

Thèse de Doctorat

Sophie Burel

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : *Biologie-Santé*

Discipline : *Biologie*

Spécialité : *Electrophysiologie cardiaque*

Unité de recherche : Unité de recherche de l'institut du thorax, Inserm UMR1087, CNRS UMR6291

Soutenue le 01/04/2016

Thèse N° : 09

Phosphorylation des canaux Nav1.5 et régulation de l'excitabilité cardiaque normale et pathologique

JURY

Rapporteurs :	Alain LACAMPAGNE, DR, Université de Montpellier Massimo MANTEGAZZA, CR, Université de Nice-Sophia Antipolis
Examineur :	Rodolphe FISCHMEISTER, DR, Université de Paris-Sud
Directeur de Thèse :	Flavien CHARPENTIER, DR, Université de Nantes
Co-directeur de Thèse :	Céline MARIONNEAU, CR, Université de Nantes

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé à la réalisation de ce travail et m'ont apporté leur aide à un moment ou un autre au cours de ces années.

Merci à Hervé Le Marec pour m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de l'institut du thorax. Merci également à Alain Lacampagne, Massimo Mantegazza et Rodolphe Fischmeister pour avoir accepté d'être membres de mon jury et d'évaluer ce travail. Merci pour le temps que vous m'avez accordé. Merci à Hugues Abriel et Arnaud Monteil pour l'aide fournie lors des comités de suivi de thèse.

Je remercie également le Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire pour m'avoir permis de prolonger cette thèse et de finaliser ce travail.

Céline, si je devais être concise je te dirais "Merci !". Mais j'espère que tu me pardonneras, car je vais m'étendre un peu. Merci de m'avoir donné ma chance pour travailler avec toi sur ce projet et d'avoir eu "le feeling" sans lequel on n'en serait pas là aujourd'hui. Merci pour la confiance que tu m'as portée et pour tout ce que tu m'as transmis, j'ai énormément appris à tes côtés, à tous points de vue. Merci pour ton dynamisme, ton honnêteté et ta disponibilité. Merci pour ta bonne humeur et pour tous les bons moments passés ensemble à la paillasse (Ouh !), dans le bureau ou lors des "soirées mogettes". Je te souhaite le meilleur pour la suite, en espérant que tu puisses continuer à développer des projets qui te passionnent, et je te souhaite évidemment de continuer à vivre de belles choses sur le plan personnel. Je suis très heureuse d'avoir vécu cette thèse avec toi, ça a été une belle aventure, et c'est en grande partie grâce à toi !

Flavien, merci d'avoir accepté de prendre la direction de cette thèse. Merci pour les conseils que vous m'avez donnés, pour le partage de votre culture scientifique (et pas que), et pour votre relecture attentive de ce manuscrit. Merci pour votre sympathie et pour les bons moments passés ensemble dans le "bureau des chefs" ou en short et baskets.

Jean, merci pour votre gentillesse, votre esprit quelque peu taquin et vos précieux conseils. Ça a été un grand plaisir de passer ces années avec vous. Vive la banane ! Le moins que l'on puisse dire c'est que je quitterai ce bureau avec regrets, quel quator de choc nous avons formé !

Merci à celles que j'ai embêtées quotidiennement en salle de bioch'. Freestyle Popo, merci pour ta bonne humeur et les instants de folie partagés, pour nos "night fever", nos chansons ("J'ai un problème...") et tout le reste !! Aurore, merci pour ta gentillesse, pour ton aide, et pour les bons moments passés ensemble. Merci également à toi Pequeño gato del bosque, je suis ravie d'avoir été matinale avec toi et d'avoir été ta bourrique !! Merci également à Agnès H et Angélique, avec qui nous avons souvent partagé nos discussions et nos délires musicaux.

Merci à toi Fabien (alias IsK), je n'oublie pas tout ce que tu m'as transmis, toujours avec le sourire et avec patience. Tu as contribué à rendre le patch un peu moins obscur pour la non-initiée que j'étais. La libellule n'a pas eu raison de moi ! Merci Maxime, pour ton implication, pour ta gentillesse et ta capacité à accepter nos taquineries avec le sourire. Ça a été un plaisir de travailler avec toi, et je te souhaite beaucoup de réussite pour cette thèse.

Zeineb, merci pour ta bienveillance, ton sourire et ta spontanéité (qui a déclenché bien des fous rires !). J'ai aimé (autant que les clémentines) chaque instant partagé avec toi. Je te souhaite le meilleur pour la suite, quelle que soit la voie qui s'offrira à toi, et j'espère que tu t'épanouiras pleinement, tu le mérites tellement ! Nadjet, merci pour ta bonne humeur et pour les bons moments passés ensemble. Merci aussi pour les leçons de "langue morte", grâce à toi je pourrai me débrouiller dans le désert (si si) ! N'oublie pas de garder un peu de "Suisse attitude" en toi ;-)

VDDF, merci pour ton sourire, ta bonne humeur, et pour les fous rires partagés. Je suis ravie d'avoir pu tester mon sens pratico-pratique à tes côtés. Petit scarabée quittera à regret son vénérable maître. Corinne, merci pour ta gentillesse, ta disponibilité et l'aide que tu m'as apportée tout au long de ces années. Merci également pour l'organisation des 48h, un super moment de la vie du labo qui est une réussite chaque année, en grande partie grâce à toi.

Merci à tous les thésards et tous ceux avec qui on a partagé de bons moments au labo, lors des soirées ou pour les tournages des 48h (mention spéciale à toi Guilaine !). Merci également à la troupe des coureurs pour les footings et les instants un peu moins sportifs, c'était top ! Merci à tous les membres de l'équipe qui m'ont apporté leur aide à un moment ou un autre. Merci Gilles, je n'oublie pas que c'est grâce à vous que j'ai fait mes premiers pas au labo. Enfin, merci à tous ceux qui, par la bonne humeur dont ils font preuve, contribuent à la bonne ambiance si précieuse qui règne au labo.

Merci au "Club des thésards anonymes" (que l'on devrait renommer d'ailleurs) et aux "Coupings" grâce à qui les années se sont passées dans la joie et la bonne humeur !

Merci à ma famille, pour leur soutien depuis toutes ces années.

Un "shbg merci" à toi Filoute, pour tout ce qu'on vit ensemble, pour ton soutien et ton amitié, tout simplement. Quel que soit le chemin que l'on prenne, je trouverai toujours un moyen de remplir mon rôle de coach personnel, c'est é-vi-dent. I'll be your boudet for ever !! Shiny, merci d'être aussi brillant, à tous points de vue, je suis ravie de pouvoir bénéficier de ta lumière ! BerNique, merci pour tous les bons moments passés ensemble et pour m'avoir accueillie à bras ouverts dans les JDGN. Merci à Ccccchilbert, BC et Leuleu pour leur soutien inconditionnel.

Table des matières

Table des matières	1
Index des figures	3
Index des tableaux.....	4
Liste des abréviations	5
Avant-propos.....	6
Introduction	7
I. Généralités sur l'activité électrique cardiaque.....	7
II. Généralités sur les canaux Nav1.5	9
II.1. Profil d'expression des canaux Nav1.5	9
II.2. Structure des canaux Nav1.5	10
II.3. Activation des canaux Nav1.5.....	12
II.4. Inactivation des canaux Nav1.5	13
II.5. Le courant sodique persistant I_{NaL}	15
III. Régulation des canaux Nav1.5 par les protéines partenaires	20
III.1. Régulation des canaux Nav1.5 par le Ca^{2+} et la Calmoduline	21
III.2. Régulation des canaux Nav1.5 par le FGF13	27
IV. Régulation des canaux Nav1.5 par la phosphorylation	31
IV.1. Régulation des canaux Nav1.5 par la PKA	31
IV.2. Régulation des canaux Nav1.5 par la PKC	33
IV.3. Régulation des canaux Nav1.5 par la CaMKII	34
IV.4. Régulation des canaux Nav1.5 par la voie PI3K/Akt/SGK	38
IV.5. Régulation des canaux Nav1.5 par la Fyn kinase	40
IV.6. Comparaison des méthodes d'identification des sites de phosphorylation	42
V. Insuffisance cardiaque et canaux Nav1.5	44
VI. Contexte et objectifs de la thèse	47
Matériel et méthodes	50
I. Génération des plasmides et mutagenèse dirigée	50
II. Culture cellulaire et transfection	50
III. Analyses Biochimiques	51
III.1. Traitements pharmacologiques	51
III.2. Co-Immunoprécipitation dans les cellules HEK293	51

III.3. Essais de Biotinylation	52
III.4. Western blot	52
IV. Patch-clamp	53
V. Analyses statistiques.....	55
Résultats.....	56
I. Projet 1 - Rôle de la phosphorylation dans la régulation de l'expression des canaux Nav1.5 à la surface cellulaire	56
I.1. Objectif du projet	56
I.2. Résultats	57
I.2.a. Rôle des sites de phosphorylation identifiés dans la régulation de l'expression des canaux Nav1.5 à la surface cellulaire	57
I.2.b. Régulation de l'expression des canaux Nav1.5 à la surface cellulaire par la PKA ...	59
I.2.c. Régulation de l'expression des canaux Nav1.5 à la surface cellulaire par la PKC	61
I.2.d. Régulation de l'expression des canaux Nav1.5 à la surface cellulaire par la SGK1 .	63
I.3. Discussion	64
II. Projet 2 - Rôle de la phosphorylation des sérines 1933 et 1984 dans les défauts d'inactivation des canaux Nav1.5 associés à l'insuffisance cardiaque	68
II.1. Objectif du projet	68
II.2. Résultats - Publication	69
II.3. Résultat supplémentaire	108
II.4. Discussion	109
Conclusion générale et perspectives.....	113
Références bibliographiques	115
Annexe	129

Index des figures

Figure 1. Représentation schématique du potentiel d'action ventriculaire humain et des principaux courants ioniques impliqués.	8
Figure 2. Structure du canal Nav1.5.....	11
Figure 3. Représentation schématique du fonctionnement des canaux Nav1.5.	13
Figure 4. Rôle de l'extrémité C-terminale des canaux Nav1.5 dans la régulation de leur inactivation.	14
Figure 5. Illustration des mécanismes à l'origine du courant I_{NaL}	17
Figure 6. Effets d'une augmentation du courant I_{NaL} sur l'excitabilité cardiaque.	19
Figure 7. Représentation schématique du complexe canalaire Nav1.5.	20
Figure 8. Modèle de l'action du Ca^{2+} et de la CaM sur le canal Nav1.5.....	26
Figure 9. Effets de l'extinction de FGF13 sur les propriétés des canaux Nav1.5 cardiaques.	28
Figure 10. Alignement de séquences C-terminales des canaux Nav1.5.	30
Figure 11. Représentation schématique de la structure de la CaMKII et de ses modes d'activation.	35
Figure 12. Régulation des canaux Nav1.5 cardiaques par la CaMKII.....	37
Figure 13. Implication du courant I_{NaL} et de la CaMKII dans le remodelage électrophysiologique associé à l'insuffisance cardiaque.	46
Figure 14. Localisation et quantification des sites de phosphorylation de Nav1.5 identifiés par phosphoprotéomique.	48
Figure 15. Localisation des sites de phosphorylation natifs des canaux Nav1.5 identifiés par phosphoprotéomique et kinases associées	56
Figure 16. Expression totale et à la surface cellulaire des phosphomutants du canal Nav1.5.	58
Figure 17. Régulation de l'expression totale et à la surface cellulaire des canaux Nav1.5 par la PKA.....	60
Figure 18. Régulation de l'expression totale et à la surface cellulaire des canaux Nav1.5 par la PKC.....	62
Figure 19. Régulation de l'expression totale et à la surface cellulaire des canaux Nav1.5 par la SGK1.....	63
Figure 20. Effets du FGF13 sur l'interaction de la CaM avec le canal Nav1.5.	108

Index des tableaux

Tableau I : Profil d'expression des canaux Nav et principales pathologies héréditaires associées.....	9
Tableau II : Protéines partenaires des canaux Nav1.5.....	22
Tableau III : Principaux effets du Ca ²⁺ et de la CaM sur les canaux Nav1.5.....	25
Tableau IV. Principaux effets de la phosphorylation des canaux Nav1.5 sur la densité et les propriétés du courant Na ⁺	41

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

BrS : *Brugada Syndrome*

CaM : Calmoduline

CaMKII : *Calcium (Ca²⁺)-Calmodulin dependent protein Kinase II*

DAD : *Delayed Afterdepolarization*

EAD : *Early Afterdepolarization*

FGF13 : *Fibroblast Growth Factor 13*

FHF : *Fibroblast Growth Factor (FGF) Homologous Factor*

GAPDH : Glycéraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

HEK : *Human Embryonic Kidney cells*

I_{Na} : courant Na⁺ transitoire

I_{NaL} : courant Na⁺ persistant

IP : Immunoprécipitation

LQTS : *Long QT Syndrome*

Nav : Canal Na⁺ dépendant du voltage

PA : Potentiel d'Action

PBS : *Phosphate Buffered Saline*

PI3K : *Phosphatidylinositol 3-Kinase*

PKA : Protéine Kinase dépendante de l'AMPc

PKC : Protéine Kinase C

ROS : *Reactive Oxygen Species*

SGK1 : *Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase 1*

TransR : *Transferrin Receptor*

TTX : Tétrodotoxine

Avant-propos

Les maladies cardiovasculaires restent à l'heure actuelle la première cause de mortalité dans le monde, avec environ 17 millions de décès par an (Organisation Mondiale pour la Santé). Une part importante de ces décès est liée à la survenue de troubles du rythme cardiaque, c'est-à-dire un défaut de l'activité électrique du cœur. L'un des objectifs de l'équipe "Maladies cardiaques et mort subite" de l'institut du thorax dans laquelle j'ai effectué ma thèse est de déterminer les mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine de ces arythmies potentiellement létales. Les canaux Na^+ dépendants du voltage Nav1.5 sont des acteurs clé de l'excitabilité cardiaque impliqués dans la génération et la propagation de l'activité électrique cardiaque. Tout défaut de régulation de leur expression et/ou de leur fonctionnement peut aboutir au développement d'arythmies cardiaques, d'où l'importance de comprendre leurs mécanismes de régulation. La phosphorylation a été décrite pour être un mécanisme clé de régulation des canaux Nav1.5, puisqu'elle module leurs propriétés biophysiques et leur expression à la surface cellulaire. L'implication physiopathologique de la phosphorylation des canaux Nav1.5 a été mise en évidence dans le contexte de l'insuffisance cardiaque, pathologie touchant environ 2% de la population adulte en France, et pour laquelle environ 50% des patients décèdent suite à un trouble du rythme cardiaque. En effet, cette pathologie est associée à des défauts d'inactivation des canaux Nav1.5, et plusieurs études suggèrent que ces défauts sont dus à une altération de leur phosphorylation, mais les mécanismes impliqués restent encore mal connus.

Dans ce contexte, l'objectif général de mon travail de thèse a été d'étudier le rôle de la phosphorylation dans la régulation des canaux Nav1.5 et de l'excitabilité cardiaque normale et pathologique. Mes travaux se sont basés sur les résultats d'une approche de phosphoprotéomique développée au laboratoire, qui a permis d'identifier *in situ* 19 sites de phosphorylation natifs présents sur les canaux Nav1.5 isolés à partir de ventricules de souris sauvages ou en insuffisance cardiaque. Mon travail de thèse a consisté à déterminer le rôle de la phosphorylation des canaux Nav1.5 (1) dans la régulation de leur expression à la surface cellulaire, et (2) dans leurs défauts d'inactivation associés à l'insuffisance cardiaque.

Introduction

I. Généralités sur l'activité électrique cardiaque

L'activité contractile cardiaque dépend de l'activité électrique coordonnée, dans le temps et dans l'espace, des différentes régions du cœur (Nerbonne et Kass, 2005). Chez l'Homme, cette activité électrique naît au niveau du nœud sinusal, localisé dans l'oreillette droite, et est transmise à l'ensemble du myocarde via le système de conduction. Ainsi, l'influx électrique est propagé dans les oreillettes, puis dans le nœud auriculo-ventriculaire, le faisceau de His, les fibres de Purkinje et enfin le myocarde ventriculaire, permettant ainsi la dépolarisation et la contraction successive du myocarde auriculaire et ventriculaire. Cette activité électrique cardiaque est caractérisée par la génération et la propagation de potentiels d'action (PA) qui reflètent l'activation et l'inactivation séquentielles de canaux ioniques dépendants du voltage, qui assurent le flux d'ions entre les milieux intracellulaire et extracellulaire en fonction des gradients électrochimiques. Ainsi, les canaux Na^+ dépendants du voltage (Nav) sont responsables d'un courant Na^+ entrant dépolarisant, impliqué dans la phase de dépolarisation (Phase 0) du PA, les canaux Ca^{2+} dépendants du voltage (Cav) sont impliqués dans la génération d'un courant Ca^{2+} entrant responsable de la phase de plateau, et les canaux K^+ dépendants du voltage de courants K^+ sortants sont impliqués dans les phases de plateau et de repolarisation (**Figure 1**). Tout changement de l'expression et/ou du fonctionnement des canaux ioniques, dans le contexte de pathologies cardiaques héréditaires ou acquises, peut modifier la forme, la durée ainsi que la propagation des PA et conduire au développement d'arythmies cardiaques et à la mort subite (Remme et Bezzina, 2010). Les canaux Na^+ dépendants du voltage Nav1.5 sont les principaux canaux Nav exprimés dans le cœur. Ils sont impliqués dans la génération du courant Na^+ entrant transitoire I_{Na} , qui s'active et s'inactive rapidement pour générer la phase 0 du PA, et ont donc un rôle majeur dans la génération et la propagation de l'activité électrique cardiaque. Les canaux Nav1.5 génèrent également un courant Na^+ persistant, ou "late", appelé I_{NaL} , qui persiste au cours de la phase de plateau, contrôlant ainsi la forme et la durée du PA cardiaque (Nerbonne et Kass, 2005). Les canaux Nav1.5 sont donc des acteurs majeurs de l'excitabilité cardiaque, et l'intérêt qui leur est porté est renforcé par leur rôle dans le développement de pathologies cardiaques et la survenue d'arythmies (Remme et Bezzina, 2010). En effet, de nombreuses mutations dans

le gène *SCN5A*, codant pour Nav1.5, ont été mises en évidence dans des pathologies héréditaires comme le syndrome du QT long de type 3 (LQTS 3) ou le syndrome de Brugada (BrS). Plusieurs études ont également mis en évidence des altérations de l'expression fonctionnelle des canaux Nav1.5 dans des pathologies cardiaques acquises telle que l'insuffisance cardiaque et le rôle délétère de ces altérations dans la survenue des troubles du rythme associés à cette pathologie.

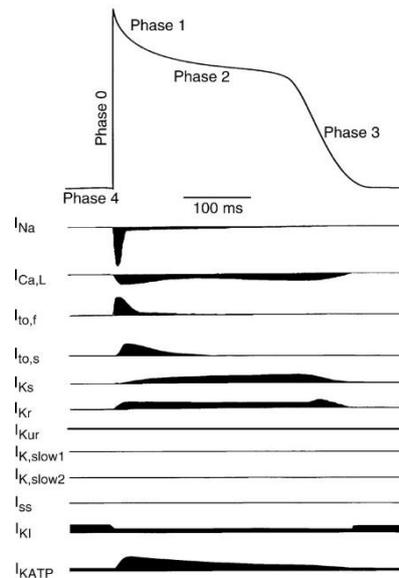


Figure 1. Représentation schématique du potentiel d'action ventriculaire humain et des principaux courants ioniques impliqués. Les courants entrants sont représentés vers le bas et les courants sortants vers le haut (Nerbonne et Kass, 2005).

II. Généralités sur les canaux Nav1.5

II.1. Profil d'expression des canaux Nav1.5

Les canaux Nav1.5 appartiennent à la famille des canaux Na⁺ dépendants du voltage (Nav), qui comprend neuf membres, Nav1.1 à Nav1.9, codés par les gènes *SCN1A* à *SCN11A*, et dont le profil d'expression varie selon les tissus (**Tableau I**). Les canaux Nav1.1, Nav1.2 et Nav1.3 sont principalement exprimés dans le système nerveux central, le canal Nav1.6 est fortement exprimé à la fois dans le système nerveux central et périphérique, alors que les canaux Nav1.7, Nav1.8 et Nav1.9 sont principalement exprimés dans le système nerveux périphérique (de Lera Ruiz et Kraus, 2015; Savio-Galimberti et al., 2012). Le canal Nav1.4 est lui majoritairement exprimé dans les muscles squelettiques, alors que Nav1.5 est le canal majoritaire dans le cœur.

Tableau I : Profil d'expression des canaux Nav et principales pathologies génétiques associées

Sous-unité Nav	Gène	Chromosome (Homme)	Expression majoritaire	Principales pathologies génétiques associées
Nav1.1	<i>SCN1A</i>	2	SNC	Epilepsies
Nav1.2	<i>SCN2A</i>	2	SNC	Convulsions fébriles, épilepsies
Nav1.3	<i>SCN3A</i>	2	SNC	Implication potentielle dans la sensibilité à la douleur
Nav1.4	<i>SCN4A</i>	11	Muscles squelettiques	Myotonies, paralysie périodique hypokaliémique
Nav1.5	<i>SCN5A</i>	3	Cœur	LQTS, BrS, troubles de la conduction, SIDS, etc.
Nav1.6	<i>SCN8A</i>	15	SNC et SNP	Ataxie
Nav1.7	<i>SCN9A</i>	2	SNP	Troubles de la sensibilité à la douleur
Nav1.8	<i>SCN10A</i>	3	SNP	Syndromes de douleur périphérique
Nav1.9	<i>SCN11A</i>	3	SNP	Rôle potentiel dans les syndromes hyperalgésiques
Na _x	<i>SCN7A</i>	2	SNC	-

BrS, *Brugada Syndrome* ; LQTS, *Long QT Syndrome* ; SIDS, *Sudden Infant Death Syndrome* ; SNC, *Système Nerveux Central* ; SNP, *Système Nerveux Périphérique* (Adapté d'après Salvio-Galimberti et al., 2012).

Il est à noter que certains canaux Nav de type "neuronaux" ont également été retrouvés dans le cœur (Maltsev et Undrovinas, 2008). C'est notamment le cas du canal Nav1.8, pour lequel des mutations dans le gène *SCN10A* sont associées à des défauts de conduction (Chambers et al., 2010). Un dixième membre de la famille, Na_x, a également été décrit dans le système nerveux central. Il est cependant à différencier des canaux Nav cités

précédemment, que ce soit en termes d'homologie de séquence ou de fonction. Plusieurs études ont en effet montré que ce canal n'est pas sensible au voltage, et qu'il est impliqué dans la détection de la concentration Na^+ , jouant ainsi un rôle dans la régulation de l'homéostasie des fluides à l'échelle de l'organisme (Noda et Hiyama, 2015).

Le canal Nav1.5 est codé par le gène *SCN5A*, localisé sur le bras court du chromosome 3 (3p21) chez l'Homme (Wilde et Brugada, 2011). Il est majoritairement exprimé au sein du myocarde, ainsi que dans le tissu de conduction, et, dans une moindre mesure, au niveau du nœud sino-atrial (à la périphérie) et du nœud auriculo-ventriculaire (Remme et al., 2009). A l'échelle cellulaire, les canaux Nav1.5 sont localisés au niveau des disques intercalaires, des membranes latérales et des tubules T des cardiomyocytes (Shy et al., 2013), et sont principalement concentrés dans la zone du perinexus, à proximité des jonctions communicantes (King et al., 2013). Bien que Nav1.5 soit souvent décrit comme étant le canal spécifique au cœur, il a été montré que *SCN5A* est également exprimé dans d'autres types cellulaires non excitables, comme les cellules musculaires lisses intestinales, les macrophages ou encore certaines cellules cancéreuses (Veerman et al., 2015).

II.2. Structure des canaux Nav1.5

Nav1.5 est une protéine transmembranaire glycosylée, d'un poids moléculaire d'environ 220 kDa (poids moléculaire apparent : 260 kDa), qui constitue la sous-unité canalaire, appelée sous-unité α , qui forme le pore du canal Nav cardiaque majoritaire et est suffisante pour son expression fonctionnelle (Abriel, 2010). Cependant, Nav1.5 interagit avec de nombreuses protéines partenaires régulatrices, formant ainsi des complexes macromoléculaires (**voir paragraphe III, p20**). La protéine Nav1.5 est composée de quatre domaines homologues (DI à DIV), comportant chacun six segments transmembranaires (S1 à S6), reliés entre eux par des boucles intracellulaires. Les extrémités N- et C-terminales sont cytoplasmiques (**Figure 2**). Les segments S4 sont les senseurs du voltage et sont responsables du changement de conformation et de l'ouverture du canal lors de la dépolarisation de la membrane. Les segments S5 et S6 forment en se repliant le pore du canal, et les boucles reliant les segments S5-S6, appelées boucles P, forment le filtre de sélectivité du canal (Catterall et Zheng, 2015).

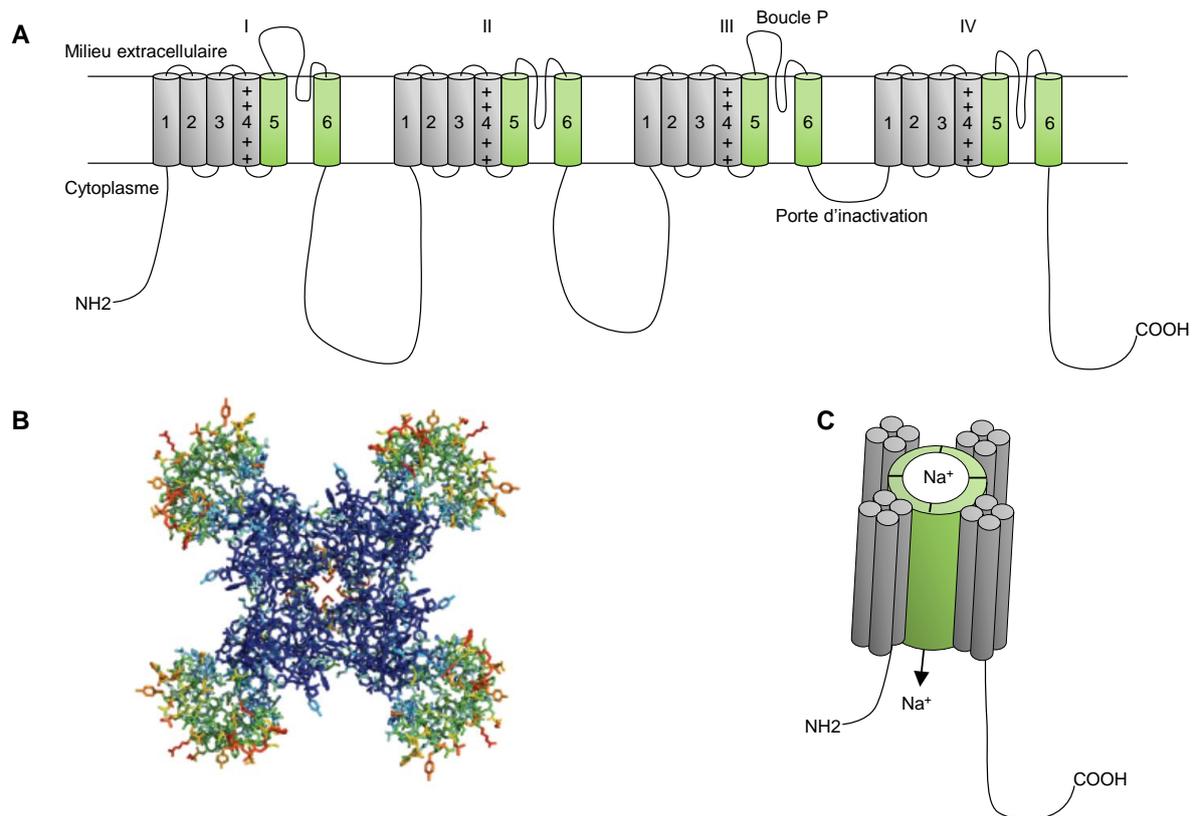


Figure 2. Structure du canal Nav1.5. (A) Représentation schématique de la structure du canal Nav1.5, composé de quatre domaines transmembranaires (DI à DIV) comprenant chacun six segments (S1 à S6) reliés entre eux par des boucles intracellulaires, et deux extrémités N- et C-terminales cytoplasmiques. Les segments S5 et S6 délimitent le pore du canal, et les segments S4, chargés positivement, constituent les senseurs du voltage. Les boucles reliant les segments S5-S6 (boucles P) forment le filtre de sélectivité et la boucle DIII-DIV constitue la porte d'inactivation. **(B)** Structure cristallographique du canal bactérien NavAb vu de dessus (Payandeh et al., 2011). **(C)** Représentation schématique de la structure tridimensionnelle de Nav1.5.

