3.1	potassium voltage-gated channel, Shaw-related subfamily, member 1	NM_004976,NM_00	11	Hs00428197_m1	1	K ⁺ channel
KCNC2	Kv3.2	potassium voltage-gated channel, Shaw-related subfamily, member 2	NM_139137,NM_13	12	Hs00373568_m1	3	K ⁺ channel
KCNC3	Kv3.3	potassium voltage-gated channel, Shaw-related subfamily, member 3	NM_004977,AF0559	19	Hs00192108_m1	7	K ⁺ channel
KCNC4	Kv3.4	potassium voltage-gated channel, Shaw-related subfamily, member 4	NM_153763,NM_00	1	Hs00428198_m1	1	K ⁺ channel
KCND1	Kv4.1	potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 1	NM_004979,AJ0058	X	Hs00192113_m1	5	K ⁺ channel
KCND2	Kv4.2	potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 2	NM_012281,AB0289	7	Hs00273378_m1	4	K ⁺ channel
KCND3	Kv4.3	potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 3	NM_004980,NM_00	1	Hs00270661_m1	5	K ⁺ channel
KCNE1	MinK	potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 1	NM_000219,L28168	21	Hs00264799_s1	1	K ⁺ channel
KCNE1L	MIRP4	KCNE1-like	NM_012282,AJ0127	X	Hs00273381_s1	2	K ⁺ channel
KCNE2	MIRP1	potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 2	NM_172201,AF0710	21	Hs00270822_s1	1	K ⁺ channel
KCNE3	MIRP2	potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 3	NM_005472,BC0322	11	Hs00538801_m1	1	K ⁺ channel
KCNE4	MIRP3	potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 4	NM_080671,BC0144	2	Hs00758199_g1	1	K ⁺ channel
KCNH2	Herg	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 2	NM_172056,NM_00	7	Hs00165120_m1	3	K ⁺ channel
KCNIP2	KChIP2	Kv channel interacting protein 2	NM_173191,NM_17	10	Hs00601709_g1	8	K ⁺ channel
KCNJ1	Kir1.1	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 1	NM_000220,NM_00	11	Hs00165012_m1	1	K ⁺ channel
KCNJ11	Kir6.2	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11	NM_000525,BC0644	11	Hs00265026_s1	6	K ⁺ channel
KCNJ12	Kir2.2	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 12	NM_021012,L36069	17	Hs00266926_s1	N/A	K ⁺ channel
KCNJ2	Kir2.1	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 2	NM_000891,U12507	17	Hs00265315_m1	1	K ⁺ channel
KCNJ3	Kir3.1	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 3	NM_002239,U50964	2	Hs00158421_m1	1	K ⁺ channel
KCNJ4	Kir2.3	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 4	NM_152868,NM_00	22	Hs00705379_s1	18	K ⁺ channel
KCNJ5	Kir3.4	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 5	NM_000890,D50134	11	Hs00168476_m1	2	K ⁺ channel
KCNJ8	Kir6.1	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 8	NM_004982,D50312	12	Hs00270663_m1	1	K ⁺ channel
KCNK1	TWIK1	potassium channel, subfamily K, member 1	NM_002245,U33632	1	Hs00158428_m1	2	K ⁺ channel
KCNK3	TASK1	potassium channel, subfamily K, member 3	NM_002246,AF0068	2	Hs00605529_m1	1	K ⁺ channel
KCNK5	TASK2	potassium channel, subfamily K, member 5	NM_003740,AF0848	6	Hs00186652_m1	1	K ⁺ channel
KCNQ1	KvLQT1	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1	NM_181797,NM_18	11	Hs00165003_m1	15	K ⁺ channel
MYH7	β-MHC	myosin, heavy polypeptide 7, cardiac muscle, beta	NM_000257,M58018	14	Hs00165276_m1	26	Cytoskeletal protein

NPPA	ANP	natriuretic peptide precursor A	NM_006172,M30262	1	Hs00383230_g1	1	Signaling molecule
NPPB	BNP	natriuretic peptide precursor B	NM_002521,M25296	1	Hs00173590_m1	2	Signaling molecule
PIAS3	KChAP	protein inhibitor of activated STAT, 3	NM_006099,AB0218	1	Hs00180666_m1	7	K ⁺ channel
PLN	PLB	phospholamban	NM_002667,M63603	6	Hs00160179_m1	1	Ca ⁺⁺ regulator
PPP3CA	CAM-PRP	protein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic subunit, alpha isoform	NM_000944,L14778	4	Hs00174223_m1	10	Ca ⁺⁺ regulator
RYR2	RYR2	ryanodine receptor 2 (cardiac)	NM_001035,X98330	1	Hs00181461_m1	10	Ca ⁺⁺ regulator
SCN1A	Nav1.1	sodium channel, voltage-gated, type I, alpha	NM_006920,AF2259	2	Hs00374696_m1	17	Na ⁺ channel
SCN1B	Navβ1	sodium channel, voltage-gated, type I, beta	NM_001037,L10338	19	Hs00168897_m1	2	Na ⁺ channel
SCN2B	Navβ2	sodium channel, voltage-gated, type II, beta	NM_004588,AF0077	11	Hs00394952_m1	3	Na ⁺ channel
SCN3A	Nav1.3	sodium channel, voltage-gated, type III, alpha	NM_006922,AF0356	2	Hs00366902_m1	12	Na ⁺ channel
SCN3B	Navβ3	sodium channel, voltage-gated, type III, beta	NM_018400,AB0329	11	Hs00393218_m1	4	Na ⁺ channel
SCN4A	Nav1.4	sodium channel, voltage-gated, type IV, alpha	NM_000334,M81758	17	Hs00165686_m1	5	Na ⁺ channel
SCN5A	Nav1.5	sodium channel, voltage-gated, type V, alpha (long QT syndrome 3)	NM_198056,NM_00	3	Hs00165693_m1	11	Na ⁺ channel
SCN7A	Nav2.1	sodium channel, voltage-gated, type VII, alpha	NM_002976,M91556	2	Hs00161546_m1	10	Na ⁺ channel
SCN9A	Nav1.7	sodium channel, voltage-gated, type IX, alpha	NM_002977,X82835	2	Hs00161567_m1	11	Na ⁺ channel
SLC8A1	NCX1	solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 1	NM_021097,M91368	2	Hs00253432_m1	2	Ca ⁺⁺ regulator

Assay-on-demand

CD4	CD4 antigen	CD4 antigen (p55)	NM_000616,M12807	12	Hs00181217_m1	2	marker of inflammation
CNN1	Calponin 1	calponin 1, basic, smooth muscle	NM_001299,D17408	19	Hs00154543_m1	1	marker of vascular vessels
COL6A1	Procollagen 6, α1	collagen, type VI, alpha 1	NM_001848,M27447	21	Hs00242448_m1	20	marker of fibroblasts
IL6	Il6	interleukin 6 (interferon, beta 2)	NM_000600,X04403	7	Hs00174131_m1	3	marker of inflammation
UCHL1	UCHL1	ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (ubiquitin thiolesterase)	NM_004181,X04741	4	Hs00188233_m1	8	marker of neuronal tissue

mapping project

Patient	Sex	Age (years)	samples								
I	man	52	LA	LV	Lepi	Lendo	RA	RV	Repi	Rendo	PF
II	woman	49	LA	LV	Lepi	Lendo	RA	RV	Repi	Rendo	
III	woman	42	LA	LV	Lepi	Lendo	RA	RV	Repi	Rendo	
IV	man	40	LA	LV	Lepi	Lendo			Repi	Rendo	
V	man	36	LA	LV	Lepi	Lendo	RA	RV	Repi	Rendo	
VI	man	52							Repi	Rendo	
VII	woman	65							Repi	Rendo	
VIII	woman	46	LA	LV	Lepi	Lendo	RA	RV	Repi	Rendo	PF
IX	woman	39	LA	LV							
X	man	18			Lepi	Lendo					PF
XI	man	20									PF
XII	woman	49									PF
XIII	man	50									PF
XIV	woman	52									PF
XV	man	44									PF

gender project

N° papier	Sex	Age (years)	samples			
VII	woman	65	Lepi	Lendo		
XVI	woman	28	Lepi	Lendo		
XII	woman	49	Lepi	Lendo	Repi	Rendo
XIII	man	50	Lepi	Lendo		
XIV	woman	52	Lepi	Lendo		
XV	man	44	Lepi	Lendo	Repi	Rendo
XVII	man	38			Repi	Rendo
XVIII	man	38			Repi	Rendo
XIX	woman	37	Lepi	Lendo	Repi	Rendo
XX	woman	18	Lepi	Lendo	Repi	Rendo

2. Hétérogénéité de l'expression des canaux ioniques entre le myocarde sous-épicaudique et sous-endocardique chez l'Homme, et sa modulation en fonction du sexe (article 2, page 129)

a. Introduction

La paroi ventriculaire se caractérise par des potentiels d'action de différentes morphologies, résultants de l'association de différents courants ioniques. On sait notamment que le PA épicaudique est plus court que le PA endocardique. En conséquence, la vague de repolarisation se propage depuis l'épicaudique vers l'endocarde à l'inverse de l'onde de dépolarisation. Il a été suggéré que l'altération de cette hétérogénéité physiologique épicaudique / endocarde pourrait être à l'origine de la survenue des arythmies par réentrée. En particulier elle pourrait être un élément central du mécanisme du syndrome de Brugada.

Des différences dans l'électrophysiologie cardiaque entre les hommes et les femmes sont bien établies (James *et al.*, 2005). Les femmes ont une fréquence cardiaque plus rapide et un intervalle QTc plus long que les hommes. De plus, la durée entre le pic et la fin de l'onde T est plus longue chez les hommes, en accord avec une plus forte hétérogénéité transmurale de la repolarisation ventriculaire. Des différences en fonction du sexe dans l'incidence de certaines cardiopathies ont également été montrées. On sait que les médicaments qui prolongent la repolarisation cardiaque induisent plus fréquemment des troubles du rythme chez les femmes par rapport aux hommes. La prévalence des syncopes et des morts subites chez des patients atteints du syndrome du QT long, maladie génétique qui prolonge la repolarisation, est supérieure chez les femmes. A l'inverse, le syndrome du Brugada, qui se caractérise par des tachycardies ventriculaires polymorphes, est nettement plus bruyant chez les hommes que chez les femmes (8 :1 en Asie).

Les données obtenues dans les modèles animaux ont montré que les propriétés des courants calciques et potassiques varient en fonction du sexe. Nous avons voulu déterminer chez l'homme si les différences de propriétés électriques cardiaques en fonction du sexe prennent leur origine dans des différences d'expression moléculaire. En effet, les hormones stéroïdes en se fixant sur des récepteurs nucléaires, sont susceptibles de moduler la transcription (James *et al.*, 2005). L'expression de 89 canaux ioniques a été évaluée par RT-PCR quantitative à haut-débit grâce à l'utilisation de *Low Density Arrays*. Le myocarde sous-épicaudique et sous-endocardique, droites et gauches, de 14 donneurs sains des deux sexes (âge moyen = 49 ans) ont été analysés.

b. Résultats

La technique de regroupement hiérarchique n'a pas permis de séparer les tissus épicaudiques et endocardiques, ni les cavités droite et gauche. Les différences d'expression des canaux ioniques sont donc trop subtiles pour pouvoir discriminer ces différents compartiments à l'aide de cette technique. L'étude de l'effet du sexe des donneurs sur la classification hiérarchique montre que à nouveau il y a trop peu de différences d'expression

des canaux ioniques entre les hommes et les femmes pour pouvoir les regrouper dans chaque compartiment ventriculaire (Figures 1 et 2, article 2).

Pour une question de clarté, seules les comparaisons épicaire / endocarde (Figure 46) et homme / femme (Figure 47, page 126) des tissus ventriculaires droits seront illustrées ici. En effet, les compartiments ventriculaires gauches présentent des différences très similaires.

Comparaison épicaire / endocarde

Parmi les sous-unités de canaux ioniques impliqués dans la genèse des courants entrants, Nav1.5 (SCN5A) et Cava2δ1 sont plus exprimés dans l'endocarde par rapport à l'épicaire, à l'inverse du canal calcique Cav1.2. Parmi les canaux potassiques, des gradients significatifs ont été observés pour KChIP2, Kv4.2 et Kv1.4, responsables des courants transitoires sortants $I_{to,fast}$ et $I_{to,slow}$. KChIP2 et Kv4.2 sont majoritairement exprimés dans l'épicaire alors que Kv1.4 est plus exprimé dans l'endocarde (Figure 46).

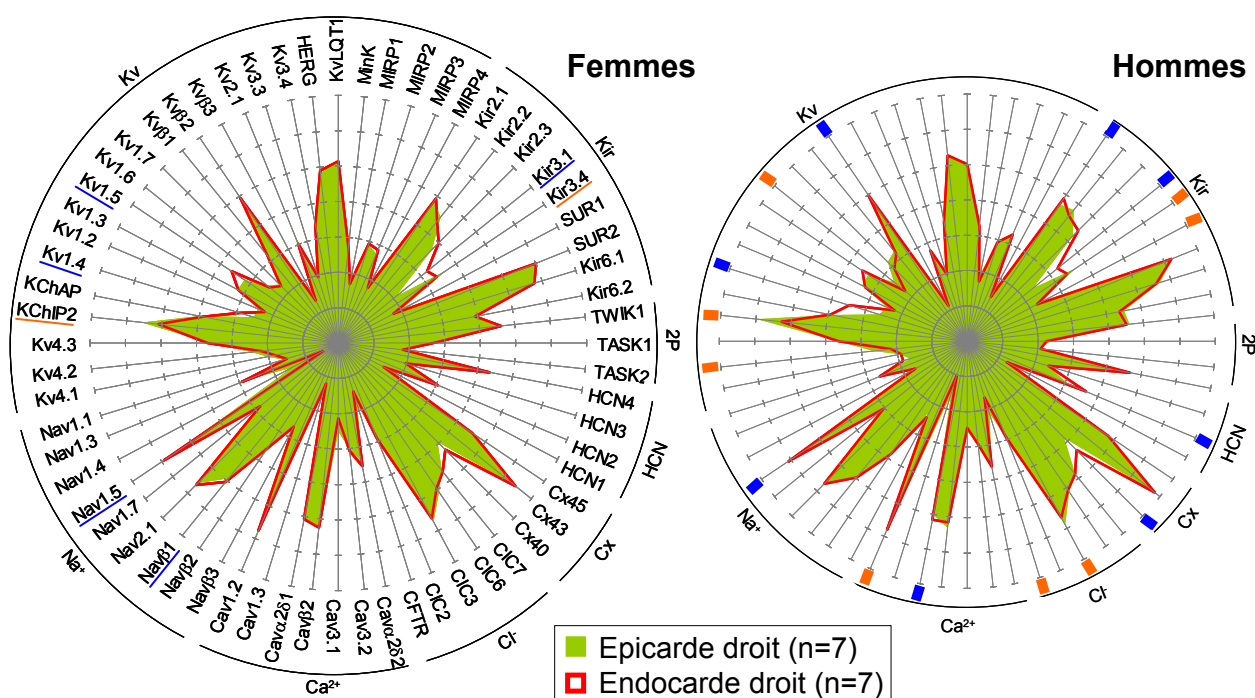


Figure 46 Profils d'expression des gènes codant les sous-unités des canaux ioniques dans l'épicaire droit (vert) et dans l'endocarde droit (rouge), chez les femmes (partie gauche du graphe) et chez les hommes (partie droite du graphe). Sur chaque axe, l'expression relative d'un gène est exprimée en $-\Delta Ct$, représentant le ratio d'expression du gène par rapport au gène de référence *HPRT*, et correspondant à la moyenne calculée à partir de 7 échantillons ventriculaires droits pour chaque sexe. Les gènes indiqués en orange sont statistiquement plus exprimés dans l'épicaire par rapport à l'endocarde. Les gènes indiqués en bleu sont statistiquement plus exprimés dans l'endocarde par rapport à l'épicaire.

Comparaison homme / femme

Aucun canal ionique responsable des courants entrants ne présente de différence d'expression en fonction du sexe. Parmi les connexines seule le transcrit de la Cx43 est

différemment représenté selon le sexe, avec un niveau plus élevé chez les hommes. En ce qui concerne les canaux potassiques, Kir6.2 et SUR2, responsables du courant $I_{K,ATP}$, Kir2.3 qui, avec Kir2.1 et Kir2.2, génère le courant cardiaque I_{K1} , et HERG, sont plus exprimés chez les hommes par rapport aux femmes dans les deux compartiments ventriculaires droits. D'autres sous-unités de canaux potassiques sont également majoritairement exprimés chez les hommes, mais uniquement dans l'endocarde droit, pour Kv1.4 et MinK, ou dans l'épicarde droit, pour KChIP2 (Figure 47).

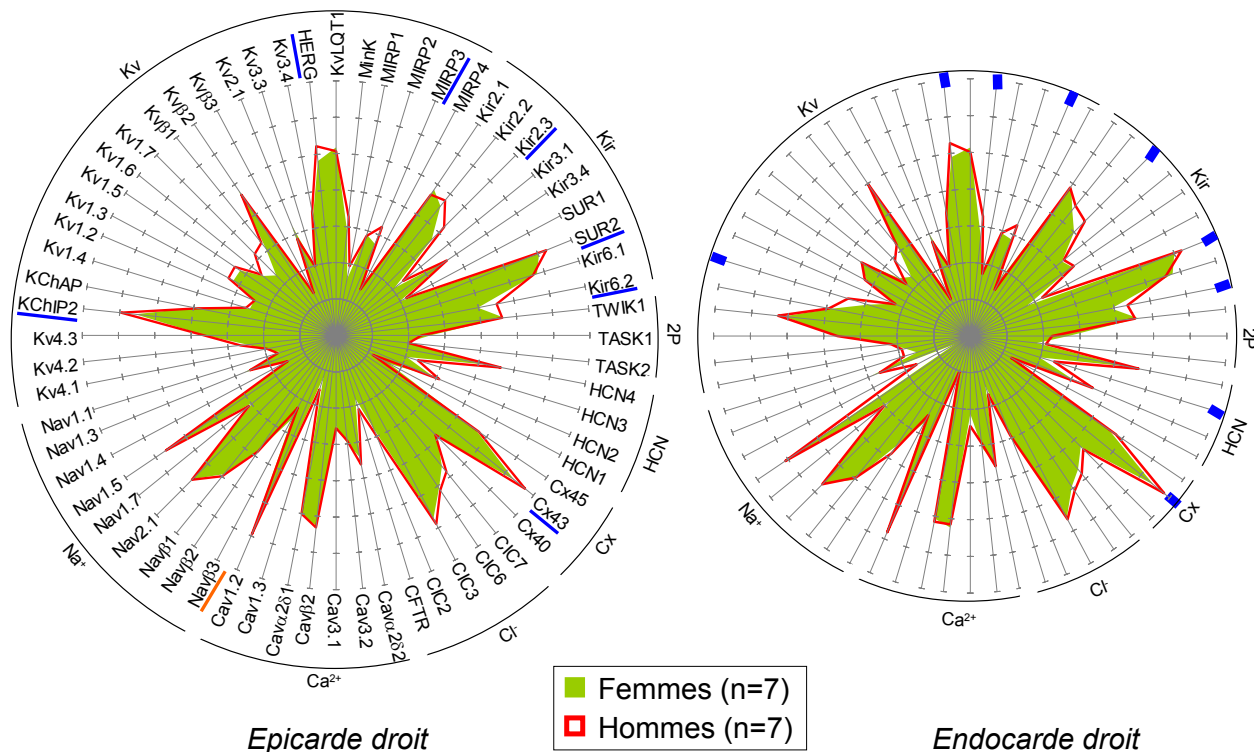


Figure 47 Profils d'expression des gènes codant les sous-unités des canaux ioniques chez les femmes (vert) et chez les hommes (rouge), dans l'épicarde droit (partie gauche du graphe) et dans l'endocarde droit (partie droite du graphe). Sur chaque axe, l'expression relative d'un gène est exprimée en $-\Delta Ct$, représentant le ratio d'expression du gène par rapport au gène de référence *HPRT*, et correspondant à la moyenne calculée à partir de 7 échantillons ventriculaire droits d'hommes et de femmes. Les gènes indiqués en orange sont statistiquement plus exprimés chez les femmes par rapport aux hommes. Les gènes indiqués en bleu sont statistiquement plus exprimés chez les hommes par rapport aux femmes.

Régulation transcriptionnelle des sous-unités responsables du courant $I_{to,fast}$

Une précédente étude (Costantini *et al.*, 2005) réalisée chez la souris, a montré que le facteur de transcription Iroquois, IRX5, régule négativement Kv4.2, sous-unité α responsable du courant $I_{to,fast}$ chez les rongeurs. Sur la base de ce résultat nous avons comparé le profil d'expression des sous-unités α et β qui génèrent ce courant potassique chez l'Homme à ceux de différents facteurs de transcription IRX (Figure 5, article 2). Nous avons observé que le profil obtenu pour KChIP2 est l'opposé de celui de IRX3 et de IRX5,

tant du point de vue des différences transmurales que de l'hétérogénéité homme/femme (Figure 48).

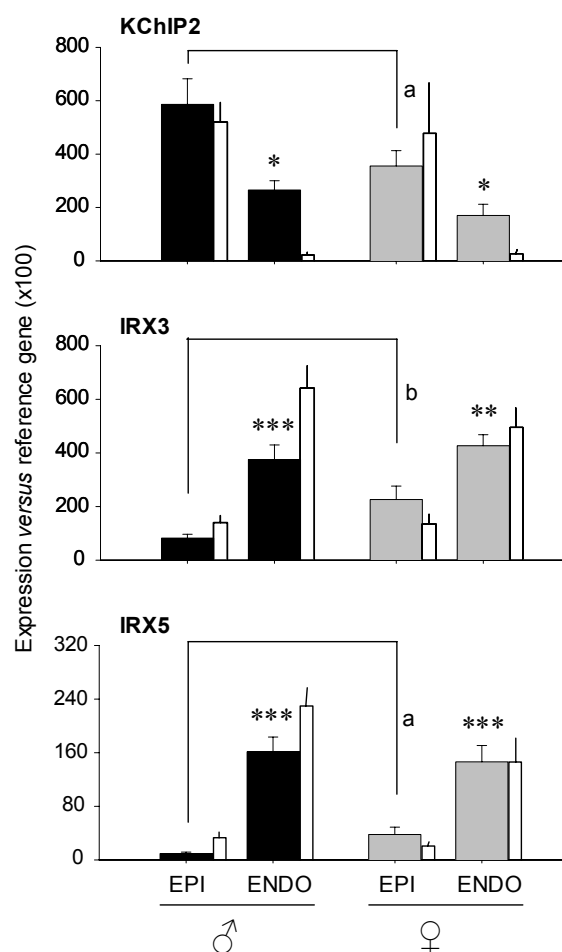


Figure 48 Profils d'expression de KChIP2 et de 2 facteurs de transcription Iroquois, dans l'épicarde et l'endocarde droits des hommes (noir) et des femmes (gris). Les barres blanches illustrent les données obtenues dans les compartiments gauches correspondants. L'expression relative (axe Y) des gènes est exprimée en $2^{-\Delta Ct}$, représentant le ratio d'expression du gène par rapport au gène de référence *HPRT*, et correspondant à la moyenne $\pm$ SEM calculée à partir de 7 échantillons ventriculaires.

c. Conclusion et discussion

Cette étude a permis de caractériser les signatures moléculaires de l'hétérogénéité transmurale dans la repolarisation cardiaque chez l'Homme et de sa modulation en fonction du sexe.

Elle a permis de montrer que les différences d'expression des canaux ioniques entre l'épicarde et l'endocarde, entre les cavités droite et gauche, et entre l'homme et la femme sont subtiles bien que potentiellement d'une importance fonctionnelle majeure.

L'expression de KChIP2 est plus importante dans l'épicarde droit des hommes par rapport aux femmes. On peut donc suggérer que la réduction de la densité du courant I_{Na} associée au syndrome de Brugada pourrait plus probablement mener à une repolarisation précoce chez les hommes.

Par ailleurs, les femmes ont globalement moins de transcrits de courants repolarisants. Ce résultat est en accord avec une durée plus courte de l'intervalle QTc chez les femmes par rapport aux hommes. On peut également suggérer que dans le cadre du syndrome de Brugada, ces différences pourraient participer à réduire la susceptibilité des femmes à une repolarisation précoce dans l'épicarde droit.

Enfin, cette étude suggère que la régulation transcriptionnelle négative de KChIP2 pourrait être liée à IRX3 et/ou IRX5.

Annexe : liste des essais TaqMan utilisés pour ce projet.

Cette étude fournit les bases moléculaires des différences transmurales dans l'électrophysiologie cardiaque humaine et leurs modulations en fonction du sexe.

Ces résultats peuvent fournir des éléments importants dans la compréhension des différences en fonction du sexe dans la susceptibilité aux arythmies ventriculaires.

Gender-related differences in human epicardial-endocardial ion channel expression heterogeneity

Nathalie Gaborit, MSc;¹ Andras Varro, PhD;² Sabrina Le Bouter, PhD;³ Viktoria Szuts, PhD;² Stanley Nattel, MD;³ Denis Escande, MD, PhD;¹ Sophie Demolombe, PhD.¹

¹*l'institut du thorax*, INSERM U533, Faculté de Médecine, Nantes, France

²Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, University of Szeged, Szeged, Hungary

³Montreal Heart Institute and University of Montreal, Montreal, Canada

Abstract

Background. Gender-related and transmural differences in ventricular electrophysiology are known to be important determinants of human arrhythmic risk, but the underlying molecular mechanisms are poorly understood.

Methods and Results. By using a high-throughput quantitative approach, we investigated at a genome-scale the expression of 79 genes encoding ion-channel and transporter subunits in non-diseased cardiac samples from either sex. Hierarchical clustering demonstrated that transcript expression dissimilarities between the endocardium and the epicardium or between samples from men and women are subtle but involve key genes implicated in conduction and repolarization. Among transcripts involved in electrical signaling and Ca^{2+} -homeostasis, 8/79 exhibited transmural ventricular-expression gradients (Nav1.5, Cav1.2, Cav α 2 δ 1, Cx40, SERCA2, Kv1.4, Kv4.2 and KChIP2), with only two (KChIP2 and Kv1.4) showing sex-related divergences. The expression of the Iroquois transcription factors IRX3 and IRX5 was opposite that of KChIP2, both in relation to the endocardium/epicardium and gender differences. In addition, 6 other ion channel transcripts encoding K^{+} channel subunits and connexins (Cx43, Kir6.2, SUR2, Kir2.3, HERG and MinK) without transmural gradients show decreased expression in women, providing a potential molecular basis for their recognized decrease in repolarization reserve. For selected genes, expression patterns were further confirmed by Western blots.

Conclusions. Our results provide novel molecular correlates for transmural differences in human cardiac electrophysiology and its modulation by gender. These results are important for understanding sex-related differences in the susceptibility to ventricular arrhythmias.

Key Words: sex, ion channels, arrhythmia.

Introduction

The various cardiac regions are characterized by specific action potential (AP) shapes, resulting from regionally-defined complements of ionic currents.¹ In particular, it is known that the human ventricular AP is shorter in the epicardium than in the endocardium. As a consequence, the epicardium repolarizes first² and repolarization spreads from the epicardium to the endocardium whereas inversely depolarization spreads from the endocardium to the epicardium. Heterogeneity in ventricular AP duration across the ventricular wall has been suggested to govern the occurrence of reentrant arrhythmias.³ Alterations in the physiological epicardial to endocardial gradient may be central to the mechanism of the Brugada syndrome, a clinical entity with ST segment elevation, right bundle branch block morphology in the right precordial leads and a high incidence of sudden cardiac death.⁴

Differences in the cardiac electrical activity of men and women are well-established. These differences are evident in electrocardiograms: not only is heart rate higher in women but the rate-corrected QT (QTc) interval is also longer.⁵ In addition, T wave shapes are different, with a longer interval between T-peak and T-end in men than in women, consistent with gender-related differences in the transmural heterogeneity of ventricular repolarization. There are also sex-related differences in the incidence of various re-entrant tachyarrhythmias, most notably *torsades-de-pointes* and Brugada syndrome, which likely involve gender-related differences in transmural cardiac repolarization (for review James AF *et al.*)⁶. Gender related differences in cardiac electrical properties have to be searched in regional ion channel transcript expression dissimilarities. Indeed, gonadal steroid hormones bind to intracellular receptors, which become transcription factors when activated, producing long-term genomic effects through altered gene transcription.⁷

To date, studies of ion-transporter subunit distribution within specific regions of the human heart have been limited to a small number of candidate subunits believed to be of importance. In addition, because of limited access to healthy human cardiac tissue samples, most studies have been performed in explanted human hearts, often severely diseased. Recent progress in genomics, particularly for species like the mouse and man, has led to the identification of an extensive repertoire of ion-channel genes. In parallel, recently-developed high-throughput molecular biology techniques now permit simultaneous measurement of the expression of up to hundreds of genes, thereby providing a global portrait of ion-channel expression. In the present study, we used a high-throughput quantitative approach to assess regionally-specific expression of genes encoding ion-channel and transporter subunits in samples from epicardial and endocardial regions of non-diseased male and female human hearts, in order to define gender-based regional differences in ion-channel subunit distribution. We found that 8/79 transcripts involved in electrical signaling exhibited

transmural gradients, with two (KChIP2 and Kv1.4) showing sex-related divergences. Six other ion channel transcripts encoding connexins and K⁺-channel subunits exhibit no transmural gradient but have decreased expression in female tissues, and are therefore candidates to underlie differences in electrophysiological function and arrhythmia susceptibility between men and women. Our results provide a molecular correlates for transmural differences in human cardiac repolarization and its modulation by gender, which may govern sex-differences in susceptibility to ventricular arrhythmias.

Methods

Human tissue samples

Non-diseased human hearts from organ donors were explanted to collect pulmonary and aortic valves for transplant surgery. Donors did not receive medication except for dobutamine, furosemide and plasma expanders. All investigations and procedures conformed to the principles outlined in the Helsinki Declaration of the World Medical Association. All experimental protocols for tissue procurement and handling were approved by the Ethical Review Board of the Medical Center of the University of Szeged (No. 51-57/1997 OEJ). Cardiac tissue dissected from 21 donor hearts (10 men, age 38.8±12 years; 11 women, age 44.5±14.2 years) were stored in cardioplegic solution at 4°C for 4-8 h before they were frozen in liquid nitrogen. Left and right epicardial and endocardial tissues were taken from the base. These regional samples were obtained by cutting 1-mm thick slices from the epicardial and endocardial surfaces, respectively.⁸ Left and right atrial (LA and RA) samples were dissected from the tip of the appendage.

All hearts sampled were macroscopically and microscopically normal. The lack of hypertrophy or failure was also confirmed biochemically by measuring the expression of atrial natriuretic factor (ANF) and verifying that ANF expression was not increased. Contamination of the samples by vascular vessels, neuronal tissue and fibroblasts was assessed by measuring the expression of calponin 1 (*CNN1*), ubiquitin thiolesterase (*UCHL1*) and collagen type VI $\alpha 1$ (*COL6A1*) respectively.

C.

D. RNA preparation

Total RNA from each cardiac sample was isolated and DNase-treated with the RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen) following manufacturer's instructions. The quality of total RNA was assessed with polyacrylamide-gel micro-electrophoresis (Agilent 2100 Bioanalyzer) and by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). The absence of genomic DNA contamination was verified by PCR.

E. TaqMan real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction

TaqMan low-density arrays (TLDA, Applied Biosystems) were used in a two-step RT-PCR process, as previously reported.⁹ Briefly, first-strand cDNA was synthesized from 2 μ g of total RNA using the High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). PCR reactions were

then performed on TLDA with the ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). The 384 wells of each card were pre-loaded with 96 x 4 pre-designed fluorogenic TaqMan probes and primers. Probes were labeled with the fluorescent reporter 6-carboxyfluorescein (FAM®, Applied Biosystems) at the 5'-end and with non-fluorescent quencher on the 3'-end. The genes selected for their cardiac expression (listed at <http://www.nantes.inserm.fr/u533/INDEX/>) encode 72 α - and β -ion channel subunits, 17 Na/K ATPase isoforms and proteins involved in calcium homeostasis, 3 hypertrophy markers (ANF, BNP, β -MHC) and 4 reference genes for normalization. Data were collected with instrument spectral compensation with Applied Biosystems SDS 2.1 software and analyzed with the threshold cycle (C_T) relative-quantification method.¹⁰ All fluorescent probes had 100% PCR efficiency (Applied Biosystems application note). This standardized method permits comparison of expression levels among cardiac compartments and among genes. We selected the hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (*HPRT*) gene as the internal standard for data normalization (ΔC_T indicates normalized data), as the most uniformly distributed gene in the heart. Ten genes with very low-level expression ($C_T > 32$) were eliminated for lack of reproducibility (*Cav γ 4*, *Cav γ 5*, *Cav γ 6*, *CFTR*, *Kv1.1*, *Kv2.2*, *Kv3.1*, *Kv3.2*, *Kir1.1* and *Nav1.4*).

Data were analyzed independently according to two distinct procedures: (i) Two-way hierarchical agglomerative clustering was applied to the gene-expression matrix consisting of 14 to 68 samples and the 79 genes with valid expression ($C_T < 32$) involved in electrical signaling. The input consisted of the ΔC_T for each gene and sample. We applied average linkage clustering with uncentered correlation using the Cluster program.¹¹ Clusters were visualized using the Treeview program; (ii) The relative expression of each gene *versus* *HPRT* ($2^{-\Delta C_T}$) was calculated in left and right epicardial and endocardial samples from each donor (data listed at <http://www.nantes.inserm.fr/u533/INDEX/>). We also investigated overall differences in gene expression between men and women. Gene expression was compared between matched right endocardial and epicardial samples from individual donors. Genes with statistically significant differential expression were identified with ANOVA in right ventricular matched samples and with unpaired Student t-tests in left ventricular unmatched samples ($p < 0.05$ considered significant).

Western Blot

Protein samples were extracted from 4 man and 4 woman donor tissue samples, as previously described.⁸ Proteins were fractionated on 12% SDS-polyacrylamide gels and transferred electrophoretically to Immobilon-P polyvinylidene fluoride membranes (Millipore). Membranes were blocked and incubated with antibodies. KChIP2 monoclonal antibody

(1:500) was a kind gift from Dr. James Trimmer (Davis, USA). IRX5 polyclonal antibody (1:1500) was a kind gift from Chi-chung Hui (Toronto, Canada). KvLQT1 and MinK polyclonal antibodies (1:200 dilution) were purchased from Alomone labs. Cx43 monoclonal antibody (1:5000 dilution) was purchased from Chemicon. Protein loading was controlled by probing with monoclonal anti-GAPDH antibody (1:5000, Research Diagnostics). After washing, membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit IgG secondary antibody (1:10 000, Santa Cruz). Bound antibodies were detected with Western Lightening Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin-Elmer Life Sciences). For each antibody, exposure times were similar for membranes containing epicardial and endocardial samples. Band densities were measured using Scion Image (Scion Corp.).

Results

Hierarchical clustering analysis

Two-way hierarchical clustering analysis groups samples according to gene-expression differences, with the most similar expression patterns located closest to each other and the most different patterns furthest apart. The process is unsupervised and therefore free from pre-conceived notions about expected differences. For visual appreciation, the samples are linked to a tree. The size of tree branches indicates the distance between clusters: longer branch lengths indicate greater separation among clusters. We aimed to establish whether hierarchical clustering could separate various ventricular compartments of males and females according to their gene-expression pattern. Because ventricular samples from different regions and genders did not show strong differences, we also analyzed atrial samples to control for the ability of the method to discriminate tissue compartments from these donors.

Hierarchical clustering analysis applied to 79 genes and to 68 atrial and ventricular samples (Figure 1) showed clear separation between atrial samples on one branch and ventricular samples on the other, demonstrating full discrimination of atrial from ventricular compartments based on the expression of genes involved in cardiac electrical activity. One clear gene cluster discriminated the atrial from ventricular samples, as shown in Figure 1. In contrast to the clear atrial-ventricular separation, samples from left- *versus* right-sided chambers did not separate. Similarly, epicardial and endocardial samples intermingled, with no distinct separation. This finding indicates that the number of ion-channel gene subunit expression differences is too small to discriminate left from right-sided and endocardial from epicardial tissues. The effects of donor gender on gene clustering are illustrated in Figure 2. Again, samples did not cluster according to gender for any of the ventricular tissue compartments studied. In summary, hierarchical clustering showed that although atrial and ventricular transcript expression patterns were clearly different, right-left, endocardial-epicardial and male-female dissimilarities were subtle and much weaker.

Transmural and gender-related gradients in ion channel gene expression

Figures 3 to 6 illustrate expression for individual ion channel transcripts selected on the basis of their relevance to transmural and gender-based differences. Right ventricular data are shown, along with detailed statistical analyses by the thick bars. Left ventricular data, which have very similar tendencies, are shown by thin bars but for the sake of visual clarity left ventricular statistical comparisons are not provided in the figures but rather in the figure legends. Among the α - and β -subunits involved in the generation of inward currents, Nav1.5 (*SCN5A*) is more strongly expressed in endocardial than epicardial samples but shows no significant differences in relation to gender (left upper and middle panels of Figure 3). An analysis of individual samples for Nav1.5 expression is shown in the upper left panel and illustrates the limited inter-individual variability in distribution, with only 1/14 individuals showing an atypical endocardial to epicardial gradient. Other genes with transmural gradients also showed limited inter-individual variability and for the sake of simplicity the individual data scatter plots are not provided for each gene.

Similar transmural differences were seen for the Ca^{2+} -channel regulator $\text{Cav}\alpha 2\delta 1$ and connexin 40. The L-type α -subunit $\text{Cav}1.2$ showed an opposite gradient, with smaller expression in endocardium. Connexin 43, the primary connexin in ventricular muscle, exhibited no transmural gradient.

Among K^+ -channel subunits (Figures 4 and 5), the only statistically-significant transmural gradients were seen for KChIP2 and $\text{Kv}4.2$ (stronger expression in epicardium) and $\text{Kv}1.4$ (stronger in endocardium). $\text{Kv}4.2$ expression was much weaker than that of $\text{Kv}4.3$, which showed no significant transmural gradient. Not illustrated are $\text{Kir}3.1$ (which expressed at very lower levels) and $\text{Kv}\beta 2$ transcripts, both of which showed a transmural gradient with stronger expression in the endocardium ($+531 \pm 230\%$, $P < 0.05$ and $+62 \pm 17\%$, $P < 0.01$, respectively) but no gender-related differences. Quite recently, the Iroquois transcription factor, IRX5, has been reported to control negatively transmural expression of $\text{Kv}4.2$ in rodents and thereby determine the epicardial/endocardial gradient for I_{to} .¹² We therefore investigated the expression of IRX3, IRX4 and IRX5 in the human ventricle. As shown in Figure 5, the abundance of IRX3 and IRX5, but not of IRX4 transcripts, inversely paralleled KChIP2 expression with stronger endocardial IRX3 and 5 expressions relative to epicardial.

With respect to ion transporter and pump subunits (Figure 6), only the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} transporter SERCA2 showed a transmural gradient, with stronger expression in the epicardium. Interestingly, the SERCA2 gradient paralleled that of the L-type Ca^{2+} -channel α -subunit, $\text{Cav}1.2$ (Figure 3).

There were no significant gender-related differences in the expression of inward current subunits (Figure 3). Statistically significant gender-based differences were seen among a variety of K^+ channel subunits (Figure 4). The inward rectifier $\text{Kir}6.2$ and its regulator SUR2 and also $\text{Kir}2.3$, which carries the cardiac I_{K1} current in combination with $\text{Kir}2.1$ and $\text{Kir}2.2$,¹³ and HERG were less expressed in tissues from women, in the absence of between-layer differences. $\text{Kv}1.4$, which underlies $\text{I}_{\text{to,slow}}$, showed lower expression in female endocardial tissue, as did the I_{Ks} subunit MinK. As for transmural expression gradients, IRX3 and 5 were more strongly expressed in female vs. male right epicardium, an expression opposite to that of KChIP2, which was more strongly expressed in males than females (Figure 5). A number of gender-determined differences were found among transcripts involved in Na^+ and Ca^{2+} homeostasis (Figure 6). Female hearts expressed Na^+/K^+ ATPase $\alpha 3$ subunits less strongly, but Na^+/Na^+ ATPase $\alpha 1$ and Ca ATPase 4 subunits more strongly than male. Phospholamban showed decreased expression, while calmodulin 3 showed increased expression, in female tissues.

In the left ventricle, genes whose products are involved in conduction, including Nav1.5, $\text{Cav}1.2$, Cx40, Cx43, and $\text{Cav}\alpha 2\delta 1$, showed very similar patterns of expression as

those seen in the right ventricle. In addition, Nav2.1 showed less expression in female epicardium ($41 \pm 6\%$ less than male, $P < 0.01$; not illustrated) but no transmural gradient. Among K⁺-channel α and β -subunits, Kir2.3, MinK and Kv1.4 also showed comparable profiles in the left ventricle to those seen in the right. Unlike the right ventricular results, Kir6.2 and SUR2 did not show clear gender-based expression differences in female left ventricles. Female hearts did show significantly weaker expression of KvLTQ1 (*KCNQ1*) in the left ventricular epicardium ($-25 \pm 5\%$, $P < 0.05$; not illustrated). TASK1 transcripts were $\approx$ 3-fold more abundant in woman left endocardium and epicardium. The left ventricle showed a similar gradient for KChIP2 between epicardium and endocardium as in right ventricle, but there was no influence of gender. As in the right ventricle, no gradient for Kv4.3 existed in the left ventricle.

In summary, Nav1.5, Cav1.2, Cav α 2 δ 1, Cx40, SERCA2, Kv1.4, Kv4.2 and KChIP2 showed an epicardium-endocardium gradient of expression both in the right and left ventricles. Among these genes, only KChIP2 and to a lesser extent Kv1.4 showed gender-related divergences. Cx43, Kir2.3, HERG, and MinK showed weaker expression in female ventricles that was consistent in both ventricular chambers, whereas Kir6.2 and SUR2 differences were seen predominantly on the right side and *KCNQ1* and TASK1 transcript differences on the left.

Protein correlates

Western-blot experiments (Figure 7) were conducted for selected ion-channel subunits. In agreement with transcriptional data, KChIP2 protein was more strongly expressed in epicardial than endocardial compartments. We also confirmed at the protein level the lower expression of KChIP2 in female epicardium. Inversely, IRX5 proteins were more abundant in the endocardium than in the epicardium, and in female *versus* male epicardium. The lower expression of KvLQT1 in female epicardium was also in accordance with its transcript profile. MinK and Cx43 proteins exhibit gender-differences in both epicardium and endocardium.

Discussion

In the present work, we provide the first detailed analysis of regional ion-channel gene distribution in the non-diseased human heart. While the atria exhibit very distinct patterns of ion-channel and transporter expression in comparison with the ventricle, the differences between the endocardium and the epicardium or between left and right side cavities or between male and female samples are subtle although potentially of major functional importance. This is consistent with the observation that only a few genes exhibit transmural gradient in pangenomic microarray experiments.¹⁴ Our data show that not only KChIP2, but also other genes, such as Cav1.2, Cav α 2 δ 1, Kv4.2 and Kv1.4, whose products are involved in repolarization phase, exhibit a transmural gradient. The most striking difference observed between male and female genders concerned the expression of KChIP2 in the right ventricle and lower expression in women of several K⁺-channel α - and β -subunits.

Correlation with previous work

Among the Na⁺ channel subunits, Nav1.5 transcripts showed higher expression in the endocardium, in accordance with a higher I_{Na} current density in canine endocardium.¹⁵ It is well-established that the epicardium expressed more transient outward current, I_{to}, than the endocardium and that this difference is key to create transmural repolarization heterogeneity in various species including human.^{16,17} In large mammals such as human and dog, Kv4.3 is the predominant I_{to}-encoding α -subunit in the heart,^{18,19} and a gradient of its regulator KChIP2 may be related to the graded expression of I_{to}.^{20,21} Accordingly, we found that KChIP2 is by far more expressed in the human epicardium layer, whereas Kv4.3 transcripts are homogeneously distributed. On the other hand, the α -subunit Kv1.4 associated with the slow outward current I_{to,slow} is more abundant in the endocardium. This molecular portrait correlates with functional studies showing larger I_{to,fast} current in human epicardium cells and larger I_{to,slow} in endocardium cells.²² In mice and rats, regional heterogeneity of I_{to} in the ventricles parallels that of Kv4.2.²³ Most recently, Constantini *et al.*¹² showed that mice lacking the homeodomain transcription factor IRX5 exhibit no cardiac repolarization gradient because of an increased Kv4.2 expression in the endocardium. These authors proposed that IRX5 acts as a repressor to negatively regulate Kv4.2 α -subunit gene expression in the heart, forming an inverse I_{to} gradient that ensures coordinated cardiac repolarization. In the human ventricle, we observed that the expression of IRX5, but also IRX3, inversely mirrors the expression of KChIP2 but not of Kv4.2 or Kv4.3. In contrast, we found no epicardium-endocardium gradient or gender-differences for IRX4 expression. Our data suggest that negative transcriptional regulation of KChIP2 may occur *via* IRX3 and/or IRX5, although this notion requires further assessment.

The cardiac inward rectifier I_{K1} is thought to represent a combination of currents carried by Kir2.1 (*KCNJ2*), Kir2.2 (*KCNJ12*) and Kir2.3 (*KCNJ4*) channels.¹³ In the rabbit, the outward component of I_{K1} has a larger density in myocytes from male than female hearts.²⁴ Male myocytes from guinea pig also show significantly larger inward I_{K1} density than female myocytes.²⁵ These data are consistent with our observation of a lower expression of Kir2.3 in female epicardium and endocardium of both the right and left ventricles. As for I_{K1} , the density of the delayed rectifier I_{Kr} is larger in myocytes isolated from male rabbits and guinea pigs compared to females.^{24,25} This correlates with lower expression of HERG transcripts that we observed in female ventricles. Our results for MinK (*KCNE1*) and SUR2 oppose previous observations in animals. Drici *et al.*²⁶ found 2-fold greater expression of *KCNE1* mRNA in hearts from adult female mice. Similarly, guinea-pig female hearts showed significantly greater expression of mRNA and protein for the cardiac sulphonylurea receptor isoform.²⁷ In agreement with previous findings,²⁸ we observed that the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 (SERCA2) responsible for intracellular Ca^{2+} uptake is predominantly expressed in epicardium. Consistently, epicardial cells exhibit fastest relaxation rate of the ventricular wall.²⁹

Our data suggest that the transcription of various K^+ -channel α - and β -subunits may be controlled by gonadal steroid hormones. Binding of these hormones to their receptor proteins catalyzes transcription of the target gene. To date, this process has been brought to light for the rat *CACNA1C* (Cav1.2) gene³⁰ and suggested for the human *CACNA1C*, *SCN5A* and *KCNJ11* (Kir6.2) genes.³¹ However, direct binding of the hormone receptors on their promoters have not yet been shown.

Potential pathophysiological significance

The Brugada syndrome is a genetically-inherited syndrome leading to sudden cardiac deaths in the absence of structural heart disease.^{3,4,32} The disease has been linked to the *SCN5A* gene in $\approx 20\%$ of Brugada syndrome cases.³³ Despite equal inheritance of Brugada syndrome between males and females, there is a clear male predominance in phenotype and symptoms.^{34,35} In some areas of East Asia where the disease is prevalent, the ratio of male to female Brugada patients is as high as 8:1.³⁵ The most commonly accepted pathophysiological basis for the Brugada syndrome involves the larger $I_{to,fast}$ in the epicardium and associated risk of early repolarization causing loss of the action potential dome and marked abbreviation of the action potential duration, potentially leading to phase 2 re-entry and sudden death.⁴ Agents that either inhibit inward currents (I_{Na} or I_{Ca} currents) or increase outward currents (e.g. pinacidil acting on Kir6.2 channels) can experimentally provoke the phenotype.³ Using the canine arterially perfused ventricular wedge preparation, Di Diego *et al.*³⁶ suggest that the gender difference in penetrance of the Brugada syndrome

is caused by a more prominent I_{to} -mediated action potential notch in the right epicardium of males *versus* females. Our data in human parallel and support Di Diego's observations in dogs, since we found significantly lesser expression of KChIP2 in the right epicardium in women in comparison to men. Thus, the reduced I_{Na} density of Brugada patients would more likely lead to premature repolarization in the right epicardium in males than in females.³⁷ In addition, decreased *SCN5A* expression in the epicardium may facilitate premature repolarization in the case of reduced *SCN5A* (I_{Na}) channel function resulting from gene mutations.

The pathophysiological mechanism of the Brugada syndrome is considered primarily located in the right ventricle.³⁸ We found that female hearts have less repolarizing current transcripts (KChIP2, HERG, Kir2.3, Kir6.2, SUR2) in the right ventricle than men. Thus, women may be less prone to premature repolarization in the right epicardium. We found no gender-related differences in epicardial KChIP2 expression in the left ventricle, in agreement with lack of sex differences in left epicardial phase 1 repolarization or I_{to} density in dog.³⁶ Importantly, we found gender-related differences in the right ventricle (KChIP2, Kir6.2, SUR2) that do not exist in the left ventricle.

Our laboratory has previously reported in a large French family, that the same *SCN5A* mutation (G1406R) principally causes Brugada syndrome in men and progressive cardiac conduction defect (Lenègre disease) in women.³⁹ Because women have less KChIP2 and less repolarizing channel transcripts in their right ventricular epicardium, they would be expected to manifest primarily direct consequences of reduced I_{Na} current like conduction defects⁴⁰ rather than arrhythmias due to large outward currents in the face of reduced I_{Na} . The female susceptibility to conduction disease may be aggravated by the reduced Cx43 expression that we noted in female hearts.

Study limitations

Transcripts do not necessarily translate into functional proteins, and although transcriptional regulation of ion channel expression is a key regulatory mechanism,⁴¹ other translational and post-translational processes should clearly play a role. Transcriptional regulation is an efficient mechanism to control precisely and specifically channel activity. We did verify protein expression differences for several genes and found that they paralleled transcript differences. No technology is currently available to explore on a large-scale the expression of a collection of membrane proteins and this is the subject of active research in the field of proteomics. Another important limitation issues from the precise locations from which samples were collected. Heterogeneous expression may very well exist between the base and the apex of the ventricle. Finally, targeting of ion channel proteins in the different subcellular compartments is key to their function and cannot be assessed by our global

analysis. In spite of these limitations, genomics represents a powerful means to promote our understanding of the potential molecular mechanisms underlying clinically significant functional cardiac properties.

Transmural heterogeneity in cellular electrical activity is not restricted to endocardium and epicardium cells but also includes M-cells in the mid-myocardial layers, which AP becomes much prolonged at slow heart rate. M-cells were first reported in dogs by Sicouri and Antzelevitch⁴² and later by our group in the human ventricle.⁴³ However, because the influence of M-cells depends on the degree of electrotonic coupling, the functional significance of M-cells has been the subject of some debate.^{44,45} In addition, M-cells do not appear in the depth of the ventricle as a continuous layer but rather as patchy isolates of cardiac myocytes.⁴⁶ It is thus difficult to define a discrete M cell area by anatomical dissection alone, as would be needed for our molecular analyses.

Acknowledgments

Supported by special grants from Ouest Genopole, Ministère Français de la Recherche (ACI), the Leducq Foundation, Canadian Institutes of Health Research, INSERM-FRSQ and Bio-37 KPI. SD holds a tenure position from the French CNRS. The authors wish to thank Miklos Bitay, Jean-Marie Heslan and Marie-Jo Louerat for their excellent technical assistance.

References

1. Schram G, Pourrier M, Melnyk P, Nattel S. Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. *Circ Res*. 2002;90:939-950.
2. Franz MR, Bargheer K, Rafflenbeul W, Haverich A, Lichtlen PR. Monophasic action potential mapping in human subjects with normal electrocardiograms: direct evidence for the genesis of the T wave. *Circulation*. 1987;75:379-386.
3. Antzelevitch C, Fish J. Electrical heterogeneity within the ventricular wall. *Basic Res Cardiol*. 2001;96:517-527.
4. Antzelevitch C, Brugada P, Brugada J, Brugada R, Towbin JA, Nademanee K. Brugada syndrome: 1992-2002: a historical perspective. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:1665-1671.
5. Stramba-Badiale M, Locati EH, Martinelli A, Courville J, Schwartz PJ. Gender and the relationship between ventricular repolarization and cardiac cycle length during 24-h Holter recordings. *Eur Heart J*. 1997;18:1000-1006.
6. James AF, Choisy SC, Hancox JC. Recent advances in understanding sex differences in cardiac repolarization. *Prog Biophys Mol Biol*. 2005 (*in press*).
7. DeFranco DB. Regulation of steroid receptor subcellular trafficking. *Cell Biochem Biophys*. 1999;30:1-24.
8. Zicha S, Xiao L, Stafford S, Cha TJ, Han W, Varro A, Nattel S. Transmural expression of transient outward potassium current subunits in normal and failing canine and human hearts. *J Physiol*. 2004;561:735-748.
9. Marionneau C, Couette B, Liu J, Li H, Mangoni ME, Nargeot J, Lei M, Escande D, Demolombe S. Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart. *J Physiol*. 2005;562:223-234.
10. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods*. 2001;25:402-408.

11. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:14863-14868.
12. Costantini DL, Arruda EP, Agarwal P, Kim KH, Zhu Y, Zhu W, Lebel M, Cheng CW, Park CY, Pierce SA, Guerchicoff A, Pollevick GD, Chan TY, Kabir MG, Cheng SH, Husain M, Antzelevitch C, Srivastava D, Gross GJ, Hui CC, Backx PH, Bruneau BG. The homeodomain transcription factor *Irx5* establishes the mouse cardiac ventricular repolarization gradient. *Cell*. 2005;123:347-358.
13. Dhamoon AS, Pandit SV, Sarmast F, Parisian KR, Guha P, Li Y, Bagwe S, Taffet SM, Anumonwo JM. Unique Kir2.x properties determine regional and species differences in the cardiac inward rectifier K⁺ current. *Circ Res*. 2004;94:1332-1339.
14. Rosati B, Grau F, McKinnon D. Regional variation in mRNA transcript abundance within the ventricular wall. *J Mol Cell Cardiol*. 2006;40:295-302.
15. Ashamalla SM, Navarro D, Ward CA. Gradient of sodium current across the left ventricular wall of adult rat hearts. *J Physiol*. 2001;536:439-443.
16. Wettwer E, Amos GJ, Posival H, Ravens U. Transient outward current in human ventricular myocytes of subepicardial and subendocardial origin. *Circ Res*. 1994;75:473-482.
17. Li GR, Feng J, Yue L, Carrier M. Transmural heterogeneity of action potentials and I_{to1} in myocytes isolated from the human right ventricle. *Am J Physiol*. 1998;275:H369-H377.
18. Nerbonne JM, Guo W. Heterogeneous expression of voltage-gated potassium channels in the heart: roles in normal excitation and arrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2002;13:406-409.
19. Dixon JE, Shi W, Wang HS, McDonald C, Yu H, Wymore RS, Cohen IS, McKinnon D. Role of the Kv4.3 K⁺ channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current. *Circ Res*. 1996;79:659-668.

20. Deschenes I, Tomaselli GF. Modulation of Kv4.3 current by accessory subunits. *FEBS Lett.* 2002;528:183-188.
21. Rosati B, Pan Z, Lypen S, Wang HS, Cohen I, Dixon JE, McKinnon D. Regulation of KChIP2 potassium channel beta subunit gene expression underlies the gradient of transient outward current in canine and human ventricle. *J Physiol.* 2001;533:119-125.
22. Kaab S, Nabauer M. Diversity of ion channel expression in health and disease. *Eur Heart J Supplements.* 2001;3:K31-K40.
23. Guo W, Li H, Aimond F, Johns DC, Rhodes KJ, Trimmer JS, Nerbonne JM. Role of heteromultimers in the generation of myocardial transient outward K⁺ currents. *Circ Res.* 2002;90:586-593.
24. Liu XK, Katchman A, Drici MD, Ebert SN, Ducic I, Morad M, Woosley RL. Gender difference in the cycle length-dependent QT and potassium currents in rabbits. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;285:672-679.
25. James AF, Arberry LA, Hancox JC. Gender-related differences in ventricular myocyte repolarization in the guinea pig. *Basic Res Cardiol.* 2004;99:183-192.
26. Drici MD, Baker L, Plan P, Barhanin J, Romey G, Salama G. Mice display sex differences in halothane-induced polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation.* 2002;106:497-503.
27. Ranki HJ, Budas GR, Crawford RM, Jovanovic A. Gender-specific difference in cardiac ATP-sensitive K(+) channels. *J Am Coll Cardiol.* 2001;38:906-915.
28. Prestle J, Dieterich S, Preuss M, Bieligg U, Hasenfuss G. Heterogeneous transmural gene expression of calcium-handling proteins and natriuretic peptides in the failing human heart. *Cardiovasc Res.* 1999;43:323-331.
29. Cordeiro JM, Greene L, Heilmann C, Antzelevitch D, Antzelevitch C. Transmural heterogeneity of calcium activity and mechanical function in the canine left ventricle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286:H1471-H1479.

30. Liu L, Fan QI, El-Zaru MR, Vanderpool K, Hines RN, Marsh JD. Regulation of DHP receptor expression by elements in the 5'-flanking sequence. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;278:H1153-H1162.
31. Borlak J, Thum T. Hallmarks of ion channel gene expression in end-stage heart failure. *FASEB J*. 2003;17:1592-1608.
32. Brugada P, Brugada J, Brugada R. The Brugada syndrome. *Card Electrophysiol Rev*. 2002;6:45-48.
33. Smits JP, Eckardt L, Probst V, Bezzina CR, Schott JJ, Remme CA, Haverkamp W, Breithardt G, Escande D, Schulze-Bahr E, LeMarec H, Wilde AA. Genotype-phenotype relationship in Brugada syndrome: electrocardiographic features differentiate SCN5A-related patients from non-SCN5A-related patients. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40:350-356.
34. Priori SG, Napolitano C, Gasparini M, Pappone C, Della Bella P, Giordano U, Bloise R, Giustetto C, De Nardis R, Grillo M, Ronchetti E, Faggiano G, Nastoli J. Natural history of Brugada syndrome: insights for risk stratification and management. *Circulation*. 2002;105:1342-1347.
35. Wilde AA, Antzelevitch C, Borggrefe M, Brugada J, Brugada R, Brugada P, Corrado D, Hauer RN, Kass RS, Nademanee K, Priori SG, Towbin JA; Study Group on the Molecular Basis of Arrhythmias of the European Society of Cardiology. Proposed diagnostic criteria for the Brugada syndrome: consensus report. *Circulation*. 2002;106:2514-2519.
36. Di Diego JM, Cordeiro JM, Goodrow RJ, Fish JM, Zygmunt AC, Perez GJ, Scornik FS, Antzelevitch C. Ionic and cellular basis for the predominance of the Brugada syndrome phenotype in males. *Circulation*. 2002;106:2004-2011.
37. Antzelevitch C. Androgens and male predominance of the Brugada syndrome phenotype. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2003;26:1429-1431.
38. Antzelevitch C, Brugada P, Brugada J, Brugada R, Shimizu W, Gussak I, Perez Riera AR. Brugada syndrome: a decade of progress. *Circ Res*. 2002;91:1114-1118.

39. Kyndt F, Probst V, Potet F, Demolombe S, Chevallier JC, Baro I, Moisan JP, Boisseau P, Schott JJ, Escande D, Le Marec H. Novel SCN5A mutation leading either to isolated cardiac conduction defect or Brugada syndrome in a large French family. *Circulation*. 2001;104:3081-3086.
40. Probst V, Allouis M, Sacher F, Pattier S, Babuty D, Mabo P, Mansourati J, Victor J, Nguyen JM, Schott JJ, Boisseau P, Escande D, Le Marec H. Progressive cardiac conduction defect is the prevailing phenotype in carriers of a brugada syndrome SCN5A mutation. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2006; *in press*
41. Rosati B, McKinnon D. Regulation of ion channel expression. *Circ Res*. 2004;94:874-883.
42. Sicouri S, Antzelevitch C. A subpopulation of cells with unique electrophysiological properties in the deep subepicardium of the canine ventricle. The M cell. *Circ Res*. 1991;68:1729-1741.
43. Drouin E, Charpentier F, Gauthier C, Laurent K, Le Marec H. Electrophysiologic characteristics of cells spanning the left ventricular wall of human heart: evidence for presence of M cells. *J Am Coll Cardiol*. 1995;26:185-192.
44. Ueda N, Zipes DP, Wu J. Functional and transmural modulation of M cell behavior in canine ventricular wall. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287:H2569-H2575.
45. Bauer A, Becker R, Freigang KD, Senges JC, Voss F, Hansen A, Muller M, Lang HJ, Gerlach U, Busch A, Kraft P, Kubler W, Schols W. Rate- and site-dependent effects of propafenone, dofetilide, and the new I(Ks)-blocking agent chromanol 293b on individual muscle layers of the intact canine heart. *Circulation*. 1999;100:2184-2190.
46. Akar FG, Yan GX, Antzelevitch C, Rosenbaum DS. Unique topographical distribution of M cells underlies reentrant mechanism of torsade de pointes in the long-QT syndrome. *Circulation*. 2002;105:1247-1253.

Figure legends

Figure 1: **Two-way hierarchical agglomerative clustering applied to 79 genes (vertically) and to 12 left and right atria (LA and RA) and 28 left epicardium (Lepi) and left endocardium (Lendo) and 28 right epicardium (Repi) and right endocardium (Rendo; horizontally) samples.** The input consisted of the ratio for each patient and gene *versus* the reference gene. Each gene is represented by a single row of colored boxes and each patient (individualized by Roman numbers) by a single column. Epicardial samples are indicated in blue. The entire gene clustering is shown on the left. Selected gene cluster is shown on the right, containing relevant genes for atrial *versus* ventricle discrimination. Each color patch in the map represents the gene expression level in one sample, with expression levels ranging from dark green (lowest) to bright red (highest). Missing values are coded as silver.

Figure 2: **Two-way hierarchical agglomerative clustering applied to 79 genes (horizontally) and to left epicardium, left endocardium, right epicardium and right endocardium from 7 women and 7 men (vertically).** Same format as in Figure 1. Samples from women are indicated in red whereas samples from men are indicated in black.

Figure 3: **Expression profile of Na⁺, Ca²⁺ and Cx channel genes associated with epicardium/endocardium gradient and/or gender differences.** Individual variability for Nav1.5 is shown in the top left panel. Bar graphs show transcript expression in the right epicardium and endocardium from man (black) and woman (grey) samples. Data from the left ventricle are represented by narrow white bars. In this figure as in Figures 4-6, data are expressed as arbitrary units normalized to *HPRT* and are mean $\pm$ SEM from 7 donors. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ *versus* epicardium. a: $p < 0.05$ *versus* women. For clarity, statistics for left ventricle expression are not illustrated. Left male endocardium: Nav1.5, $p < 0.05$; Cav1.2, $p < 0.05$; Cav α 2 δ 1, $p < 0.05$; Cx40, $p < 0.01$ vs epicardium. Left female endocardium: Nav1.5, $p < 0.05$ vs epicardium. Left male epicardium: Cav α 2 δ 1, $p < 0.01$; Cx40, $p < 0.05$; Cx43, $p < 0.05$ vs female epicardium. Left male endocardium: Cx43, $p < 0.05$ vs female endocardium.