De nombreuses informations sur la fonction et l'organisation tridimensionnelle des canaux Nav eucaryotes ont pu être déduites par analogie avec les autres familles de canaux dépendants du voltage et par l'analyse cristallographique des canaux Nav bactériens. En particulier, l'analyse structurale du canal NavAb, extrait d'*Acrobacter butzleri*, a permis de montrer que les canaux Nav bactériens sont des homotétramères dans lesquels quatre sous-unités Nav de six segments transmembranaires s'organisent de façon symétrique pour former un pore central, autour duquel s'organisent les modules senseurs du voltage (Payandeh et al., 2011) (**Figure 2B**). Par homologie avec les canaux procaryotes, l'étude de la séquence des canaux Nav eucaryotes a permis de déterminer leur structure tridimensionnelle, dans laquelle les quatre domaines homologues se replient autour du pore central, de façon similaire à la

configuration prise par les quatre sous-unités NavAb. Les études cristallographiques des canaux Nav bactériens ont également permis d'obtenir de nombreuses informations sur leurs mécanismes d'activation et d'inactivation.

II.3. Activation des canaux Nav1.5

L'activation des canaux ioniques dépendants du voltage correspond au passage du canal de l'état fermé à l'état ouvert en réponse à une dépolarisation de la membrane plasmique, et se traduit par un flux d'ions au travers du pore (**Figure 3A**). Etant donné le gradient électrochimique existant de part et d'autre de la membrane des cardiomyocytes, le flux d'ions passant au travers des canaux Nav1.5 dans la gamme de potentiels transmembranaires physiologiques est un flux entrant de Na^+ , qui génère une accumulation de charges positives à l'intérieur de la cellule et donc une dépolarisation de la membrane plasmique. L'étude moléculaire des mécanismes d'activation des canaux Nav a clairement démontré le rôle du segment S4 de chaque domaine dans le processus d'activation. Le segment S4 des canaux Nav contient quatre à sept répétitions d'un motif composé d'un acide aminé chargé positivement (le plus souvent une arginine), suivi de deux acides aminés hydrophobes, rendant ainsi le segment S4 riche en charges positives (Noda et al., 1984). Un modèle d'activation appelé "*sliding-helix*", expliquant le rôle de ce segment S4 dans le processus d'activation, a été décrit par Catterall en 1986 (**Figure 3B**). Celui-ci propose qu'à l'état de repos les charges positives du segment S4 interagissent avec les charges négatives des segments S1-S3 voisins, et sont tirées vers l'intérieur de la cellule par la force électrostatique liée au potentiel membranaire négatif existant au repos, maintenant ainsi le canal à l'état fermé (Catterall, 1986, 2010). Lors d'une dépolarisation de la membrane plasmique, les forces électrostatiques retenant le segment S4 sont diminuées, et celui-ci est alors poussé vers l'extérieur de la cellule selon un mouvement hélicoïdal, les résidus positifs du S4 formant alors à nouveau une paire avec les résidus négatifs avoisinants. Ce mouvement du S4 vers le milieu extracellulaire induit un changement conformationnel du canal, en tirant sur la boucle reliant les segments S4-S5, ce qui déplace le segment S6 et permet ainsi l'ouverture du pore du canal. Cette activation se traduit par la génération du courant Na^+ entrant I_{Na} responsable de la phase de dépolarisation du potentiel d'action cardiaque.

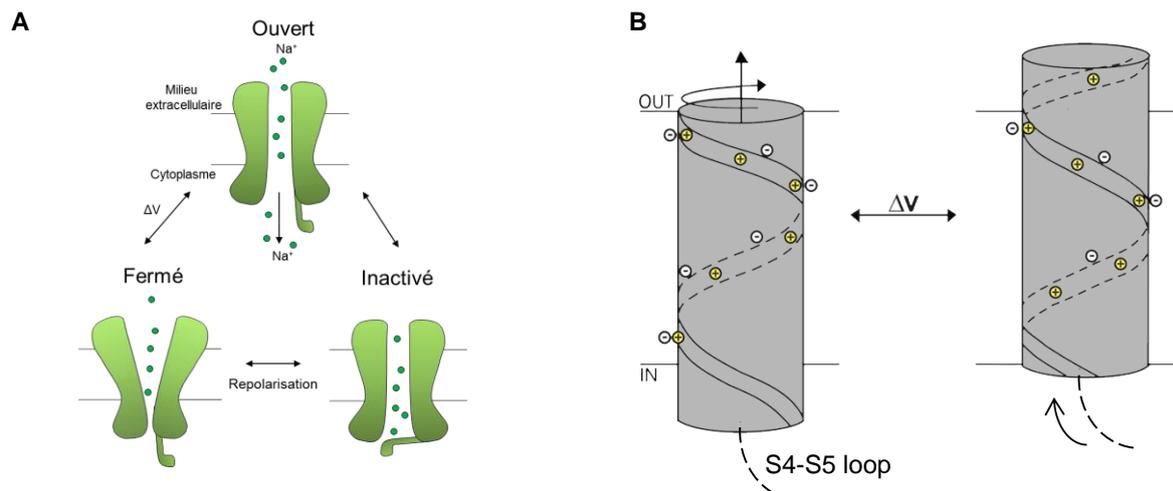


Figure 3. Représentation schématique du fonctionnement des canaux Nav1.5. (A) Représentation schématique des états des canaux Nav1.5 : ouvert, inactivé et fermé. (B) Illustration du mouvement du S4 lors de l'activation des canaux Nav selon le modèle de "Sliding-helix" proposé par Catterall. Les charges positives du S4 sont représentées en jaune. (Modifié d'après Catterall, 2010).

II.4. Inactivation des canaux Nav1.5

L'inactivation correspond quant à elle à la transition du canal d'un état ouvert à un état inactivé non conducteur pendant une dépolarisation de la membrane plasmique. Le mécanisme d'inactivation des canaux Nav, également dépendant du voltage, est constitué de plusieurs composantes présentant des cinétiques différentes (Catterall et Zheng, 2015; Kambouris et al., 1998; Savio-Galimberti et al., 2012). On distingue ainsi l'inactivation rapide, qui a lieu en quelques millisecondes, l'inactivation intermédiaire, se développant sur plusieurs dizaines de millisecondes, et les inactivations lente et ultra-lente, dont les cinétiques sont respectivement de l'ordre de la centaine de millisecondes et de la seconde.

L'inactivation rapide est celle pour laquelle le mécanisme moléculaire est le mieux compris à l'heure actuelle. Elle est associée au mouvement du segment S4 lors de l'activation et est initiée au cours de celle-ci (Goldfarb, 2012). Elle se met en place très rapidement, en une à deux millisecondes, et se lève en quelques millisecondes lors de la repolarisation de la membrane plasmique. Des études ont montré qu'elle est due à la boucle intracellulaire reliant les domaines DIII et DIV (boucle DIII-DIV), appelée porte d'inactivation, qui vient bloquer physiquement le pore du canal par sa face interne après qu'il ait été activé (Vassilev et al.,

1988) (**Figure 4A**). Des approches de mutagenèse dirigée dans la boucle DIII-IV ont montré le rôle essentiel du motif IFM (Isoleucine Phénylalanine Méthionine) et de la thréonine (T) adjacente dans ce mécanisme, via une interaction avec des résidus présents dans les boucles reliant les segments S4-S5 des domaines DIII et DIV (Goldin, 2003).

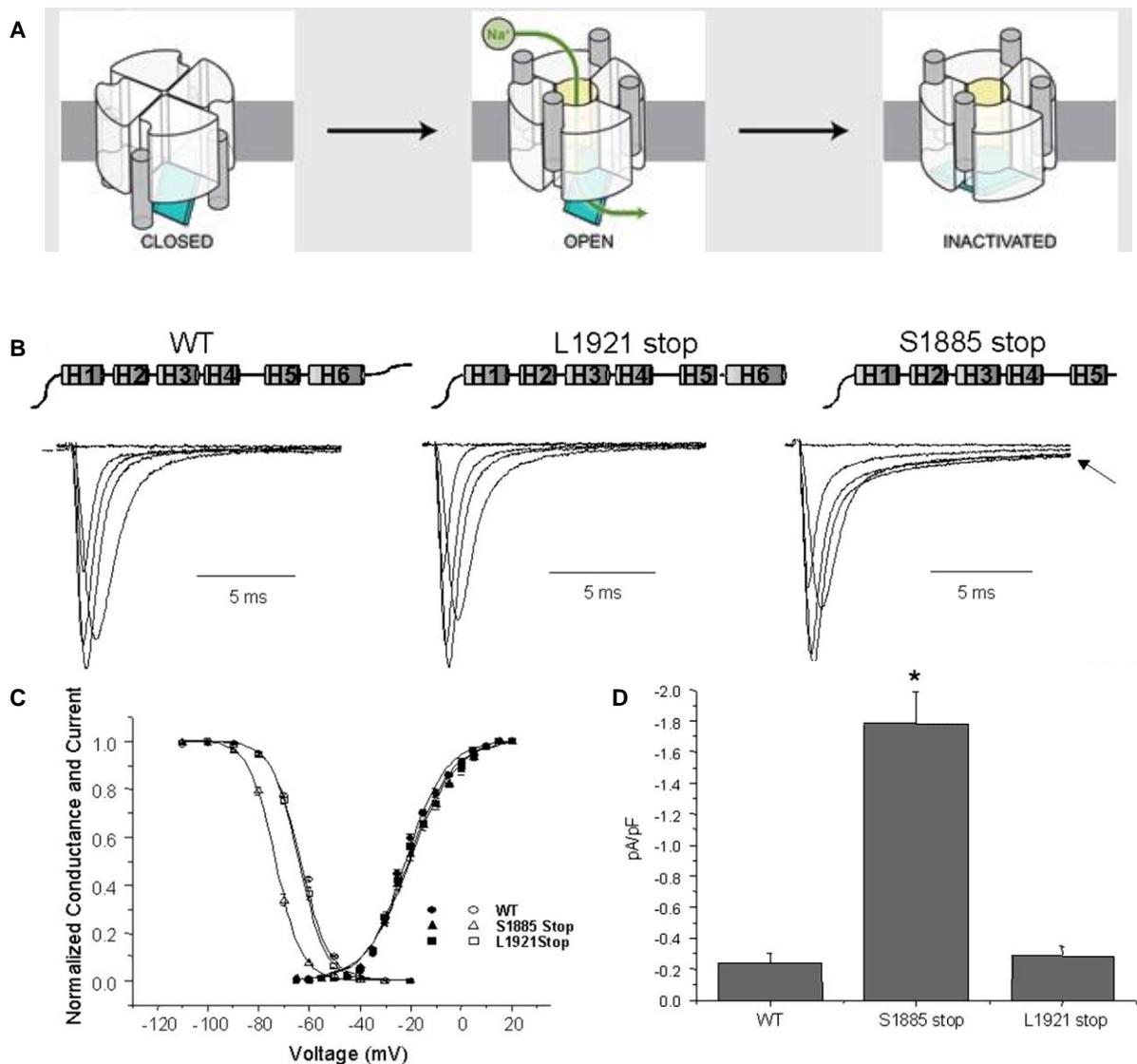


Figure 4. Rôle de l'extrémité C-terminale des canaux Nav1.5 dans la régulation de leur inactivation. (A) Schéma représentatif du modèle "d'inactivation couplée" dans lequel l'ouverture du canal après le mouvement du S4 rend accessible le site de liaison de la porte d'inactivation (représentée en bleu) qui vient obstruer la face interne du pore du canal (Ahern et al., 2016). Influence de la troncature de l'extrémité C-terminale du canal Nav1.5 après l'acide aminé 1921 (L1921 Stop) ou 1885 (S1885 Stop) sur (B) les courants I_{Na} en réponse à des potentiels de -60, -25, -10, 0 et +20 mV, (C) les courbes d'activation et d'inactivation et (D) le courant I_{NaL} (Cormier et al., 2002).

Plusieurs études ont également mis en évidence l'implication de l'extrémité C-terminale des canaux Nav dans la régulation de leur inactivation rapide (Cormier et al., 2002; Deschenes et al., 2001; Motoike et al., 2004). Les travaux de Motoike et ses collaborateurs ont notamment permis de montrer que l'extrémité C-terminale des canaux Nav interagit avec la boucle DIII-DIV et stabilise l'inactivation des canaux, empêchant ainsi leur réouverture. Ceci est cohérent avec les travaux de Cormier et ses collaborateurs qui ont montré que la délétion de la sixième hélice α l'extrémité C-terminale de Nav1.5 (tronqué après la sérine 1885) retarde l'inactivation (Cormier et al., 2002) (**Figure 4**). Les travaux du groupe de Walter Chazin ont confirmé cette interaction entre l'extrémité C-terminale et la boucle DIII-DIV et suggèrent de plus que la Calmoduline (CaM) y contribue (Potet et al., 2009) (**voir paragraphe III.1, p21**). La mise en évidence du rôle de cette interaction dans la régulation de Nav1.5 est cohérente avec le fait que des mutations dans la boucle DIII-DIV et dans l'extrémité C-terminale, identifiées notamment dans le LQTS de type 3, induisent des défauts d'inactivation des canaux Nav1.5 (Amin et al., 2010; Cormier et al., 2002; Glaaser et al., 2006; Goldin, 2003).

Les mécanismes à l'origine des inactivations intermédiaire, lente et ultra-lente sont eux moins bien caractérisés. Il a cependant été montré que l'inactivation lente n'est pas liée au mécanisme d'activation, et ne fait pas intervenir la boucle DIII-DIV, mais serait plutôt due à un changement conformationnel du pore et d'autres résidus du canal. Toutefois, le mécanisme moléculaire permettant d'empêcher le flux d'ions au travers du pore n'a pas encore été identifié (Goldin, 2003). L'inactivation ultra-lente semble quant à elle faire intervenir certains résidus présents dans la boucle P du domaine IV et être inhibée par l'interaction de la boucle DIII-DIV, suggérant qu'il existe des interactions entre les différents modes d'inactivation.

II.5. Le courant sodique persistant I_{NaL}

Comme nous l'avons vu précédemment, les canaux Nav1.5 génèrent le courant I_{Na} transitoire responsable de la phase de dépolarisation du PA. Une très grande majorité des canaux Nav1.5 s'inactivent rapidement suite à cette activation, et ne pourront être réactivés qu'après une repolarisation de la membrane plasmique permettant la levée d'inactivation et le retour du canal à l'état fermé (Wilde et Brugada, 2011). Cependant, une petite proportion de ces canaux (environ 0,5%) peuvent rester ouverts ou se ré-ouvrir lors des phases 2 et 3 du PA, donnant naissance au courant Na^+ persistant ou I_{NaL} , qui perdure pendant les phases de

plateau et de repolarisation du PA. Avant de détailler le rôle de ce courant I_{NaL} , il est nécessaire de préciser qu'il existe une disparité de terminologie pour faire référence à celui-ci, ce qui peut porter à confusion. En effet, toutes les études s'accordent pour dire qu'il existe deux grands mécanismes pouvant générer un courant Na^+ entrant lors de la phase de plateau du PA, mais les termes utilisés pour les désigner diffèrent (Makielski, 2015; Maltsev et Undrovinas, 2008; Zaza et Rocchetti, 2013). Le premier mécanisme induisant l'entrée de Na^+ pendant la phase de plateau est associé au courant de fenêtre ou "*window current*". Ce courant est généré dans une gamme de potentiels dans laquelle l'activation des canaux Nav1.5 est possible et l'inactivation est incomplète, et qui correspond graphiquement à l'intervalle de potentiels pour lequel les courbes d'activation et d'inactivation se chevauchent (Zaza et Rocchetti, 2013) (**Figure 5**). Ainsi, si le potentiel transmembranaire atteint cette fenêtre lors de la repolarisation, une fraction des canaux Nav1.5 peut se lever d'inactivation et se réactiver pour générer un courant I_{Na} . Physiologiquement, ce courant de fenêtre peut exister pour les canaux Cav (de -10 mV à -40 mV environ), mais il est moins probable pour les canaux Nav, car la gamme de potentiels (aux alentours de -60 mV) dans laquelle il peut être généré est réduite et éloignée du potentiel membranaire existant lors de la phase de plateau du PA (environ 0 mV). Cependant, certaines mutations dans Nav1.5 peuvent augmenter ce courant de fenêtre, qui peut alors contribuer de façon importante à la phase de plateau du PA (Zaza et Rocchetti, 2013). Le deuxième mécanisme générant un courant Na^+ entrant lors de la phase de plateau est associé à un ralentissement ou un échec de l'inactivation, qui se traduit par une réouverture des canaux Nav1.5 selon les mécanismes de "*bursts*" ou de "*Late Scattered Opening*" (Maltsev et Undrovinas, 2008). Ce courant est appelé courant retardé (*late*, I_{NaL}) ou persistant (*sustained*) selon les études (Wilde et Brugada, 2011; Zaza et al., 2008). Dans la suite de ce manuscrit nous utiliserons le terme I_{NaL} pour désigner le courant Na^+ existant pendant la phase de plateau du PA, par opposition au courant I_{Na} transitoire, sans présupposer du mécanisme qui en est à l'origine.

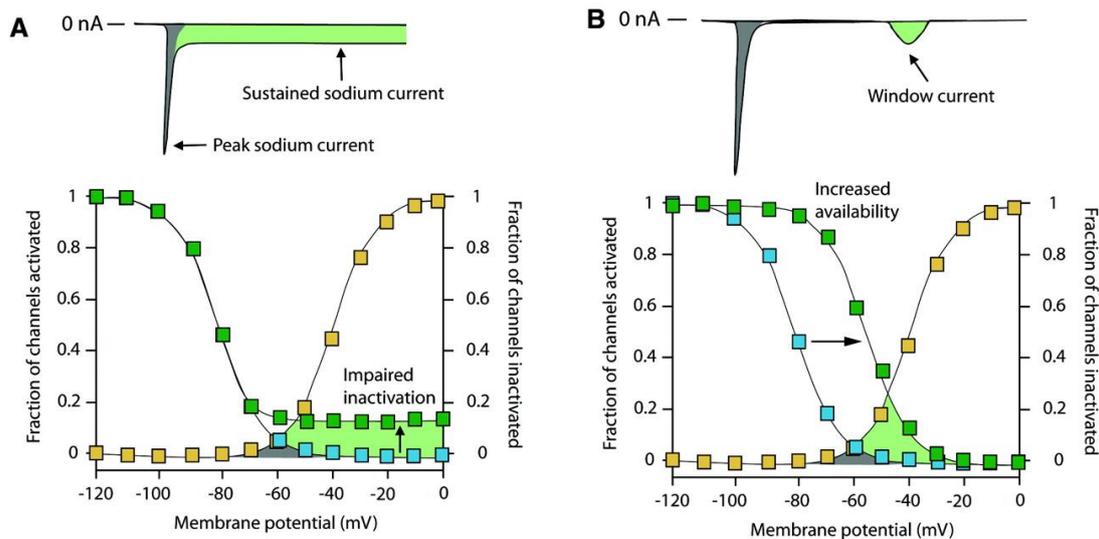


Figure 5. Illustration des mécanismes à l'origine du courant I_{NaL} . Représentation graphique des effets (A) d'un défaut d'inactivation des canaux Nav1.5 sur le courant persistant et (B) d'une augmentation de la disponibilité sur le courant de fenêtre, correspondant à l'intersection des courbes d'activation et d'inactivation (grisé) (Wilde et Brugada, 2011).

Des controverses existent sur l'identité moléculaire du canal responsable de ce courant I_{NaL} dans le cœur, et certaines études ont suggéré qu'il pourrait être dû à l'expression de canaux Nav neuronaux, notamment dans des contextes pathologiques comme l'insuffisance cardiaque (Maltsev et Undrovinas, 2008; Mishra et al., 2015; Yang et al., 2012). En effet, bien que le canal Nav1.5 soit le principal canal Nav exprimé dans le cœur, des expériences de PCR quantitative ou d'immunocytochimie ont également révélé la présence des canaux neuronaux Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3 et Nav1.6 dans le cœur de nombreuses espèces, posant la question de leur implication dans la génération du courant I_{NaL} (Banyasz et al., 2015; Maltsev et Undrovinas, 2008). Ainsi, certaines études ont montré que les canaux Nav neuronaux sont à l'origine d'environ 40% du courant I_{NaL} dans des cardiomyocytes ventriculaires de chien (Biet et al., 2012), de souris ou de lapin (Yang et al., 2012). Cependant, plusieurs évidences basées sur l'application de concentrations μM de tétródotoxine (TTX) et sur des approches d'extinction de gène suggèrent que le courant I_{NaL} est porté, du moins en partie, par le canal Nav1.5 (Maltsev et al., 2008a; Maltsev et al., 2009). Cet argument est renforcé par le fait que de nombreuses mutations dans le gène *SCN5A* codant pour Nav1.5 sont associées à une augmentation du courant I_{NaL} dans le contexte du LQTS de type 3 (Remme et Wilde, 2014).

Bien que de faible amplitude par rapport au courant I_{Na} transitoire (environ 0,1%), ce courant I_{NaL} joue un rôle majeur dans la régulation de l'excitabilité cardiaque (Maltsev et Undrovinas, 2006). Des études ont en effet montré que la quantité de Na^+ entrant dans la cellule par I_{NaL} lors du PA est équivalente à celle entrant via le courant transitoire I_{Na} , ce qui s'explique par le fait que le courant I_{NaL} perdure pendant plusieurs centaines de ms (Makielski et Farley, 2006). Le courant I_{NaL} est donc déterminant dans la régulation de la forme, de la durée et de la période réfractaire du PA cardiaque, ainsi que dans la régulation de l'homéostasie Na^+ . Le courant I_{NaL} est particulièrement important dans le contexte de pathologies cardiaques héréditaires ou acquises dans lesquelles une augmentation du courant I_{NaL} contribue à la survenue d'arythmies cardiaques. Ainsi, de nombreuses mutations dans le gène *SCN5A* associées au LQTS de type 3 ont été décrites pour induire une augmentation du courant I_{NaL} , conduisant à un défaut de la repolarisation et à un allongement de la durée du PA, qui se reflète sur l'électrocardiogramme par un allongement de l'intervalle QT (Makielski, 2015). Ce phénotype a également été mis en évidence dans les LQTS de types 9, 10 et 12, associés à des mutations dans les gènes codant respectivement pour la Cavéoline 3, la sous-unité $Nav\beta 4$ et la Syntrophine $\alpha 1$, trois protéines régulatrices des canaux $Nav1.5$. L'augmentation du courant I_{NaL} est également observée dans des pathologies cardiaques acquises, en particulier l'insuffisance cardiaque (**Voir paragraphe V, p44**).

Quel que soit le contexte physiopathologique, il a été montré que l'augmentation du courant I_{NaL} conduit à une prolongation du PA, et augmente la probabilité de développer des post-dépolarisations précoces (ou *Early After Depolarization*, EAD) pouvant conduire à la formation de torsades de pointes (**Figure 6**). Cette augmentation du courant I_{NaL} induit également une augmentation de l'influx Na^+ dans la cellule, ce qui va déstabiliser l'homéostasie Na^+/Ca^{2+} . En effet, les concentrations Na^+ et Ca^{2+} sont étroitement liées via l'échangeur Na^+/Ca^{2+} (NCX), qui constitue le mécanisme principal d'extrusion du Ca^{2+} de la cellule, en permettant la sortie d'un ion Ca^{2+} en échange de l'entrée de trois ions Na^+ dans des conditions normales (Zaza et al., 2008). Une augmentation de la concentration Na^+ intracellulaire suite à une augmentation d' I_{NaL} peut aboutir à une diminution de l'extrusion du Ca^{2+} via NCX, du fait d'une diminution du gradient électrochimique, voire même au fonctionnement de NCX en mode inverse, c'est-à-dire une extrusion de Na^+ et une entrée de Ca^{2+} . Ces deux phénomènes vont induire une augmentation de la concentration Ca^{2+} .

cytoplasmique, ainsi qu'une surcharge Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique, ce qui va favoriser la formation de post-dépolarisations retardées (ou *Delayed After Depolarizations*, DAD). L'augmentation du courant I_{NaL} peut également aboutir à la formation de réentrées, en augmentant la durée de repolarisation, créant ainsi des blocs de conduction. Enfin, plusieurs études ont montré que l'amplitude du courant I_{NaL} n'est pas la même dans toutes les régions du cœur, et une augmentation de ce courant peut donc contribuer à augmenter cette hétérogénéité, ce qui va favoriser la dispersion de la repolarisation et le développement des troubles du rythme cardiaque (Qi et al., 2015; Zaza et Rocchetti, 2013).

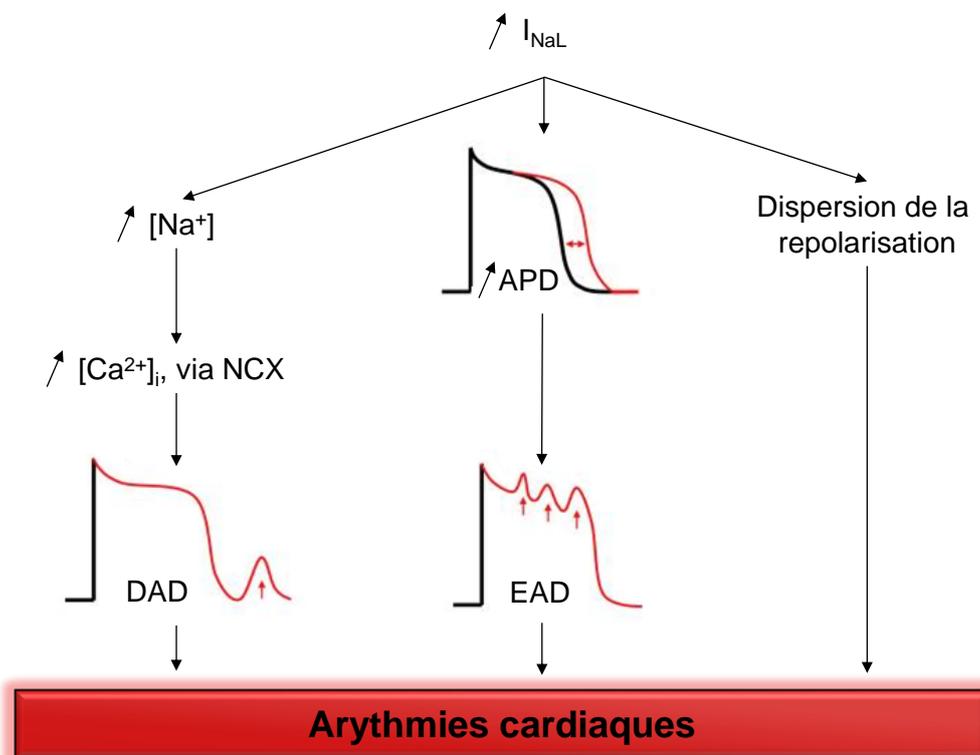


Figure 6. Effets d'une augmentation du courant I_{NaL} sur l'excitabilité cardiaque. Une augmentation du courant I_{NaL} se traduit par (1) une augmentation de la durée du potentiel d'action, qui favorise la survenue de post-dépolarisations précoces (EAD), (2) une augmentation de $[\text{Na}^+]_i$ et donc une augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, favorisant la survenue de post-dépolarisations retardées (DAD), et (3) une dispersion de la repolarisation dans les différentes régions du cœur. Ces trois effets participent au développement d'arythmies cardiaques. APD, *Action Potential Duration* ; $[\text{Ca}^{2+}]_i$, concentration Ca^{2+} intracellulaire ; DAD, *Delayed Afterdepolarization* ; EAD, *Early Afterdepolarization* ; $[\text{Na}^+]_i$, Concentration Na^+ intracellulaire ; NCX, Echangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Adapté d'après Sossalla et Maier, 2012).

III. Régulation des canaux Nav1.5 par les protéines partenaires

Les canaux Nav1.5 interagissent avec de nombreuses protéines, directement ou indirectement, formant ainsi avec elles un complexe macromoléculaire (**Figure 7**). Il serait d'ailleurs plus juste de dire que les canaux Nav1.5 forment avec leurs protéines partenaires des complexes macromoléculaires, puisqu'il a été montré qu'il existe plusieurs *pools* de complexes canaux Nav1.5 dans les cardiomyocytes, composés de différentes protéines (Shy et al., 2013). Les travaux du groupe d'Hugues Abriel ont ainsi montré que la composition des complexes canaux Nav1.5 est différente en fonction de leur localisation subcellulaire. En particulier, Nav1.5 interagit avec le complexe syntrophine/dystrophine au niveau des membranes latérales des cardiomyocytes, alors qu'au niveau des disques intercalaires il interagit avec SAP97 (Petitprez et al., 2011). On comprend alors que l'interaction des canaux Nav1.5 avec leurs protéines partenaires peut réguler non seulement leur fonction, mais également leur localisation subcellulaire. Ainsi, ces protéines régulatrices peuvent être classées en (1) protéines adaptatrices/d'ancrage, (2) protéines modifiant les propriétés biophysiques du canal par des modifications post-traductionnelles, et (3) protéines qui modulent les propriétés biophysiques du canal par leur liaison (Abriel, 2010; Shy et al., 2013).

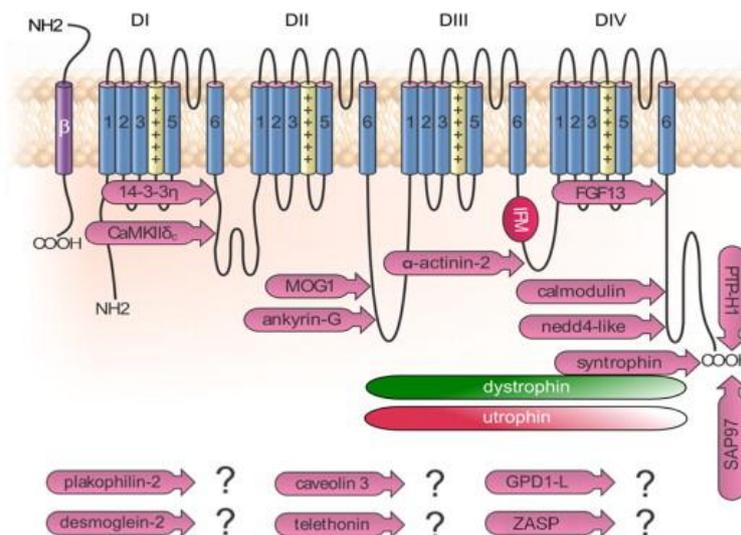


Figure 7. Représentation schématique du complexe canalaire Nav1.5. Les protéines partenaires décrites pour réguler et interagir avec le canal Nav1.5 sont représentées schématiquement au niveau de leur site d'interaction avec le canal. Pour les six protéines annotées d'un point d'interrogation sous le schéma, le site d'interaction avec le canal n'a pas encore été identifié (Shy et al., 2013).

Parmi ces protéines partenaires, on trouve les sous-unités Nav β 1 à Nav β 4, codées par les gènes *SCN1B* à *SCN4B*, qui sont des protéines à un domaine transmembranaire pouvant s'associer au canal Nav1.5 pour en moduler l'expression à la surface cellulaire et les propriétés biophysiques (Savio-Galimberti et al., 2012; Shy et al., 2013). Outre les sous-unités Nav β , une vingtaine de protéines partenaires des canaux Nav1.5 ont été identifiées à ce jour par des études d'interaction ou de protéomique. L'intérêt porté aux protéines régulatrices des canaux Nav1.5 et à leurs rôles dans la régulation de ces canaux est largement renforcé par le fait que plusieurs mutations dans les gènes codant pour ces protéines ont été identifiées dans le contexte de pathologies cardiaques héréditaires comme le LQTS ou le BrS (Abriel, 2010). Le rôle de chacune de ces protéines a été décrit de façon détaillée dans plusieurs revues de qualité (Abriel, 2010; Savio-Galimberti et al., 2012; Shy et al., 2013), et les effets principaux de ces protéines sur les canaux Nav1.5 sont récapitulés dans le **Tableau II**. Dans les paragraphes suivants nous détaillerons le rôle de deux protéines sur lesquelles nous avons focalisé notre attention : la Calmoduline (CaM) et le *Fibroblast Growth Factor 13* (FGF13).

III.1. Régulation des canaux Nav1.5 par le Ca²⁺ et la Calmoduline

L'existence, la nature et les mécanismes présumés de régulation des canaux Nav par le Ca²⁺ et la Calmoduline (CaM) est un des sujets les plus débattus lorsque l'on s'intéresse à la régulation des canaux Nav1.5. En effet, le Ca²⁺ et la CaM sont étroitement liés, et de nombreuses études ont cherché à déterminer les rôles respectifs de ces deux acteurs dans la régulation des canaux Nav1.5 (Ben-Johny et al., 2014) (**Tableau III**). Le Ca²⁺ est un second messenger universel impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires, telles que l'organisation du cytosquelette, la mitose, la transcription de gènes ou encore la prolifération cellulaire (Bahler et Rhoads, 2002; Bootman et al., 2001; Dominguez-Rodriguez et al., 2012). Le rôle du Ca²⁺ est peut-être encore plus important dans le cœur que dans n'importe quel autre organe, puisqu'il y est impliqué dans l'initiation de l'activité *pacemaker*, dans la phase de plateau du PA, le couplage excitation-contraction via le mécanisme de "*calcium-induced calcium release*" et dans la contraction en elle-même. Certaines des fonctions exercées par le Ca²⁺ sont directes, mais d'autres se font via l'activation de la CaM, une petite protéine

ubiquitaire composée de quatre domaines *EF-hand* liant le Ca^{2+} , formant deux lobes N- et C-terminaux reliés par une hélice α flexible (Saimi et Kung, 2002).

Tableau II : Protéines partenaires des canaux Nav1.5

Protéine	Principaux effets décrits sur Nav1.5	Mutations associées	Site d'interaction
14-3-3 η	Décale la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs et ralentit la levée d'inactivation	-	Boucle DI-II
α -actinine 2	Adressage à la membrane plasmique	-	Boucle DIII-IV
Ankyrine G	Adressage à la membrane plasmique	-	Boucle DII-III
Calmoduline	Confère à Nav1.5 sa sensibilité au Ca^{2+} et régule l'inactivation	-	Motifs EF-hand et IQ de l'extrémité C-ter et boucle DIII-IV
CaMKII	Phosphorylation du canal, décale la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs, ralentit la levée d'inactivation et augmente I_{NaL}	-	Boucle DI-II, via la Spectrine β IV
Cavéoline 3	Mutant LQTS de type 9 : augmente I_{NaL}	LQTS et SIDS	Non déterminé
Desmoglénine 2	Mutant Desmoglénine (ARVC) : diminue I_{Na} et ralentit la conduction cardiaque	ARVC	Non déterminé
FGF12/FGF13	Adressage à la membrane cellulaire Décale la courbe d'inactivation vers des potentiels moins négatifs	BrS, LQTS	C-ter
GPD1-L	Mutant BrS type 2 : diminue I_{Na}	BrS	Non déterminé
Nav β 1- β 4	Régule l'adressage à la surface cellulaire et les propriétés biophysiques	BrS, CCD, fibrillation atriale	Nav β 1 : boucle S5-S6 des DI et DIV
MOG1	Augmente l'expression à la surface cellulaire et I_{Na}	Suggéré dans BrS	Boucle DII-III
Nedd4-like E3 ubiquitin ligases	Diminue l'expression à la surface cellulaire par ubiquitinylation et internalisation	-	Motif PY du C-ter
Plakophiline 2	Extinction par siRNA : diminue I_{Na} , décale la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs et ralentit la levée d'inactivation	ARVC	Non déterminé
PTPH1	Phosphorylation du canal, décale de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs	-	Motif liant les protéines à domaine PDZ, C-ter
SAP97	Adressage à la membrane plasmique	-	Motif liant les protéines à domaine PDZ, C-ter
Syntrophine α 1	Permet l'interaction avec la dystrophine et l'adressage au niveau des membranes latérales	LQTS	Motif liant les protéines à domaine PDZ, C-ter
Téléthonine	Régule la dépendance au voltage de l'activation	-	Non déterminé
ZASP	Mutation (modèle de cardiomyopathie) décale la courbe d'activation vers des potentiels moins négatifs	Cardiomyopathie	Non déterminé

ARVC, *Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy* ; BrS, *Brugada Syndrome* ; CCD, *Cardiac conduction Disease*; C-ter, extrémité C-terminale ; FGF12/13, *Fibroblast Growth Factor 12/13* ; GPD1-L, *Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase 1 Like protein* ; LQTS, *Long QT Syndrome* ; MOG1, *Multicopy suppressor Of Gsp1* ; PTPH1, *Protein Tyrosine Phosphatase H1* ; SAP97, *Synapse Associated Protein 97* ; SIDS, *Sudden Infant Death Syndrome* ; ZASP, *Z band Alternately Sliced PDZ-containing Protein* (Adapté d'après Shy et al., 2013).

La CaM agit comme un senseur de la concentration Ca^{2+} permettant de traduire des signaux Ca^{2+} en réponse cellulaire, via son interaction avec de nombreuses protéines effectrices (Nelson et Chazin, 1998). Elle existe sous une forme libre de Ca^{2+} , appelée Apo-CaM, et sous une forme liée au Ca^{2+} , appelée Ca^{2+} /CaM ou holo-CaM. Bien que de nombreuses protéines cibles de la CaM soient dépendantes de la forme Ca^{2+} /CaM, certaines sont régulées par l'Apo-CaM (Bahler et Rhoads, 2002). L'implication de la CaM dans la régulation des canaux Nav1.5 a été suggérée après qu'une approche de double hybride ait révélé l'existence d'une interaction de celle-ci avec l'extrémité C-terminale du canal Nav1.2 de rat (Mori et al., 2000). Dans leurs travaux, Mori et ses collaborateurs ont montré que les canaux Nav1.2 peuvent lier les deux formes de CaM via deux motifs différents, le motif Baa (*Basic amphiphilic alpha-helix*) et le motif IQ (Isoleucine Glutamine), ce qui suggère que le site de liaison de l'ApoCaM et celui de la Ca^{2+} /CaM au canal sont différents. Ces travaux, et le fait que les canaux Nav1.5 présentent dans leur extrémité C-terminale un motif IQ, site de liaison de la CaM conservé entre tous les canaux Nav, et présent dans les canaux Cav, ont donc amené à considérer que la CaM pourrait réguler les canaux Nav, de la même façon qu'elle régule les canaux Cav de type L (Peterson et al., 1999).

En 2002, Deschênes et ses collaborateurs ont montré que la CaM régule l'inactivation des canaux Nav1.4, de façon Ca^{2+} -dépendante, mais pas celle de Nav1.5, suggérant ainsi que la régulation par la CaM serait spécifique à chaque canal Nav (Deschenes et al., 2002; Herzog et al., 2003). Cependant, l'interaction de la CaM avec les canaux Nav1.5 a été confirmée par de nombreuses études qui ont permis de montrer que la CaM régule les propriétés d'inactivation des canaux Nav1.5 (Chagot et Chazin, 2011; Kim et al., 2004; Mori et al., 2003; Potet et al., 2009; Sarhan et al., 2009; Shah et al., 2006; Tan et al., 2002). Ces travaux ont notamment révélé que la CaM interagit de façon constitutive avec le motif IQ présent au niveau de l'extrémité C-terminale des canaux Nav1.5, l'affinité de l'Apo-CaM pour le motif IQ étant supérieure à celle de la Ca^{2+} /CaM, et que la liaison du Ca^{2+} à l'Apo-CaM induit un changement conformationnel de celle-ci (Kim et al., 2004; Mori et al., 2003; Shah et al., 2006; Tan et al., 2002; Wang et al., 2014). Il a de plus été montré que la perte d'interaction de la CaM avec le motif IQ (mutant IQ/AA) induit une augmentation du courant I_{NaL} (Kim et al., 2004). Ceci est d'autant plus intéressant que la CaM interagit également avec la boucle DIII-IV, qui constitue la porte d'inactivation du canal Nav1.5 (Kim et al., 2004; Motoike et al., 2004;

Potet et al., 2009; Sarhan et al., 2009; Shah et al., 2006). L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que la CaM pourrait jouer un rôle de pont fonctionnel et/ou moléculaire entre l'extrémité C-terminale et la boucle DIII-IV et ainsi réguler les propriétés d'inactivation des canaux Nav1.5.

La CaM étant un senseur de la concentration Ca^{2+} , plusieurs études ont cherché à déterminer quel était le rôle du Ca^{2+} dans la régulation des canaux Nav1.5. L'analyse de la séquence de l'extrémité C-terminale de Nav1.5 a mis en évidence la présence d'un motif *EF-hand*, environ 120 acides aminés en amont du motif IQ, suggérant que ces canaux pourraient être régulés par la fixation directe du Ca^{2+} au niveau de ce motif (Wingo et al., 2004). Plusieurs études ont ainsi montré que l'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} induit un décalage de la courbe d'inactivation des canaux Nav1.5 vers des potentiels moins négatifs (Biswas et al., 2009; Potet et al., 2009; Sarhan et al., 2009; Shah et al., 2006; Wingo et al., 2004). Etant donné que cet effet persiste en présence d'un peptide inhibiteur de la CaM (peptide 209-309) (Wingo et al., 2004), il a été suggéré que le Ca^{2+} régule directement les canaux Nav1.5, via le domaine *EF-hand*, et ce indépendamment de la CaM. Cette hypothèse est cependant controversée, car bien que certaines études aient mis en évidence une interaction directe du Ca^{2+} avec le motif *EF-hand* (Shah et al., 2006; Wingo et al., 2004), d'autres réfutent l'existence de cette interaction (Kim et al., 2004; Wang et al., 2014) ou n'observent pas d'effet du Ca^{2+} sur les canaux Nav1.5 (Ben-Johny et al., 2014). Shah et ses collaborateurs suggèrent que les discordances observées concernant la liaison directe du Ca^{2+} sur Nav1.5 pourraient être dues à des différences de protocoles expérimentaux, notamment de purification de protéines, et proposent que les résultats obtenus, bien que paraissant pour certains contradictoires, pourraient être combinés au sein d'un même modèle. Ce modèle propose qu'en présence de faibles concentrations intracellulaires de Ca^{2+} , la CaM est liée au motif IQ de Nav1.5 via son lobe C. Lors d'une augmentation de la concentration de Ca^{2+} , celui-ci se lie à la CaM, ce qui induit un changement conformationnel et une diminution de l'affinité de la CaM pour le motif IQ. Ceci va entraîner la dissociation d'un ou deux lobes de la CaM, ce qui pourrait lui permettre d'interagir avec un autre partenaire, possiblement la boucle DIII-IV. En parallèle, le motif IQ pourrait interagir avec le motif *EF-hand*, ce qui augmenterait l'affinité du Ca^{2+} pour ce dernier et pourrait ainsi expliquer le mécanisme de sensibilité au Ca^{2+} des canaux Na1.5 (Shah et al., 2006) (**Figure 8**).

Tableau III : Principaux effets du Ca²⁺ et de la CaM sur les canaux Nav1.5

Publication	Effet du Ca ²⁺ ou de la CaM	Liaison CaM/IQ	Liaison Ca ²⁺ /EF-hand
Deschênes et al, 2000	Pas d'effet du Ca ²⁺ ni de la CaM sur Nav1.5	Oui	Non testée
Tan et al, 2002	La CaM augmente l'inactivation lente, de façon Ca ²⁺ -dépendante.	Oui, dépend de de la [Ca ²⁺]	Non testée
Wingo et al, 2004	L'augmentation de la [Ca ²⁺] décale la courbe d'inactivation vers des potentiels moins négatifs, indépendamment de la CaM.	Oui	Oui
Kim et al, 2004	Interaction entre le C-ter et la boucle DIII-IV, dépendante de la CaM. La mutation IQ/AA induit une perte d'interaction avec la CaM et une augmentation de I _{NaL}	Oui, liaison Apo CaM et Ca ²⁺ /CaM	Non
Shah et al, 2006	L'augmentation de la [Ca ²⁺] décale la courbe d'inactivation vers des potentiels moins négatifs. Implication du motif IQ dans la liaison du Ca ²⁺	Oui, par le lobe C de la CaM	Oui
Biswas et al, 2009	L'augmentation de la [Ca ²⁺] décale la courbe d'inactivation vers des potentiels moins négatifs, indépendamment de la CaM Existence d'une régulation latente par la CaM	Oui. Interaction possible motif IQ/ <i>EF hand</i>	Non testée
Potet et al, 2009	L'augmentation de la [Ca ²⁺] décale la courbe d'inactivation vers des potentiels moins négatifs	Oui, permet l'interaction C-ter/DIII-IV	Non testée
Sahran et al, 2009	Ca ²⁺ nécessaire pour l'interaction entre la CaM et la boucle DIII-IV	Oui, via le lobe C de la CaM	Non testée
Wang et al, 2014	Non étudié, étude de structure	Oui, via lobes C et N de la CaM	Non
Gabelli et al, 2014	Non étudié, étude de structure	Oui	Non
Ben-Johny et al, 2014	Pas d'effet du Ca ²⁺ sur Nav1.5	Non testée	Non testée

[Ca²⁺], concentration de Ca²⁺ ; CaM, Calmoduline ; C-ter, Extrémité C-terminale de Nav1.5 ; DIII-IV, Boucle DIII-IV de Nav1.5.

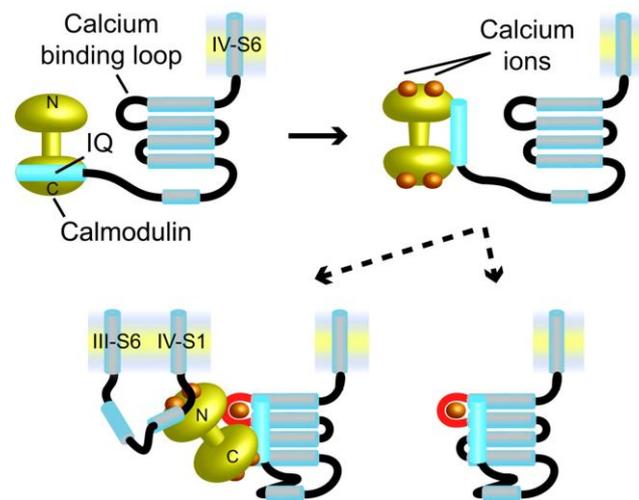


Figure 8. Modèle de l'action du Ca²⁺ et de la CaM sur le canal Nav1.5. En présence de faibles concentrations Ca²⁺, la CaM est liée au motif IQ du canal Nav1.5 via son lobe C. La liaison du Ca²⁺ à la CaM induit un changement conformationnel et diminue l'affinité de la CaM avec le motif IQ. La libération d'un ou deux lobes de la CaM permettrait l'interaction du motif IQ avec le domaine *EF-hand*, augmentant l'affinité du Ca²⁺ pour celui-ci et permettant donc sa liaison. L'un des lobes de la CaM pourrait aussi interagir avec un autre partenaire, potentiellement la boucle DIII-IV (Shah et al., 2006).

Ce modèle est globalement cohérent avec les analyses structurales réalisées ces dernières années qui suggèrent que le Ca²⁺ ne se lie pas directement au motif *EF-hand*, mais qu'il se lie à la CaM, préalablement associée au motif IQ, ce qui induit un changement conformationnel de la CaM et du canal qui serait à l'origine des effets observés sur l'inactivation (Gabelli et al., 2014; Wang et al., 2014). L'ensemble de ces résultats et les désaccords qui les entourent soulignent la complexité du mécanisme de régulation des canaux Nav1.5, et Nav en général, par le Ca²⁺ et la CaM. Cependant, même s'il n'existe pas de consensus à l'heure actuelle au sujet de ces mécanismes, il apparaît de façon claire que ces deux acteurs jouent un rôle important dans la régulation de l'inactivation des canaux Nav1.5. Ainsi, l'ensemble des études s'accordent globalement pour conclure qu'une augmentation de la concentration de Ca²⁺ induit un décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels moins négatifs, même s'il reste encore à déterminer si ceci passe par une interaction directe du Ca²⁺ avec le motif *EF-hand* et/ou par l'intermédiaire de la CaM. Il est également clair que la CaM joue un rôle majeur dans la régulation des propriétés d'inactivation des canaux Nav1.5, et ce potentiellement via le rôle de pont fonctionnel et/ou moléculaire qu'elle semble jouer entre l'extrémité C-terminale et la porte d'inactivation du canal Nav1.5.

III.2. Régulation des canaux Nav1.5 par le FGF13

Le FGF13, qui a été décrit pour interagir avec et réguler les canaux Nav1.5 cardiaques, appartient à la famille des Facteurs Homologues au FGF (FHF, *Fibroblast Growth Factor (FGF) Homologous Factor*), nommés ainsi en raison de leur homologie de séquence avec les FGF conventionnels (Smallwood et al., 1996). La sous-famille des FHF est composée de quatre membres : FGF11 = FHF3, FGF12 = FHF1, FGF13 = FHF2 et FGF14 = FHF4. Chaque gène possède deux sites d'initiation de la transcription ou plus, ce qui, combiné à l'épissage alternatif, aboutit à la production de dix FHF chez l'Homme, qui diffèrent par leurs extrémités N-terminales (Munoz-Sanjuan et al., 2000). Bien que les FHF présentent une forte homologie de séquence avec les FGF au niveau de leur domaine central, ils possèdent des extrémités N- et C-terminales plus étendues que ces derniers. Contrairement aux FGF conventionnels, les FHF ne sont pas sécrétés, du fait de l'absence de peptide signal dans leur séquence, et ne sont pas capables de se lier aux récepteurs aux FGF, ni de les activer (Olsen et al., 2003). L'ensemble de ces critères structuraux et fonctionnels a donc amené à considérer ces protéines comme une sous-famille bien à part des FGF. Ils sont d'ailleurs parfois qualifiés de FGF intracrines ou intracellulaires, du fait de leur non-sécrétion et de leur mode d'action indépendant des récepteurs aux FGF. L'analyse de la distribution tissulaire des transcrits a montré que les FHF sont majoritairement exprimés dans les cellules excitables, en particulier dans le système nerveux, où ils co-localisent avec les canaux Nav au niveau des segments initiaux des axones et des nœuds de Ranvier (Lou et al., 2005; Smallwood et al., 1996). Ils sont également exprimés dans le cœur, où l'isoforme FGF13-2 est majoritaire dans le ventricule chez la souris (Wang et al., 2011a).

La fonction des FHF est restée méconnue jusqu'à ce que plusieurs études montrent que ces protéines interagissent avec l'extrémité C-terminale des canaux Nav. En effet, en 2001, une approche de double-hybride visant à découvrir de nouvelles protéines partenaires du canal neuronal Nav1.9 a permis d'identifier le FGF12 comme partenaire potentiel, suggérant pour la première fois que les FHF sont des protéines régulatrices des canaux Nav (Liu et al., 2001). Le même groupe a ensuite montré par des approches similaires que le FGF12 interagit avec Nav1.5 via son extrémité C-terminale et induit un décalage de la dépendance au voltage de l'inactivation vers des potentiels plus négatifs, suggérant un rôle de ces protéines dans le contrôle de l'excitabilité cardiaque (Liu et al., 2003). Un intérêt particulier a

été porté pour déterminer le rôle des FHF dans la régulation des canaux Nav après que des mutations dans le gène *FGF14*, exprimé majoritairement dans le système nerveux central, aient été retrouvées chez des patients atteints d'ataxie spinocérébelleuse et de défauts cognitifs (Dalski et al., 2005; van Swieten et al., 2003). L'étude du mutant *FGF14-F145S* a ainsi montré que celui-ci induit une diminution du courant I_{Na} et une diminution d'expression des canaux Nav au niveau des segments initiaux des axones, confirmant l'implication des FHF dans la régulation des canaux Nav neuronaux (Laezza et al., 2007).

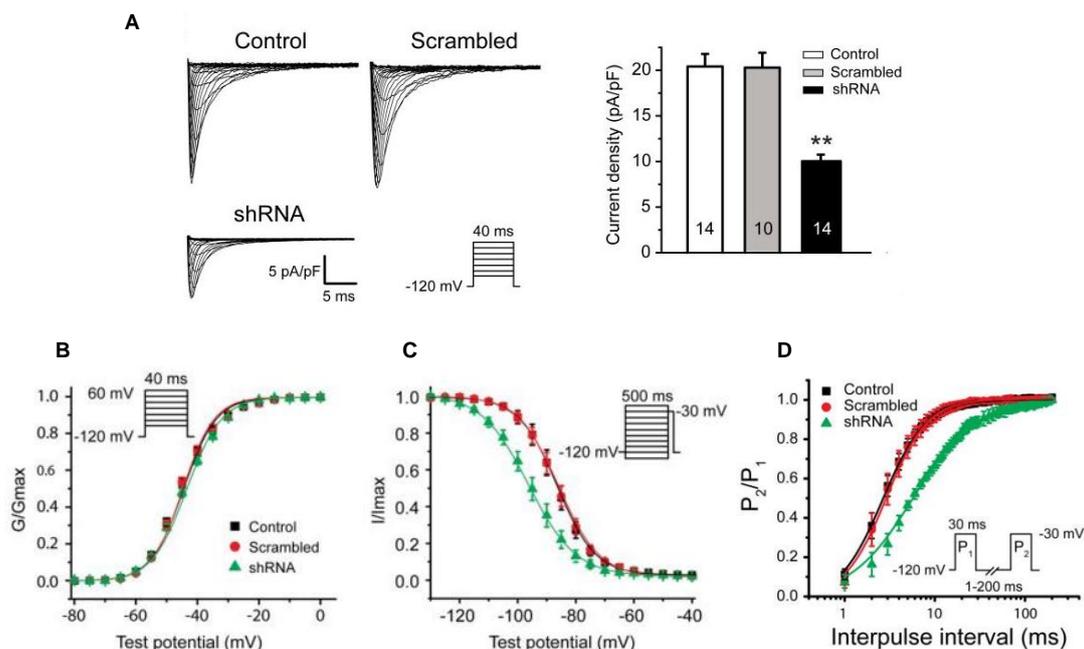


Figure 9. Effets de l'extinction de FGF13 sur les propriétés des canaux Nav1.5 cardiaques. (A) Traces représentatives et quantification de la densité de courant I_{Na} , et (B) courbes d'activation, (C) d'inactivation et (D) de levée d'inactivation des canaux Nav1.5 dans des cardiomyocytes de souris adultes en culture contrôles, ou infectés avec des adénovirus contenant un shRNA contrôle (scrambled) ou dirigé contre FGF13 (shRNA) (Wang et al., 2011a).