Figure 4: **Expression profile of K⁺ channel α - and β -subunit genes.** Same format as in Figure 3. b: $p < 0.01$ *versus* women. Left male endocardium: Kv1.4, $p < 0.01$ vs epicardium. Left female endocardium: Kv1.4, $p < 0.05$; Kir2.3, $p < 0.01$ vs epicardium. Left male epicardium:

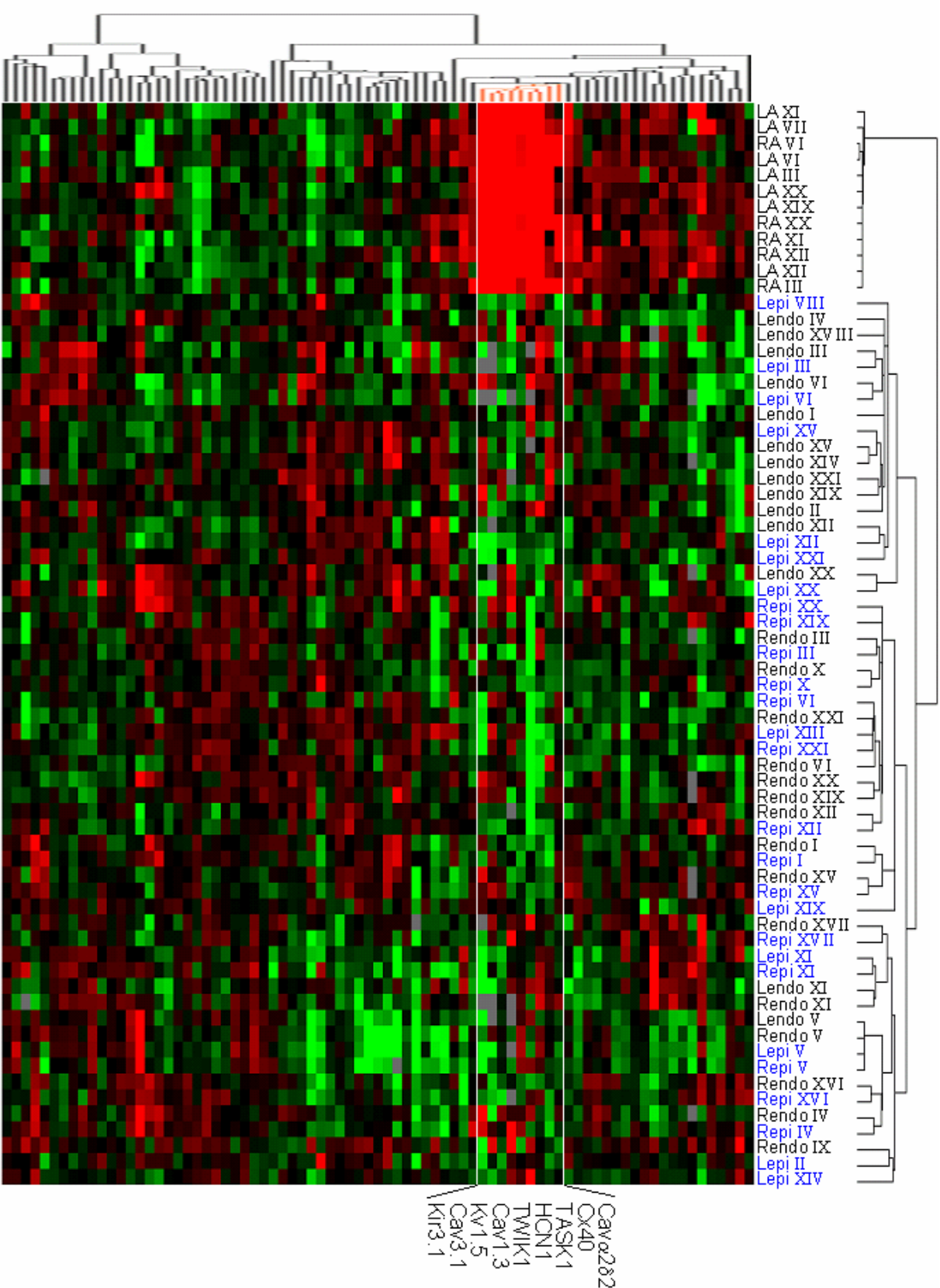
Kir2.3, $p < 0.001$; HERG, $p < 0.05$; MinK, $p < 0.01$; Kv1.4, $p < 0.01$ vs female epicardium. Left male endocardium: Kir2.3, $p < 0.05$; MinK, $p < 0.01$; Kv1.4, $p < 0.05$ vs female endocardium.

Figure 5: **Expression profile of Ito-encoding K⁺-channel subunits and the Iroquois transcription factors (IRX3, IRX4 and IRX5).** Same format as in Figures 3 and 4. c: $p < 0.001$ versus women. Left male endocardium: KChIP2, $p < 0.001$; IRX3, $p < 0.001$; IRX5, $p < 0.001$ vs epicardium. Left female endocardium: KChIP2, $p < 0.01$; IRX3, $p < 0.001$; IRX5, $p < 0.01$; Kv4.2, $p < 0.05$ vs epicardium. Left male epi- and endocardium: IRX4, $p < 0.01$ vs female epi- and endocardium.

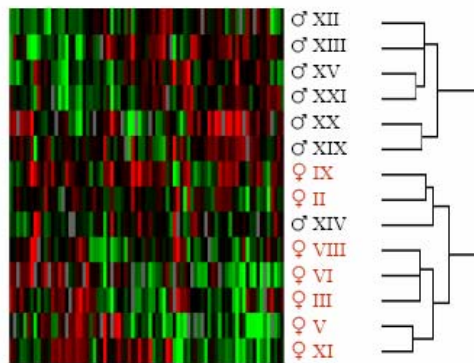
Figure 6: **Expression profile of intracellular calcium regulators.** SERCA2 indicates the sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase type 2, PLN, phospholamban, CALM3, calmodulin 3. Same format as in Figures 3-5. Left male and female endocardium: SERCA2, $p < 0.05$ vs epicardium. Left male epicardium: Na/K ATPase $\alpha 1$, $p < 0.001$; Na/K ATPase $\alpha 3$, $p < 0.01$; Ca ATPase $\beta 4$, $p < 0.05$; SERCA2, $p < 0.05$; CALM3, $p < 0.01$ vs female epicardium. Left male endocardium: Na/K ATPase $\alpha 1$, $p < 0.01$; Na/K ATPase $\alpha 3$, $p < 0.01$; PLN, $p < 0.05$; CALM3, $p < 0.01$ vs female endocardium.

Figure 7: **Western-blot analysis of key proteins.** *Left:* representative Western blots probed with anti-KChIP2, anti-IRX5, anti-KvLQT1, anti-MinK and anti-Cx43 antibodies. GAPDH is shown as loading control. Expected molecular masses are indicated. *Right:* quantification of Western blots versus GAPDH expressed in arbitrary units (n=4).

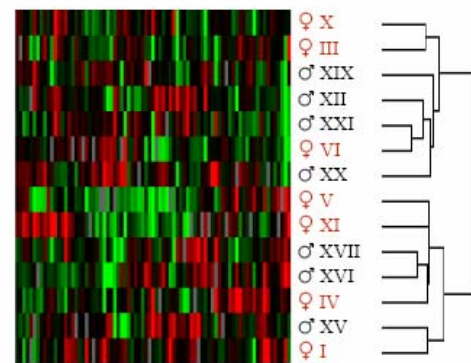
Figure 1



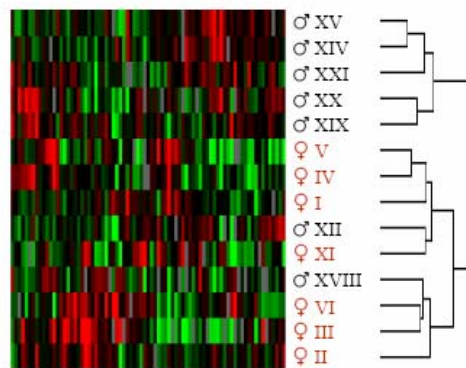
Left epicardium



Right epicardium



Left endocardium



Right endocardium

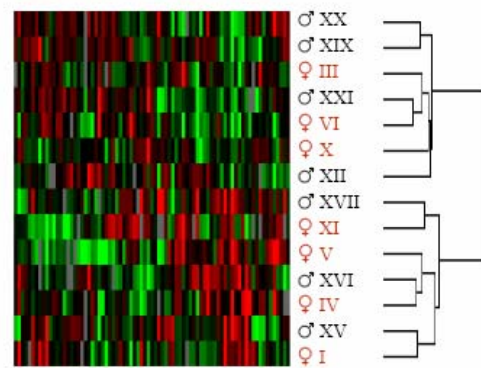
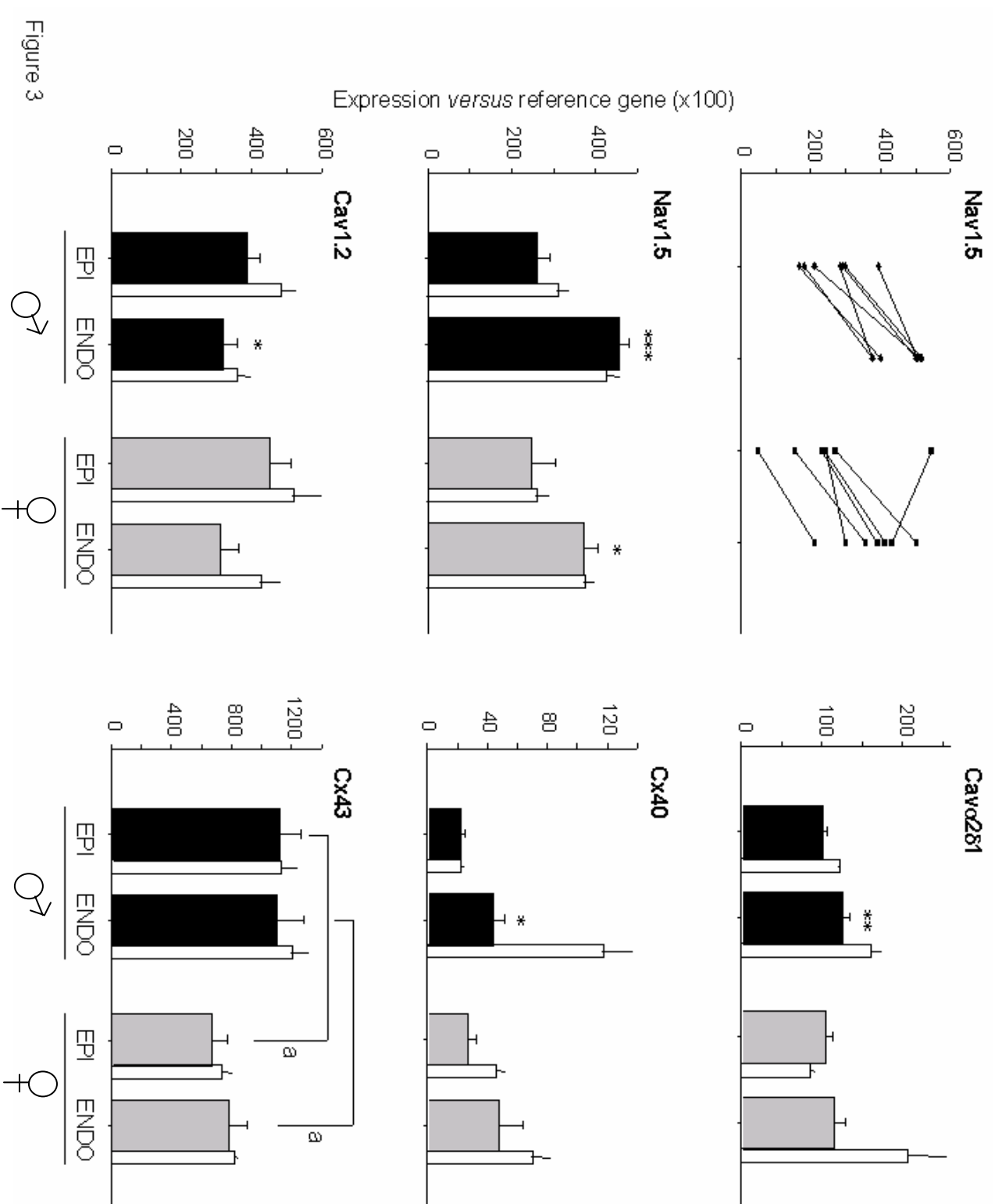


Figure 2



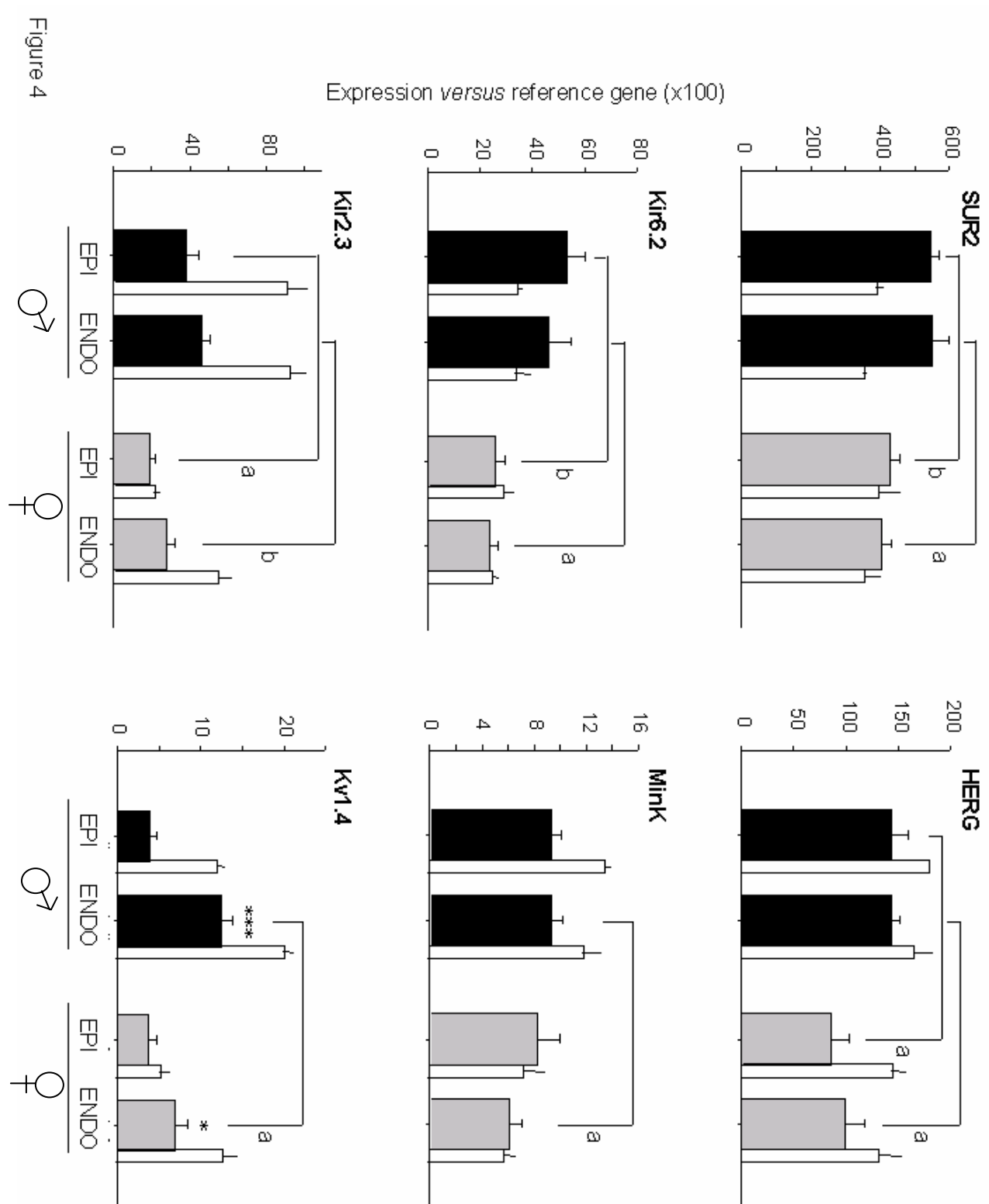
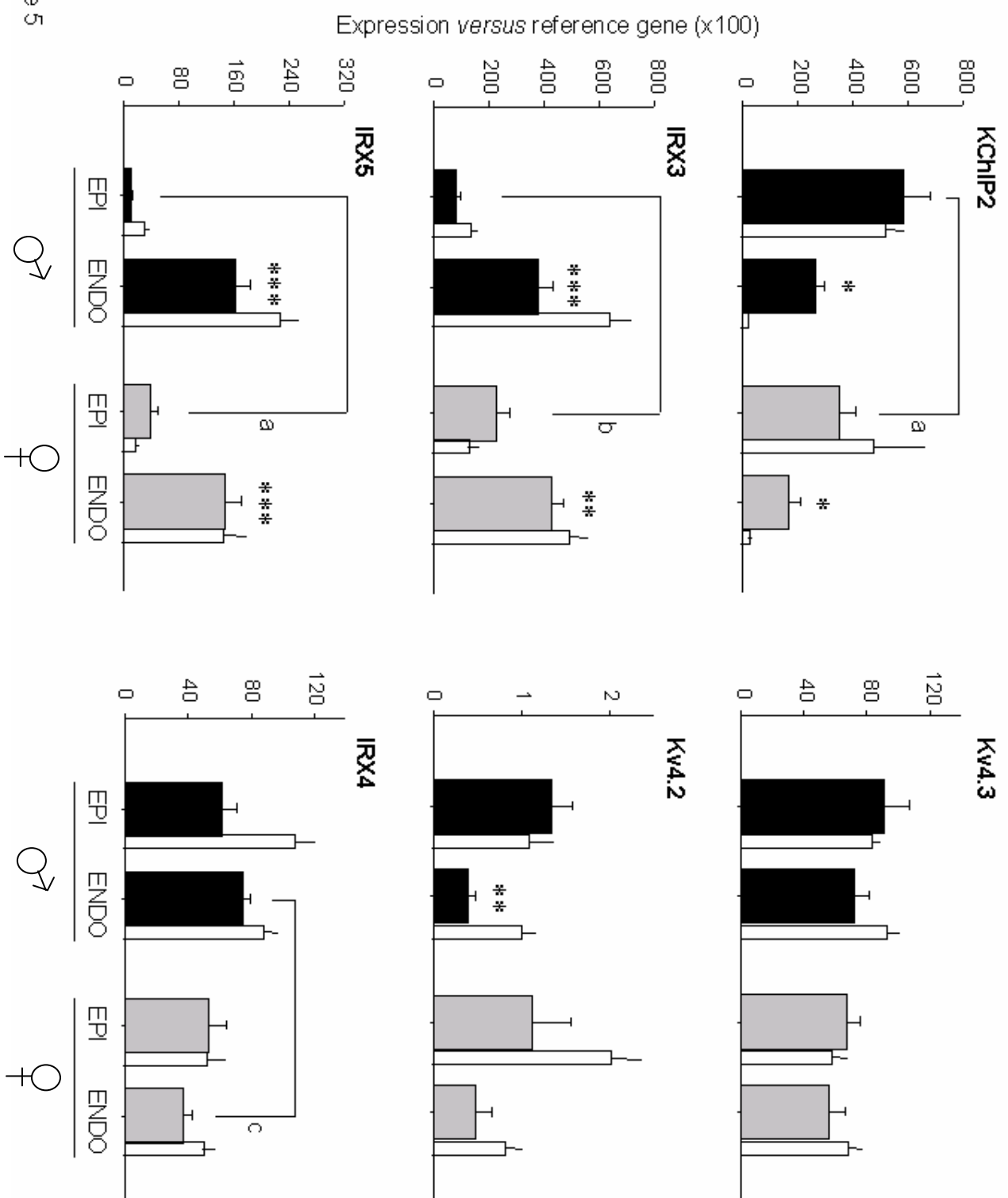


Figure 4

Figure 5



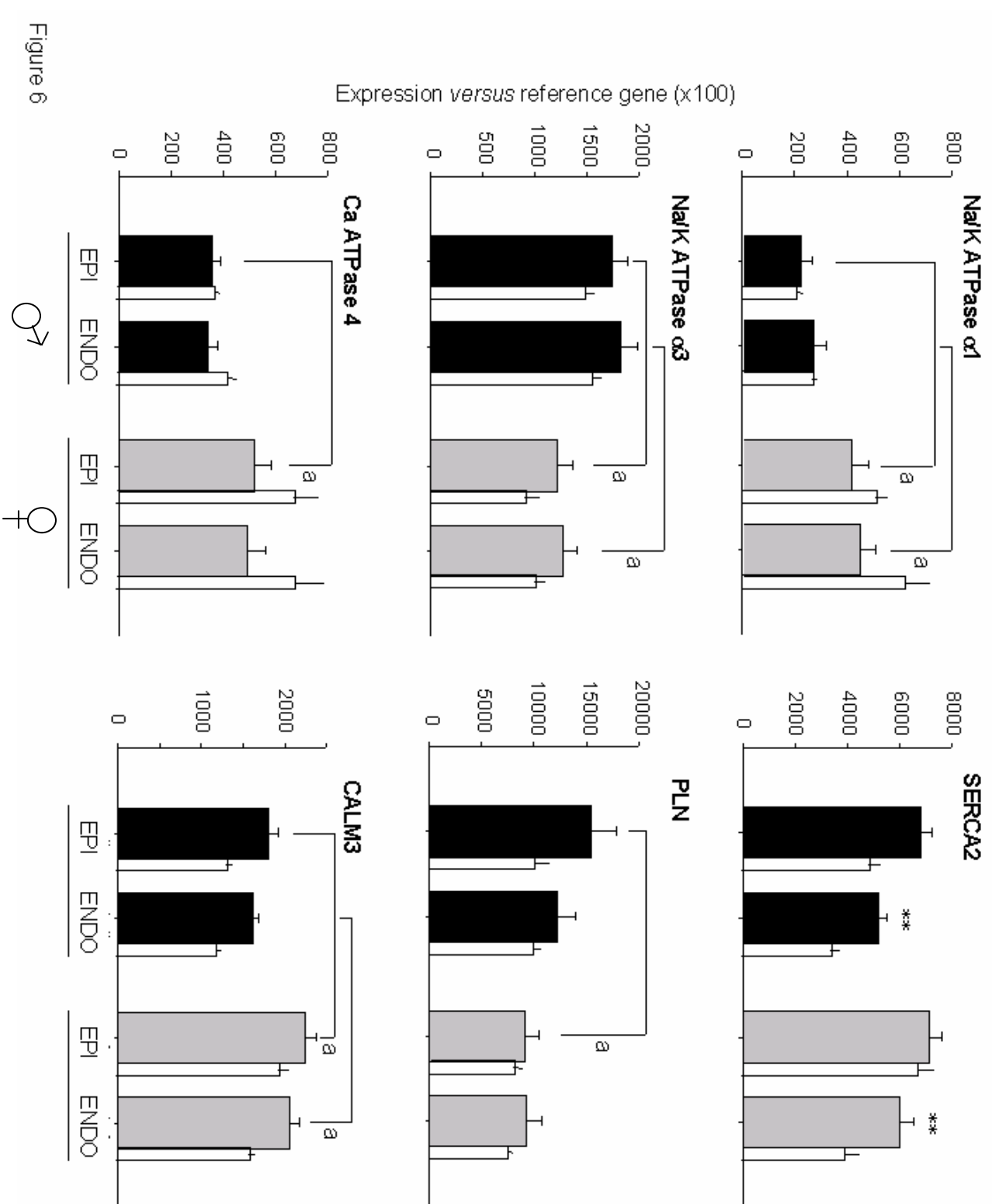
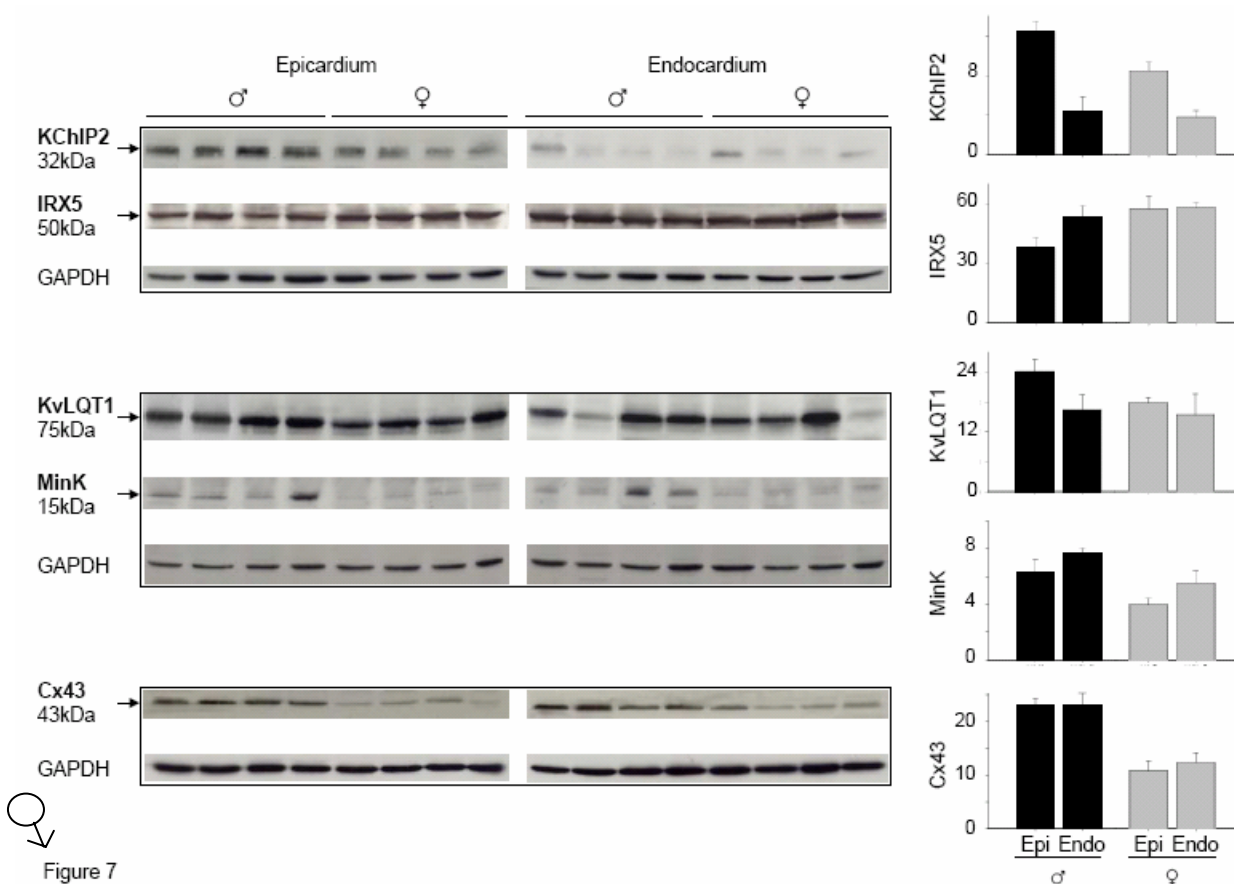


Figure 6

Abstract

Background. Gender-related and transmural differences in ventricular electrophysiology are known to be important determinants of human arrhythmic risk, but the underlying molecular mechanisms are poorly understood.

Methods and Results. By using a high-throughput quantitative approach, we investigated at a genome-scale the expression of 79 genes encoding ion-channel and transporter subunits



in non-diseased cardiac samples from either sex. Hierarchical clustering demonstrated that transcript expression dissimilarities between the endocardium and the epicardium or between samples from men and women are subtle but involve key genes implicated in conduction and repolarization. Among transcripts involved in electrical signaling and Ca^{2+} -homeostasis, 8/79 exhibited transmural ventricular-expression gradients (Nav1.5, Cav1.2, Cav α 2 δ 1, Cx40, SERCA2, Kv1.4, Kv4.2 and KChIP2), with only two (KChIP2 and Kv1.4) showing sex-related divergences. The expression of the Iroquois transcription factors IRX3 and IRX5 was opposite that of KChIP2, both in relation to the endocardium/epicardium and gender differences. In addition, 6 other ion channel transcripts encoding K^+ channel subunits and connexins (Cx43, Kir6.2, SUR2, Kir2.3, HERG and MinK) without transmural gradients show decreased expression in women, providing a potential molecular basis for their

recognized decrease in repolarization reserve. For selected genes, expression patterns were further confirmed by Western blots.

Conclusions. Our results provide novel molecular correlates for transmural differences in human cardiac electrophysiology and its modulation by gender. These results are important for understanding sex-related differences in the susceptibility to ventricular arrhythmias.

Key Words: sex, ion channels, arrhythmia.

Introduction

The various cardiac regions are characterized by specific action potential (AP) shapes, resulting from regionally-defined complements of ionic currents.¹ In particular, it is known that the human ventricular AP is shorter in the epicardium than in the endocardium. As a consequence, the epicardium repolarizes first² and repolarization spreads from the epicardium to the endocardium whereas inversely depolarization spreads from the endocardium to the epicardium. Heterogeneity in ventricular AP duration across the ventricular wall has been suggested to govern the occurrence of reentrant arrhythmias.³ Alterations in the physiological epicardial to endocardial gradient may be central to the mechanism of the Brugada syndrome, a clinical entity with ST segment elevation, right bundle branch block morphology in the right precordial leads and a high incidence of sudden cardiac death.⁴

Differences in the cardiac electrical activity of men and women are well-established. These differences are evident in electrocardiograms: not only is heart rate higher in women but the rate-corrected QT (QTc) interval is also longer.⁵ In addition, T wave shapes are different, with a longer interval between T-peak and T-end in men than in women, consistent with gender-related differences in the transmural heterogeneity of ventricular repolarization. There are also sex-related differences in the incidence of various re-entrant tachyarrhythmias, most notably *torsades-de-pointes* and Brugada syndrome, which likely involve gender-related differences in transmural cardiac repolarization (for review James AF *et al.*)⁶. Gender related differences in cardiac electrical properties have to be searched in regional ion channel transcript expression dissimilarities. Indeed, gonadal steroid hormones bind to intracellular receptors, which become transcription factors when activated, producing long-term genomic effects through altered gene transcription.⁷

To date, studies of ion-transporter subunit distribution within specific regions of the human heart have been limited to a small number of candidate subunits believed to be of importance. In addition, because of limited access to healthy human cardiac tissue samples, most studies have been performed in explanted human hearts, often severely diseased. Recent progress in genomics, particularly for species like the mouse and man, has led to the identification of an extensive repertoire of ion-channel genes. In parallel, recently-developed high-throughput molecular biology techniques now permit simultaneous measurement of the expression of up to hundreds of genes, thereby providing a global portrait of ion-channel expression. In the present study, we used a high-throughput quantitative approach to assess regionally-specific expression of genes encoding ion-channel and transporter subunits in samples from epicardial and endocardial regions of non-diseased male and female human hearts, in order to define gender-based regional differences in ion-channel subunit distribution. We found that 8/79 transcripts involved in electrical signaling exhibited

transmural gradients, with two (KChIP2 and Kv1.4) showing sex-related divergences. Six other ion channel transcripts encoding connexins and K⁺-channel subunits exhibit no transmural gradient but have decreased expression in female tissues, and are therefore candidates to underlie differences in electrophysiological function and arrhythmia susceptibility between men and women. Our results provide a molecular correlates for transmural differences in human cardiac repolarization and its modulation by gender, which may govern sex-differences in susceptibility to ventricular arrhythmias.

Methods

Human tissue samples

Non-diseased human hearts from organ donors were explanted to collect pulmonary and aortic valves for transplant surgery. Donors did not receive medication except for dobutamine, furosemide and plasma expanders. All investigations and procedures conformed to the principles outlined in the Helsinki Declaration of the World Medical Association. All experimental protocols for tissue procurement and handling were approved by the Ethical Review Board of the Medical Center of the University of Szeged (No. 51-57/1997 OEJ). Cardiac tissue dissected from 21 donor hearts (10 men, age 38.8±12 years; 11 women, age 44.5±14.2 years) were stored in cardioplegic solution at 4°C for 4-8 h before they were frozen in liquid nitrogen. Left and right epicardial and endocardial tissues were taken from the base. These regional samples were obtained by cutting 1-mm thick slices from the epicardial and endocardial surfaces, respectively.⁸ Left and right atrial (LA and RA) samples were dissected from the tip of the appendage.

All hearts sampled were macroscopically and microscopically normal. The lack of hypertrophy or failure was also confirmed biochemically by measuring the expression of atrial natriuretic factor (ANF) and verifying that ANF expression was not increased. Contamination of the samples by vascular vessels, neuronal tissue and fibroblasts was assessed by measuring the expression of calponin 1 (*CNN1*), ubiquitin thiolesterase (*UCHL1*) and collagen type VI $\alpha 1$ (*COL6A1*) respectively.

F.

G. RNA preparation

Total RNA from each cardiac sample was isolated and DNase-treated with the RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen) following manufacturer's instructions. The quality of total RNA was assessed with polyacrylamide-gel micro-electrophoresis (Agilent 2100 Bioanalyzer) and by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). The absence of genomic DNA contamination was verified by PCR.

H. TaqMan real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction

TaqMan low-density arrays (TLDA, Applied Biosystems) were used in a two-step RT-PCR process, as previously reported.⁹ Briefly, first-strand cDNA was synthesized from 2 μ g of total RNA using the High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). PCR reactions were

then performed on TLDA with the ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). The 384 wells of each card were pre-loaded with 96 x 4 pre-designed fluorogenic TaqMan probes and primers. Probes were labeled with the fluorescent reporter 6-carboxyfluorescein (FAM®, Applied Biosystems) at the 5'-end and with non-fluorescent quencher on the 3'-end. The genes selected for their cardiac expression (listed at <http://www.nantes.inserm.fr/u533/INDEX/>) encode 72 α - and β -ion channel subunits, 17 Na/K ATPase isoforms and proteins involved in calcium homeostasis, 3 hypertrophy markers (ANF, BNP, β -MHC) and 4 reference genes for normalization. Data were collected with instrument spectral compensation with Applied Biosystems SDS 2.1 software and analyzed with the threshold cycle (C_T) relative-quantification method.¹⁰ All fluorescent probes had 100% PCR efficiency (Applied Biosystems application note). This standardized method permits comparison of expression levels among cardiac compartments and among genes. We selected the hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (*HPRT*) gene as the internal standard for data normalization (ΔC_T indicates normalized data), as the most uniformly distributed gene in the heart. Ten genes with very low-level expression ($C_T > 32$) were eliminated for lack of reproducibility (*Cav γ 4*, *Cav γ 5*, *Cav γ 6*, *CFTR*, *Kv1.1*, *Kv2.2*, *Kv3.1*, *Kv3.2*, *Kir1.1* and *Nav1.4*).

Data were analyzed independently according to two distinct procedures: (i) Two-way hierarchical agglomerative clustering was applied to the gene-expression matrix consisting of 14 to 68 samples and the 79 genes with valid expression ($C_T < 32$) involved in electrical signaling. The input consisted of the ΔC_T for each gene and sample. We applied average linkage clustering with uncentered correlation using the Cluster program.¹¹ Clusters were visualized using the Treeview program; (ii) The relative expression of each gene *versus* *HPRT* ($2^{-\Delta C_T}$) was calculated in left and right epicardial and endocardial samples from each donor (data listed at <http://www.nantes.inserm.fr/u533/INDEX/>). We also investigated overall differences in gene expression between men and women. Gene expression was compared between matched right endocardial and epicardial samples from individual donors. Genes with statistically significant differential expression were identified with ANOVA in right ventricular matched samples and with unpaired Student t-tests in left ventricular unmatched samples ($p < 0.05$ considered significant).

Western Blot

Protein samples were extracted from 4 man and 4 woman donor tissue samples, as previously described.⁸ Proteins were fractionated on 12% SDS-polyacrylamide gels and transferred electrophoretically to Immobilon-P polyvinylidene fluoride membranes (Millipore). Membranes were blocked and incubated with antibodies. KChIP2 monoclonal antibody

(1:500) was a kind gift from Dr. James Trimmer (Davis, USA). IRX5 polyclonal antibody (1:1500) was a kind gift from Chi-chung Hui (Toronto, Canada). KvLQT1 and MinK polyclonal antibodies (1:200 dilution) were purchased from Alomone labs. Cx43 monoclonal antibody (1:5000 dilution) was purchased from Chemicon. Protein loading was controlled by probing with monoclonal anti-GAPDH antibody (1:5000, Research Diagnostics). After washing, membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit IgG secondary antibody (1:10 000, Santa Cruz). Bound antibodies were detected with Western Lightening Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin-Elmer Life Sciences). For each antibody, exposure times were similar for membranes containing epicardial and endocardial samples. Band densities were measured using Scion Image (Scion Corp.).

Results

Hierarchical clustering analysis

Two-way hierarchical clustering analysis groups samples according to gene-expression differences, with the most similar expression patterns located closest to each other and the most different patterns furthest apart. The process is unsupervised and therefore free from pre-conceived notions about expected differences. For visual appreciation, the samples are linked to a tree. The size of tree branches indicates the distance between clusters: longer branch lengths indicate greater separation among clusters. We aimed to establish whether hierarchical clustering could separate various ventricular compartments of males and females according to their gene-expression pattern. Because ventricular samples from different regions and genders did not show strong differences, we also analyzed atrial samples to control for the ability of the method to discriminate tissue compartments from these donors.

Hierarchical clustering analysis applied to 79 genes and to 68 atrial and ventricular samples (Figure 1) showed clear separation between atrial samples on one branch and ventricular samples on the other, demonstrating full discrimination of atrial from ventricular compartments based on the expression of genes involved in cardiac electrical activity. One clear gene cluster discriminated the atrial from ventricular samples, as shown in Figure 1. In contrast to the clear atrial-ventricular separation, samples from left- *versus* right-sided chambers did not separate. Similarly, epicardial and endocardial samples intermingled, with no distinct separation. This finding indicates that the number of ion-channel gene subunit expression differences is too small to discriminate left from right-sided and endocardial from epicardial tissues. The effects of donor gender on gene clustering are illustrated in Figure 2. Again, samples did not cluster according to gender for any of the ventricular tissue compartments studied. In summary, hierarchical clustering showed that although atrial and ventricular transcript expression patterns were clearly different, right-left, endocardial-epicardial and male-female dissimilarities were subtle and much weaker.

Transmural and gender-related gradients in ion channel gene expression

Figures 3 to 6 illustrate expression for individual ion channel transcripts selected on the basis of their relevance to transmural and gender-based differences. Right ventricular data are shown, along with detailed statistical analyses by the thick bars. Left ventricular data, which have very similar tendencies, are shown by thin bars but for the sake of visual clarity left ventricular statistical comparisons are not provided in the figures but rather in the figure legends. Among the α - and β -subunits involved in the generation of inward currents, Nav1.5 (*SCN5A*) is more strongly expressed in endocardial than epicardial samples but shows no significant differences in relation to gender (left upper and middle panels of Figure 3). An analysis of individual samples for Nav1.5 expression is shown in the upper left panel and illustrates the limited inter-individual variability in distribution, with only 1/14 individuals showing an atypical endocardial to epicardial gradient. Other genes with transmural gradients also showed limited inter-individual variability and for the sake of simplicity the individual data scatter plots are not provided for each gene.

Similar transmural differences were seen for the Ca^{2+} -channel regulator $\text{Cav}\alpha 2\delta 1$ and connexin 40. The L-type α -subunit $\text{Cav}1.2$ showed an opposite gradient, with smaller expression in endocardium. Connexin 43, the primary connexin in ventricular muscle, exhibited no transmural gradient.

Among K^+ -channel subunits (Figures 4 and 5), the only statistically-significant transmural gradients were seen for KChIP2 and $\text{Kv}4.2$ (stronger expression in epicardium) and $\text{Kv}1.4$ (stronger in endocardium). $\text{Kv}4.2$ expression was much weaker than that of $\text{Kv}4.3$, which showed no significant transmural gradient. Not illustrated are $\text{Kir}3.1$ (which expressed at very lower levels) and $\text{Kv}\beta 2$ transcripts, both of which showed a transmural gradient with stronger expression in the endocardium ($+531 \pm 230\%$, $P < 0.05$ and $+62 \pm 17\%$, $P < 0.01$, respectively) but no gender-related differences. Quite recently, the Iroquois transcription factor, IRX5, has been reported to control negatively transmural expression of $\text{Kv}4.2$ in rodents and thereby determine the epicardial/endocardial gradient for I_{to} .¹² We therefore investigated the expression of IRX3, IRX4 and IRX5 in the human ventricle. As shown in Figure 5, the abundance of IRX3 and IRX5, but not of IRX4 transcripts, inversely paralleled KChIP2 expression with stronger endocardial IRX3 and 5 expressions relative to epicardial.

With respect to ion transporter and pump subunits (Figure 6), only the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} transporter SERCA2 showed a transmural gradient, with stronger expression in the epicardium. Interestingly, the SERCA2 gradient paralleled that of the L-type Ca^{2+} -channel α -subunit, $\text{Cav}1.2$ (Figure 3).

There were no significant gender-related differences in the expression of inward current subunits (Figure 3). Statistically significant gender-based differences were seen among a variety of K^+ channel subunits (Figure 4). The inward rectifier $\text{Kir}6.2$ and its regulator SUR2 and also $\text{Kir}2.3$, which carries the cardiac I_{K1} current in combination with $\text{Kir}2.1$ and $\text{Kir}2.2$,¹³ and HERG were less expressed in tissues from women, in the absence of between-layer differences. $\text{Kv}1.4$, which underlies $I_{\text{to,slow}}$, showed lower expression in female endocardial tissue, as did the I_{Ks} subunit MinK. As for transmural expression gradients, IRX3 and 5 were more strongly expressed in female vs. male right epicardium, an expression opposite to that of KChIP2, which was more strongly expressed in males than females (Figure 5). A number of gender-determined differences were found among transcripts involved in Na^+ and Ca^{2+} homeostasis (Figure 6). Female hearts expressed Na^+/K^+ ATPase $\alpha 3$ subunits less strongly, but Na^+/Na^+ ATPase $\alpha 1$ and Ca ATPase 4 subunits more strongly than male. Phospholamban showed decreased expression, while calmodulin 3 showed increased expression, in female tissues.

In the left ventricle, genes whose products are involved in conduction, including Nav1.5, $\text{Cav}1.2$, Cx40, Cx43, and $\text{Cav}\alpha 2\delta 1$, showed very similar patterns of expression as

those seen in the right ventricle. In addition, Nav2.1 showed less expression in female epicardium ($41 \pm 6\%$ less than male, $P < 0.01$; not illustrated) but no transmural gradient. Among K⁺-channel α and β -subunits, Kir2.3, MinK and Kv1.4 also showed comparable profiles in the left ventricle to those seen in the right. Unlike the right ventricular results, Kir6.2 and SUR2 did not show clear gender-based expression differences in female left ventricles. Female hearts did show significantly weaker expression of KvLTQ1 (*KCNQ1*) in the left ventricular epicardium ($-25 \pm 5\%$, $P < 0.05$; not illustrated). TASK1 transcripts were $\approx$ 3-fold more abundant in woman left endocardium and epicardium. The left ventricle showed a similar gradient for KChIP2 between epicardium and endocardium as in right ventricle, but there was no influence of gender. As in the right ventricle, no gradient for Kv4.3 existed in the left ventricle.

In summary, Nav1.5, Cav1.2, Cav α 2 δ 1, Cx40, SERCA2, Kv1.4, Kv4.2 and KChIP2 showed an epicardium-endocardium gradient of expression both in the right and left ventricles. Among these genes, only KChIP2 and to a lesser extent Kv1.4 showed gender-related divergences. Cx43, Kir2.3, HERG, and MinK showed weaker expression in female ventricles that was consistent in both ventricular chambers, whereas Kir6.2 and SUR2 differences were seen predominantly on the right side and *KCNQ1* and TASK1 transcript differences on the left.

Protein correlates

Western-blot experiments (Figure 7) were conducted for selected ion-channel subunits. In agreement with transcriptional data, KChIP2 protein was more strongly expressed in epicardial than endocardial compartments. We also confirmed at the protein level the lower expression of KChIP2 in female epicardium. Inversely, IRX5 proteins were more abundant in the endocardium than in the epicardium, and in female *versus* male epicardium. The lower expression of KvLQT1 in female epicardium was also in accordance with its transcript profile. MinK and Cx43 proteins exhibit gender-differences in both epicardium and endocardium.

Discussion

In the present work, we provide the first detailed analysis of regional ion-channel gene distribution in the non-diseased human heart. While the atria exhibit very distinct patterns of ion-channel and transporter expression in comparison with the ventricle, the differences between the endocardium and the epicardium or between left and right side cavities or between male and female samples are subtle although potentially of major functional importance. This is consistent with the observation that only a few genes exhibit transmural gradient in pangenomic microarray experiments.¹⁴ Our data show that not only KChIP2, but also other genes, such as Cav1.2, Cav α 2 δ 1, Kv4.2 and Kv1.4, whose products are involved in repolarization phase, exhibit a transmural gradient. The most striking difference observed between male and female genders concerned the expression of KChIP2 in the right ventricle and lower expression in women of several K⁺-channel α - and β -subunits.

Correlation with previous work

Among the Na⁺ channel subunits, Nav1.5 transcripts showed higher expression in the endocardium, in accordance with a higher I_{Na} current density in canine endocardium.¹⁵ It is well-established that the epicardium expressed more transient outward current, I_{to}, than the endocardium and that this difference is key to create transmural repolarization heterogeneity in various species including human.^{16,17} In large mammals such as human and dog, Kv4.3 is the predominant I_{to}-encoding α -subunit in the heart,^{18,19} and a gradient of its regulator KChIP2 may be related to the graded expression of I_{to}.^{20,21} Accordingly, we found that KChIP2 is by far more expressed in the human epicardium layer, whereas Kv4.3 transcripts are homogeneously distributed. On the other hand, the α -subunit Kv1.4 associated with the slow outward current I_{to,slow} is more abundant in the endocardium. This molecular portrait correlates with functional studies showing larger I_{to,fast} current in human epicardium cells and larger I_{to,slow} in endocardium cells.²² In mice and rats, regional heterogeneity of I_{to} in the ventricles parallels that of Kv4.2.²³ Most recently, Constantini *et al.*¹² showed that mice lacking the homeodomain transcription factor IRX5 exhibit no cardiac repolarization gradient because of an increased Kv4.2 expression in the endocardium. These authors proposed that IRX5 acts as a repressor to negatively regulate Kv4.2 α -subunit gene expression in the heart, forming an inverse I_{to} gradient that ensures coordinated cardiac repolarization. In the human ventricle, we observed that the expression of IRX5, but also IRX3, inversely mirrors the expression of KChIP2 but not of Kv4.2 or Kv4.3. In contrast, we found no epicardium-endocardium gradient or gender-differences for IRX4 expression. Our data suggest that negative transcriptional regulation of KChIP2 may occur *via* IRX3 and/or IRX5, although this notion requires further assessment.

The cardiac inward rectifier I_{K1} is thought to represent a combination of currents 1 outward component of I_{K1} has a larger density in myocytes from male than female hearts.²⁴ Male myocytes from guinea pig also show significantly larger inward I_{K1} density than female myocytes.²⁵ These data are consistent with our observation of a lower expression of Kir2.3 in female epicardium and endocardium of both the right and left ventricles. As for I_{K1} , the density of the delayed rectifier I_{Kr} is larger in myocytes isolated from male rabbits and guinea pigs compared to females.^{24,25} This correlates with lower expression of HERG transcripts that we observed in female ventricles. Our results for MinK (*KCNE1*) and SUR2 oppose previous observations in animals. Drici *et al.*²⁶ found 2-fold greater expression of *KCNE1* mRNA in hearts from adult female mice. Similarly, guinea-pig female hearts showed significantly greater expression of mRNA and protein for the cardiac sulphonylurea receptor isoform.²⁷ In agreement with previous findings,²⁸ we observed that the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 (SERCA2) responsible for intracellular Ca^{2+} uptake is predominantly expressed in epicardium. Consistently, epicardial cells exhibit fastest relaxation rate of the ventricular wall.²⁹

Our data suggest that the transcription of various K^+ -channel α - and β -subunits may be controlled by gonadal steroid hormones. Binding of these hormones to their receptor proteins catalyzes transcription of the target gene. To date, this process has been brought to light for the rat *CACNA1C* (Cav1.2) gene³⁰ and suggested for the human *CACNA1C*, *SCN5A* and *KCNJ11* (Kir6.2) genes.³¹ However, direct binding of the hormone receptors on their promoters have not yet been shown.

Potential pathophysiological significance

The Brugada syndrome is a genetically-inherited syndrome leading to sudden cardiac deaths in the absence of structural heart disease.^{3,4,32} The disease has been linked to the *SCN5A* gene in $\approx 20\%$ of Brugada syndrome cases.³³ Despite equal inheritance of Brugada syndrome between males and females, there is a clear male predominance in phenotype and symptoms.^{34,35} In some areas of East Asia where the disease is prevalent, the ratio of male to female Brugada patients is as high as 8:1.³⁵ The most commonly accepted pathophysiological basis for the Brugada syndrome involves the larger $I_{to,fast}$ in the epicardium and associated risk of early repolarization causing loss of the action potential dome and marked abbreviation of the action potential duration, potentially leading to phase 2 re-entry and sudden death.⁴ Agents that either inhibit inward currents (I_{Na} or I_{Ca} currents) or increase outward currents (e.g. pinacidil acting on Kir6.2 channels) can experimentally provoke the phenotype.³ Using the canine arterially perfused ventricular wedge preparation, Di Diego *et al.*³⁶ suggest that the gender difference in penetrance of the Brugada syndrome is caused by a more prominent I_{to} -mediated action potential notch in the right epicardium of

males *versus* females. Our data in human parallel and support Di Diego's observations in dogs, since we found significantly lesser expression of KChIP2 in the right epicardium in women in comparison to men. Thus, the reduced I_{Na} density of Brugada patients would more likely lead to premature repolarization in the right epicardium in males than in females.³⁷ In addition, decreased *SCN5A* expression in the epicardium may facilitate premature repolarization in the case of reduced *SCN5A* (I_{Na}) channel function resulting from gene mutations.

The pathophysiological mechanism of the Brugada syndrome is considered primarily located in the right ventricle.³⁸ We found that female hearts have less repolarizing current transcripts (KChIP2, HERG, Kir2.3, Kir6.2, SUR2) in the right ventricle than men. Thus, women may be less prone to premature repolarization in the right epicardium. We found no gender-related differences in epicardial KChIP2 expression in the left ventricle, in agreement with lack of sex differences in left epicardial phase 1 repolarization or I_{to} density in dog.³⁶ Importantly, we found gender-related differences in the right ventricle (KChIP2, Kir6.2, SUR2) that do not exist in the left ventricle.

Our laboratory has previously reported in a large French family, that the same *SCN5A* mutation (G1406R) principally causes Brugada syndrome in men and progressive cardiac conduction defect (Lenègre disease) in women.³⁹ Because women have less KChIP2 and less repolarizing channel transcripts in their right ventricular epicardium, they would be expected to manifest primarily direct consequences of reduced I_{Na} current like conduction defects⁴⁰ rather than arrhythmias due to large outward currents in the face of reduced I_{Na} . The female susceptibility to conduction disease may be aggravated by the reduced Cx43 expression that we noted in female hearts.

Study limitations

Transcripts do not necessarily translate into functional proteins, and although transcriptional regulation of ion channel expression is a key regulatory mechanism,⁴¹ other translational and post-translational processes should clearly play a role. Transcriptional regulation is an efficient mechanism to control precisely and specifically channel activity. We did verify protein expression differences for several genes and found that they paralleled transcript differences. No technology is currently available to explore on a large-scale the expression of a collection of membrane proteins and this is the subject of active research in the field of proteomics. Another important limitation issues from the precise locations from which samples were collected. Heterogeneous expression may very well exist between the base and the apex of the ventricle. Finally, targeting of ion channel proteins in the different subcellular compartments is key to their function and cannot be assessed by our global analysis. In spite of these limitations, genomics represents a powerful means to promote our

understanding of the potential molecular mechanisms underlying clinically significant functional cardiac properties.

Transmural heterogeneity in cellular electrical activity is not restricted to endocardium and epicardium cells but also includes M-cells in the mid-myocardial layers, which AP becomes much prolonged at slow heart rate. M-cells were first reported in dogs by Sicouri and Antzelevitch⁴² and later by our group in the human ventricle.⁴³ However, because the influence of M-cells depends on the degree of electrotonic coupling, the functional significance of M-cells has been the subject of some debate.^{44,45} In addition, M-cells do not appear in the depth of the ventricle as a continuous layer but rather as patchy isolates of cardiac myocytes.⁴⁶ It is thus difficult to define a discrete M cell area by anatomical dissection alone, as would be needed for our molecular analyses.

Acknowledgments

Supported by special grants from Ouest Genopole, Ministère Français de la Recherche (ACI), the Leducq Foundation, Canadian Institutes of Health Research, INSERM-FRSQ and Bio-37 KPI. SD holds a tenure position from the French CNRS. The authors wish to thank Miklos Bitay, Jean-Marie Heslan and Marie-Jo Louerat for their excellent technical assistance.

References

1. Schram G, Pourrier M, Melnyk P, Nattel S. Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. *Circ Res*. 2002;90:939-950.
2. Franz MR, Bargheer K, Rafflenbeul W, Haverich A, Lichtlen PR. Monophasic action potential mapping in human subjects with normal electrocardiograms: direct evidence for the genesis of the T wave. *Circulation*. 1987;75:379-386.
3. Antzelevitch C, Fish J. Electrical heterogeneity within the ventricular wall. *Basic Res Cardiol*. 2001;96:517-527.
4. Antzelevitch C, Brugada P, Brugada J, Brugada R, Towbin JA, Nademanee K. Brugada syndrome: 1992-2002: a historical perspective. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:1665-1671.
5. Stramba-Badiale M, Locati EH, Martinelli A, Courville J, Schwartz PJ. Gender and the relationship between ventricular repolarization and cardiac cycle length during 24-h Holter recordings. *Eur Heart J*. 1997;18:1000-1006.
6. James AF, Choisy SC, Hancox JC. Recent advances in understanding sex differences in cardiac repolarization. *Prog Biophys Mol Biol*. 2005 (*in press*).
7. DeFranco DB. Regulation of steroid receptor subcellular trafficking. *Cell Biochem Biophys*. 1999;30:1-24.
8. Zicha S, Xiao L, Stafford S, Cha TJ, Han W, Varro A, Nattel S. Transmural expression of transient outward potassium current subunits in normal and failing canine and human hearts. *J Physiol*. 2004;561:735-748.
9. Marionneau C, Couette B, Liu J, Li H, Mangoni ME, Nargeot J, Lei M, Escande D, Demolombe S. Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart. *J Physiol*. 2005;562:223-234.
10. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25:402-408.

11. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:14863-14868.
12. Costantini DL, Arruda EP, Agarwal P, Kim KH, Zhu Y, Zhu W, Lebel M, Cheng CW, Park CY, Pierce SA, Guerchicoff A, Pollevick GD, Chan TY, Kabir MG, Cheng SH, Husain M, Antzelevitch C, Srivastava D, Gross GJ, Hui CC, Backx PH, Bruneau BG. The homeodomain transcription factor *Irx5* establishes the mouse cardiac ventricular repolarization gradient. *Cell*. 2005;123:347-358.
13. Dhamoon AS, Pandit SV, Sarmast F, Parisian KR, Guha P, Li Y, Bagwe S, Taffet SM, Anumonwo JM. Unique Kir2.x properties determine regional and species differences in the cardiac inward rectifier K⁺ current. *Circ Res*. 2004;94:1332-1339.
14. Rosati B, Grau F, McKinnon D. Regional variation in mRNA transcript abundance within the ventricular wall. *J Mol Cell Cardiol*. 2006;40:295-302.
15. Ashamalla SM, Navarro D, Ward CA. Gradient of sodium current across the left ventricular wall of adult rat hearts. *J Physiol*. 2001;536:439-443.
16. Wettwer E, Amos GJ, Posival H, Ravens U. Transient outward current in human ventricular myocytes of subepicardial and subendocardial origin. *Circ Res*. 1994;75:473-482.
17. Li GR, Feng J, Yue L, Carrier M. Transmural heterogeneity of action potentials and I_{to1} in myocytes isolated from the human right ventricle. *Am J Physiol*. 1998;275:H369-H377.
18. Nerbonne JM, Guo W. Heterogeneous expression of voltage-gated potassium channels in the heart: roles in normal excitation and arrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2002;13:406-409.
19. Dixon JE, Shi W, Wang HS, McDonald C, Yu H, Wymore RS, Cohen IS, McKinnon D. Role of the Kv4.3 K⁺ channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current. *Circ Res*. 1996;79:659-668.

20. Deschenes I, Tomaselli GF. Modulation of Kv4.3 current by accessory subunits. *FEBS Lett.* 2002;528:183-188.
21. Rosati B, Pan Z, Lypen S, Wang HS, Cohen I, Dixon JE, McKinnon D. Regulation of KChIP2 potassium channel beta subunit gene expression underlies the gradient of transient outward current in canine and human ventricle. *J Physiol.* 2001;533:119-125.
22. Kaab S, Nabauer M. Diversity of ion channel expression in health and disease. *Eur Heart J Supplements.* 2001;3:K31-K40.
23. Guo W, Li H, Aimond F, Johns DC, Rhodes KJ, Trimmer JS, Nerbonne JM. Role of heteromultimers in the generation of myocardial transient outward K⁺ currents. *Circ Res.* 2002;90:586-593.
24. Liu XK, Katchman A, Drici MD, Ebert SN, Ducic I, Morad M, Woosley RL. Gender difference in the cycle length-dependent QT and potassium currents in rabbits. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;285:672-679.
25. James AF, Arberry LA, Hancox JC. Gender-related differences in ventricular myocyte repolarization in the guinea pig. *Basic Res Cardiol.* 2004;99:183-192.
26. Drici MD, Baker L, Plan P, Barhanin J, Romey G, Salama G. Mice display sex differences in halothane-induced polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation.* 2002;106:497-503.
27. Ranki HJ, Budas GR, Crawford RM, Jovanovic A. Gender-specific difference in cardiac ATP-sensitive K(+) channels. *J Am Coll Cardiol.* 2001;38:906-915.
28. Prestle J, Dieterich S, Preuss M, Bieligg U, Hasenfuss G. Heterogeneous transmural gene expression of calcium-handling proteins and natriuretic peptides in the failing human heart. *Cardiovasc Res.* 1999;43:323-331.
29. Cordeiro JM, Greene L, Heilmann C, Antzelevitch D, Antzelevitch C. Transmural heterogeneity of calcium activity and mechanical function in the canine left ventricle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286:H1471-H1479.

30. Liu L, Fan QI, El-Zaru MR, Vanderpool K, Hines RN, Marsh JD. Regulation of DHP receptor expression by elements in the 5'-flanking sequence. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;278:H1153-H1162.
31. Borlak J, Thum T. Hallmarks of ion channel gene expression in end-stage heart failure. *FASEB J*. 2003;17:1592-1608.
32. Brugada P, Brugada J, Brugada R. The Brugada syndrome. *Card Electrophysiol Rev*. 2002;6:45-48.
33. Smits JP, Eckardt L, Probst V, Bezzina CR, Schott JJ, Remme CA, Haverkamp W, Breithardt G, Escande D, Schulze-Bahr E, LeMarec H, Wilde AA. Genotype-phenotype relationship in Brugada syndrome: electrocardiographic features differentiate SCN5A-related patients from non-SCN5A-related patients. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40:350-356.
34. Priori SG, Napolitano C, Gasparini M, Pappone C, Della Bella P, Giordano U, Bloise R, Giustetto C, De Nardis R, Grillo M, Ronchetti E, Faggiano G, Nastoli J. Natural history of Brugada syndrome: insights for risk stratification and management. *Circulation*. 2002;105:1342-1347.
35. Wilde AA, Antzelevitch C, Borggrefe M, Brugada J, Brugada R, Brugada P, Corrado D, Hauer RN, Kass RS, Nademanee K, Priori SG, Towbin JA; Study Group on the Molecular Basis of Arrhythmias of the European Society of Cardiology. Proposed diagnostic criteria for the Brugada syndrome: consensus report. *Circulation*. 2002;106:2514-2519.
36. Di Diego JM, Cordeiro JM, Goodrow RJ, Fish JM, Zygmunt AC, Perez GJ, Scornik FS, Antzelevitch C. Ionic and cellular basis for the predominance of the Brugada syndrome phenotype in males. *Circulation*. 2002;106:2004-2011.
37. Antzelevitch C. Androgens and male predominance of the Brugada syndrome phenotype. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2003;26:1429-1431.
38. Antzelevitch C, Brugada P, Brugada J, Brugada R, Shimizu W, Gussak I, Perez Riera AR. Brugada syndrome: a decade of progress. *Circ Res*. 2002;91:1114-1118.

39. Kyndt F, Probst V, Potet F, Demolombe S, Chevallier JC, Baro I, Moisan JP, Boisseau P, Schott JJ, Escande D, Le Marec H. Novel SCN5A mutation leading either to isolated cardiac conduction defect or Brugada syndrome in a large French family. *Circulation*. 2001;104:3081-3086.
40. Probst V, Allouis M, Sacher F, Pattier S, Babuty D, Mabo P, Mansourati J, Victor J, Nguyen JM, Schott JJ, Boisseau P, Escande D, Le Marec H. Progressive cardiac conduction defect is the prevailing phenotype in carriers of a brugada syndrome SCN5A mutation. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2006; *in press*
41. Rosati B, McKinnon D. Regulation of ion channel expression. *Circ Res*. 2004;94:874-883.
42. Sicouri S, Antzelevitch C. A subpopulation of cells with unique electrophysiological properties in the deep subepicardium of the canine ventricle. The M cell. *Circ Res*. 1991;68:1729-1741.
43. Drouin E, Charpentier F, Gauthier C, Laurent K, Le Marec H. Electrophysiologic characteristics of cells spanning the left ventricular wall of human heart: evidence for presence of M cells. *J Am Coll Cardiol*. 1995;26:185-192.
44. Ueda N, Zipes DP, Wu J. Functional and transmural modulation of M cell behavior in canine ventricular wall. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287:H2569-H2575.
45. Bauer A, Becker R, Freigang KD, Senges JC, Voss F, Hansen A, Muller M, Lang HJ, Gerlach U, Busch A, Kraft P, Kubler W, Schols W. Rate- and site-dependent effects of propafenone, dofetilide, and the new I(Ks)-blocking agent chromanol 293b on individual muscle layers of the intact canine heart. *Circulation*. 1999;100:2184-2190.
46. Akar FG, Yan GX, Antzelevitch C, Rosenbaum DS. Unique topographical distribution of M cells underlies reentrant mechanism of torsade de pointes in the long-QT syndrome. *Circulation*. 2002;105:1247-1253.

Figure legends

Figure 1: **Two-way hierarchical agglomerative clustering applied to 79 genes (vertically) and to 12 left and right atria (LA and RA) and 28 left epicardium (Lepi) and left endocardium (Lendo) and 28 right epicardium (Repi) and right endocardium (Rendo; horizontally) samples.** The input consisted of the ratio for each patient and gene *versus* the reference gene. Each gene is represented by a single row of colored boxes and each patient (individualized by Roman numbers) by a single column. Epicardial samples are indicated in blue. The entire gene clustering is shown on the left. Selected gene cluster is shown on the right, containing relevant genes for atrial *versus* ventricle discrimination. Each color patch in the map represents the gene expression level in one sample, with expression levels ranging from dark green (lowest) to bright red (highest). Missing values are coded as silver.

Figure 2: **Two-way hierarchical agglomerative clustering applied to 79 genes (horizontally) and to left epicardium, left endocardium, right epicardium and right endocardium from 7 women and 7 men (vertically).** Same format as in Figure 1. Samples from women are indicated in red whereas samples from men are indicated in black.

Figure 3: **Expression profile of Na⁺, Ca²⁺ and Cx channel genes associated with epicardium/endocardium gradient and/or gender differences.** Individual variability for Nav1.5 is shown in the top left panel. Bar graphs show transcript expression in the right epicardium and endocardium from man (black) and woman (grey) samples. Data from the left ventricle are represented by narrow white bars. In this figure as in Figures 4-6, data are expressed as arbitrary units normalized to *HPRT* and are mean $\pm$ SEM from 7 donors. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ *versus* epicardium. a: $p < 0.05$ *versus* women. For clarity, statistics for left ventricle expression are not illustrated. Left male endocardium: Nav1.5, $p < 0.05$; Cav1.2, $p < 0.05$; Cav α 2 δ 1, $p < 0.05$; Cx40, $p < 0.01$ vs epicardium. Left female endocardium: Nav1.5, $p < 0.05$ vs epicardium. Left male epicardium: Cav α 2 δ 1, $p < 0.01$; Cx40, $p < 0.05$; Cx43, $p < 0.05$ vs female epicardium. Left male endocardium: Cx43, $p < 0.05$ vs female endocardium.

Figure 4: **Expression profile of K⁺ channel α - and β -subunit genes.** Same format as in Figure 3. b: $p < 0.01$ *versus* women. Left male endocardium: Kv1.4, $p < 0.01$ vs epicardium. Left female endocardium: Kv1.4, $p < 0.05$; Kir2.3, $p < 0.01$ vs epicardium. Left male epicardium:

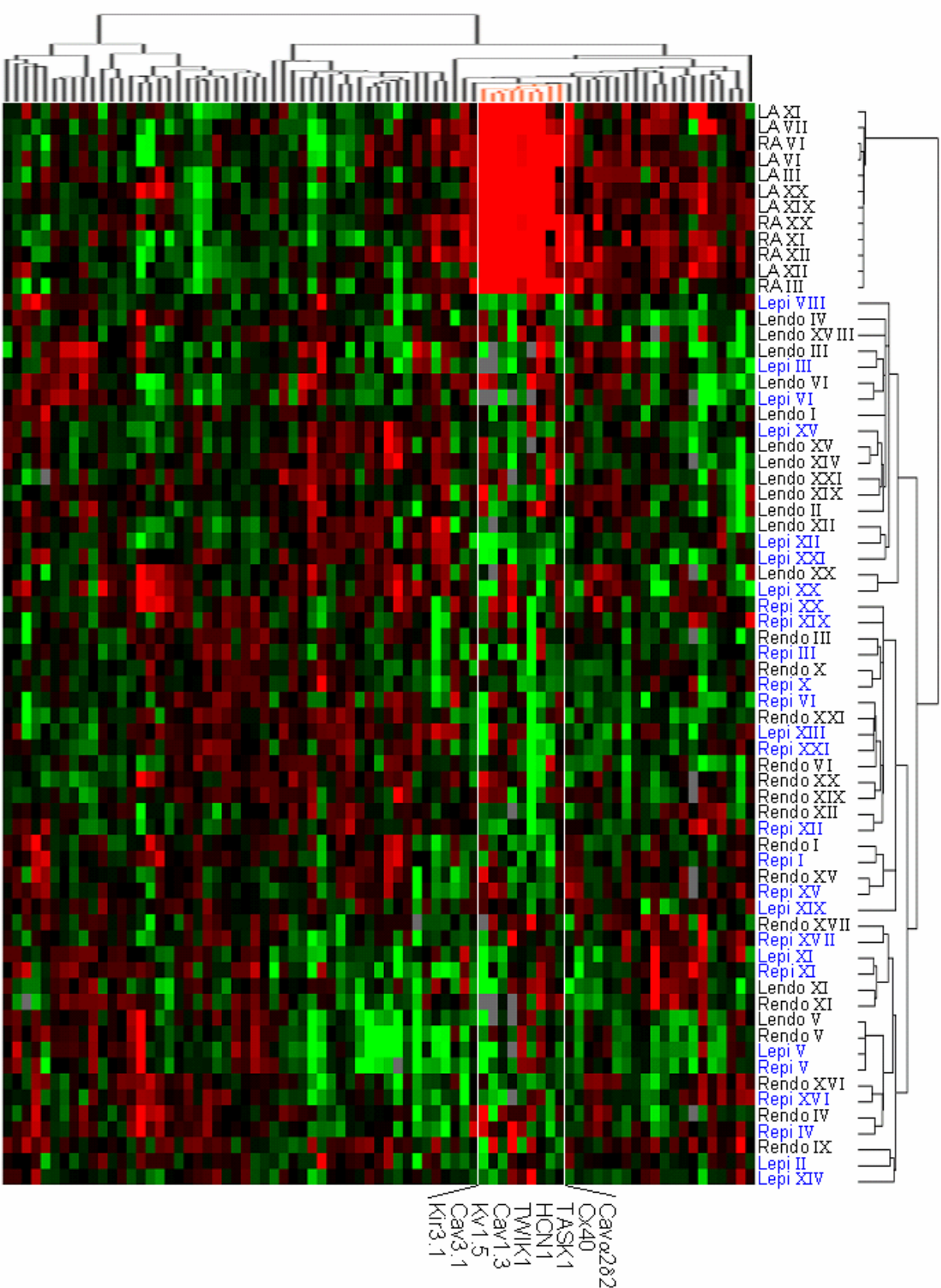
Kir2.3, $p < 0.001$; HERG, $p < 0.05$; MinK, $p < 0.01$; Kv1.4, $p < 0.01$ vs female epicardium. Left male endocardium: Kir2.3, $p < 0.05$; MinK, $p < 0.01$; Kv1.4, $p < 0.05$ vs female endocardium.

Figure 5: **Expression profile of Ito-encoding K⁺-channel subunits and the Iroquois transcription factors (IRX3, IRX4 and IRX5).** Same format as in Figures 3 and 4. c: $p < 0.001$ versus women. Left male endocardium: KChIP2, $p < 0.001$; IRX3, $p < 0.001$; IRX5, $p < 0.001$ vs epicardium. Left female endocardium: KChIP2, $p < 0.01$; IRX3, $p < 0.001$; IRX5, $p < 0.01$; Kv4.2, $p < 0.05$ vs epicardium. Left male epi- and endocardium: IRX4, $p < 0.01$ vs female epi- and endocardium.

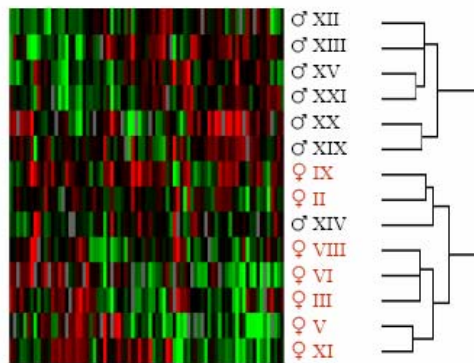
Figure 6: **Expression profile of intracellular calcium regulators.** SERCA2 indicates the sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase type 2, PLN, phospholamban, CALM3, calmodulin 3. Same format as in Figures 3-5. Left male and female endocardium: SERCA2, $p < 0.05$ vs epicardium. Left male epicardium: Na/K ATPase $\alpha 1$, $p < 0.001$; Na/K ATPase $\alpha 3$, $p < 0.01$; Ca ATPase $\beta 4$, $p < 0.05$; SERCA2, $p < 0.05$; CALM3, $p < 0.01$ vs female epicardium. Left male endocardium: Na/K ATPase $\alpha 1$, $p < 0.01$; Na/K ATPase $\alpha 3$, $p < 0.01$; PLN, $p < 0.05$; CALM3, $p < 0.01$ vs female endocardium.

Figure 7: **Western-blot analysis of key proteins.** *Left:* representative Western blots probed with anti-KChIP2, anti-IRX5, anti-KvLQT1, anti-MinK and anti-Cx43 antibodies. GAPDH is shown as loading control. Expected molecular masses are indicated. *Right:* quantification of Western blots versus GAPDH expressed in arbitrary units (n=4).

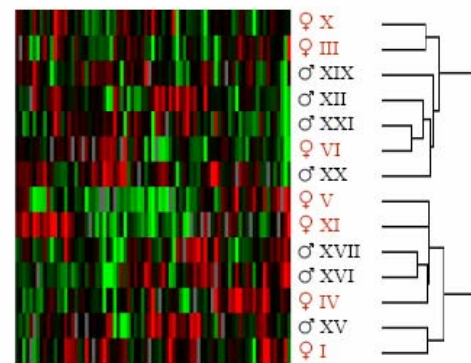
Figure 1



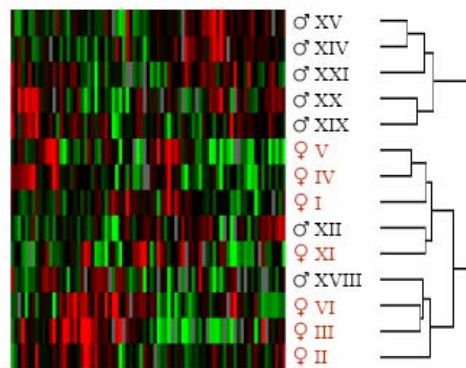
Left epicardium



Right epicardium



Left endocardium



Right endocardium

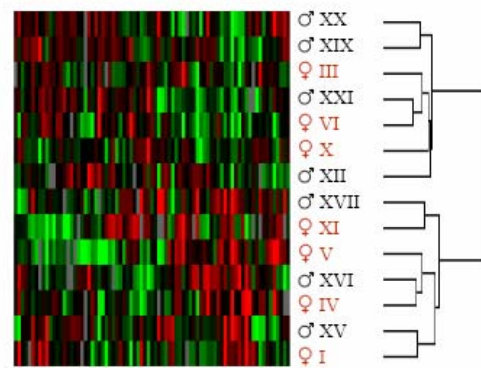
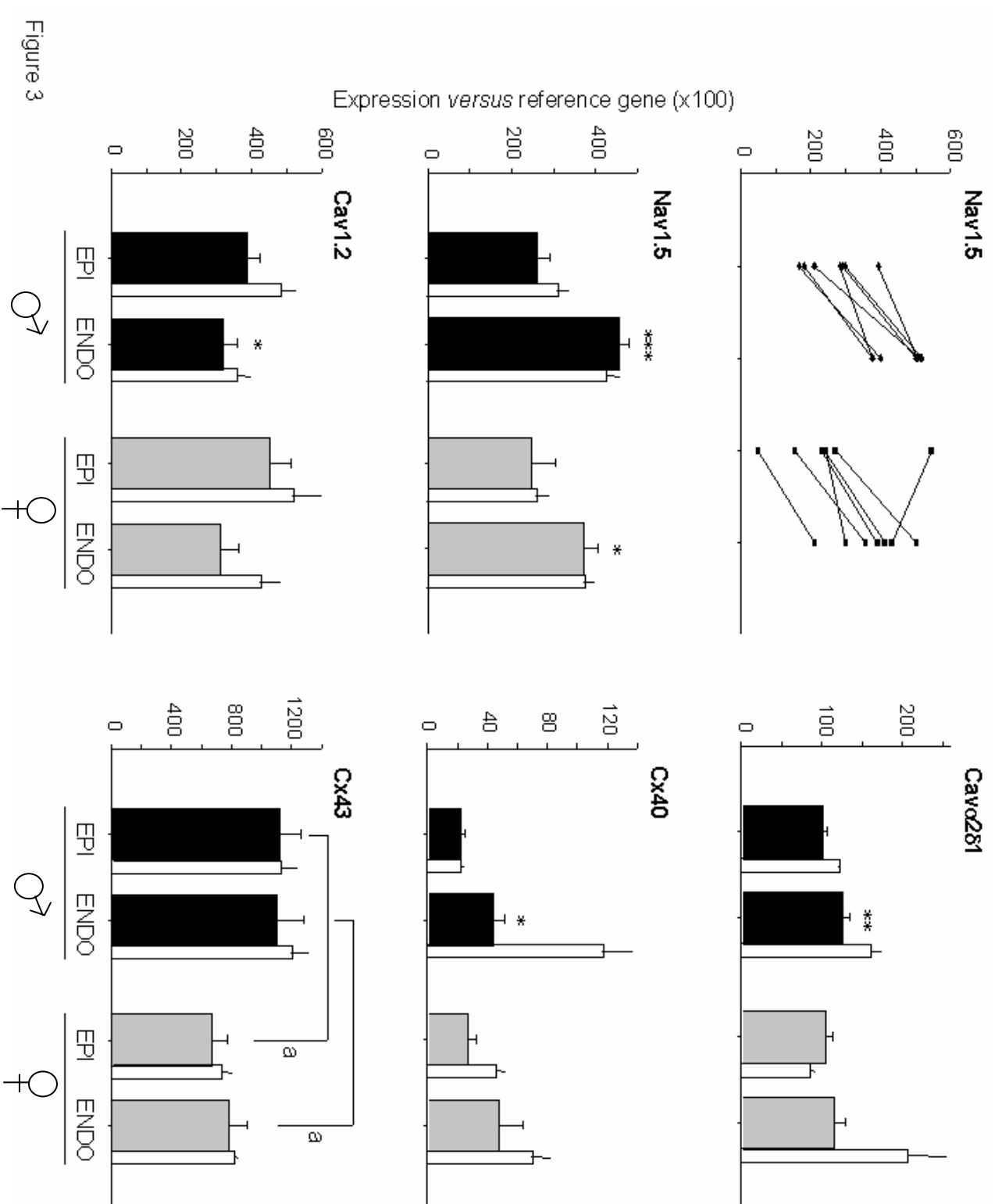


Figure 2



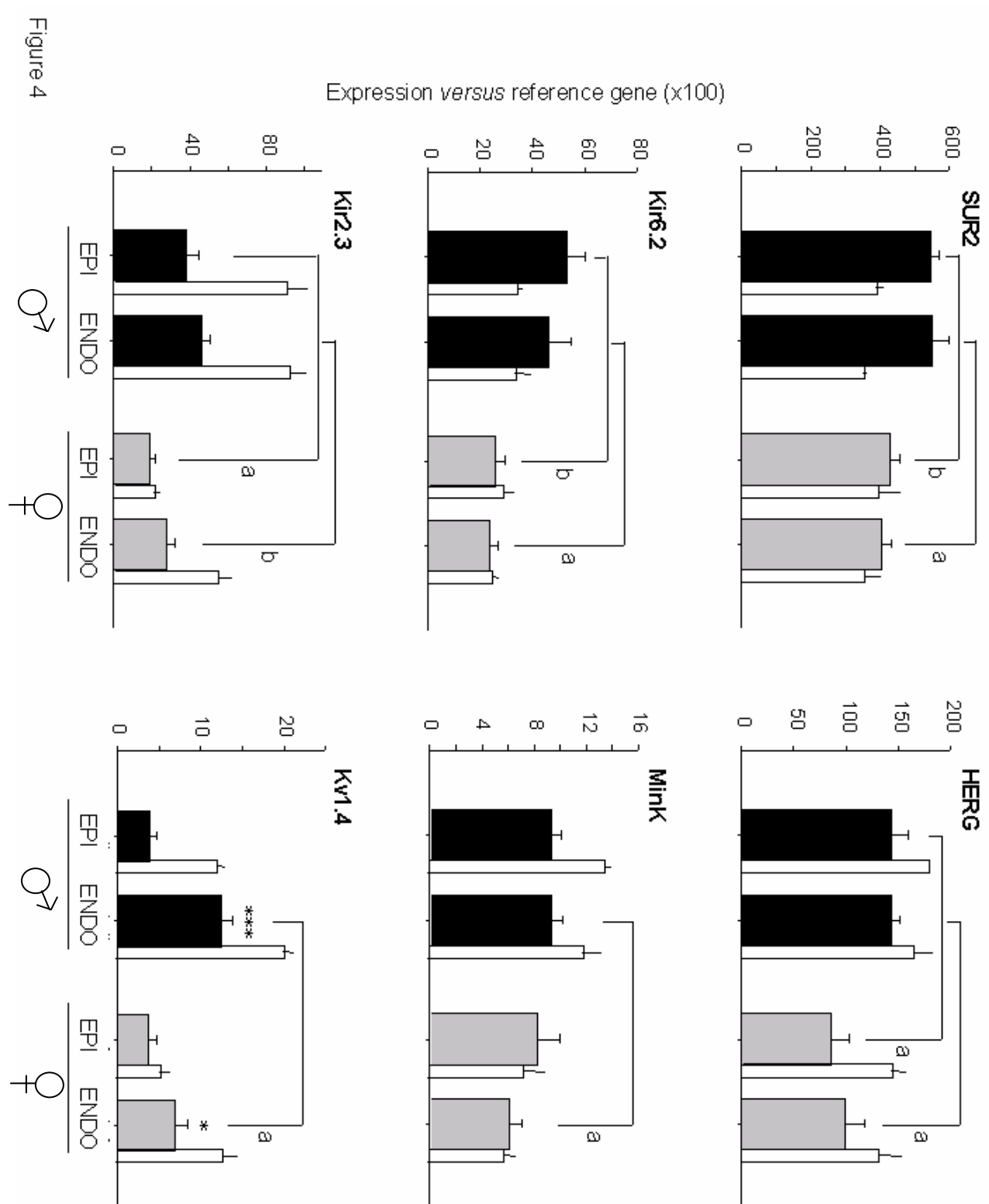
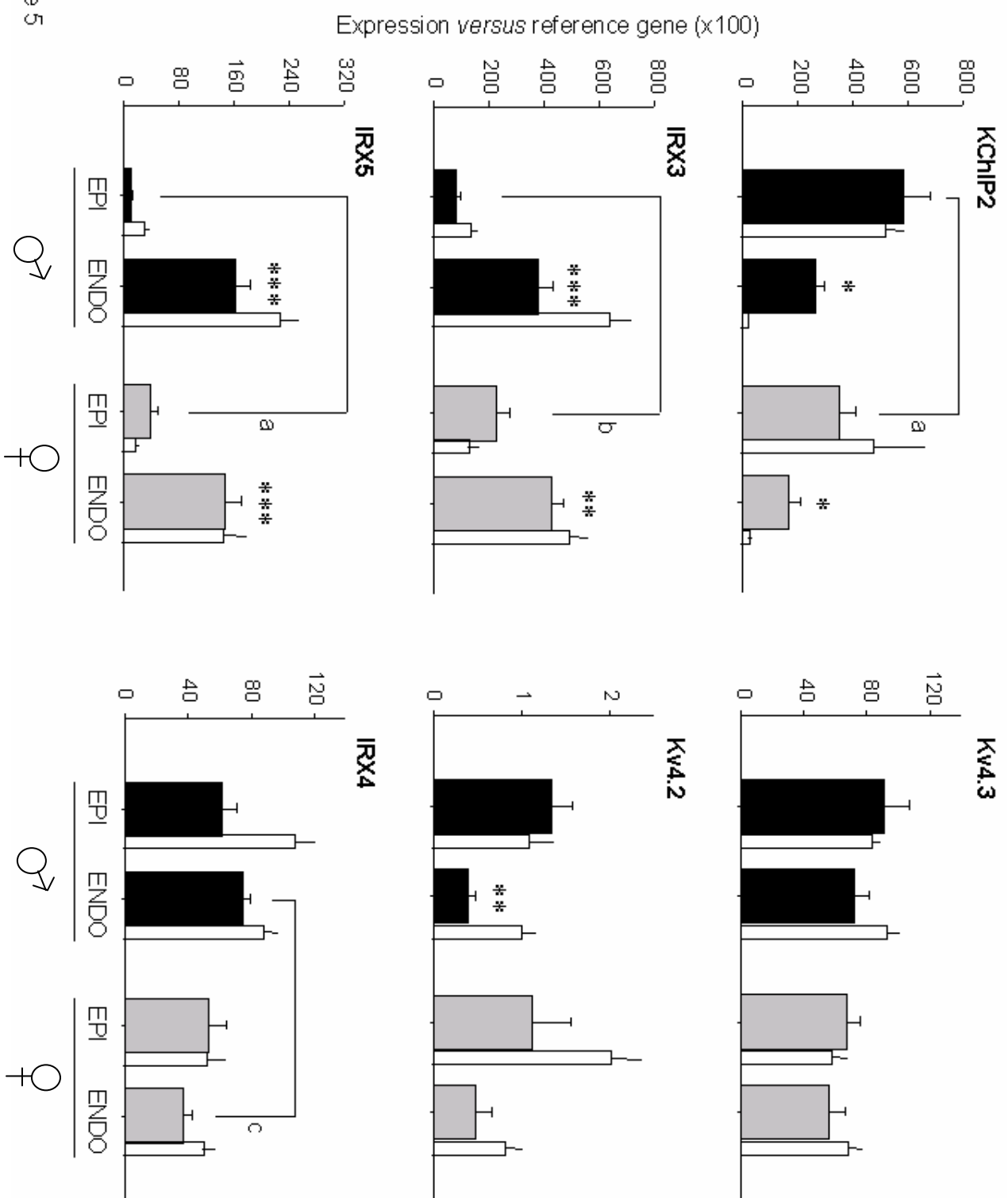


Figure 4

Figure 5



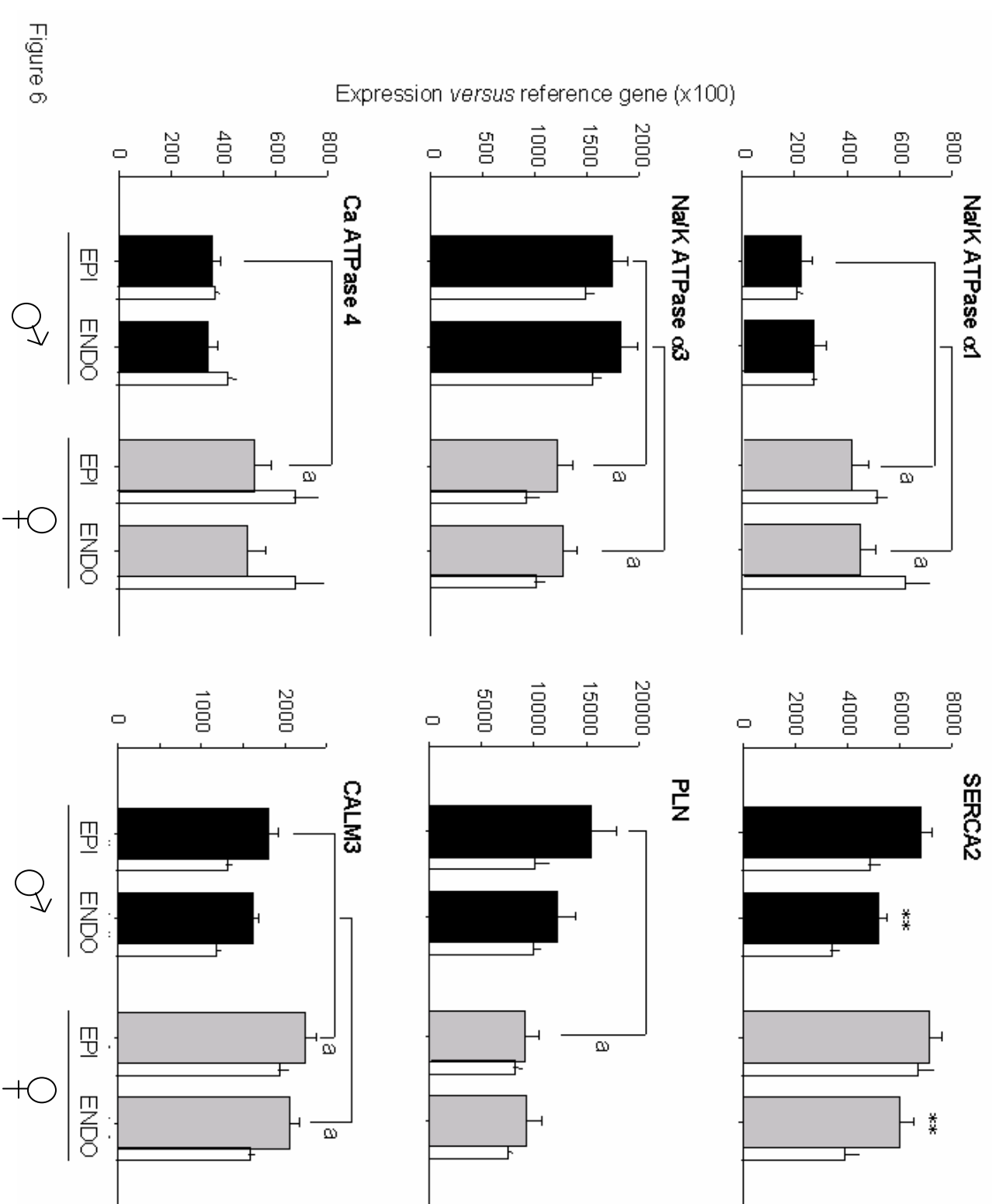


Figure 6

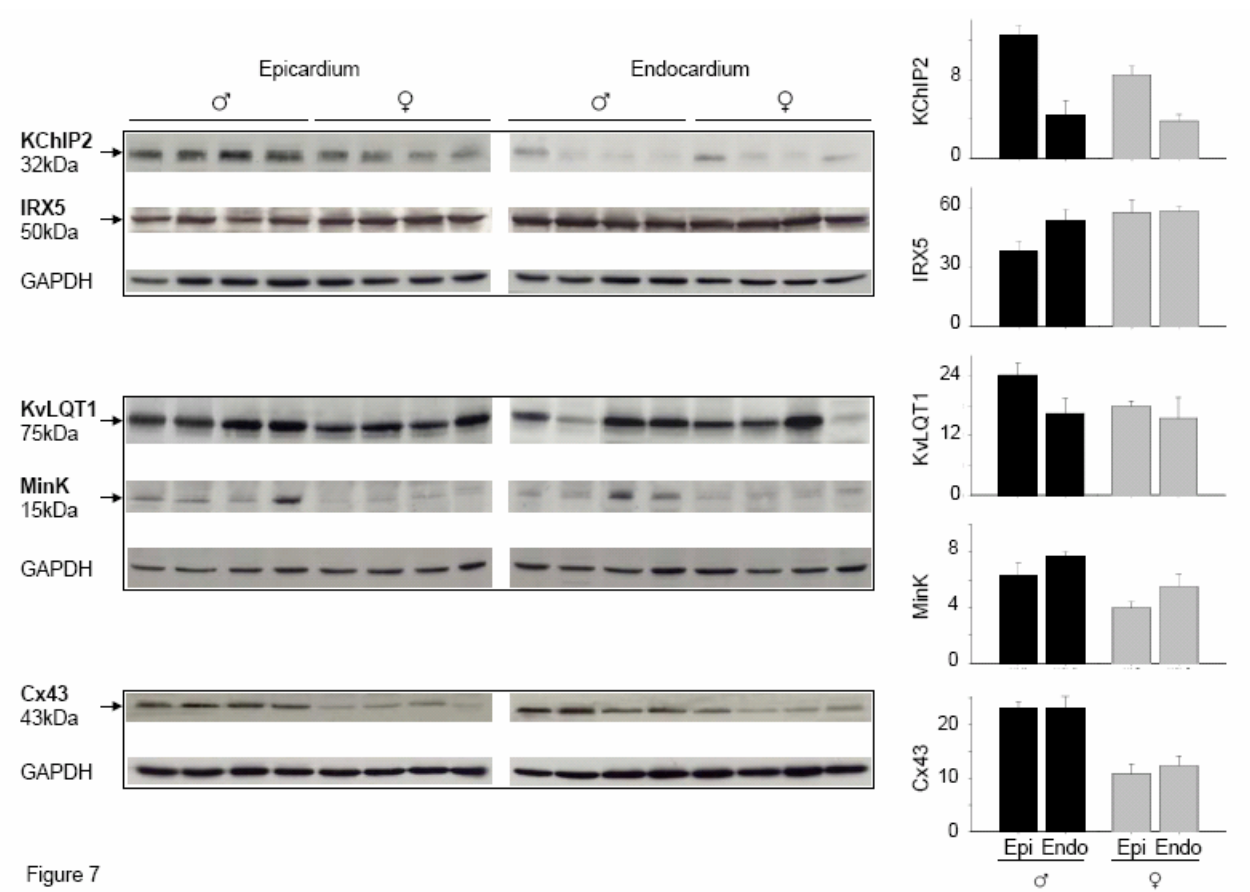


Figure 7

Gene Symbol	Gene Name		NCBI Gene Ref	Chromosome	Assay ID	Target Exons	Category
18S RNA	18S RNA	Eukaryotic 18s rRNA	X03205	9	4342379-18S	N/A	endogenous control
ABCC8	SUR1	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 8	NM_000352,U63421	11	Hs00165861_m1	16	K ⁺ channel
ABCC9	SUR2	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 9	NM_005691,NM_020	12	Hs00245832_m1	28	K ⁺ channel
ATP1A1	Na/K-ATPase α 1	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 1 polypeptide	NM_001001586,NM_	1	Hs00167556_m1	15	Na ⁺ /K ⁺ ATPase
ATP1A3	Na/K-ATPase α 3	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 3 polypeptide	NM_152296,BC0092	19	Hs00265163_m1	N/A	Na ⁺ /K ⁺ ATPase
ATP1B1	Na/K-ATPase β 1	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 1 polypeptide	NM_001001787,NM_	1	Hs00426868_g1	5	Na ⁺ /K ⁺ ATPase
ATP2A2	SERCA2	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2	NM_001681,M23115	12	Hs00155939_m1	20	Ca ⁺⁺ regulator
ATP2A3	SERCA3	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, ubiquitous	NM_174953,NM_174	17	Hs00193090_m1	17	Ca ⁺⁺ regulator
ATP2B1	Ca ATPase 1	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 1	NM_001001323,NM_	12	Hs00155949_m1	11	Ca ⁺⁺ regulator
ATP2B4	Ca ATPase 4	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 4	NM_001001396,NM_	1	Hs00608066_m1	1	Ca ⁺⁺ regulator
CACNA1C	Cav1.2	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit	NM_000719,L29529,	12	Hs00167681_m1	2	Ca ⁺⁺ channel
CACNA1D	Cav1.3	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit	NM_000720,M83566	3	Hs00167753_m1	47	Ca ⁺⁺ channel
CACNA1G	Cav3.1	calcium channel, voltage-dependent, alpha 1G subunit	NM_018896,NM_198	17	Hs00367969_m1	4	Ca ⁺⁺ channel
CACNA1H	Cav3.2	calcium channel, voltage-dependent, alpha 1H subunit	NM_021098,AF0519,	16	Hs00234934_m1	1	Ca ⁺⁺ channel
CACNA2D1	Cav α 2 δ 1	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 1	NM_000722,M76559	7	Hs00167808_m1	13	Ca ⁺⁺ channel
CACNA2D2	Cav α 2 δ 2	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 2	NM_006030,AB0111	3	Hs00195772_m1	6	Ca ⁺⁺ channel
CACNB2	Cav β 2	calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit	NM_201593,NM_201	10	Hs00167861_m1	9	Ca ⁺⁺ channel
CACNG4	Cav γ 4	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 4	NM_014405,AF1626	17	Hs00205244_m1	2	Ca ⁺⁺ channel
CACNG5	Cav γ 5	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 5	NM_145811,NM_145	17	Hs00274241_m1	1	Ca ⁺⁺ channel
CACNG6	Cav γ 6	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 6	NM_145814,NM_145	19	Hs00230428_m1	N/A	Ca ⁺⁺ channel
CALM1	CALM1	calmodulin 1 (phosphorylase kinase, delta)	NM_006888,BX5376	14	Hs00300085_s1	6	Ca ⁺⁺ regulator
CALM3	CALM3	calmodulin 3 (phosphorylase kinase, delta)	NM_005184,J04046,	19	Hs00270914_m1	1	Ca ⁺⁺ regulator
CASQ1	CASQ1	calsequestrin 1 (fast-twitch, skeletal muscle)	NM_001231,S73775,	1	Hs00154281_m1	6	Ca ⁺⁺ regulator
CASQ2	CASQ2	calsequestrin 2 (cardiac muscle)	NM_001232,D55655	1	Hs00415779_m1	N/A	Ca ⁺⁺ regulator
CFTR	CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, ATP-binding cassette	NM_000492,M28668	7	Hs00357011_m1	21	Cl ⁻ channel
CLCN2	ClC2	chloride channel 2	NM_004366,AF0260	3	Hs00189078_m1	1	Cl ⁻ channel
CLCN3	ClC3	chloride channel 3	NM_001829,X78520,	4	Hs00156527_m1	12	Cl ⁻ channel
CLCN6	ClC6	chloride channel 6	NM_001286,NM_021	1	Hs00154518_m1	4	Cl ⁻ channel
CLCN7	ClC7	chloride channel 7	NM_001287,Z67743,	16	Hs00241850_m1	1	Cl ⁻ channel
G6PD	G6PD	glucose-6-phosphate dehydrogenase	NM_000402,M21248	X	Hs00166169_m1	2	endogenous control
GJA1	Cx43	gap junction protein, alpha 1, 43kDa (connexin 43)	NM_000165,M65188	6	Hs00748445_s1	10	Connexin
GJA5	Cx40	gap junction protein, alpha 5, 40kDa (connexin 40)	NM_181703,NM_005	1	Hs00270952_s1	1	Connexin
GJA7	Cx45	gap junction protein, alpha 7, 45kDa (connexin 45)	NM_005497,AK1243	17	Hs00271416_s1	8	Connexin
HCN1	HCN1	hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 1	NM_021072,AF0648	5	Hs00395037_m1	1	Cation channel
HCN2	HCN2	hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 2	NM_001194,AJ01258	19	Hs00606903_m1	2	Cation channel
HCN3	HCN3	hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 3	NM_020897,AB0409	1	Hs00380018_m1	3	Cation channel
HCN4	HCN4	hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 4	NM_005477,AJ13242	15	Hs00175760_m1	1	Cation channel
HPRT1	HPRT	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (Lesch-Nyhan syndrome)	NM_000194,M31642	X	Hs99999909_m1	N/A	endogenous control
ISYNA1	ISYNA1	myo-inositol 1-phosphate synthase A1	NM_016368,AF2205	19	Hs00375021_g1	5	endogenous control

ITPR1	IP3R1	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 1	NM_002222,D26070	3	Hs00181881_m1	3	Ca ⁺⁺ regulator
ITPR3	IP3R3	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 3	NM_002224,D26351	6	Hs00609908_m1	1	Ca ⁺⁺ regulator
KCNA1	Kv1.1	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 1	NM_000217,L02750	12	Hs00264798_s1	8	K ⁺ channel
KCNA2	Kv1.2	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 2	NM_004974,L02752	1	Hs00270656_s1	8	K ⁺ channel
KCNA3	Kv1.3	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 3	NM_002232,M85217	1	Hs00704943_s1	22	K ⁺ channel
KCNA4	Kv1.4	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 4	NM_002233,M55514	11	Hs00357903_s1	1	K ⁺ channel
KCNA5	Kv1.5	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 5	NM_002234,M83254	12	Hs00266898_s1	7	K ⁺ channel
KCNA6	Kv1.6	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 6	NM_002235,X17622	12	Hs00266903_s1	4	K ⁺ channel
KCNA7	Kv1.7	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 7	NM_031886,AF3158	19	Hs00361015_m1	1	K ⁺ channel
KCNAB1	Kvβ1	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 1	NM_172159,NM_172	3	Hs00185764_m1	4	K ⁺ channel
KCNAB2	Kvβ2	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 2	NM_172130,NM_003	1	Hs00186308_m1	4	K ⁺ channel
KCNAB3	Kvβ3	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 3	NM_004732,AF0164	17	Hs00190986_m1	6	K ⁺ channel
KCNB1	Kv2.1	potassium voltage-gated channel, Shab-related subfamily, member 1	NM_004975,L02840	20	Hs00270657_m1	1	K ⁺ channel
KCNB2	Kv2.2	potassium voltage-gated channel, Shab-related subfamily, member 2	NM_004770,NM_004	8	Hs00191116_m1	1	K ⁺ channel
KCNC1	Kv3.1	potassium voltage-gated channel, Shaw-related subfamily, member 1	NM_004976,NM_004	11	Hs00428197_m1	1	K ⁺ channel
KCNC2	Kv3.2	potassium voltage-gated channel, Shaw-related subfamily, member 2	NM_139137,NM_139	12	Hs00373568_m1	3	K ⁺ channel
KCNC3	Kv3.3	potassium voltage-gated channel, Shaw-related subfamily, member 3	NM_004977,AF0559	19	Hs00192108_m1	7	K ⁺ channel
KCNC4	Kv3.4	potassium voltage-gated channel, Shaw-related subfamily, member 4	NM_153763,NM_004	1	Hs00428198_m1	1	K ⁺ channel
KCND1	Kv4.1	potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 1	NM_004979,AJ0058	X	Hs00192113_m1	5	K ⁺ channel
KCND2	Kv4.2	potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 2	NM_012281,AB0289	7	Hs00273378_m1	4	K ⁺ channel
KCND3	Kv4.3	potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 3	NM_004980,NM_004	1	Hs00270661_m1	5	K ⁺ channel
KCNE1	MinK	potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 1	NM_000219,L28168	21	Hs00264799_s1	1	K ⁺ channel
KCNE1L	MIRP4	KCNE1-like	NM_012282,AJ0127	X	Hs00273381_s1	2	K ⁺ channel
KCNE2	MIRP1	potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 2	NM_172201,AF0710	21	Hs00270822_s1	1	K ⁺ channel
KCNE3	MIRP2	potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 3	NM_005472,BC0322	11	Hs00538801_m1	1	K ⁺ channel
KCNE4	MIRP3	potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 4	NM_080671,BC0144	2	Hs00758199_g1	1	K ⁺ channel
KCNH2	HERG	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 2	NM_172056,NM_000	7	Hs00165120_m1	3	K ⁺ channel
KCNIP2	KChIP2	Kv channel interacting protein 2	NM_173191,NM_173	10	Hs00601709_g1	8	K ⁺ channel
KCNJ1	Kir1.1	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 1	NM_000220,NM_000	11	Hs00165012_m1	1	K ⁺ channel
KCNJ11	Kir6.2	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11	NM_000525,BC0644	11	Hs00265026_s1	6	K ⁺ channel
KCNJ12	Kir2.2	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 12	NM_021012,L36069	17	Hs00266926_s1	N/A	K ⁺ channel
KCNJ2	Kir2.1	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 2	NM_000891,U12507	17	Hs00265315_m1	1	K ⁺ channel
KCNJ3	Kir3.1	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 3	NM_002239,U50964	2	Hs00158421_m1	1	K ⁺ channel
KCNJ4	Kir2.3	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 4	NM_152868,NM_004	22	Hs00705379_s1	18	K ⁺ channel
KCNJ5	Kir3.4	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 5	NM_000890,D50134	11	Hs00168476_m1	2	K ⁺ channel
KCNJ8	Kir6.1	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 8	NM_004982,D50312	12	Hs00270663_m1	1	K ⁺ channel
KCNK1	TWIK1	potassium channel, subfamily K, member 1	NM_002245,U33632	1	Hs00158428_m1	2	K ⁺ channel
KCNK3	TASK1	potassium channel, subfamily K, member 3	NM_002246,AF0068	2	Hs00605529_m1	1	K ⁺ channel
KCNK5	TASK2	potassium channel, subfamily K, member 5	NM_003740,AF0848	6	Hs00186652_m1	1	K ⁺ channel
KCNQ1	KvLQT1	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1	NM_181797,NM_181	11	Hs00165003_m1	15	K ⁺ channel
MYH7	β-MHC	myosin, heavy polypeptide 7, cardiac muscle, beta	NM_000257,M58018	14	Hs00165276_m1	26	Cytoskeletal protein

NPPA	ANP	natriuretic peptide precursor A	NM_006172,M30262	1	Hs00383230_g1	1	Signaling molecule
NPPB	BNP	natriuretic peptide precursor B	NM_002521,M25296	1	Hs00173590_m1	2	Signaling molecule
PIAS3	KChAP	protein inhibitor of activated STAT, 3	NM_006099,AB0218	1	Hs00180666_m1	7	K ⁺ channel
PLN	PLN	phospholamban	NM_002667,M63603	6	Hs00160179_m1	1	Ca ⁺⁺ regulator
PPP3CA	CAM-PRP	protein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic subunit, alpha isoform	NM_000944,L14778,	4	Hs00174223_m1	10	Ca ⁺⁺ regulator
RYR2	RYR2	ryanodine receptor 2 (cardiac)	NM_001035,X98330	1	Hs00181461_m1	10	Ca ⁺⁺ regulator
SCN1A	Nav1.1	sodium channel, voltage-gated, type I, alpha	NM_006920,AF2259	2	Hs00374696_m1	17	Na ⁺ channel
SCN1B	Navβ1	sodium channel, voltage-gated, type I, beta	NM_001037,L10338,	19	Hs00168897_m1	2	Na ⁺ channel
SCN2B	Navβ2	sodium channel, voltage-gated, type II, beta	NM_004588,AF0077	11	Hs00394952_m1	3	Na ⁺ channel
SCN3A	Nav1.3	sodium channel, voltage-gated, type III, alpha	NM_006922,AF0356	2	Hs00366902_m1	12	Na ⁺ channel
SCN3B	Navβ3	sodium channel, voltage-gated, type III, beta	NM_018400,AB0329	11	Hs00393218_m1	4	Na ⁺ channel
SCN4A	Nav1.4	sodium channel, voltage-gated, type IV, alpha	NM_000334,M81758	17	Hs00165686_m1	5	Na ⁺ channel
SCN5A	Nav1.5	sodium channel, voltage-gated, type V, alpha (long QT syndrome 3)	NM_198056,NM_000	3	Hs00165693_m1	11	Na ⁺ channel
SCN7A	Nav2.1	sodium channel, voltage-gated, type VII, alpha	NM_002976,M91556	2	Hs00161546_m1	10	Na ⁺ channel
SCN9A	Nav1.7	sodium channel, voltage-gated, type IX, alpha	NM_002977,X82835	2	Hs00161567_m1	11	Na ⁺ channel
SLC8A1	NCX1	solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 1	NM_021097,M91368	2	Hs00253432_m1	2	Ca ⁺⁺ regulator

Assay-on-demand

CNN1	Calponin 1	calponin 1, basic, smooth muscle	NM_001299,D17408	19	Hs00154543_m1	1	marker of vascular vessels
COL6A1	Procollagen 6, α1	collagen, type VI, alpha 1	NM_001848,M27447	21	Hs00242448_m1	20	marker of fibroblasts
UCHL1	UCHL1	ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (ubiquitin thiolesterase)	NM_004181,X04741,	4	Hs00188233_m1	8	marker of neuronal tissue

B. REMODELAGE IONIQUE CHEZ L'HOMME

2. Signature transcriptionnelle associée à la valvulopathie et à la fibrillation auriculaire chez l'homme (*article 3, page 162*)

a. Introduction

La fibrillation auriculaire est le trouble du rythme le plus répandu en pratique clinique et elle est liée à une augmentation de la mortalité et de la morbidité cardiovasculaire (Gajewski & Singer, 1981 ; Kannel *et al.*, 1982). Les mécanismes cellulaires associés à la FA ont fait l'objet de nombreuses études chez l'homme et les modèles animaux (voir revue Schram *et al.*, 2002). Les études gène à gène ont montré que le remodelage des canaux ioniques joue un rôle important dans la physiopathologie de la FA. Il contribue à son initiation et à son maintien. Au niveau fonctionnel, il a été montré que la diminution de la densité du courant calcique $I_{Ca,L}$ joue un rôle central dans la réduction de la durée de la période effective réfractaire associée à la FA (Bosch *et al.*, 1999). Une diminution de la densité du courant potassique transitoire sortant I_{to} a également été rapportée (Van Wagoner *et al.*, 1997 ; Yue *et al.*, 1997 ; Bosch *et al.*, 1999 ; Grammer *et al.*, 2000). En ce qui concerne les courants potassiques rectifiant entrants, alors que la densité de I_{K1} semble être augmentée, les résultats concernant celle de $I_{K,ACh}$ sont plus contradictoires (Bosch *et al.*, 1999 ; Dobrev *et al.*, 2001). Les variations de densité de courants ioniques associées à la FA ont été associées à des modifications d'expression des canaux ioniques correspondants au niveau du transcrit et de la protéine (Pour revue, Nattel & Li, 2000 ; Van Wagoner *et al.*, 2000 ; Brundel *et al.*, 2002).

Les atteintes des valves cardiaques sont des causes fréquentes de la FA (Benjamin *et al.*, 1998 ; Kannel *et al.*, 1998b), cependant, très peu de données sont disponibles concernant le remodelage ionique associé aux valvulopathies. Il a été montré que la dilatation atriale associée à une pathologie valvulaire s'accompagne d'une réduction de la densité des courants $I_{Ca,L}$ et I_{to} (Le Grand *et al.*, 1994).

Les études précédentes concernant le remodelage des canaux ioniques associé à la FA se sont limitées à l'évaluation de quelques sous-unités (six au maximum) supposées être importantes dans sa physiopathologie. Une autre limitation est liée au fait que les contributions indépendantes de la FA et de sa pathologie sous-jacente dans le remodelage ionique n'ont pas été évaluées. En effet, dans les études du remodelage ionique associé à la FA, les patients ont généralement une pathologie sous-jacente (souvent une valvulopathie), et les groupes contrôles utilisés ne sont alors pas les plus pertinents (patients ischémiques) (Van Wagoner *et al.*, 1997 ; Van Wagoner *et al.*, 1999). L'objectif de cette étude a été

d'évaluer le profil d'expression des canaux ioniques de patients présentant une pathologie valvulaire, et qui sont soit en fibrillation auriculaire permanente, soit en rythme sinusal. Pour cela, nous avons utilisé des puces à ADN contenant des sondes spécifiques de canaux ioniques humains et de gènes régulateurs de l'homéostasie calcique. Cette étude a fait l'objet d'une publication dans *Circulation* (Gaborit *et al.*, 2005;112:471-481, article 3, page 162). Nous avons quantifié l'expression transcriptionnelle de l'ensemble de ces gènes chez (i) 7 patients présentant une pathologie valvulaire et un rythme sinusal (SR-VHD) et (ii) 11 patients présentant une FA associée à une valvulopathie (FA-VHD), par comparaison à (iii) des patients contrôles, en rythme sinusal et sans pathologie cardiaque structurale (SR-CAD). A partir de l'ensemble des données, nous avons sélectionné 59 transcrits exprimés dans le cœur humain pour une analyse détaillée.

b. Résultats

La technique de regroupement hiérarchique à deux voies a permis de séparer les deux groupes de patients valvulopathiques, suggérant qu'un profil transcriptionnel de canaux ioniques les distingue (Figure 3, Gaborit *et al.*, 2005).

Les patients en rythme sinusal présentant une pathologie valvulaire expriment différemment 29 canaux ioniques et régulateurs de l'homéostasie calcique sur les 59 étudiés. Il y a une forte similarité entre les deux groupes de patients valvulopathiques. En effet, 66 % des gènes dont l'expression est modifiée chez les patients en rythme sinusal sont altérés de la même manière chez les patients en FA. L'analyse statistique des gènes différemment exprimés entre le groupe de patients FA-VHD et celui des SR-VHD a permis d'identifier le portrait moléculaire spécifique de la FA : il implique 12 gènes. Cette signature de la FA se caractérise par une augmentation de l'expression du phospholamban, des sous-unités MinK et MiRP2, et du canal potassique à deux pores, TWIK1. La FA est également associée à une diminution de l'expression du canal calcique Cav3.1 et de la sous-unité principale du courant potassique transitoire I_{to} , Kv4.3 (Figures 1 et 2, Gaborit *et al.*, 2005).

Les modifications d'expression transcriptionnelles des canaux Kir2.1 et Cav1.2, et de Cx40 ont été validées au niveau protéique. Par ailleurs, pour les canaux générant les courants $I_{Ca,L}$ et I_{K1} , les corrélations entre les transcrits et la fonction ont été explorées. Enfin, nous avons montré pour 13 gènes que le retour en rythme sinusal des patients, par traitement à l'amiodarone, permet de réverser leur remodelage : ils retrouvent un profil d'expression similaire à celui de la valvulopathie causale.

c. Conclusion

Nous avons montré que la valvulopathie causale entraîne un remodelage extensif de l'expression auriculaire des gènes codant les sous-unités des canaux ioniques, en absence ou en présence de FA. Seules quelques variations supplémentaires caractérisent les patients qui développent une FA. Notre approche globale a donc permis d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la fibrillation auriculaire.

Cette étude montre pour la première fois que le remodelage ionique précède la survenue de la fibrillation auriculaire et est lié en majorité à la cardiopathie causale.

ARTICLE 3 en PDF

Circulation

JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION



**Human Atrial Ion Channel and Transporter Subunit Gene-Expression
Remodeling Associated With Valvular Heart Disease and Atrial Fibrillation**
Nathalie Gaborit, Marja Steenman, Guillaume Lamirault, Nolwenn Le Meur, Sabrina
Le Bouter, Gilles Lande, Jean Léger, Flavien Charpentier, Torsten Christ, Dobromir
Dobrev, Denis Escande, Stanley Nattel and Sophie Demolombe
Circulation 2005;112;471-481; originally published online Jul 18, 2005;
DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.506857
Circulation is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX
72514
Copyright © 2005 American Heart Association. All rights reserved. Print ISSN: 0009-7322. Online
ISSN: 1524-4539

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

<http://circ.ahajournals.org/cgi/content/full/112/4/471>

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

Permissions: Permissions & Rights Desk, Lippincott Williams & Wilkins, 351 West Camden
Street, Baltimore, MD 21202-2436. Phone 410-5280-4050. Fax: 410-528-8550. Email:
journalpermissions@lww.com

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

Human Atrial Ion Channel and Transporter Subunit Gene-Expression Remodeling Associated With Valvular Heart Disease and Atrial Fibrillation

Nathalie Gaborit, MSc*; Marja Steenman, PhD*; Guillaume Lamirault, MD; Nolwenn Le Meur, MSc; Sabrina Le Bouter, PhD; Gilles Lande, MD; Jean Léger, PhD; Flavien Charpentier, PhD; Torsten Christ, MD; Dobromir Dobrev, MD; Denis Escande, MD, PhD; Stanley Nattel, MD; Sophie Demolombe, PhD

Background—Valvular heart disease (VHD), which often leads to atrial fibrillation (AF), and AF both cause ion-channel remodeling. We evaluated the ion-channel gene expression profile of VHD patients, in permanent AF (AF-VHD) or in sinus rhythm (SR-VHD), in comparison with patients without AF or VHD, respectively.

Methods and Results—We used microarrays containing probes for human ion-channel and Ca^{2+} -regulator genes to quantify mRNA expression in atrial tissues from 7 SR-VHD patients and 11 AF-VHD patients relative to 11 control patients in SR without structural heart disease (SR-CAD). From the data set, we selected for detailed analysis 59 transcripts expressed in the human heart. SR-VHD patients differentially expressed 24/59 ion-channel and Ca^{2+} -regulator transcripts. There was significant overlap between VHD groups, with 66% of genes altered in SR-VHD patients being similarly modified in AF-VHD. Statistical differences between the AF- and SR-VHD groups identified the specific molecular portrait of AF, which involved 12 genes that were further confirmed by real-time reverse transcription–polymerase chain reaction. For example, phospholamban, the β -subunit MinK (*KCNE1*) and MIRP2 (*KCNE3*), and the 2-pore potassium channel *TWIK-1* were upregulated in AF-VHD compared with SR-VHD, whereas the T-type calcium-channel Cav3.1 and the transient-outward potassium channel Kv4.3 were downregulated. Two-way hierarchical clustering separated SR-VHD from AF-VHD patients. AF-related changes in L-type Ca^{2+} -current and inward-rectifier current were confirmed at protein and functional levels. Finally, for 13 selected genes, SR restoration reversed ion-channel remodeling.

Conclusions—VHD extensively remodels cardiac ion-channel and transporter expression, and AF alters ion-channel expression in VHD patients. (*Circulation*. 2005;112:471-481.)

Key Words: remodeling ■ ion channels ■ fibrillation ■ valves ■ atrium

Atrial fibrillation (AF), the most common cardiac arrhythmia, contributes substantially to cardiac morbidity and mortality.¹ The cellular mechanisms underlying AF have been the subject of extensive studies both in human and in animal models (reviewed in reference 2). Ion-channel remodeling clearly plays an important role in the pathophysiology of AF, contributing to its initiation and perpetuation.² At the functional level, decreased L-type Ca^{2+} -current ($I_{\text{Ca,L}}$) density is central to the shortening of the effective refractory period characteristic of AF.³ Downregulation of the transient outward current, I_{to} , has also been reported,^{3–6} whereas inward-rectifier currents can be increased.^{3,7} Functional alterations in ionic currents have been associated with corresponding alterations in mRNA and ion-channel protein expression (see

Brundel et al,⁸ Van Wagoner and Nerbonne,⁹ and Nattel and Li¹⁰ for reviews).

Valvular heart disease (VHD) is a frequent clinical cause of AF.^{1,11} There is limited information available about ion-channel remodeling due to VHD, although VHD-related atrial dilation is associated with reduced $I_{\text{Ca,L}}$ and I_{to} .¹²

Previous studies of ion-transporter subunit remodeling associated with AF have been limited to the evaluation of a small number of candidate subunits believed to be important, with none examining >6 subunits. An additional limitation has been the fact that the independent contributions of AF and underlying heart disease have not been adequately addressed, because in studies of cardiac disease–related remodeling, many patients also have AF¹²

Received September 14, 2004; revision received April 7, 2005; accepted April 14, 2005.

From l'Institut du Thorax, INSERM U533, Faculté de Médecine, Nantes, France (N.G., M.S., G. Lamirault, N.L.M., S.L.B., G. Lande, J.L., F.C., D.E., S.D.); the Montreal Heart Institute and University of Montreal, Montreal, Canada (S.N.); and Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Dresden, Germany (T.C., D.D.).

*The first 2 authors contributed equally to this work.

Raw data for DNA chips can be found online with this article at <http://www.circulationaha.org>.

Correspondence to Sophie Demolombe, PhD, INSERM U533, Faculté de Médecine, 1 rue G. Veil, 44035 Nantes cedex, France. E-mail sophie.demolombe@nantes.inserm.fr

© 2005 American Heart Association, Inc.

Circulation is available at <http://www.circulationaha.org>

DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.506857

Clinical Characteristics of Patients in Normal SR (VHD and SR-CAD Groups) and in AF at the Time of Cardiac Surgery

Patients	Underlying Cardiac Disease								PMH							
	Age, y	Sex	Ischemic Heart Disease	Valvular Replacement Indication	Duration of AF, y	LV Ejection Fraction, %	LAD, mm	P Wave, ms	β-Blockers	Digitalis	Statins	Diuretics	ACE Inhibitors+AT ₁ Blockers	Ca ²⁺ Antagonists	Nitrates	Other Medication
SR-VHD group																
SR-VHD1	76	M	—	AS		64	40	118					FS			AA
SR-VHD2	62	M	—	MR		77	63	116				FR	RM			
SR-VHD3	80	M	+	AS		62	44	100			PV		LS			
SR-VHD4	72	M	+	AS		57	39	105			SM		VL			
SR-VHD5	52	M	—	MR		64	46	118				FR	RM			
SR-VHD6	69	M	—	AR/MR		71.5	45	111	ST		PV	IN	PR			FL
SR-VHD7	78	F	—	AS		47	39	87		DG		SP+FR	RM			
	70±9					63±10	45±8	108±11								
AF-VHD group																
AF-VHD1	67	M	—	MR	9	41	62		CR		PV	FR	LS			FN
AF-VHD2	70	F	—	MS	5	57	50			DG					ID	FN
AF-VHD3	74	M	—	AS	1	71	40					AM+HCT		DL		FN
AF-VHD4	67	M	—	AS	2	45	49						RM			FN
AF-VHD5	76	M	—	AS/MR	12	58	56					FR	PR			FN
AF-VHD6	72	F	+	MR	10	64	44			DT	PV	FR	CP	NC		FN+LT
AF-VHD7	73	M	+	AS	6	75	45					FR	EL	DL		
AF-VHD8	73	M	—	AS	13	61	52			DG		FR	EL			FN
AF-VHD9	69	M	+	AS	7	70	40		AT		SM					FN
AF-VHD10	77	M	+	AS	2	70	40		AT					NC	TT+MS	AA+FN
AF-VHD11	75	M	+	AS	10	60	51					FR	EL	DL		FN
	72±3				7±4	61±10	48±7									
SR-CAD group																
SR-CAD1	64	M	+	no		47		80	AC		SM				MS	AA
SR-CAD2	73	M	+	no		50		105	AT						TT+MS	CD
SR-CAD3	68	M	+	no		57		73	AT		PV					AA
SR-CAD4	72	M	+	no		71		110	MT						TT+MS	AA
SR-CAD5	70	M	+	no		52		100	AT		AO				MS	FL
SR-CAD6	68	M	+	no		60		98	AT		PV		RM			AA
SR-CAD7	58	F	+	no		73		97	AT		PV			AD	TT+MS	AA
SR-CAD8	74	M	+	no		73		112	AC		PV	AZ+SP		AD		AA
SR-CAD9	71	M	+	no		72		92	BT		SM			AD	TT+MS	AA
SR-CAD10	73	F	+	no		66		89	AT		PV			FE	TT+ID	AA
SR-CAD11	73	M	+	no		74		107						DL	TT	AA
	69±5					63±10		97±12								

LAD indicates left atrium diameter; PMH, previous medical history; ACE, angiotensin-converting enzyme; AT₁, angiotensin II type 1; AS indicates aortic stenosis; MR, mitral regurgitation; AR, aortic regurgitation; MS, mitral stenosis; ST, sotalol; CR, carvedilol; AT, atenolol; AC, acebutolol; MT, metoprolol; BT, betaxolol; DG, digoxin; DT, digitalis; PV, pravastatin; SM, simvastatin; AO, atorvastatin; FR, furosemide; IN, indapamide; SP, spironolactone; AZ, altizide; AM, amiloride; HCT, hydrochlorothiazide; ID, isosorbide dinitrate; TT, trinitroglycerin; MS, molsidomine; AA, acetylsalicylic acid; AD, amlodipine; CD, clopidogrel; CP, captopril; DL, diltiazem; EL, enalapril; FE, felodipine; FL, flurbiprofen; FN, fluindione; FS, flosinopril; LS, losartan; LT, levothyroxine; NC, nicardipine; PR, perindopril; RM, ramipril; VL, valsartan; +, present; and —, absent. Data in bold are presented as mean±SD.

and in studies of AF, many patients also have significant cardiac disease, often VHD.^{6,13} The present study was designed to use a genomic approach to address the following hypotheses: (1) Ion-channel subunit expression in patients with VHD differs from that in patients without VHD, reflecting ionic remodeling and (2) AF induces ion-channel remodeling beyond that induced by VHD alone, as reflected by different ion-channel subunit expression patterns in patients with AF and VHD compared with VHD patients in sinus rhythm (SR).

Methods

Human Samples

For molecular biology studies, right atrial appendages (RAAs) were obtained during open-heart surgery from 7 VHD patients in SR (SR-VHD), 11 patients with VHD and permanent (>1 year) AF (AF-VHD), and 11 patients undergoing revascularization surgery for coronary artery disease (CAD), constituting the control group (SR-CAD). SR-VHD and AF-VHD groups were similar in terms of age, sex distribution, types of valve disease, left ventricular (LV) function, and atrial dimensions (the Table). Differences in drug therapy followed underlying heart disease: VHD patients received more

angiotensin-system suppressants and diuretics, which were less common in SR-CAD patients. SR-CAD patients commonly took β -blockers, statins, and Ca^{2+} antagonists. Ca^{2+} antagonists were prescribed for about half of the AF-VHD and none of the SR-VHD patients. To assess potential reversibility, we obtained data from an additional 6 patients with VHD and persistent AF, who were cardioverted and kept in SR for at least 1 month preoperatively (sinus-rhythm reversion [SRR-VHD] group). These patients were similar to other VHD groups in age (mean $\pm$ SD, 74 ± 1 years), types of valve disease (4 aortic, 1 mitral, 1 combined), LV ejection fraction ($60 \pm 2\%$), and left atrial dimension (50 ± 1 mm). Their drug therapy was also similar, except that they all received oral amiodarone. Finally, RAA samples were obtained from 7 SR-CAD, 6 SR-VHD, and 6 AF-VHD patients for functional studies. These additional patients showed comparable clinical characteristics to other groups. After excision, RAAs were immediately snap-frozen in LN_2 and stored at -80°C .

RNA Isolation and Labeling

Total RNA was isolated with Trizol reagent (Life Technologies). RNA was DNase-treated (RNeasy fibrous tissue mini kit, Qiagen). The quality of isolated RNA was assessed by microelectrophoresis on polyacrylamide gels (Agilent 2100 Bioanalyzer). The absence of DNA contamination was verified by reverse transcription (RT)-negative polymerase chain reaction (PCR). A control pool was prepared, containing equal amounts of total RNA from each SR-CAD sample. RT was performed on this pool to obtain Cy3-labeled cDNA with the CyScribe cDNA postlabeling kit (Amersham Biosciences). For every SR-VHD and AF-VHD patient, 2 or 3 distinct RT reactions (depending on tissue availability) were performed to obtain Cy5-labeled cDNA. Each RT was processed independently.

Oligonucleotides and Microarrays

Fifty-mer, 5' amino-modified oligonucleotide probes were synthesized at MWG Biotech AG. Lyophilized oligonucleotides were dissolved at $25 \mu\text{mol/L}$ in $1 \times$ spotting buffer A (MWG). The microarray stand was epoxysilane-coated slides. Oligonucleotide spotting was performed with the Lucidea array spotter (Amersham).

Each microarray contained 4116 oligonucleotides (spotted in quadruplicate on each slide), including 315 targets for genes encoding human ion-channel subunits and proteins involved in calcium homeostasis.

Hybridization

Slides were treated with 50 mmol/L ethanolamine for oligonucleotide fixation. Each Cy5-labeled cDNA was mixed with an equal amount of Cy3-labeled control-pool cDNA, preincubated with yeast tRNA and polyA RNA (Gibco-BRL), and hybridized onto microarrays. After overnight hybridization, slides were washed with successively more stringent standard saline citrate solutions.

Forty-six independent hybridizations were performed in total: 2 for each SR-VHD patient and 2 or 3 for each AF-VHD patient. Hybridized arrays were scanned by fluorescence confocal microscopy (ScanArray 3000, GSI-Lumonics). Measurements were obtained separately for each fluorochrome at $10 \mu\text{m/pixel}$ resolution.

Microarray-Data Analysis

Fluorescence values were analyzed with GenePixPro 5.0. Raw data were processed with software (<http://cardioserve.nantes.inserm.fr/mad/madscan/login.php>) developed internally.¹⁴ Low-quality spots were filtered, leaving only spots with valid expression values. Invariant genes were selected with the rank-invariant method.¹⁵ To normalize Cy3 and Cy5 values, a nonlinear regression method (Lowess fitness) was applied to invariant genes to calculate the correction for every spot of the microarray.¹⁶ Outliers were excluded by the median absolute deviation-modified Z test.¹⁷ To compensate for experimental variability and compare SR-VHD with AF-VHD data sets, expression-values of the 46 slides were scaled to the same median absolute deviation.¹⁶

Two statistical analyses were performed on the 4116-oligonucleotide data-points: (1) comparison of SR-VHD and AF-VHD groups based on data normalized to the SR-CAD control patient pool and (2) direct comparison of SR-VHD versus AF-VHD patients. Genes with statistically significant differential expression were identified with 1- and 2-class significance analysis of microarrays (SAMs)¹⁸ and linear models for microarray data (LIMMA).¹⁹ For SAM, genes with a q value $< 0.24\%$ were selected. For LIMMA, genes with a Holm-corrected probability value < 0.01 were selected. Genes were considered differentially expressed when they met both SAM and LIMMA criteria. For each gene, the median of replicate expression values was calculated. Oligonucleotides representing 59 genes encoding cardiac ion channels and calcium homeostasis proteins were retained for further study.

Two-way hierarchical agglomerative clustering was applied to the gene expression matrix consisting of 18 VHD patients and 59 selected genes. The input consisted of median replicate expression values (displayed as log-normal) for each gene and patient. Clustering with uncentered correlation with the CLUSTER program²⁰ was visualized with Treeview software.

TaqMan Real-Time RT-PCR

First-strand cDNA was synthesized from $2 \mu\text{g}$ total RNA with Super Script III first-strand for RT-PCR (Invitrogen). Real-time PCR was performed with predesigned 6-carboxy-fluorescein (FAM)-labeled fluorogenic TaqMan probes and primers and $1 \times$ TaqMan universal master mix (Applied Biosystems). After 2 minutes at 50°C and 10 minutes at 95°C , 40 cycles of amplification were performed with the ABI PRISM 7900HT sequence-detection system (Applied Biosystems). Data were collected with instrument spectral compensation by Applied Biosystems SDS 2.1 software. Fluorescence signals were normalized to the housekeeping gene myo-inositol 1-phosphate synthetase A1 (*ISYNA1*). The comparative threshold-cycle (C_t) relative-quantification method was used.²¹ For each patient, each gene was quantified in duplicate in 3 separate experiments. The values were averaged and then used for the $2^{-\Delta C_t} \times 10$ calculation, where $2^{-\Delta C_t}$ corresponds to expression relative to *ISYNA1*. Statistical analysis was performed with ANOVA followed by Tukey's test, with $P < 0.05$ considered significant.