Plusieurs travaux ont alors cherché à déterminer le rôle des FHF dans la régulation des canaux Nav1.5, et ont permis de montrer que les FHF interagissent avec l'extrémité C-terminale des canaux Nav1.5, régulant à la fois leur expression à la surface cellulaire mais aussi leurs propriétés d'inactivation (Goetz et al., 2009; Liu et al., 2003; Wang et al., 2012; Wang et al., 2011a; Wang et al., 2011b). En particulier, l'extinction du gène *FGF13* chez la souris induit une diminution de la densité de courant I_{Na} , qui s'explique notamment par une diminution

d'expression des canaux Nav1.5 à la surface cellulaire (Wang et al., 2011a) (**Figure 9**). L'extinction de FGF13 entraîne également un décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs, c'est-à-dire une diminution de la disponibilité des canaux Nav1.5, ainsi qu'un ralentissement de la levée d'inactivation. De façon cohérente, des expériences d'*optical mapping* sur des cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés ont également mis en évidence un ralentissement de la vitesse de conduction suite à l'extinction de *FGF13*.

L'ensemble des résultats s'accordent pour dire que les FHF régulent les propriétés d'inactivation des canaux Nav via leur interaction avec l'extrémité C-terminale, cependant cette régulation semble différente selon les canaux Nav et les FHF (Wang et al., 2011b). Des études structurales ont cherché à déterminer les raisons de cette spécificité sans pouvoir apporter de réponse précise à ce sujet. Il a d'abord été suggéré que la spécificité d'interaction entre les canaux Nav et les FHF était due à l'extrémité N-terminale de ces derniers. Or, une approche de résonance plasmonique de surface a notamment montré que l'affinité d'interaction de l'extrémité C-terminale de Nav1.5 avec deux variants de FGF12 présentant des extrémités N-terminales différentes est la même, et qu'une interaction est possible entre les FGF11, FGF13 et FGF14 et les canaux Nav1.1, Nav1.2, Nav1.5, Nav1.6 et Nav1.9 (Goetz et al., 2009). Ceci sous-entend que le site ou l'un des sites d'interaction des FHF avec les canaux Nav1.5 est situé en dehors de l'extrémité N-terminale, dans un domaine conservé entre tous les FHF. Ainsi, il a été montré qu'une région de 152 acides aminés, présentant une homologie d'environ 75% entre les différents FHF, est suffisante pour la liaison aux canaux Nav (Goetz et al., 2009). De même, la zone d'interaction des FHF sur les canaux Nav a été localisée au niveau de la partie proximale de l'extrémité C-terminale des canaux Nav, une région très conservée entre les différents canaux Nav (Liu et al., 2003). Or, un même FHF peut interagir avec certains Nav et pas avec d'autres, suggérant qu'il existe d'autres déterminants que cette séquence pour expliquer les spécificités d'interaction. Le groupe de Geoffrey Pitt a montré que certains déterminants de cette interaction sont situés en dehors de la zone proximale précédemment décrite, car l'expression d'un construit tronqué après l'acide aminé 1885 entraîne une perte d'interaction avec les canaux Nav, et que ces résidus se situent probablement entre les acides aminés 1887 et 1908 (Wang et al., 2011b) (**Figure 10**).

			Domaine de liaison des FHF	
Mouse Nav1.5	(1836)	ISLINMDLPMVSGDRIHCMDILFAFTKRVLGESGEMDALKIQMEEKFMAANPSKISYEPI		
Rat Nav1.5	(1835)	ISLINMDLPMVSGDRIHCMDILFAFTKRVLGESGEMDALKIQMEEKFMAANPSKISYEPI		
Bovine Nav1.5	(1838)	ISLINMDLPMVSGDRIHCMDILFAFTKRVLGESGEMDALKIQMEEKFMAANPSKISYEPI		
Human Nav1.5	(1832)	ISLINMDLPMVSGDRIHCMDILFAFTKRVLGESGEMDALKIQMEEKFMAANPSKISYEPI		
Canine Nav1.5	(1830)	ISLINMDLPMVSGDRIHCMDILFAFTKRVLGESGEMDALKIQMEEKFMAANPSKISYEPI		
Mouse Nav1.5	(1896)	TTTLRRKH E E V S A T V I Q R A F R R H L L Q R S V K H A S F L F R Q Q A G S S G L S D E D A P E R E G L I A Y M		
Rat Nav1.5	(1895)	TTTLRRKH E E V S A T V I Q R A F R R H L L Q R S V K H A S F L F R Q Q A G S S G L S D E D A P E R E G L I A Y M		
Bovine Nav1.5	(1898)	TTTLRRKH E E V S A T I I Q R A F R R H L L Q R S V K H A S F L Y R Q Q A G S S G L S E E D A P E Q E G L I A Y M		
Human Nav1.5	(1892)	TTTLRRKH E E V S A M V I Q R A F R R H L L Q R S L K H A S F L F R Q Q A G - S G L S E E D A P E R E G L I A Y V		
Canine Nav1.5	(1890)	TTTLRRKH E E V S A T V I Q R A F R R H L L Q R S V K H A S F L Y R Q Q A G - G A R S G E R A P E R E G L I A Y T		
			Domaine de liaison de la CaM	

Figure 10. Alignement de séquences C-terminales des canaux Nav1.5. Le domaine de liaison des FHF est encadré en vert, et celui de la Calmoduline (IQ motif) est encadré en orange. Les séquences sont conservées entre les espèces (D'après Wang et al., 2011b).

De façon intéressante, le site d'interaction de FGF13 avec le canal Nav1.5 est localisé au niveau de l'extrémité C-terminale de ces derniers, juste en amont du motif IQ (Goetz et al., 2009; Wang et al., 2012; Wang et al., 2011b) (**Figure 10**), suggérant l'existence d'un lien étroit entre le FGF13 et la CaM dans la régulation de l'inactivation des canaux Nav1.5, ce qui est cohérent avec le fait que le FGF13 et la CaM induisent tous les deux un décalage de l'inactivation vers des potentiels moins négatifs. Cette hypothèse est étayée par plusieurs études de cristallographie qui ont mis en évidence l'existence d'un complexe ternaire composé de l'extrémité C-terminale des canaux Nav1.5, la CaM et le FGF13 (Gabelli et al., 2014; Wang et al., 2012; Wang et al., 2014). Le rôle des FHF dans la régulation de l'inactivation des canaux Nav1.5 est renforcé par le fait qu'une mutation associée au BrS a été identifiée dans les gènes codant pour FGF12 (Hennessey et al., 2013; Wei et al., 2011). De plus, la mutation D1790G sur Nav1.5, associée au LQTS de type 3 et au BrS, abolit l'interaction de Nav1.5 avec FGF12 (Blich et al., 2015; Liu et al., 2003), et des travaux récents du groupe de Peter Mohler ont montré qu'un variant Nav1.5-H1849R, identifié chez un patient LQTS de type 3, et compris dans le site d'interaction avec les FHF, induit une perte d'interaction du canal avec FGF12 et FGF13, ainsi qu'un défaut d'inactivation des canaux Nav1.5 (Musa et al., 2015), soulignant à nouveau l'importance du rôle des FHF dans la régulation des canaux Nav1.5 cardiaques.

IV. Régulation des canaux Nav1.5 par la phosphorylation

La phosphorylation est une modification post-traductionnelle ubiquitaire impliquée dans de nombreux processus tels que la transduction de signaux, la régulation du cytosquelette ou le métabolisme, qui permet de moduler l'activité des protéines (Groban et al., 2006). En effet, l'addition d'un groupement phosphate, chargé négativement, sur un acide aminé initialement neutre (sérine, thréonine ou tyrosine) induit des perturbations électrostatiques conduisant à une modification conformationnelle de la protéine phosphorylée, et donc potentiellement à une modification de son activité, de façon intrinsèque ou en modulant son interaction avec des partenaires. La phosphorylation est sans doute la modification post-traductionnelle des canaux Nav1.5 la mieux documentée à l'heure actuelle (Marionneau et Abriel, 2015). De nombreux laboratoires ont en effet cherché à déterminer quel était le rôle physiologique et/ou physiopathologique de la phosphorylation des canaux Nav1.5 et quels étaient les sites de phosphorylation et voies de signalisation impliqués. L'objectif des prochains paragraphes est donc de détailler l'état des connaissances actuelles concernant les kinases impliquées et les effets de la phosphorylation dans la régulation des canaux Nav1.5 cardiaques (**Tableau IV**).

IV.1. Régulation des canaux Nav1.5 par la PKA

La Protéine Kinase dépendante de l'AMPc (PKA), pour laquelle deux isoformes ont été décrites (types I et II), est une sérine/thréonine kinase organisée en tétramère, avec deux sous-unités catalytiques et deux sous-unités régulatrices (Wagner et al., 2013). L'activation des récepteurs β -adrénergiques induit l'activation de l'adénylate cyclase, qui catalyse la conversion de l'ATP (Adénosine Triphosphate) en AMPc (Adénosine Monophosphate cyclique), qui va alors se lier aux sous-unités régulatrices de la PKA et permettre son activation par libération des sites catalytiques. Outre la régulation de l'activité kinase, le domaine régulateur est également impliqué dans la liaison de la PKA à ses protéines d'ancrage, les protéines AKAP (*A-Kinase Anchor Proteins*), qui permettent de localiser la PKA à proximité de ses substrats. La PKA joue un rôle majeur dans la signalisation intracellulaire cardiaque, en régulant de nombreuses protéines comme le récepteur à la ryanodine, le phospholamban ou les canaux Ca^{2+} de type-L. Il a d'ailleurs été montré que l'insuffisance cardiaque est associée à une

altération d'activité de la PKA qui contribue aux défauts de contraction du cœur dans ce contexte (Wehrens et al., 2006).

L'activation des voies β -adrénergiques a été décrite pour réguler les canaux Nav1.5 par (1) un effet direct, associé à l'activation de la protéine $G\alpha_s$, qui aboutit à une augmentation du nombre de canaux Nav1.5 à la surface cellulaire et une augmentation du courant I_{Na} et (2), un effet indirect, médié par la PKA (Yarbrough et al., 2002). La régulation des canaux Nav1.5 par la PKA a été démontrée à de nombreuses reprises, avec cependant des résultats contradictoires rapportés selon les études, puisque par exemple l'application d'AMPc sur des myocytes a montré, selon les études, soit une augmentation, soit une diminution du courant I_{Na} (Frohnwieser et al., 1997; Hallaq et al., 2006; Murphy et al., 1996; Sunami et al., 1991; Zhou et al., 2000). L'ensemble des études réalisées suggèrent cependant que les effets les plus cohérents de l'activation de la PKA sur les canaux Nav1.5 sont (1) un décalage de l'inactivation vers des potentiels plus négatifs, et (2) une augmentation du courant I_{Na} (Herren et al., 2013). Plusieurs travaux ont montré que l'augmentation de I_{Na} associée à l'activation de la PKA est due à une augmentation du nombre de canaux à la surface cellulaire (Hallaq et al., 2006; Zhou et al., 2000). Une approche de phosphorylation *in vitro* développée par le groupe de William Catterall a par ailleurs permis d'identifier deux résidus cibles de la PKA sur le canal Nav1.5 de rat : les serines 526 et 529 (S526 et S529, correspondant aux S525 et S528 dans la séquence humaine), localisées dans la boucle intracellulaire DI-II (Murphy et al., 1996). L'implication de ces deux résidus dans les effets observés sur le courant I_{Na} a été confirmée par une approche de mutagenèse dirigée qui a montré que la mutation de ces deux sites en alanine, qui abolit la possibilité de phosphorylation, élimine les effets de la PKA sur les canaux Nav1.5 (Zhou et al., 2002). De plus, cette étude a montré que l'augmentation du nombre de canal à la surface cellulaire en réponse à la PKA fait intervenir des sites de rétention dans le réticulum endoplasmique (motifs RXR) présents dans la boucle intracellulaire DI-DII, le site 533-RRR-535 jouant un rôle majeur. Les auteurs ont émis l'hypothèse que la phosphorylation par la PKA masque ces sites de rétention, et participe ainsi à l'augmentation du nombre de canaux à la surface cellulaire. De façon intéressante, l'implication de la régulation des canaux Nav1.5 par la PKA a été suggérée dans le cadre de deux mutations sur le gène *SCN5A*. En effet, le mutant Nav1.5-D1790G, associé au LQTS de type 3, induit une augmentation du courant I_{NaL} dépendante de la phosphorylation par la PKA sur les S36 et 525 (Tateyama et al., 2003), alors

que le mutant BrS Nav1.5-R526H, localisé dans le site consensus de phosphorylation par la PKA de la S528, inhibe les effets de la PKA sur l'expression des canaux Nav1.5 à la surface cellulaire et le courant I_{Na} (Aiba et al., 2014). L'analyse phosphoprotéomique des canaux Nav1.5 purifiés à partir de ventricules de souris dans des conditions basales a permis de confirmer la phosphorylation des sérines 36 et 525, mais la phosphorylation sur S528 n'a elle pas été observée (Marionneau et al., 2012; Burel et al., en révision).

IV.2. Régulation des canaux Nav1.5 par la PKC

La Protéine Kinase C (PKC) est une sérine/thréonine kinase pour laquelle les 12 isoformes décrites sont classées en 3 catégories (conventionnelles, nouvelles et atypiques) selon leurs modalités d'activation (Newton, 2003; Wagner et al., 2013). Les PKC sont constituées d'une extrémité N-terminale régulatrice, dont la composition dicte les modalités d'activation de la kinase, et d'une extrémité C-terminale qui constitue le domaine catalytique. Les PKC conventionnelles (cPKC) répondent au Ca^{2+} et au Diacylglycérol (DAG), les PKC dites nouvelles (nPKC) sont activées par le DAG mais pas le Ca^{2+} , et les PKC atypiques, qui ne répondent ni au DAG, ni au Ca^{2+} , sont activées par d'autres lipides comme le Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3) ou le céramide (Steinberg, 2008). Comme pour la PKA, la liaison des activateurs de la PKC au domaine régulateur induit un changement conformationnel qui permet la libération du domaine catalytique et l'activation de la kinase.

De façon similaire aux études menées sur la PKA, les travaux ayant cherché à déterminer le rôle de la PKC dans la régulation des canaux Nav1.5 ont conduit à des résultats controversés, avec divers effets rapportés sur la densité et les propriétés biophysiques de I_{Na} (Marionneau et Abriel, 2015). Plusieurs études réalisées s'accordent cependant pour conclure que l'activation de la PKC diminue la densité de courant I_{Na} , notamment via une diminution de l'expression des canaux Nav1.5 à la membrane cellulaire (Hallaq et al., 2012; Shin et Murray, 2001), et décale la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs (Qu et al., 1994). Des études visant à déterminer les résidus impliqués dans cette régulation ont mis en évidence le rôle de la sérine 1505 (S1505) située dans la boucle DIII-IV, correspondant à la S1503 dans la séquence humaine. En effet, la mutation de ce résidu en alanine abolit les effets de l'activation de la PKC sur la dépendance au voltage de l'inactivation (Qu et al., 1996). Cependant, plusieurs études suggèrent que d'autres sites de phosphorylation, ou d'autres mécanismes, sont

impliqués dans la régulation de Nav1.5 par la PKC, car la mutation de la S1505 en alanine n'inhibe pas totalement la diminution du courant I_{Na} induite par la PKC (Qu et al., 1996; Valdivia et al., 2009). De façon intéressante, plusieurs études suggèrent que l'activation de la PKC ralentit les cinétiques d'inactivation des canaux Nav1.5 et augmente le courant I_{NaL} (Ma et al., 2012; Watson et Gold, 1997).

L'identification de deux mutations dans la protéine *Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase 1-Like protein* (GPD1L) a permis de relier la régulation des canaux Nav1.5 par la PKC au métabolisme et au stress oxydant. En effet, ces deux mutations, A280V et E83K, associées respectivement au BrS et à la mort subite du nourrisson (*Sudden Infant Death Syndrom*, SIDS), induisent une perte d'activité de l'enzyme GPD1L et dans les deux cas une diminution du courant I_{Na} (Liu et al., 2009; Valdivia et al., 2009). Valdivia et ses collaborateurs ont en effet montré que l'expression de ces deux mutants dans un système d'expression hétérologue induit une diminution du courant I_{Na} , associée à une diminution d'expression à la surface cellulaire. Cette diminution étant inhibée par un inhibiteur de la PKC, il est possible que la GPD1L régule le courant I_{Na} par une voie dépendante de la PKC. Cette hypothèse est renforcée par le fait que l'effet des mutants GPD1L est partiellement aboli par l'expression du mutant Nav1.5-S1503A. La pertinence de la phosphorylation de la S1503 par la PKC reste cependant à démontrer, et l'étude phosphoprotéomique réalisée sur des ventricules de souris sauvages n'a malheureusement pas permis de valider la phosphorylation de ce site (Marionneau et al., 2012).

IV.3. Régulation des canaux Nav1.5 par la CaMKII

La protéine kinase II dépendante de la Ca^{2+}/CaM (CaMKII) est une sérine/thréonine kinase composée de douze monomères, qui s'assemblent sous la forme de deux anneaux de six monomères via le domaine d'association présent à l'extrémité C-terminale de chaque sous-unité (Erickson, 2014) (**Figure 11**). Chez l'Homme, il existe quatre CaMKII (α , β , γ et δ), codées par quatre gènes différents, présentant des distributions tissulaires, des sensibilités à la Ca^{2+}/CaM et des cinétiques d'activation différentes. La CaMKII δ est la plus exprimée dans le cœur et est présente sous la forme de deux variants d'épissage : CaMKII δ_b , comprenant une séquence de localisation nucléaire (séquence NLS, *Nuclear Localization Sequence*), et CaMKII δ_c , ne comprenant pas de séquence NLS, et dont l'expression est majoritairement

cytoplasmique (Anderson et al., 2011). Dans le cœur, la CaMKII a été décrite pour phosphoryler et réguler de nombreuses protéines impliquées dans la signalisation Ca^{2+} , comme le phospholamban, le récepteur à la ryanodine ou les canaux Ca^{2+} de type L, ce qui en fait un acteur essentiel du couplage excitation-contraction et plus largement de la physiologie cardiaque (Wagner et al., 2013). Dans des conditions basales, la CaMKII est dans une conformation inactive, ou auto-inhibée, dans laquelle le domaine catalytique est fortement associé au domaine régulateur, qui joue un rôle de pseudo-substrat (Erickson, 2014; Hudmon et Schulman, 2002) (**Figure 11**). Une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} induit la liaison du complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ au niveau du domaine régulateur de la CaMKII, ce qui entraîne un changement conformationnel permettant la libération du domaine catalytique, et donc l'activation de la kinase, qui va alors pouvoir lier l'ATP et phosphoryler ses protéines cibles. Cette activation de la CaMKII, dépendante de la $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, constitue l'étape initiale commune à tous les modes d'activation de la CaMKII. En effet, elle va aboutir à l'autophosphorylation de la CaMKII sur les thréonines 286 ou 287 (T286/287 en fonction des isoformes), c'est-à-dire à la phosphorylation d'un monomère par un autre. Cette autophosphorylation permet de maintenir l'activité de la CaMKII, même lorsque la CaM se dissocie et que la concentration en Ca^{2+} intracellulaire diminue (Maier et Bers, 2002).

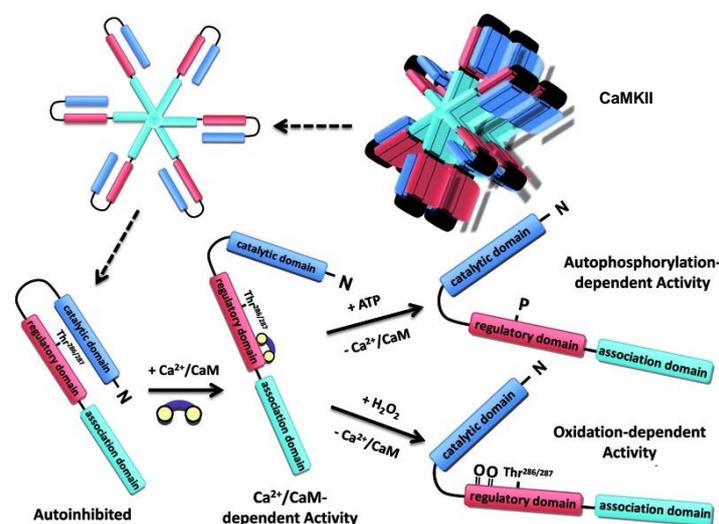


Figure 11. Représentation schématique de la structure de la CaMKII et de ses modes d'activation. La CaMKII est constituée de 12 monomères, comprenant chacun un domaine catalytique N-terminal, un domaine régulateur et un domaine d'association C-terminal. La liaison de la $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ au domaine régulateur entraîne un changement de conformation permettant la libération du domaine catalytique et l'activation de la CaMKII. L'activation peut être maintenue par autophosphorylation de la T286/287 ou par oxydation des M281/M282 présentes dans le domaine régulateur (Wagner et al, 2013).

L'activité de la CaMKII peut également être maintenue en absence de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ par oxydation des méthionines 281 et 282, via un mécanisme similaire à celui de la phosphorylation de la T286, reliant ainsi l'activité de la CaMKII au stress oxydant (Wagner et al., 2013). Il est à noter que l'autophosphorylation de la T286 et l'oxydation des M281/M282 semblent être deux processus liés, car l'autophosphorylation de la T286 est augmentée lorsque le taux d'espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*, ROS) est augmenté dans la cellule, ce qui pourrait notamment s'expliquer par le fait que les ROS inhibent de nombreuses phosphatases (Anderson et al., 2011). De plus, des travaux ont suggéré que la CaMKII peut également être activée par O-GlcNAcylation sur S279 et par la nitrosylation (Wagner et al., 2015).

Les premières preuves indirectes d'un effet de la CaMKII sur les canaux Nav1.5 ont été rapportées par Deschênes et ses collaborateurs, qui ont montré que le KN93, un inhibiteur non-spécifique des CaMK, induit un décalage de l'inactivation à l'état stable vers des potentiels moins négatifs, ainsi qu'un ralentissement des cinétiques d'inactivation et une accélération de la levée d'inactivation du canal (Deschenes et al., 2002). Ces travaux ne permirent cependant pas de conclure sur la pertinence de ces résultats vis à vis de la CaMKII, car l'utilisation d'un analogue inactif du KN93, le KN92, induisait des effets similaires sur le courant I_{Na} alors que l'utilisation de l'AIP (*Autocamtide-2 related Inhibitory Peptide*), un inhibiteur spécifique de la CaMKII, ne produisait au contraire aucun effet. Les effets de la CaMKII sur les canaux Nav1.5 ont ensuite été étudiés par le groupe de Lars Maier dans un modèle de souris transgéniques surexprimant la CaMKII δc de façon restreinte au cœur (souris CaMKII δc -Tg) et développant une insuffisance cardiaque, et dans un modèle de cardiomyocytes de lapin surexprimant la CaMKII de façon aigüe via une infection par des adénovirus (Wagner et al., 2006). Ces travaux ont montré que la surexpression de la CaMKII δc , qu'elle soit aigüe ou chronique, induit un décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs, traduisant une diminution de la disponibilité des canaux Nav1.5 (**Figure 12**). Cette surexpression induit également une augmentation de la proportion de canaux entrant en inactivation intermédiaire, ainsi qu'un ralentissement de la levée d'inactivation, et tous ces effets sont inhibés par l'utilisation de KN93 ou d'AIP. De façon intéressante, cette surexpression induit également une augmentation du courant I_{NaL} . Les auteurs ont également montré, par des approches de co-immunoprécipitation et de tests d'activité kinase, que la CaMKII interagit

avec et phosphoryle les canaux Nav1.5 (Ashpole et al., 2012; Wagner et al., 2006), suggérant le rôle de la phosphorylation par la CaMKII dans la régulation des propriétés de ces canaux.

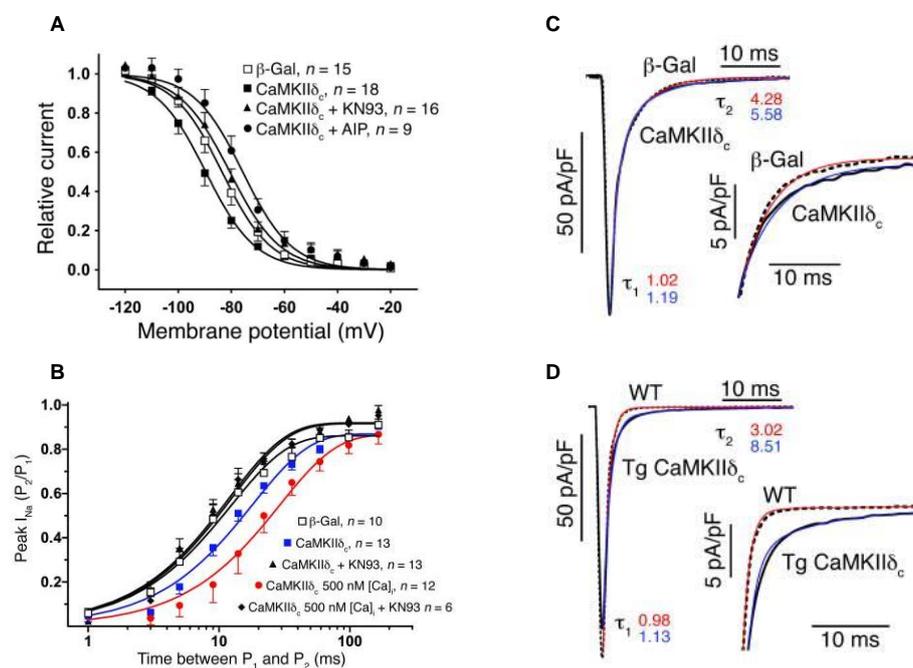


Figure 12. Régulation des canaux Nav1.5 cardiaques par la CaMKII. (A) Courbes d'inactivation et (B) de levée d'inactivation des canaux Nav1.5 dans des cardiomyocytes de lapin infectés avec un adénovirus contrôle (β -Gal) ou CaMKII δ_c , en absence ou présence d'inhibiteurs de la CaMKII (AIP et KN93) ou de Ca^{2+} . (C) Enregistrement du courant I_{Na} et des cinétiques d'inactivation dans des cardiomyocytes de lapin infectés avec un adénovirus contrôle (β -Gal) ou CaMKII δ_c et (D) dans des cardiomyocytes de souris sauvages (WT) ou surexprimant la CaMKII δ_c dans le cœur (CaMKII δ_c -Tg) (Wagner et al., 2006).