Western Blotting

Membrane proteins were extracted ($n=6$ in each group) and processed as previously described.²² Antibodies were obtained from Alomone Laboratories (Kir2.1 and Cav1.2) or Chemicon (Cx40).

I_{K1} and $I_{Ca,L}$ Measurements

Human atrial myocytes were isolated²³ and suspended in storage solution (mmol/L): KCl 20, KH_2PO_4 10, glucose 10, potassium glutamate 70, β -hydroxybutyrate 10, taurine 10, EGTA 10, and albumin 1, pH 7.4. Whole-cell voltage-clamp I_{K1} and $I_{Ca,L}$ recordings were performed and analyzed as previously described.^{7,24} Cell capacitances averaged 89.4 ± 8.8 ($n=17$) for SR-CAD, 94.3 ± 7.6 ($n=18$) for SR-VHD, and 112.1 ± 9.4 ($n=22$) pF for AF-VHD myocytes ($P=\text{NS}$).

Results

Gene Expression Changes of SR-VHD and AF-VHD Compared With SR-CAD Group

Figures 1 and 2 show ion-transport gene expression values in each VHD group. Results for calcium channels and regulators, Na^+ , K^+ -ATPase, and sodium-channel data are shown in Figure 1 and chloride, pacemaker, and potassium-channel genes and connexins in Figure 2. Results are given as percentage change from the control pool (SR-CAD group), with open circles representing individual patient values and horizontal lines representing medians. Red indicates statistically significant changes; black indicates results not signifi-

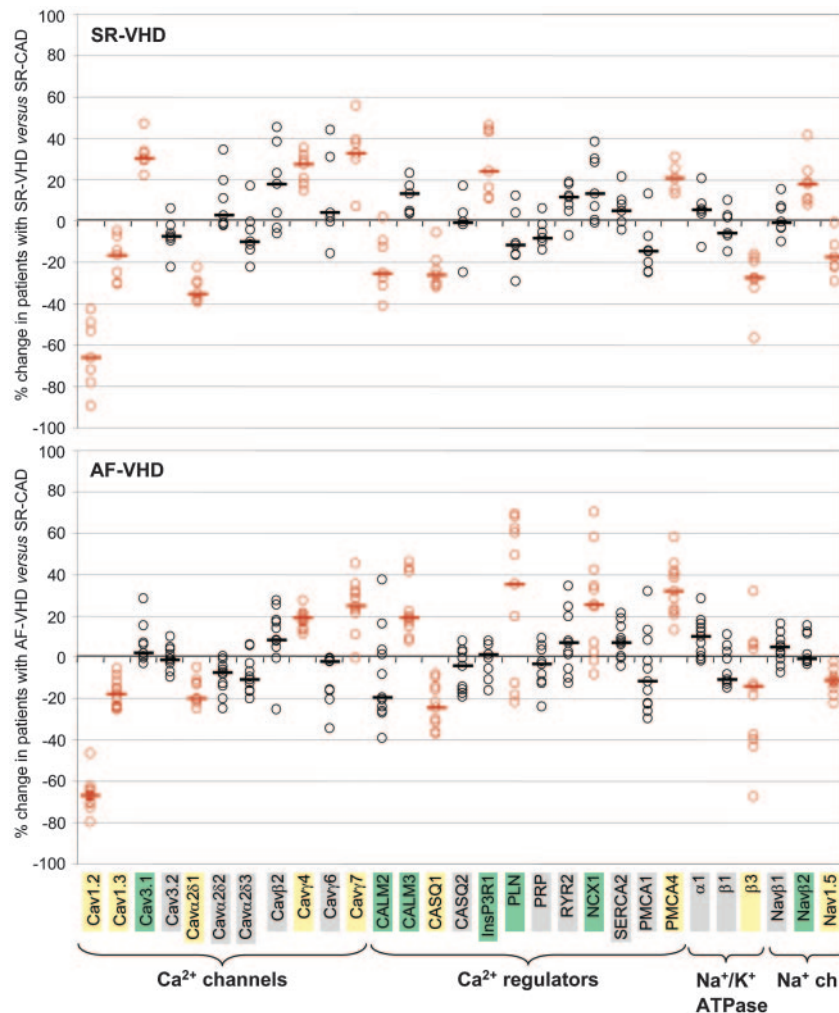


Figure 1. Cardiac ion-channel remodeling associated with VHD and AF. Graphs represent percentage change in expression vs control-pool (y axis) evaluated by microarrays for genes selected for cardiac expression (x axis). Data points indicate medians of repeated measures for each patient. Bars represent median of per-patient values for each gene. Red circles and bars represent genes with statistically significant differential expression in SR-VHD or/and AF-VHD patients vs SR-CAD by 1-class SAM and LIMMA analyses. Genes in gray boxes are unchanged in either SR-VHD or AF-VHD; genes in yellow boxes are statistically significantly changed in same direction; genes in green boxes are changed in only 1 of the VHD groups.

cantly different from the control pool. Of the 59 genes, 28 were unchanged in either SR-VHD or AF-VHD (indicated by gray boxes on the horizontal axis labels). Statistically significant changes in the same direction were observed for 16 genes (yellow boxes). For the 15 remaining genes, statistically significant changes were seen for only one of the VHD groups (green boxes). For no genes were there statistically significant changes in both groups that went in opposite directions. Thus, the SR-VHD group showed substantial changes from control, pointing to important remodeling of cardiac ion-transport genes in VHD and the need to consider VHD effects in the AF group.

To identify the AF-related molecular portrait, AF-VHD patients were compared with SR-VHD patients with 2-class statistical analysis. Among genes that were not significantly altered compared with control in either SR-VHD or AF-VHD alone, 2 genes (Kv4.3 and Cava2δ2) showed a different distribution in SR-VHD compared with AF-VHD patients. Among genes that were significantly up- or downregulated congruently, MinK and Cava2δ1 showed differential expression in SR-VHD versus AF-VHD patients. Among 15 genes that demonstrated significantly altered expression in 1 group only, 8 were differentially distributed in SR-VHD versus AF-VHD patients. In total, 12 genes showed differential expression in AF-VHD versus SR-VHD: the calcium-channel

β-subunit Cava2δ1 (*CACNA2D1*), phospholamban (*PLN*), the chloride-channel subunit *CLCN6*, the voltage-gated potassium channel β-subunit Kvβ1 (*KCNAB1*), the slow delayed-rectifier β-subunit MinK (*KCNE1*), the potassium-channel subunit MIRP2 (*KCNE3*), and the 2-pore potassium-channel subunit TWIK-1 (*KCNK1*) were more strongly expressed in AF-VHD patients compared with SR-VHD, whereas the T-type calcium-channel α-subunit Cav3.1 (*CACNA1G*), the calcium-channel β-subunit Cava2δ2 (*CACNA2D2*), inositol-triphosphate receptor 1 (*ITPR1*), the sodium-channel β-subunit Navβ2 (*SCN2B*), and the transient-outward potassium-current α-subunit Kv4.3 (*KCND3*) were less strongly expressed in AF-VHD than in SR-VHD patients.

Hierarchical Clustering Analysis Reveals AF-SR Differences

The results of unsupervised 2-way hierarchical clustering analysis are shown in Figure 3. Samples were grouped according to gene expression differences, ordering samples with the most similar expression patterns closest to each other and the most different patterns furthest apart. The hierarchical clustering analysis clearly separated SR-VHD from AF-VHD patients, displaying distinct transcriptional profiles of genes involved in cardiac electrical signaling. All 12 genes identi-

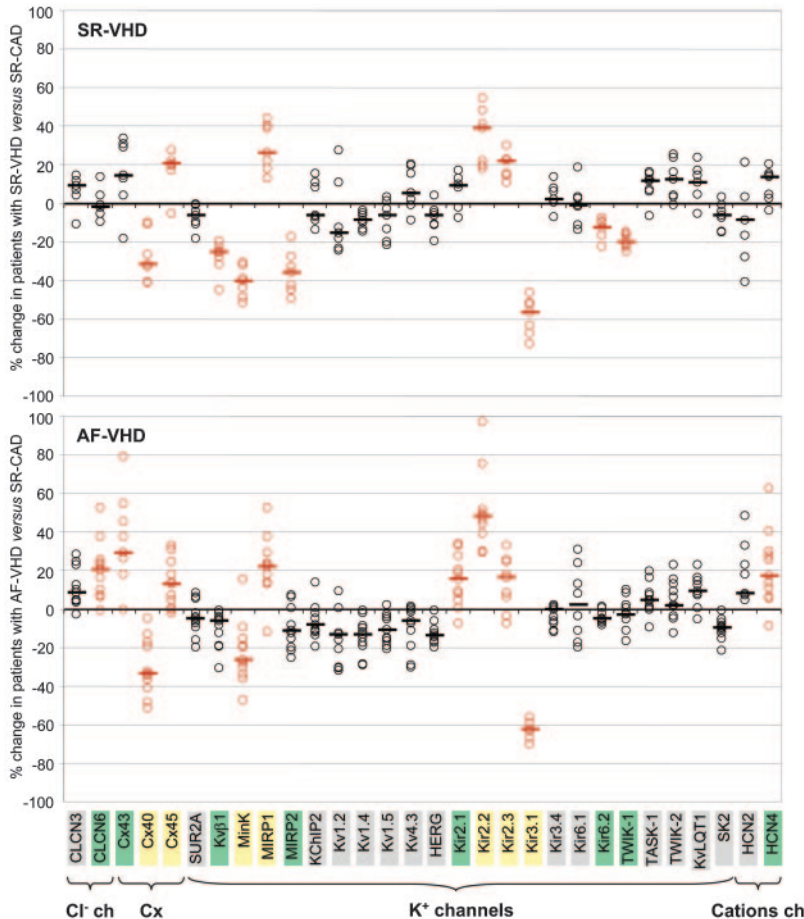


Figure 2. Cardiac ion-channel remodeling associated with VHD and AF. Data were obtained for chloride, potassium, and cation channels. Same format as for Figure 1.

fied by 2-class analysis were included in discriminatory gene clusters (indicated at right of figure). Gene groups A and B were more strongly expressed in AF-VHD compared with SR-VHD, whereas the opposite was seen for group C. It should be noted that this hierarchical clustering indicates gene expression levels in SR-VHD relative to the AF-VHD group but not relative to the control group. Thus, some genes in groups A and B may show decreased expression versus the control pool, whereas others in group C may show increased expression (see Figures 1 and 2). Among the genes identified, 6 play potential roles in ionic currents that are modified in models of AF: Kv4.3 (I_{to}), Kir2.1 (I_{K1}), MinK and MIRP2 (I_K), and Cav α 2 δ 1 and Cav α 2 δ 2 (I_{Ca}). Clustering was also attempted in relation to medication or type of VHD, and this analysis showed no detectable effect of these variables. When gene clusters A, B, and C were removed from the analysis, hierarchical clustering did not reveal gene expression differences between AF-VHD and SR-VHD samples (Figure 4), which intermingled rather than being distinctly separated as in Figure 3.

Expression Assessment by Real-Time RT-PCR and Western Blotting

Microarray data were further confirmed by TaqMan real-time PCR (Figure 5). The expression of the 12 genes showing characteristic expression in AF and clustering on hierarchical analysis was quantified on the RNA samples previously used

for microarray experiments. In addition, we validated 2 genes that were not modified by either AF or VHD (SERCA2 and KvLQT1) and 4 genes that are classically altered by AF (NCX1, Cx43, Cx40, and Kir2.1). Transcripts were quantified with fluorescent probes with 100% PCR efficacy. This standardized method permits accurate quantification of transcript expression levels. Statistically significant differences between SR-VHD and SR-CAD groups are shown by asterisks (Figure 5), and differences between AF-VHD and SR-VHD groups are shown by pound symbols (#). Expression differences detected by real-time RT-PCR paralleled those identified by microarray. Of particular note are similar variations in inositoltrisphosphate receptor, phospholamban, CLCN6, Nav β 2, Kv β 1, MiRP2, and Kv4.3. The expression level of Cav3.1 was too low to be reproducibly evaluated by RT-PCR and this is not shown in Figure 5. Finally, the 2 genes that were unchanged by either AF-VHD or SR-VHD showed no change by RT-PCR.

Western-blot experiments (Figure 6) were conducted for ion-channel subunits (Cav1.2, Kir2.1, and Cx40) selected on the basis of evidence for a pathophysiological role in AF.² In agreement with gene expression data, Cav1.2 and Cx40 proteins were similarly expressed in SR-VHD and AF-VHD groups. Cav1.2 and Cx40 were significantly downregulated in SR-VHD versus SR-CAD. Kir2.1 was upregulated in the AF-VHD group only. Although changes were quantitatively similar for Cav1.2 and Cx40 mRNA and protein, upregula-

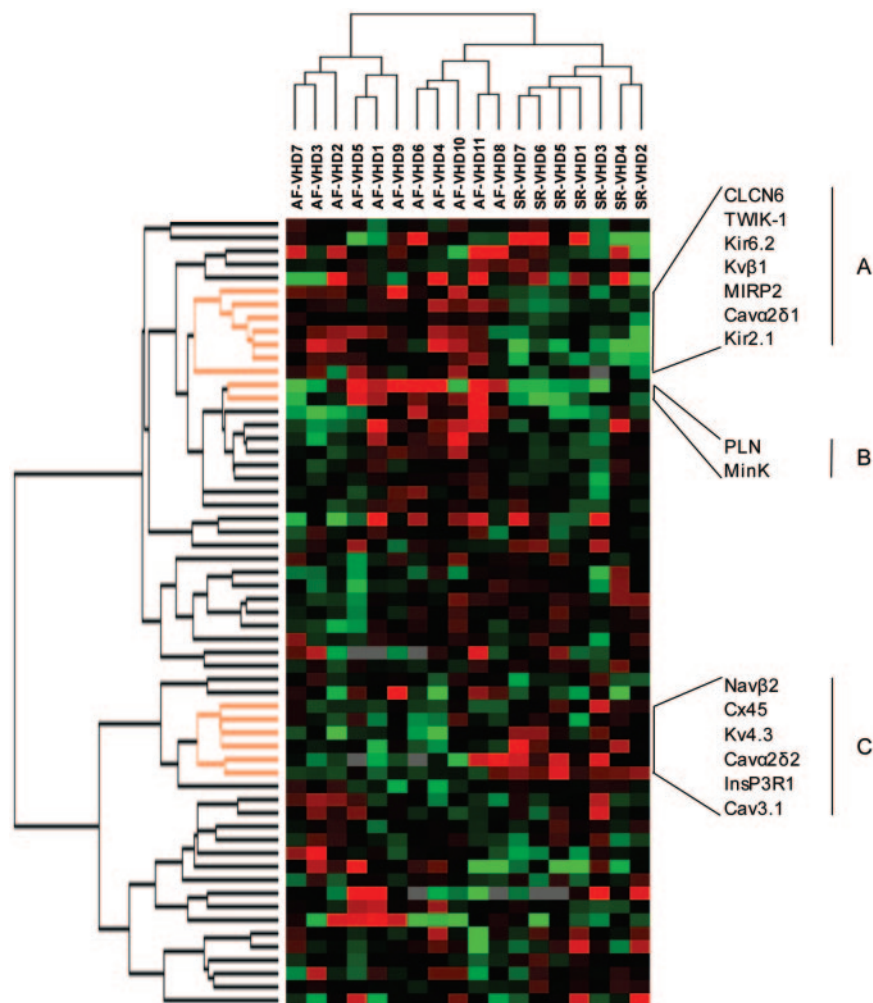


Figure 3. Two-way hierarchical clustering. Two-way hierarchical agglomerative clustering applied to 7 SR-VHD patients and 11 AF-VHD patients (horizontally) and to 59 selected genes (vertically). Input consisted of median of replicate expression values for each gene and patient. Each gene is represented by single row of colored boxes, and each patient by single column. Entire gene clustering is shown at left. Three selected clusters containing genes relevant to SR-VHD vs AF-VHD discrimination are shown at right (A, B, C). Each color patch in map represents gene expression level, with continuum of expression levels from dark green (lowest) to bright red (highest). Missing values are coded as gray.

tion of Kir2.1 protein was more pronounced than Kir2.1 mRNA.

Functional Correlation

I_{K1} recorded with a ramp protocol (Figure 7A and 7B) was significantly larger in AF-VHD than in SR-VHD or SR-CAD groups (Figure 7C). Peak I_{CaL} (Figure 7B) was significantly smaller in AF-VHD than in SR-VHD (Figure 7C). I_{CaL} was slightly, but not significantly, smaller in SR-VHD than SR-CAD.

Reversibility of Ion-Subunit Changes

To assess potential changes in ionic remodeling with SR restoration, we used quantitative RT-PCR to study ion-channel subunit expression after SRR. Figure 8 shows mRNA quantification for 13 selected genes (3 of which had been found downregulated, 4 upregulated, and 5 unchanged in the AF-VHD group). For each of the genes altered in the AF-VHD group, values for SRR-VHD were indistinguishable from those of SR-VHD, indicating their reversibility. Genes that did not differ between SR-VHD and AF-VHD were similarly unchanged for SRR-VHD.

Discussion

Although the link between VHD and AF is well recognized, the electrophysiological profile that distinguishes VHD pa-

tients who develop AF from those who do not remains unclear. Furthermore, there are relatively few data in the literature about the changes in ion-channel gene expression caused by VHD. The present study shows substantial remodeling in SR-VHD patients. It also shows that ion-channel subunit profiling discriminates SR-VHD patients from AF-VHD patients, and thus that there is a specific ion-channel subunit expression portrait for VHD patients with AF.

Ion-Channel Expression Changes in Our Study Compared With the Literature

In accordance with previous studies performed in dogs and humans,^{25–27} we found a clear reduction in L-type calcium-channel mRNA expression (Cav1.2 and Cav1.3) associated with a weak but statistically significant decrease in Nav1.5. The Cav1.2 differences were observed in both AF-VHD and SR-VHD patients and were confirmed at the protein level. However, functional data showed that I_{CaL} was lower in AF-VHD than SR-VHD, which showed only a small trend to be lower than in SR-CAD. These data support the idea that the mechanism for I_{CaL} reduction is complex and could involve altered regulation or other mechanisms distinct from mRNA and protein expression changes. Christ et al²⁸ recently illustrated this complexity by showing that in AF patients, increased protein phosphatase activity may contribute to

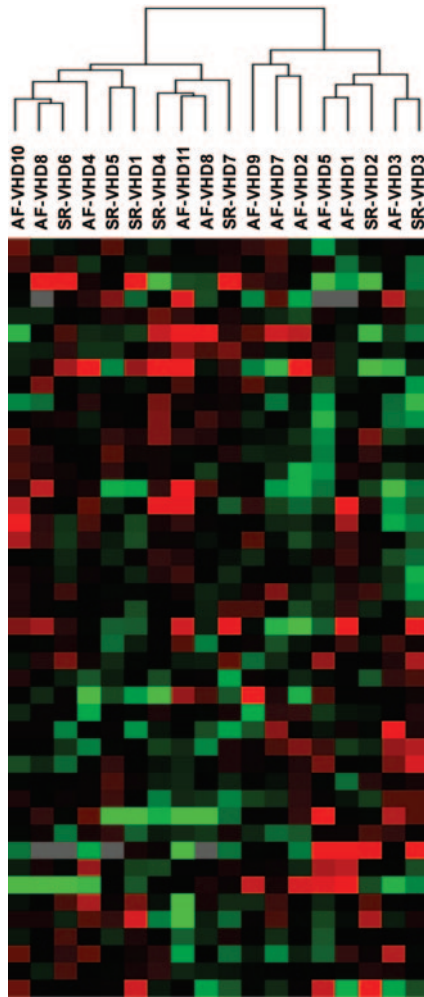


Figure 4. Two-way hierarchical clustering applied to 44 selected genes. Removal of gene clusters A, B, and C in Figure 3 eliminates ability to discriminate AF-VHD from SR-VHD patients, illustrating importance of these clusters. Format as in Figure 3.

impaired basal I_{CaL} . In both SR-VHD and AF-VHD groups, we observed upregulation of calcium-channel γ -subunits Cav γ 4 and Cav γ 7. The physiological functions of these calcium-channel subunits are complex and their role in the heart is unknown,²⁹ but they could contribute to determining L-type calcium-channel function in VHD and AF. Cav3.1 was upregulated in SR-VHD but unchanged in AF-VHD. Although there is some evidence of a role for T-type calcium channels in AF-related remodeling,³⁰ T-type calcium-current density is not altered by atrial tachycardia-induced remodeling.¹³

Our observation of Cx43 upregulation in AF is consistent with observations of Cx43 protein distribution by Elvan et al,³¹ and our observation of reduced Cx40 expression in AF agrees with the elegant experiments of Nao et al³² and Ausma et al.³³ These findings suggest that previously observed connexin-protein changes in AF may be due to transcriptional regulation. However, it should be noted that AF-related connexin expression changes have varied widely across studies, at least in part according to the model used (see Van der Velden and Jongsma³⁴ for review). Upregulation of Cx45

may compensate for the decreases we observed in Cx40, but the role of Cx45 in the atria is unclear. NCX1 was upregulated in AF-VHD (albeit with pronounced interindividual variability) but not in SR-VHD. Upregulation of NCX1 protein has been reported in cardiac samples from AF patients,³⁵ and NCX1 upregulation occurs in an animal model of AF related to congestive heart failure.³⁶

In agreement with previous findings,³⁷ we observed downregulation of Kir3.1 subunit expression in AF patients. Several studies have reported increased inward-rectifier current density in cardiomyocytes isolated from atrial tissues from patients with AF.^{3,7} The cardiac inward rectifier is carried not only by Kir2.1 channels but also by Kir2.2 and Kir2.3.³⁸ In our study, Kir2.1 expression was unmodified in SR-VHD but slightly increased in AF-VHD patients, whereas Kir2.2 and Kir2.3 were upregulated in both SR-VHD and AF-VHD. RT-PCR, protein, and patch-clamp data showed a significant upregulation of Kir2.1 in AF-VHD, suggesting that (1) expression changes were slightly underestimated by the microarray technique, consistent with our previous findings,³⁹ and (2) Kir2.1 is regulated posttranscriptionally. Previous reports have indicated downregulation of Kv4.3 subunit expression in AF patients.^{5,37} Our initial microarray analysis did not show statistically significant Kv4.3 changes in either SR-VHD or AF-VHD groups. However, 2-class statistical analysis and hierarchical clustering indicated a significant contribution of Kv4.3 to the discrimination of SR-VHD from AF-VHD groups, with AF-VHD patients showing lower expression. In addition, real-time RT-PCR showed significant decreases in Kv4.3 expression in AF-VHD.

We are not aware of published studies of ion-channel subunit expression changes in VHD. Le Grand et al¹² showed that (1) L-type calcium-current density was decreased in patients with dilated atria, in agreement with our findings (Figure 1), and (2) transient-outward current was decreased, but to a lesser extent.

Potential Significance of Our Observations

To our knowledge, this is the first study that used gene microarrays to evaluate ion-channel subunit-expression changes associated with AF and VHD. Thijssen et al⁴⁰ examined gene-expression changes in a goat model of AF with the differential display technique, but their approach did not address changes in ion-channel subunits. We obtained 2 principal general findings (1) that VHD produces important changes in cardiac ion-channel gene expression and (2) that discrete ion-channel subunit changes differentiate patients with VHD who develop persistent AF from those who do not. A number of the ion-channel and transporter subunits that are differentially affected in AF patients, including calcium-channel δ -subunits, inositoltrisphosphate receptors, CLCN6 chloride-channels, and a variety of potassium-channel β -subunits, have not previously been reported in AF-related ionic remodeling. Their significance will need to be addressed in further studies. The ion-channel changes differentiating AF-VHD from SR-VHD patients could be a result of AF, which was sustained for at least 1 year before surgery in the AF-VHD group, or could theoretically represent ionic current expression patterns favoring AF development. How-

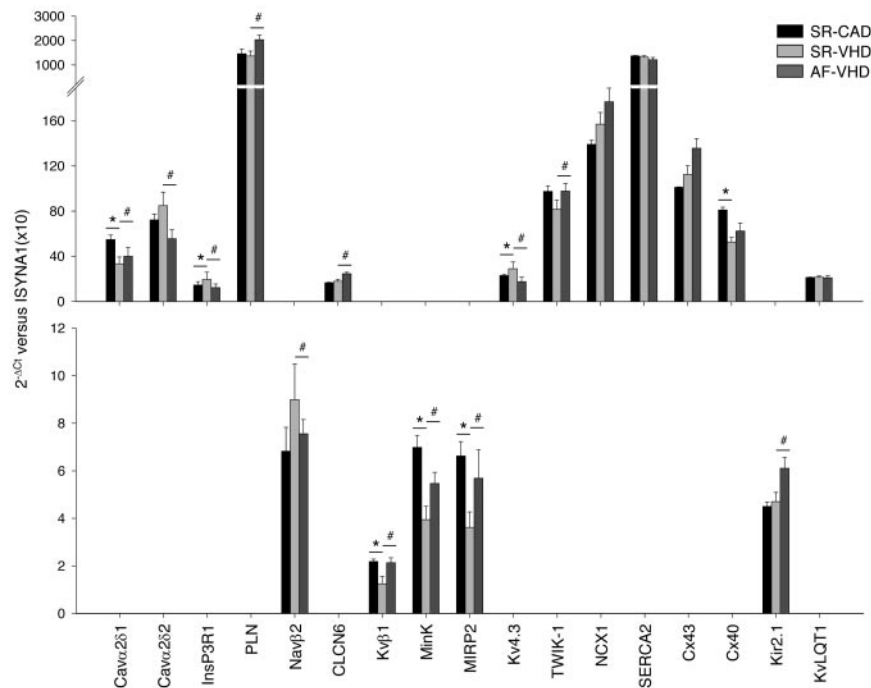


Figure 5. Cardiac ion-channel subunit remodeling evaluated by quantitative real-time PCR. Bar graphs show relative quantification (y axis) of 17 selected genes (x axis). In this figure, as in Figure 8, data are expressed relative to expression of *ISYNA1* ($\times 10$) and are mean $\pm$ SEM from 7 to 11 patients. Top panel shows highly expressed transcripts, whereas bottom panel contains weakly expressed transcripts. Black bars are from SR group, whereas gray bars are from VHD groups. * $P < 0.05$ for SR-VHD vs SR-CAD; # $P < 0.05$ for AF-VHD vs SR-VHD.

ever, our finding that the SRR-VHD group had a gene expression pattern like that of SR-VHD suggests that the specific AF-VHD profile is more likely a result of AF per se than of predisposing factors.

One important observation in our study is the overall similarity in ion-channel and transporter-expression changes in SR-VHD versus AF-VHD groups (Figures 1 and 2). This highlights the need to obtain a disease-matched control group for studies of gene expression changes associated with AF. Many previous studies of AF-associated remodeling have lacked such control groups, making it difficult to know whether the changes observed in the AF population were due to AF or the underlying heart disease.

Study Limitations

Overall, changes in the expression of ion-channel genes were small in amplitude, with the exception of changes in the

L-type Ca^{2+} -channel *Cav1.2* and *Kir3.1* K^{+} -channel transcripts, which were decreased to less than half their control value. However, ion-channel gene expression is finely tuned. A 30% alteration in ion-channel mRNA could have a dramatic effect on cardiomyocyte electrophysiology if it translates into similar alterations at the levels of protein expression and current amplitude.

The AF-specific ionic remodeling described here was obtained in patients with >1 year of sustained arrhythmia. Different durations of AF and paroxysmal forms could produce different alterations. It is well known that the atria are heterogeneous tissues. Therefore, our data obtained in RAA samples may not accurately reflect alterations in the rest of the atria. Furthermore, ion-channel gene-expression changes in thoracic veins like the pulmonary veins,⁴¹ the ligament of Marshall,⁴² and the venae cavae⁴³ may be different from changes in the present study and may be

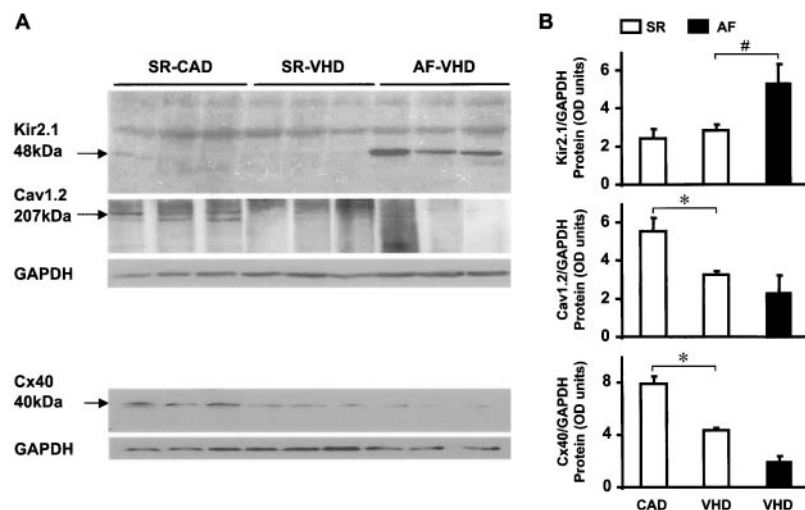


Figure 6. Western blot analysis of key channel proteins in SR-CAD, SR-VHD, and AF-VHD groups. A, Whole-tissue membrane proteins probed with anti-Kir2.1, anti-Cav1.2, and anti-Cx40 antibody. Expected molecular masses are indicated. Lower panels show corresponding glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) bands to which protein results were normalized. B, Mean $\pm$ SEM protein expression values vs GAPDH. * $P < 0.05$ for SR-VHD vs SR-CAD and # $P < 0.05$ for AF-VHD vs SR-VHD, $n = 6$ atrial appendages per group.

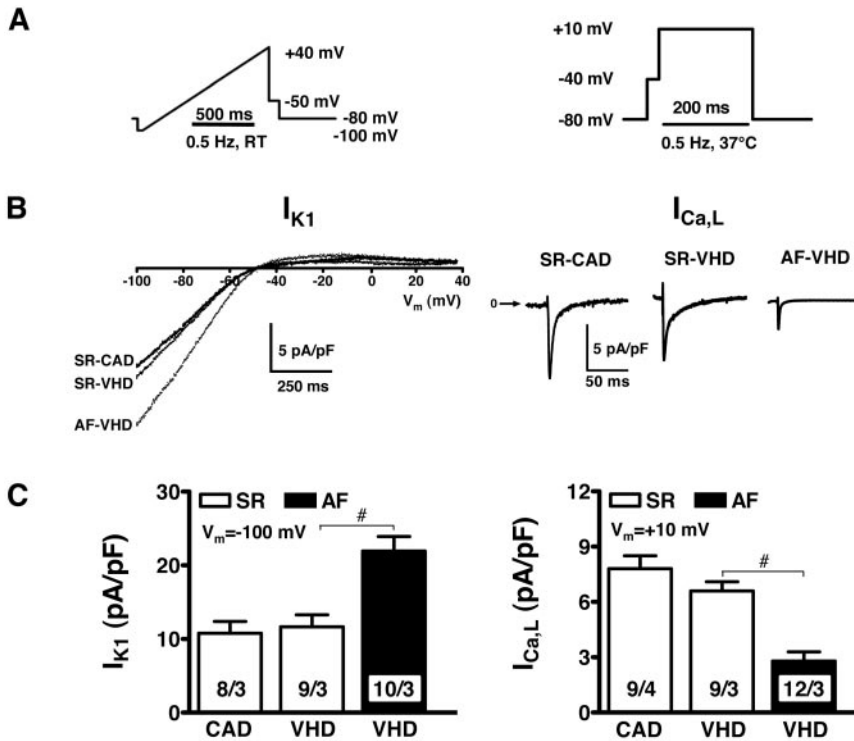


Figure 7. Characterization of I_{K1} and $I_{Ca,L}$ in atrial myocytes from patients in SR-CAD, SR-VHD, and AF-VHD. A, Clamp protocols for I_{K1} and $I_{Ca,L}$. B, Original recordings of I_{K1} (only currents during depolarizing ramps are depicted) and $I_{Ca,L}$. C, Current densities of I_{K1} (at 100 mV) and $I_{Ca,L}$ (at +10 mV). Numbers within columns indicate number of myocytes/patients (# $P < 0.05$ for AF-VHD vs SR-VHD).

important in determining AF occurrence. The LA may better reflect the effects of VHD on ion-channel remodeling, and the impact of VHD on the right atrium, as shown here, may be an underestimate.

It would be practically impossible to confirm all of the gene expression changes we saw with Western blotting and functional studies. We were able to confirm alterations in Kir2.1, CaV1.2, and Cx40. In addition, our transcriptional data for RYR2, PLN, SERCA2, and CASQ2 agree with

Western blot data obtained by Vest et al⁴⁴ and El-Armouche et al (unpublished data). However, these data clearly do not bear on the rest of the transcripts studied.

A final limitation is the fact that our patients in AF were taking a variety of cardioactive drugs, which differed to some extent between SR-VHD and AF-VHD patients. An example is the higher incidence of aspirin treatment in the control group and of fluindone in the AF-VHD group. Although there was no obvious relation between specific drug treatments and

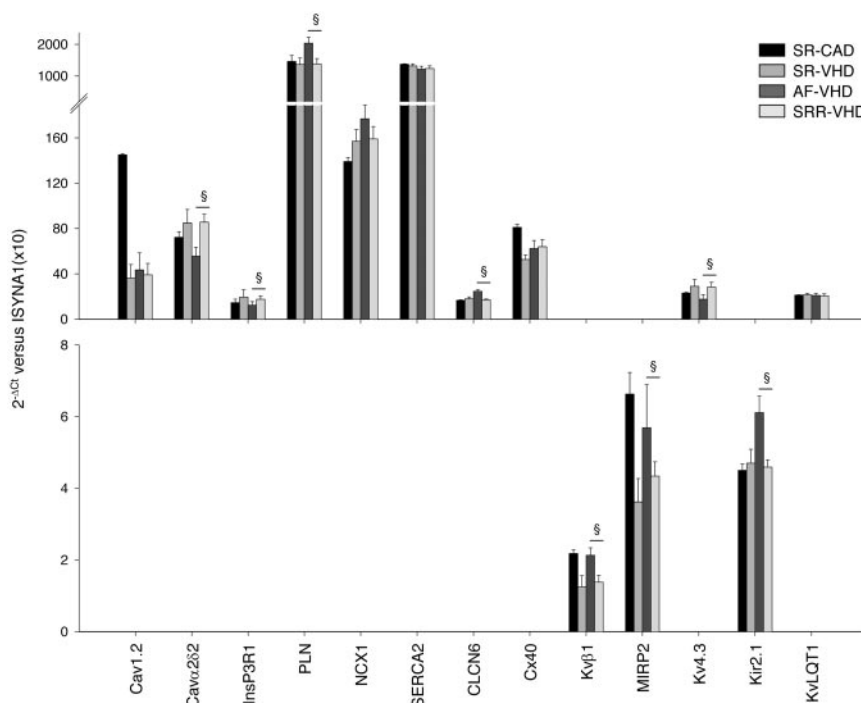


Figure 8. Real-time RT-PCR quantification in SRR-VHD patients. As in Figure 5, data are mean $\pm$ SEM of expression values ($n = 6$ in SRR-VHD group) and are expressed as ratio vs *ISYNA1* ($\times 10$). § $P < 0.05$ for AF-VHD vs SRR-VHD.

ion-channel expression pattern, as assessed with clustering, we cannot exclude some influence of these inevitable differences in drug therapy between patients in SR and those in AF.

The remodeling changes due to SR-VHD might be expected to parallel those in animal models of congestive heart failure³⁶ and those associated specifically with AF-VHD to parallel those in models of atrial tachycardia remodeling.^{4,27} Although there are many similarities, there are also differences that could be due to species differences, discrepancies in the precise form of heart disease and its duration, and drug therapy effects in the clinical population. In addition, tachycardia-related remodeling is altered by concomitant heart failure, so that tachycardia-induced ionic remodeling in a pathological substrate may differ from what is seen in the normal heart, as in experimental paradigms.⁴⁵

Acknowledgments

This study was supported by special grants from Ouest genopole, INSERM, CNRS, Ministère français de la Recherche (ACI), Canadian Institutes of Health Research, Quebec Heart and Stroke Foundation, Bundes Ministerium für Bildung und Forschung, and the Deutsche Forschungsgemeinschaft. The authors thank Martine Le Cunff, Isabelle Guisle, Catherine Chevalier, Jean-Marie Heslan, Evelyn Landry, Annegret Häntzschel, Trautlinde Thurm, and Ulrike Heinrich for their excellent technical assistance.

References

- Benjamin EJ, Wolf PA, D'Agostino RB, Silbershatz H, Kannel WB, Levy D. Impact of atrial fibrillation on the risk of death: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 1998;98:946–952.
- Nattel S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature*. 2002;415:219–226.
- Bosch RF, Zeng X, Grammer JB, Popovic K, Mewis C, Kuhlkamp V. Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*. 1999;44:121–131.
- Yue L, Feng J, Gaspo R, Li GR, Wang Z, Nattel S. Ionic remodeling underlying action potential changes in a canine model of atrial fibrillation. *Circ Res*. 1997;81:512–525.
- Grammer JB, Bosch RF, Kuhlkamp V, Seipel L. Molecular remodeling of Kv4.3 potassium channels in human atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2000;11:626–633.
- Van Wagoner DR, Pond AL, McCarthy PM, Trimmer JS, Nerbonne JM. Outward K⁺ current densities and Kv1.5 expression are reduced in chronic human atrial fibrillation. *Circ Res*. 1997;80:772–781.
- Dobrev D, Graf E, Wettwer E, Himmel HM, Hala O, Doerfel C, Christ T, Schuler S, Ravens U. Molecular basis of downregulation of G-protein-coupled inward rectifying K(+) current (I(K,ACh) in chronic human atrial fibrillation: decrease in GIRK4 mRNA correlates with reduced I(K,ACh) and muscarinic receptor-mediated shortening of action potentials. *Circulation*. 2001;104:2551–2557.
- Brundel BJ, Henning RH, Kampinga HH, Van Gelder IC, Crijns HJ. Molecular mechanisms of remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*. 2002;54:315–324.
- Van Wagoner DR, Nerbonne JM. Molecular basis of electrical remodeling in atrial fibrillation. *J Mol Cell Cardiol*. 2000;32:1101–1117.
- Nattel S, Li D. Ionic remodeling in the heart: pathophysiological significance and new therapeutic opportunities for atrial fibrillation. *Circ Res*. 2000;87:440–447.
- Kannel WB, Wolf PA, Benjamin EJ, Levy D. Prevalence, incidence, prognosis, and predisposing conditions for atrial fibrillation: population-based estimates. *Am J Cardiol*. 1998;82:2N–9N.
- Le Grand BL, Hatem S, Deroubaix E, Couetil JP, Coraboeuf E. Depressed transient outward and calcium currents in dilated human atria. *Cardiovasc Res*. 1994;28:548–556.
- Van Wagoner DR, Pond AL, Lamorgese M, Rossie SS, McCarthy PM, Nerbonne JM. Atrial L-type Ca²⁺ currents and human atrial fibrillation. *Circ Res*. 1999;85:428–436.
- Le Meur N, Lamirault G, Bihoué A, Steenman M, Bedrine-Ferran H, Teusan R, Ramstein G, Leger JJ. A dynamic, web-accessible resource to process raw microarray scan data into consolidated gene expression values: importance of replication. *Nucleic Acids Res*. 2004;32:5349–5358.
- Tseng GC, Oh MK, Rohlin L, Liao JC, Wong WH. Issues in cDNA microarray analysis: quality filtering, channel normalization, models of variations and assessment of gene effects. *Nucleic Acids Res*. 2001;29:2549–2557.
- Yang YH, Dudoit S, Luu P, Lin DM, Peng V, Ngai J, Speed TP. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res*. 2002;30:e15.
- Iglewicz B, Hoaglin DC. *How to Detect and Handle Outliers*. Milwaukee, Wis: American Society for Quality Control; 1993.
- Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionising radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:5116–5121.
- Smyth GK, Yang YH, Speed T. Statistical issues in cDNA microarray data analysis. *Methods Mol Biol*. 2003;224:111–136.
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:14863–14868.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*. 2001;25:402–408.
- Zicha S, Xiao L, Stafford S, Cha TJ, Han W, Varro A, Nattel S. Transmural expression of transient outward potassium current subunits in normal and failing canine and human hearts. *J Physiol*. 2004;561:735–748.
- Dobrev D, Wettwer E, Himmel HM, Kortner A, Kuhlisch E, Schuler S, Siffert W, Ravens U. G-protein β_3 -subunit 825T-allele is associated with enhanced human atrial inward rectifier potassium currents. *Circulation*. 2000;102:692–697.
- Christ T, Boknik P, Wohrl S, Wettwer E, Graf EM, Bosch RF, Knaut M, Schmitz W, Ravens U, Dobrev D. Reduced L-type Ca²⁺ current density in chronic human atrial fibrillation is associated with increased activity of protein phosphatases. *Circulation*. 2004;110:2651–2657.
- Grammer JB, Zeng X, Bosch RF, Kuhlkamp V. Atrial L-type Ca²⁺-channel, β -adrenoreceptor, and 5-hydroxytryptamine type 4 receptor mRNAs in human atrial fibrillation. *Basic Res Cardiol*. 2001;96:82–90.
- Lai LP, Su MJ, Lin JL, Lin FY, Tsai CH, Chen YS, Huang SK, Tseng YZ, Lien WP. Down-regulation of L-type calcium channel and sarcoplasmic reticular Ca²⁺-ATPase mRNA in human atrial fibrillation without significant change in the mRNA of ryanodine receptor, calsequestrin and phospholamban: an insight into the mechanism of atrial electrical remodeling. *J Am Coll Cardiol*. 1999;33:1231–1237.
- Yue L, Melnyk P, Gaspo R, Wang Z, Nattel S. Molecular mechanisms underlying ionic remodeling in a dog model of atrial fibrillation. *Circ Res*. 1999;84:776–784.
- Christ T, Boknik P, Wohrl S, et al. L-type Ca²⁺ current downregulation in chronic human atrial fibrillation is associated with increased activity of protein phosphatases. *Circulation*. 2004;110:2651–2657.
- Kang MG, Campbell KP. γ -Subunit of voltage-activated calcium channels. *J Biol Chem*. 2003;278:21315–21318.
- Fareh S, Benardeau A, Thibault B, Nattel S. The T-type Ca²⁺ channel blocker mibefradil prevents the development of a substrate for atrial fibrillation by tachycardia-induced atrial remodeling in dogs. *Circulation*. 1999;100:2191–2197.
- Elvan A, Huang XD, Pressler ML, Zipes DP. Radiofrequency catheter ablation of the atria eliminates pacing-induced sustained atrial fibrillation and reduces connexin 43 in dogs. *Circulation*. 1997;96:1675–1685.
- Nao T, Ohkusa T, Hisamatsu Y, Inoue N, Matsumoto T, Yamada J, Shimizu A, Yoshiga Y, Yamagata T, Kobayashi S, Yano M, Hamano K, Matsuzaki M. Comparison of expression of connexin in right atrial myocardium in patients with chronic atrial fibrillation versus those in sinus rhythm. *Am J Cardiol*. 2003;91:678–683.
- Ausma J, van der Velden HM, Lenders MH, van Ankeren EP, Jongsma HJ, Ramaekers FC, Borgers M, Allesie MA. Reverse structural and gap-junctional remodeling after prolonged atrial fibrillation in the goat. *Circulation*. 2003;107:2051–2058.
- Van der Velden HM, Jongsma HJ. Cardiac gap junctions and connexins: their role in atrial fibrillation and potential as therapeutic targets. *Cardiovasc Res*. 2002;54:270–279.
- Schotten U, Greiser M, Benke D, Buerkel K, Ehrenteidt B, Stellbrink C, Vasquez-Jimenez JF, Schoendube F, Hanrath P, Allesie M. Atrial

- fibrillation-induced atrial contractile dysfunction: a tachycardiomyopathy of a different sort. *Cardiovasc Res.* 2002;53:192–201.
36. Li D, Melnyk P, Feng J, Wang Z, Petrecca K, Shrier A, Nattel S. Effects of experimental heart failure on atrial cellular and ionic electrophysiology. *Circulation.* 2000;101:2631–2638.
 37. Brundel BJ, Van Gelder IC, Henning RH, Tuinenburg AE, Wietses M, Grandjean JG, Wilde AA, Van Gilst WH, Crijns HG. Alterations in potassium channel gene expression in atria of patients with persistent and paroxysmal atrial fibrillation: differential regulation of protein and mRNA levels for K⁺ channels. *J Am Coll Cardiol.* 2001;37:926–932.
 38. Dhamoon AS, Pandit SV, Sarmast F, Parisian KR, Guha P, Li Y, Bagwe S, Taffet SM, Anumonwo JM. Unique Kir2.x properties determine regional and species differences in the cardiac inward rectifier K⁺ current. *Circ Res.* 2004;94:1332–1339.
 39. Le Bouter S, El Harchi A, Marionneau C, Bellocq C, Chambellan A, van Veen T, Boixel C, Gavillet B, Abriel H, Le Quang K, Chevalier JC, Lande G, Leger JJ, Charpentier F, Escande D, Demolombe S. Chronic amiodarone remodels expression of ion channel transcripts in the mouse heart. *Circulation.* 2004;110:3028–3035.
 40. Thijssen VL, van der Velden HM, van Ankeren EP, Ausma J, Allesie MA, Borgers M, van Eys GJ, Jongsma JH. Analysis of altered gene expression during sustained atrial fibrillation in the goat. *Cardiovasc Res.* 2002;54:427–437.
 41. Nattel S. Basic electrophysiology of the pulmonary veins and their role in atrial fibrillation: precipitators, perpetuators, and perplexers. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2003;14:1372–1375.
 42. Hwang C, Wu TJ, Doshi RN, et al. Vein of marshall cannulation for the analysis of electrical activity in patients with focal atrial fibrillation. *Circulation.* 2000;101:1503–1505.
 43. Tsai CF, Tai CT, Hsieh MH, Lin WS, Yu WC, Ueng KC, Ding YA, Chang MS, Chen SA. Initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating from the superior vena cava: electrophysiological characteristics and results of radiofrequency ablation. *Circulation.* 2000;102:67–74.
 44. Vest JA, Wehrens XH, Reiken SR, Lehnart SE, Dobrev D, Chandra P, Danilo P, Ravens U, Rosen MR, Marks AR. Defective cardiac ryanodine receptor regulation during atrial fibrillation. *Circulation.* 2005;111:2025–2032.
 45. Cha TJ, Ehrlich JR, Zhang L, Nattel S. Atrial ionic remodeling induced by atrial tachycardia in the presence of congestive heart failure. *Circulation.* 2004;110:1520–1526.

CLINICAL PERSPECTIVE

Remodeling of atrial ion-channel expression occurs in atrial fibrillation (AF) and may play an important role in its maintenance. Changes in ion-channel function have potentially significant implications for designing more effective and specific antiarrhythmic drug therapy for AF. In this study, we applied gene microarray technology to examine the expression of a wide range of cardiac ion channel and transporter genes in atrial tissues from patients with no atrial disease undergoing routine coronary-bypass surgery and valvular heart disease (VHD) patients in sinus rhythm (VHD-SR) or with longstanding AF (VHD-AF) undergoing valve-replacement surgery. We found substantial ion-channel gene-expression changes in both VHD-SR and VHD-AF, with roughly two thirds of remodeled genes being common to both; however, there was also a specific pattern of gene-expression change characteristic of VHD-AF, including several ion-channel genes not previously known to be remodeled in AF. Our study shows that VHD substantially affects ion-channel expression, emphasizing the importance of disease-matched controls for any AF-remodeling study, and that there is a pattern of ion-channel gene-expression change specifically related to AF. These findings have potentially important implications for understanding how VHD leads to AF, how AF alters cardiac ion-channel function, and how to design improved ion channel–modulating antiarrhythmic drug targets for AF patients.

2. Signature transcriptionnelle associée au syndrome de Brugada chez l'homme (*article 4, page 177*)

a. Introduction

Le syndrome de Brugada est associé à une augmentation du risque d'arythmies ventriculaires à l'origine d'épisodes de syncope et de mort subites. Il se transmet de manière autosomique dominante et est lié dans environ 20% des cas à des mutations du gène *SCN5A* (Schulze-Bahr *et al.*, 2003). Le profil électrocardiographique typique (élévation du segment ST) est à la base du diagnostic de ce syndrome (Wilde *et al.*, 2002). Cependant, il est fréquemment difficile car (i) le profil ECG est dynamique et souvent caché, (ii) la pénétrance de la mutation *SCN5A* est faible et (iii) les patients porteurs d'une mutation sont souvent asymptomatiques. Actuellement, des bloqueurs des canaux sodiques sont utilisés pour démasquer le phénotype, cependant la spécificité de leurs effets reste incertaine (Wilde *et al.*, 2002).

Le syndrome de Brugada est donc une canalopathie qui affecte un gène clé de la conduction cardiaque et de l'arythmogénèse. Nous avons fait l'hypothèse que cette pathologie pourrait s'accompagner d'un remodelage de l'expression des canaux ioniques, comme mécanisme moléculaire compensateur. Nous avons utilisé la technique de RT-PCR quantitative à haut-débit (*Low Density Arrays*) qui permet d'analyser des échantillons biologiques de très petite taille. Nous avons ainsi obtenu le profil transcriptionnel de biopsies septales endomyocardiques du ventricule droit de 11 patients atteints du syndrome de Brugada, et de deux groupes contrôles. Dans le premier groupe contrôle (Ctl1), les échantillons tissulaires ont été obtenus par dissection chirurgicale de cœurs de 11 donneurs d'organes, et dans le deuxième groupe contrôle (Ctl2), le prélèvement de deux biopsies a été fait par cathétérisme chez 7 patients récemment transplantés. Nous avons analysé le profil d'expression de 81 gènes codant des canaux ioniques et des sous-unités régulatrices de l'homéostasie calcique.

b. Résultats

La technique de classification hiérarchique a permis de séparer les patients Brugada des deux groupes contrôles. Par conséquent, les différences dans le profil d'expression des canaux ioniques permettent à elle-seules de discriminer ces trois groupes de patients (Figure 1, article 4).

Quinze gènes présentent une expression différentielle entre les patients Brugada et les deux groupes de patients contrôles. Parmi eux, on trouve les canaux sodiques Nav1.5 dont l'expression est diminuée chez les patients Brugada, ainsi que Nav1.3 et Nav2.1 dont l'expression est augmentée. Le profil transcriptionnel des patients Brugada se caractérise

c. Conclusion et discussion

Parmi les variations transcriptionnelles associées au syndrome de Brugada, l'augmentation d'expression du canal sodique Nav2.1 (*SCN6A* ou *SCN7A*) est d'une importance potentielle. En effet, dans le cœur humain, son niveau d'expression est similaire à celui de Nav1.5, cependant son rôle reste encore à être identifié. Par ailleurs, l'expression du canal calcique de type T, Cav3.1 (*CACNA1G*), potentiellement impliqué dans la conduction (Mangoni *et al.*, 2006), est elle aussi augmentée chez les patients atteints du syndrome de Brugada. Enfin, parmi les canaux potassiques, les variations transcriptionnelles les plus importantes sont celles de TWIK1 et de TASK2, dont l'expression est augmentée dans le syndrome de Brugada. Dans le cœur humain, TWIK1 est plus exprimé que TASK2. Il produit un courant de faible amplitude qui ne s'inactive pas, et pourrait donc participer au courant potassique de fond dans les cellules cardiaques.

L'origine du syndrome de Brugada est associé au myocarde sous-épique droit (Antzelevitch *et al.*, 2003). Etant donné que cette étude porte sur le septum endomyocardique, la signification physiopathologique de ce remodelage ionique est difficile à établir. Cependant, la signature moléculaire est commune chez les patients porteurs d'une mutation *SCN5A* et chez les patients non porteurs. Par conséquent, on peut suggérer que la génomique pourrait à l'avenir devenir un argument de choix pour le diagnostic de ce syndrome. Cette perspective est discutée à la fin de la thèse (Discussion générale, page 217).

Annexe : liste des essais TaqMan utilisés pour ce projet.

Cette étude montre pour la première fois que la génomique pourrait participer au diagnostic d'un syndrome arythmique.

Abstract

Background. The Brugada syndrome is an inherited arrhythmia syndrome associated with a high risk for sudden cardiac death. Diagnosis of Brugada syndrome is made by a unique electrocardiographic pattern in the right precordial leads. However, in many cases, the diagnosis of the syndrome remains uncertain and mutation detection in the cardiac sodium channel gene *SCN5A* is helpful in only $\approx 20\%$ of probands.

Methods and Results. In order to identify novel molecular markers for Brugada syndrome, we performed transcriptional profiling in right ventricular septal endomyocardial biopsies from 11 unrelated probands with Brugada syndrome, 11 non-diseased organ donors and 7 patients early after heart transplantation. When analyzed for 81 genes encoding ion channel and transporter subunits, hierarchical clustering showed that patients with Brugada syndrome clustered separately from the two control groups and fully discriminated Brugada syndrome patients from controls based on transcriptional profiles. Fifteen genes showed differential expression between Brugada syndrome and both control groups. These included Nav1.5 which was down-regulated, and Nav1.3 and Nav2.1, which were up-regulated in Brugada syndrome. Also typical for Brugada syndrome was an up-regulation of Cx43 and the T-type Ca^{2+} channel α -subunit Cav3.1. Alterations in the expression of transcripts involved in Ca^{2+} -homeostasis included up-regulation of RYR2. Among K^{+} channel genes, the two-pore domain channel genes TWIK1 and TASK2 were up-regulated in Brugada syndrome. The molecular profile of the 5 Brugada syndrome patients with a mutation in *SCN5A* did not differ from that of the remaining 6 patients without a *SCN5A* mutation.

Conclusions. We conclude that patients with Brugada syndrome exhibit a common ionic molecular signature irrespective of the culprit gene. We provide first evidence that genomics with transcriptional profiling may become a diagnostic tool in an arrhythmia syndrome.

Key Words: Brugada syndrome, genomics, ion channels, arrhythmia, diagnosis, transcriptional profiling

Introduction

The Brugada syndrome is a new syndrome first described in 1992.¹ The syndrome associates a typical ECG pattern (ST segment elevation in the right precordial leads) with an increased risk of life-threatening ventricular arrhythmias.² It is inherited as an autosomal dominant trait and is linked in $\approx$ 20% of the cases to mutations in the *SCN5A* gene encoding the pore-forming α -subunit of the cardiac sodium channel.³ In many cases, the diagnosis of the Brugada syndrome is difficult because the penetrance is low, gene carriers are often asymptomatic and the ECG pattern is dynamic and often concealed.² Pharmacological challenge has been proposed to unmask the phenotype with sodium channel blockers such as flecainide, ajmaline, and procainamide, although the specificity of this effect has been questioned.²

The Brugada syndrome is a channelopathy affecting a key gene involved in cardiac conduction and arrhythmogenesis. We therefore hypothesized that the disease could remodel ion channel gene expression in the myocardium as a result of compensatory molecular mechanisms. Novel methods to accurately investigate the expression of hundreds of transcripts in very small size biological samples have recently been developed.⁴ Here, we used these methods to obtain full profiling of ion channel expression in right ventricular septal endomyocardial biopsies from patients with Brugada syndrome. Hierarchical clustering demonstrated complete discrimination between endomyocardial tissues from patients with Brugada syndrome and those from two groups of control subjects, in which normal endomyocardial tissue from the right ventricular septum was obtained by either surgical dissection (donor hearts) or a catheter-based bioprobe during right heart catheterization (recently transplanted hearts). We observed no difference between patients genotyped with a *SCN5A* mutation and those not carrying a *SCN5A* mutation. Thus, patients with Brugada syndrome share a common molecular signature irrespective of the culprit gene. With these results, we provide the first evidence that genomics with transcriptional profiling may be helpful in the diagnosis of an arrhythmia syndrome.

Materials and Methods

Samples

From October 2004 to December 2005, right ventricular endomyocardial biopsies from 11 unrelated consecutive patients with suspected Brugada syndrome were collected at the Department of Cardiology and Angiology, Hospital of the University of Münster, Germany. Biopsies were sampled through a percutaneous and transvenous route, from the right side of the ventricular septum of 10 male and 1 female patients suspected as having the Brugada syndrome. The indication to perform endomyocardial biopsy was to exclude structural heart disease, in particular arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Additional samples were taken for research purposes after written informed consent was obtained. All procedures followed institutional guidelines and were approved by the local ethics committee within a broader research project. The final diagnosis of Brugada syndrome was made according to the most up-to-date standards.² The clinical characteristics of the study population are summarized in Table 1. Patient #XI was considered as borderline because of discrete ST-elevation in right precordial ECG leads, unspecific for Brugada syndrome. Patients were genotyped by direct sequencing of all coding exons of the *SCN5A* gene as previously described.³ At least 5 biopsies, 1–2 mm cube, were collected per patient. Three samples from various areas of the right ventricle were fixed for histological analyses. The remaining samples, taken from the right ventricular septum, were immediately frozen in liquid nitrogen and then stored at -80°C. Two biopsy samples were pooled and used for molecular profiling. Biopsies were collected at distance from the arrhythmic episode. Histological examination showed nonspecific fatty tissue invasion in 1 of 3 samples from patient #X. Patient #II had mild focal interstitial fibrosis whereas patient #III had focal interstitial fibrosis with borderline myocyte hypertrophy in adjacent areas. Histology was completely normal in all other cases. No patient showed signs of inflammation or arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy.

We used two distinct control groups, which were both matched in age and sex with the study group of Brugada syndrome patients. Control group 1 (Ctl-1) consisted of non-diseased endomyocardial tissues of hearts from organ donors, collected at the University of Szeged, Hungary. Hearts were explanted to collect pulmonary and aortic valves for transplant surgery. Donors did not receive medication except dobutamine, furosemide and plasma expanders. The investigations performed conform to the principles outlined in the Helsinki Declaration of the World Medical Association. All experimental protocols were approved by the Ethical Review Board of the Medical Center of the University of Szeged, Hungary (No. 51-57/1997 OEJ). Cardiac tissues dissected from the 11 donors were stored in cardioplegic solution at 4°C for 4~8 h. Endomyocardial slices of 1 mm thickness were carefully cut from the right-sided ventricular septum and then frozen in liquid nitrogen.⁵ Ctl-1

group has the remarkable advantage of representing normal human cardiac tissues. However, the dissection procedure differed somewhat from that used to collect the endomyocardial samples in Brugada syndrome. In particular, variable depth of the scalpel biopsy may include variable relative amounts of endocardium. Control group 2 (Ctl-2) consisted of endomyocardial samples from the right ventricular septum, obtained with a catheter bioprobe during right heart catheterization in 7 patients early (<1 month) after cardiac transplantation, presenting no clinical signs of graft rejection. The samples were taken at the time of our routine post-transplantation follow-up biopsy procedure. Thus, the endomyocardial samples in Brugada syndrome and Ctl-2 were taken using strictly the same biopsy catheter protocol. However, transplanted hearts cannot be considered as completely normal because of the immune reaction developed by the recipient and because of the active immunosuppressive therapy received by the patients.

I. RNA preparation

Total RNA from each cardiac sample was isolated and DNase-treated with the RNeasy Fibrous Tissue Micro Kit (Qiagen) following manufacturer's instructions. The quality of total RNA was assessed with polyacrylamide-gel micro-electrophoresis (Agilent 2100 Bioanalyzer) and by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Lack of genomic DNA-contamination was verified by PCR.

J. TaqMan real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction

TaqMan low-density arrays (TLDA, Applied Biosystems) were used in a two-step RT-PCR process, as previously reported.⁴ Briefly, first-strand cDNA was synthesized from 200 ng of total RNA using the High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). PCR reactions were then performed on TLDA with the ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). The 384 wells of each card were pre-loaded with 96 x 4 pre-designed fluorogenic TaqMan probes and primers. Probes were labeled with the fluorescent reporter 6-carboxyfluorescein (FAM[®], Applied Biosystems) at the 5'-end and with non-fluorescent quencher on the 3'-end. The genes selected for their cardiac expression (listed in the supplemental data) encode 67 α - and β -ion channel subunits, 17 Na⁺/K⁺-ATPase isoforms and proteins involved in calcium homeostasis, 8 markers (ANF, BNP, β -MHC, CD4, CNN1, COL6A1, IL6, UCHL1) and 4 reference genes for normalization. Data were collected with instrument spectral compensation with Applied Biosystems SDS 2.1 software and analyzed with the threshold cycle (Ct) relative-quantification method.⁶ All fluorescent probes had 100% PCR efficiency (Applied Biosystems application note). This standardized method permits comparison of expression levels among cardiac biopsies and among genes. We selected the hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (*HPRT*) gene for data normalization, as the most uniformly distributed gene. The relative expression of each gene *versus* HPRT was calculated for each biopsy ($2^{-\Delta Ct}$

indicates normalized data). Medians $\pm$ MAD in each group are listed in the supplemental data. Three genes (Cav γ 4, Cav γ 6, Kv1.1) were eliminated for lack of detection ($> 50\%$ of undetermined data). Among the conserved genes, fourteen genes exhibited a maximum of 7% of undetermined data. The remaining (67 genes) exhibited no undetermined data point.

Data Analysis

Data were analyzed independently according to two distinct procedures: (i) two-way hierarchical agglomerative clustering was applied to the gene-expression matrix consisting of 18, 22 and 29 biopsies and the 81 genes involved in electrical signaling. The input consisted of the Δ Ct for each gene and biopsy. We applied average linkage clustering with uncentered correlation using the Cluster software.⁷ Clusters were visualized using the Treeview software; (ii) the Significance Analysis of Microarrays (SAM version 2023A)⁸ was used to assess the significance of the difference in median expression across Brugada patients and Ctl-1 and Ctl-2 groups. We assigned a score on the basis of a Wilcoxon test to each gene. Genes with a score greater than the user-defined threshold were selected. Repeated random sample permutations were performed to estimate the percentage of genes identified by chance (false-discovery rate) among the selected genes. We arbitrarily fixed the false-discovery rate $<0.5\%$ (corresponding to less than one falsely-discovered gene out of 81 selected genes). A q -value of less than 0.05 indicated statistical significance. For the genes with statistical differences between Brugada syndrome and both control groups, the ratio *versus* the median of each control group was calculated.

Results

Hierarchical clustering analysis

Our success rate to obtain expression data from each individual patient was 100% with the use of two pooled biopsies. Two-way hierarchical clustering analysis groups samples according to gene-expression similarities, with the most similar expression patterns located closest to each other and the most different patterns furthest apart. For visual appreciation, the samples are linked to a tree. The size of tree branches indicates the distance between clusters: larger branch sizes indicate greater separation among clusters. Hierarchical clustering analysis applied to 81 genes and to 29 samples from Brugada syndrome and control subjects (Figure 1, top panel) showed clear separation between Brugada syndrome samples on one branch, Ctl-1 and Ctl-2 samples on the other, demonstrating full discrimination of Brugada syndrome from control samples based on the expression of genes involved in the electrical activity and intracellular calcium homeostasis of the heart. One exception to this separation was patient #XI who had a borderline phenotype of Brugada syndrome and positioned among Ctl-2 samples, whether Brugada samples were compared with Ctl-1 and Ctl-2 biopsies (Figure 1, top panel) or with Ctl-2 samples only (Figure 1, bottom right panel). Also, the control biopsy Ctl-2A intermingled with Brugada syndrome samples. Within the group of Brugada syndrome, patients carrying a *SCN5A* mutation (#I, #II, #III, #IV, and #VI) did not cluster separately from those not carrying a *SCN5A* mutation. Five selected clusters containing genes relevant to discriminate Brugada patients from controls are indicated. Gene-groups A, B and C were more strongly expressed in Brugada patients, whereas the opposite was seen for Groups D and E.

Differentially expressed genes in Brugada syndrome tissues

Since we used two distinct control groups, two collections of genes differentially expressed in Brugada syndrome hearts were identified: one reaching significance against Ctl-1 (n=39 genes) and the other against Ctl-2 (n=23 genes). A presentation of all genes assayed and results of comparisons are available in the supplemental data. Figures 2-4 illustrate 15 genes showing differential expression both against Ctl-1 and Ctl-2. This conservative analysis was chosen since both control groups had their inherent limitations. Brugada syndrome samples showed slight but significant down-expression of Nav1.5 transcripts whereas Nav1.3 (a neuronal type Na⁺ channel) and Nav2.1 (a Na⁺ channel with unknown function) transcripts were clearly up-regulated (Figure 2). Among the five patients positive for *SCN5A*, two with a premature protein truncation (#II and #IV) had clearly reduced Nav1.5 transcripts (-53 and -44% *versus* Ctl-2) whereas the three others (#I, #III and #VI), all without a premature protein truncation, had normal Nav1.5 expression (+2, -4 and +8%). Interestingly, the two patients with Brugada syndrome and reduced Nav1.5 with a premature protein truncation exhibited markedly increased Nav1.3 (+71 and +71%) whereas the three others with normal Nav1.5 expression

had less increased Nav1.3 (+28, +20 and +30%). Of notice, ankyrin-B was not differentially expressed in Brugada syndrome biopsies. Cx43 expression was increased in tissues from Brugada syndrome patients, particularly when the comparison was made with non-diseased right ventricular septal tissue. The T-type Ca^{2+} channel Cav3.1, as well as the Ca^{2+} channel regulator Cav α 2 δ 2, were up-regulated (Figure 3). Concerning other genes from the Ca^{2+} homeostasis, the ryanodine receptor RYR2 was up-regulated in Brugada syndrome samples whereas the Ca-ATPase type 4 was slightly down-regulated. Among K^{+} channel genes, the most remarkable alterations consisted in up-regulation of Kv1.2 and up-regulation of the 2P-domain genes TWIK1 and TASK2 (Figure 4).

Figure 5 illustrates the relative abundance and variability in the control groups for the 15 genes showing differential expression in Brugada syndrome samples.

Discussion

We present the first report on transcriptional profiling in patients with Brugada syndrome that clearly discriminates the right ventricular myocardium of Brugada patients from controls. Clustering analysis groups patients with Brugada syndrome in a common cluster distinct from that of right ventricular septal biopsies from normal hearts or from transplanted hearts. The findings demonstrate consistent differences in ion channel and Ca^{2+} regulator gene expression. Success of biological samples clustering is not guaranteed. As an example, epicardial and endocardial tissue samples from non-diseased human hearts intermingled, with no distinct separation. Similarly, samples from left *versus* right ventricles did not separate. These findings indicate that differences of ion-channel gene subunit expression are too small to discriminate myocardial tissues sampled from the endocardium *versus* the epicardium or from left- *versus* the right ventricles (Gaborit N. *et al.*, unpublished data).

We tentatively interpreted gene expression differences that characterized Brugada syndrome biopsies as resulting from compensatory molecular remodeling. The usual pathophysiological sequence to explain the Brugada syndrome comprises an increased fast component of the transient outward current in the epicardium, which in front of a reduced Na^+ current may cause early repolarization, loss of the action potential dome, marked abbreviation of the action potential duration, and phase 2 re-entry.⁹ Furthermore, Brugada syndrome related to *SCN5A* exhibit patent conduction anomalies resulting from partial loss of the major cardiac Na^+ channel.¹⁰ Because our study was limited to the endomyocardium however, the pathophysiological significance of the observed electrical remodeling remains difficult to establish. In our samples, compensatory molecular remodeling particularly concerns Na^+ channel, T-type Ca^{2+} channel and connexin 43 transcripts. The most impressive transcriptional regulation was increased expression of Nav2.1 (*SCN6A* or *SCN7A*) transcripts. Nav2.1 channels first identified in the human heart by Al George *et al.*¹¹ express both in neuronal and muscular tissues. This atypical sodium channel is only 50% identical to Nav1.x channels.¹² All attempts to express functional Nav2.1 channels using heterologous expression systems such as *Xenopus* oocytes, Chinese hamster ovary cells, and human embryonic kidney 293 cells have been unsuccessful,^{13,14} suggesting the requirement of an as yet unidentified partner. The human heart expresses Nav1.5 and Nav2.1 transcripts in comparable abundance. Na^+ channel subunit mRNA species expressed in the human heart include Nav1.5 $\approx$ Nav2.1 $>$ Nav β 1 $>$ Nav β 2 $>>>$ Nav β 3 $\approx$ Nav1.3. Obviously, the role of Nav2.1 channels in the heart muscle should be the subject of future investigations. Also potentially involved in conduction is the T-type Ca^{2+} channel Cav3.1 (α 1G) which is up-regulated in endomyocardial tissue of patients with Brugada syndrome. Concerning K^+ channel genes, the most remarkable remodeling in relation to Brugada syndrome was up-regulation of the tandem-pore TWIK1 and TASK2 channel transcripts. In the human heart, TWIK1 expresses at much higher levels than TASK2. When reconstituted in heterologous expression systems, TWIK1 produces quasi-instantaneous and non-inactivating K^+ currents of weak amplitude, which may participate to the background K^+ conductance in cardiac cells.¹⁵

Study limitation

Obtaining normal samples from the human heart has always been a difficult challenge. This has for long hampered the description of the normal physiology of the human heart. To circumvent this classical difficulty, we used two control groups, one consisting of normal tissue although sampled with a different procedure and the other consisting of less normal tissue from allograft transplants sampled with the same procedure. Alterations in gene expression as reported in the present article were only considered when consistent variations were obtained vis-à-vis the two control populations. In Brugada syndrome samples, more genes differed in their expression *versus* normal ventricular septum than *versus* allograft transplant biopsies, suggesting that either more genes than reported here differentiate Brugada syndrome from control samples or alternatively that the impact of the sampling technique predominates over other considerations.

We developed our approach in search of a molecular technique that could help identifying molecular pathways and establishing the diagnosis of the Brugada syndrome. Our work demonstrates clear discrimination between Brugada syndrome and controls but in no instance between Brugada syndrome and other arrhythmic or structural disease. We are now accumulating a larger biopsy collection from patients receiving an implantable defibrillator for various indications including Brugada syndrome. Results from this new investigation should conclude whether molecular profiling could reliably diagnose Brugada syndrome. Our current data provide the first evidence that genomics may be used to diagnose an arrhythmia syndrome.

Acknowledgements

Supports were received from the Fondation de France and by a Leducq foundation transatlantic network of excellence "Preventing sudden cardiac death". The work was further supported by grants from the German Research Foundation to ESB (DFG Schu1082/3-1 and 3-2 and Ki653/13-1 and 13-2) and to TW (DFG SFB-556, project C4) and by a KPI grant (Bio-37) to AV.

References

1. 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;20:1391-1396.
2. Wilde AA, Antzelevitch C, Borggrefe M, Brugada J, Brugada R, Brugada P, Corrado D, Hauer RN, Kass RS, Nademanee K, Priori SG, Towbin JA. Study Group on the Molecular Basis of Arrhythmias of the European Society of Cardiology. Proposed diagnostic criteria for the Brugada syndrome: consensus report. *Circulation*. 2002;106:2514-2519.
3. Schulze-Bahr E, Eckardt L, Breithardt G, Seidl KH, 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;21:651-652.
4. Marionneau C, Couette B, Liu J, Li H, Mangoni ME, Nargeot J, Lei M, Escande D, Demolombe S. Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart. *J Physiol*. 2005;562:223-234.
5. Zicha S, Xiao L, Stafford S, Cha TJ, Han W, Varro A, Nattel S. Transmural expression of transient outward potassium current subunits in normal and failing canine and human hearts. *J Physiol*. 2004;561:735-748.
6. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25:402-408.
7. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:14863-14868.
8. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:5116-5121.
9. Antzelevitch C, Brugada P, Brugada J, Brugada R, Towbin JA, Nademanee K. Brugada syndrome: 1992-2002: a historical perspective. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:1665-1671.
10. Smits JP, Eckardt L, Probst V, Bezzina CR, Schott JJ, Remme CA, Haverkamp W, Breithardt G, Escande D, Schulze-Bahr E, LeMarec H, Wilde AA. Genotype-phenotype

relationship in Brugada syndrome: electrocardiographic features differentiate SCN5A-related patients from non-SCN5A-related patients. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40:350-356.

11. George AL Jr, Knittle TJ, Tamkun MM. 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*. 1992;89:4893-4897.

12. Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC, Kallen RG, Mandel G, Meisler MH, Netter YB, Noda M, Tamkun MM, Waxman SG, Wood JN, Catterall WA. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron*. 2000;28:365-368.

13. Felipe A, Knittle TJ, Doyle KL, Tamkun MM. Primary structure and differential expression during development and pregnancy of a novel voltage-gated sodium channel in the mouse. *J Biol Chem*. 1994;269:30125-30131.

14. Akopian AN, Souslova V, Sivilotti L, Wood JN. Structure and distribution of a broadly expressed atypical sodium channel. *FEBS Lett*. 1997;400:183-187.

15. Lesage F, Lazdunski M. Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000;279:F793-F801.

Figure legends

Figure 1: **Two-way hierarchical agglomerative clustering applied to 81 genes (vertically) and to 11 normal tissues from donor hearts (Ctl-1), 7 biopsies from transplanted hearts (Ctl-2) and 11 biopsies from Brugada syndrome patients (horizontally).** The input consisted of the ratio for each patient and gene *versus* the reference gene. Each gene is represented by a single row of colored boxes and each patient (individualized by numbers and letters) by a single column. Each color patch in the map represents the gene expression level in one sample, with expression levels ranging from bright green (lowest) to bright red (highest). Missing values are coded as silver. Ctl-1 consists of non-diseased human tissues (1 mm slices of right ventricular septal endomyocardium). Ctl-2 consists of endomyocardial biopsies from the right ventricular septum of transplanted patients obtained *via* a biopsy catheter procedure. Brugada consists of endomyocardial biopsies from the right ventricular septum obtained from patients suspected as having the Brugada syndrome (see M&M for more details). Five selected clusters containing genes relevant to discriminate Brugada patients *versus* controls are shown on the right (A, B, C, D, E).

Figure 2: **Cardiac ion channel remodeling associated with Brugada syndrome.** The graph represents the percentage of change in expression *versus* the two control groups (y-axis) evaluated by TaqMan low density arrays for sodium-channels and connexin (x-axis). Data points (circles) indicate individual measurement for each patient. Larger circles represent the median of the patient values for each gene. Only genes with statistically significant differential expression in patients with Brugada syndrome *versus* both control group-1 (Ctl-1; grey circles) and control group-2 (Ctl-2; empty circles) are illustrated. a: $q < 0.05$, c: $q < 0.001$ *versus* control-group.

Figure 3: **Cardiac calcium regulator remodeling associated with Brugada syndrome.** Data obtained for genes involved in calcium homeostasis. Same format as in Figure 2. b: $q < 0.01$ *versus* control-group.

Figure 4: **Cardiac ion channel remodeling associated with Brugada syndrome.** Data obtained for potassium channel α - and β -subunits. Same format as in Figures 2 and 3.

Figure 5: **Relative abundance and variability of selected genes in the control groups.** The graphs show the relative quantification (y-axis) of genes with statistically significant differential expression in Brugada syndrome patients *versus* both control group-1 (Ctl-1) and control group-2 (Ctl-2; x-axis). Data points indicate individual measurement for each patient from Ctl-1 (squares) and Ctl-2 (triangles)

groups. Larger squares and triangles represent the median. Data are expressed as ratio *versus HPRT* (x100).

Table 1: Clinical characteristics of patients with Brugada syndrome

Patient	Sex	Age (years)	SCN5A mutation	Nucleotide alteration	VF	Symptoms	ECG findings
							ST elevation at rest
Brs I	male	51	V1784F	6290 G>T		asymptomatic	yes
Brs II	male	26	F881WfsX90	2581-2582delTT		syncope	yes
Brs III	male	21	1493delK	4477-4478delAAG		syncope	yes
Brs IV	male	40	P1002HfsX25	3005-3012 delCAGCTGC		syncope	yes
Brs V	male	31	no	no	+	cardiac arrest	no
Brs VI	male	36	E1574K	4720 G>A		syncope	yes
Brs VII	male	50	no	no		none	yes
Brs VIII	male	43	no	no	+	dizziness	yes
Brs IX	female	28	no	no		asymptomatic	yes
Brs X	male	41	no	no		syncope	no
Brs XI	male	60	n.a.	n.a.		dizziness	atypical

VF, ventricular fibrillation; RBBB, right bundle branch block; HV, bundle of His to ventricle; n.a., not available

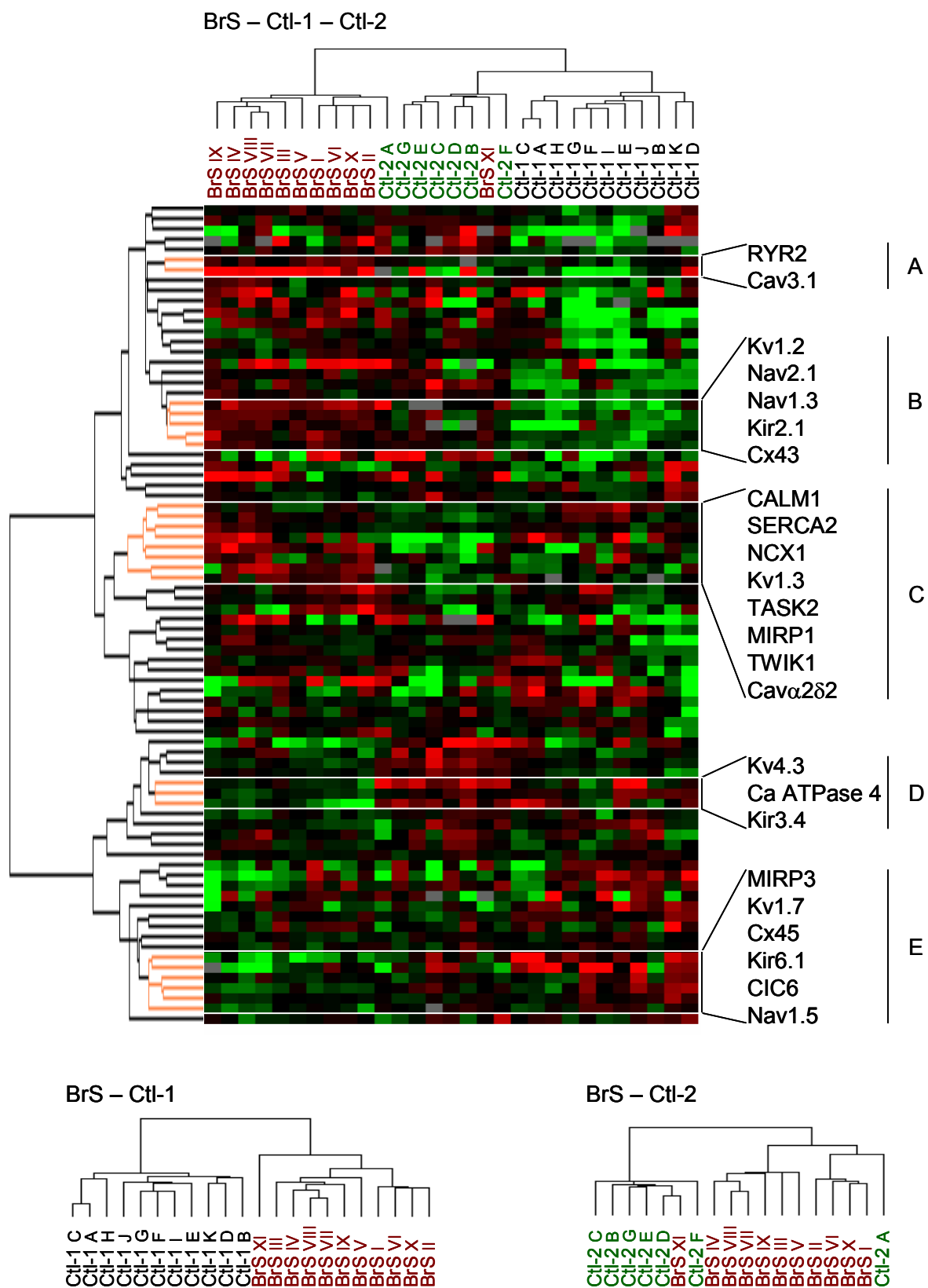


Figure 1

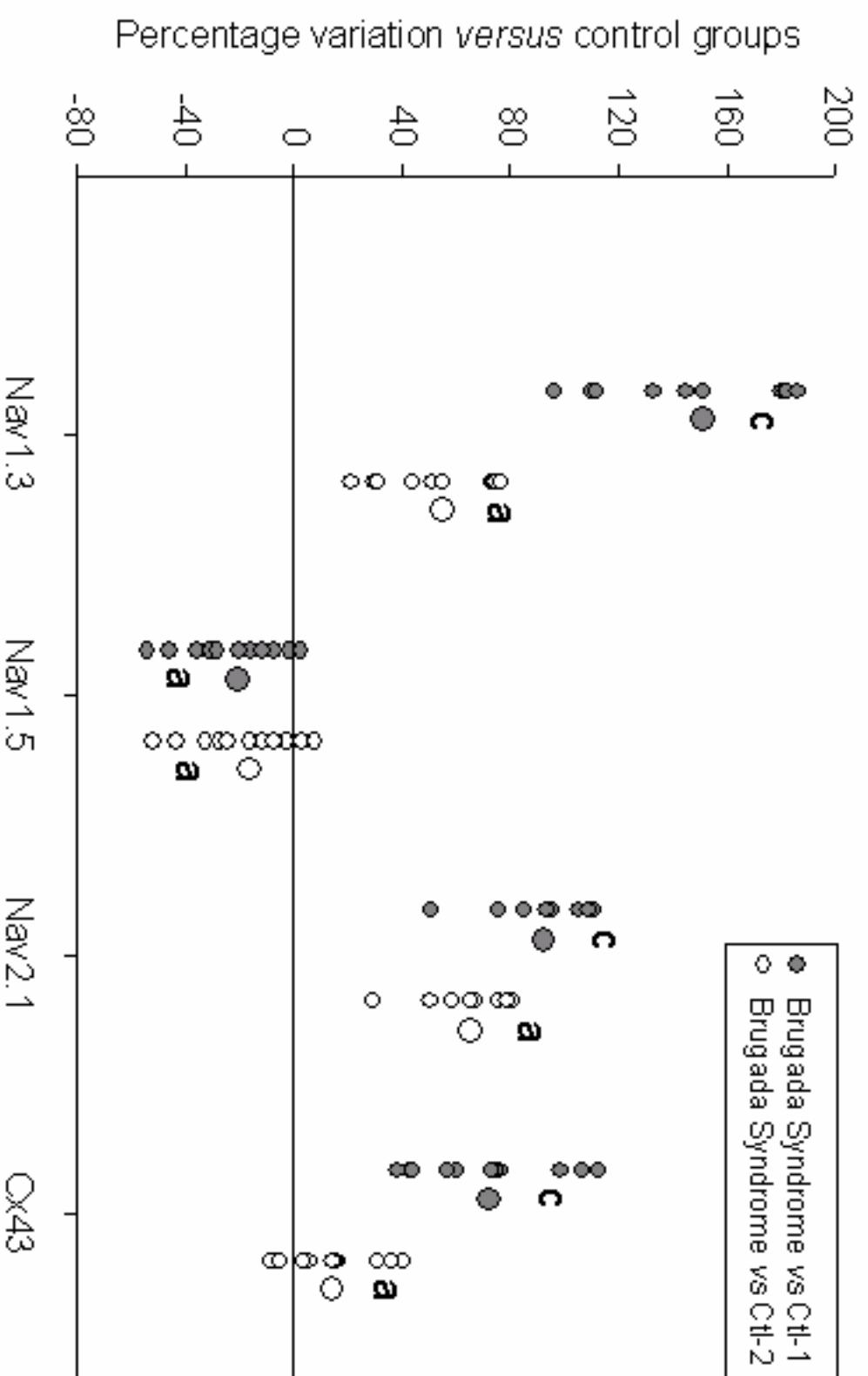


Figure 2

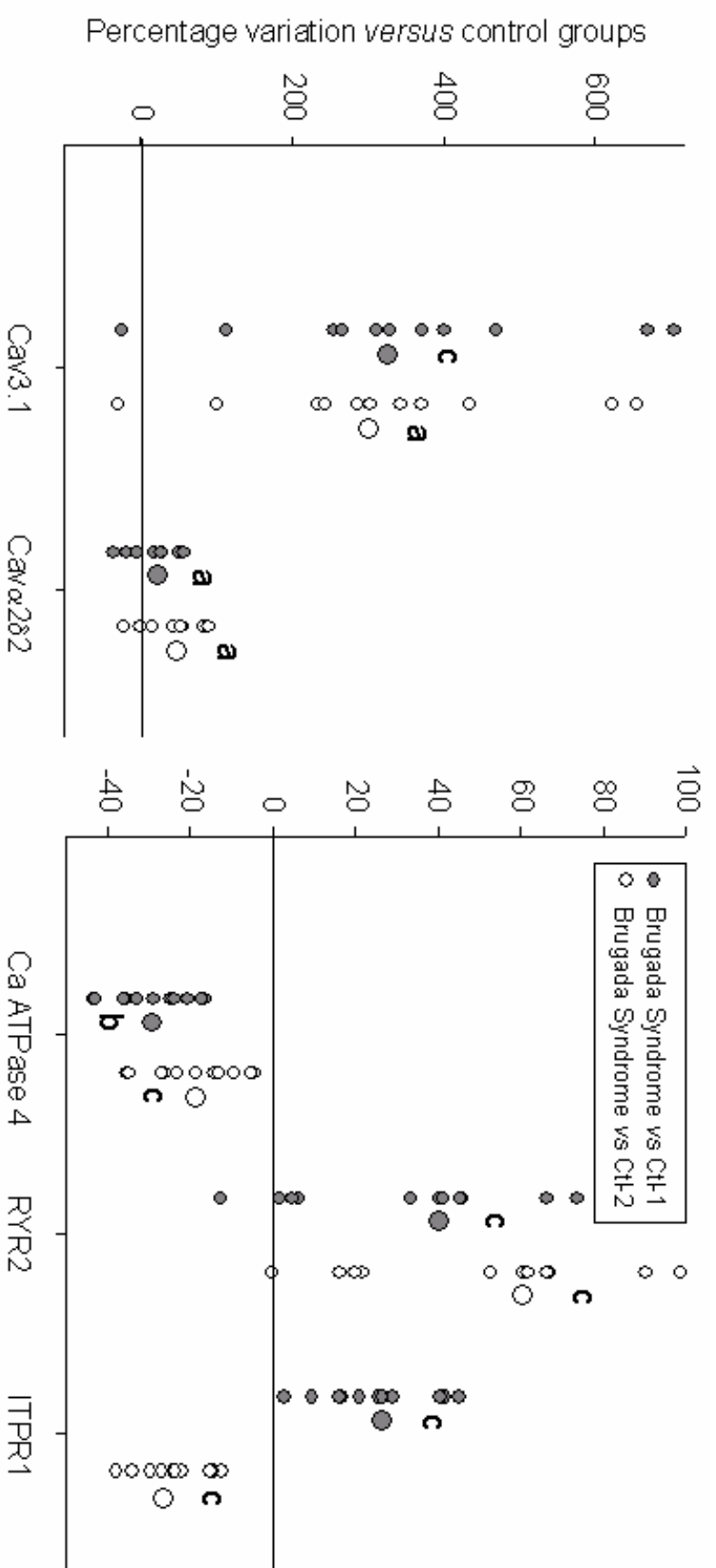


Figure 3

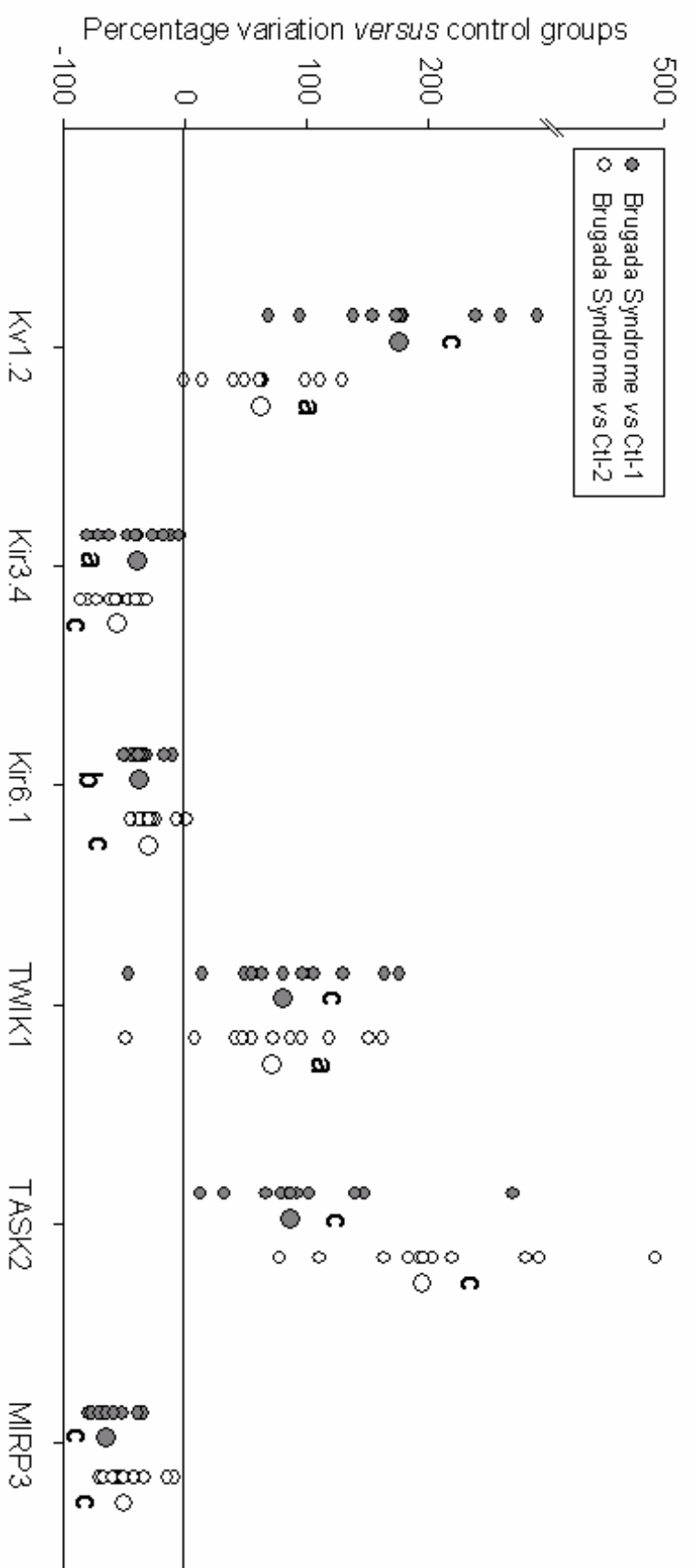


Figure 4

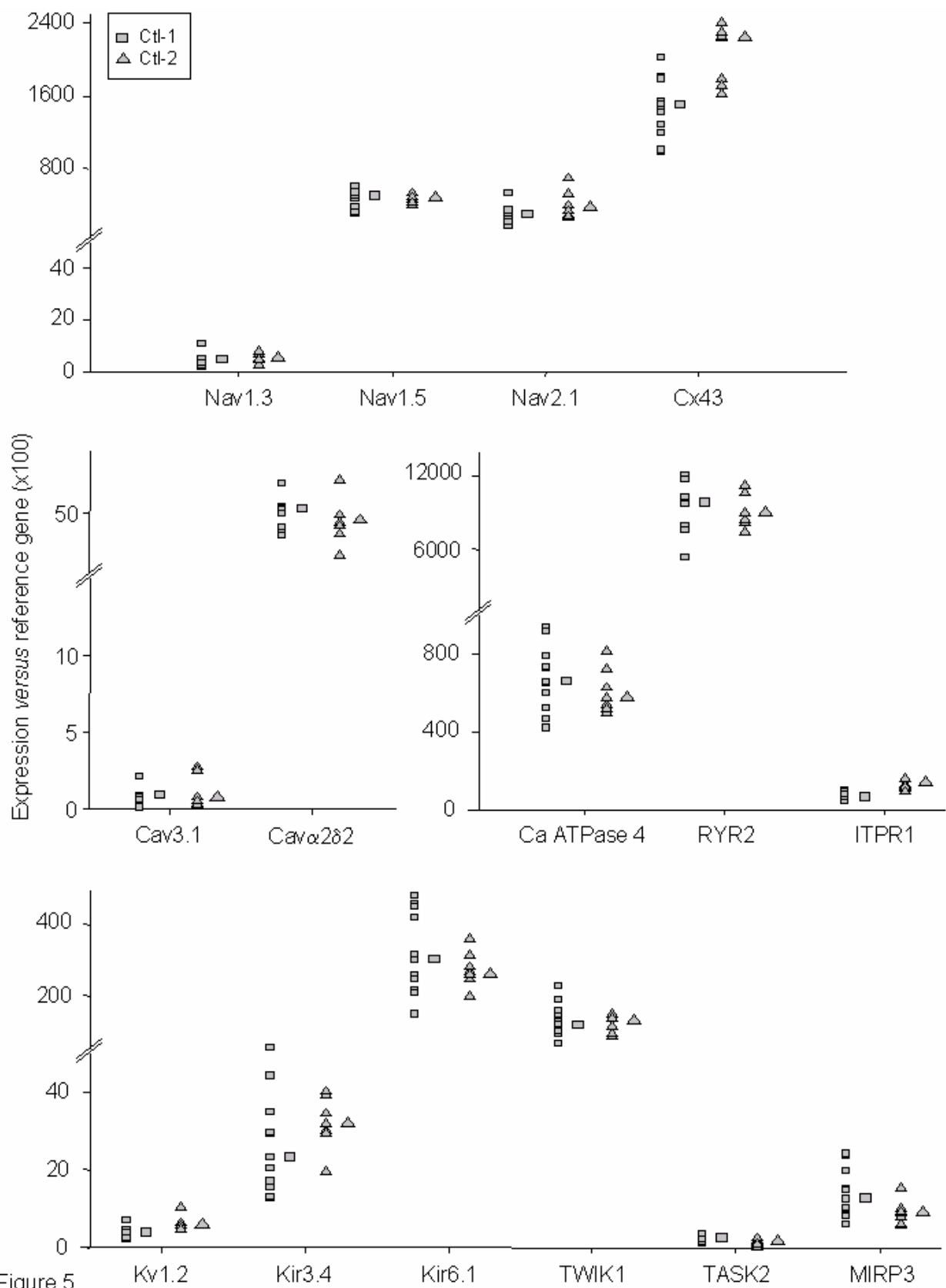


Figure 5

3. Signature transcriptionnelle associée à l'insuffisance cardiaque chronique chez l'homme

a. Introduction

Les arythmies ventriculaires et la dysfonction contractile sont les causes principales des décès associés à l'insuffisance cardiaque chez l'homme. Plusieurs études génomiques ont permis de mettre en évidence des modifications d'expression transcriptionnelles liées à l'insuffisance cardiaque. Cependant, toutes se sont intéressées à la même région cardiaque, la paroi libre du ventricule gauche, et les données sur le remodelage ionique sont très limitées (Yang *et al.*, 2000 ; Barrans *et al.*, 2002 ; Hwang *et al.*, 2002 ; Tan *et al.*, 2002 ; Kaynac *et al.*, 2003 ; Steenman *et al.*, 2003 ; Kääb *et al.*, 2004). Seules quelques études gène à gène se sont intéressées aux modifications transmursales de l'expression transcriptionnelle des canaux ioniques, se limitant à l'évaluation de quelques sous-unités à la fois (Prestle *et al.*, 1999 ; Péréon *et al.*, 2000). Etant donné le rôle de l'hétérogénéité électrique transmurale dans la survenue des arythmies par réentrée, nous avons fait l'hypothèse qu'elle puisse être un élément important dans la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque. Par ailleurs, alors que les données concernant le remodelage ventriculaire sont nombreuses, l'impact de l'insuffisance cardiaque sur le transcriptome auriculaire a été beaucoup moins évalué (Borlak & Thum, 2003 ; Kääb *et al.*, 2004).

L'objectif de cette étude a été d'évaluer le profil global de l'expression des canaux ioniques dans différentes régions du cœur de patients en insuffisance cardiaque chronique. L'expression de 83 canaux ioniques, protéines régulatrices de l'homéostasie calcique et marqueurs de l'insuffisance cardiaque a été évaluée par RT-PCR quantitative à haut-débit grâce à l'utilisation de *Low Density Arrays*. Le myocarde sous-épicaudique et sous-endocardique gauches, ainsi que l'oreillette gauche de 6 cœurs explantés et de 7 cœurs de donneurs sains ont été analysés.

b. Résultats

i. Classification hiérarchique

La technique de classification hiérarchique a permis de séparer, dans chaque compartiment étudié, les patients insuffisants cardiaques des contrôles (Figure 50, page 199). Pour chaque comparaison, les gènes clefs de la discrimination des deux groupes de patients sont indiqués dans des groupes ou *clusters*. Pour l'épicaudique et l'endocardique, le *cluster* supérieur rassemble les gènes sous-exprimés chez les patients insuffisants cardiaques, et le *cluster* inférieur, les gènes sur-exprimés. A l'inverse, pour l'oreillette le *cluster* des gènes sur-exprimés est en haut et celui des gènes sous-exprimés est en bas.

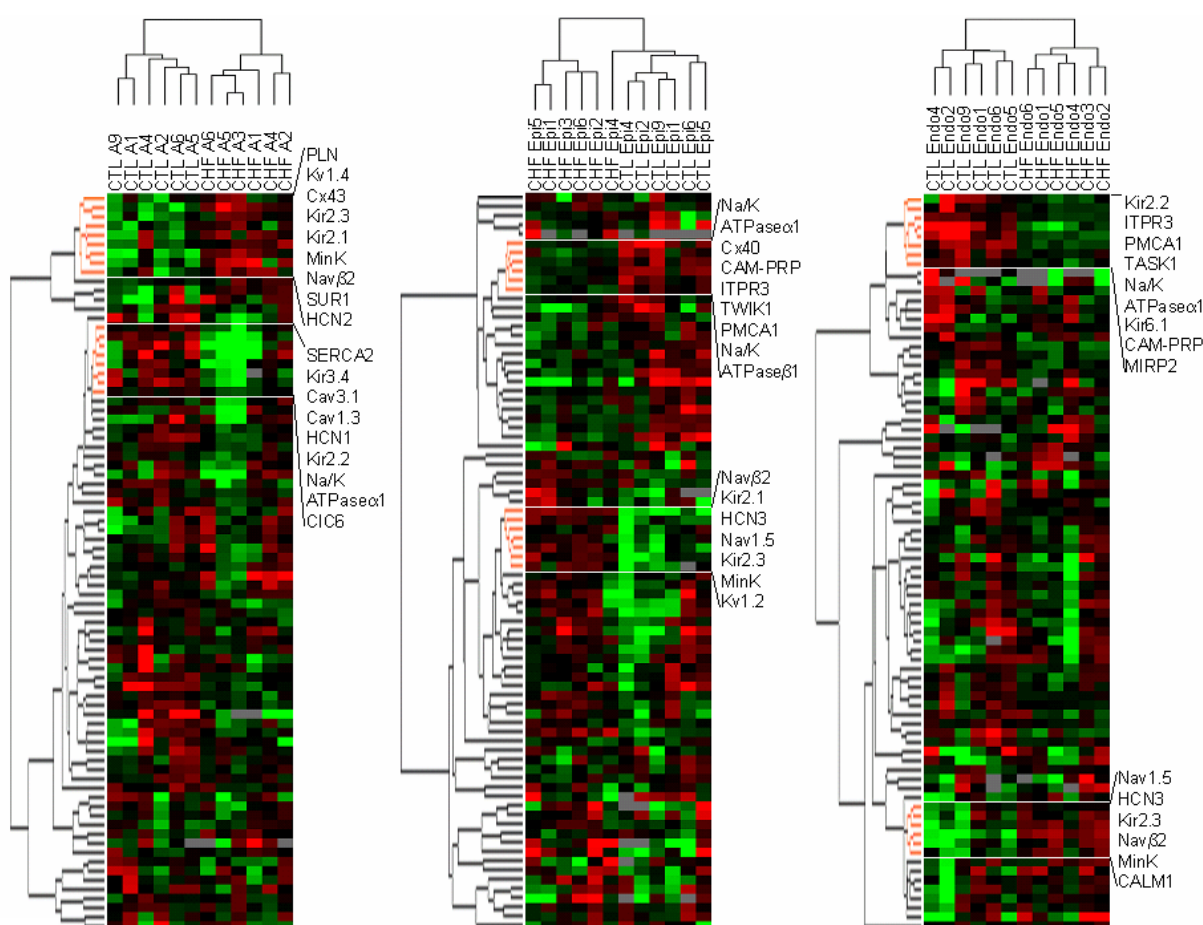


Figure 50 Classifications hiérarchiques appliquées à 81 canaux ioniques et protéines de l'homéostasie calcique (verticalement) et respectivement à 6 et 7 échantillons tissulaires insuffisants cardiaques et contrôles humains (horizontalement). La classification de gauche illustre la comparaison des oreillettes gauches, celui du milieu, des épicarides et celui de droite, des endocardes. Chaque gènes et chaque patient sont représentés respectivement par une ligne et une colonne. Chaque carré de couleur correspond au niveau d'expression relatif d'un gène. La gamme de couleur s'étend du vert (moins exprimé) au rouge (plus exprimé). Les valeurs manquantes sont représentées en gris. Les *clusters* de gènes pertinents pour discriminer les deux groupes de patients dans chaque compartiment sont indiqués à droite des classifications.

ii. Profil d'expression des canaux ioniques et des protéines de l'homéostasie calcique associé à l'insuffisance cardiaque

Parmi les gènes fortement exprimés, seul *SCN2B* (Nav β 2) est statistiquement sur-exprimé dans l'insuffisance cardiaque, dans l'oreillette, l'épicarde et l'endocarde gauches. Malgré son niveau d'expression plus faible, le gène *CACNA1H* (Cav3.2) présente aussi une tendance de variation similaire dans les 3 types tissulaires, caractérisée par une sous-expression. Pour d'autres sous-unités, les variations d'expression associées à l'insuffisance cardiaque sont spécifiques d'un seul compartiment, auriculaire ou ventriculaire. L'expression de *SCN5A* (Nav1.5) par exemple, est augmentée uniquement dans les compartiments

ventriculaires, alors que celle de *SCN6A/7A* (Nav2.1) n'est réduite que dans l'oreillette (Figure 51).

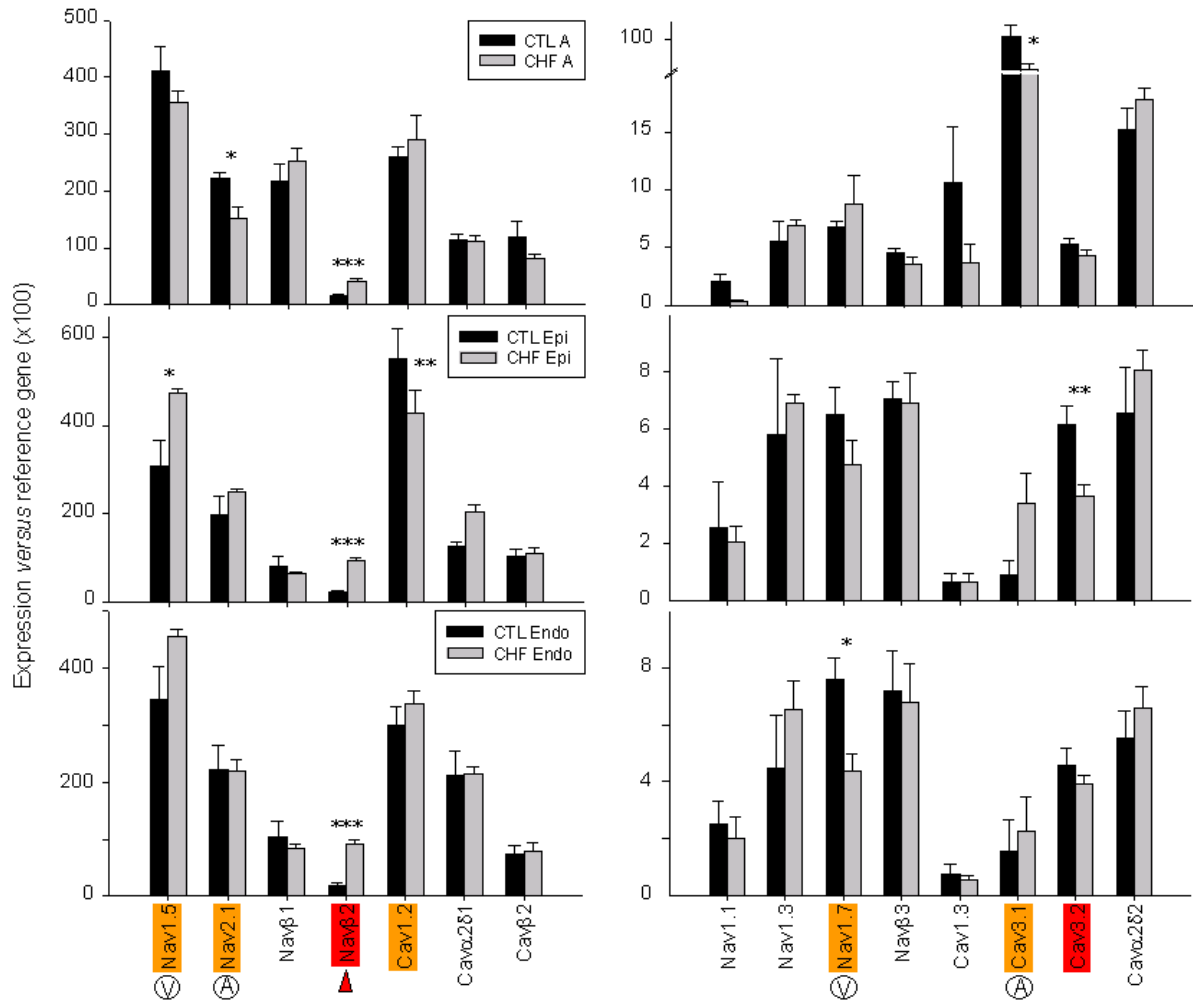


Figure 51 Profil d'expression des gènes codant les sous-unités des canaux Na^+ et Ca^{2+} , obtenu pour les groupes contrôle (noir) et insuffisant cardiaque (gris). La partie supérieure du graphe représente les résultats dans l'oreillette gauche, la partie intermédiaire, les résultats dans l'épicarde gauche et la partie inférieure, les résultats dans l'endocarde gauche. L'expression relative (axe Y) des gènes (axe X) est exprimée en $2^{-\Delta\text{Ct}}$, représentant le ratio d'expression du gène par rapport au gène de référence *HPRT* (x100), et correspond à la moyenne $\pm$ SEM calculée à partir de 7 échantillons contrôles et 6 insuffisants cardiaques. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ par rapport au groupe contrôle (test *t* de Student). Les gènes indiqués par un code couleur sont statistiquement variants dans au moins un des trois compartiments. La couleur rouge représente les gènes qui ont la même tendance de variation dans les trois compartiments. La flèche rouge indique plus précisément les gènes qui sont statistiquement variants dans les trois conditions. La couleur jaune indique les gènes qui varient différemment dans un compartiment par rapport aux deux autres. Pour les gènes qui ne varient que dans l'oreillette gauche, un A entouré est ajouté, et pour ceux qui ne varient que dans les compartiments ventriculaires, un V entouré est ajouté. Les gènes qui ne sont pas indiqués par une couleur ne sont statistiquement variants dans aucun compartiment.

Nos résultats montrent que l'insuffisance cardiaque est associée à des variations d'expression des connexines. L'expression de *GJA5* (Cx40) semble être réduite dans l'ensemble des compartiments alors que *GJA1* (Cx43) ne varie que dans l'oreillette où elle est sur-exprimée. Dans l'insuffisance cardiaque, l'expression des canaux HCN est également modifiée. Pour *HCN2* (HCN2) et *HCN4* (HCN4) les variations sont au niveau de l'oreillette avec respectivement une augmentation et une diminution d'expression. L'expression de *HCN1* (HCN1) semble par contre être réduite dans l'ensemble des compartiments étudiés (Figure 52).

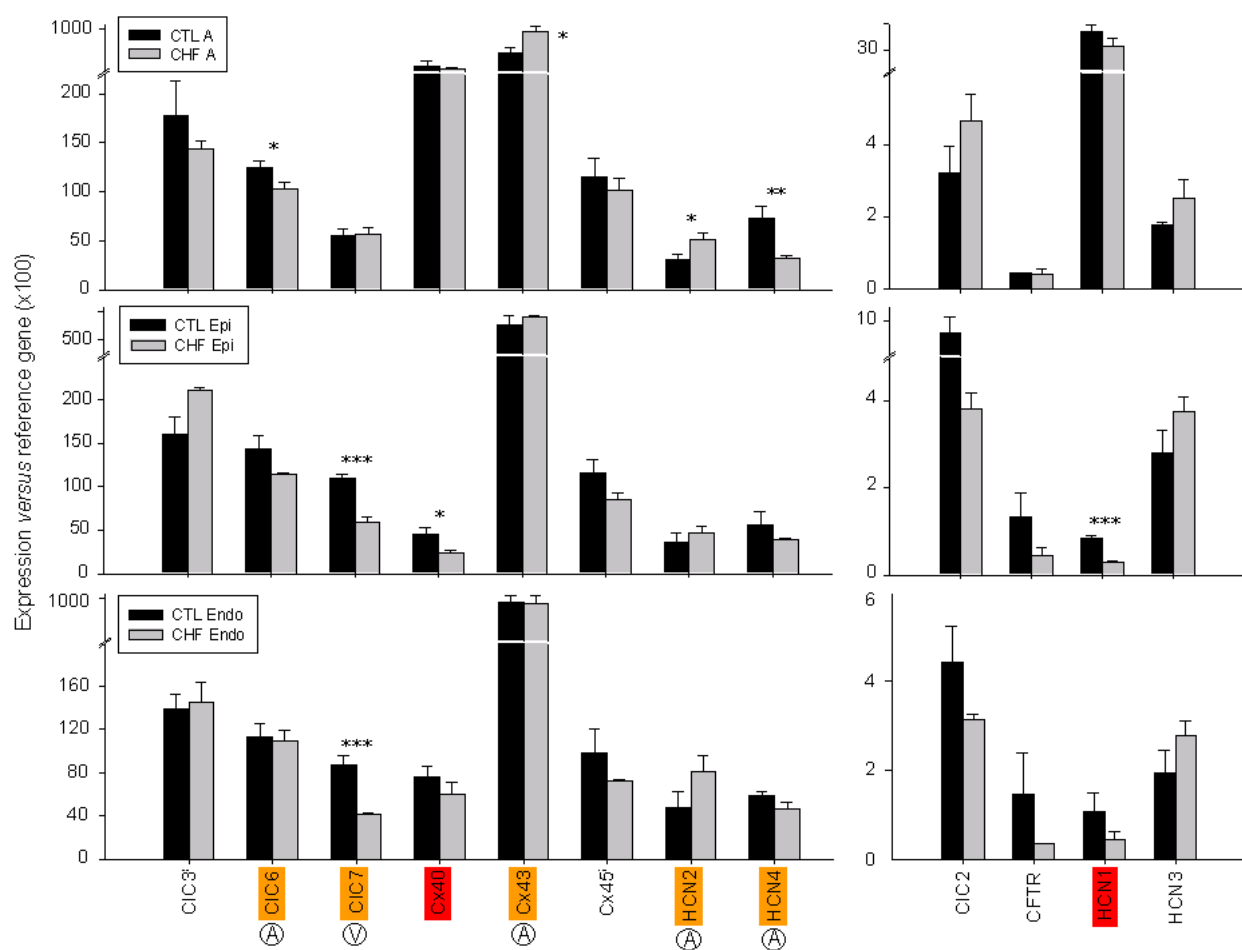


Figure 52 Profil d'expression des gènes codant les sous-unités des canaux Cl^- et HCN ainsi que les connexines, obtenu pour les groupes contrôle (noir) et insuffisant cardiaque (gris). Même format que pour la figure 51.

Parmi les canaux potassiques dépendant du voltage (Kv), l'expression du gène *KCNA4* (Kv1.4) est augmentée dans l'ensemble des compartiments, à l'inverse de celle de *KCNA7* (Kv1.7) et de *KCNH2* (HERG). L'expression de *KCNC4* (Kv3.4) et de *KCNQ1* (KvLQT1) semble être réduite dans les compartiments ventriculaires uniquement (Figure 53).

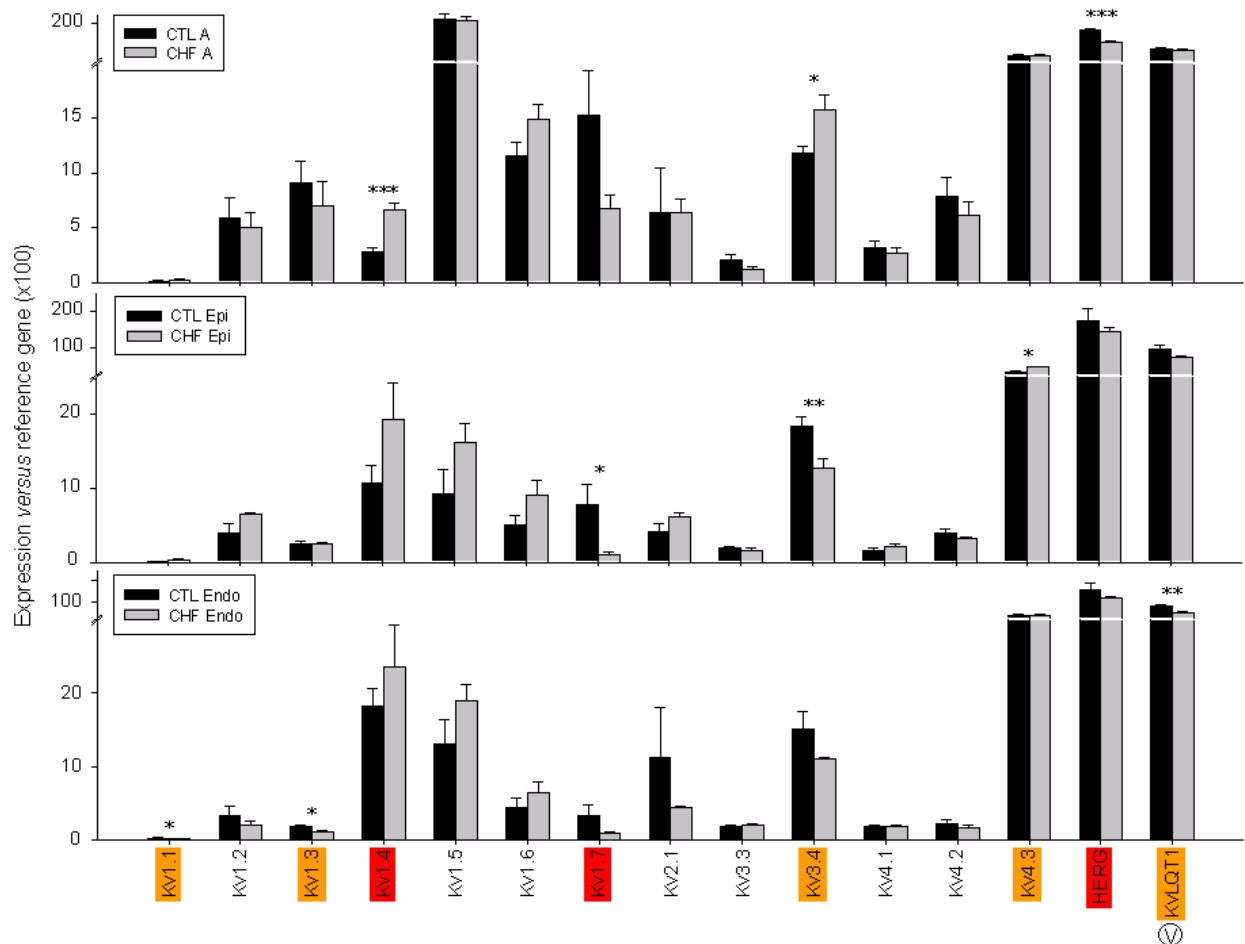


Figure 53 Profil d'expression des gènes codant les sous-unités des canaux potassiques dépendants du voltage, obtenus pour les groupes contrôle (noir) et insuffisant cardiaque (gris). Même format que pour la figure 51.

Concernant les sous-unités β des canaux potassiques, l'expression de *KCNE1* (Mink) est augmentée dans l'ensemble des compartiments.

Parmi les canaux potassiques rectifiant entrants générant le courant I_{K1} , l'expression de *KCNJ2* (Kir2.1) et *KCNJ4* (Kir2.3) est augmentée dans les trois compartiments alors que celle de *KCNJ12* (Kir2.2) semble y être réduite. L'expression du gène *KCNJ8* (Kir6.1) est fortement diminuée dans les deux compartiments ventriculaires. A l'inverse, les gènes *KCNJ3* et *KCNJ5*, codant les canaux Kir3.1 et Kir3.4, générant le courant $I_{K,ACh}$, sont sous-exprimés dans l'oreillette gauche (Figure 54, page 203).

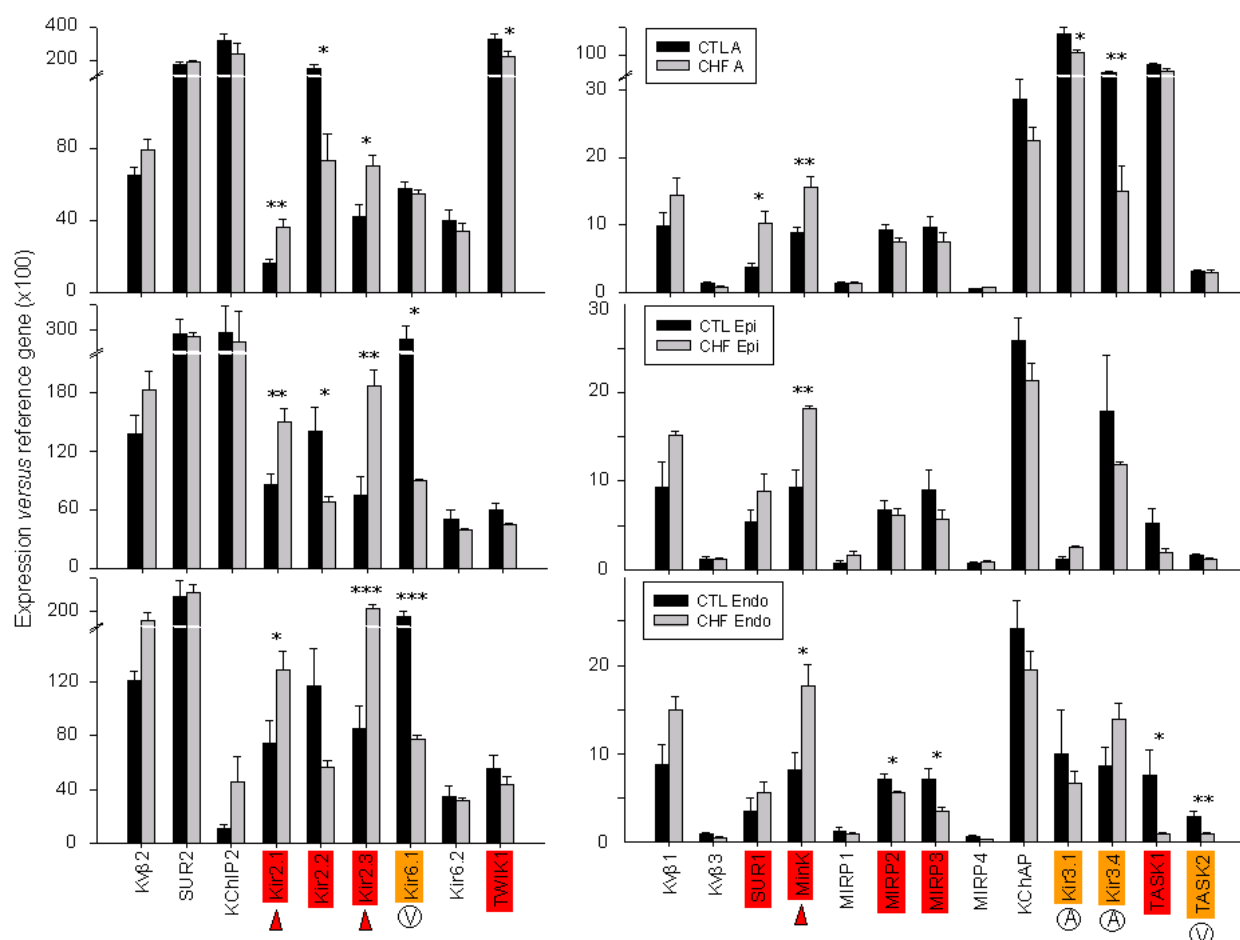


Figure 54 Profil d'expression des gènes codant les sous-unités β des canaux potassiques et les canaux rectifiant entrants, obtenus pour les groupes contrôle (noir) et insuffisant cardiaque (gris). Même format que pour la figure 51.

En ce qui concerne les gènes codant les protéines régulatrices de l'homéostasie calcique, l'expression de *ATP1A1* (Na^+/K^+ ATPase $\alpha 1$) et de *ATP1B1* (Na^+/K^+ ATPase $\beta 1$), ainsi que de *ATP2A2* (SERCA2) est diminuée dans l'ensemble des compartiments. L'expression du gène *PLB* (phospholamaban) n'est augmentée que dans l'épicarde gauche.

Enfin, comme attendu l'expression des marqueurs de l'insuffisance cardiaque β -MHC et ANP est augmentée dans les tissus pathologiques (Figure 55, page 204).

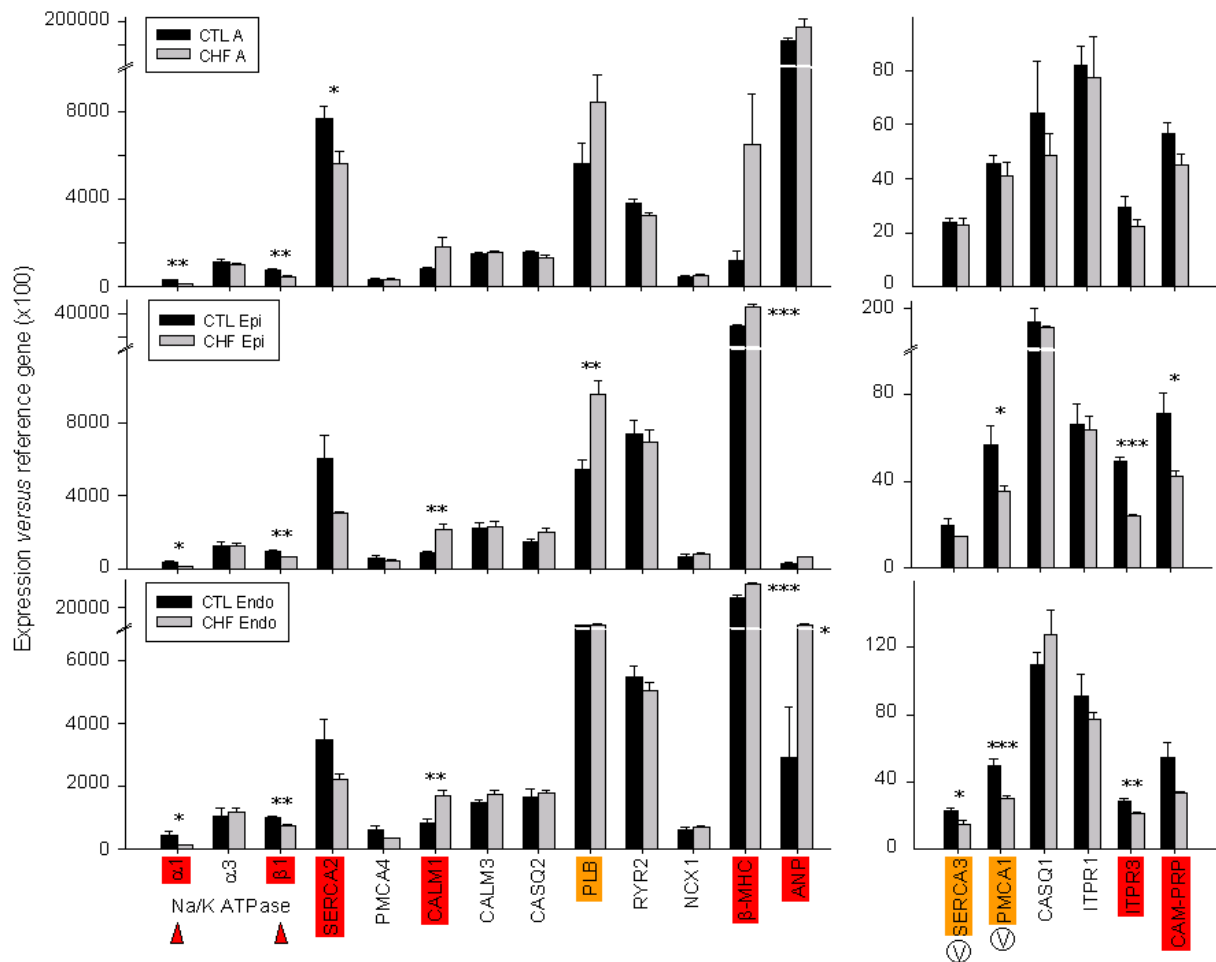


Figure 55 Profil d'expression des gènes codant les protéines régulatrices de l'homéostasie calcique et les marqueurs de l'insuffisance cardiaque, obtenus pour les groupes contrôle (noir) et insuffisant cardiaque (gris). Même format que pour la figure 51.

c. Discussion et conclusion

Cette étude fournit le premier profil transcriptionnel global du remodelage ionique associé à l'insuffisance cardiaque terminale chez l'homme, au niveau transmurale ainsi que dans l'oreillette gauche.

La classification hiérarchique a révélé une séparation claire entre les patients insuffisants cardiaques et contrôles, quelque soit le compartiment étudié. Par conséquent, les différences dans les profils d'expression des gènes codant les sous-unités des canaux ioniques et les protéines de l'homéostasie calcique permettent de discriminer les deux groupes de patients.

Cette analyse régionale de l'insuffisance cardiaque permet donc de comparer le remodelage ionique de différents compartiments. Sur les 83 gènes analysés, 61 ont le même profil dans les trois compartiments, avec 24 gènes différentiellement exprimés. Cette étude montre donc que le remodelage ionique associé à l'insuffisance cardiaque touche largement l'oreillette gauche, en accord avec l'augmentation de l'incidence des arythmies supraventriculaires dans le cadre de cette pathologie. L'insuffisance cardiaque est en effet, comme les pathologies valvulaires, l'une des principales causes de la survenue de la fibrillation auriculaire.

Par ailleurs, le remodelage ionique auriculaire dans l'insuffisance cardiaque est en partie commun à celui des pathologies valvulaires (article 3, page 162) : l'expression de *SCN2B* (Nav β 2), et de *KCNJ4* (Kir2.3) est augmentée alors que celle de *KCNJ3* (Kir3.1) et de *KCNK1* (TWIK1) est réduite. Ces résultats suggèrent que ces variations pourraient participer à la prédisposition de la FA.

La diminution de l'expression de la SERCA2 est en accord avec la séquestration défectueuse du Ca²⁺ par le réticulum sarcoplasmique dans l'insuffisance cardiaque (Lindner *et al.*, 1998 ; Pieske *et al.*, 1999). Ce résultat confirme également les données de la littérature, obtenues à partir de l'étude de la paroi libre ventriculaire gauche de patients insuffisants cardiaques, au niveau transcriptionnel, protéique et fonctionnel (Flesch *et al.*, 1996 ; Linck *et al.*, 1996 ; Lehnart *et al.*, 1998 ; DiPaola *et al.*, 2001 ; Borlak & Thum, 2003).