Afin de déterminer les mécanismes moléculaires de régulation des canaux Nav1.5 par la CaMKII, plusieurs groupes ont cherché à déterminer les sites phosphorylés par la CaMKII. L'approche développée par Hund et ses collaborateurs a consisté à muter les résidus sérines présents dans les sites consensus de phosphorylation par la CaMKII (RXX[S/T]) dans la séquence de Nav1.5 soit en alanine (A), pour empêcher la phosphorylation, soit en glutamate (E), pour la mimer par ajout d'une charge négative (Hund et al., 2010). L'expression du mutant Nav1.5-S571A dans un système d'expression hétérologue a montré une inhibition des effets de la CaMKII sur les propriétés des canaux Nav1.5, alors que l'expression du phosphomutant Nav1.5-S571E récapitule les effets de la CaMKII, suggérant que la sérine 571 est un site de phosphorylation par la CaMKII. L'implication de ce site dans la régulation des canaux Nav1.5 a été confirmée par la suite dans les cardiomyocytes, grâce à des travaux montrant que la

phosphorylation de la S571 est augmentée dans le contexte de l'insuffisance cardiaque (Koval et al., 2012) et que la génération de souris *knock-in* Nav1.5-S571E, mimant la phosphorylation sur ce site, permet de récapituler les effets induits par la phosphorylation des canaux Nav1.5 par la CaMKII (Glynn et al., 2015a). Le groupe de Donald Bers a lui identifié la sérine 516 et la thréonine 594 (S516 et T594) comme sites de phosphorylation par la CaMKII, à partir de prédictions *in silico* et d'essais kinases *in vitro* (Ashpole et al., 2012). L'identification des S516 et S571 comme sites de phosphorylation par la CaMKII a été confirmée récemment par ce même groupe par une approche de phosphoprotéomique qui a permis d'identifier les sites de phosphorylation des canaux Nav1.5 humains exprimés de façon transitoire dans des cellules HEK293, dans des conditions basales et après activation par la CaMKII (Herren et al., 2015). Les différences d'abondance relative de chaque phosphopeptide entre la situation basale et la situation où la CaMKII est activée suggère que 23 des sites identifiés sont des cibles potentielles de la CaMKII, mais à l'heure actuelle seule la phosphorylation des S516 et S571 a pu être validée dans les cardiomyocytes (Glynn et al., 2015a; Marionneau et al., 2012).

IV.4. Régulation des canaux Nav1.5 par la voie PI3K/Akt/SGK

Les Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) sont des protéines kinases qui phosphorylent les lipides, et qui sont réparties en trois classes selon leur structure, leur composition et leur spécificité vis-à-vis de leurs substrats (Ballou et al., 2015). L'activation de la voie des PI3K induit l'activation de la *Phosphoinositide3-Phosphate Dependent Kinase 1* (PDK1), qui va à son tour pouvoir activer la *Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase* (SGK), l'Akt (ou Protéine Kinase B, PKB) et les PKC atypiques.

L'intérêt porté au rôle de la voie des PI3K dans la régulation des canaux Nav1.5 cardiaques est notamment lié à la découverte de LQTS associés à la prise de traitements anti-cancéreux (Ballou et al., 2015). Le groupe de Richard Lin a en effet montré que deux inhibiteurs de tyrosine kinases utilisés dans le traitement des cancers, le nilotinib et le dasatinib, induisent une diminution de l'activité PI3K qui est associée à une augmentation de la durée du PA (Lu et al., 2012). Afin de déterminer quelle PI3K était impliquée, des modèles murins invalidés pour des PI3K spécifiques ont été créés, et ont permis de montrer que les souris invalidées pour la sous-unité catalytique p110 α présentent une augmentation de la durée du PA et un allongement de l'intervalle QT, qui sont en partie dus à une augmentation du courant I_{NaL} (Lu

et al., 2012). Ces résultats sont d'autant plus intéressants qu'une augmentation du courant I_{NaL} , conduisant à un allongement de la durée du PA, a également été associée à la PI3K dans le contexte du diabète (Lu et al., 2013). En effet, la prolongation de la durée du PA observée chez les souris diabétiques est abolie par l'administration de $PI(3,4,5)P_3$ ou par l'infection de cardiomyocytes en culture avec un adénovirus exprimant la forme constitutivement active de $p110\alpha$, suggérant que la voie de la PI3K est également altérée dans ces conditions et est impliquée dans l'augmentation de I_{NaL} . Dans cette même étude, les auteurs ont montré que l'augmentation du courant I_{NaL} associée au diabète est médiée par une inhibition de l'Akt. Ces résultats suggèrent donc que la voie PI3K/Akt est impliquée dans la régulation des canaux Nav1.5, cependant aucun site de phosphorylation associé n'a pu être identifié à ce jour.

La voie de la *Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase 1* (SGK1), une serine thréonine kinase exprimée de façon ubiquitaire, avec une forte expression dans le cœur, a également été décrite pour réguler les canaux Nav1.5 cardiaques. La SGK1 est notamment activée par les voies de la PI3K et de la PDK1, et son expression est régulée par de nombreuses hormones et médiateurs comme les glucocorticoïdes et les minéralocorticoïdes (Lang et al., 2014). Les premières études sur le rôle de la SGK1 dans la régulation des canaux Nav1.5 ont fait suite aux travaux du groupe d'Hugues Abriel, qui a montré que ces derniers sont régulés par l'ubiquitine-ligase Nedd4-2, qui diminue l'expression des canaux Na1.5 à la surface cellulaire (Abriel et al., 2000). Or, la SGK1 peut phosphoryler Nedd4-2 et inhiber ses effets sur le canal Na^+ épithélial ENac, suggérant que la SGK1 ainsi que de la SGK3, également exprimée dans le cœur, pourraient réguler les canaux Nav1.5 cardiaques par ce même mécanisme (Debonneville et al., 2001; Snyder et al., 2004). Les études menées dans des ovocytes de xénope ont ainsi montré que la co-expression de la SGK1 ou la SGK3 avec Nav1.5 augmente le courant I_{Na} , et que la co-expression d'un mutant constitutivement actif de la SGK1 (SGK1-S422D) récapitule ce phénotype, alors que celle d'un mutant constitutivement inactif (SGK1-K127N) diminue le courant I_{Na} (Boehmer et al., 2003). De plus, la mutation en alanine des sérines 483 et 664 de Nav1.5, prédites pour être des sites consensus de phosphorylation par la SGK, abolit les effets induits par la SGK3 sur les propriétés biophysiques des canaux Nav1.5, suggérant que ces sites sont en effet des cibles de la SGK.

De façon intéressante, l'activation de la SGK1 est augmentée dans le contexte de l'insuffisance cardiaque, chez l'Homme et dans des modèles murins, et l'expression de

l'isoforme constitutivement active SGK1-S422D chez des souris transgéniques induit une dysfonction cardiaque et des arythmies ventriculaires (Das et al., 2012). Les effets pro-arythmiques observés chez les souris SGK1-S422D s'accompagnent d'une augmentation de I_{Na} , due à la phosphorylation et à la perte d'interaction de Nedd4-2 avec Nav1.5 qui entraîne une augmentation d'expression du canal à la surface cellulaire, ainsi que d'un décalage des courbes d'activation et d'inactivation vers des potentiels plus négatifs, et d'une augmentation de I_{NaL} , (Das et al., 2012). De façon intéressante, les effets pro-arythmiques chez les souris SGK1-S422D sont inhibés par la Ranolazine, et l'expression de l'isoforme constitutivement inactive SGK1-K127M a un effet protecteur vis-à-vis des troubles du rythme cardiaque associés au développement de l'insuffisance cardiaque. L'ensemble de ces résultats pointent donc vers un rôle majeur de la régulation des canaux Nav1.5 par la SGK1 et l'implication de cette régulation dans la survenue des troubles du rythme associés à l'insuffisance cardiaque.

IV.5. Régulation des canaux Nav1.5 par la Fyn kinase

Les canaux Nav1.5 sont également la cible de la kinase Fyn, une tyrosine kinase de la famille Src. Les travaux d'Ahern et ses collaborateurs ont en effet montré que la Fyn kinase induit un décalage de la courbe d'inactivation des canaux Nav1.5 vers des potentiels moins négatifs ainsi qu'une accélération de la levée d'inactivation (Ahern et al., 2005). Ceci est cohérent avec le décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs induit par l'application d'inhibiteurs des tyrosine kinases sur des cardiomyocytes ventriculaires de lapin (Wang et al., 2003), ou par la *Protein Tyrosine Phosphatase* (PTPH1), qui interagit avec l'extrémité C-terminale des canaux Nav1.5 (Jespersen et al., 2006). Des approches de biochimie et de mutagenèse dirigée ont permis de valider que les canaux Nav1.5 sont phosphorylés par Fyn, et que la tyrosine 1495, située dans la porte d'inactivation (boucle DIII-IV), non loin du motif IFMT, semble être le site préférentiel de cette phosphorylation. Des travaux récents ont confirmé l'implication de la Fyn kinase dans la régulation des propriétés biophysiques des canaux Nav1.5 (Iqbal et al., 2015), cependant la pertinence physiologique de cette régulation reste à démontrer, et la phosphorylation de la Y1495 n'a pas pu être validée *in situ* par phosphoprotéomique (Marionneau et al., 2012; Burel et al., en révision).

Tableau IV. Principaux effets de la phosphorylation des canaux Nav1.5 sur la densité et les propriétés du courant Na⁺.

Kinases	Effets les plus décrits sur I _{Na} et I _{NaL}	Site(s) de phosphorylation*	Validation dans les cardiomyocytes ?
CaMKII	Décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs Augmentation de l'inactivation intermédiaire Ralentissement de la levée d'inactivation Ralentissement de l'inactivation rapide Augmentation de I _{NaL}	S516, S571, T594	S516 et S571 (souris, chien, Homme)
Fyn	Décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels moins négatifs	Y1495	Non
PI3K/Akt	Inhibition > augmentation de I _{NaL}	Inconnu	-
PKA	Augmentation de l'expression à la surface cellulaire et de I _{Na} Décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs	S525 et S528	S525 (souris) et S528 (rat)
PKC	Diminution de l'expression à la surface cellulaire et de I _{Na} Décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs	S1503	Non
SGK1	Augmente l'expression de Nav1.5 à la surface cellulaire et augmente I _{Na} , via la phosphorylation et l'inactivation de Nedd4-2 Décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs Augmentation d'I _{NaL}	S484 et S664	S484 et S664 (souris)

*Numérotation selon la séquence humaine de Nav1.5 (Référence NCBI NP_932173). Adapté d'après Marionneau et Abriel, 2015.

IV.6. Comparaison des méthodes d'identification des sites de phosphorylation

Comme nous l'avons vu, la phosphorylation constitue un mode de régulation clé des canaux Nav1.5, régulant à la fois leur adressage à la surface cellulaire et leurs propriétés biophysiques. Il paraît donc important de déterminer les sites de phosphorylation présents sur ces canaux et de développer des approches permettant d'identifier ceux qui ont une pertinence physiopathologique, c'est-à-dire ceux qui sont effectivement présents *in vivo*. Les premières études réalisées pour identifier les sites de phosphorylations présents sur les canaux Nav1.5 se sont basées sur des approches combinant prédiction de sites consensus de phosphorylation (approche *in silico*), mutagenèse dirigée et phosphorylation *in vitro*. Plusieurs équipes ont ainsi cherché à identifier les sites consensus de phosphorylation pour une kinase puis à en muter les acides aminés afin de déterminer s'ils étaient en effet des sites de phosphorylation (phosphorylation *in vitro*) et/ou si l'effet d'une kinase spécifique sur les canaux Nav1.5 persistait après leur modification. Ce type d'approche a par exemple été utilisé par les équipes de Peter Mohler et Donald Bers pour identifier les sites phosphorylés par la CaMKII décrits précédemment (S516, S571, T594) (Ashpole et al., 2012; Hund et al., 2010) et a permis d'obtenir des informations importantes sur les mécanismes de régulation des canaux Nav1.5 par la phosphorylation. Cependant, il n'est pas exclu que certains sites identifiés par ce biais ne présentent pas de pertinence physiopathologique. En effet, l'identification des sites de phosphorylation par ces méthodes peut être due aux conditions expérimentales (expression dans des cellules hétérologues, surexpression de la kinase, présence/absence des protéines partenaires endogènes,...), ce qui peut expliquer pourquoi certains sites identifiés par des approches *in silico/in vitro* n'ont pas pu être validés dans des cellules natives (**Tableau III**). En particulier, de nombreux essais kinases ont été réalisés sur des fragments peptidiques du canal Nav1.5 qui ne reflètent pas la structure tridimensionnelle de la protéine native, pouvant ainsi rendre accessibles à la kinase des sites qui ne le sont pas nécessairement *in vivo*. De plus, les approches fondées sur une hypothèse spécifique ne permettent pas d'identifier l'ensemble des sites de phosphorylation présents sur une protéine.

Les avancées technologiques de ces dernières années dans le domaine de la spectrométrie de masse ont permis de développer des approches de phosphoprotéomique visant à identifier l'ensemble ou tout du moins un maximum des sites de phosphorylation présents sur une protéine, sans hypothèse pré-fondée. Cette démarche consiste à solubiliser

et purifier la protéine d'intérêt à partir de lysats cellulaires ou tissulaires, à la digérer par des endoprotéases, puis à identifier les sites de phosphorylation présents par des approches de spectrométrie de masse. Une telle approche a été développée au laboratoire, et a permis d'identifier successivement 11 (Marionneau et al., 2012) puis 19 sites de phosphorylation natifs présents sur les canaux Nav1.5 purifiés à partir de ventricules de souris sauvages et/ou en insuffisance cardiaque (Burel et al., en révision). Cette approche présente l'avantage de fournir une carte plus complète de phosphorylation des canaux Nav1.5 *in situ*. Il faut cependant noter que cette méthode d'identification des sites de phosphorylation présente également ses limites. L'une d'elles est liée au fait que la phosphorylation est labile, et l'identification des résidus phosphorylés dépend donc de notre capacité à préserver la phosphorylation lors de la préparation des échantillons. De plus, on ne peut pas exclure la possibilité que des sites de phosphorylation identifiés soient le résultat d'une phosphorylation qui a eu lieu lors de la préparation des échantillons (lors du sacrifice de l'animal par exemple, ou phosphorylation qui a lieu dans le tube). L'ensemble de ces limites, quelle que soit l'approche choisie, souligne la nécessité de vérifier la pertinence des résultats obtenus en validant le rôle fonctionnel des sites de phosphorylation identifiés.

V. Insuffisance cardiaque et canaux Nav1.5

L'insuffisance cardiaque est décrite comme une pathologie complexe dans laquelle le cœur n'est plus capable de maintenir une fonction permettant de subvenir aux besoins métaboliques de l'organisme (Kemp et Conte, 2012). Elle est la conséquence d'une perte fonctionnelle du myocarde, due dans la majorité des cas à une pathologie ischémique, à l'hypertension artérielle ou au diabète. Parmi les patients atteints d'insuffisance cardiaque, environ 50% décèdent de mort subite cardiaque suite à des arythmies (Aiba et Tomaselli, 2010), d'où l'importance de comprendre les mécanismes à l'origine de ces troubles du rythme. L'insuffisance cardiaque se caractérise notamment par un remodelage électrophysiologique, observé à la fois chez les patients et les modèles animaux, qui se traduit le plus souvent par un allongement de la durée du PA et un ralentissement de la conduction dus à des modifications d'expression et/ou de régulation des canaux ioniques (Aiba et Tomaselli, 2010). C'est notamment le cas pour les canaux Nav1.5, pour lesquels une augmentation du courant I_{NaL} est observée, et est parfois associée à une diminution de leur disponibilité (Makielski, 2015; Maltsev et Undrovinas, 2008; Wagner et al., 2006). Il a été démontré que ces défauts de régulation des canaux Nav1.5 dans l'insuffisance cardiaque jouent un rôle majeur dans la survenue des troubles du rythme associés à cette pathologie. Comme nous l'avons vu précédemment, les canaux Nav1.5 sont notamment régulés par la phosphorylation, et plusieurs études suggèrent que les défauts d'inactivation de ces canaux dans le contexte de l'insuffisance cardiaque sont dus à des modifications de leur phosphorylation. En particulier, il a été montré que l'expression et l'activité de la CaMKII sont augmentées dans l'insuffisance cardiaque, que ce soit chez les patients ou dans les modèles animaux (Anderson et al., 2011). De plus, le groupe de Lars Maier a montré que la CaMKII interagit avec et phosphoryle les canaux Nav1.5 (Wagner et al., 2006), suggérant que cette phosphorylation directe par la CaMKII pourrait être impliquée dans les défauts d'inactivation de ces canaux dans l'insuffisance cardiaque. Plusieurs équipes ont donc cherché à identifier les mécanismes de régulation des canaux Nav1.5 par la CaMKII dans ce contexte. Comme décrit précédemment, les premiers travaux menés sur les souris CaMKII δ c-Tg, développant une insuffisance cardiaque, ont montré que la surexpression de la CaMKII δ c dans le cœur augmente le courant I_{NaL} et diminue la disponibilité des canaux Nav1.5 (Wagner et al., 2006). Des travaux plus récents ont révélé que les arythmies observées chez les souris CaMKII δ c-Tg sont inhibées par

la Ranolazine, un inhibiteur du courant I_{NaL} (Sag et al., 2014; Sossalla et al., 2011), suggérant que l'augmentation du courant I_{NaL} due à la surexpression de la CaMKII δ c, et potentiellement à la phosphorylation directe des canaux Nav.1.5, est impliquée dans la survenue des arythmies associées à l'insuffisance cardiaque. L'importance du courant I_{NaL} dans la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque est renforcée par le fait que les stratégies visant à corriger le courant I_{NaL} permettent de restaurer une repolarisation normale, de diminuer la variabilité de la durée du PA et d'améliorer la contraction cardiaque et l'homéostasie Ca^{2+} (Maltsev et Undrovinas, 2008). Il est également intéressant de noter que l'insuffisance cardiaque est associée à une augmentation du stress oxydant dans le cœur, due à l'augmentation de la production de ROS et/ou à la diminution de la capacité anti-oxydante du myocarde (Wagner et al., 2013). Or, il a été montré que les ROS peuvent (1) permettre le maintien de l'activation de la CaMKII (**voir paragraphe IV.3, p 34**), et (2) induire une augmentation du courant I_{NaL} , celle-ci étant prévenue dans un modèle de souris KO pour la CaMKII δ c (Wagner et al., 2011). Ces résultats soulignent le lien étroit existant entre la CaMKII δ c et I_{NaL} , et laissent penser qu'une augmentation de la phosphorylation par la CaMKII δ c pourrait expliquer les défauts de régulation des canaux Nav1.5 observés dans l'insuffisance cardiaque.

L'ensemble de ces études pointe vers un rôle majeur de la CaMKII dans l'augmentation du courant I_{NaL} et dans le développement des arythmies associées à l'insuffisance cardiaque. Des approches thérapeutiques visant à inhiber la CaMKII et/ou le courant I_{NaL} semblent être des pistes intéressantes car elles pourraient permettre de limiter le développement des troubles du rythme cardiaque associés, en diminuant la durée du PA et la probabilité de survenue des EAD, mais aussi en limitant la surcharge Ca^{2+} qui contribue aux DAD et aux défauts de relaxation (**Figure 13**). Cependant, une meilleure compréhension des mécanismes à l'origine de la régulation des canaux Nav1.5 par la CaMKII, et par la phosphorylation en général, reste nécessaire pour pouvoir envisager de telles approches. En effet, comme nous l'avons vu précédemment les travaux des groupes de Donald Bers et Peter Mohler ont montré que les résidus S516, S571 et T594 sur Nav1.5 semblent être des cibles de la CaMKII, mais leur rôle dans la régulation des canaux Nav1.5 dans les cardiomyocytes et dans la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque reste controversé. En effet, la phosphorylation de la S516 a été décrite pour être diminuée (Herren et al., 2015), alors que celle de la S571 (Glynn et al., 2015a) est augmentée chez des patients insuffisants cardiaques, par rapport à des sujets sains, et la

phosphorylation de la T594 n'a pas pu être validée dans les cardiomyocytes (Marionneau et al, 2012; Burel et al., en révision). Ainsi il paraît important de déterminer quels sont les sites de phosphorylation et les kinases impliqués dans la régulation des canaux Nav1.5 cardiaques, que ce soit dans un contexte physiologique ou pathophysiologique.

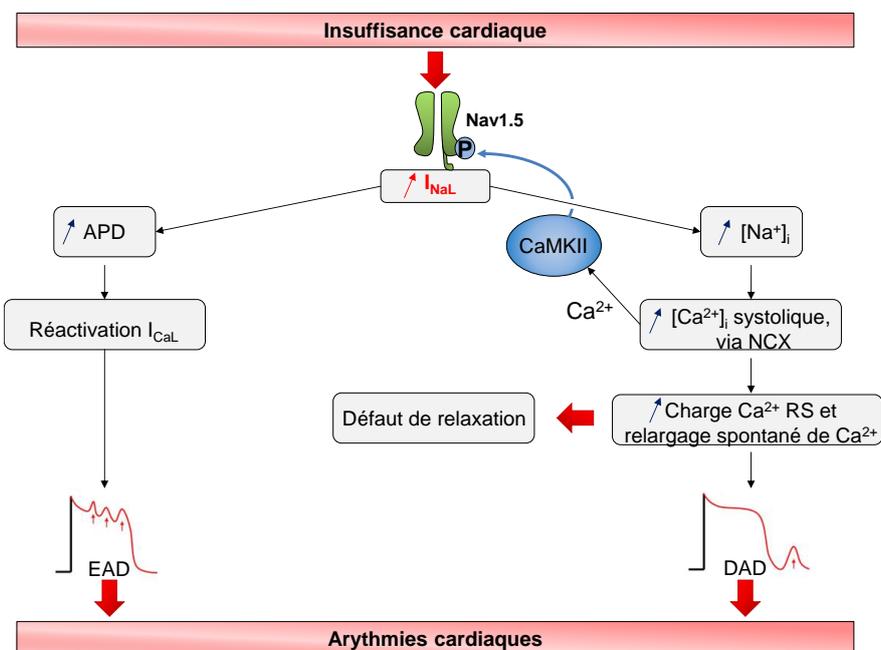


Figure 13. Implication du courant I_{NaL} et de la CaMKII dans le remodelage électrophysiologique associé à l'insuffisance cardiaque. L'augmentation du courant I_{NaL} se traduit par (1) une augmentation de la durée du potentiel d'action, qui favorise la survenue de post-dépolarisations précoces (EAD), (2) une augmentation de la $[Na^+]_i$ et donc une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$, favorisant la survenue de post-dépolarisations retardées (DAD), et des défauts de relaxation. APD, Action Potential Duration ; $[Ca^{2+}]_i$, concentration Ca^{2+} intracellulaire ; DAD, Delayed Afterdepolarization ; EAD, Early Afterdepolarization ; $[Na]_i$, Concentration Na^+ intracellulaire ; NCX, Echangeur Na^+/Ca^{2+} ; RS, Reticulum Sarcoplasmique (Adapté d'après Maltsev et Udovinas, 2008).

VI. Contexte et objectifs de la thèse

Comme nous l'avons vu dans les paragraphes précédents, la phosphorylation constitue l'un des mécanismes majeurs de régulation des canaux Nav1.5 cardiaques. Les études publiées jusqu'ici s'accordent en effet pour affirmer que la phosphorylation régule à la fois l'expression des canaux Nav1.5 à la surface cellulaire et leurs propriétés biophysiques. Cependant, les mécanismes moléculaires, les sites de phosphorylation et kinases impliquées dans ces régulations restent mal connus. En particulier, plusieurs études ont mis en avant le rôle de la PKA, de la PKC et de la SGK1 dans cette régulation, mais jusqu'à présent seuls trois sites (S525, S528 et S1503) ont été suggérés pour être directement impliqués dans la régulation de l'expression des canaux Nav1.5 à la surface cellulaire. De plus, l'existence et la pertinence fonctionnelle de seulement deux d'entre eux (S525 et S528) a pu être validée dans des cardiomyocytes. Or, on peut raisonnablement penser que d'autres sites de phosphorylation, et possiblement d'autres kinases, sont impliqués dans cette régulation. D'un point de vue physiopathologique, les défauts d'inactivation des canaux Nav1.5 et l'augmentation du courant I_{NaL} dans le contexte de l'insuffisance cardiaque ont été associés à la CaMKII et à la phosphorylation des canaux Nav1.5. Trois sites de phosphorylation des canaux Nav1.5 par la CaMKII ont pu être mis en évidence jusqu'à présent (S516, S571 et T594). Bien que la pertinence de deux d'entre eux ait pu être confirmée dans des cardiomyocytes (S516 et S571), l'un (S516) a été rapporté comme moins phosphorylé et l'autre (S571) plus phosphorylé dans le contexte de l'insuffisance cardiaque, et la cohérence de ces résultats restent donc à être démontré. De plus, le profil de phosphorylation global des canaux Nav1.5 associé à l'insuffisance cardiaque reste inconnu.

Afin de mieux comprendre les mécanismes de régulation des canaux Nav1.5 cardiaques par la phosphorylation, une approche de phosphoprotéomique a été développée au laboratoire par Céline Marionneau. Cette approche a consisté à immunoprécipiter les canaux Nav1.5 à partir de ventricules de souris sauvages et de souris transgéniques (CaMKII δ c-Tg) qui surexpriment la CaMKII δ c dans le cœur et développent une insuffisance cardiaque (Wagner et al., 2006). Les fractions immunoprécipitées ont ensuite été digérées en solution puis analysées par spectrométrie de masse afin de déterminer les sites de phosphorylation présents sur les canaux Nav1.5 dans une situation basale (souris sauvages) et dans un contexte d'insuffisance cardiaque (souris CaMKII δ c-Tg). L'analyse phosphoprotéomique a ainsi permis

d'identifier 19 sites de phosphorylation natifs sur les canaux Nav1.5 cardiaques, 10 d'entre eux ayant été identifiés par la même approche lors de travaux précédents effectués dans l'équipe (Marionneau et al., 2012) (**Figure 14**). La plupart des sites identifiés sont localisés dans la boucle DI-II, un est situé dans l'extrémité N-terminale, un dans la boucle DII-III et quatre sont localisés dans l'extrémité C-terminale.

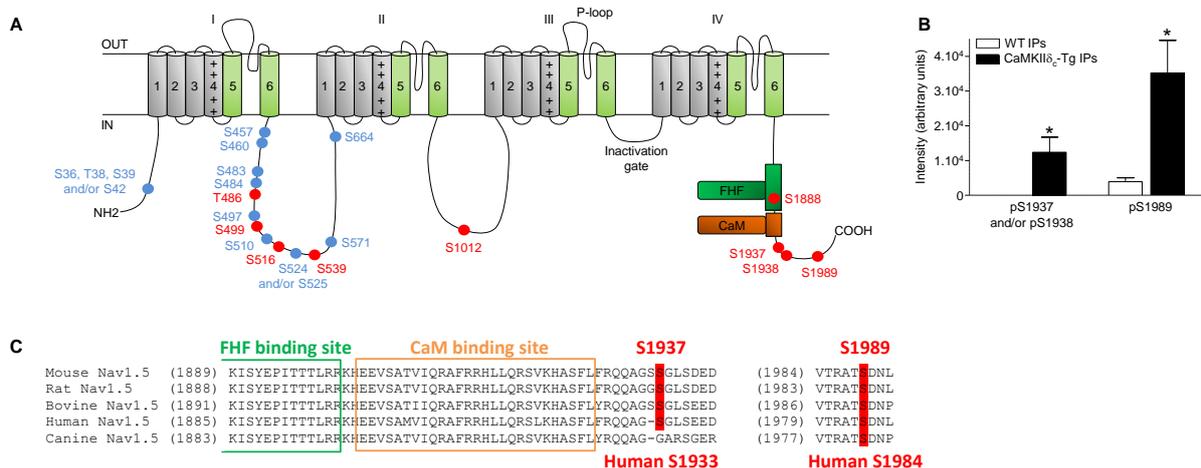


Figure 14. Localisation et quantification des sites de phosphorylation de Nav1.5 identifiés par phosphoprotéomique. (A) Représentation schématique du canal Nav1.5, des sites d'interaction des FHF (vert), de la CaM (orange) et des sites de phosphorylation identifiés. Ceux représentés en bleu ont été décrits précédemment (Marionneau et al., 2012), ceux en rouge sont nouveaux. **(B)** Quantification relative de l'abondance des phosphopeptides ayant permis d'identifier les sérines 1937/38 et 1989 chez les souris WT et CaMKII δ -Tg. **(C)** Alignement de séquences de l'extrémité C-terminale des canaux Nav1.5 de différentes espèces. Les sites de liaison des FHF (vert) et de la CaM (motif IQ, orange) sont encadrés. FHF, *Fibroblast Growth Factor Homologous Factor* ; IP, Immunoprécipitation ; WT, *Wild-type*. (Modifié d'après Burel al., en révision).

Afin de déterminer si l'un ou plusieurs de ces sites étai(en)t plus représenté(s) dans la condition d'insuffisance cardiaque par rapport à la situation basale, une quantification de l'abondance relative des phosphopeptides ayant permis l'identification de chaque site entre les souris CaMKII δ -Tg et les souris sauvages a été effectuée. Cette analyse a permis de montrer que deux sites présents dans l'extrémité C-terminale du canal Nav1.5 sont significativement plus abondants dans les ventricules des souris CaMKII δ -Tg par rapport aux ventricules des souris sauvages. En effet, le phosphopeptide ayant permis l'identification de la sérine 1937/38 (S1937/38) est présent chez les souris CaMKII δ -Tg et absent chez les souris sauvages, et celui ayant permis l'identification de la sérine 1989 (S1989) est environ neuf fois

plus représenté chez les souris CaMKII δ c-Tg par rapport aux souris sauvages (**Figure 14B**). Il est à noter que la sérine 1937 n'est pas conservée chez l'Homme, et nous avons par conséquent focalisé notre attention sur la sérine 1938. Ces résultats sont d'autant plus intéressants que les S1937 et S1989, correspondant aux S1933 et S1984 dans la séquence humaine de Nav1.5, sont localisées à proximité des sites de liaison du FGF13 et de la CaM, qui sont, comme nous l'avons vu précédemment, deux protéines clés dans la régulation de l'inactivation des canaux Nav1.5. Il est également intéressant de noter que ces sites sont conservés dans différentes espèces, et que la S1989 est localisée dans un site consensus de phosphorylation par la CaMKII ([R/L]XX[S/T]). Nous avons donc émis l'hypothèse que la phosphorylation des canaux Nav1.5 sur l'un et/ou l'autre de ces deux sites pourrait être impliquée dans les défauts d'inactivation des canaux Nav1.5 associés à l'insuffisance cardiaque en altérant la régulation de ces canaux par le FGF13 et la CaM.

Mon **premier objectif** de thèse a été de déterminer le rôle de la phosphorylation dans la régulation de l'expression des canaux Nav1.5 à la surface cellulaire. Spécifiquement, mes travaux ont consisté à cribler le rôle de chacun des sites de phosphorylation identifiés ainsi que des kinases connues pour réguler l'expression des canaux Nav1.5 à la surface cellulaire, dans des cellules HEK293.

Mon **deuxième objectif** a été de déterminer le rôle de la phosphorylation des sérines 1933 et 1984 dans la régulation des propriétés d'inactivation des canaux Nav1.5. Pour cela j'ai développé une approche de mutagenèse dirigée et utilisé des approches biochimiques et électrophysiologiques dans des cellules HEK293 pour déterminer le rôle de la phosphorylation de ces deux sérines dans la régulation de l'interaction du canal Nav1.5 avec le FGF13 et la CaM, et des propriétés d'inactivation du canal.

Matériel et méthodes

I. Génération des plasmides et mutagenèse dirigée

La séquence codante du canal Nav1.5 humain hH1c (Séquence de référence NCBI NM_000335), isoforme la plus représentée dans le cœur, a été sous-clonée dans le vecteur pCI. La séquence codant pour la sous-unité humaine Nav β 1 (NM_001037) a été sous-clonée dans le vecteur pRc/CMV, et celle codant pour la protéine humaine FGF13-2 (NM_001139500) a été sous-clonée dans le vecteur pCMV6-XL5. Les phosphomutants des canaux Nav1.5 ont été générés par mutagenèse dirigée, à l'aide du kit *Quick Change II XL Site-directed Mutagenesis* (Agilent Technologies). Chacune des sérines a été remplacée, individuellement ou de façon simultanée, soit par des alanines (A), afin d'éliminer le site de phosphorylation, soit par des acides glutamiques (E), afin de mimer la phosphorylation par ajout d'une charge négative. Les différents fragments mutés ont été sous-clonés dans le plasmide d'origine et tous les plasmides ainsi générés ont été séquencés afin de s'assurer de l'absence de mutation non souhaitées.

II. Culture cellulaire et transfection

La lignée cellulaire *Human Embryonic Kidney 293* (HEK293) a été utilisée afin d'exprimer de façon transitoire le canal Nav1.5 et ses protéines partenaires Nav β 1 et FGF13. Les cellules HEK293 ont été cultivées dans du *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Invitrogen) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (Eurobio), de la L-glutamine (Invitrogen), 100 U/mL de pénicilline et 100 μ g/mL de streptomycine. Les cellules ont été maintenues dans un incubateur ventilé à 37°C avec 5% de CO₂ et 95% d'air. La veille de la transfection, les cellules ont été trypsinées puisensemencées dans des puits de 35 mm de diamètre. Les cellules ont été transfectées à environ 60-70 % de confluence de façon transitoire avec 2 μ g d'ADN plasmidique, à l'aide de *Lipofectamine 2000* (Invitrogen).

III. Analyses Biochimiques

III.1. Traitements pharmacologiques

Afin d'activer la PKA, les cellules HEK293 ont été traitées avec 0,5 mM de Sp-5,6-DCI-cBIMPS (Biolog) ou un cocktail composé de 100 μ M d'IBMX et de 10 μ M de Forskoline (Sigma). Pour activer la PKC, les cellules ont été traitées avec 50 nM de PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) ou 100 μ M d'OAG (1-oleoyl-2-acetyl-glycerol) (Sigma). La Chelerytrine (5 μ M, Sigma) et le Gö6976 (1 μ M, Calbiochem) ont été utilisés pour inhiber son activité. Pour chaque expérience, une condition contrôle dans laquelle les cellules n'ont subi aucun traitement ou ont été mises en contact avec 0,1% de DMSO a été effectuée, en fonction de la solution (H₂O ou DMSO) dans laquelle ont été resuspendu les agents pharmacologiques utilisés. L'ensemble des traitements ont été réalisés pendant 4 heures. Le cycloheximide (100 μ g/mL) a été utilisé en pré-traitement pendant 30 min pour inhiber la traduction protéique et déterminer si les effets observés étaient post-traductionnels ou non.

III.2. Co-Immunoprécipitation dans les cellules HEK293

Quarante-huit heures après transfection, les cellules HEK293 ont été rincées 2 fois avec du PBS 1X pH 7,4 puis lysées dans le tampon de lyse contenant 20 mM d'HEPES pH 7,4, 150 mM de NaCl, 0,5% d'amidosulfobetaine-14 (Sigma), un cocktail d'inhibiteurs de protéases 1X (Roche), 1mM de Fluorure de Phenylmethylsulfonyl (Interchim), 0,7 μ g/mL de pepstatine A (ThermoScientific), et des inhibiteurs de phosphatases 1X (*Halt Phosphatase Inhibitor Cocktail*, ThermoScientific). Après 15 minutes d'agitation à 4°C, les lysats cellulaires ont été centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min, puis les surnageants ont été récupérés et dosés à l'aide du kit *BCA Protein Assay Kit* (Pierce). Les lysats cellulaires ont été incubés pendant 2h avec 12,5 μ L des billes magnétiques (*Dynabeads Protein G*, Invitrogen) préalablement crosslinkées à 3 μ g d'anticorps monoclonaux de souris anti-NavPan (M α NavPan, Sigma) avec 20 mM de dimethyl pimelimidate (Thermo Scientific). Les billes ont ensuite été lavées 3 fois avec du tampon de lyse froid, et les complexes protéiques ont été élués avec du *XT Sample Buffer* 1X (Biorad) pendant 10 min à 60°C. Les lysats protéiques totaux et les fractions immunoprécipitées ont ensuite été dénaturés et analysés par western blot.

III.3. Essais de Biotinylation

Après deux rinçages avec du PBS 1X pH 7,4, les cellules ont été incubées avec la biotine (*EZ Link Sulfo-NHS-SS-Biotin*, Pierce) resuspendue à 0,5 mg/mL dans du PBS 1X, pendant 30 minutes à 4°C, de façon à marquer les protéines exprimées à la surface cellulaire. La solution de biotinylation a ensuite été aspirée puis la biotine en excès éliminée par trois rinçages avec une solution contenant 10 mM de Tris, pH 7,5 et 120 mM de NaCl. Les cellules ont ensuite été lysées et les protéines quantifiées. Afin de purifier les protéines biotinylées, un pull-down a ensuite été effectué en incubant une fraction du lysat cellulaire total avec des billes de sépharose couplées à de la Neutraavidin (*Immobilized Neutraavidin*, Pierce) pendant 2h à 4°C. L'élution des protéines biotinylées a été réalisée par ajout de 70 µL de *XT Sample Buffer* (Biorad) supplémenté en DTT (100 µM) et en portant les échantillons à 50°C pendant 30 min. Les lysats protéiques totaux et les fractions biotinylées ont enfin été analysés par western blot.

III.4. Western blot

Les échantillons protéiques ont été repris dans du *XT Sample Buffer* (Biorad) contenant du DTT (100 µM), dénaturés pendant 5 min à 60°C, puis les protéines ont été séparées sur gel d'acrylamide. Les protéines ont ensuite été transférées sur membrane de nitrocellulose à l'aide du TransBlot® Turbo™ (Biorad) et la membrane saturée pendant 1h avec 5% de lait dans du PBS-Tween 0,1%. La membrane a ensuite été incubée avec l'anticorps primaire pendant une nuit à 4°C. L'anticorps primaire polyclonal de lapin RbαCaM (Abcam) a été utilisé au 1:300^{ème}. Les anticorps primaires monoclonaux de souris MαNavPAN (Sigma), MαFGF13-2 (NeuroMab), MαTrR (Invitrogen) et MαGAPDH (Santa Cruz) ont été utilisés respectivement au 1:2000^{ème}, 1:500^{ème}, 1:10 000^{ème} et 1:100 000^{ème}. Après trois rinçages de 10 min avec du PBS-Tween 0,1%, la membrane a été incubée 1 h avec un anticorps secondaire, dirigé contre les anticorps primaires de souris ou de lapin, couplé à la *Horse Radish Peroxidase*. Après trois nouveaux rinçages avec du PBS-Tween 0,1%, la membrane a été incubée avec du réactif *ElectroChemiLuminescence (SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate*, Pierce) pendant 5 min, puis les signaux de chemiluminescence ont été révélés à l'aide de l'appareil ImageQuant RT ECL (GE Healthcare).

IV. Patch-clamp

La technique de voltage-clamp en configuration cellule entière a été utilisée afin d'enregistrer le courant Na^+ des cellules HEK293 transfectées de façon transitoire comme décrit ci-dessus. Les expériences de patch clamp ont été réalisées à température ambiante, 48 h après transfection. L'acquisition des données et leur analyse ont été effectuées avec le logiciel pClamp (Version 10, Molecular Devices). L'électrode de mesure et de stimulation est reliée à un amplificateur de patch-clamp Axopatch 200A (Axon Instruments). Les pipettes ont été étirées à l'aide d'une étireuse horizontale (Modèle P-97, Sutter Instrument), à partir de capillaires de verre en borosilicate (BF150-86-10, Sutter Instrument), afin d'obtenir des pipettes avec une résistance comprise entre 1,5 et 2,5 M Ω une fois remplie avec la solution intrapipette.

La solution intrapipette contenait (en mM) : NaCl 5, CsCl 105, HEPES 10, Glucose 5, EGTA 10, CaCl_2 4, Mg-ATP 5 (pH = 7,4 avec CsOH). La solution extracellulaire dans laquelle baignaient les cellules HEK293 lors des enregistrements était composée de (en mM) : NaCl 25, CsCl 94, TEA-Cl 25, HEPES 10, Glucose 5, CaCl_2 1, MgCl_2 2 (pH = 7,4 avec du CsOH). L'osmolarité a été ajustée pour être comprise entre 300 et 310 mOsm. Les enregistrements du courant I_{NaL} ont été effectués avec une solution extracellulaire contenant (en mM) : NaCl 140, CsCl 5, HEPES 10, Glucose 5, CaCl_2 1, MgCl_2 2 (pH = 7.4 avec du CsOH). Tous les composés ont été achetés chez Sigma. Afin de perfuser la tétrodotoxine (TTX, Tocris) lors des enregistrements du courant I_{NaL} , 20 mM de mannitol ont été ajoutés à la solution extracellulaire, sans ou avec 30 μM de TTX.

Les données ont été analysées grâce aux logiciels ClampFit (Molecular Devices), Excel et GraphPad Prism (GraphPad Software). Pour chaque condition expérimentale, seules les cellules présentant une résistance membranaire minimum de 200 M Ω , une résistance d'accès inférieure à 7 M Ω , une capacitance membranaire inférieure à 30M Ω et une fuite inférieure à 200 pA et 10% du courant au pic ont été prises en compte. Les cellules présentant des courants inférieurs à 500 pA et supérieurs à 5000 pA n'ont pas été prises en compte dans les analyses.

Après avoir établi la configuration cellule entière, 2 sauts de potentiel de ± 10 mV ont été réalisés pendant 25 ms à partir du potentiel de maintien de -70 mV afin de mesurer la

capacitance cellulaire et la résistance d'accès. La résistance de série a été compensée à 80 % de façon électronique, et le potentiel de maintien alors fixé à -120 mV.

Un protocole d'activation a été réalisé en effectuant, à partir du potentiel de repos de -120 mV, une dépolarisation du potentiel de membrane de -80 mV à +40 mV, avec un incrément de 5 mV pendant 50 ms, toutes les 5 s. Ce protocole a permis de mesurer les paramètres suivants :

- La densité de courant Na⁺ à différents voltages, permettant ainsi la représentation des courbes courant-voltage (I-V).
- Le potentiel de demi-activation ($V_{1/2}$) et le facteur de pente (k) de la courbe d'activation. Ces 2 paramètres ont été déterminés grâce à une régression non linéaire de la conductance (G) normalisée par la conductance maximale (G_{max}), à l'aide d'une équation de type Boltzmann :

$$G_I = G_{max} / (1 + \exp(-(V_m - V_{1/2}) / k)) \quad \text{Equation 1}$$

- Le temps au pic, reflétant la cinétique d'activation des canaux.
- Les constantes d'inactivation à l'état ouvert, τ_1 et τ_2 , ainsi que le ratio A_2/A_1 , représentant la proportion de canaux s'inactivant rapidement par rapport aux canaux s'inactivant plus lentement. Ces constantes ont été déterminées grâce à une régression non linéaire bi-exponentielle de la partie décroissante du courant Na⁺, dont l'équation est la suivante :

$$I(t) = A_1 \times \exp(-t/\tau_1) + A_2 \times \exp(-t/\tau_2) + y_0 \quad \text{Equation 2}$$

Un protocole d'inactivation a été réalisé afin de déterminer la dépendance au voltage de l'inactivation à l'état stable. Pour cela une dépolarisation de la membrane (stimulation P1) de -120 mV à -40 mV, avec un incrément de 5 mV, pendant 1 s, a été réalisée, suivie d'une dépolarisation (stimulation P2) à -20 mV pendant 20 ms, toutes les 5 s. Les courbes d'inactivation ont été obtenues en normalisant le courant Na⁺ mesuré à chaque stimulation P2 par rapport au courant maximum (I_{max}). Ces courbes ont été tracées à l'aide d'une régression non linéaire de type Boltzmann :

$$I = I_{max} / (1 + \exp((V_m - V_{1/2 \text{ inact}}) / k)) \quad \text{Equation 3}$$

Afin d'étudier la levée d'inactivation des canaux Nav1.5, un protocole constitué d'une dépolarisation de -120 mV à -20 mV pendant 1 s (stimulation P1), suivie d'une repolarisation à -120 mV pendant 1 à 200 ms, avant une nouvelle stimulation à -20 mV pendant 20 ms (stimulation P2), toutes les 5 s, a été utilisé. La constante de temps (τ_{rec}) et l'amplitude (A) de levée d'inactivation ont été déterminées à l'aide d'une régression non linéaire du pic de courant Na^+ mesuré en P2 normalisé par rapport au pic de courant mesuré en P1, à l'aide d'une équation de type mono-exponentielle :

$$I = A (1 - \exp(-t / \tau_{rec})) \quad \text{Equation 4}$$

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

V. Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous la forme de moyenne \pm l'erreur standard à la moyenne (SEM). Les différences sont statistiquement testées en utilisant un test non-paramétrique de Mann-Whitney. Une valeur de $p < 0,05$ est considérée comme significative.

Résultats

I. Projet 1 - Rôle de la phosphorylation dans la régulation de l'expression des canaux Nav1.5 à la surface cellulaire

I.1. Objectif du projet

Comme nous l'avons vu en introduction, la phosphorylation est un mécanisme majeur de régulation des canaux Nav1.5 cardiaques, qui a été décrite pour réguler leurs propriétés biophysiques, mais également leur expression à la surface cellulaire. Plusieurs études ont montré le rôle de la PKA, de la PKC et de la SGK1 dans cette régulation, et plusieurs sites ont été suggérés comme cibles de ces kinases : S525 et S528 pour la PKA, S483, S484 et S664 pour la SGK1 et S1503 pour la PKC. Cependant, le rôle de ces kinases et de ces sites dans la régulation des canaux Nav1.5 à la surface cellulaire dans les cardiomyocytes reste mal caractérisé. L'approche de phosphoprotéomique développée au laboratoire a permis d'identifier 19 sites de phosphorylation natifs des canaux Nav1.5 (Burel et al., en révision) (**Figure 15**).

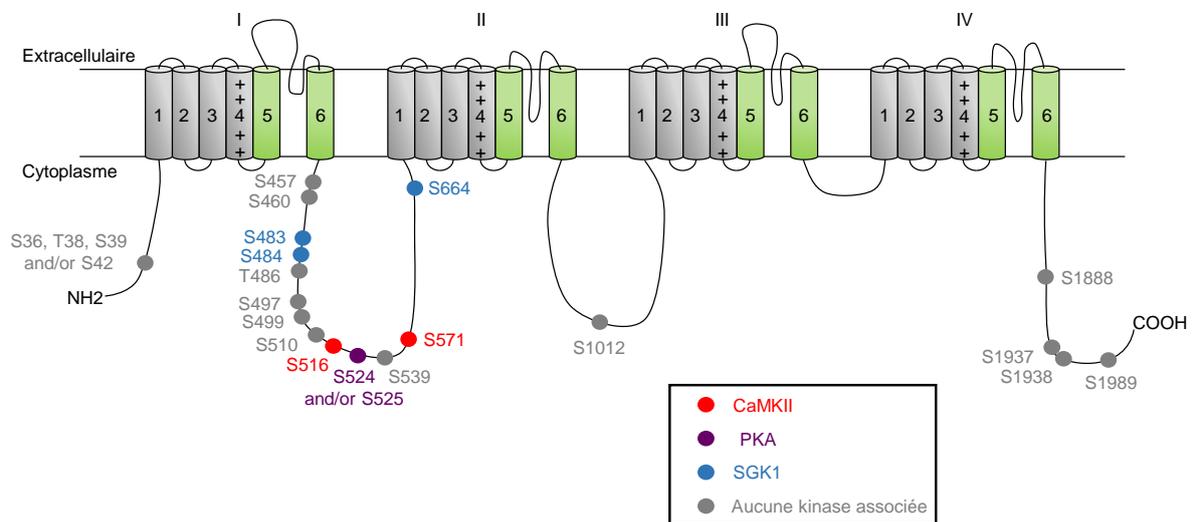


Figure 15. Localisation des sites de phosphorylation natifs des canaux Nav1.5 identifiés par phosphoprotéomique et kinases associées. Dix-neuf sites de phosphorylation natifs des canaux Nav1.5 ont été identifiés par phosphoprotéomique à partir de ventricules de souris. Les sites représentés en rouge ont été décrits pour être phosphorylés par la CaMKII, ceux en violet par la PKA, ceux en bleu par la SGK1, ceux représentés en gris n'ont été associés à aucune kinase (Adapté d'après Burel et al., en révision et Marionneau et Abriel, 2015). CaMKII, Ca^{2+} /CaM-dependent protein kinase II ; PKA, Protéine Kinase A ; SGK1, *Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase 1*.

Le premier objectif de ma thèse a été de déterminer le rôle de chacun de ces sites dans la régulation de l'expression des canaux Nav1.5 à la surface cellulaire. Pour cela, j'ai développé une approche de mutagenèse dirigée qui a consisté à muter chacun de ces sites soit en alanine (A), pour éliminer le site de phosphorylation, soit en glutamate (E), pour mimer la phosphorylation par ajout d'une charge négative. Ces différents phosphomutants ont été exprimés dans des cellules HEK293, et leur expression totale et à la surface cellulaire a dans un premier temps été évaluée à l'état basal par des essais de biotinylation. Dans un deuxième temps, nous avons cherché à reproduire ces expériences après activation ou inhibition des kinases PKA, PKC ou SGK1.

I.2. Résultats

I.2.a. Rôle des sites de phosphorylation identifiés dans la régulation de l'expression des canaux Nav1.5 à la surface cellulaire

Des essais de biotinylation ont été réalisés à partir de cellules HEK293 transfectées de façon transitoire avec le canal Nav1.5 sauvage (WT) ou avec les différents phosphomutants, permettant ainsi d'évaluer la quantité de Nav1.5 totale et exprimée à la membrane plasmique. La **Figure 16** illustre les résultats obtenus pour les phosphomutants des S483, S484 et S664, précédemment décrites pour être des cibles de la SGK, et de la S525, cible de la PKA. Le récepteur à la transferrine (TransR), protéine endogène exprimée à la membrane plasmique, a été utilisé comme protéine de référence, et l'analyse de l'expression de la GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) a permis de vérifier l'absence de contamination des fractions biotinylées, c'est-à-dire des protéines exprimées à la membrane plasmique, par des protéines cytoplasmiques. La mutation des sérines 483, 484, 525 ou 664 en alanine (A) ou glutamate (E) n'induit pas de différence d'expression totale ou à la surface cellulaire du canal Nav1.5 par rapport au canal Nav1.5-WT. Ce résultat est représentatif des résultats obtenus pour chacun des autres phosphomutants générés (données non présentées). En conclusion, le fait d'éliminer ou de mimer la phosphorylation sur chacune de ces sérines n'induit pas de différence d'expression totale ou à la surface cellulaire du canal Nav1.5 à l'état basal.

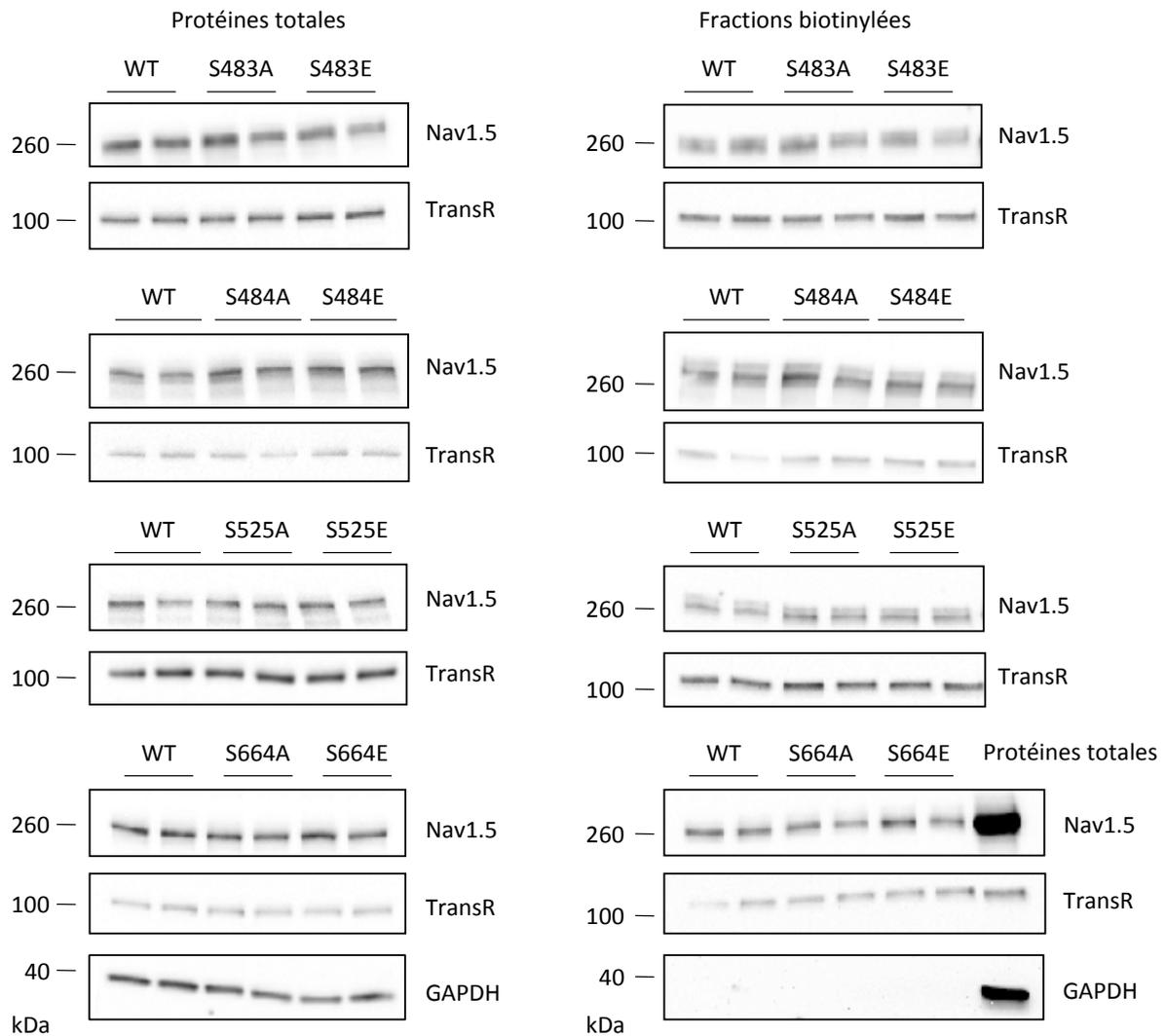


Figure 16. Expression totale et à la surface cellulaire des phosphomutants du canal Nav1.5. Le canal Nav1.5 sauvage (WT) ou les phosphomutants S483, S484, S525 ou S664 alanine (A) ou glutamate (E) ont été transfectés avec Navβ1 de façon transitoire dans des cellules HEK293, et l'expression totale (à gauche) et à la surface cellulaire (à droite) du canal Nav1.5 a été évaluée par des essais de biotinylation et western blots. GAPDH, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ; kDa, kilodalton ; TransR, Récepteur à la transferrine.