La diminution de l'expression transcriptionnelle des Na⁺/K⁺ ATPases confirme les données de Borlak & Thum, au niveau de la paroi libre du ventricule (Borlak & Thum, 2003). Une réduction de leur activité est à l'origine d'une augmentation de la concentration cytoplasmique en Na⁺, qui elle-même affecte l'activité de l'échangeur NCX. Cette modification entraîne une élévation de la concentration en Ca²⁺ intracellulaire, à l'origine d'une dégradation de la contractilité et de la relaxation qui aggrave l'insuffisance cardiaque. Par ailleurs la réduction de l'activité des Na⁺/K⁺ ATPases entraîne une diminution du potentiel de membrane qui, associée à l'augmentation du Ca²⁺ intracytoplasmique et à la réduction de l'activité de la SERCA2, pourrait être arythmogène, par la survenue de post-dépolarisations tardives (Verdonck *et al.*, 2003).

Il a été suggéré que la diminution de la densité des courants potassiques pourraient participer à l'augmentation de la durée du PA, et donc à la survenue d'arythmies (Li *et al.*, 2004b). En accord avec ces données nous avons mis en évidence une réduction de l'expression de plusieurs canaux potassiques tels que *KCNH2* (HERG), *KCNQ1* (KvLQT1) et *KCNJ8* (Kir6.1). A notre connaissance, aucune donnée n'est actuellement disponible sur l'expression transcriptionnelle de ces sous-unités dans les compartiments épicaux, endocaux et auriculaires du cœur insuffisant cardiaque chez l'homme.

Plusieurs gènes pouvant moduler les propriétés de contractilité du myocarde ainsi que la durée du PA, présentent un remodelage de leur expression transcriptionnelle différent entre l'épicaux et l'endocaux insuffisants cardiaques. C'est le cas de *CACNA1C* (Cav1.2), *CACNA1H* (Cav3.2) et *GJA5* (Cx40) dont l'expression n'est diminuée que dans l'épicaux. A l'inverse, l'expression du phospholamban n'est augmentée que dans le compartiment épicaux. Par conséquent, les gradients transmuraux physiologiques de l'expression de ces gènes sont altérés avec l'insuffisance cardiaque, en accord avec une modification de la contractilité et une susceptibilité aux arythmies associées à l'insuffisance cardiaque. Ces résultats permettent également de suggérer que l'épicaux et l'endocaux présentent des sensibilités différentes aux facteurs qui affectent l'expression de ces gènes.

Par ailleurs, une étude chez le chien a montré que l'augmentation de la dispersion de repolarisation transmurale dans l'insuffisance cardiaque pourrait être liée à une variation du gradient de KChIP2 (Zicha *et al.*, 2004). De la même manière, nous avons observé chez l'homme une réduction du gradient d'expression épicarde/endocarde de KChIP2 associée à cette pathologie.

Cette évaluation globale de l'expression des canaux ioniques dans l'insuffisance cardiaque a permis de fournir des signatures moléculaires spécifiques qui pourraient contribuer à une meilleure compréhension de cette pathologie. Du fait de son originalité concernant les tissus analysés, cette étude pourrait également permettre de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques grâce à l'identification de nouveaux gènes candidats.

DISCUSSION GÉNÉRALE

K. JUSTIFICATION DE L'APPROCHE DÉDIÉE

L'intérêt de notre équipe pour l'étude du rôle des canaux ioniques dans l'activité électrique du cœur nous a conduit à dédier notre approche à la famille des gènes codant les sous-unités des canaux ioniques.

Les puces à ADN pangénomiques présentent des limites lorsqu'on se focalise sur une fonction précise. Environ 20% des données d'expression qu'elles fournissent ne sont pas interprétables pour des raisons techniques, ce qui rend difficile l'interprétation au niveau fonctionnel. En effet, le défaut de détection d'un seul canal ionique intervenant dans la genèse du PA peut empêcher l'élaboration d'hypothèses pertinentes sur un mécanisme physiologique ou pathologique. Pour palier à cette limite de l'approche pangénomique, nous nous avons donc utilisé des puces dédiées (les MyoChip) et plus récemment, la technique de RT-PCR quantitative à haut débit (*Low Density Arrays*). Nous utilisons quasi exclusivement cette dernière car elle présente les avantages suivants.

Tout d'abord, la faible quantité de matériel biologique initial nécessaire (2 ng d'ARN total par réaction PCR) permet d'accéder à des structures biologiques pour lesquelles la quantité de tissu est limitée telles que des fibres de Purkinje ou des biopsies tissulaires chez l'homme, sans amplification préalable de l'ARN total (Gaborit *et al.* ; Résultats et discussion - A - 1 ; Wichter *et al.*, soumis ; Résultats et discussion - B - 2). Ainsi, nous avons pu établir pour la première fois le profil d'expression d'une centaine de gènes dans ce type d'échantillons.

Sa sensibilité et sa reproductibilité permettent de détecter des variations d'expression de faible amplitude (de l'ordre de 10%). Lorsqu'il s'agit de canaux ioniques, cette amplitude peut cependant avoir des conséquences majeures sur le phénotype électrique (Gaborit *et al.*, 2005).

Elle permet de traiter indépendamment chaque échantillon biologique et ainsi de pouvoir en faire des comparaisons multiples.

La RT-PCR quantitative à haut débit offre également la possibilité d'évaluer le niveau d'expression relatif des gènes les uns par rapport aux autres. Il faut cependant pondérer cet aspect : il ne s'agit pas d'une quantification absolue.

Tous ces avantages ont rendu la RT-PCR à haut débit compétitive par rapport aux puces à ADN (même dédiées) dites de l'ancienne génération. Les frontières entre les puces nouvelle génération et la RT-PCR à haut débit s'amenuisent grâce au progrès biotechnologiques récents. Ces progrès concernent les puces pangénomiques uniquement. Notre expérience est encore trop limitée pour savoir si la qualité des données que nous

avons obtenu en ce qui concerne les canaux ioniques fera qu'elles se substitueront à la RT-PCR quantitative à haut débit

D'un point de vue technologique, le développement de la RT-PCR quantitative à haut débit (*Low Density Arrays*) a constitué une avancée considérable en génomique.

L. CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES SUR LE REMODELAGE GLOBAL DES CANAUX IONIQUES CARDIAQUES

L'intérêt de notre approche est qu'elle est globale, c'est à dire qu'elle fournit une vision simultanée de l'ensemble des gènes connus à ce jour comme étant impliqués dans l'activité électrique cardiaque.

Parmi l'ensemble des comparaisons réalisées sur cœur humain sain, nous avons montré que ce sont les deux tissus contractiles, oreillettes et ventricules, qui présentent la plus large hétérogénéité d'expression des canaux ioniques. En effet, en moyenne 47% des canaux étudiés sont différenciellement exprimés entre ces deux compartiments. On pouvait s'attendre à des différences moins marquées étant donné que ce sont deux tissus de même fonction. Cependant, nous avons montré dans l'introduction une forte hétérogénéité dans leurs caractéristiques électrophysiologiques. Au sein de ce profil, c'est la famille des canaux calciques qui discrimine le plus l'oreillette du ventricule. Nos résultats suggèrent ainsi l'importance de Cav1.3 dans la genèse du courant $I_{Ca,L}$ auriculaire.

Ensuite ce sont les fibres de Purkinje qui se discriminent le plus du ventricule, avec 30% de canaux ioniques différenciellement exprimés. Ce résultat est plus attendu puisqu'on étudie ici deux compartiments de fonction différente : automatique et contractile. La famille des canaux HCN est en grande partie responsable de cette discrimination, avec un profil majoritairement spécifique des fibres de Purkinje.

A l'inverse, bien qu'associés à de larges différences phénotypiques, certains compartiments tissulaires présentent une faible hétérogénéité d'expression des canaux ioniques. Ainsi, les différences d'expression entre le myocarde sous-épique et sous-endocardique ne concernent que 18% des canaux ioniques (Gaborit *et al.* ; Résultats et discussion - A - 2). On peut donc suggérer que les canaux impliqués ont un rôle majeur dans la genèse du PA et donc dans sa modulation.

Au contraire, entre les hommes et les femmes, seul un faible nombre de canaux de canaux ioniques est différenciellement exprimé (14%), et les différences phénotypiques sont restreintes (Gaborit *et al.* ; Résultats et discussion - A - 2). Nous avons montré que les profils

différentiels homme *versus* femme impliquent majoritairement les canaux potassiques. On peut donc imaginer que la redondance qui existe dans cette famille permet une compensation phénotypique.

Les travaux de cette thèse ont par ailleurs permis de montrer que les pathologies étudiées entraînent des variations extensives et complexes de l'expression des canaux ioniques. En effet, si je considère globalement le nombre de canaux ioniques dont l'expression est modifiée de façon physiologique, j'ai estimé que le pourcentage atteint environ 28%. Ce pourcentage est bien supérieur dans les situations pathologiques auxquelles je me suis intéressée. En effet, ce pourcentage atteint une moyenne de 48%. Le syndrome du Brugada est une exception puisque seuls 19% des canaux ioniques sont différentiellement exprimés. On peut suggérer que le fait d'étudier des biopsies tissulaires puisse en être responsable. On peut en effet penser que les biopsies sont plus homogènes en terme de types cellulaires par rapport à des sections plus larges de tissus, minimisant ainsi les variations d'expression des gènes étudiés.

Enfin, notre approche globale nous a permis de mettre en évidence qu'une large part des profils différentiels (physiologiques et pathologiques) concerne les sous-unité régulatrices des canaux ioniques (en moyenne 24%). Malheureusement, pour des raisons historiques, leur rôle est encore mal connu, même si les progrès sont notables depuis ces dernières années. L'exemple de la sous-unité Cav α 2 δ 2 qui d'après son profil d'expression oreillette *versus* ventricule, semble réguler majoritairement les courants calciques auriculaires, mérite d'être exploré sur le plan fonctionnel.

M. CONSIDÉRATIONS PARTICULIÈRES : DONNÉES EXPÉRIMENTALES ORIGINALES

D'un point de vue scientifique, les études de la plasticité de l'expression des canaux ioniques du cœur humain sain constituent une base fondamentale pour la compréhension de l'électrophysiologie cardiaque dans des conditions physiologiques et pathologiques. Au cours de cette thèse, nous avons pu constituer une tissuthèque cardiaque unique à partir de donneurs sains, qui nous a permis, pour la première fois, de caractériser de manière globale la distribution des canaux ioniques dans différentes régions du cœur humain (Gaborit *et al.* ; Résultats et discussion - A - 1). L'originalité de cette étude réside notamment dans l'analyse des fibres de Purkinje, puisqu'à notre connaissance aucune donnée de ce type n'a été

publiée à ce jour. Les propriétés du courant I_{Na} des fibres de Purkinje présente des différences par rapport à celui des ventricules, suggérant une origine moléculaire différente. Il est notamment sensible à la tétrodotoxine (TTX), alors que I_{Na} ventriculaire, généré par la sous-unité Nav1.5, ne l'est pas (Carmeleit, 1987). L'expression majoritaire de la sous-unité neuronale Nav1.7, TTX-sensible (Klugbauer *et al.*, 1995), dans ce tissu cardiaque apporte donc des éléments nouveaux pour la compréhension de la nature moléculaire de son courant sodique. Par ailleurs, des mutations de MiRP1 ont été associées à des troubles du rythme ventriculaires (Abbott *et al.*, 1999 ; Sesti *et al.*, 2000 ; Isbrandt *et al.*, 2002). L'expression majoritaire de ce gène dans les fibres de Purkinje, pourrait permettre de mieux comprendre leur contribution dans la survenue de ces arythmies. Bien entendu, ces suggestions ne peuvent être faites que si l'on considère que le profil transcriptionnel se répercute au niveau fonctionnel. La validation de ces hypothèses requiert donc une analyse des courants générés par les canaux ioniques d'intérêt.

Nous avons également montré que l'expression transcriptionnelle de plusieurs canaux ioniques varie en fonction du sexe du donneur (Gaborit *et al.* ; Résultats et discussion - A - 2). Cette étude peut fournir des bases dans la compréhension de la différence d'incidence en fonction du sexe de différentes arythmies cardiaques. En particulier, l'expression plus importante de KChIP2 chez les hommes par rapport aux femmes dans l'épicarde droit, pourrait permettre d'expliquer la forte incidence masculine du syndrome de Brugada. Par ailleurs, cette étude suggère l'implication des hormones stéroïdiennes dans le mécanisme de régulation de l'expression des canaux ioniques. Cependant des investigations supplémentaires seront nécessaires pour valider cette hypothèse. Une analyse des promoteurs des gènes différentiellement exprimés entre les hommes et les femmes a permis d'y prédire la présence du site de fixation du récepteur α aux œstrogènes (Transfac, M00191) pour 6 gènes, *GJA1*, *KCNA4*, *KCNH2*, *KCNJ4*, *IRX4* et *IRX3* (Cardiac Promoter Database, <http://morissardjerome.free.fr/cpd/index.html>). On peut donc suggérer un rôle du récepteur aux œstrogènes dans la régulation de l'expression de ces gènes. De manière complémentaire, il pourrait être également intéressant d'utiliser les deux modèles murins délétés respectivement pour le récepteur α ou β aux œstrogènes (Johnson *et al.*, 1997 ; Korte *et al.*, 2005) afin d'y caractériser de manière globale l'expression des canaux ioniques. Une recherche des sites de fixation du récepteur β aux œstrogènes, ainsi que des récepteurs à la testostérone et à la progestérone devrait également être informative, cependant à l'heure actuelle ces matrices ne sont pas disponibles.

Plusieurs projets nous ont également permis d'aborder la notion de remodelage ionique associé à des situations pathologiques. L'un d'eux nous a permis de montrer que le remodelage ionique associé spécifiquement à la fibrillation auriculaire concerne uniquement

12 gènes, dont *KCNE3* (MiRP2) qui est sur-exprimé (Gaborit *et al.*, 2005). Fort de ce résultat, nous avons développé au laboratoire un modèle de souris sur-exprimant le gène *KCNE3*. La caractérisation électrophysiologique de ce modèle bien que débutante, montre que les souris sur-exprimantes développent spontanément une FA vers l'âge de 24 semaines. Si ces données se confirment, ce modèle va nous permettre d'analyser le remodelage ionique qui s'installe au cours du temps et qui conduit à la FA.

L'étude du remodelage ionique associé au syndrome de Brugada nous a permis d'aborder le pouvoir potentiel de la génomique dans le diagnostic d'un syndrome arythmique. A l'avenir, il sera intéressant de réaliser d'autres investigations afin de confirmer cette hypothèse (développé page 217).

L'ensemble des travaux de cette thèse ont permis de montrer que les cellules cardiaques sont capables d'adapter leurs propriétés électrophysiologiques à des contraintes externes, en modifiant la transcription de leurs canaux ioniques.

La régulation transcriptionnelle des canaux semble avoir un rôle majeur dans les propriétés électrophysiologiques des cellules cardiaques.

N. LIMITES DE L'APPROCHE DÉDIÉE ET DE L'UTILISATION DE TISSUS HUMAINS

Nous avons souvent été critiqués de se focaliser sur l'expression des canaux ioniques tandis que des outils permettent d'étudier l'ensemble des gènes du génome. Cependant, les résultats que nous avons obtenu valident notre démarche. Nous avons toutefois conscience que le phénotype cardiaque physiologique ou pathologique, n'est pas lié qu'aux propriétés électrophysiologiques. Un remodelage notamment au niveau des protéines contractiles, de la matrice extracellulaire, de l'étirement ou encore de la vascularisation, peuvent également jouer un rôle non négligeable dans ce phénotype. Notre approche dédiée ne nous permettant pas d'aborder ces propriétés, l'interprétation de l'origine du remodelage ionique auquel nous nous intéressons, est limitée. L'utilisation des puces à ADN multidédiées ou pangénomiques présente dans ce contexte un avantage certain. En effet, bien que le niveau de sensibilité des puces ne permette de détecter que difficilement les gènes faiblement exprimés tels que les canaux ioniques, l'étude du remodelage transcriptionnel est beaucoup plus exhaustif. En collaboration avec Marja Steenman, nous nous sommes intéressés au remodelage structural et contractile associé à

la fibrillation auriculaire, grâce à la technique des puces multidédiées, MyoChip (Lamirault *et al.*, 2006 ; Article supplémentaire, page 248). L'idée actuelle est que l'état hypercoagulable associé à la fibrillation auriculaire est lié à la perte de contraction atriale qui mène à une stase du sang (Nattel, 2002a). Un des résultats majeurs de notre étude est l'augmentation de l'expression de facteurs procoagulants. Elle met donc en évidence un nouveau mécanisme qui pourrait potentiellement participer à l'état thromboembolique associé à la fibrillation auriculaire et ainsi permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Actuellement, nous poursuivons cette étude par une analyse de ces facteurs procoagulants dans des échantillons sanguins provenant des mêmes types de patients. L'objectif est d'identifier de nouveaux marqueurs moléculaires spécifiques qui pourraient aider à confirmer le pronostic et le diagnostic du risque thromboembolique associé à la fibrillation auriculaire, à partir de prélèvements non invasifs.

J'ai fait le choix de travailler sur du tissu humain malgré les contraintes que cela pose. En effet, les études sont moins standardisées que chez l'animal et de la molécule à la fonction, tout y est plus compliqué. Tout d'abord, les fameux "contrôles" sont un problème. Grâce à une collaboration avec le P^r Varró, nous avons pu constituer une tissuthèque à partir de cœurs de donneurs sains dont seules les valves sont transplantées. Ces conditions particulières nous ont permis d'avoir accès à nombre élevé d'échantillons de différents types tissulaires cardiaques, de très bonne qualité, et très reproductible en terme de mode de dissection. Cependant, nous restons malgré tout limités dans le choix de l'âge et du sexe du donneur.

L'accès aux tissus pathologiques n'est guère plus facile. L'institut du thorax nous offre la possibilité de travailler dans la même structure que des cardiologues. Grâce à ces derniers, j'ai pu bénéficier d'un accès privilégié à des auricules. De plus, nous avons établi des collaborations avec Stanley Nattel, à Montréal, et Thomas Wichter, en Allemagne, qui nous ont permis d'obtenir les tissus insuffisants cardiaques et les biopsies de patients présentant un syndrome du Brugada. Ceci n'empêche pas le fait que l'aspect cinétique, c'est à dire la mise en place d'une pathologie est quasi impossible chez l'homme.

La difficulté d'accès aux tissus humains complexifie beaucoup les analyses électrophysiologiques et donc la validation au niveau fonctionnel des profils transcriptionnels obtenus par génomique. En effet, les analyses des courants ioniques par la technique de patch-clamp doivent être réalisées sur cellules fraîchement isolées. De ce fait, les données électrophysiologiques chez l'homme sont beaucoup plus restreintes que chez les modèles animaux.

L'hétérogénéité transmurale de l'activité électrique n'est pas restreinte à l'épicarde et à l'endocarde, mais elle inclut également les cellules M présentes dans le mid-myocarde. Nous avons pourtant choisi de ne pas étudier ce compartiment tissulaire car 1) les cellules M

y sont regroupées en îlots, et les dissections de mid-myocarde ne sont donc pas homogènes en terme de contenu en cellules M (Akar *et al.*, 2002) et 2) la pertinence fonctionnelle de ces cellules est aujourd'hui remise en question (Bauer *et al.*, 1999 ; Ueda *et al.*, 2004), puisque leur influence dépend du degré de couplage électrotonique.

O. NOS OBJECTIFS FUTURS

1. La régulation transcriptionnelle des canaux ioniques

Au cours des dernières années, notre groupe a accumulé une large collection de données élucidant à l'échelle du génome comment l'expression des canaux ioniques varie dans diverses situations physiologiques et pathologiques. De façon logique, notre prochaine étape consiste à comprendre les mécanismes de la régulation transcriptionnelle des canaux ioniques et leur rôle dans la physiologie des cellules excitables du cœur.

a. Etape 1 : Mise en évidence des corrélations facteurs de transcription – canaux ioniques

Fort de notre expérience de génomique, la stratégie que nous avons choisi d'adopter consiste à **rechercher des corrélations entre les profils d'expression transcriptionnels** des canaux ioniques et ceux des facteurs de transcription, dans le tissu cardiaque, dans différentes conditions. Pour cela nous avons exploré le profil d'expression de 163 gènes codant des facteurs de transcription connus pour leur expression cardiaque, dans différentes régions du cœur de souris adulte. Nous avons ensuite comparé leurs profils à celui des canaux ioniques. Ce projet met donc à profit les résultats d'une précédente étude qui décrivait la régionalisation des canaux ioniques (Marionneau *et al.*, 2005). Cette étude a permis par exemple d'identifier des corrélations fortes de Shox2, GATA5, Sox9 et Msx1 avec les sous-unités Cav3.1 et Cava2δ2, dans les structures nodales et entre Pparα, Irx3, Irx5, Hsf1 et Ets2 avec Nav1.5 et KChIP2 dans les structures ventriculaires.

En parallèle, nous avons mis en évidence chez l'homme une corrélation inverse entre le profil d'expression transmural de KChIP2 et celui de IRX3 et IRX5 (Résultats et discussion - A - 2).

Notre approche génomique nous a donc permis d'identifier plusieurs facteurs de transcription susceptibles de réguler l'expression de canaux ioniques jouant un rôle majeur dans la formation du PA cardiaque. Cependant, cette approche présente une critique majeure liée au fait que l'activité des facteurs de transcription peut ne pas être régulée par leur niveau d'expression transcriptionnel, mais par d'autres mécanismes tels que des

modifications post-traductionnelles. Ces premières pistes seront donc à valider par les analyses décrites ci-dessous.

b. Etape 2 : Validation bioinformatique des corrélations facteurs de transcription – canaux ioniques

Une première option consiste à faire une **validation bioinformatique** des corrélations mises en évidence par le biais de la génomique. Elle repose sur le clonage et l'analyse *in silico* des séquences promotrices des gènes codant les sous-unités des canaux ioniques. La corrélation entre la présence ou l'absence des sites de fixation des facteurs de transcription dans les régions promotrices avec l'expression différentielle des gènes sera alors analysée.

Ces deux premières étapes ne sont que des suppositions, il est donc indispensable de les valider biologiquement.

c. Etape 3 : Validation biologique des corrélations facteurs de transcription – canaux ioniques

Validation *in vitro* :

- **utilisation des siRNA.** Suite à la transfection de cardiomyocytes néonataux de souris par des *siRNA* (petits ARN interférents) dirigés contre un facteur de transcription, l'analyse global du remodelage ionique devrait permettre l'identification des canaux dont il contrôle l'expression. Cette approche limite cependant le choix des facteurs de transcription candidats à des gènes exprimés au stade néonatal. Si l'expression des canaux ioniques est modifiée, les **conséquences fonctionnelles** seront évaluées par patch-clamp.

Si tel n'est pas le cas, une autre possibilité pourrait être de **sur-exprimer le gène codant le facteur de transcription** d'intérêt suivi, de la même manière, par une investigation des modifications d'expression des canaux ioniques.

- **essai rapporteur luciférase.** L'objectif serait alors de cloner le gène rapporteur sous le promoteur du canal ionique dont la régulation transcriptionnelle est étudiée. Après co-transfection avec le facteur de transcription candidat, l'analyse du niveau de fluorescence devrait permettre de valider ou non leur corrélation. Cette approche implique donc la mise à profit des clonages bioinformatiques de promoteurs. Nous avons démarré un projet de ce type dont l'objectif est d'évaluer l'effet de IRX3 ou de SRF sur l'expression transcriptionnelle de KChIP2.

- **l'approche ChIP on chips.** Elle devrait permettre par la suite d'identifier les gènes dont l'expression est contrôlée par un facteur de transcription en particulier (Weinmann, 2004). Cette méthode consiste à immunoprécipiter la chromatine (ChIP) avec un anticorps dirigé contre un facteur de transcription, et hybrider l'ADN co-immunoprécipité sur une puce à ADN (chip) contenant des régions inter-géniques, et en particulier, des régions promotrices.

Validation *in vivo* :

l'étude de modèles animaux. Notre but ultime est de vérifier que les régulations mises en évidence ont des conséquences fonctionnelles *in vivo*. Pour cela, nous avons réalisé en collaboration avec l'équipe de Zhenlin Li (Université de Paris VI) et Dominique Daegelen (Institut Cochin) l'analyse globale de l'expression des canaux ioniques dans un modèle murin invalidé de façon conditionnelle pour le facteur de transcription Srf. Les résultats montrent que l'expression de KChIP2 est spécifiquement réduite de moitié alors que les autres canaux ne sont pas affectés.

De manière générale, l'utilisation de modèles transgéniques murins conditionnels devrait permettre de palier à la létalité et de limiter au maximum la mise en place d'un remodelage ionique compensateur de l'invalidation du facteur de transcription.

d. Autres aspects de la régulation transcriptionnelle : modulation par des senseurs

Dans un système idéal, le paramètre qui devrait réguler l'expression des canaux ioniques est le phénotype électrophysiologique. On peut donc émettre l'hypothèse d'un rétro-contrôle par le potentiel membranaire ou encore par le calcium intracellulaire, de l'expression des facteurs de transcription (Rosati & McKinnon, 2004). A l'heure actuelle, aucun mécanisme de ce type n'est connu dans les myocytes. A plus long terme, il serait intéressant d'identifier comment une cellule cardiaque informe sa machinerie de transcription des variations de son potentiel de membrane et/ou de son calcium intracellulaire (Figure 56, page 217).

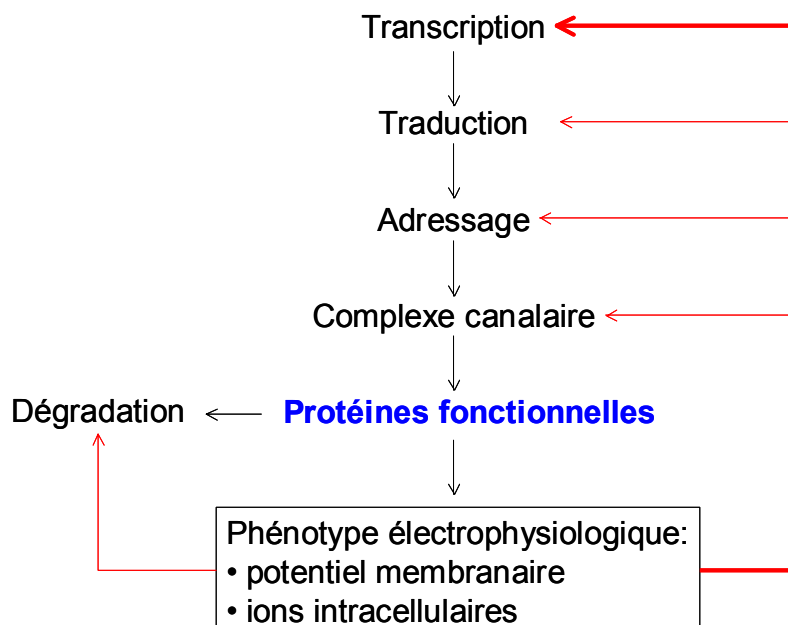


Figure 56 Représentation des différentes voies de régulation du phénotype cellulaire électrophysiologique.

2. La génomique : outil diagnostique

Au cours de ma thèse, l'étude du syndrome de Brugada (Witcher *et al.*, soumis ; Résultat et discussion - B - 2) a permis de suggérer le potentiel de la génomique en tant qu'outil diagnostique d'un syndrome arythmique. Etant donné les difficultés actuelles liées à l'évaluation des signes cliniques du syndrome de Brugada, cette nouvelle approche pourrait constituer un apport fondamental dans le diagnostic de cette pathologie. Les perspectives de ce travail sont donc maintenant de valider ce nouveau concept.

Le premier objectif consiste à prouver que l'analyse du transcriptome de biopsies cardiaques peut, de manière fiable, participer au diagnostic du syndrome de Brugada. Pour cela, il est indispensable de démontrer que le remodelage ionique que nous avons décrit est bien spécifiquement et exclusivement associé au syndrome de Brugada. Le programme de recherche à venir consiste donc à réaliser le même travail sur des biopsies de patients présentant différentes indications d'implantation d'un défibrillateur (tachycardie ventriculaire droite et dysplasie ventriculaire droite arythmogène). En parallèle, une analyse de l'ensemble de ces échantillons tissulaires sur puce à ADN pangénomique devrait permettre d'élargir l'investigation au delà du remodelage ionique.

Par ailleurs, l'importance des risques associés au prélèvement de biopsies endomyocardiques, nous ont amené à évaluer la génomique en tant qu'outil diagnostique, sur des échantillons de sang de patients atteints du syndrome de Brugada. Cette source de matériel clinique est rapidement disponible et son prélèvement est non invasif. Cette étude n'a malheureusement pas permis d'identifier un profil d'expression caractéristique de la pathologie. Cependant, pour des questions techniques, nous avons dû utiliser nos *Low Density Arrays* spécifiques du cœur, et le nombre de canaux ioniques détectés dans les prélèvements sanguins était très limité. Par conséquent, considérant que nous n'avons pas d'expertise dans le transcriptome spécifique des cellules sanguines, il serait intéressant de poursuivre cette étude par une analyse sur puces pangénomiques. Dans ce contexte, elles présentent un avantage indéniable puisque toute variation transcriptionnelle, liée ou non à l'activité électrique, serait détectée.

3. La modélisation mathématique des données de génomique

L'objectif ultime de la génomique fonctionnelle des canaux ioniques dans le cœur est l'intégration des données d'expression dans les modèles mathématiques de l'activité électrique cardiaque (Noble, 2004) tels que les modèle de potentiel d'action à l'échelle tissulaire, et les modèles de l'électrocardiogramme de surface à l'échelle de l'organe. Il faudra pour cela avoir connaissance des conséquences fonctionnelles des phénomènes d'adaptation moléculaire et être en mesure d'intégrer ces données à l'échelle de la cellule, du tissu et de l'organe. Cet objectif ambitieux ne pourra être envisagé qu'à long terme après l'accumulation et la comparaison de plusieurs études.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW, Keating MT, Goldstein SA. MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell*. 1999;97:175-187.

Abi-Gerges N, Philp K, Pollard C, Wakefield I, Hammond TG, Valentin JP. Sex differences in ventricular repolarization: from cardiac electrophysiology to Torsades de Pointes. *Fundam. Clin. Pharmacol*. 2004a;18:139–151.

Abi-Gerges N, Small BG, Lawrence CL, Hammond TG, Valentin JP, Pollard CE. Evidence for gender differences in electrophysiological properties of canine Purkinje fibres. *Br. J. Pharmacol*. 2004b;142:1255–1264.

Acierio LJ. The history of cardiology. *The Parthenon Publishing Group, London*. 1994.

Aime-Sempe C, Folliguet T, Rucker-Martin C, Krajewska M, Krajewska S, Heimbürger M, Aubier M, Mercadier JJ, Reed JC, Hatem SN. Myocardial cell death in fibrillating and dilated human right atria. *J Am Coll Cardiol*. 1999;34:1577-1586.

Akar FG, Yan GX, Antzelevitch C, Rosenbaum DS. Unique topographical distribution of M cells underlies reentrant mechanism of torsade de pointes in the long-QT syndrome. *Circulation*. 2002;105:1247-1253.

Akazawa H, Komuro I. Pharmacological therapeutics based on molecular mechanisms *Nippon Rinsho*. 2006;64:897-903.

Alings M, Wilde A. "Brugada" syndrome: clinical data and suggested pathophysiological mechanism. *Circulation*. 1999;99:666-673.

Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson JJr, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Staudt LM. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403:503-511.

Allessie R, Nusynowitz M, Abildskov JA, Moe GK. Non-uniform distribution of vagal effects on atrial refractory period. *Am J Physiol*. 1958;194:406–410.

Allessie MA, Lammers WJ, Bonke IM, Hollen J. Intra-atrial reentry as a mechanism for atrial flutter induced by acetylcholine and rapid pacing in the dog. *Circulation*. 1984;70:123–135.

Andelfinger G, Tapper AR, Welch RC, Vanoye CG, George Jr AL, Benson DW. KCNJ2 mutation results in Andersen and skeletal muscle phenotypes, *Am. J. Hum. Genet*. 2002;71:663–668.

Antzelevitch A, Fish J. Electrical heterogeneity within the ventricular wall. *Basic Res. Cardiol*. 2001;96:517–527.

Antzelevitch C, Brugada P, Brugada J, Brugada R, Shimizu W, Gussak I, Perez Riera AR. Brugada syndrome: a decade of progress. *Circ Res*. 2002;91:1114-1118.

Antzelevitch A, Brugada P, Brugada J, Brugada R, Towbin JA, Nademanee K. Brugada syndrome: 1992–2002: a historical perspective. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2003;41:1665–1671.

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;111:659-670.

Antzelevitch C, Fish JM. Therapy for the Brugada syndrome. *Handb Exp Pharmacol.* 2006;171:305-330.

Armoundas AA, Wu R, Juang G, Marban E, Tomaselli GF. Electrical and structural remodeling of the failing ventricle. *Pharmacol Ther.* 2001;92:213-230.

Ashamalla SM, Navarro D, Ward CA. Gradient of sodium current across the left ventricular wall of adult rat hearts. *J Physiol.* 2001;536:439-443.

Barnett V, Lewis T. Outliers in statistical data. *John Willey & Sons, New York.* 1984

Barr CS, Naas A, Freeman M, Lang CC, Struthers AD. QT dispersion and sudden unexpected death in chronic heart failure. *Lancet.* 1994;343:327-329.

Barrans JD, Allen PD, Stamatiou D, Dzau VJ, Liew CC. Global gene expression profiling of end-stage dilated cardiomyopathy using a human cardiovascular-based cDNA microarray. *Am J Pathol.* 2002;160:2035-2043.

Bauer A, Becker R, Freigang KD, Senges JC, Voss F, Hansen A, Muller M, Lang HJ, Gerlach U, Busch A, Kraft P, Kubler W, Schols W. Rate- and site-dependent effects of propafenone, dofetilide, and the new I(Ks)-blocking agent chromanol 293b on individual muscle layers of the intact canine heart. *Circulation.* 1999;100:2184-2190.

Bauer A, Becker R, Karle C, Schreiner KD, Senges JC, Voss F, Kraft P, Kuebler W, Schoels W. Effects of the I(Kr)-blocking agent dofetilide and of the I(Ks)-blocking agent chromanol 293b on regional disparity of left ventricular repolarization in the intact canine heart. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2002;39:460-467.

Bazett H. An analysis of time-relations of electrocardiograms. *Heart.* 1920;7:353-370.

Bean BP. Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology. *J Gen Physiol.* 1985;86:1-30.

Belhassen B, Glick A, Viskin S. Efficacy of quinidine in high-risk patients with Brugada syndrome. *Circulation.* 2004;110:1731-1737.

Benjamin EJ, Wolf PA, D'Agostino RB, Silbershatz H, Kannel WB, Levy D. Impact of atrial fibrillation on the risk of death: the Framingham Heart Study. *Circulation.* 1998;98:946-952.

Benton RE, Sale M, Flockhart DA, Woosley RL. Greater quinidine-induced QTc interval prolongation in women. *Clin Pharmacol Ther.* 2000;67:413-418.

Berger RD, Kasper EK, Baughman KL, Marban E, Calkins H, Tomaselli GF. Beat-to-beat QT interval variability: novel evidence for repolarization lability in ischemic and nonischemic dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 1997;96:1557-1565.

Bertucci F, Houlgatte R, Benziene A, Granjeaud S, Adelaide J, Tagett R, Lloriod B, Jacquemier J, Viens P, Jordan B, Birnbaum D, Nguyen C. Gene expression profiling of primary breast carcinomas using arrays of candidate genes. *Hum Mol Genet*. 2000;9:2981-2991.

Beuckelmann DJ, Nabauer M, Erdmann E. Alterations of K⁺ currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res*. 1993;73:379-385.

Bezzina CR, Rook MB, Wilde AA. Cardiac sodium channel and inherited arrhythmia syndromes. *Cardiovasc Res*. 2001;49:257-271.

Bidoggia H, Maciel JP, Capalozza N, Mosca S, Blaksley EJ, Valverde E, Bertran G, Arini P, Biagetti MO, Quinteiro RA. Sex differences on the electrocardiographic pattern of cardiac repolarization: possible role of testosterone. *Am. Heart J*. 2000;140:678-683.

Bittner M, Meltzer P, Chen Y, Jiang Y, Seftor E, Hendrix M, Radmacher M, Simon R, Yakhini Z, Ben-Dor A, Sampas N, Dougherty E, Wang E, Marincola F, Gooden C, Lueders J, Glatfelter A, Pollock P, Carpten J, Gillanders E, Leja D, Dietrich K, Beaudry C, Berens M, Alberts D, Sondak V. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature*. 2000;406:536-540.

Bleumink GS, Knetsch AM, Sturkenboom MC, Straus SM, Hofman A, Deckers JW, Witteman JC, Stricker BH. Quantifying the heart failure epidemic: prevalence, incidence rate, lifetime risk and prognosis of heart failure The Rotterdam Study. *Eur Heart J*. 2004;25:1614-1619.

Boixel C, Gonzalez W, Louedec L, Hatem SN. Mechanisms of L-type Ca²⁺ current downregulation in rat atrial myocytes during heart failure. *Circ Res*. 2001;89:607-613.

Boixel C, Fontaine V, Rucker-Martin C, Milliez P, Louedec L, Michel JB, Jacob MP, Hatem SN. Fibrosis of the left atria during progression of heart failure is associated with increased matrix metalloproteinases in the rat. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42:336-344.

Borlak J, Thum T. Hallmarks of ion channel gene expression in end-stage heart failure. *FASEB J*. 2003;17:1592-1608.

Bosch RF, Zeng X, Grammer JB, Popovic K, Mewis C, Kuhlkamp V. Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*. 1999;44:121-131.

Boutjdir M, Le Heuzey JY, Lavergne T, Chauvaud S, Guize L, Carpentier A, Peronneau P. Inhomogeneity of cellular refractoriness in human atrium: factor of arrhythmia? *Pacing Clin Electrophysiol*. 1986;9:1095-1100.

Boyett MR, Harrison SM, Janvier NC, McMorn SO, Owen JM, Shui Z. A list of vertebrate cardiac ionic currents nomenclature, properties, function and cloned equivalents. *Cardiovasc Res*. 1996;32:455-481.

Brandt MC, Priebe L, Bohle T, Sudkamp M, Beuckelmann DJ. The ultrarapid and the transient outward K(+) current in human atrial fibrillation. Their possible role in postoperative atrial fibrillation. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32:1885-1896.

Broberg P. Statistical methods for ranking differentially expressed genes. *Genome. Biology.* 2003;4:R41-1-R4-9.

Brouillette J, Trepanier-Boulay V, Fiset C. Effect of androgen deficiency on mouse ventricular repolarization. *J Physiol.* 2003;546:403-413.

Brugada J, Brugada R, Brugada P. Right bundle-branch block and ST-segment elevation in leads V1 through V3: a marker for sudden death in patients without demonstrable structural heart disease. *Circulation.* 1998;97:457-460.

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;20:1391-1396.

Brugada P, Brugada J, Brugada R. The Brugada syndrome. *Card Electrophys.* 2002;6:45–48.

Brugada P, Brugada R, Brugada J. Should patients with an asymptomatic Brugada electrocardiogram undergo pharmacological and electrophysiological testing? *Circulation.* 2005;112:279-292.

Brugada R, Tapscott T, Czernuszewicz GZ, Marian AJ, Iglesias A, Mont L, Brugada J, Girona J, Domingo A, Bachinski LL, Roberts R. Identification of a genetic locus for familial atrial fibrillation. *N Engl J Med.* 1997;336:905-911.

Brundel BJ, Henning RH, Kampinga HH, Van Gelder IC, Crijns HJ. Molecular mechanisms of remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc Res.* 2002;54:315-324.

Brunet S, Aimond F, Li H, Guo W, Eldstrom J, Fedida D, Yamada KA, Nerbonne JM. Heterogeneous expression of repolarizing, voltage-gated K⁺ currents in adult mouse ventricles. *J Physiol.* 2004;559:103-120.

Bryant SM, Wan X, Shipsey SJ, Hart G. Regional differences in the delayed rectifier current (I_{Kr} and I_{Ks}) contribute to the differences in action potential duration in basal left ventricular myocytes in guinea-pig. *Cardiovasc Res.* 1998;40:322-331.

Burke JH, Goldberger JJ, Ehlert FA, Kruse JT, Parker MA, Kadish AH. Gender differences in heart rate before and after autonomic blockade: evidence against an intrinsic gender effect. *Am J Med.* 1996;100:537-543.

Burke JH, Ehlert FA, Kruse JT, Parker MA, Goldberger JJ, Kadish AH. Gender-specific differences in the QT interval and the effect of autonomic tone and menstrual cycle in healthy adults. *Am. J. Cardiol.* 1997;79:178–181.

Cardin S, Li D, Thorin-Trescases N, Leung TK, Thorin E, Nattel S. Evolution of the atrial fibrillation substrate in experimental congestive heart failure: angiotensin-dependent and -independent pathways. *Cardiovasc Res.* 2003;60:315-325.

Carmeliet E. Repolarisation and frequency in cardiac cells. *J Physiol (Paris).* 1977;73:903–923.

Carmeliet E. Slow inactivation of the sodium current in rabbit cardiac Purkinje fibres. *Pflugers Arch.* 1987;408:18-26.

Cerbai E, Pino R, Porciatti F, Sani G, Toscano M, Maccherini M, Giunti G, Mugelli A. Characterization of the hyperpolarization-activated current, $I(f)$, in ventricular myocytes from human failing heart. *Circulation.* 1997;95:568-571.

Cerbai E, Sartiani L, DePaoli P, Pino R, Maccherini M, Bizzarri F, DiCiolla F, Davoli G, Sani G, Mugelli A. The properties of the pacemaker current $I(F)$ in human ventricular myocytes are modulated by cardiac disease. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33:441-448.

Chan PS, Vijan S, Morady F, Oral H. Cost-effectiveness of radiofrequency catheter ablation for atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47:2513-2520.

Chang CM, Wu TJ, Zhou S, Doshi RN, Lee MH, Ohara T, Fishbein MC, Karagueuzian HS, Chen PS, Chen LS. Nerve sprouting and sympathetic hyperinnervation in a canine model of atrial fibrillation produced by prolonged right atrial pacing. *Circulation.* 2001;103:22-25.

Chen Q, Kirsch GE, 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 RE, Schulze-Bahr E, Keating MT, Towbin JA, Wang Q. Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature.* 1998;392:293-296.

Chen YH, Xu SJ, Bendahhou S, Wang XL, Wang Y, Xu WY, Jin HW, Sun H, Su XY, Zhuang QN, Yang YQ, Li YB, Liu Y, Xu HJ, Li XF, Ma N, Mou CP, Chen Z, Barhanin J, Huang W. KCNQ1 gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation. *Science.* 2003;299:251-254.

Cheng J. Evidences of the gender-related differences in cardiac repolarization and the underlying mechanisms in different animal species and human. *Fundam Clin Pharmacol.* 2006;20:1-8.

Cheung DW. Electrical activity of the pulmonary vein and its interaction with the right atrium in the guinea-pig. *J Physiol.* 1981;314:445-456.

Cho RJ, Campbell MJ. Transcription, genomes, function. *Trends Genet.* 2000;16:409-415.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162:156-159.

Cohn JN. New concepts regarding events that lead to end-stage heart disease. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1995;9:489-492.

Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35:569-582.

Copeland JG, Smith RG, Arabia FA, Nolan PE, Sethi GK, Tsau PH, McClellan D, Slepian MJ; CardioWest Total Artificial Heart Investigators. Cardiac replacement with a total artificial heart as a bridge to transplantation. *N Engl J Med.* 2004;351:859-867.

Coraboeuf E, Weidmann S. Potentiel de repos et potentiel d'action du muscle cardiaque mesurés à l'aide d'électrodes intracellulaires. *CR Soc Seances Soc Biol Fil.* 1949;143:1329-1331.

Corrado D, Basso C, Nava A, Thiene G. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: current diagnostic and management strategies. *Cardiol Rev.* 2001;9:259-265.

Costantini DL, Arruda EP, Agarwal P, Kim KH, Zhu Y, Zhu W, Lebel M, Cheng CW, Park CY, Pierce SA, Guerchicoff A, Pollevick GD, Chan TY, Kabir MG, Cheng SH, Husain M, Antzelevitch C, Srivastava D, Gross GJ, Hui CC, Backx PH, Bruneau BG. The homeodomain transcription factor *Irx5* establishes the mouse cardiac ventricular repolarization gradient. *Cell*. 2005;123:347-358.

Coumel P, Attuel P, Lavalley J, Flammang D, Leclercq JF, Slama R. The atrial arrhythmia syndrome of vagal origin. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 1978;71:645-656.

Courtemanche M, Ramirez RJ, Nattel S. Ionic mechanisms underlying human atrial action potential properties: insights from a mathematical model. *Am J Physiol*. 1998;275:H301-H321.

Crow RS, Hannan PJ, Folsom AR. Prognostic significance of corrected QT and corrected JT interval for incident coronary heart disease in a general population sample stratified by presence or absence of wide QRS complex: the ARIC study with 13 years of follow-up. *Circulation* 2003;108:1985-1989.

Dai Y, Wang X, Cao L, Yang M, Wu T. Expression of extracellular signal-regulated kinase and angiotensin-converting enzyme in human atria during atrial fibrillation. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2004;24:32-36.

Daoud EG, Bogun F, Goyal R, Harvey M, Man KC, Strickberger SA, Morady F. Effects of atrial fibrillation on atrial refractoriness in humans. *Circulation*. 1996;94:1600-1606.

Darbar D, Herron KJ, Ballew JD, Jahangir A, Gersh BJ, Shen WK, Hammill SC, Packer DL, Olson TM. Familial atrial fibrillation is a genetically heterogeneous disorder. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:2185-2192.

Datta S, Satten GA, Benos DJ, Xia J, Heslin MJ, Datta S. An empirical bayes adjustment to increase the sensitivity of detecting differentially expressed genes in microarray experiments. *Bioinformatics*. 2004;20:235-242.

Decher N, Kumar P, Gonzalez T, Pirard B, Sanguinetti MC. Binding site of a novel Kv1.5 blocker: a "foot in the door" against atrial fibrillation. *Mol Pharmacol*. 2006; In press.

De Leo V, la Marca A, Agricola E, Morgante G, Mondillo S, Setacci C. Resting ECG is modified after oophorectomy and regresses with estrogen replacement therapy in premenopausal women. *Maturitas* 2000;36:43-47.

Derakhchan K, Li D, Courtemanche M, Smith B, Brouillette J, Page PL, Nattel S. Method for simultaneous epicardial and endocardial mapping of in vivo canine heart: application to atrial conduction properties and arrhythmia mechanisms. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2001;12:548-555.

Deroubaix E, Folliguet T, Rucker-Martin C, Dinanian S, Boixel C, Validire P, Daniel P, Capderou A, Hatem SN. Moderate and chronic hemodynamic overload of sheep atria induces reversible cellular electrophysiologic abnormalities and atrial vulnerability. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44:1918-1926.

Dhala A, Underwood D, Leman R, Madu E, Baugh D, Ozawa Y, Kasamaki Y, Xue Q, Reddy S. Signal-averaged P-wave analysis of normal controls and patients with paroxysmal atrial fibrillation: a study in gender differences, age dependence, and reproducibility. *Clin. Cardiol*. 2002;25:525-531.

Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:6025-6030.

Di Diego JM, Sun ZQ, Antzelevitch C. I(to) and action potential notch are smaller in left vs. right canine ventricular epicardium. *Am J Physiol*. 1996;271:H548-H561.

Di Diego JM, Cordeiro JM, Goodrow RJ, Fish JM, Zygmunt AC, Perez GJ, Scornik FS, Antzelevitch C. Ionic and cellular basis for the predominance of the Brugada syndrome phenotype in males. *Circulation* 2002;106:2004–2011.

DiFrancesco D. Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu Rev Physiol*. 1993;55:455-472.

DiPaola NR, Sweet WE, Stull LB, Francis GS, Schomisch Moravec C. Beta-adrenergic receptors and calcium cycling proteins in non-failing, hypertrophied and failing human hearts: transition from hypertrophy to failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33:1283-1295.

Dobrev D, Graf E, Wettwer E, Himmel HM, Hala O, Doerfel C, Christ T, Schuler S, Ravens U. Molecular basis of downregulation of G-protein-coupled inward rectifying K(+) current (I(K,ACh) in chronic human atrial fibrillation: decrease in GIRK4 Mrna correlates with reduced I(K,ACh) and muscarinic receptor-mediated shortening of action potentials. *Circulation*. 2001;104:2551-2557.

Dobrev D, Wettwer E, Kortner A, Knaut M, Schuler S, Ravens U. Human inward rectifier potassium channels in chronic and postoperative atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*. 2002;54:397-404.

Dobrev D, Ravens U. Remodeling of cardiomyocyte ion channels in human atrial fibrillation. *Basic Res Cardiol*. 2003;98:137-148.

Dobrev D, Friedrich A, Voigt N, Jost N, Wettwer E, Christ T, Knaut M, Ravens U. The G protein-gated potassium current I(K,ACh) is constitutively active in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation*. 2005;112:3697-3706.

Dobrev D. Electrical remodeling in atrial fibrillation. *Herz*. 2006;31:108-112

Drici MD, Baker L, Plan P, Barhanin J, Romey G, Salama G. Mice display sex differences in halothane-induced polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* 2002;106:497-503.

Dudoit S, Yang YH, Callow MJ, Speed TP. Statistical methods for identifying differentially expressed genes in replicated cDNA microarray experiments. *Statistica Sinica*. 2002;12:111-139.

Dumaine R, Towbin JA, Brugada P, Vatta M, Nesterenko DV, Nesterenko VV, Brugada J, Brugada R, Antzelevitch C. Ionic mechanisms responsible for the electrocardiographic phenotype of the Brugada syndrome are temperature dependent. *Circ Res*. 1999 29;85:803-809.

Ebert SN, Liu XK, Woosley RL. Female gender as a risk-factor for drug-induced cardiac arrhythmias: evaluation of clinical and experimental evidence. *J. Womens Health*. 1998;7:547-557.

Eckardt L, Haverkamp W, Borggrefe M, Breithardt G. Experimental models of torsade de pointes. *Cardiovasc. Res.* 1998;39:178-193.

Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). The CONSENSUS Trial Study Group. *N Engl J Med.* 1987;316:1429-1435.

Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. The SOLVD Investigators. *N Engl J Med.* 1991;325:293-302.

Efron B, Tibshirani R, Storey J, Tusher V. Empirical bayes. analysis of a microarray experiment. *J. Am. Statist. Assoc.* 2001;96:1151-1160.

Ehrlich JR, Hohnloser SH, Nattel S. Role of angiotensin system and effects of its inhibition in atrial fibrillation: clinical and experimental evidence. *Eur Heart J.* 2006;27:512-518.

Eichhorn EJ, Bristow MR. The Carvedilol Prospective Randomized Cumulative Survival (COPERNICUS) trial. *Curr Control Trials Cardiovasc Med.* 2001;2:20-23.

Einthoven W. Un nouveau galvanomètre. *Arch Neerl Sc Ex Nat.* 1901;6:625-633

Einthoven W. Die galvanometrische Registerung des menschlichen Elektrokardiogram: Zugleich eine Beurtheilung der Anwendung des Capillar-Elektrometers in der Physiologie. *Pflügers Arch ges Physiol.* 1903;99:472-480.

Einthoven W. Le telecardiogramme. *Arch Int de Physiol.* 1906;4:132-164

Einthoven W. Weiters über das Elektrokardiogramm. Nach gemeinschaftlich mit Dr. B. Vaandrager angestellten Versuchen mitgeteilt. *Pflüger Arch Gesamt Physiol.* 1908;122:517-584.

Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:14863-14868.

El Atifi M, Dupre I, Rostaing B, Chambaz EM, Benabid AL, Berger F. Long oligonucleotide arrays on nylon for large-scale gene expression analysis. *Biotechniques.* 2002;33:612-616, 618.

Elvan A, Pride HP, Eble JN, Zipes DP. Radiofrequency catheter ablation of the atria reduces inducibility and duration of atrial fibrillation in dogs. *Circulation.* 1995;91:2235-2244.

Faris R, Flather M, Purcell H, Henein M, Poole-Wilson P, Coats A. Current evidence supporting the role of diuretics in heart failure: a meta analysis of randomised controlled trials. *Int J Cardiol.* 2002;82:149-158.

Fehlbaum P, Guihal C, Bracco L, Cochet O. A microarray configuration to quantify expression levels and relative abundance of splice variants. *Nucleic Acids Res.* 2005;33:e47.

Fenelon G, Shepard RK, Stambler BS. Focal origin of atrial tachycardia in dogs with rapid ventricular pacing-induced heart failure. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2003;14:1093-1102.

Feng J, Wible B, Li GR, Wang Z, Nattel S. Antisense oligodeoxynucleotides directed against Kv1.5 mRNA specifically inhibit ultrarapid delayed rectifier K⁺ current in cultured adult human atrial myocytes. *Circ. Res.* 1997;80:572-579.

Flesch M, Schwinger RH, Schnabel P, Schiffer F, van Gelder I, Bavendiek U, Sudkamp M, Kuhn-Regnier F, Bohm M. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and phospholamban mRNA and protein levels in end-stage heart failure due to ischemic or dilated cardiomyopathy. *J Mol Med*. 1996;74:321-332.

Fraser HRL, Turner RWD. Auricular fibrillation with special reference to rheumatic heart disease. *Br. Med. J*. 1955;2:1414-1418.

Friberg J, Scharling H, Gadsboll N, Jensen GB. Sex-specific increase in the prevalence of atrial fibrillation (The Copenhagen City Heart Study). *Am. J. Cardiol*. 2003;92:1419-1423.

Futterman LG, Lemberg L. Heart failure: update on treatment and prognosis. *Am J Crit Care*. 2001;10:285-293.

Gajewski J, Singer RB. Mortality in an insured population with atrial fibrillation. *JAMA*. 1981;245:1540-1544.

Garrey WE. Auricular fibrillation. *Physiol. Rev*. 1924;4:215-250.

Gaspo R, Bosch RF, Bou-Abboud E, Nattel S. Tachycardia-induced changes in Na⁺ current in a chronic dog model of atrial fibrillation. *Circ Res*. 1997a;81:1045-1052.

Gaspo R, Bosch RF, Talajic M, Nattel S. Functional mechanisms underlying tachycardia-induced sustained atrial fibrillation in a chronic dog model. *Circulation* 1997b;96:4027-4035.

Gellens ME, George AL Jr, Chen LQ, Chahine M, Horn R, Barchi RL, Kallen RG. Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:554-558.

Gilbert DR, Schroeder M, van Helden J. Interactive visualization and exploration of relationships between biological objects. *Trends Biotechnol*. 2000;18:487-494.

Godtfredsen J. Atrial Fibrillation: Etiology, Course and Prognosis: A Follow-up Study of 1212 Cases. *Copenhagen, Denmark: Munksgaard*. 1975.

Goette A, Staack T, Rocken C, Arndt M, Geller JC, Huth C, Ansorge S, Klein HU, Lendeckel U. Increased expression of extracellular signal-regulated kinase and angiotensin-converting enzyme in human atria during atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*. 2000a;35:1669-1677.

Goette A, Arndt M, Rocken C, Spiess A, Staack T, Geller JC, Huth C, Ansorge S, Klein HU, Lendeckel U. Regulation of angiotensin II receptor subtypes during atrial fibrillation in humans. *Circulation*. 2000b;101:2678-2681.

Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*. 1999;286:531-537.

Gowda RM, Khan IA, Punukollu G, Vasavada BC, Sacchi TJ, Wilbur SL. Female preponderance in ibutilide-induced torsade de pointes. *Int J Cardiol*. 2004;95:219-222.

Grammer JB, Bosch RF, Kuhlkamp V, Seipel L. Molecular remodeling of Kv4.3 potassium channels in human atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2000;11:626-633.

Grant AO, Carboni MP, Neplioueva V, Starmer CF, Memmi M, Napolitano C, Priori S. Long QT syndrome, Brugada syndrome, and conduction system disease are linked to a single sodium channel mutation. *J Clin Invest*. 2002;110:1201-1209.

Grigioni F, Avierinos JF, Ling LH, Scott CG, Bailey KR, Tajik AJ, Frye RL, Enriquez-Sarano M. Atrial fibrillation complicating the course of degenerative mitral regurgitation: determinants and long-term outcome. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2002;40:84–92.

Gussak I, Antzelevitch C, Bjerregaard P, Towbin JA, Chaitman BR. The Brugada syndrome: clinical, electrophysiologic and genetic aspects. *J Am Coll Cardiol*. 1999;33:5-15.

Gutierrez A, Lopez JE. Update in atrial fibrillation. *P R Health Sci J*. 2004;23:279-284.
Haissaguerre M, Jais P, Shah DC, Takahashi A, Hocini M, Quiniou G, Garrigue S, Le Mouroux A, Le Metayer P, Clementy J. Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *N Engl J Med*. 1998;339:659-666.

Hamabe A, Okuyama Y, Miyauchi Y, Zhou S, Pak HN, Karagueuzian HS, Fishbein MC, Chen PS. Correlation between anatomy and electrical activation in canine pulmonary veins. *Circulation*. 2003;107:1550-1555.

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*. 1981;391:85-100.

Han W, Zhang L, Schram G, Nattel S. Properties of potassium currents in Purkinje cells of failing human hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283:H2495-H2503.

Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, Meyer M, Pieske B, Holtz J, Holubarsch C, Posival H, Just H, Drexler H. Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res*. 1994;75:434-442.

Haseroth K, Seyffart K, Wehling M, Christ M. Effects of progestin-estrogen replacement therapy on QT-dispersion in postmenopausal women. *Int. J. Cardiol*. 2000;75:161-165.

Haufe V, Cordeiro JM, Zimmer T, Wu YS, Schiccitano S, Benndorf K, Dumaine R. Contribution of neuronal sodium channels to the cardiac fast sodium current I_{Na} is greater in dog heart Purkinje fibers than in ventricles. *Cardiovasc Res*. 2005;65:117-127.

Hauswirth O, Noble D, Tsien RW. Adrenaline: mechanism of action on the pacemaker potential in cardiac Purkinje fibers. *Science*. 1968;162:916–917.

Heidenhain R. Ueber arrhythmische Herztätigkeit. *Pflüger Arch Gesamt Physiol*. 1872;5:143-153.

Henry WL, Morganroth J, Pearlman AS, Clark CE, Redwood DR, Itscoitz SB, Epstein SE. Relation between echocardiographically determined left atrial size and atrial fibrillation. *Circulation*. 1976;53:273-279.

Hering HE. Das Elektrokardiogramm des Pulsus irregularis perpetuus. *Dtsch Arch Klein Med*. 1908;94:205-208.

Hertervig E, Li Z, Kongstad O, Holm M, Olsson SB, Yuan S. Global dispersion of right atrial repolarization in healthy pigs and patients. *Scand Cardiovasc J*. 2003;37:329-333.

Hocini M, Ho SY, Kawara T, Linnenbank AC, Potse M, Shah D, Jais P, Janse MJ, Haissaguerre M, De Bakker JM. Electrical conduction in canine pulmonary veins: electrophysiological and anatomic correlation. *Circulation*. 2002;105:2442-2448.

Hodgkin AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol*. 1952;117:500-544.

Hondeghem LM, Hoffmann P. Blinded test in isolated female rabbit heart reliably identifies action potential duration prolongation and proarrhythmic drugs: importance of triangulation, reverse use dependence, and instability. *J. Cardiovasc. Pharmacol*. 2003;41:14-24.

Hondeghem LM, Lu HR, Rossem KV, De Clerck F. Detection of proarrhythmia in the female rabbit heart: blinded validation. *J. Cardiovasc. Electrophysiol*. 2003;14:287-294.

Hong K, Bjerregaard P, Gussak I, Brugada R. Short QT syndrome and atrial fibrillation caused by mutation in KCNH2. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2005;16:394-396.

Hoppe UC, Jansen E, Sudkamp M, Beuckelmann DJ. Hyperpolarization-activated inward current in ventricular myocytes from normal and failing human hearts. *Circulation*. 1998;97:55-65.

<http://bioconductor.org>

<http://cardioserve.nantes.inserm.fr/mad/madscan/login.php>

<http://morissardjerome.free.fr/cpd/index.html>

<http://www.insdc.org/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Huikuri HV, Pikkujamsa SM, Airaksinen KEJ, Ikaheimo MJ, Rantala AO, Kauma H, Lilja M, Kesaniemi YA. Sex-related differences in autonomic modulation of heart rate in middle-aged subjects. *Circulation* 1996;94:122-125.

Hulot JS, Demolis JL, Riviere R, Strabach S, Christin-Maitre S, Funck-Brentano C. Influence of endogenous oestrogens on QT interval duration. *Eur. Heart J*. 2003;24:1663-1667.

Hwang JJ, Allen PD, Tseng GC, Lam CW, Fananapazir L, Dzau VJ, Liew CC. Microarray gene expression profiles in dilated and hypertrophic cardiomyopathic end-stage heart failure. *Physiol Genomics*. 2002;10:31-44.

International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004;431:931-945.

Irisawa H, Brown HF, Giles W. Cardiac pacemaking in the sinoatrial node. *Physiol Rev*. 1993;73:197-227.

Isbrandt D, Friederich P, Solth A, Haverkamp W, Ebner A, Borggrefe M, Funke H, Sauter K, Breithardt G, Pongs O, Schulze-Bahr E. Identification and functional characterization of a novel KCNE2 (MiRP1) mutation that alters HERG channel kinetics. *J Mol Med*. 2002;80:524-532.

James AF, Arberry LA, Hancox JC. Gender-related differences in ventricular myocyte repolarization in the guinea pig. *Basic Res Cardiol*. 2004;99:183-192.

James AF, Choisy SC, Hancox JC. Recent advances in understanding sex differences in cardiac repolarization. *Prog Biophys Mol Biol*. 2005; In press.

Janse MJ, Rosen MR. History of arrhythmias. *Handb Exp Pharmacol*. 2006;1-39.

Jessup M, Brozena S. Heart failure. *N Engl J Med*. 2003;348:2007-2018.

Johnson BD, Zheng W, Korach KS, Scheuer T, Catterall WA, Rubanyi GM. Increased expression of the cardiac L-type calcium channel in estrogen receptor-deficient mice. *J Gen Physiol*. 1997;110:135-40.

Jose AD, Collison D. The normal range and determinants of the intrinsic heart rate in man. *Cardiovasc Res*. 1970;4:160-167.

Jost N, Virag L, Bitay M, Takacs J, Lengyel C, Biliczki P, Nagy Z, Bogats G, Lathrop DA, Papp JG, Varro A. Restricting excessive cardiac action potential and QT prolongation: a vital role for IKs in human ventricular muscle. *Circulation*. 2005;112:1392-1399.

Kaab S, Nuss HB, Chiamvimonvat N, O'Rourke B, Pak PH, Kass DA, Marban E, Tomaselli GF. Ionic mechanism of action potential prolongation in ventricular myocytes from dogs with pacing-induced heart failure. *Circ Res*. 1996;78:262-273.

Kaab S, Dixon J, Duc J, Ashen D, Nabauer M, Beuckelmann DJ, Steinbeck G, McKinnon D, Tomaselli GF. Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a reduction in current density. *Circulation*. 1998;98:1383-1393.

Kaab S, Näbauer M. Diversity of ion channel expression in health and disease. *European Heart Journal Supplements*. 2001;3:K31-K40

Kaab S, Barth AS, Margerie D, Dugas M, Gebauer M, Zwermann L, Merk S, Pfeufer A, Steinmeyer K, Bleich M, Kreuzer E, Steinbeck G, Nabauer M. Global gene expression in human myocardium-oligonucleotide microarray analysis of regional diversity and transcriptional regulation in heart failure. *J Mol Med*. 2004;82:308-316.