I.2.b. Régulation de l'expression des canaux Nav1.5 à la surface cellulaire par la PKA

Etant donné l'absence d'effet des phosphomutants de Nav1.5 à l'état basal, nous avons ensuite cherché à activer ou inhiber les différentes kinases connues pour réguler les canaux Nav1.5 afin de déterminer l'implication de chacune d'entre elles dans la régulation de l'expression des canaux Nav1.5 à la surface cellulaire dans les cellules HEK293. L'objectif étant de reproduire par la suite ces expériences avec les phosphomutants de Nav1.5, pour déterminer le rôle des sites de phosphorylation identifiés dans cette régulation. Nous avons dans un premier temps cherché à activer la PKA, qui a été décrite pour augmenter l'expression du canal à la surface cellulaire dans les cardiomyocytes, mais aussi dans les cellules HEK293. Pour cela, les cellules HEK293 transfectées avec Nav1.5 ont été traitées pendant 30 min ou 1h avec du Sp-5,6-DCI-cBIMPS (0,5 mM), un activateur de la PKA. Ces expériences ont montré que l'activation de la PKA ne modifie pas l'expression de Nav1.5 dans les fractions totales ni dans les fractions biotinylées, par rapport à la condition contrôle non traitée (**Figure 17A**). Afin de nous assurer que l'absence d'effet n'était pas due à une activation non optimale de la PKA, nous avons répété cette expérience sur des cellules traitées pendant 4 h avec du Sp-5,6-DCI-cBIMPS (0,5 mM), ou un cocktail d'activateurs de la PKA comprenant de la Forskoline (10 μ M) et de l'IBMX (3-isobutyl-1-méthylxanthine, 100 μ M). Dans ces conditions, l'activation de la PKA augmente l'expression de Nav1.5 dans les fractions totales et dans les fractions biotinylées, par rapport à la condition contrôle non traitée ou par rapport à la condition dans laquelle les cellules ont été traitées avec 0,1% de DMSO (Diméthyl sulfoxyde) (**Figure 17B**). Afin de déterminer si l'effet observé était dépendant de la phosphorylation des canaux Nav1.5, c'est-à-dire associé à une régulation post-traductionnelle, nous avons reproduit l'expérience en présence de cycloheximide, un inhibiteur de la traduction protéique. La **Figure 17C** illustre les résultats obtenus et montre que l'augmentation d'expression induite par le Sp5-6 DCI est inhibée en présence de cycloheximide, suggérant que l'effet observé est transcriptionnel ou traductionnel, et ne dépend donc pas de la phosphorylation du canal Nav1.5 par la PKA. En conclusion, nos résultats n'ont pas révélé de rôle de la phosphorylation des canaux Nav1.5 par la PKA dans la régulation de leur expression à la surface cellulaire dans les cellules HEK293.

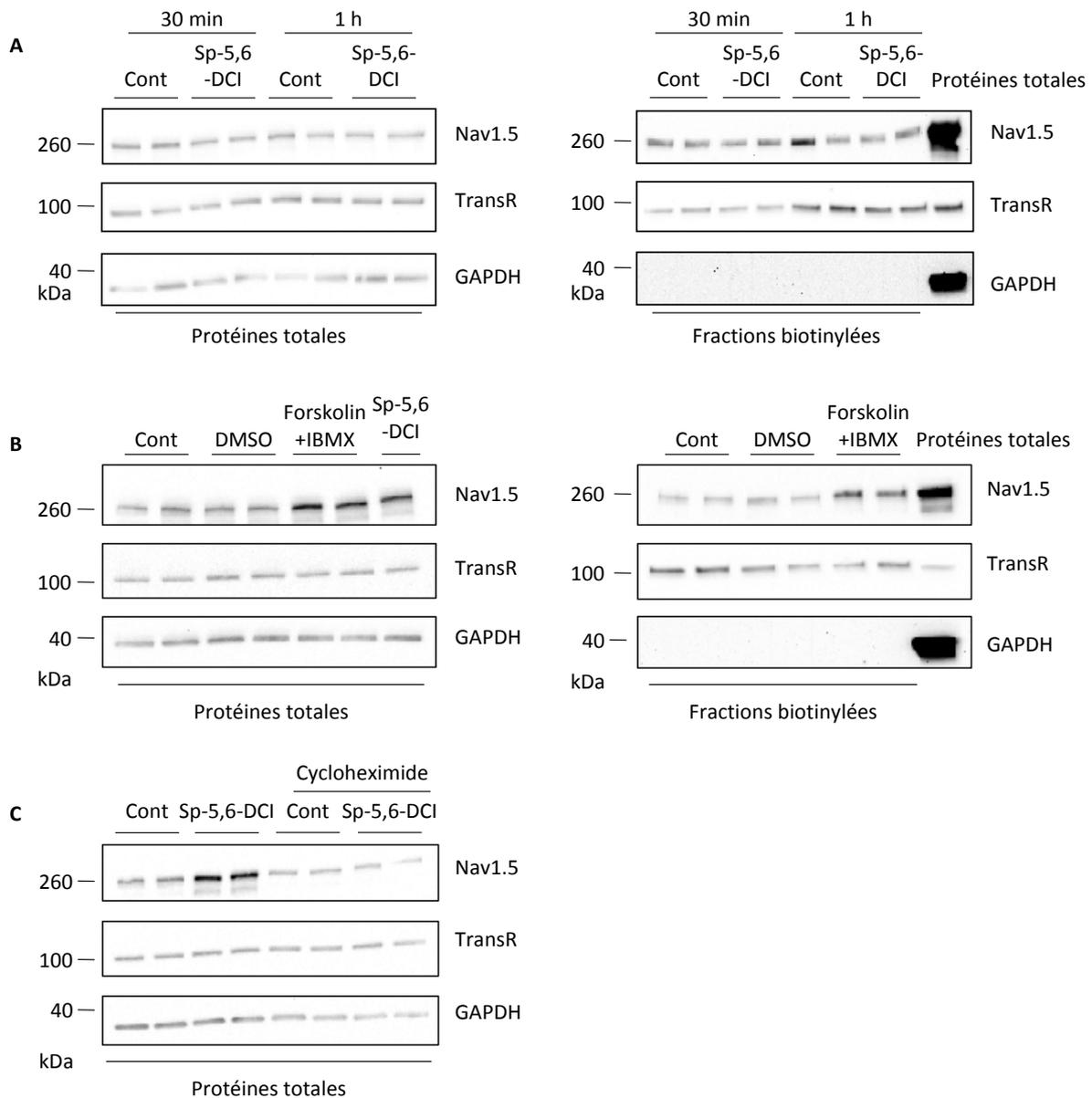


Figure 17. Régulation de l'expression totale et à la surface cellulaire des canaux Nav1.5 par la PKA. Les cellules HEK293 transfectées de façon transitoire avec Nav1.5 et Nav β 1 ont été traitées pendant **(A)** 30 min ou 1 h avec du Sp-5,6-DCl-cBIMPS (0,5 mM), ou **(B)** pendant 4 h avec un cocktail de Forskoline (10 μ M) et d'IBMX (100 μ M), ou du Sp-5,6-DCl-cBIMPS (0,5 mM), **(C)** en absence ou présence de cycloheximide (100 μ g/mL). L'expression totale et à la surface cellulaire du canal a été évaluée par des essais de biotinylation et western blots. DMSO, Dimethyl sulfoxyde ; GAPDH, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ; IBMX, 3-isobutyl-1-méthylxanthine ; kDa, kilodalton ; PKA, Protéine Kinase A ; TransR, Récepteur à la transferrine.

I.2.c. Régulation de l'expression des canaux Nav1.5 à la surface cellulaire par la PKC

Nous avons ensuite cherché à moduler la voie de la PKC, dont l'activation dans les cardiomyocytes et les cellules HEK293 a été décrite pour diminuer l'expression des canaux Nav1.5 à la surface cellulaire. Comme illustré dans la **Figure 18A**, l'activation de la PKC par traitement des cellules avec du PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate, 50 nM) pendant 30 min ou 1 h ne modifie pas l'expression de Nav1.5 dans les fractions totales ni dans les fractions biotinylées par rapport à la condition contrôle dans laquelle les cellules ont été mises en contact avec 0,1% de DMSO. Nous avons ensuite augmenté le temps de traitement des cellules HEK293 avec le PMA, afin de nous assurer que l'absence d'effet n'était pas due à un temps de traitement trop court. Comme illustré **Figure 18B**, le traitement des cellules HEK293 pendant 4 h avec du PMA augmente l'expression de Nav1.5 à la fois dans les fractions totales et dans les fractions biotinylées, par rapport à la condition contrôle. Cet effet est partiellement inhibé lorsque les cellules sont incubées simultanément avec du Gö6976 (1 μ M), un inhibiteur spécifique de la PKC, suggérant que cet effet est bien spécifique à la PKC. Ces résultats étant contradictoires avec ceux reportés dans la littérature, nous avons ensuite cherché à déterminer si l'effet observé était dû à une modification de Nav1.5 par phosphorylation, c'est-à-dire à un effet post-traductionnel, en répétant la même expérience en présence de cycloheximide. Comme illustré dans la **Figure 18C**, en présence de cycloheximide le traitement des cellules HEK293 avec le PMA n'induit aucun changement d'expression des canaux Nav1.5 par rapport à la condition contrôle. Ce résultat suggère que l'effet observé n'est pas spécifique à la phosphorylation des canaux Nav1.5 par la PKC, mais est plutôt lié à une activation de la transcription ou de la traduction de Nav1.5. L'effet de la PKC a également été étudié dans des cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés en culture traités avec du PMA ou de l'OAG (1-oleoyl-2-acetyl-glycerol), un autre activateur de la PKC, et les résultats représentés dans la **Figure 18D** ne montrent aucune différence d'expression de Nav1.5 dans les fractions totales ou biotinylées par rapport à la condition contrôle. En conclusion, les expériences réalisées n'ont révélé aucun effet spécifique de la phosphorylation par la PKC sur la régulation de l'expression des canaux Nav1.5 à la surface cellulaire, que ce soit dans les cellules HEK293 ou dans les cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés en culture.

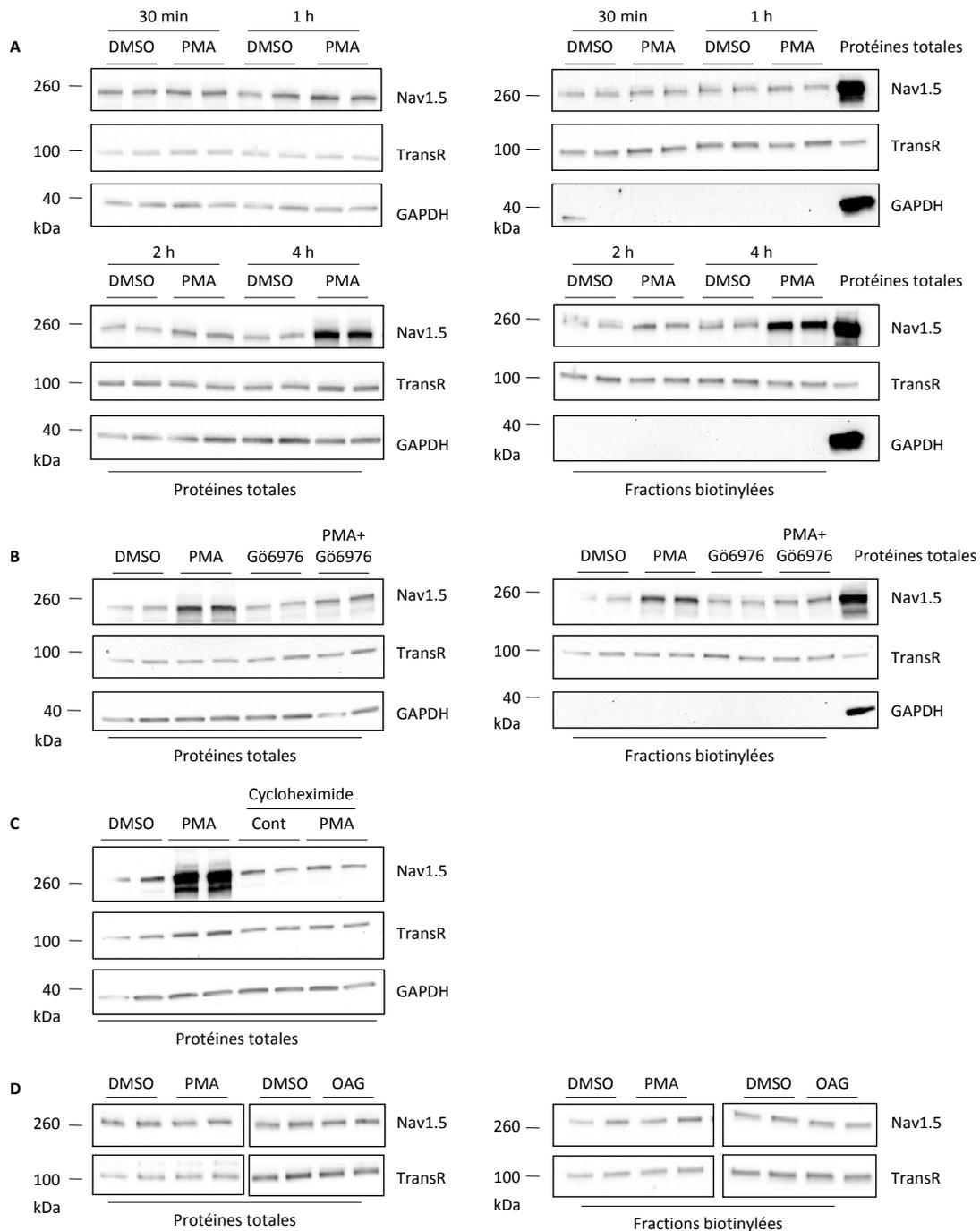


Figure 18. Régulation de l'expression totale et à la surface cellulaire des canaux Nav1.5 par la PKC. Expression totale et à la surface cellulaire du canal Nav1.5 évaluée par essais de biotinylation et western blots réalisés à partir de cellules HEK293 transfectées de façon transitoire avec Nav1.5 et Nav β 1 et traitées pendant **(A)** 30 min, 1 h, 2 h ou 4 h avec un activateur (PMA, 50 nM) de la PKC, ou **(B)** pendant 4 h avec du PMA (50 nM) et/ou un inhibiteur de la PKC (Gö6976, 1 μ M), **(C)** en absence ou présence de cycloheximide (100 μ g/mL) ; ou **(D)** à partir de cardiomyocytes ventriculaire de rats nouveau-nés en culture traités pendant 4 h avec du PMA (50 nM) ou de l'OAG (100 μ M). DMSO, Dimethyl sulfoxyde ; GAPDH, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ; kDa, kilodalton ; OAG, 1-oleoyl-2-acetyl-glycerol ; PKC, Protéine Kinase C ; PMA, Phorbol 12-myristate 13-acetate ; TransR, Récepteur à la transferrine.

I.2.d. Régulation de l'expression des canaux Nav1.5 à la surface cellulaire par la SGK1

Nous avons également cherché à moduler l'activité de la SGK1, qui a précédemment été décrite pour augmenter l'expression des canaux Nav1.5 à la surface cellulaire dans les cardiomyocytes. Comme illustré dans la **Figure 19**, les résultats n'ont montré aucune différence de l'expression totale et à la surface cellulaire des canaux Nav1.5 dans les cellules HEK293 transfectées avec un ADNc codant pour la SGK1 sauvage, l'isoforme constitutivement active (SGK1-S422D) ou inactive (SGK1-K127M) de la SGK1, par rapport à la condition contrôle dans laquelle les cellules ont été transfectées avec un ADNc codant pour la GFP. En conclusion, l'activation de la SGK1 dans les cellules HEK293 n'induit aucune différence d'expression des canaux Nav1.5 à la surface cellulaire, ce qui n'est pas cohérent avec les études précédentes.

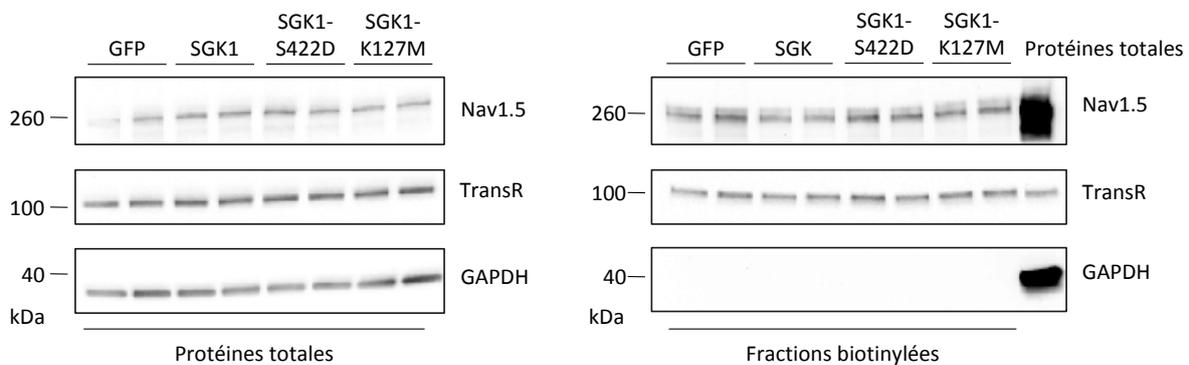


Figure 19. Régulation de l'expression totale et à la surface cellulaire des canaux Nav1.5 par la SGK1. Expression de Nav1.5 dans les fractions totales et biotinylées obtenues à partir de cellules HEK293 transfectées avec Nav1.5 et la GFP, la SGK1, l'isoforme constitutivement active (SGK1-S422D) ou constitutivement inactive (SGK1-K127M) de la SGK1. GAPDH, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ; GFP, *Green Fluorescent Protein* ; kDa, kilodalton ; SGK, *Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase 1* ; TransR, Récepteur à la transferrine.

I.3. Discussion

L'objectif de ce premier projet était de déterminer le rôle de la phosphorylation des canaux Nav1.5 dans la régulation de leur expression à la surface cellulaire. En effet, plusieurs études ont démontré que la phosphorylation participe à ce mécanisme de régulation (Das et al., 2012; Hallaq et al., 2012; Hallaq et al., 2006; Zhou et al., 2002), mais les kinases et sites de phosphorylation impliqués, et le rôle de cette phosphorylation dans les cardiomyocytes, restent mal caractérisés. Nous avons donc choisi de cribler le rôle de chacun des 19 sites de phosphorylation natifs des canaux Nav1.5 identifiés par phosphoprotéomique (Burel et al., en révision) dans la régulation de l'expression des canaux Nav1.5 à la surface cellulaire. Ainsi, les phosphomutants générés pour chaque site ont été transfectés de façon transitoire dans des cellules HEK293, et leur expression totale et à la surface cellulaire a été étudiée par des essais de biotinylation et western blots, et comparée à celle du canal Nav1.5 sauvage. Cette approche a révélé qu'aucun des phosphomutants générés n'induit de différence d'expression de Nav1.5 à la surface cellulaire par rapport au canal Nav1.5 sauvage. Ces résultats sont contradictoires avec les travaux réalisés précédemment qui ont montré l'implication de certains de ces sites dans la régulation des canaux Nav1.5 par la PKA, la PKC et la SGK1.

En particulier, l'absence d'effet des phosphomutants S525A/E peut paraître étonnante, car ce site a été décrit comme étant impliqué dans l'augmentation du courant I_{Na} et du nombre de canaux Nav1.5 exprimés à la surface cellulaire après activation de la PKA (Hallaq et al., 2006; Zhou et al., 2002). L'absence d'effet des phosphomutants sur l'expression des canaux Nav1.5 à la surface cellulaire peut notamment s'expliquer par le fait que la phosphorylation d'un site unique n'est peut-être pas suffisante, et que plusieurs sites doivent être phosphorylés simultanément pour induire un effet sur l'expression des canaux Nav1.5 à la surface cellulaire. Ainsi, il serait intéressant de réaliser les mêmes expériences avec des phosphomutants du canal Nav1.5 éliminant ou mimant simultanément la phosphorylation de plusieurs sites, en particulier ceux qui sont à proximité les uns des autres. Une autre approche intéressante pourrait consister à muter en alanine ou glutamate tous les sites de phosphorylation d'un domaine du canal Nav1.5 (extrémité N-terminale, boucle intracellulaire I-II,...), comme cela a par exemple été fait pour le canal Cav3.2 neuronal (Blesneac et al., 2015), afin d'évaluer si certains sites localisés dans ces domaines sont impliqués dans la régulation de l'expression des canaux Nav1.5 à la surface cellulaire. Il est également possible que le

mimétisme de la phosphorylation par le remplacement des sérines par le glutamate ne soit pas efficace. Il est également possible que la PKA ne soit pas activée à l'état basal dans les cellules HEK293, ce qui expliquerait l'absence d'effet des phosphomutants alanine, qui éliminent la phosphorylation. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons donc dans un deuxième temps cherché à reproduire les effets de la PKA sur la régulation de l'expression des canaux Nav1.5 à la surface cellulaire décrits dans la littérature, avec comme objectif par la suite de reproduire les expériences avec les phosphomutants Nav1.5. Cependant, ces expériences ne nous ont pas permis de montrer d'effet spécifique de la phosphorylation des canaux Nav1.5 par la PKA sur la régulation de leur expression à la surface cellulaire. En effet, le traitement des cellules HEK293 avec des activateurs de la PKA pendant 30 min ou 1 h n'ont pas montré d'effet sur l'expression totale ou à la surface cellulaire du canal Nav1.5. Au contraire, nous avons observé une augmentation d'expression totale et à la surface cellulaire des canaux Nav1.5 après activation de la PKA pendant 4 h, mais cet effet est aboli par l'incubation des cellules avec du cycloheximide, un inhibiteur de la traduction protéique. Cela suggère que l'effet observé n'est pas dépendant de la phosphorylation, mais est plutôt dû à une augmentation de la transcription ou de la traduction protéique. Les doses et temps de traitement que nous avons utilisés pour activer la PKA étant similaires à ceux qui ont été décrits dans la littérature, nous pouvons nous interroger sur la pertinence et la spécificité des effets observés précédemment concernant la régulation de l'expression des canaux Nav1.5 à la surface cellulaire dans les cellules HEK293 par la PKA.

Nous avons également cherché à activer la voie de la PKC, décrite pour diminuer l'expression du canal Nav1.5 à la surface cellulaire. Or, de façon similaire à ce que nous avons observé pour la PKA, l'activation de la PKC pendant 30 min ou 1 h dans les cellules HEK293 par le PMA n'induit pas d'effet sur l'expression totale ou à la surface cellulaire de Nav1.5. Au contraire, un traitement pendant 4 h induit une augmentation d'expression de Nav1.5 dans les fractions totales et biotinylées. Cet effet est partiellement inhibé par l'incubation des cellules avec du Gö6976, un inhibiteur spécifique de la PKC, ce qui montre que cette augmentation est bien due à la PKC. Cependant, l'augmentation d'expression de Nav1.5 est abolie par l'incubation préalable des cellules avec du cycloheximide, ce qui suggère que l'effet n'est pas spécifique à la phosphorylation des canaux Nav1.5 par la PKC. En conclusion, nos résultats ne nous ont pas permis de mettre en évidence de rôle de la phosphorylation par la

PKC dans la régulation de l'expression des canaux Nav1.5 à la surface cellulaire dans les cellules HEK293. Ces résultats sont contradictoires avec ceux du groupe de Katherine Murray, qui a montré une diminution de l'expression des canaux Nav1.5 à la membrane plasmique après activation de la PKC (Hallaq et al., 2012; Shin et Murray, 2001). Cependant, il faut noter que les résultats concernant la régulation des canaux Nav1.5 à la surface cellulaire par la PKC sont controversés, et une étude du groupe de Samuel Dudley a notamment montré que l'activation de la PKC induit une augmentation d' I_{Na} sans changement d'expression des canaux Nav1.5 à la surface cellulaire (Liu et al., 2009). De façon cohérente avec ces résultats, nous n'avons pas montré d'effet de la PKC dans la régulation de l'expression des canaux Nav1.5 à la membrane plasmique des cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés en culture.

Nous nous sommes également intéressés au rôle de la SGK1, décrite pour augmenter le courant I_{Na} et l'expression des canaux Nav1.5 à la surface cellulaire dans les cellules HEK293 et dans les cardiomyocytes (Boehmer et al., 2003; Das et al., 2012). Ces études ont suggéré l'implication des S484 et S664 dans la régulation des paramètres biophysiques des canaux Nav1.5 par la SGK1, mais le rôle de ces sites dans la régulation de l'adressage du canal à la surface cellulaire n'a pas été démontré. Nos travaux n'ont pas révélé d'effet des phosphomutants S484A/E, S484A/E ou S664A/E sur l'expression du canal Nav1.5 à la surface cellulaire. Il est donc possible que ces sites ne soient pas impliqués dans cet aspect de la régulation des canaux Nav1.5 par la SGK1. Il se peut également que ces sites ne soient pas les seuls dont la phosphorylation est nécessaire pour induire une augmentation d'expression des canaux Nav1.5 à la surface cellulaire. De façon similaire à l'approche adoptée pour la PKA et la PKC, nous avons cherché à moduler l'activité de la SGK1. Cependant, la transfection d'isoformes constitutivement active ou inactive de la SGK1 dans les cellules HEK293 ne nous a pas permis de montrer d'effet de cette kinase dans la régulation de l'expression du canal Nav1.5 à la surface cellulaire. Ceci est contradictoire avec l'étude du groupe de Gordon Tomaselli, qui a montré que l'expression d'une isoforme constitutivement active de la SGK1 dans des cardiomyocytes de rats nouveau-nés augmente l'expression de Nav1.5 à la surface cellulaire (Das et al., 2012). Il est toutefois possible que cette discordance soit due à la différence de modèles cellulaires utilisés, et il serait donc intéressant de reproduire cette approche dans des cardiomyocytes de rats nouveau-nés par exemple, afin de déterminer si nous pouvons confirmer les résultats de cette étude.

L'ensemble des expériences réalisées dans le cadre de ce projet n'ont montré aucun effet des sites de phosphorylation nouvellement identifiés, ni de la PKA, de la PKC ou de la SGK1 sur la régulation de l'expression des canaux Nav1.5 à la surface cellulaire dans les cellules HEK293. Ces résultats sont contradictoires avec la littérature, et ne permettent pas d'apporter de réponse claire quant au rôle de la phosphorylation des canaux Nav1.5 dans ce mécanisme de régulation. Outre les arguments énoncés précédemment pour expliquer l'absence d'effet observée, il est également possible que les conditions nécessaires à l'activation des kinases étudiées ne soient pas réunies dans les cellules HEK293, et/ou que certaines protéines impliquées dans la régulation du canal par ces kinases soient par exemple absentes. Il paraît donc essentiel de développer des études similaires dans un modèle cellulaire cardiaque, plutôt que dans un système d'expression hétérologue, tel que des cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés ou adultes en culture. Il faut également noter que la plupart des études portant sur cet aspect de la régulation des canaux Nav1.5 se sont basées le plus souvent sur l'étude du courant I_{Na} et sur l'utilisation de techniques de microscopie (Aiba et al., 2014; Hallaq et al., 2012; Hallaq et al., 2006), et que peu d'études ont utilisé une approche biochimique (Aiba et al., 2014). Il est donc possible que nous n'ayons pas pu mettre en avant d'effet sur la régulation de l'expression des canaux Nav1.5 à la surface cellulaire car la sensibilité de la technique de western blot ne permet peut-être pas de révéler de faibles différences d'expression.

En conclusion, les expériences réalisées dans le cadre de ce projet ne nous ont pas permis de mettre en évidence de rôle des sites de phosphorylation identifiés, ni des kinases précédemment décrites pour réguler les canaux Nav1.5, dans la régulation de leur expression à la surface cellulaire. Cependant, cela ne signifie pas nécessairement que les sites de phosphorylation identifiés n'ont pas d'effet sur la régulation du canal Nav1.5 à la surface cellulaire. En effet, l'ensemble des données obtenues suggèrent plutôt que l'étude de l'expression des canaux Nav1.5 à la surface cellulaire dans les cellules HEK293 par des essais de biotinylation ne constitue pas un bon modèle d'étude, et il semble nécessaire de développer ce type d'approches dans un modèle cellulaire plus physiologique, comme les cardiomyocytes de rats nouveau-nés par exemple.