Kannel WB, Abbott RD, Savage DD, McNamara PM. Epidemiologic features of chronic atrial fibrillation: the Framingham study. *N Engl J Med*. 1982;306:1018-1022.

Kannel WB, Wilson PW, D'Agostino RB, Cobb J. Sudden coronary death in women. *Am Heart J*. 1998a;136:205-212.

Kannel WB, Wolf PA, Benjamin EJ, Levy D. Prevalence, incidence, prognosis, and predisposing conditions for atrial fibrillation: population-based estimates. *Am J Cardiol*. 1998b;82:2N-9N.

Kassotis J, Costeas C, Bedi AK, Tolat A, Reiffel J. Effects of aging and gender on QT dispersion in an overtly healthy population, *J. Pacing Clin. Electrophysiol*. 2000;23:1121-1126.

Katz AM. Heart failure: a hemodynamic disorder complicated by maladaptive proliferative responses. *J Cell Mol Med*. 2003;7:1-10.

Kaynak B, von Heydebreck A, Mebus S, Seelow D, Hennig S, Vogel J, Sperling HP, Pregla R, Alexi-Meskishvili V, Hetzer R, Lange PE, Vingron M, Lehrach H, Sperling S. Genome-wide array analysis of normal and malformed human hearts. *Circulation*. 2003;107:2467-2474.

Kearney MT, Fox KAA, Lee AJ, Brooksby WP, Shah AM, Flapan A, Prescott RJ, Andrews R, Batin PD, Eckberg DL, Gall N, Zaman AG, Lindsay HS, Nolan J. Predicting sudden death in patients with mild to moderate chronic heart failure. *Heart* 2004;90:1137-1143.

Kerr MK, Churchill GA. Bootstrapping cluster analysis: assessing the reliability of conclusions from microarray experiments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:8961-8965.

Kligfield P, Lax KG, Okin PM. QT interval-heart rate relation during exercise in normal men and women: definition by linear regression analysis. *J. Am. Coll. Cardiol*. 1996;28:1547-1555.

Klugsbauer N, Lacinova L, Flockerzi V, Hofmann F. Structure and functional expression of a new member of the tetrodotoxin-sensitive voltage-activated sodium channel family from human neuroendocrine cells. *EMBO J*. 1995;14:1084-1090.

Kneller J, Zou R, Vigmond EJ, Wang Z, Leon LJ, Nattel S. Cholinergic atrial fibrillation in a computer model of a two-dimensional sheet of canine atrial cells with realistic ionic properties. *Circ Res*. 2002;90:E73-E87.

Korte T, Fuchs M, Arkudas A, Geertz S, Meyer R, Gardiwal A, Klein G, Niehaus M, Krust A, Chambon P, Drexler H, Fink K, Grohe C. Female mice lacking estrogen receptor beta display prolonged ventricular repolarization and reduced ventricular automaticity after myocardial infarction. *Circulation*. 2005;111:2282-2290.

Kovoor P, Wickman K, Maguire CT, Pu W, Gehrmann J, Berul CI, Clapham DE. Evaluation of the role of I(KACh) in atrial fibrillation using a mouse knockout model. *J Am Coll Cardiol*. 2001;37:2136-2143.

Kurita T, Shimizu W, Inagaki M, Suyama K, Taguchi A, Satomi K, Aihara N, Kamakura S, Kobayashi J, Kosakai Y. The electrophysiologic mechanism of ST-segment elevation in Brugada syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40:330-334.

Lamirault G, Gaborit N, Le Meur N, Chevalier C, Lande G, Demolombe S, Escande D, Nattel S, Leger JJ, Steenman M. Gene expression profile associated with chronic atrial fibrillation and underlying valvular heart disease in man. *J Mol Cell Cardiol*. 2006;40:173-184.

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissole SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH,

Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blocker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglu S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409:860-921.

Landmesser U, Drexler H. Chronic heart failure: an overview of conventional treatment versus novel approaches. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2005;2:628-638.

Lauribe P, Escande D, Nottin R, Coraboeuf E. Electrical activity of human atrial fibres at frequencies corresponding to atrial flutter. *Cardiovasc Res*. 1989;23:159-168.

Le Grand BL, Hatem S, Deroubaix E, Couetil JP, Coraboeuf E. Depressed transient outward and calcium currents in dilated human atria. *Cardiovasc Res*. 1994;28:548-556.

Lehmann MH, Timothy KW, Frankovich D, Fromm BS. Age-gender influence on the rate-corrected QT interval and the QT-heart rate relation in families with genotypically characterized long QT syndrome. *J. Am. Coll. Cardiol*. 1997;29:93-99.

Lehnart SE, Schillinger W, Pieske B, Prestle J, Just H, Hasenfuss G. Sarcoplasmic reticulum proteins in heart failure. *Ann N Y Acad Sci*. 1998;853:220-230.

Le Meur N, Lamirault G, Bihoue A, Steenman M, Bedrine-Ferran H, Teusan R, Ramstein G, Leger JJ. A dynamic, web-accessible resource to process raw microarray scan data into consolidated gene expression values: importance of replication. *Nucleic Acids Res*. 2004;32:5349-5358.

Lemmens-Gruber R, Kamyar M. Vasopressin antagonists. *Cell Mol Life Sci*. 2006;63:1766-1779.

Lendeckel U, Arndt M, Wrenger S, Nepple K, Huth C, Ansorge S, Klein HU, Goette A. Expression and activity of ectopeptidases in fibrillating human atria. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33:1273-1281.

Lepeschkin E. Components of Q-T and Q-U intervals of the electrocardiogram in normals. *J. Appl. Physiol*. 1956;9:443-446.

Levinson S, Liu K, Stamler J, Stamler R, Whipple I, Ausbrook D, Berkson D. Ethnic differences in blood pressure and heart rate of Chicago school children. *Am. J. Epidemiol.* 1985;122:366-377.

Levy S. Drug Insight: angiotensin-converting-enzyme inhibitors and atrial fibrillation: indications and contraindications. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2006;3:220-225.

Lewis T. Auricular fibrillation: a common clinical condition. *Br Med J.* 1909;2:1528

Lewis T, Schleiter HG. The relation of regular tachycardias of auricular origin to auricular fibrillation. *Heart.* 1912;3:173-193.

Li D, Melnyk P, Feng J, Wang Z, Petrecca K, Shrier A, Nattel S. Effects of experimental heart failure on atrial cellular and ionic electrophysiology. *Circulation.* 2000;101:2631-2638.

Li D, Zhang L, Kneller J, Nattel S. Potential ionic mechanism for repolarization differences between canine right and left atrium. *Circ Res.* 2001a;88:1168-1175.

Li D, Shinagawa K, Pang L, Leung TK, Cardin S, Wang Z, Nattel S. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on the development of the atrial fibrillation substrate in dogs with ventricular tachypacing-induced congestive heart failure. *Circulation.* 2001b;104:2608-2614.

Li GR, Feng J, Yue L, Carrier M, Nattel S. Evidence for two components of delayed rectifier K⁺ current in human ventricular myocytes. *Circ Res.* 1996;78:689-696.

Li GR, Lau CP, Leung TK, Nattel S. Ionic current abnormalities associated with prolonged action potentials in cardiomyocytes from diseased human right ventricles. *Heart Rhythm.* 2004b;1:460-468.

Li J, McLerie M, Lopatin AN. Transgenic upregulation of IK1 in the mouse heart leads to multiple abnormalities of cardiac excitability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004a;287:H2790-H2802.

Linck B, Boknik P, Eschenhagen T, Muller FU, Neumann J, Nose M, Jones LR, Schmitz W, Scholz H. Messenger RNA expression and immunological quantification of phospholamban and SR-Ca(2⁺)-ATPase in failing and nonfailing human hearts. *Cardiovasc Res.* 1996;31:625-632.

Lindner M, Erdmann E, Beuckelmann DJ. Calcium content of the sarcoplasmic reticulum in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 1998;30:743-749.

Liu L, Nattel S. Differing sympathetic and vagal effects on atrial fibrillation in dogs: role of refractoriness heterogeneity. *Am J Physiol.* 1997;273:H805-H816.

Liu S, Yuan S, Hertervig E, Kongstad O, Olsson SB. Gender and atrioventricular conduction properties of patients with symptomatic atrioventricular nodal reentrant tachycardia and Wolff-Parkinson-White syndrome. *J. Electrocardiol.* 2001;34:295-301.

Liu XK, Katchman A, Drici MD, Ebert SN, Ducic I, Morad M, Woosley RL. Gender difference in the cycle length-dependent QT and potassium currents in rabbits. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1998;285:672-679.

Liu XK, Katchman A, Whitfield BH, Wan G, Janowski EM, Woosley RL, Ebert SN. In vivo androgen treatment shortens the QT interval and increases the densities of inward and

delayed rectifier potassium currents in orchietomized male rabbits. *Cardiovasc. Res.* 2003;57:28-36.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25:402-408.

Lloyd-Jones DM, Larson MG, Leip EP, Beiser A, D'Agostino RB, Kannel WB, Murabito JM, Vasan RS, Benjamin EJ, Levy D; Framingham Heart Study. Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study. *Circulation.* 2002;106:3068-3072.

London B, Sanyal S, Michalec M, Pfahnl AE, Shang LL, Kerchner L, Lagana S, Aleong RG, Mehdi H, Gutmann R, Weiss P, Dudley SC. A mutation in the Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase 1-Like Gene (GPD1L) causes Brugada syndrome. *Heart Rhythm Society. NASPE.* 2006;AB16-1:abstract.

Lonnstedt I, Speed TP. Replicated microarray data. *Statistical Sinica.* 2002;12:31-46.

Lüderitz B. History of the disorders of cardiac rhythm, second edn. *Futura Publishing Company, Armonk.* 1995.

Lüderitz B. The stor of atrial fibrillation. In: *Capucci A (ed) Atrial fibrillation. Centro Eitoriale Pubbicitario Italiano, Rome.* 2003:101-106.

Lu HR, Remeysen P, Somers K, Saels A, De Clerck F. Female gender is a risk factor for drug-induced long QT and cardiac arrhythmias in an in vivo rabbit model. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 2001;12:538-545.

Lue WM, Boyden PA. Abnormal electrical properties of myocytes from chronically infarcted canine heart. Alterations in Vmax and the transient outward current. *Circulation.* 1992;85:1175-1188.

Maier LS, Braunhalter J, Horn W, Weichert S, Pieske B. The role of SR Ca(2+)-content in blunted inotropic responsiveness of failing human myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34:455-467.

Makkar RP, Fromm BS, Steinman RT, Meissner MD, Lehmann MH. Female gender as a risk factor for torsades de pointes associated with cardiovascular drugs. *J. Am. Med. Assoc.* 1993;270:2590-2597.

Mancini D, Burkhoff D. Mechanical device-based methods of managing and treating heart failure. *Circulation.* 2005;112:438-448.

Mangoni ME, Traboulsie A, Leoni AL, Couette B, Marger L, Le Quang K, Kupfer E, Cohen-Solal A, Vilar J, Shin HS, Escande D, Charpentier F, Nargeot J, Lory P. Bradycardia and slowing of the atrioventricular conduction in mice lacking CaV3.1/alpha1G T-type calcium channels. *Circ Res.* 2006;98:1422-1430.

Manttari M, Oikarinen L, Manninen V, Viitasalo M. QT dispersion as a risk factor for sudden cardiac death and fatal myocardial infarction in a coronary risk population. *Heart* 1997;78: 268-272.

Margulies KB, Matiwala S, Cornejo C, Olsen H, Craven WA, Bednarik D. Mixed messages: transcription patterns in failing and recovering human myocardium. *Circ Res.* 2005;96:592-599.

Marionneau C, Couette B, Liu J, Li H, Mangoni ME, Nargeot J, Lei M, Escande D, Demolombe S. Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart. *J Physiol*. 2005;562:223-234.

Martini B, Nava A, Thiene G, Buja GF, Canciani B, Scognamiglio R, Daliento L, Dalla Volta S. Ventricular fibrillation without apparent heart disease: description of six cases. *Am Heart J*. 1989;118:1203-1209.

Martini B, Nava A, Canciani B, Thiene G. Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death. *J Am Coll Cardiol*. 1993;22:633.

Matsuo K, Akahoshi M, Seto S, Yano K. Disappearance of the Brugada-type electrocardiogram after surgical castration: a role for testosterone and an explanation for the male preponderance? *Pacing Clin. Electrophysiol*. 2003;26:1551-1553.

McCammon RW. A longitudinal study on electrocardiographic intervals in normal infants and children. *Acta Paediatr*. 1961;50:3-54.

McMorn SO, Harrison SM, Zang WJ, Yu XJ, Boyett MR. A direct negative inotropic effect of acetylcholine on rat ventricular myocytes. *Am J Physiol*. 1993;265:H1393- H1400.

McMurray JJ. Angiotensin II receptor antagonists for the treatment of heart failure: what is their place after ELITE-II and Val-HeFT? *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2001;2:89-92.

McMurray JJ, Pfeffer MA. Heart failure. *Lancet*. 2005;365:1877-1889.

McWilliams JA. Fibrillar contraction of the heart. *J Physiol (London)*. 1887;8:296-310.

Mercadier JJ, Lompre AM, Duc P, Boheler KR, Fraysse JB, Wisnewsky C, Allen PD, Komajda M, Schwartz K. Altered sarcoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase gene expression in the human ventricle during end-stage heart failure. *J Clin Invest*. 1990;85:305-309.

Meregalli PG, Wilde AA, Tan HL. Pathophysiological mechanisms of Brugada syndrome: depolarization disorder, repolarization disorder, or more? *Cardiovasc Res*. 2005;67:367-378.

Merot J, Probst V, Debailleul M, Gerlach U, Moise NS, Le Marec H, Charpentier F. Electropharmacological characterization of cardiac repolarization in German shepherd dogs with an inherited syndrome of sudden death: abnormal response to potassium channel blockers. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36:939-947.

Merri M, Benhorin J, Alberti M, Locati E, Moss A. Electrocardiographic quantitation of ventricular repolarization. *Circulation*. 1989;80:1301-1308.

Milliez P, Deangelis N, Rucker-Martin C, Leenhardt A, Vicaut E, Robidel E, Beaufile P, Delcayre C, Hatem SN. Spironolactone reduces fibrosis of dilated atria during heart failure in rats with myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2005;26:2193-2199.

Miyazaki T, Mitamura H, Miyoshi S, Soejima K, Ogawa S, Aizawa Y. Autonomic and antiarrhythmic drug modulation of ST segment elevation in patients with Brugada syndrome. *J. Am. Coll. Cardiol*. 1996;27:1061-1070.

Moe GK, Abildskov JA. Atrial fibrillation as a self-sustaining arrhythmia independent of focal discharge. *Am Heart J*. 1959;58:59-70.

Moe GK, Rheinboldt WC, Abildskov JA. A COMPUTER MODEL OF ATRIAL FIBRILLATION. *Am Heart J*. 1964;67:200-220.

Mohler PJ, Schott JJ, Gramolini AO, Dilly KW, Guatimosim S, duBell WH, Song LS, Haurogne K, Kyndt F, Ali ME, Rogers TB, Lederer WJ, Escande D, Le Marec H, Bennett V. Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature*. 2003;421:634-639.

Moore EN, Preston JB, Moe GK. Durations of transmembrane action potentials and functional refractory periods of canine false tendons and ventricular myocardium: comparisons in single fibers. *Circ Res*. 1965;17:259-273.

Mosterd A, Hoes AW, de Bruyne MC, Deckers JW, Linker DT, Hofman A, Grobbee DE. Prevalence of heart failure and left ventricular dysfunction in the general population; The Rotterdam Study. *Eur Heart J*. 1999;20:447-455.

Movsesian MA, Karimi M, Green K, Jones LR. Ca(2+)-transporting ATPase, phospholamban, and calsequestrin levels in nonfailing and failing human myocardium. *Circulation*. 1994;90:653-657.

Nabauer M, Beuckelmann DJ, Uberfuhr P, Steinbeck G. Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle. *Circulation*. 1996;93:168-177.

Naccarelli GV, Antzelevitch C. The Brugada syndrome: clinical, genetic, cellular, and molecular abnormalities. *Am J Med*. 2001;110:573-581.

Nademanee K, Veerakul G, Nimmannit S, Chaowakul V, Bhuripanyo K, Likittanasombat K, Tunsanga K, Kuasirikul S, Malasit P, Tansupasawadikul S, Tatsanavivat P. Arrhythmogenic marker for the sudden unexplained death syndrome in Thai men. *Circulation*. 1997;96:2595-2600.

Nakagawa M, Takahashi N, Watanabe M, Ichinose M, Nobe S, Yonemochi H, Ito M, Saikawa T. Gender differences in ventricular repolarization: terminal T wave interval was shorter in women than in men. *Pacing Clin. Electrophysiol*. 2003;26:59-64.

Nakashima H, Gerlach U, Schmidt D, Nattel S. In vivo electrophysiological effects of a selective slow delayed-rectifier potassium channel blocker in anesthetized dogs: potential insights into class III actions. *Cardiovasc Res*. 2004;61:705-714.

Nattel S, Quantz MA. Pharmacological response of quinidine induced early afterdepolarisations in canine cardiac Purkinje fibres: insights into underlying ionic mechanisms. *Cardiovasc Res*. 1988;22:808-817.

Nattel S. Experimental evidence for proarrhythmic mechanisms of antiarrhythmic drugs. *Cardiovasc Res*. 1998;37:567-577.

Nattel S, Li D. Ionic remodeling in the heart: pathophysiological significance and new therapeutic opportunities for atrial fibrillation. *Circ Res*. 2000;87:440-447.

Nattel S, Li D, Yue L. Basic mechanisms of atrial fibrillation--very new insights into very old ideas. *Annu Rev Physiol*. 2000;62:51-77.

Nattel S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature* 2002a;415:219-226.

Nattel S. Therapeutic implications of atrial fibrillation mechanisms: can mechanistic insights be used to improve AF management? *Cardiovasc Res.* 2002b;54:347-360.

Nattel S. Drugs to promote sinus rhythm reversion and maintenance in atrial fibrillation-why amiodarone is better. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2003;17:5-6.

Nerbonne JM, Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev.* 2005;85:1205-1253.

Ninomiya I. Direct evidence of nonuniform distribution of vagal effects on dog atria. *Circ Res.* 1966;19:576-583.

Noble D. Modeling the heart. *Physiology (Bethesda).* 2004;19:191-197.

Nuss HB, Houser SR. T-type Ca^{2+} current is expressed in hypertrophied adult feline left ventricular myocytes. *Circ Res.* 1993;73:777-782.

Nuwaysir EF, Huang W, Albert TJ, Singh J, Nuwaysir K, Pitas A, Richmond T, Gorski T, Berg JP, Ballin J, McCormick M, Norton J, Pollock T, Sumwalt T, Butcher L, Porter D, Molla M, Hall C, Blattner F, Sussman MR, Wallace RL, Cerrina F, Green RD. Gene expression analysis using oligonucleotide arrays produced by maskless photolithography. *Genome Res.* 2002;12:1749-1755.

Ogata K, Platt JL. Potential applications and prospects for cardiac xenotransplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2004;23:515-526.

Olson TM, Alekseev AE, Liu XK, Park S, Zingman LV, Bienengraeber M, Sattiraju S, Ballew JD, Jahangir A, Terzic A. Kv1.5 channelopathy due to KCNA5 loss-of-function mutation causes human atrial fibrillation. *Hum Mol Genet.* 2006;15:2185-2191.

O'Rourke B, Kass DA, Tomaselli GF, Kaab S, Tunin R, Marban E. Mechanisms of altered excitation-contraction coupling in canine tachycardia-induced heart failure, I: experimental studies. *Circ Res.* 1999;84:562-570.

Osher HL, Wolff L. Electrocardiographic pattern simulating acute myocardial injury. *Am J Med Sci.* 1953;226:541-545.

Ouadid H, Albat B, Nargeot J. Calcium currents in diseased human cardiac cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1995;25:282-291.

Pak PH, Nuss HB, Tunin RS, Kaab S, Tomaselli GF, Marban E, Kass DA. Repolarization abnormalities, arrhythmia and sudden death in canine tachycardia-induced cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 1997;30:576-584.

Pan W. A comparative review of statistical methods for discovering differentially expressed genes in replicated microarray experiments. *Bioinformatics.* 2002;18:546-554.

Pappone C, Santinelli V, Manguso F, Vicedomini G, Gugliotta F, Augello G, Mazzone P, Tortoriello V, Landoni G, Zangrillo A, Lang C, Tomita T, Mesas C, Mastella E, Alfieri O. Pulmonary vein denervation enhances long-term benefit after circumferential ablation for paroxysmal atrial fibrillation. *Circulation.* 2004;109:327-334.

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

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406:747-752.

Petanceska SS, Nagy V, Frail D, Gandy S. Ovariectomy and 17 β -estradiol modulate the levels of Alzheimer's amyloid β peptides in brain. *Neurology* 2000;54:2212–2217.

Peukert S, Brendel J, Pirard B, Bruggemann A, Below P, Kleemann HW, Hemmerle H, Schmidt W. Identification, synthesis, and activity of novel blockers of the voltage-gated potassium channel Kv1.5. *J Med Chem*. 2003;46:486-498.

Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CB, Held P, McMurray JJ, Michelson EL, Olofsson B, Ostergren J, Yusuf S, Pocock S; CHARM Investigators and Committees. Effects of candesartan on mortality and morbidity in patients with chronic heart failure: the CHARM-Overall programme. *Lancet*. 2003;362:759-766.

Pham TV, Sosunov EA, Gainullin RZ, Danilo Jr. P, Rosen MR. Impact of sex and gonadal steroids on prolongation of ventricular repolarization and arrhythmias induced by I_K -blocking drugs. *Circulation* 2001;103:2207-2212.

Pham TV, Robinson RB, Danilo Jr. P, Rosen MR. Effects of gonadal steroids on gender-related differences in transmural dispersion of L-type calcium current. *Cardiovasc. Res*. 2002;53:752-762.

Pham TV, Rosen MR. Sex, hormones, and repolarization. *Cardiovasc. Res*. 2002;53:740-751.

Piacentino V 3rd, Weber CR, Chen X, Weisser-Thomas J, Margulies KB, Bers DM, Houser SR. Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes. *Circ Res*. 2003;92:651-658.

Pieske B, Maier LS, Bers DM, Hasenfuss G. Ca²⁺ handling and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content in isolated failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res*. 1999;85:38-46.

Pietila E, Fodstad H, Niskasaari E, Laitinen P PJ, Swan H, Savolainen M, Kesaniemi YA, Kontula K, Huikuri HV. Association between HERG K897T polymorphism and QT interval in middle-aged Finnish women. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40:511-514.

Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*. 1999;341:709-717.

Polontchouk L, Haefliger JA, Ebelt B, Schaefer T, Stuhlmann D, Mehlhorn U, Kuhn-Regnier F, De Vivie ER, Dhein S. Effects of chronic atrial fibrillation on gap junction distribution in human and rat atria. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38:883-891.

Potreau D, Gomez JP, Fares N. Depressed transient outward current in single hypertrophied cardiomyocytes isolated from the right ventricle of ferret heart. *Cardiovasc Res*. 1995;30:440-448.

Prestle J, Dieterich S, Preuss M, Bieligg U, Hasenfuss G. Heterogeneous transmural gene expression of calcium-handling proteins and natriuretic peptides in the failing human heart. *Cardiovasc Res*. 1999;43:323-331.

Priori SG, Napolitano C, Giordano U, Collisani G, Memmi M. Brugada syndrome and sudden cardiac death in children. *Lancet*. 2000;355:808-809.

Priori SG, Napolitano C, Gasparini M, Pappone C, Della Bella P, Giordano U, Bloise R, Giustetto C, De Nardis R, Grillo M, Ronchetti E, Faggiano G, Nastoli J. Natural history of Brugada syndrome: insights for risk stratification and management. *Circulation*. 2002;105:1342-1347.

Probst V, Allouis M, Sacher F, Pattier S, Babuty D, Mabo P, Mansourati J, Victor J, Nguyen JM, Schott JJ, Boisseau P, Escande D, Le Marec H. Progressive cardiac conduction defect is the prevailing phenotype in carriers of a Brugada syndrome SCN5A mutation. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2006a ;17:270-275.

Probst V, Evain S, Gournay V, Marie A, Schott JJ, Boisseau P, LE Marec H. Monomorphic ventricular tachycardia due to Brugada syndrome successfully treated by hydroquinidine therapy in a 3-year-old child. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2006b;17:97-100.

Pruitt KD, Katz KS, Sicotte H, Maglott DR. Introducing RefSeq and LocusLink: curated human genome resources at the NCBI. *Trends Genet*. 2000;16:44-47.

Prystowsky EN, Naccarelli GV, Jackman WM, Rinkenberger RL, Heger JJ, Zipes DP. Enhanced parasympathetic tone shortens atrial refractoriness in man. *Am J Cardiol*. 1983;51:96-100.

Psaty BM, Manolio TA, Kuller LH, Kronmal RA, Cushman M, Fried LP, White R, Furberg CD, Rautaharju PM. Incidence of and risk factors for atrial fibrillation in older adults. *Circulation*. 1997;96:2455-2461.

Rautaharju PM, Zhou SH, Wong S, Calhoun HP, Berenson GS, Prineas R, Davignon A. Sex differences in the evolution of the electrocardiographic QT interval with age. *Can. J. Cardiol*. 1992;8:690-695.

Ravelli F, Allessie M. Effects of atrial dilatation on refractory period and vulnerability to atrial fibrillation in the isolated Langendorff-perfused rabbit heart. *Circulation*. 1997;96:1686-1695.

Ravens U, Wettwer E. Electrophysiological aspects of changes in heart rate. *Basic Res Cardiol*. 1998;93:60-65.

Redfern WS, Carlsson L, Davis AS, Lynch WG, MacKenzie I, Palethorpe S, Siegl PKS, Strang I, Sullivan AT, Wallis R. Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development. *Cardiovasc. Res*. 2003;58:32-45.

Reinecke H, Studer R, Vetter R, Holtz J, Drexler H. Cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchange activity in patients with end-stage heart failure. *Cardiovasc Res*. 1996;31:48-54.

Remme CA, Wever EFD, Wilde AAM, Derksen R, Hauer RNW. Diagnosis and long-term follow-up of the Brugada syndrome in patients with idiopathic ventricular fibrillation. *Eur. Heart J*. 2001;22:400-409.

Reuter H. The dependence of slow inward current in Purkinje fibres on the extracellular Calcium-concentration. *J Physiol*. 1967;192:479-492.

Roberts R. Mechanisms of disease: Genetic mechanisms of atrial fibrillation. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2006;3:276-282.

Rodriguez I, Kilborn MJ, Liu XK, Pezzullo JC, Woosley RL. Drug-induced QT prolongation in women during the menstrual cycle. *J. Am. Med. Assoc.* 2001;285:1322–1326.

Rosati B, McKinnon D. Regulation of ion channel expression. *Circ Res.* 2004;94:874-883.

Rose J, O'Rourke B, Kass DA, Tomaselli GF. $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ exchange (NCX) current density is unchanged in heart failure despite an increase in NCX protein. *Circulation* 1998;98:1–679.

Rosenshtraukh LV, Zaitsev AV, Fast VG, Pertsov AM, Krinsky VI. Vagally induced block and delayed conduction as a mechanism for circus movement tachycardia in frog atria. *Circ Res.* 1989;64:213-226.

Ross DT, Scherf U, Eisen MB, Perou CM, Rees C, Spellman P, Iyer V, Jeffrey SS, Van de Rijn M, Waltham M, Pergamenschikov A, Lee JC, Lashkari D, Shalon D, Myers TG, Weinstein JN, Botstein D, Brown PO. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nature Genetics.* 2000;24:227-235.

Rothberger CJ, Winterberg H. Vorhofflimmern und Arrhythmia perpetua. *Wiener Klinische Wochenschrift.* 1909;22:839-844

Rothberger CJ, Winterberg H. Über Vorhofflimmern und Vorhofflattern. *Pflüger's Arch Gesamte Physiol.* 1914;160:42-90

Rucker-Martin C, Pecker F, Godreau D, Hatem SN. Dedifferentiation of atrial myocytes during atrial fibrillation: role of fibroblast proliferation in vitro. *Cardiovasc Res.* 2002;55:38-52.

Rucker-Martin C, Milliez P, Tan S, Decrouy X, Recouvreur M, Vranckx R, Delcayre C, Renaud JF, Dunia I, Segretain D, Hatem SN. Chronic hemodynamic overload of the atria is an important factor for gap junction remodeling in human and rat hearts. *Cardiovasc Res.* 2006;72:69-79.

Saba S, Link MS, Homoud MK, Wang PJ, Estes NA 3rd. Effect of low estrogen states in healthy women on dispersion of ventricular repolarization. *Am J Cardiol.* 2001;87:354-356.
Saliba WJ. Dofetilide (Tikosyn): a new drug to control atrial fibrillation. *Cleve Clin J Med.* 2001;68:353-363.

Sanders P, Morton JB, Davidson NC, Spence SJ, Vohra JK, Sparks PB, Kalman JM. Electrical remodeling of the atria in congestive heart failure: electrophysiological and electroanatomic mapping in humans. *Circulation.* 2003;108:1461-1468.

Scavée C, Jaïs P, Weerasoorya R, Macle L, Hocini M, Hsu LF, Sanders P, Haïssaguerre M. Ablation de la fibrillation auriculaire : expérience d'un centre de référence. *Louvain Médical.* 2004;123:276-285.

Schatzkin A, Cupples LA, Heeren T, Morelock S, Kannel WB. Sudden death in the framingham heart study. differences in incidence and risk factors by sex and coronary disease status. *Am. J. Epidemiol.* 1984;120:888–899.

Schmutz J, Wheeler J, Grimwood J, Dickson M, Yang J, Caoile C, Bajorek E, Black S, Chan YM, Denys M, Escobar J, Flowers D, Fotopulos D, Garcia C, Gomez M, Gonzales E, Haydu L, Lopez F, Ramirez L, Retterer J, Rodriguez A, Rogers S, Salazar A, Tsai M, Myers RM. Quality assessment of the human genome sequence. *Nature.* 2004;429:365-368.

Schotten U, Greiser M, Benke D, Buerkel K, Ehrenteidt B, Stellbrink C, Vazquez-Jimenez JF, Schoendube F, Hanrath P, Allessie M. Atrial fibrillation-induced atrial contractile dysfunction: a tachycardiomyopathy of a different sort. *Cardiovasc Res.* 2002;53:192-201.

Schram G, Pourrier M, Melnyk P, Nattel S. Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. *Circ Res.* 2002;90:939-950.

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;21:651-652.

Sesti F, Abbott GW, Wei J, Murray KT, Saksena S, Schwartz PJ, Priori SG, Roden DM, George AL Jr, Goldstein SA. A common polymorphism associated with antibiotic-induced cardiac arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:10613-10618.

Shi F, Ozawa M, Komura H, Yang P, Trewin AL, Hutz RJ, Watanabe G, Taya K. Secretion of ovarian inhibin and its physiologic roles in the regulation of follicle-stimulating hormone secretion during the estrous cycle of the female Guinea pig. *Biol. Reprod.* 1999;60:78-84.

Shigekawa M, Iwamoto T. Cardiac Na(+)-Ca(2+) exchange: molecular and pharmacological aspects. *Circ Res.* 2001;88:864-876.

Shih HT. Anatomy of the action potential in the heart. *Tex Heart Inst J.* 1994;21:30-41.

Shiroshita-Takeshita A, Brundel BJ, Nattel S. Atrial fibrillation: basic mechanisms, remodeling and triggers. *J Interv Card Electrophysiol.* 2005;13:181-193.

Silva de Paula R, Antelmi I, Vincenzi MA, Andre CD, Artes R, Jose Grupi C, Jose Mansur A. Influence of age, gender, and serum triglycerides on heart rate in a cohort of asymptomatic individuals without heart disease. *Int J Cardiol.* 2005;105:152-158.

Skasa M, Jungling E, Picht E, Schondube F, Luckhoff A. L-type calcium currents in atrial myocytes from patients with persistent and non-persistent atrial fibrillation. *Basic Res Cardiol.* 2001;96:151-159.

Smetana P, Batchvarov VN, Hnatkova K, Camm AJ, Malik M. Sex differences in repolarization homogeneity and its circadian pattern. *Am. J. Physiol.* 2002;282:H1889-H1897.

Smetana P, Batchvarov V, Hnatkova K, Camm AJ, Malik M. Sex differences in the rate dependence of the T wave descending limb. *Cardiovasc. Res.* 2003;58:549-554.

Smyth GK, Yang YH, Speed T. Statistical issues in cDNA microarray data analysis. *Methods Mol Biol.* 2003;224:111-136.

Smyth GK. Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology.* 2004;3.

Snellen HA. History of cardiology. *Donkers Academic Publications, Rotterdam.* 1984.

Solti F, Vecsey T, Kékesi V, Juhasz-Nagy A. The effect of atrial dilatation on the genesis of atrial arrhythmias. *Cardiovasc Res.* 1989;23:882-886.

Spach MS, Dolber PC, Heidlage JF. Influence of the passive anisotropic properties on directional differences in propagation following modification of the sodium conductance in human atrial muscle. A model of reentry based on anisotropic discontinuous propagation. *Circ Res*. 1988;62:811-832.

Spach MS, Dolber PC, Anderson PA. Multiple regional differences in cellular properties that regulate repolarization and contraction in the right atrium of adult and newborn dogs. *Circ Res*. 1989a;65:1594-1611.

Spach MS, Dolber PC, Heidlage JF. Interaction of inhomogeneities of repolarization with anisotropic propagation in dog atria. A mechanism for both preventing and initiating reentry. *Circ Res*. 1989b;65:1612-1631.

Stannius HF. Zwei reihen physiologischer Versuche. *Arch Anat Physiol Wiss Med*. 1852;2:85-100.

Steenman M, Chen YW, Le Cunff M, Lamirault G, Varro A, Hoffman E, Leger JJ. Transcriptomal analysis of failing and nonfailing human hearts. *Physiol Genomics*. 2003;12:97-112.

Stramba-Badiale M, Spagnolo D, Bosi G, Schwartz PJ. Are gender differences in QTc present at birth? *Am. J. Cardiol*. 1995;75:1277-1278.

Stramba-Badiale M, Locati EH, Martinelli A, Courville J, Schwartz PJ. Gender and the relationship between ventricular repolarization and cardiac cycle length during 24-h Holter recordings. *Eur. Heart J*. 1997;18:1000-1006.

Szentadrassy N, Banyasz T, Biro T, Szabo G, Toth BI, Magyar J, Lazar J, Varro A, Kovacs L, Nanasi PP. Apico-basal inhomogeneity in distribution of ion channels in canine and human ventricular myocardium. *Cardiovasc Res*. 2005;65:851-860.

Tadei A, Geslin P, Delhumeau A, Victor J, Le Douarin L, Richard M. Phentolamine in treatment of acute left ventricular insufficiencies. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 1975;68:877-885.

Takahashi T, Allen PD, Lacro RV, Marks AR, Dennis AR, Schoen FJ, Grossman W, Marsh JD, Izumo S. Expression of dihydropyridine receptor (Ca²⁺ channel) and calsequestrin genes in the myocardium of patients with end-stage heart failure. *J Clin Invest*. 1992;90:927-935.

Tan FL, Moravec CS, Li J, Apperson-Hansen C, McCarthy PM, Young JB, Bond M. The gene expression fingerprint of human heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:11387-11392.

Taneja T, Windhagen Mahnert B, Passman R, Goldberger J, Kadish A. Effects of sex and age on electrocardiographic and cardiac electrophysiological properties in adults. *Pacing Clin. Electrophys*. 2001;24:16-21.

Tessier S, Karczewski P, Krause EG, Pansard Y, Acar C, Lang-Lazdunski M, Mercadier JJ, Hatem SN. Regulation of the transient outward K(+) current by Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinases II in human atrial myocytes. *Circ Res*. 1999;85:810-819.

The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. *Lancet*. 1999;353:9-13.

" the Chipping Forecast ", *Supplement to Nature Genetics*. 1999;21.

Thomas JG, Olson JM, Tapscott SJ, Zhao LP. An efficient and robust statistical modeling approach to discover differentially expressed genes using genomic expression profiles. *Genome Res.* 2001;11:1227-1236.

Tkatchenko AV, Le Cam G, Leger JJ, Dechesne CA. Large-scale analysis of differential gene expression in the hindlimb muscles and diaphragm of mdx mouse. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1500:17-30.

Tomaselli GF, Beuckelmann DJ, Calkins HG, Berger RD, Kessler PD, Lawrence JH, Kass D, Feldman AM, Marban E. Sudden cardiac death in heart failure. The role of abnormal repolarization. *Circulation.* 1994;90:2534-2539.

Trepanier-Boulay V, St-Michel C, Tremblay A, Fiset C. Gender-based differences in cardiac repolarization in mouse ventricle. *Circ. Res.* 2001;89:437-444.

Trulock EP, Edwards LB, Taylor DO, Boucek MM, Keck BM, Hertz MI. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-first official adult lung and heart-lung transplant report--2004. *J Heart Lung Transplant.* 2004;23:804-815.

Tse HF, Oral H, Pelosi F, Knight BP, Strickberger SA, Morady F. Effect of gender on atrial electrophysiologic changes induced by rapid atrial pacing and elevation of atrial pressure. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 2001;12:986-989.

Tseng GN, Boyden PA. Multiple types of Ca²⁺ currents in single canine Purkinje cells. *Circ Res.* 1989;65:1735-1750.

Tsunakawa H, Miyamoto N, Kawabata M, Mashima S. Electrocardiogram in heart failure *Nippon Rinsho.* 1993;51:1222-1232.

Tukkie R, Sogaard P, Vleugels J, de Groot IK, Wilde AA, Tan HL. Delay in right ventricular activation contributes to Brugada syndrome. *Circulation.* 2004;109:1272-1277.

Tumor Analysis Best Practices Working Group. Expression profiling – Best practices for data generation and interpretation in clinical trials. *Nature Rev. Genet.* 2004;5:229-237

Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:5116-5121.

Ueda N, Zipes DP, Wu J. Functional and transmural modulation of M cell behavior in canine ventricular wall. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;287:H2569-H2575.

Van Wagoner DR, Pond AL, McCarthy PM, Trimmer JS, Nerbonne JM. Outward K⁺ current densities and Kv1.5 expression are reduced in chronic human atrial fibrillation. *Circ Res.* 1997;80:772-781.

Van Wagoner DR, Pond AL, Lamorgese M, Rossie SS, McCarthy PM, Nerbonne JM. Atrial L-type Ca²⁺ currents and human atrial fibrillation. *Circ Res.* 1999;85:428-436.

Van Wagoner DR, Nerbonne JM. Molecular basis of electrical remodeling in atrial fibrillation. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32:1101-1117.

Vanzini P, Brugada J. Spontaneous recurrent ventricular fibrillation in a patient with a structurally normal heart. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2000;23:266-267.

Varro A, Nanasi PP, Lathrop DA. Potassium currents in isolated human atrial and ventricular cardiocytes. *Acta Physiol Scand*. 1993;149:133-142.

Vasan RS, Larson MG, Levy D, Evans JC, Benjamin EJ. Distribution and categorization of echocardiographic measurements in relation to reference limits: the framingham heart study: formulation of a height- and sex-specific classification and its prospective validation. *Circulation*. 1997;96:1863-1873.

Vaziri SM, Larson MG, Benjamin EJ, Levy D. Echocardiographic predictors of nonrheumatic atrial fibrillation. The Framingham heart study. *Circulation* 1994;89:724-730.

Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science*. 1995;270:484-487.

Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratt S, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigo R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X. The sequence of the human genome. *Science*. 2001;291:1304-1351.

Verdonck F, Volders PG, Vos MA, Sipido KR. Intracellular Na⁺ and altered Na⁺ transport mechanisms in cardiac hypertrophy and failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2003;35:5-25.

Viskin S, Fish R, Eldar M, Zeltser D, Lesh MD, Glick A, Belhassen B. Prevalence of the Brugada sign in idiopathic ventricular fibrillation and healthy controls. *Heart*. 2000;84:31-36.

Waller AD. A demonstration on man of the electromotive changes accompanying the heart's beat. *J Physiol*. 1887;8:229-234.

Wang J, Liu L, Feng J, Nattel S. Regional and functional factors determining induction and maintenance of atrial fibrillation in dogs. *Am J Physiol.* 1996;271:H148-H158.

Wang RF, Kim SJ, Robertson LH, Cerniglia CE. Development of a membrane-array method for the detection of human intestinal bacteria in fecal samples. *Mol. Cell. Probes.* 2002;16:341-350.

Wang Z, Fermini B, Nattel S. Sustained depolarization-induced outward current in human atrial myocytes. Evidence for a novel delayed rectifier K⁺ current similar to Kv1.5 cloned channel currents. *Circ. Res.* 1993;73:1061-1076.

Wang Z, Yue L, White M, Pelletier G, Nattel S. Differential distribution of inward rectifier potassium channel transcripts in human atrium versus ventricle. *Circulation.* 1998;98:2422-2428.

Weinmann AS. Novel ChIP-based strategies to uncover transcription factor target genes in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2004;4:381-386.

Weiss R, Barmada MM, Nguyen T, Seibel JS, Cavlovich D, Kornblit CA, Angelilli A, Villanueva F, McNamara DM, London B. Clinical and molecular heterogeneity in the Brugada syndrome: a novel gene locus on chromosome 3. *Circulation.* 2002;105:707-713.

Wessel P. Geological data analysis. 2000.

Wettwer E, Amos GJ, Posival H, Ravens U. Transient outward current in human ventricular myocytes of subepicardial and subendocardial origin. *Circ Res.* 1994;75:473-482.

Wilde AAM, Antzelevitch C, Borggrefe M, Brugada J, Brugada R, Brugada P, Corrado D, Hauer RNW, Kass RS, Nademanee K, Priori SG, Towbin JA. Study Group on the Molecular Basis of Arrhythmias of the European Society of Cardiology, Proposed diagnostic criteria for the Brugada syndrome: consensus report. *Circulation.* 2002;106:2514-2519.

Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allessie MA. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation.* 1995;92:1954-1968.

Wijffels MCEF, Kirchhof CJHJ, Dorland R, Power J, Allessie MA. Electrical remodeling due to atrial fibrillation in chronically instrumented conscious goats: roles of neurohumoral changes, ischemia, atrial stretch and high rate of electrical activation. *Circulation.* 1997;96:3710-3720.

Wolbrette D. Gender differences in the proarrhythmic potential of QT-prolonging drugs. *Curr. Womens Health Rep.* 2002;2:105-109.

Wolbrette DL. Risk of proarrhythmia with class III antiarrhythmic agents: sex-based differences and other issues. *Am. J. Cardiol.* 2003;91:39-44.

Workman AJ, Kane KA, Rankin AC. The contribution of ionic currents to changes in refractoriness of human atrial myocytes associated with chronic atrial fibrillation. *Cardiovasc Res.* 2001;52:226-235.

Xia M, Jin Q, Bendahhou S, He Y, Larroque MM, Chen Y, Zhou Q, Yang Y, Liu Y, Liu B, Zhu Q, Zhou Y, Lin J, Liang B, Li L, Dong X, Pan Z, Wang R, Wan H, Qiu W, Xu W, Eurlings P, Barhanin J, Chen Y. A Kir2.1 gain-of-function mutation underlies familial atrial fibrillation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;332:1012-1019.

Xu XP, Best PM. Decreased transient outward K⁺ current in ventricular myocytes from acromegalic rats. *Am J Physiol*. 1991;260:H935-H942.

Yamada M, Inanobe A, Kurachi Y. G protein regulation of potassium ion channels. *Pharmacol Rev*. 1998;50:723-760.

Yan GX, Antzelevitch C. Cellular basis for the electrocardiographic J wave. *Circulation*. 1996;93:372-379.

Yan GX, Antzelevitch C. Cellular basis for the Brugada syndrome and other mechanisms of arrhythmogenesis associated with ST-segment elevation. *Circulation*. 1999;100:1660-1666.

Yang H, Elko P, Fromm BS, Baga JJ, Pire LA, Schuger CD, Steinman RT, Lehmann M. Maximal ascending and descending slopes of the T wave in men and women. *J. Electrocardiol*. 1997;30:267-276.

Yang J, Moravec CS, Sussman MA, DiPaola NR, Fu D, Hawthorn L, Mitchell CA, Young JB, Francis GS, McCarthy PM, Bond M. Decreased SLIM1 expression and increased gelsolin expression in failing human hearts measured by high-density oligonucleotide arrays. *Circulation*. 2000;102:3046-3052.

Yang Y, Xia M, Jin Q, Bendahhou S, Shi J, Chen Y, Liang B, Lin J, Liu Y, Liu B, Zhou Q, Zhang D, Wang R, Ma N, Su X, Niu K, Pei Y, Xu W, Chen Z, Wan H, Cui J, Barhanin J, Chen Y. Identification of a KCNE2 gain-of-function mutation in patients with familial atrial fibrillation. *Am J Hum Genet*. 2004;75:899-905.

Yeung KY, Haynor DR, Ruzzo WL. Validating clustering for gene expression data. *Bioinformatics*. 2001;17:309-318.

Yildirim A, Aybar F, Kabakci MG, Yarali H, Akgul E, Bukulmez O, Tokgozoglu SL, Gurgan T, Oto A. Hormone replacement therapy shortens QT dispersion in healthy postmenopausal women. *Ann. Noninvasive Electrocardiol*. 2001;6:193-197.

Yu H, Chang F, Cohen IS. Pacemaker current i(f) in adult canine cardiac ventricular myocytes. *J Physiol*. 1995;485:469-483.

Yue L, Feng J, Gaspo R, Li GR, Wang Z, Nattel S. Ionic remodeling underlying action potential changes in a canine model of atrial fibrillation. *Circ Res*. 1997;81:512-525.

Yung CK, Halperin VL, Tomaselli GF, Winslow RL. Gene expression profiles in end-stage human idiopathic dilated cardiomyopathy: altered expression of apoptotic and cytoskeletal genes. *Genomics*. 2004;83:281-297.

Zabel M, Acar B, Klingenhoben T, Franz MR, Hohnloser SH, Malik M. Analysis of 12-Lead T-wave morphology for risk stratification after myocardial infarction. *Circulation* 2000;102:1252-1257.

Zareba W, Moss AJ, Locati EH, Lehmann MH, Peterson DR, Hall WJ, Schwartz PJ, Vincent GM, Priori SG, Benhorin J. Modulating effects of age and gender on the clinical course of long QT syndrome by genotype. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2003;42:103-109.

Zhang DF, Liang B, Lin J, Liu B, Zhou QS, Yang YQ. KCNE3 R53H substitution in familial atrial fibrillation. *Chin Med J (Engl)*. 2005;118:1735-1738.

Zicha S, Xiao L, Stafford S, Cha TJ, Han W, Varro A, Nattel S. Transmural expression of transient outward potassium current subunits in normal and failing canine and human hearts. *J Physiol*. 2004;561:735-748.

Zipes DP, Mihalick MJ, Robbins GT. Effects of selective vagal and stellate ganglion stimulation of atrial refractoriness. *Cardiovasc Res*. 1974;8:647-655.

Ziskind B, Halioua B. Contribution of Ancient Egypt to cardiovascular medicine. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 2004;97:370-374.

ANNEXES

Articles

15

16

17

18

19

PDF

Gene Symbol	Gene Name		NCBI Gene Ref	Chromosome	Assay ID	Target Exons	Category
18S RNA	18S RNA	Eukaryotic 18s rRNA	X03205	9	4342379-18S	N/A	reference gene
ABCC8	SUR1	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 8	NM_000352,U63421	11	Hs00165861_m1	16	K ⁺ channel
ABCC9	SUR2	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 9	NM_005691,NM_020	12	Hs00245832_m1	28	K ⁺ channel
ATP1A1	Na/K-ATPase α 1	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 1 polypeptide	NM_001001586,NM_	1	Hs00167556_m1	15	Na ⁺ /K ⁺ ATPase
ATP1A3	Na/K-ATPase α 3	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 3 polypeptide	NM_152296,BC0092	19	Hs00265163_m1	N/A	Na ⁺ /K ⁺ ATPase
ATP1B1	Na/K-ATPase β 1	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 1 polypeptide	NM_001001787,NM_	1	Hs00426868_g1	5	Na ⁺ /K ⁺ ATPase
ATP2A2	SERCA2	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2	NM_001681,M23115	12	Hs00155939_m1	20	Ca ⁺⁺ regulator
ATP2A3	SERCA3	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, ubiquitous	NM_174953,NM_174	17	Hs00193090_m1	17	Ca ⁺⁺ regulator
ATP2B1	Ca ATPase 1	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 1	NM_001001323,NM_	12	Hs00155949_m1	11	Ca ⁺⁺ regulator
ATP2B4	Ca ATPase 4	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 4	NM_001001396,NM_	1	Hs00608066_m1	1	Ca ⁺⁺ regulator
CACNA1C	Cav1.2	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit	NM_000719,L29529,	12	Hs00167681_m1	2	Ca ⁺⁺ channel
CACNA1D	Cav1.3	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit	NM_000720,M83566	3	Hs00167753_m1	47	Ca ⁺⁺ channel
CACNA1G	Cav3.1	calcium channel, voltage-dependent, alpha 1G subunit	NM_018896,NM_198	17	Hs00367969_m1	4	Ca ⁺⁺ channel
CACNA1H	Cav3.2	calcium channel, voltage-dependent, alpha 1H subunit	NM_021098,AF0519,	16	Hs00234934_m1	1	Ca ⁺⁺ channel
CACNA2D1	Cav α 2 δ 1	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 1	NM_000722,M76559	7	Hs00167808_m1	13	Ca ⁺⁺ channel
CACNA2D2	Cav α 2 δ 2	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 2	NM_006030,AB0111	3	Hs00195772_m1	6	Ca ⁺⁺ channel
CACNB2	Cav β 2	calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit	NM_201593,NM_201	10	Hs00167861_m1	9	Ca ⁺⁺ channel
CACNG4	Cav γ 4	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 4	NM_014405,AF1626	17	Hs00205244_m1	2	Ca ⁺⁺ channel
CACNG6	Cav γ 6	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 6	NM_145814,NM_145	19	Hs00230428_m1	N/A	Ca ⁺⁺ channel
CALM1	CALM1	calmodulin 1 (phosphorylase kinase, delta)	NM_006888,BX5376	14	Hs00300085_s1	6	Ca ⁺⁺ regulator
CALM3	CALM3	calmodulin 3 (phosphorylase kinase, delta)	NM_005184,J04046,	19	Hs00270914_m1	1	Ca ⁺⁺ regulator
CASQ1	CASQ1	calsequestrin 1 (fast-twitch, skeletal muscle)	NM_001231,S73775,	1	Hs00154281_m1	6	Ca ⁺⁺ regulator
CASQ2	CASQ2	calsequestrin 2 (cardiac muscle)	NM_001232,D55655	1	Hs00415779_m1	N/A	Ca ⁺⁺ regulator
CD4	CD4	CD4 antigen (p55)	NM_000616,M12807	12	Hs00181217_m1	2	marker of inflammation
CFTR	CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, ATP-binding cassette	NM_000492,M28668	7	Hs00357011_m1	21	Cl ⁻ channel
CLCN2	CLCN2	chloride channel 2	NM_004366,AF0260	3	Hs00189078_m1	1	Cl ⁻ channel
CLCN3	CLCN3	chloride channel 3	NM_001829,X78520,	4	Hs00156527_m1	12	Cl ⁻ channel
CLCN6	CLCN6	chloride channel 6	NM_001286,NM_021	1	Hs00154518_m1	4	Cl ⁻ channel
CLCN7	CLCN7	chloride channel 7	NM_001287,Z67743,	16	Hs00241850_m1	1	Cl ⁻ channel
CNN1	CNN1	calponin 1, basic, smooth muscle	NM_001299,D17408	19	Hs00154543_m1	1	marker of vessels
COL6A1	COL6A1	collagen, type VI, alpha 1	NM_001848,M27447	21	Hs00242448_m1	20	marker of fibroblasts
G6PD	G6PD	glucose-6-phosphate dehydrogenase	NM_000402,M21248	X	Hs00166169_m1	2	reference gene
GJA1	Cx43	gap junction protein, alpha 1, 43kDa (connexin 43)	NM_000165,M65188	6	Hs00748445_s1	10	Connexin
GJA5	Cx40	gap junction protein, alpha 5, 40kDa (connexin 40)	NM_181703,NM_005	1	Hs00270952_s1	1	Connexin
GJA7	Cx45	gap junction protein, alpha 7, 45kDa (connexin 45)	NM_005497,AK1243	17	Hs00271416_s1	8	Connexin
HCN1	HCN1	hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 1	NM_021072,AF0648	5	Hs00395037_m1	1	Cation channel
HCN2	HCN2	hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 2	NM_001194,AJ01258	19	Hs00606903_m1	2	Cation channel
HCN3	HCN3	hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 3	NM_020897,AB0409	1	Hs00380018_m1	3	Cation channel
HCN4	HCN4	hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 4	NM_005477,AJ13242	15	Hs00175760_m1	1	Cation channel

HPRT1	HPRT	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (Lesch-Nyhan syndrome)	NM_000194,M31642	X	Hs99999909_m1	N/A	reference gene
IL6	IL6	interleukin 6 (interferon, beta 2)	NM_000600,X04403	7	Hs00174131_m1	3	marker of inflammation
ISYNA1	ISYNA1	myo-inositol 1-phosphate synthase A1	NM_016368,AF2205	19	Hs00375021_g1	5	reference gene
ITPR1	ITPR1	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 1	NM_002222,D26070	3	Hs00181881_m1	3	Ca ⁺⁺ regulator
ITPR3	ITPR3	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 3	NM_002224,D26351	6	Hs00609908_m1	1	Ca ⁺⁺ regulator
KCNA1	Kv1.1	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 1	NM_000217,L02750	12	Hs00264798_s1	8	K ⁺ channel
KCNA2	Kv1.2	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 2	NM_004974,L02752	1	Hs00270656_s1	8	K ⁺ channel
KCNA3	Kv1.3	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 3	NM_002232,M85217	1	Hs00704943_s1	22	K ⁺ channel
KCNA4	Kv1.4	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 4	NM_002233,M55514	11	Hs00357903_s1	1	K ⁺ channel
KCNA5	Kv1.5	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 5	NM_002234,M83254	12	Hs00266898_s1	7	K ⁺ channel
KCNA6	Kv1.6	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 6	NM_002235,X17622	12	Hs00266903_s1	4	K ⁺ channel
KCNA7	Kv1.7	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 7	NM_031886,AF3158	19	Hs00361015_m1	1	K ⁺ channel
KCNAB1	Kvβ1	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 1	NM_172159,NM_172	3	Hs00185764_m1	4	K ⁺ channel
KCNAB2	Kvβ2	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 2	NM_172130,NM_003	1	Hs00186308_m1	4	K ⁺ channel
KCNAB3	Kvβ3	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 3	NM_004732,AF0164	17	Hs00190986_m1	6	K ⁺ channel
KCNB1	Kv2.1	potassium voltage-gated channel, Shab-related subfamily, member 1	NM_004975,L02840	20	Hs00270657_m1	1	K ⁺ channel
KCNC3	Kv3.3	potassium voltage-gated channel, Shaw-related subfamily, member 3	NM_004977,AF0559	19	Hs00192108_m1	7	K ⁺ channel
KCNC4	Kv3.4	potassium voltage-gated channel, Shaw-related subfamily, member 4	NM_153763,NM_004	1	Hs00428198_m1	1	K ⁺ channel
KCND1	Kv4.1	potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 1	NM_004979,AJ00589	X	Hs00192113_m1	5	K ⁺ channel
KCND2	Kv4.2	potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 2	NM_012281,AB0289	7	Hs00273378_m1	4	K ⁺ channel
KCND3	Kv4.3	potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 3	NM_004980,NM_004	1	Hs00270661_m1	5	K ⁺ channel
KCNE1	MinK	potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 1	NM_000219,L28168	21	Hs00264799_s1	1	K ⁺ channel
KCNE1L	MIRP4	KCNE1-like	NM_012282,AJ01274	X	Hs00273381_s1	2	K ⁺ channel
KCNE2	MIRP1	potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 2	NM_172201,AF0710	21	Hs00270822_s1	1	K ⁺ channel
KCNE3	MIRP2	potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 3	NM_005472,BC0322	11	Hs00538801_m1	1	K ⁺ channel
KCNE4	MIRP3	potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 4	NM_080671,BC0144	2	Hs00758199_g1	1	K ⁺ channel
KCNH2	HERG	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 2	NM_172056,NM_000	7	Hs00165120_m1	3	K ⁺ channel
KCNIP2	KChIP2	Kv channel interacting protein 2	NM_173191,NM_173	10	Hs00601709_g1	8	K ⁺ channel
KCNJ11	Kir6.2	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11	NM_000525,BC0644	11	Hs00265026_s1	6	K ⁺ channel
KCNJ12	Kir2.2	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 12	NM_021012,L36069	17	Hs00266926_s1	N/A	K ⁺ channel
KCNJ2	Kir2.1	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 2	NM_000891,U12507	17	Hs00265315_m1	1	K ⁺ channel
KCNJ3	Kir3.1	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 3	NM_002239,U50964	2	Hs00158421_m1	1	K ⁺ channel
KCNJ4	Kir2.3	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 4	NM_152868,NM_004	22	Hs00705379_s1	18	K ⁺ channel
KCNJ5	Kir3.4	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 5	NM_000890,D50134	11	Hs00168476_m1	2	K ⁺ channel
KCNJ8	Kir6.1	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 8	NM_004982,D50312	12	Hs00270663_m1	1	K ⁺ channel
KCNK1	TWIK1	potassium channel, subfamily K, member 1	NM_002245,U33632	1	Hs00158428_m1	2	K ⁺ channel
KCNK3	TASK1	potassium channel, subfamily K, member 3	NM_002246,AF0068	2	Hs00605529_m1	1	K ⁺ channel
KCNK5	TASK2	potassium channel, subfamily K, member 5	NM_003740,AF0848	6	Hs00186652_m1	1	K ⁺ channel
KCNQ1	KvLQT1	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1	NM_181797,NM_181	11	Hs00165003_m1	15	K ⁺ channel
MYH7	β-MHC	myosin, heavy polypeptide 7, cardiac muscle, beta	NM_000257,M58018	14	Hs00165276_m1	26	marker of hypertrophy
NPPA	ANF	natriuretic peptide precursor A	NM_006172,M30262	1	Hs00383230_g1	1	marker of hypertrophy

NPPB	BNP	natriuretic peptide precursor B	NM_002521,M25296	1	Hs00173590_m1	2	marker of hypertrophy
PIAS3	KChAP	protein inhibitor of activated STAT, 3	NM_006099,AB0218	1	Hs00180666_m1	7	K ⁺ channel
PLN	PLN	phospholamban	NM_002667,M63603	6	Hs00160179_m1	1	Ca ⁺⁺ regulator
PPP3CA	CAM-PRP	protein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic subunit, alpha isoform	NM_000944,L14778,	4	Hs00174223_m1	10	Ca ⁺⁺ regulator
RYR2	RYR2	ryanodine receptor 2 (cardiac)	NM_001035,X98330	1	Hs00181461_m1	10	Ca ⁺⁺ regulator
SCN1A	Nav1.1	sodium channel, voltage-gated, type I, alpha	NM_006920,AF2259	2	Hs00374696_m1	17	Na ⁺ channel
SCN1B	Navβ1	sodium channel, voltage-gated, type I, beta	NM_001037,L10338,	19	Hs00168897_m1	2	Na ⁺ channel
SCN2B	Navβ2	sodium channel, voltage-gated, type II, beta	NM_004588,AF0077	11	Hs00394952_m1	3	Na ⁺ channel
SCN3A	Nav1.3	sodium channel, voltage-gated, type III, alpha	NM_006922,AF0356	2	Hs00366902_m1	12	Na ⁺ channel
SCN3B	Navβ3	sodium channel, voltage-gated, type III, beta	NM_018400,AB0329	11	Hs00393218_m1	4	Na ⁺ channel
SCN4A	Nav1.4	sodium channel, voltage-gated, type IV, alpha	NM_000334,M81758	17	Hs00165686_m1	5	Na ⁺ channel
SCN5A	Nav1.5	sodium channel, voltage-gated, type V, alpha (long QT syndrome 3)	NM_198056,NM_000	3	Hs00165693_m1	11	Na ⁺ channel
SCN7A	Nav2.1	sodium channel, voltage-gated, type VII, alpha	NM_002976,M91556	2	Hs00161546_m1	10	Na ⁺ channel
SCN9A	Nav1.7	sodium channel, voltage-gated, type IX, alpha	NM_002977,X82835	2	Hs00161567_m1	11	Na ⁺ channel
SLC8A1	NCX1	solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 1	NM_021097,M91368	2	Hs00253432_m1	2	Ca ⁺⁺ regulator
UCHL1	UCHL1	ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (ubiquitin thiolesterase)	NM_004181,X04741,	4	Hs00188233_m1	8	marker of neuronal tissue

Assay-on-demand

ANK2	ANKB	ankyrin 2, neuronal	NM_001148,NM_020	4	Hs01547993_m1	10	binding protein
-------------	------	---------------------	------------------	---	---------------	----	-----------------

Original article

Gene expression profile associated with chronic atrial fibrillation
and underlying valvular heart disease in manGuillaume Lamirault ^{a,b}, Nathalie Gaborit ^a, Nolwenn Le Meur ^{a,c}, Catherine Chevalier ^c,
Gilles Lande ^{a,b}, Sophie Demolombe ^a, Denis Escande ^a, Stanley Nattel ^d,
Jean J. Léger ^{a,c}, Marja Steenman ^{a,*}^a *L'institut du Thorax, Inserm U533, Faculté de Médecine, 1, rue Gaston Veil, 44035 Nantes, France*^b *L'institut du Thorax, Cardiology Department, Hôpital G&R Laennec, Nantes, France*^c *West Genopole Transcriptome Facility, Nantes, France*^d *Montreal Heart Institute, University of Montreal, Montreal, Canada*

Received 31 August 2005; accepted 8 September 2005

Available online 19 October 2005

Abstract

Atrial fibrillation (AF) is the most common sustained cardiac arrhythmia in humans. The pathophysiology of AF involves electrical, structural and contractile remodeling, which is associated with changes in cardiac gene expression. Previous studies of gene-expression changes in clinical AF have mostly been limited to a small number of candidate genes and have not all been well controlled for underlying heart disease. The present study assessed AF-related gene-expression changes in valve-disease patients with microarrays representing the cardiac transcriptome. Right atrial appendages from 11 patients with chronic AF and underlying valvular heart disease (AF-VHD) and seven patients in sinus rhythm with VHD (SR-VHD) were individually compared to an age-matched sinus-rhythm control group (SR-CTRL, 11 patients) using cardiac-specific microarray analysis. One-class statistical analysis was used to identify genes differentially expressed between SR-VHD and SR-CTRL patients. Two-class statistical analysis was used to identify genes differentially expressed between AF-VHD and SR-VHD patients. Out of 3863 analyzed genes, 832 genes were differentially expressed between SR-VHD and SR-CTRL patients, and 169 genes were differentially expressed between AF-VHD and SR-VHD patients. Striking AF-related changes included altered expression of nine genes pointing towards the development of fibrosis (e.g. upregulation of transforming growth factor β 1), and changes in eight genes potentially related to an increased risk of thromboembolic events (e.g. upregulation of α 2 macroglobulin). Microarray results were confirmed by quantitative PCR. Our results suggest that AF produces a characteristic profile of gene-expression changes that may be related to the pathophysiology of the arrhythmia.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Atrial fibrillation; Valvular heart disease; Gene expression; Coagulation; Fibrosis

1. Introduction

Atrial fibrillation (AF) is the most common sustained cardiac arrhythmia in humans. In most cases, AF is associated with other cardiovascular diseases like heart failure, thyrotoxic heart disease, hypertension, coronary artery disease (CAD) and rheumatic valve disease [1]. The increased risk of stroke and thromboembolism associated with AF has been

thought to be mainly due to increased blood stasis in the non-contracting atria [2]. AF causes progressive changes [3] related to electrical, contractile and structural remodeling [4]. Thus far, there has been a major focus on electrical components of the remodeling process, which has been analyzed at the molecular level by candidate gene approaches that have identified expression changes in genes encoding ion channels or calcium-handling proteins [5,6]. Four recent studies characterized the molecular basis of remodeling on a more global scale. Kim et al. [7] analyzed the expression of 1152 genes in 26 AF patients and 26 controls. They focused on genes

* Corresponding author. Tel.: +33 2 40 41 29 59; fax: +33 2 40 41 29 50.
E-mail address: marja.steenman@nantes.inserm.fr (M. Steenman).

involved in oxidative stress. Their AF patients did not have permanent AF, and the underlying pathology of the control group was unknown. Lai et al. [8] analyzed the expression of 6035 genes in a porcine model of AF. Ohki-Kaneda et al. [9] analyzed the expression of ~12,000 genes in seven chronic and persistent AF patients and 10 matched controls. They found a very large number of significantly differentially-expressed genes and then focused on genes with a greater than 0.5 U absolute difference in expression. This resulted in the identification of only 11 genes, four of which were of unknown function. Finally, Barth et al. [10] analyzed the expression of ~45,000 genes in 10 permanent AF patients and 20 unmatched controls. They identified 1434 genes deregulated in AF. These studies provided interesting insights but were either directed towards limited components of the cardiac transcriptome or did not contain a disease-matched sinus rhythm group to differentiate changes associated with AF from those related to underlying heart disease.

The present study was designed to pinpoint gene-expression changes in the cardiac transcriptome that are specifically associated with AF in patients with valvular heart disease (VHD), a cardiac disease frequently associated with the arrhythmia. We constructed a long-oligonucleotide microarray representing ~4000 human genes selected on the basis of evidence for involvement in normal or pathological cardiovascular functioning. With these microarrays, we determined the right atrial (RA) expression profile related to VHD and identified genes specifically related to AF. The AF-specific genes were involved in diverse functional categories—particularly in fibrosis and coagulation pathways—revealing potential new components of the pathophysiology of AF.

2. Methods

2.1. Patients

RA appendage (RAA) samples were obtained from 29 patients undergoing mitral/aortic valve replacement or coronary artery bypass graft surgery. These RAAs were from 11 patients with permanent AF and underlying VHD, constituting the AF-VHD group, seven patients in sinus rhythm with VHD and with no history of AF (SR-VHD) and 11 patients with CAD and no history of AF. The CAD patients taken to constitute a ‘control’ (SR-CTRL) group for normal RAA gene expression were all undergoing routine aortocoronary bypass surgery. They were selected to have: 1) sinus rhythm and no history of previous cardiac arrhythmias (based on both no clinical history of arrhythmias and the absence of tachyarrhythmias on any ECG recording in the patient’s medical record prior to surgery); 2) normal left ventricular function; 3) no dilation of cardiac cavities. The clinical characteristics of individual patients are shown in Table 1. The three groups were comparable in mean age and gender distribution (72 ± 3 , 70 ± 9 , 69 ± 5 years; 83%, 83%, 82% male for AF-VHD,

SR-VHD, SR-CTRL groups, respectively). AF-VHD and SR-VHD had similar left ventricular ejection fractions ($59 \pm 10\%$, $63 \pm 9\%$, respectively) and comparable valve-disease distributions (respectively, 45%, 57% aortic valve stenosis; 27%, 43% mitral regurgitation; remainder mixed disease). AF-VHD patients had a greater tendency to have hypertension and atrial dilation, but the differences were not statistically-significant (Fisher exact test). The AF duration was between 1 and 13 years with an average of 7 ± 4 years.

2.2. RNA isolation and labeling

Total RNA was isolated using TRIZOL® Reagent (Life Technologies) and treated with DNase using the RNase-Free DNase Set and the RNeasy Mini Kit (Qiagen). RNA quality was assessed using an Agilent 2100 bioanalyzer and RT-PCR with primers for β -actin. Absence of DNA contamination was verified by PCR using the same primers. Cy3- and Cy5-labeled cDNA was prepared using the CyScribe cDNA Post Labeling Kit (Amersham Pharmacia Biotech). RAA samples from AF-VHD patients and from SR-VHD patients were each labeled individually with Cy5. SR-CTRL patients were pooled and then labeled with Cy3.

2.3. Microarrays

Microarrays were prepared in-house using 50-mer oligonucleotide probes (MWG Biotech). These oligonucleotides were obtained from the MWG Biotech human genome-wide microarray collection and had all been tested for specificity. The probes were spotted onto epoxy-silane coated glass slides using the Lucidea Array Spotter from Amersham. The 3863 genes that were represented on the microarray had been selected for involvement in skeletal muscle and/or cardiovascular normal and pathological functioning. Selection was based on 1) subtractive hybridization experiments [11]; 2) genome-wide microarray hybridizations [12], including an AF-VHD vs. SR-CTRL hybridization; 3) literature data. Each gene was spotted in quadruplicate on the microarrays. The use of a relevant gene selection—as opposed to the whole genome—allowed us to obtain sufficient replicate expression values per gene to be able to identify statistically significant gene expression changes as small as 15% [13]. For more information see: http://cardioserve.nantes.inserm.fr/ptf-puce/puce_multi_dediee.php?langue=_en&id=0. Each Cy5-labeled sample was mixed with an equal amount of Cy3-labeled SR-CTRL sample, pre-incubated with human Cot-I DNA (Gibco-BRL), yeast tRNA and polyA RNA, and hybridized to the microarrays. Three independent hybridizations were performed for each AF-VHD patient (except patient AF-VHD09, for whom only two hybridizations were possible) and two independent hybridizations were performed for each SR-VHD patient. For each hybridization a different Cy5-labeled sample was used. Hybridized arrays were scanned by fluorescence confocal microscopy (Scanarray 3000, GSI-Lumonic). Measurements were obtained separately for each fluorochrome at 10 μm /pixel resolution.

Table 1
Clinical characteristics of patients

Patient	Age	Sex	AF duration (years)	Valvular replacement indication	LVEF (%)	Ischemic heart disease	LAD (mm)	HTN	Treatment
<i>AF-VHD group</i>									
AF-VHD02	67	M	9	MR	41	–	62	+	CR, FN, FR, LS, PV
AF-VHD03	70	F	5	MS + TR	57	–	50	–	DG, ID, FN
AF-VHD08	74	M	2	AS	71	–	40	–	AM, DL, HCT, FN
AF-VHD09	67	M	2	MR*	45	–	49	+	FN, RM
AF-VHD10	76	M	12	AS + MR	58	–	56	+	FN, FR, PR, PV
AF-VHD13	74	F	1	AS + MR	49	+	46	+	DG, DL, EL, FN, FR
AF-VHD14	72	F	10	MR	64	+	44	+	CP, DT, FB, FN, FR, LT, NC, PV
AF-VHD15	73	M	6	AS	75	+	45	+	DL, EL, FR, PB
AF-VHD16	73	M	13	AS	61	–	52	+	DG, EL, FN, FR
AF-VHD17	69	M	7	AS	70	+	40	+	AT, FN, SM
AF-VHD20	75	M	10	AS	60	+	51	+	DL, EL, FN, FR
	72±3	3/8	7±4		59±10		49±6		
<i>SR-VHD group</i>									
SR-VHD31	76	M		AS	64	–	40	–	AA, FS
SR-VHD32	62	M		MR	77	–	63	+	FR, RM
SR-VHD34	80	M		AS	62	+	44	+	LS, PV
SR-VHD37	72	M		AS	57	+	39	+	SM, VL
SR-VHD39	52	M		MR	64	–	46	–	FR, RM
SR-VHD46	69	M		MR	72	–	45	+	IN, FL, PR, PV, ST
SR-VHD47	78	F		AS	47	–	39	–	DG, FR, RM, SP
	70±9	1/6			63±9		45±8		
<i>SR-CTRL group</i>									
CTRL10	64	M			47	+	–	–	AA, AC, MS, SM
CTRL13	73	M			50	+	–	–	AT, CD, MS, TT
CTRL14	68	M			57	+	+	–	AA, AT, PV
CTRL16	72	M			71	+	–	–	AA, MS, MT, TT
CTRL17	70	M			52	+	–	–	AO, AT, FL, MS
CTRL19	68	M			60	+	–	–	AA, AT, PV, RM
CTRL35	58	F			73	+	–	–	AA, AD, AT, MS, TT, PV
CTRL36	74	M			73	+	+	–	AA, AC, AD, AZ, PV, SP
CTRL48	71	M			72	+	–	–	AA, AD, BT, MS, SM, TT
CTRL42	73	F			66	+	+	–	AA, AT, FE, ID, PV, TT
CTRL43	73	M			74	+	–	–	AA, DL, TT
	69 ± 5	2/9			63 ± 10				

Group data are shown as mean ± S.D. Gender data are summarized as females/males. HTN: arterial hypertension; AS: aortic valve stenosis; MR: mitral regurgitation; *: patient AF-VHD09 has undergone successful aortic valve replacement surgery 12 years ago for treatment of aortic valve stenosis; MS: mitral stenosis; TR: tricuspid regurgitation; LVEF: left ventricular ejection fraction; LAD: left atrium diameter; AA: acetylsalicylic acid; AC: acebutolol; AD: amlodipine; AM: amiloride; AO: atorvastatin; AT: atenolol; AZ: altizide; BT: betaxolol; CD: clopidogrel; CP: captopril; CR: carvedilol; DG: digoxine; DL: diltiazem; DT: digatilin; EL: enalapril; FB: fenobarbital; FE: felodipine; FL: flubriprofen; FN: fluidione; FR: furosemide; FS: fosinopril; HCT: hydrochlorothiazide; ID: isosorbide dinitrate; IN: indapamide; LS: losartan; LT: levothyroxine; MS: molsidomine; MT: metoprolol; NC: nicardipine; PB: pirbuterol; PR: perindopril; PV: pravastatin; RM: ramipril; SM: simvastatin; SP: spironolactone; ST: sotalol; TT: trinitrin; VL: valsartan.

2.4. Data analysis and statistics

Fluorescence values and expression ratios were analyzed using GenePix (Axon). Consolidated expression values were obtained using MADSCAN, developed in our laboratory [13,14]. This step includes a physical validation of the spots and a normalization of the Cy3 and Cy5 values, combining the rank invariant and lowest fitness methods with spatial normalization. This strategy excluded the need for dye-swap experiments [15]. All arrays were scaled and outlier values within arrays (based on quadruplicate spot replicates) and between arrays (based on the ‘replicate hybridizations’ × ‘quadruplicate spots’) were identified [13] and eliminated

from further analysis. For each gene, the median expression ratio within each array was determined. Genes lacking valid expression values for more than one array were eliminated for all patients. One-class Significance Analysis of Microarrays (SAM) [16] and Linear Models for MicroArray data (Limma) [17] were used to identify genes with statistically-significant differential expression between SR-VHD and SR-CTRL patients. Two-class SAM was used to identify genes differentially-expressed between AF-VHD and SR-VHD patients. With this method, each gene is first assigned a score on the basis of a modified *t*-test and genes with scores greater than a user-defined threshold are selected. Repeated random sample permutations are used to estimate the percent-

age of genes identified by chance (false-discovery rate, FDR) among the selected genes. The FDR is similar to a *P* value adjusted for multiple comparisons. For all SAM analyses, the chosen delta threshold corresponded to the lowest median FDR. Two-way hierarchical agglomerative clustering was applied to the gene expression matrix consisting of the 18 patients (AF-VHD and SR-VHD) and the genes selected by the two-class SAM analysis or a selection of these genes. The input consisted of the median of the replicate expression values for each gene. We applied average linkage clustering with uncentered correlation using Cluster [18]. Clusters were visualized using Treeview.

2.5. Gene ontology analysis

Genes differentially expressed between SR-VHD and SR-CTRL patients were grouped according to the biological process classification established by the Gene Ontology consortium, using the Biological Process Pie Chart tool of the PANTHER classification system [19]. To obtain a balanced representation of different biological processes between 5% and 25%, the following adjustments were made: ‘signal transduction’ was divided into ‘signal transduction’, ‘cell communication’, ‘cell surface receptor mediated signal transduction’ and ‘intracellular signaling cascade’; ‘muscle contraction’ was merged with ‘cell structure and motility’; ‘nitrogen metabolism’, ‘phosphor metabolism’ and ‘sulfur metabolism’ were merged with ‘other metabolism’; ‘amino acid metabolism’ was merged with ‘protein metabolism and modification’.

2.6. Quantitative PCR

As a control for the results of microarray gene-expression quantification, the relative expression levels of 20 genes were analyzed in all patients using Taqman® Gene Expression Assays (Applied Biosystems) on the ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System, with methods previously described in detail in [20]. Genes were selected from interesting functional categories revealed by the microarray analysis. The identity of all 20 genes is indicated in Table 3 in the on-line data supplement and in Fig. 6. Myo-inositol 1-phosphate synthase A1 (ISYNA1) was taken as an internal standard. This gene was chosen based on ranking according to least expression changes in the 18 microarray experiments (selecting for genes with most constant expression over all subjects and groups) and based on its housekeeping function: ISYNA1 is essential to the organism as the sole supplier of the 6-carbon myo-inositol ring, the precursor of the inositol phospholipids which are important structural components of all membranes [21,22]. Duplicate experiments were performed and each experiment contained duplicate PCR reactions. Mean gene expression ratios were calculated for each AF-VHD and each SR-VHD patient vs. the pooled SR-CTRL patients. The AF-VHD/SR-VHD expression ratio was calculated by dividing the median AF-VHD/SR-CTRL ratio by the median SR-VHD/SR-CTRL ratio.

3. Results

The strategy and overall results of our approach are summarized in Fig. 1. RAAs from seven SR-VHD and 11 AF-VHD patients were analyzed by hybridization against pooled control samples on replicate microarrays containing quadruplicate 50mer oligonucleotides corresponding to 3863 non-redundant genes. After analysis of all hybridizations, valid expression values were obtained for 2996 genes in all patients. The advantage of using dedicated as opposed to genome-wide microarrays is reflected by this high percentage (78%) of valid expression values.

3.1. Gene-expression changes associated with VHD

One-class SAM analysis of SR-VHD vs. SR-CTRL hybridizations identified 1498 statistically-significant differentially expressed genes (Fig. 1). One-class Limma analysis identified 832 genes differentially expressed in SR-VHD vs. SR-CTRL patients (all 832 genes were present in the SAM gene set). This suggests that VHD requiring valve-replacement surgery produces major changes in cardiac gene expression and that underlying VHD probably could influence the transcriptomal remodeling observed in our AF-VHD patients. Therefore, we set out to further characterize the VHD expression profile. Fig. 2A shows that the distribution of the 832 genes among the Gene Ontology biological processes largely corresponds with the distribution of all analyzed genes. Some functional categories appeared to be somewhat stronger represented among the SR-VHD differential genes. These categories include nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism (containing many genes involved in RNA transcription), cell cycle and apoptosis. We next classified the 832 genes into two groups; the ‘most differentially expressed genes’ (ratio > 1.5 or < 0.67, *N* = 183), and the remaining ‘least differentially expressed genes’ (*N* = 649) and compared their functional-category distribution. Fig. 2B shows that genes involved in cell structure and motility (including

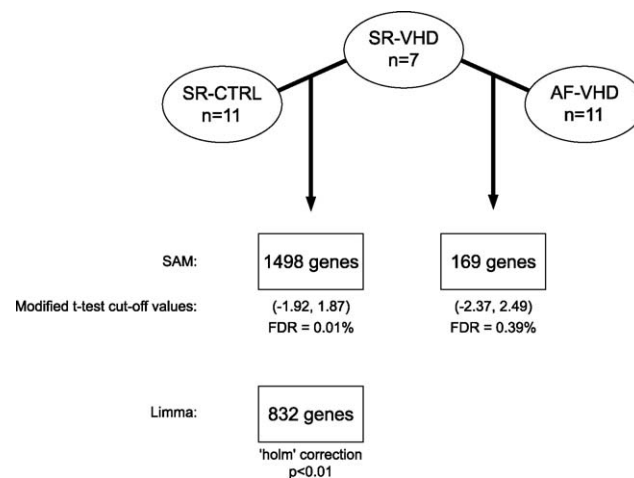


Fig. 1. Experimental set-up and global results. Schematic representation of the experimental set-up and the number of identified differentially expressed genes.

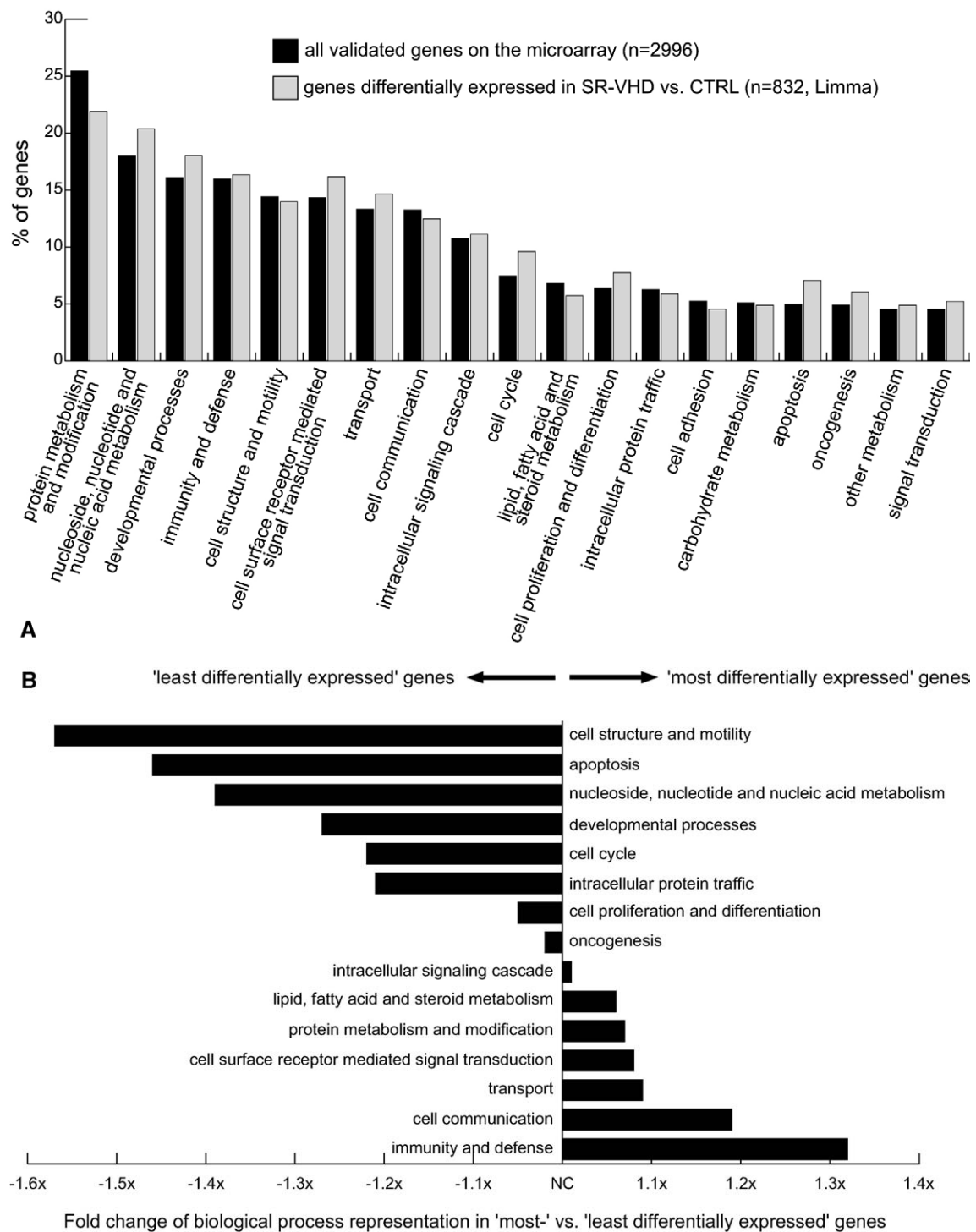


Fig. 2. Gene Ontology classification of genes differentially expressed in SR-VHD vs. SR-CTRL patients.

A: Representation of biological process categories (as defined by the Gene Ontology consortium) among all validated genes on the microarray and among the genes differentially expressed in SR-VHD vs. SR-CTRL patients (according to one-class Limma analysis with 'holm' correction and $P < 0.01$). B: Representation of biological process categories among genes 'most differentially expressed' in SR-VHD vs. SR-CTRL patients (ratio >1.5 or <0.67) as compared to the remaining 'least differentially expressed' genes. The fold change reflects the difference between the number of observed 'most differentially expressed' genes in a biological process and the number of expected 'most differentially expressed' genes based on the representation (percentage) of the biological process among the 'least differentially expressed' genes.

genes involved in muscle contraction) and apoptosis were mostly affected by relatively small expression changes, whereas genes involved in immunity and defense and cell

communication were mostly affected by large expression changes. A complete list of the 832 genes is available in the on-line data supplement (Table 2).

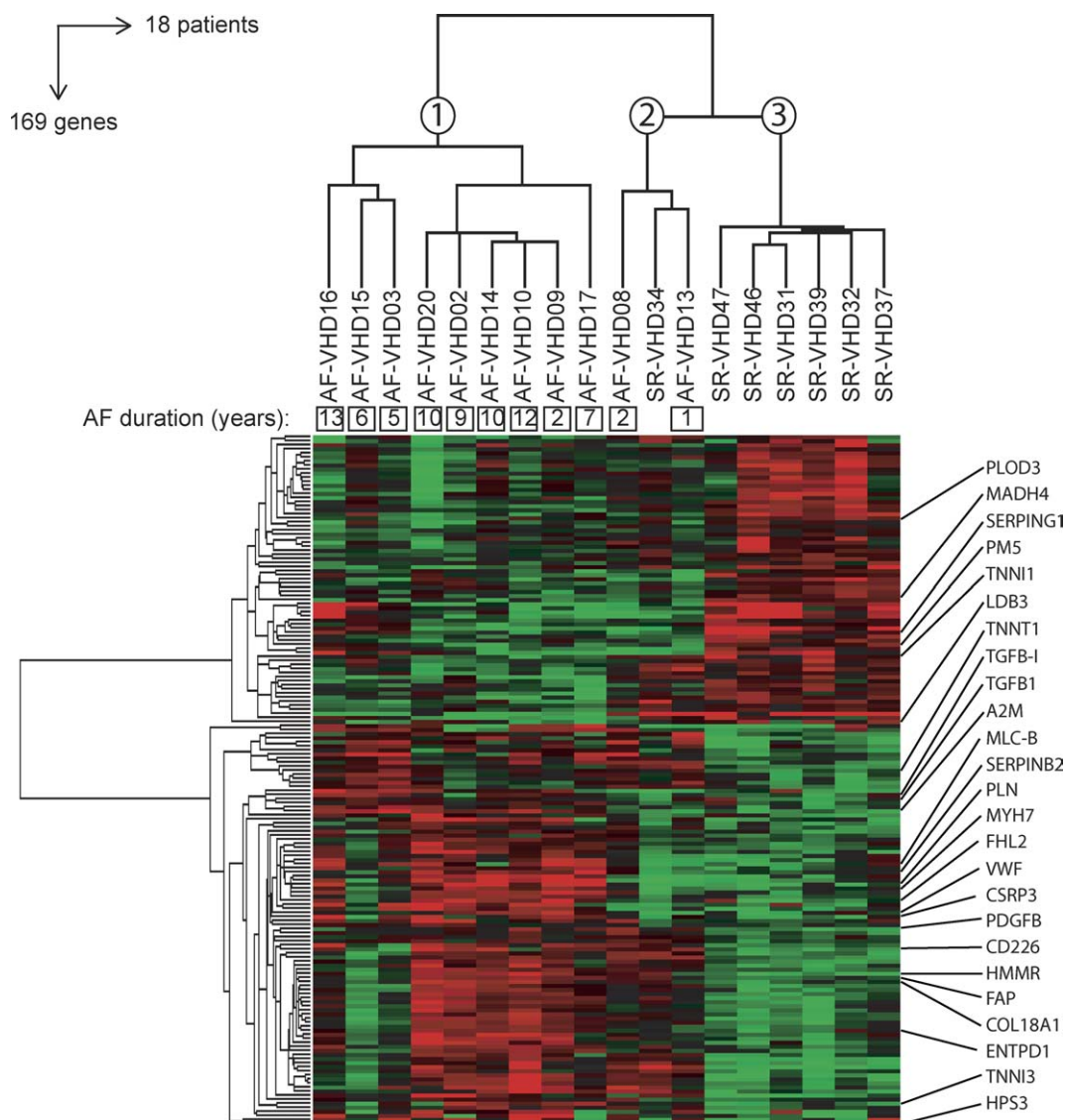


Fig. 3. Two-way hierarchical clustering. Two-way hierarchical clustering of the 18 patients (11 AF-VHD patients and seven SR-VHD patients) and the 169 genes differentially expressed between both patient groups. The duration of AF is indicated. The position of the 25 genes from Fig. 4B is shown. Expression values are indicated by color coding; red > black > green. For each gene, the gene expression values were median centered and therefore represent relative expression ratios.

3.2. AF-specific changes in cardiac gene expression

To identify AF-specific expression changes, we performed two-class SAM analysis between AF-VHD and SR-VHD patients (Fig. 1). This analysis identified 169 genes with statistically-significant differential expression between the two groups. Fig. 3 shows the results of unsupervised two-way hierarchical clustering of the 18 VHD patients (11 AF-VHD patients and seven SR-VHD patients) and the 169 AF-specific genes. Nine of the 11 AF-VHD patients clustered together (in patient cluster 1), as did six of the seven SR-VHD patients (in patient cluster 3). One of the SR-VHD patients (SR-VHD34) had a gene-expression profile closer to two AF-VHD patients (AF-VHD08 and AF-VHD13, patient cluster 2) than to the other SR-VHD patients. These two AF-VHD patients had a relatively short duration of AF (1 and 2 years). After careful analysis of clinical parameters, we discovered

that patient SR-VHD34 was the only SR-VHD patient with post-operative AF. Thus, possibly the similar gene-expression profile of SR-VHD34 to the AF group represented a latent AF gene-expression phenotype unmasked by surgery. In any case, the ability of the profile of the 169 genes to divide the patients into relatively distinct AF and SR clusters supports the notion of a selective AF-related gene-expression pattern.

Among the 169 genes displaying AF-specific expression changes, 93 are involved in well-defined functions (Fig. 4A). All genes are displayed in Table 3 (on-line data supplement). Many genes involved in gene and protein expression ($N = 22$) and sarcomeric and cytoskeletal functions ($N = 15$) were differentially expressed. Genes involved in gene and protein expression showed both up- and downregulation, whereas genes involved in sarcomeric and cytoskeletal functions were mostly upregulated (e.g. β myosin heavy chain (MYH7), phospholamban (PLN) and nexilin (NEX)). Fourteen identi-

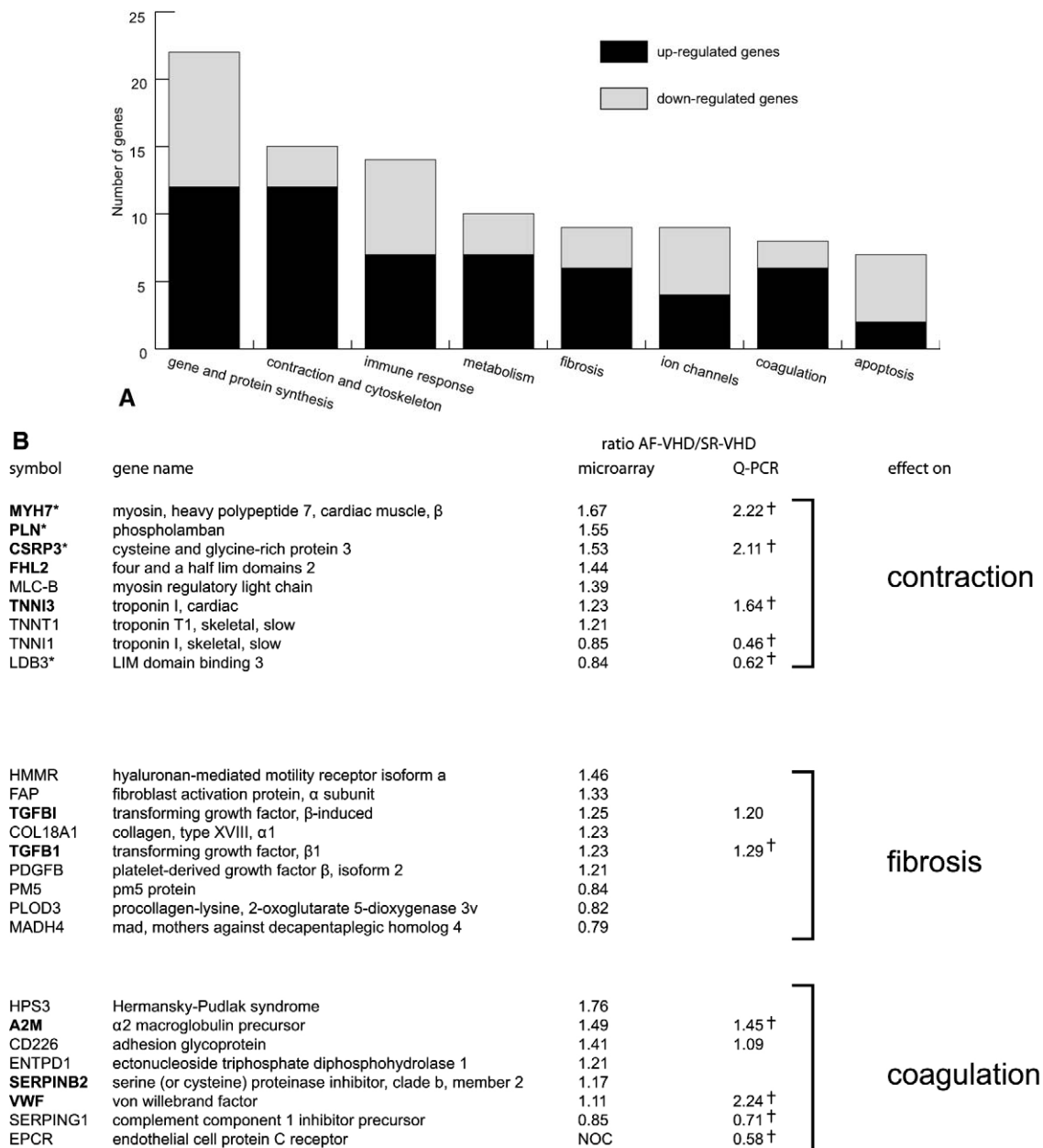


Fig. 4. Genes differentially expressed between AF-VHD and SR-VHD patients. A: Representation of different functional categories among the 169 AF-specific genes. B: A selection of 26 genes differentially expressed between AF-VHD and SR-VHD patients. Upper: Genes involved in contraction and/or cardiac dilation (*). Middle: Genes involved in the development of fibrosis. Lower: Genes involved in thrombosis. Genes in bold were not differential between SR-VHD and SR-CTRL patients and therefore VHD-independent. Q-PCR: quantitative PCR. NOC: not on chip. †: Genes differentially expressed based on two-class SAM analysis of the Q-PCR results.

fied genes involved in the immune response displayed both up- and downregulation, and the expression changes identified in metabolic genes ($N = 10$) were directed mainly towards increased energy production (e.g. upregulation of cytochrome *c* oxidase assembly protein (COX17) and adenylate kinase 1 (AK1)). Nine genes are potentially involved in the development of fibrosis, and 7 gene expression changes are indicative of a hypercoagulable state (e.g. upregulation of $\alpha 2$ macroglobulin (A2M) and von Willebrand factor (VWF)). Based on this interesting finding related to coagulation we analyzed four additional genes—either not present on our microarray or not differential in our analysis—by quantita-

tive PCR: endothelial protein C receptor (EPCR), thrombomodulin (THBD), P selectin (SELP) and tissue factor (F3). Of these, EPCR (not present on our microarray) was found to be downregulated in AF-VHD patients. Finally, seven genes were found with functions in apoptosis. No specific direction (pro- or anti-apoptotic) was indicated by the gene changes. Expression changes were also identified in a few ion channel encoding genes. Since ion channel genes generally display low levels of expression and are therefore difficult to assess with broad-spectrum gene microarrays like those used in the present study, they were analyzed in a separate investigation with ion channel-selective analysis tools [23]. Changes in con-

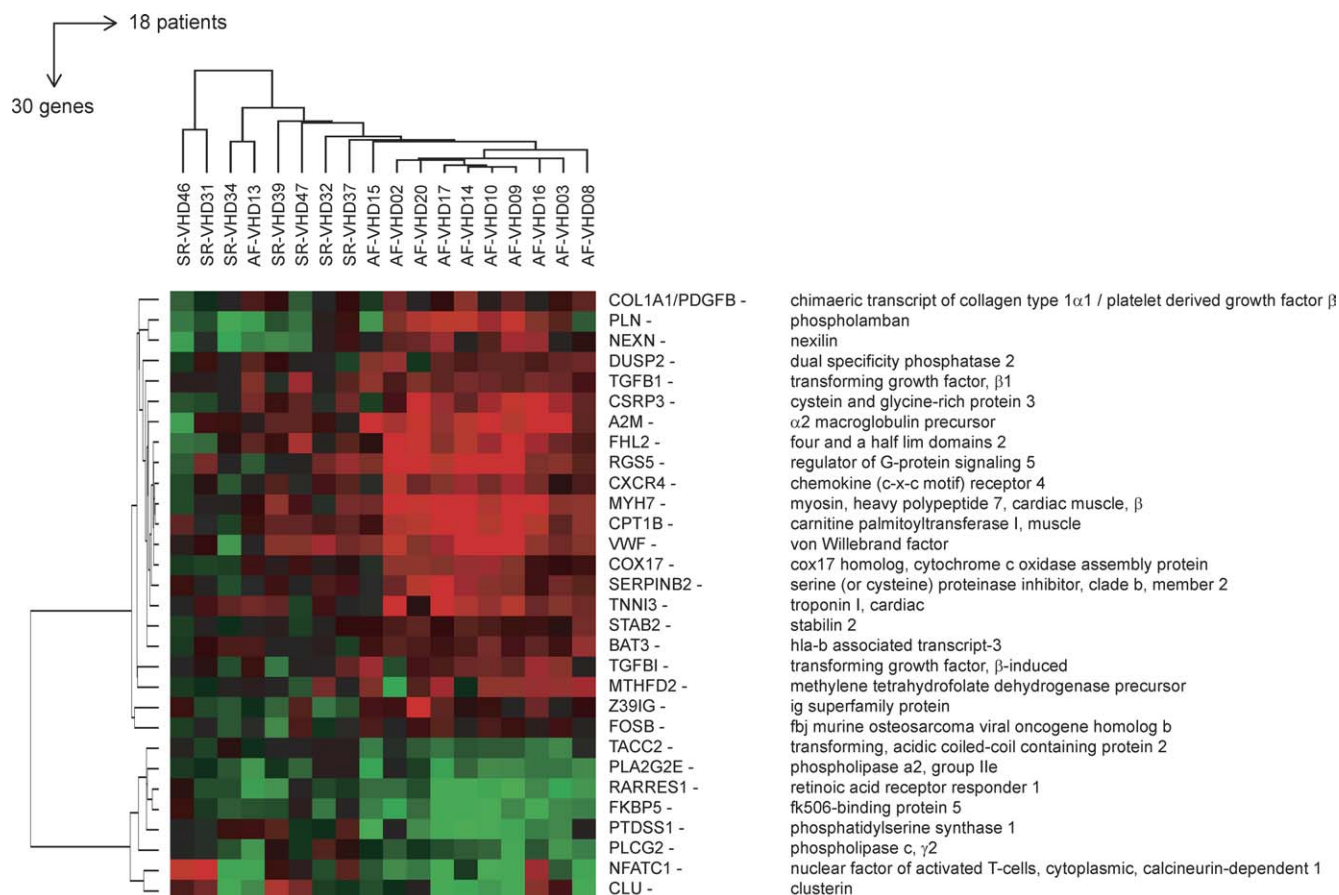


Fig. 5. Two-way hierarchical clustering. Two-way hierarchical clustering of the 18 patients (11 AF-VHD patients and seven SR-VHD patients) and the 30 VHD-independent, AF-specific genes. The gene expression values were not median centered and therefore represent absolute expression ratios.

traction, coagulation and fibrosis-related genes are illustrated in Fig. 4B.

As stated in the previous section, VHD has a substantial effect on the cardiac expression profile. However, among the 169 genes differentially expressed between AF-VHD and SR-VHD patients, 30 genes were not affected by VHD. These genes (indicated in bold in Table 3 in the on-line data supplement and (partly) in Fig. 4B) were identified based on the fact that they were not differentially expressed between SR-VHD and SR-CTRL patients, but were differentially expressed between AF-VHD and SR-VHD patients (based on SAM analysis). Fig. 5 shows the unsupervised hierarchical clustering of these 30 VHD-independent, AF-specific genes and all 18 patients. This clustering provided a comparable separation of the AF-VHD and SR-VHD patients to the clustering based on the 169 genes shown in Fig. 3. Patient AF-VHD13 (with the shortest duration of AF) still clusters together with patient SR-VHD34, whereas patient AF-VHD08 now clusters with the AF-VHD patients. This observation suggests that some gene changes independent of VHD may be particularly characteristic of AF. Some of the prominent differential genes in this analysis include genes involved in inflammation and fibrosis (TGFB1), coagulation (VWF) and contraction (cardiac troponin I, TNNI3).

Although valve-disease contributions in the AF-VHD and SR-VHD patient groups were comparable, small differences

did exist. Since mitral valve and aortic valve disease may have different effects on the atria, two-class SAM analysis was performed between patients with pure aortic valve disease ($N = 9$) and patients with pure mitral valve disease ($N = 6$). Of the 79 identified genes, only 4 were also found to be differential between AF-VHD and SR-VHD patients (identified in Table 3, on-line data supplement). Therefore, the small difference in valve disease distribution did not contribute significantly to the AF-specific gene expression profile. Similarly, gender differences did not contribute significantly to the AF-specific gene expression profile (since only two of 62 genes that were differentially expressed between female and male AF-VHD patients were also differentially expressed between AF-VHD and SR-VHD patients).

3.3. Quantitative PCR

A comparison of data obtained with microarrays and with quantitative PCR is shown in Fig. 6. Exact values can be found in Table 3 (on-line data supplement). Out of 20 genes analyzed by quantitative PCR, microarray data were obtained for 17. The remaining three genes either failed to provide valid microarray values (atrial natriuretic factor, NPPA) or were not present on the microarray (EPCR and SELP). Quantitative PCR results showed EPCR to be significantly down-regulated. Of the 17 genes analyzed by both methods,

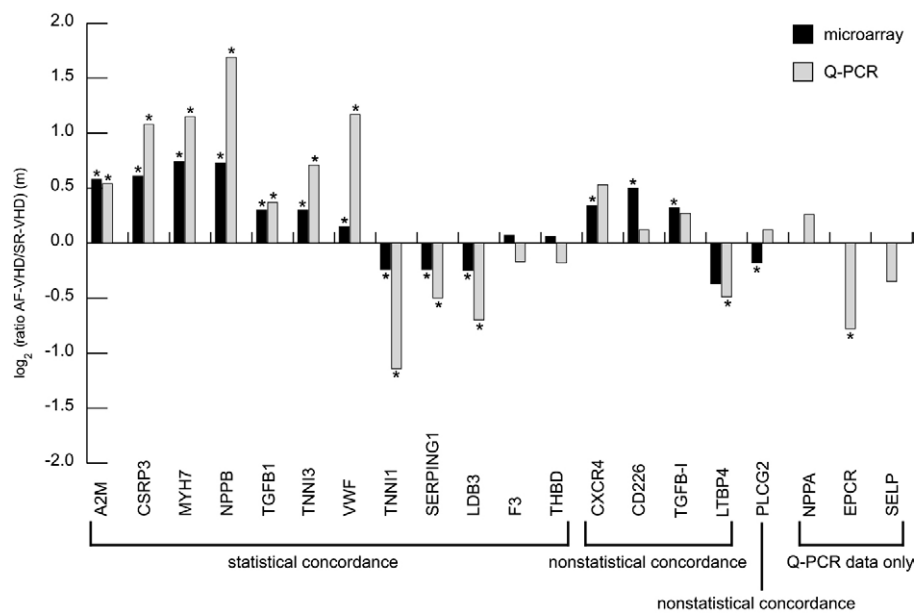


Fig. 6. Quantitative PCR vs. microarray. Comparison of results obtained with microarray and quantitative PCR analysis. Statistical concordance: Genes displaying similar results with both methods and similar results after statistical analysis. Non-statistical concordance: Genes displaying similar results with both methods, but only showing statistical significance with one method. Non-statistical discordance: gene displaying different results with both methods, the result of only one method is validated by statistical analysis. Q-PCR data only: Genes without available microarray data. *: Statistically significant according to two-class SAM analysis.

11 showed concordant significant up- or down-regulation or concordant unchanged expression levels. Five genes displayed significant up- or down-regulation by one method, and a similar (same direction) non-significant expression change by the other. One gene (phospholipase C gamma 2, PLCG2) showed discordant results.

4. Discussion

With this study, we aimed to provide a global view of cardiac gene expression changes related to permanent AF. We have succeeded in obtaining an extensive transcriptomal analysis, the largest to date on AF patients. The use of replicate spots on our microarrays and replicate hybridizations allowed us to reliably identify even small expression changes [13]. This is the great advantage of using dedicated microarrays as opposed to genome-wide microarrays, which do not contain replicate spots. Striking points included the extent to which valve disease per se remodeled cardiac gene expression, and the prominent AF-specific changes in genes associated with fibrosis and thrombosis.

4.1. Comparison with previous genomic analyses in AF and VHD patients

Thus far, four other studies have used a genomic approach in the analysis of AF, three of which were on human samples. In contrast to those studies, we analyzed a more defined AF population by assessing only patients with chronic AF and we were careful to include a sinus-rhythm group with similar heart disease to AF patients. We did not identify the same

expression changes as Kim et al. [7]. This may be related to the fact that their patients were not in chronic AF or to the fact that they did not match their control group in underlying cardiac disease. The latter is underlined by the fact that we identified differentially-expressed genes from their study as differently expressed between our SR-VHD and SR-CTRL patients but none were differentially expressed between our SR-VHD and AF-VHD patients. The analysis by Ohki-Kaneda et al. [9]—on a mixed population of chronic and persistent AF patients—resulted in the identification of only 11 AF-related genes (four of which were ESTs). These genes were either not present on our microarray or not differential between our SR-VHD and AF-VHD patients. A primary objective of their study was to create a regression relating gene expression to cardiac function. In concordance with the study by Lai et al. [8] we identified up-regulation of the myosin regulatory light chain. The main finding of the study by Barth et al. [10] was that the atrial myocardium of AF patients showed a ventricular-like genomic signature. In concordance with their results we identified an upregulation of transforming growth factor β 1 (TGFB1) in human AF patients. Studies on transgenic mice have shown that increased cardiac expression of TGFB1 leads to atrial fibrosis [24] and increased vulnerability to AF [25]. The upregulation of TGFB1 identified in our AF patients may therefore play a significant functional role in promoting atrial fibrosis, a known risk factor for AF [26–28]. In addition, we identified increased expression of two genes regulated by TGFB1: the hyaluronan mediated motility receptor HMMR, whose function is related to the extracellular matrix and whose mRNA stability is induced by TGFB1 [29]; and the TGFB1-induced gene TGFB-I, a component of the extracellular matrix [30]. The upregulation of

platelet-derived growth factor β (PDGFB) that we noted in AF may also lead to the activation of cardiovascular fibroblasts and increased collagen deposition [31]. This gene was also identified by Barth et al. [10].

Our finding that VHD is associated with substantial cardiac transcriptomal remodeling shows the importance of matching AF and control patients in underlying cardiac pathology.

4.2. Novel elements and potential significance

Numerous functional categories were affected by AF. Expression levels of genes involved in transcription and genes involved in protein synthesis or modification were found to be both up- and downregulated in AF. Two of these genes are known regulators of cardiac transcription: Gata binding protein 4 (GATA4), which was upregulated, and nuclear factor of activated T cells (NFATC1), which was downregulated. GATA4 plays a crucial role in cardiogenesis [32] and regulates a set of cardiac-specific genes. Among those genes are brain natriuretic peptide (BNP) [33,34] and cardiac troponin I (TNNT3) [35–37], which we found to be upregulated in AF. NFATC1—as part of the NFAT transcription complex—also has been found to be involved in cardiac development [38,39]. The differential expression of many genes involved in gene and protein synthesis is consistent with the extensive changes in electrical, contractile and structural properties associated with AF.

AF has already been associated with a hypercoagulable state by the following observations [40]: First, the loss of atrial systole leads to increased blood stasis. Secondly, atrial endocardial damage has been associated with AF. Thirdly, abnormalities of procoagulant blood constituents have been found in AF patients. In our study, the AF-specific differential expression of several genes was suggestive of a hypercoagulable state, a result of potential importance to understanding the thromboembolic diathesis in AF. Of those genes, only VWF has been previously associated with AF. Several studies identified an increased plasma level [41–43], increased endocardial protein expression [44,45], or increased endocardial RNA expression [45]. VWF is a marker of damaged endothelium and plays a role in platelet aggregation. We also identified the adhesion glycoprotein CD226, a gene involved in platelet activation and aggregation [46], as being upregulated in AF. A third upregulated gene with a potential role in platelet function is Hermansky–Pudlak syndrome 3 (HPS3), a gene with loss-of-function mutation in patients with the HPS [47,48]. One of the consequences of this syndrome is impaired platelet function, related to the absence of platelet dense bodies and decreased aggregation responses. Upregulation of the gene encoding ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (ENTPD1) might, on the other hand, lead to inhibition of platelet aggregation [49]. The differential expression of two other factors may be linked to increased coagulation directly related to protein C activation. A2M, which was upregulated in our AF patients, inhibits the anticoagulant

action of activated protein C [50]. EPCR, which was downregulated in our AF patients, augments protein C activation [51]. Finally, downregulation of the coagulation inhibitory complement component 1 inhibitor precursor (SERPING1) and upregulation of the plasminogen activator inhibitor (SERPINB2) may also be associated with increased coagulation. Thus far, the search for prothrombotic markers has been mainly performed by quantification of candidate proteins in blood samples [52]. Only two studies analyzed potential markers on a local level in atrial endocardium [44,45]. Our study identified novel potential prothrombotic markers in AF patients. These findings may be relevant to both the pathophysiology and prevention of thromboembolic complications in AF. Since the risk of stroke in AF is not homogeneous, better risk stratification for thromboprophylaxis is needed.

Overall, we have provided the largest and most detailed view thus far of gene expression changes related to VHD and AF in humans. The results of our study may contribute to a better understanding of the pathobiology of AF and the potential identification of new therapeutic targets.

4.3. Potential limitations

Since it is not ethically possible to obtain atrial samples from patients with normal hearts, our SR-CTRL patients did not have truly normal hearts. This may have affected the SR-VHD vs. SR-CTRL comparison. However, this did not affect the discovery of AF-specific genes, since these were identified by comparing AF-VHD to underlying-disease matched SR-VHD patients. Because of sample size limitations it was not possible to perform multivariate analysis to explore the combined effect of AF and potential other variables like age, mean ventricular heart rate prior to surgery, the timing of atrial biopsy in relationship to bypass, etc. on gene expression variations. We were limited to the use of RAA tissue for our analysis. Our results may therefore not be representative of transcriptomal remodeling processes in the atria as a whole. Had we attempted to obtain samples from other right and left atrial regions, it would have been virtually impossible to obtain a large enough patient population, particularly of patients with sinus rhythm and no valvular disease.

It is now well-recognized that many episodes of AF can be asymptomatic [53]. In fact, in patients with known AF, asymptomatic episodes are more common than symptomatic ones [54]. Therefore, although our SR-CTRL and SR-VHD patients had no history of AF nor any pre-operative ECGs showing AF, we cannot be sure that they had never had episodes of asymptomatic AF prior to surgery. We reviewed all patient files in detail to determine whether 24-hour Holter monitoring recordings had been obtained in the SR groups. Recordings were available for three SR-CTRL patients and one SR-VHD patient and none showed supraventricular tachyarrhythmias. On 6-month follow-up, only one patient had an episode of AF (SR-VHD34, see Section 3), which was

restricted to the immediate post-operative period. The possibility of asymptomatic AF in sinus-rhythm control patients has not been considered in previous studies comparing atrial samples from AF vs. SR patients [7–10,23,28], and is potentially a significant limitation. The effect of AF episodes in SR patients would be to diminish the differences between them and an AF group, and could have reduced our ability to detect AF-related differences.

Most AF-VHD patients (10 of 11) received anti-coagulation treatment (fluindone), which might conceivably affect the expression of genes involved in coagulation, although there is no known evidence for such regulation. Some clinical heterogeneity exists within each patient group. If this heterogeneity is reflected by a heterogeneous atrial gene expression profile, the affected genes may not have reached statistical significance in the SAM one- and two-class analyses. Therefore, some genes may have been missed in our study.

Our list of genes involved in AF is probably not exhaustive since we did not use genome-wide microarrays. We preferred statistical robustness over completeness by analyzing a subset of the human genome with replicate experiments. Furthermore, we used a set of genes that we have developed on the basis of known or strongly suspected involvement in cardiac physiology and/or pathophysiology (a fact underlined by the high percentage of valid expression values in our study). The risk of missing potentially significant genes not presently known to be involved in the heart is offset by the large number of false-positive changes that would inevitably be detected by adding the remaining ~20,000 genes in the human transcriptome to the study.

Acknowledgments

The authors thank the Thoracic Surgery and Cardiology Departments of Nantes University Hospital for their participation, Audrey Bihouée for development of the local microarray database and Raluca Teusan for help with the Gene Ontology analyses. Funding was provided by the “Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale” (Inserm), the “Centre National de la Recherche Scientifique”, the “Association Française contre les Myopathies”, the “Region Pays de Loire” and the Canadian Institutes of Health Research.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.yjmcc.2005.09.004](https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2005.09.004).

References

- [1] Nattel S. Therapeutic implications of atrial fibrillation mechanisms: can mechanistic insights be used to improve AF management? *Cardiovasc Res* 2002;54:347–60.
- [2] Wolf PA, Dawber TR, Thomas Jr. HE, Kannel WB. Epidemiologic assessment of chronic atrial fibrillation and risk of stroke: the Framingham study. *Neurology* 1978;28:973–7.
- [3] Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allessie MA. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation* 1995;92:1954–68.
- [4] Allessie M, Ausma J, Schotten U. Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2002;54:230–46.
- [5] Brundel BJ, Henning RH, Kampinga HH, Van Gelder IC, Crijns HJ. Molecular mechanisms of remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2002;54:315–24.
- [6] Yue L, Melnyk P, Gaspo R, Wang Z, Nattel S. Molecular mechanisms underlying ionic remodeling in a dog model of atrial fibrillation. *Circ Res* 1999;84:776–84.
- [7] Kim YH, Lee JH, Lim DS, Shim WJ, Ro YM, Park GH, et al. Gene expression profiling of oxidative stress on atrial fibrillation in humans. *Exp Mol Med* 2003;35:336–49.
- [8] Lai LP, Lin JL, Lin CS, Yeh HM, Tsay YG, Lee CF, et al. Functional genomic study on atrial fibrillation using cDNA microarray and two-dimensional protein electrophoresis techniques and identification of the myosin regulatory light chain isoform reprogramming in atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2004;15:214–23.
- [9] Ohki-Kaneda R, Ohashi J, Yamamoto K, Ueno S, Ota J, Choi YL, et al. Cardiac function-related gene expression profiles in human atrial myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;320:1328–36.
- [10] Barth AS, Merk S, Arnoldi E, Zwermann L, Kloos P, Gebauer M, et al. Reprogramming of the human atrial transcriptome in permanent atrial fibrillation: expression of a ventricular-like genomic signature. *Circ Res* 2005;96:1022–9.
- [11] Steenman M, Lamirault G, Le Meur N, Le Cunff M, Escande D, Léger JJ. Distinct molecular portraits of human failing hearts identified by dedicated cDNA microarrays. *Eur J Heart Fail* 2005;7:157–65.
- [12] Steenman M, Chen Y-W, Le Cunff M, Lamirault G, Varro A, Hoffman E, et al. Transcriptomal analysis of failing and non-failing human hearts. *Physiol Genomics* 2003;12:97–112.
- [13] Le Meur N, Lamirault G, Bihouée A, Steenman M, Bédérine-Ferran H, Teusan R, et al. A dynamic, web-accessible resource to process raw microarray scan data into consolidated gene expression values: importance of replication. *Nucleic Acids Res* 2004;32:5349–58.
- [14] Tseng GC, Oh M-K, Rohlin L, Liao JC, Wong WH. Issues in cDNA microarray analysis: quality filtering, channel normalization, models of variations and assessment of gene effects. *Nucleic Acids Res* 2001;29:2549–57.
- [15] Workman C, Jensen LJ, Jarmer H, Berka R, Gautier L, Nielser HB, et al. A new non-linear normalization method for reducing variability in DNA microarray experiments. *Genome Biol* 2002;3 research 0048.1–0048.16.
- [16] Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:5116–21.
- [17] Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 2004;3:1–26.
- [18] Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:14863–8.
- [19] Thomas PD, Kejariwal A, Campbell MJ, Mi H, Diemer K, Guo N, et al. PANTHER: a browsable database of gene products organized by biological function, using curated protein family and subfamily classification. *Nucleic Acids Res* 2003;31:334–41.
- [20] Winer J, Jung CK, Shackel I, Williams PM. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal Biochem* 1999;270:41–9.
- [21] Eisenberg Jr. F. D-Myoinositol 1-phosphate as product of cyclization of glucose 6-phosphate and substrate for a specific phosphatase in rat testis. *J Biol Chem* 1967;242:1375–82.

- [22] Maeda T, Eisenberg Jr. F. Purification, structure, and catalytic properties of L-myo-inositol-1-phosphate synthase from rat testis. *J Biol Chem* 1980;255:8458–64.
- [23] Gaborit N, Steenman M, Lamirault G, Le Meur N, Le Bouter S, Lande G, et al. Human atrial ion channel and transporter subunit gene-expression remodeling associated with valvular heart disease and atrial fibrillation. *Circulation* 2005;112:471–81.
- [24] Nakajima H, Nakajima HO, Salcher O, Dittie AS, Dembowski K, Jing S, et al. Atrial but not ventricular fibrosis in mice expressing a mutant transforming growth factor-beta(1) transgene in the heart. *Circ Res* 2000;86:571–9.
- [25] Verheule S, Sato T, Everett T, Engle SK, Otten D, Rubart-von der LM, et al. Increased vulnerability to atrial fibrillation in transgenic mice with selective atrial fibrosis caused by overexpression of TGF-beta1. *Circ Res* 2004;94:1458–65.
- [26] Kostin S, Klein G, Szalay Z, Hein S, Bauer EP, Schaper J. Structural correlate of atrial fibrillation in human patients. *Cardiovasc Res* 2002;54:361–79.
- [27] Cha TJ, Ehrlich JR, Zhang L, Shi YF, Tardif JC, Leung TK, et al. Dissociation between ionic remodeling and ability to sustain atrial fibrillation during recovery from experimental congestive heart failure. *Circulation* 2004;109:412–8.
- [28] Xu J, Cui G, Esmailian F, Plunkett M, Marelli D, Ardehali A, et al. Atrial extracellular matrix remodeling and the maintenance of atrial fibrillation. *Circulation* 2004;109:363–8.
- [29] Amara FM, Entwistle J, Kuschak TI, Turley EA, Wright JA. Transforming growth factor-beta1 stimulates multiple protein interactions at a unique cis-element in the 3'-untranslated region of the hyaluronan receptor RHAMM mRNA. *J Biol Chem* 1996;271:15279–84.
- [30] Billings PC, Whitbeck JC, Adams CS, Abrams WR, Cohen AJ, Engelsberg BN, et al. The transforming growth factor-beta-inducible matrix protein (beta)ig-h3 interacts with fibronectin. *J Biol Chem* 2002;277:28003–9.
- [31] Bishop JE. Regulation of cardiovascular collagen deposition by mechanical forces. *Mol Med Today* 1998;4:69–75.
- [32] Garg V, Kathiriyia IS, Barnes R, Schluterman MK, King IN, Butler CA, et al. GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature* 2003;424:443–7.
- [33] Grepin C, Dagnino L, Robitaille L, Haberstroh L, Antakly T, Nemer M. A hormone-encoding gene identifies a pathway for cardiac but not skeletal muscle gene transcription. *Mol Cell Biol* 1994;14:3115–29.
- [34] Thuerauf DJ, Hanford DS, Glembotski CC. Regulation of rat brain natriuretic peptide transcription. A potential role for GATA-related transcription factors in myocardial cell gene expression. *J Biol Chem* 1994;269:17772–5.
- [35] Murphy AM, Thompson WR, Peng LF, Jones L. Regulation of the rat cardiac troponin I gene by the transcription factor GATA-4. *Biochem J* 1997;322(Pt. 2):393–401.
- [36] Di Lisi R, Millino C, Calabria E, Altruda F, Schiaffino S, Ausoni S. Combinatorial cis-acting elements control tissue-specific activation of the cardiac troponin I gene in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 1998;273:25371–80.
- [37] Bhavsar PK, Dellow KA, Yacoub MH, Brand NJ, Barton PJ. Identification of cis-acting DNA elements required for expression of the human cardiac troponin I gene promoter. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:95–108.
- [38] De la Pompa JL, Timmerman LA, Takimoto H, Yoshida H, Elia AJ, Samper E, et al. Role of the NF-ATc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum. *Nature* 1998;392:182–6.
- [39] Schubert W, Yang XY, Yang TT, Factor SM, Lisanti MP, Molken JD, et al. Requirement of transcription factor NFAT in developing atrial myocardium. *J Cell Biol* 2003;161:861–74.
- [40] Choudhury A, Lip GY. Atrial fibrillation and the hypercoagulable state: from basic science to clinical practice. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003;33:282–9.
- [41] Heppell RM, Berkin KE, McLenachan JM, Davies JA. Haemostatic and haemodynamic abnormalities associated with left atrial thrombosis in non-rheumatic atrial fibrillation. *Heart* 1997;77:407–11.
- [42] Li-Saw-Hee FL, Blann AD, Lip GY. A cross-sectional and diurnal study of thrombogenesis among patients with chronic atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:1926–31.
- [43] Li-Saw-Hee FL, Blann AD, Gurney D, Lip GY. Plasma von Willebrand factor, fibrinogen and soluble P-selectin levels in paroxysmal, persistent and permanent atrial fibrillation. Effects of cardioversion and return of left atrial function. *Eur Heart J* 2001;22:1741–7.
- [44] Nakamura Y, Nakamura K, Fukushima-Kusano K, Ohta K, Matsubara H, Hamuro T, et al. Tissue factor expression in atrial endothelia associated with nonvalvular atrial fibrillation: possible involvement in intracardiac thrombogenesis. *Thromb Res* 2003;111:137–42.
- [45] Kumagai K, Fukuchi M, Ohta J, Baba S, Oda K, Akimoto H, et al. Expression of the von Willebrand factor in atrial endocardium is increased in atrial fibrillation depending on the extent of structural remodeling. *Circ J* 2004;68:321–7.
- [46] Scott JL, Dunn SM, Jin B, Hillam AJ, Walton S, Berndt MC, et al. Characterization of a novel membrane glycoprotein involved in platelet activation. *J Biol Chem* 1989;264:13475–82.
- [47] Anikster Y, Huizing M, White J, Shevchenko YO, Fitzpatrick DL, Touchman JW, et al. Mutation of a new gene causes a unique form of Hermansky-Pudlak syndrome in a genetic isolate of central Puerto Rico. *Nat Genet* 2001;28:376–80.
- [48] Huizing M, Anikster Y, Fitzpatrick DL, Jeong AB, D'Souza M, Rausche M, et al. Hermansky-Pudlak syndrome type 3 in Ashkenazi Jews and other non-Puerto Rican patients with hypopigmentation and platelet storage-pool deficiency. *Am J Hum Genet* 2001;69:1022–32.
- [49] Kawashima Y, Nagasawa T, Ninomiya H. Contribution of ecto-5'-nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells. *Blood* 2000;96:2157–62.
- [50] Cvirn G, Gallistl S, Muntean W. Alpha-2-macroglobulin inhibits the anticoagulant action of activated protein C in cord and adult plasma. *Haemostasis* 2001;31:1–11.
- [51] Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mollica JS, Ferrell GL, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:10212–6.
- [52] Lip GY. Does atrial fibrillation confer a hypercoagulable state? *Lancet* 1995;346:1313–4.
- [53] Flaker GC, Belew K, Beckman K, Vidaillet H, Kron J, Safford R, et al. Asymptomatic atrial fibrillation: demographic features and prognostic information from the Atrial Fibrillation Follow-up Investigation of Rhythm Management (AFFIRM) study. *Am Heart J* 2005;149:657–63.
- [54] Page RL, Wilkinson WE, Clair WK, McCarthy EA, Pritchett EL. Asymptomatic arrhythmias in patients with symptomatic paroxysmal atrial fibrillation and paroxysmal supraventricular tachycardia. *Circulation* 1994;89:224–7.

Remodelage de l'expression des canaux ioniques cardiaques : rôle dans le phénotype électrophysiologique

Les approches gène à gène ont montré que les cellules cardiaques sont capables d'adapter leurs propriétés électrophysiologiques à des contraintes externes physiologiques ou pathologiques, en modifiant l'expression transcriptionnelle de leurs canaux ioniques. Cependant, elles n'ont fourni que des données partielles. La génomique autorise aujourd'hui un abord global de ce remodelage. Au cours de ma thèse j'ai utilisé des outils de génomique afin de définir l'ensemble des canaux ioniques cardiaques dont la régulation transcriptionnelle était modifiée face à des contraintes externes. J'ai d'une part évalué la distribution des transcrits des canaux dans différentes régions du cœur humain sain et sa modulation en fonction du sexe. D'autre part, j'ai analysé le remodelage ionique associé à la fibrillation auriculaire, au syndrome de Brugada et à l'insuffisance cardiaque. J'ai pu ainsi montrer que cette régulation transcriptionnelle est systématique, qu'elle concerne un grand nombre de canaux et notamment leurs sous-unités régulatrices, et enfin qu'elle est généralement cohérente avec les propriétés électrophysiologiques des cellules cardiaques. On peut donc supposer que ces cellules utilisent de façon préférentielle la transcription des canaux pour adapter leurs propriétés électrophysiologiques. Il reste maintenant à définir quels sont les facteurs de transcription impliqués dans la régulation des canaux et quels sont les mécanismes de rétrocontrôle qui existent entre le phénotype électrophysiologique des cellules cardiaques et leur machinerie de transcription.

Mots clefs : génomique – canaux ioniques – remodelage moléculaire – arythmies cardiaques

Abstract

Cardiac ion channel expression remodeling: role in the electrophysiological phenotype

Gene by gene approaches have shown that cardiac cells adapt their electrophysiological properties to physiological or pathological situations by modifying gene expression levels of ion channels. However, these approaches have only provided partial data. Today, genomics allows to investigate this remodeling in a global way. During my thesis I used genomic tools to determine which ion channels have a modified transcriptional regulation when exposed to external pressure. First, the distribution of ion channel gene expression in different regions of the human heart, and its modulation by gender, was evaluated. Secondly, ionic remodeling associated with atrial fibrillation, Brugada syndrome and heart failure was analyzed. Thus, I showed that transcriptional regulation of ion channels is systematic, that it concerns a large number of ion channels and particularly auxiliary sub-units, and finally that it is generally consistent with the electrophysiological properties of the cardiac cells. We therefore suggest that cells preferentially use ion channel transcription to adapt their electrophysiological properties. We have now to determine which transcription factors are implicated in channel regulation and what are the feed-back mechanisms between the electrophysiological phenotype of the cardiac cells and their transcription machinery.

Keywords: genomics – ion channels – molecular remodeling – cardiac arrhythmias