II. Projet 2 - Rôle de la phosphorylation des sérines 1933 et 1984 dans les défauts d'inactivation des canaux Nav1.5 associés à l'insuffisance cardiaque

II.1. Objectif du projet

Comme décrit dans l'introduction, les propriétés d'inactivation des canaux Nav1.5 sont altérées dans l'insuffisance cardiaque, et plusieurs études suggèrent que ces défauts sont dus à l'activation de la CaMKII et à la phosphorylation directe des canaux Nav1.5 par celle-ci. Cependant, les sites de phosphorylation et les mécanismes moléculaires associés à ces défauts restent mal caractérisés. C'est pourquoi une approche de phosphoprotéomique des canaux Nav1.5 a été développée au laboratoire, afin d'identifier *in situ* les sites de phosphorylation des canaux Nav1.5 purifiés à partir de cœur de souris sauvages et en insuffisance cardiaque (souris CaMKII δ c-Tg, voir paragraphe IV.3, p34) (Burel et al., en révision). L'étude de l'abondance relative des phosphopeptides identifiés a montré que les phosphosérines S1938 et S1989 sont plus abondantes dans les ventricules des souris CaMKII δ c-Tg que dans les ventricules des souris sauvages. De façon intéressante, ces deux sites, correspondants aux S1933 et S1984 dans la séquence Nav1.5 humaine, sont localisés à proximité des sites de liaison du FGF13 et de la CaM, deux protéines partenaires clés dans la régulation de l'inactivation des canaux Nav1.5. Nous avons donc émis l'hypothèse que la phosphorylation de ces deux sérines pourrait moduler les propriétés d'inactivation des canaux Nav1.5 en altérant leur interaction avec le FGF13 et la CaM. Afin de tester cette hypothèse, les simples ou doubles phosphomutants alanine (A) ou glutamate (E), abolissant ou mimant la phosphorylation, ont été générés par mutagenèse dirigée et ont été exprimés dans des cellules HEK293, en absence ou en présence de FGF13. Des analyses de patch-clamp en configuration cellule entière ont été effectuées pour déterminer l'effet de ces phosphomutants sur les propriétés biophysiques du canal et sur le courant I_{NaL} , et des expériences de co-immunoprécipitation ont été réalisées afin d'évaluer leur impact sur l'interaction du FGF13 et de la CaM avec le canal Nav1.5. Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet ont fait l'objet d'un manuscrit en révision à *Cardiovascular Research*.

II.2. Résultats - Publication

C-TERMINAL PHOSPHORYLATION OF Nav1.5 IN HEART FAILURE IMPAIRS FGF13-DEPENDENT REGULATION OF CHANNEL INACTIVATION

Sophie Burel^{1-3*}, Fabien C. Coyan^{1-3*}, Maxime Lorenzini¹⁻³, Matthew R. Meyer⁴, Cheryl F. Lichti⁵, Joan H. Brown⁶, Gildas Loussouarn¹⁻³, Flavien Charpentier¹⁻³, Jeanne M. Nerbonne^{7,8}, R. Reid Townsend^{8,9}, Lars S. Maier¹⁰ and Céline Marionneau^{1-3†}

***These authors contributed equally.**

¹L'Institut du Thorax, INSERM UMR1087, ²CNRS UMR6291, ³Université de Nantes, Nantes, France, Departments of ⁴Medicine, ⁷Developmental Biology, ⁸Internal Medicine and ⁹Cell Biology and Physiology, Washington University Medical School, Saint Louis, MO, USA, ⁵Department of Pharmacology and Toxicology, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, USA, ⁶Department of Pharmacology, University of California, San Diego, CA, USA, and ¹⁰University Hospital Regensburg, Regensburg, Germany.

†Correspondence to: Céline Marionneau, L'Institut du Thorax, INSERM UMR1087, CNRS UMR6291, IRS-Université de Nantes, 8 Quai Moncousu, BP 70721, 44007 Nantes Cedex 1, Tel: +33 2 28 08 01 63, Fax : +33 2 28 08 01 30, Email: celine.marionneau@univ-nantes.fr

Word count: 6,772

Running Title: Phosphorylation and Inactivation of Cardiac Nav1.5 Channels

Abbreviations

CaMKII δ_c -Tg: Transgenic mouse overexpressing the cytosolic isoform of the *delta* subunit of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II

CTD: C-Terminal Domain of Nav channels

iFGF: intracellular Fibroblast Growth Factor

IP: Immunoprecipitation

MS: Mass Spectrometry

MS1: Mass spectrum of precursor ions

m α NavPAN: Anti-Nav α subunit monoclonal antibody

mIgG: Mouse Immunoglobulin G

Nav α subunit: Voltage-gated Na⁺ (Nav) channel pore-forming (α) subunit

pS: phosphoserine

pT: phosphothreonine

WT: Wild-Type

Abstract

Aims: Voltage-gated Na⁺ (Nav) channels are key regulators of myocardial excitability, determining depolarization, duration, waveform and refractoriness of action potentials. In heart failure, action potentials are prolonged, and evidence suggests that this arrhythmogenic abnormality is associated with Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) and altered phosphorylation of the main ventricular Nav channel subunit, Nav1.5. The global native phosphorylation patterns of Nav1.5 subunits in failing, compared with non-failing, ventricles, and the associated channel regulatory defects, however, remain unknown.

Methods and Results: Phosphoproteomic analyses were undertaken to identify and quantify *in situ* the phosphorylation sites on the Nav1.5 proteins purified from adult wild-type (WT) and failing CaMKII δ_c -overexpressing (CaMKII δ_c -Tg) mouse ventricles. Of the nineteen native Nav1.5 phosphorylation sites identified, two C-terminal phosphoserines at positions 1938 and 1989 showed increased phosphorylation in the CaMKII δ_c -Tg, compared with the WT, ventricles. Because these two phosphoserines are located in close proximity to the binding site for Fibroblast Growth Factor 13 (FGF13), we tested the hypothesis that phosphorylation at these sites impairs the FGF13-mediated regulation of channel inactivation. Whole cell voltage-clamp analyses in HEK293 cells demonstrated that FGF13 increases Nav1.5 channel availability and decreases late Na⁺ current, two effects that were abrogated with Nav1.5 mutants mimicking phosphorylation at both sites. Further co-immunoprecipitation experiments revealed that phosphorylation at both sites decreases the interaction of FGF13 and of calmodulin with Nav1.5.

Conclusions: These analyses provide two novel native phosphorylation sites in the C-terminus of Nav1.5 which show increased phosphorylation in failing mouse ventricles and impair FGF13-dependent regulation of channel inactivation.

Keywords: Cardiac Nav1.5 Channels; Native Phosphorylations; Phosphoproteomics; FGF13; Nav1.5 Channel Inactivation

Introduction

Voltage-gated Na^+ (Nav) channels are critical determinants of myocardial excitability, underlying the rapid upstroke of action potentials and functioning in the regulation of action potential duration, waveform, refractoriness and propagation. In heart failure, action potentials are prolonged and conduction is slowed, two abnormalities that increase the risk of arrhythmias (Aiba et al., 2013; Maltsev et Undrovinas, 2008; Toischer et al., 2013; Wagner et al., 2006). Among the major determinants involved in prolonging action potential duration in failing hearts is an increased late Na^+ current (I_{NaL}), generated by the Nav channels (Aiba et al., 2013; Maltsev et al., 2008b; Maltsev et Undrovinas, 2008; Toischer et al., 2013; Valdivia et al., 2005; Wagner et al., 2006). This increased I_{NaL} in failing hearts is sometimes accompanied by a reduced availability of Nav channels caused by a hyperpolarizing shift of the voltage-dependence of steady-state Na^+ current (I_{Na}) inactivation, hence contributing to conduction slowing (Aiba et al., 2013; Wagner et al., 2006). The primary determinant of cardiac I_{Na} is the $\text{Nav}1.5$ pore-forming (α) subunit, which consists in four homologous domains (DI to DIV), each containing six transmembrane segments, joined by three intracellular linker loops and flanked by cytoplasmic N- and C-termini. The molecular bases of cardiac I_{NaL} , in contrast, remain elusive. Several studies have linked the increased I_{NaL} , as well as the decreased Nav channel availability, observed in heart failure with the activation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) (Maltsev et al., 2008b; Toischer et al., 2013; Wagner et al., 2006) and associated altered phosphorylation of $\text{Nav}1.5$ (Wagner et al., 2006). Three phosphorylation sites in the first linker loop of $\text{Nav}1.5$, at positions 516 (Ashpole et al., 2012; Herren et al., 2015), 571 (Glynn et al., 2015b; Koval et al., 2012; Toischer et al., 2013) and 594 (Ashpole et al., 2012), have subsequently been suggested to play causative roles in these deleterious mechanisms. Nonetheless, the global native phosphorylation pattern of $\text{Nav}1.5$ channels in heart failure as well as the molecular mechanisms associated with altered phosphorylation that underlie the defects in channel inactivation remain unknown.

The understanding of $\text{Nav}1.5$ channel inactivation has received a lot of attention over the past decade and has recently been buttressed by the generation of several crystal structures of the cytoplasmic C-terminal domain (CTD) of $\text{Nav}1.5$ (as well as of other Nav subunits) in complex with Ca^{2+} -free or Ca^{2+} -bound calmodulin (CaM) and/or a member of the intracellular Fibroblast Growth Factor (iFGF) family of proteins (Chagot et Chazin, 2011; Gabelli et al., 2014; Wang et al., 2012; Wang et al., 2014). The Ca^{2+} -binding protein CaM acts as a sensor for Ca^{2+} and regulates fast inactivation of Nav channels, although postulated underlying mechanisms still elude consensus. Depending on whether CaM is loaded with Ca^{2+} , it binds different sites within and around the IQ-motif in the CTD and/or the third linker loop of Nav channels, thereby inducing conformational changes and affecting channel inactivation and the late Na^+ current (Chagot et Chazin, 2011; Gabelli et al., 2014; Kim et al., 2004; Sarhan et al., 2012; Shah et al., 2006; Wang et al., 2012; Wang et al., 2014). iFGFs, which include FGF11-14, are also constitutive Nav channel associated proteins, binding the CTD of Nav channels, just upstream of the IQ-motif (Gabelli et al., 2014; Goetz et al., 2009; Wang et al., 2012; Wang et al., 2014; Wang et al., 2011a; Wang et al., 2011b). The most consistent effect of iFGFs is to increase the availability of Nav channels by shifting the voltage-dependence of steady-state inactivation towards depolarized potentials (Bosch et al., 2015; Goetz et al., 2009; Shavkunov et al., 2013; Wang et al., 2012; Wang et al., 2011a; Wang et al., 2011b). The central role of the $\text{Nav}1.5$ CTD as well as of iFGFs and CaM in regulating the inactivation properties of $\text{Nav}1.5$ channels is highlighted by the effects of many mutations observed in the arrhythmic long QT3 and Brugada syndromes that map to their binding interfaces (Gabelli et al., 2014; Gabelli et al., 2015; Musa et al., 2015).

The present study uses a mass spectrometry (MS)-based phosphoproteomic analysis to identify and quantify *in situ* the native phosphorylation sites on the Nav1.5 proteins purified from failing CaMKII δ_c -overexpressing (CaMKII δ_c -Tg), *versus* non-failing (wild-type, WT), mouse ventricles. Further biochemical and electrophysiological investigations determined the impact of phosphorylation at two C-terminal serines on the interaction of FGF13 and CaM with Nav1.5 and on the inactivation properties of Nav1.5 channels.

Methods

Animals were handled in accordance with the guidelines from Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes. Generation and characterization of the CaMKII δ_c -Tg mouse line have been described previously (Zhang et al., 2003). Detailed methods are provided in the online **Supplementary Data**.

Immunoprecipitations

Flash-frozen ventricles from 13 months-old WT and CaMKII δ_c -Tg mice were homogenized in ice-cold lysis buffer, and soluble protein fractions were used for immunoprecipitations (IP) with an anti-NavPAN monoclonal antibody (m α NavPAN, Sigma) as described previously (Marionneau et al., 2012). For co-immunoprecipitations of heterologously expressed proteins, Human Embryonic Kidney 293 (HEK293) cells were lysed 48 hours after transfection, and IPs were performed as above. IP samples were loaded on SDS-PAGE gels and analyzed using SYPRO Ruby staining or western blotting.

Mass Spectrometry

IP samples were digested in solution and analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using previously described methods (Marionneau et al., 2012). Database searching was performed with MASCOT against the UNIPROT mouse protein database, and data were visualized using Scaffold. Phosphopeptide spectra were manually interpreted. Label-free quantitative analyses of peptide and protein abundances were completed using the Rosetta ElucidatorTM (Neubert et al., 2008) and DAnTE (Polpitiya et al., 2008) statistical softwares, respectively.

Plasmids

The Nav1.5 phosphomutant constructs were generated by site-directed mutagenesis of the pCI-Nav1.5 plasmid containing the human Nav1.5 hH1C cDNA (NM_000335). The human Nav β 1 cDNA (NM_001037, a gift from A. L. George) was subcloned into pRc/CMV. The human transcript variant 2 of FGF13 (NM_001139500), subcloned into pCMV6-XL5, was purchased from Amsbio.

Transfections

HEK293 cells were transiently transfected in 35 mm dishes with 0.9 μ g of the WT or phosphomutant Nav1.5 plasmids, 0.45 μ g of the Nav β 1 plasmid, with or without 0.45 μ g of the FGF13 plasmid using Lipofectamine 2000. For patch-clamp recordings, transfections also contained 0.2 μ g of the pEGFP plasmid. The empty pcDNA3.1 plasmid was used as a filler plasmid to keep the total DNA constant at 2 μ g in each transfection.

Electrophysiological Recordings

Whole cell Nav currents were recorded at room temperature from transiently transfected HEK293 cells 48 hours after transfection using indicated voltage-clamp protocols.

Statistics

Results are expressed as means \pm SEM. Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney test.

Results

Purification and Characterization of Nav Channel Complexes from WT and CaMKII δ_c -Tg Mouse Ventricles

Total lysates from four adult WT and four CaMKII δ_c -Tg (Zhang et al., 2003) mouse ventricles were prepared, pooled and used in eight distinct IPs (four WT IPs and four CaMKII δ_c -Tg IPs) using the m α Nav β PAN specific antibody. As illustrated in **Figure 1A** and consistent with previous findings (Wagner et al., 2006), western blot analyses of total lysates showed greater Nav1.5 protein expression in the CaMKII δ_c -Tg, compared with the WT, ventricles. This difference in total protein expression resulted in significantly ($p < 0.05$) higher Nav1.5 protein abundance (3.8-fold) in the m α Nav β PAN-IPs from the CaMKII δ_c -Tg, than from the WT, ventricles (**Figures 1A & 1B**). Accordingly, analyses of m α Nav β PAN-IPs on SYPRO Ruby-stained gels revealed the presence of a band corresponding to the molecular weight of Nav α subunits (Marionneau et al., 2012), the intensities of which are higher in the CaMKII δ_c -Tg IPs than in the WT IPs (**Figure 1C**).

The protein components of isolated Nav channel complexes from WT and CaMKII δ_c -Tg ventricles were identified by MS using three distinct mass spectrometers: a LTQ-Orbitrap XL, a LTQ-Orbitrap Elite and a TripleTOF 5600 Plus. The Nav1.5 protein was the most abundant protein in the m α Nav β PAN-IPs from both WT and CaMKII δ_c -Tg ventricles with average numbers of total exclusive MS/MS spectra acquired increasing from 95 using the Orbitrap XL to 177 using the Orbitrap Elite and 524 using the TripleTOF (**Figure 2A**). These greater sensitivities of the Orbitrap Elite and TripleTOF mass spectrometers improved the Nav1.5 amino acid sequence coverage from 27% to 28% and 32%, respectively, and from 36% to 38% and 43% with the transmembrane domains removed. Nav1.4 was the second most abundant Nav α subunit with much fewer spectra acquired: 5, 7 and 30 using the Orbitrap XL, Orbitrap Elite and TripleTOF, respectively. Most interestingly, the greater sensitivity of the TripleTOF mass spectrometer allowed the identification of three additional Nav α subunits, Nav1.7 (4 spectra), Nav1.3 (3 spectra) and Nav1.8 (2 spectra). These experiments also led to the reliable identification of several previously identified Nav1.5 channel associated/regulatory proteins (Abriel et al., 2015), including the δ , β and γ subunits of CaMKII, CaM, FGF13 and ankyrin-G (**Figure 2C**). **Supplementary Tables 1, 2 and 3** provide the complete lists of identified peptides and proteins using the Orbitrap XL, Elite and the TripleTOF mass spectrometers, respectively.

The relative abundances of identified proteins in the m α Nav β PAN-IPs from the failing CaMKII δ_c -Tg, *versus* the non-failing WT, ventricles were calculated from the (Orbitrap XL) MS1 peptide data using the DAnTE statistical analysis tool (Polpitiya et al., 2008). Consistent with the biochemistry data (**Figure 1**), the Nav1.5 protein is 2.9-fold ($p < 0.001$) more represented in the CaMKII δ_c -Tg IPs than in the WT IPs (**Figure 2C**). Interestingly, this quantitative MS analysis also revealed that of the ten Nav1.5 associated/regulatory proteins identified, the abundance ratios of CaMKII δ , β 2-syntrophin and dystrophin in the CaMKII δ_c -Tg, *versus* the WT, IPs are substantially greater than the 2.9-fold abundance ratio obtained for Nav1.5. On the contrary, the CaMKII β and γ subunits as well as CaM and FGF13 are relatively less represented compared with Nav1.5. The abundance ratios obtained for ankyrin-G, plakophilin-2 and α 1-syntrophin are close to the Nav1.5 abundance ratio. Taken together, these observations demonstrate that Nav1.5 is more expressed in the CaMKII δ_c -Tg, than in the WT, mouse ventricles, which, as a consequence, leads to greater IP yields from the CaMKII δ_c -Tg, than from the WT, ventricles. These analyses also suggest different relative compositions of

associated/regulatory proteins in Nav1.5 channel complexes in the failing, compared with the non-failing, ventricles.

Identification of Native Nav1.5 Phosphorylation Sites from WT and CaMKII δ_c -Tg Mouse Ventricles

In order to determine the global native phosphorylation pattern of Nav1.5 channels associated with heart failure, the phosphorylation sites on the Nav1.5 proteins purified from the CaMKII δ_c -Tg and the WT mouse ventricles were identified and compared directly. This phosphoproteomic analysis unambiguously allowed the identification of nineteen native phosphorylation sites on the mouse ventricular Nav1.5 protein (**Figures 2B & 3**). **Table 1** lists the phosphopeptides enabling the best phosphorylation site assignment(s), with the mass spectrometer used for the identification and the percentages of maximum intensities of site-discriminating ions, for each phosphorylation site. Representative MS/MS (and MS1) phosphopeptide spectra are presented in **Supplementary Figures 1**. Descriptions of all detected site-discriminating and supporting ions (calculated mass errors, confirmations of charge states) are given in **Supplementary Tables 4**. Among the nineteen Nav1.5 phosphoserines (pS) or phosphothreonines (pT) identified, ten (in blue) had already been identified in our previous phosphoproteomic analyses (Marionneau et al., 2012) and nine (in red) are novel (**Figures 2B & 3**). These nine novel phosphorylation sites are located in the first (pT486, pS499, pS516 and pS539) and second (pS1012) intracellular linker loops as well as in the CTD (pS1888, pS1937, pS1938 and pS1989) of Nav1.5. Interestingly, the three C-terminal pS1888, pS1937 and pS1938 are in close proximity to the binding sites for the iFGFs (Gabelli et al., 2014; Goetz et al., 2009; Wang et al., 2012; Wang et al., 2014; Wang et al., 2011a; Wang et al., 2011b) and CaM (IQ-motif) (Chagot et Chazin, 2011; Gabelli et al., 2014; Kim et al., 2004; Sarhan et al., 2012; Shah et al., 2006; Wang et al., 2012; Wang et al., 2014).

In order to determine whether one or several of these MS-identified Nav1.5 phosphorylation sites are differentially represented in the failing, compared with the non-failing, ventricles, the relative abundance of each Nav1.5 phosphopeptide in the CaMKII δ_c -Tg, *versus* the WT, α NavPAN-IPs was determined by label-free quantification of MS1 data (Neubert et al., 2008). As illustrated in **Figure 4A**, and consistent with the quantification of the biochemical (**Figure 1**) and the MS protein (**Figure 2C**) data, the unphosphorylated Nav1.5 peptides are 3.6-fold more represented in the CaMKII δ_c -Tg, *versus* the WT, IPs. Out of the 86 unphosphorylated and 32 phosphorylated Nav1.5 peptides (118 peptides total), only the three phosphopeptides AT(pS)DNLPVR, RL(pS)(pS)GTEDGGDDR and AL(pS)AVSVLTSAL EELEESHK (†marked with a symbol in **Figure 4A**), exhibiting phosphorylation(s) on serines 1989 (pS1989), 483 and 484 (pS483 and pS484) and 664 (pS664), respectively, present fold change ratios (8.96-, 7.13- and 0.58-fold) significantly (Tukey whisker analysis) different from the median ratio (**Figure 4B**). Nonetheless, the other phosphopeptides assigning pS483 and/or pS484 do not show any significant abundance changes compared with the median ratio (**Figures 4A & 4B**); and the abundance change observed for the phosphopeptide identifying pS664 is not significantly different (**Figure 4A**). In addition, the phosphopeptide Q(-17.03)QAGSSGLSDEDAPER, assigning pS1937 and/or pS1938 (**Table 1**), is present in the CaMKII δ_c -Tg IPs (n=3/4) and absent in the WT IPs (n=0/4) (**Figure 4C**). Relative abundances of all the other Nav1.5 phosphopeptides are comparable to the median (or mean) relative abundance found for the unphosphorylated Nav1.5 peptides (**Figures 4A & 4B**).

Amino acid sequence alignment of the flanking regions of pS1937/38 and pS1989 showed a good conservation of S1938 and S1989 across orthologous sequences (S1937 is not well conserved), and interestingly revealed that S1989 conforms to the consensus CaMKII phosphorylation site (RXX[S/T]) (Songyang et al., 1996), **Figure 4D**). Taken together, these phosphoproteomic analyses identified nine novel native Nav1.5 phosphorylation sites, of which

two conserved serines in the CTD, at positions 1938 and 1989, show increased phosphorylation in the CaMKII δ_c -Tg, compared with the WT, ventricles.

FGF13 Decreases Peak Na⁺ Current, Increases Nav1.5 Channel Availability and Decreases Late Na⁺ Current

Because pS1938 and pS1989 are located in close proximity to the binding site for the iFGFs (Gabelli et al., 2014; Goetz et al., 2009; Wang et al., 2012; Wang et al., 2014; Wang et al., 2011a; Wang et al., 2011b), initial experiments were aimed at exploring the effects of FGF13 on the current density and biophysical properties of heterologously expressed Nav1.5 channels. The isoform 2 of FGF13 was chosen as the iFGF in these experiments as it is the isoform detected in the m α Nav_vPAN-IPs. As illustrated in **Figure 5**, these analyses demonstrated that FGF13 significantly decreases the peak Na⁺ current (I_{Na}) density ($p < 0.05$, **Figure 5A**) and shifts the voltage-dependence of steady-state current inactivation towards depolarized potentials ($p < 0.01$, **Figure 5C**) in transiently transfected HEK293 cells (see detailed densities, properties and statistics in **Table 2**). In contrast, no significant differences in the voltage-dependence of activation (**Figure 5B**) or the kinetics of activation, inactivation and recovery from inactivation were observed upon FGF13 co-expression (**Table 2**).

Additional voltage-clamp experiments were designed to examine the effects of FGF13 on the late Na⁺ current. These analyses showed that the relative percentage of the TTX-sensitive late (I_{NaL}) Na⁺ current, compared with the peak (I_{Na}) Na⁺ current, (% I_{NaL}/I_{Na}) is significantly ($p < 0.01$) smaller in cells co-expressing Nav1.5 and FGF13 than in cells expressing Nav1.5 alone (**Figure 6**). Albeit small, these differences were observed in two different data sets (**Figures 6A-6B & 6C-6D**), and apparent with or without normalization by the peak Na⁺ current (see detailed percentages, amplitudes and statistics in **Supplementary Table 6**). In summary, consistent with previous studies on the roles of iFGFs in the regulation of Nav channels (Bosch et al., 2015; Goetz et al., 2009; Shavkunov et al., 2013; Wang et al., 2012; Wang et al., 2011a; Wang et al., 2011b), FGF13 has several effects on heterologously expressed Nav1.5 channels, most notably on the inactivation properties.

Phosphorylation at Serines 1933 and 1984 Impairs FGF13-Dependent Regulation of Nav1.5 Channel Inactivation

To determine the impact of phosphorylation at the two C-terminal (mouse) serines 1938 and 1989 on the gating properties of Nav1.5 channels, the orthologous human serine to glutamate (Nav1.5-S1933E-S1984E, Nav1.5-EE) or serine to alanine (Nav1.5-S1933A-S1984A, Nav1.5-AA) double Nav1.5 phosphomutants were generated and transfected with FGF13 in HEK293 cells. Interestingly, whole cell voltage-clamp analyses revealed that the voltage-dependence of steady-state inactivation in cells co-expressing Nav1.5-EE and FGF13 is significantly ($p < 0.05$) shifted towards hyperpolarized potentials compared with cells co-expressing Nav1.5-WT and FGF13, and similar to cells expressing Nav1.5-WT alone (**Figure 5C, Table 2**). In contrast, the Nav1.5-AA phosphomutant co-expressed with FGF13 showed voltage-dependence of inactivation properties similar to those recorded from cells co-expressing Nav1.5-WT and FGF13. No changes in peak I_{Na} density, voltage-dependence of activation or kinetics of activation, inactivation and recovery from inactivation were observed with either the Nav1.5-EE or Nav1.5-AA phosphomutants, compared with the Nav1.5-WT, co-expressed with FGF13 (**Figures 5A & 5B, Table 2**). Interestingly, however, mimicking or abolishing phosphorylation at only one of the two identified phosphorylation sites (in cells co-expressing Nav1.5-S1933E/A or Nav1.5-S1984E/A with FGF13) did not show any significant changes on peak I_{Na} density or channel biophysical properties compared with cells co-expressing Nav1.5-WT and FGF13 (**Supplementary Table 5**). Finally, recordings of the late Na⁺ current showed that the % I_{NaL}/I_{Na} in cells co-expressing Nav1.5-EE and FGF13 is significantly ($p < 0.001$) higher than in cells co-

expressing Nav1.5-WT and FGF13, and similar to cells expressing Nav1.5-WT alone, whereas no such abrogation of the FGF13 effect was observed with the Nav1.5-AA phosphomutant (**Figure 6, Supplementary Table 6**). In addition, similar to the biophysical properties, no consistent effects on I_{NaL} could be detected with the simple phosphomutants (**Supplementary Table 6**). Taken together, these results suggest that simultaneous phosphorylation at serines 1933 and 1984 on Nav1.5 impairs the effects of FGF13 on channel inactivation properties, *i.e.* decreases channel availability and increases I_{NaL} .

Phosphorylation at Serines 1933 and 1984 Decreases the Interaction of FGF13 and CaM with Nav1.5

To explore the hypothesis that phosphorylation at serines 1933 and 1984 on Nav1.5 impairs the regulation of channel inactivation mediated by FGF13 by altering the binding of FGF13 and/or of CaM to the channel, co-immunoprecipitation experiments were completed using the same experimental paradigm as above. As illustrated in **Figure 7A**, FGF13 and (endogenous) CaM co-immunoprecipitate with Nav1.5, whether in the WT, Nav1.5-AA or Nav1.5-EE forms, in HEK293 cells. Interestingly, however, the relative abundances of FGF13 (**Figure 7B**) and CaM (**Figure 7C**) are significantly ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively) lower in the Nav1.5 immunoprecipitates from cells expressing the Nav1.5-EE phosphomutant, compared with cells expressing the WT, channels. No changes were observed with the Nav1.5-AA phosphomutant. Parallel negative controls of co-immunoprecipitations obtained from cells transiently transfected with FGF13 or Nav1.5-WT alone confirmed the specificity of detected signals. In order to determine whether phosphorylation at only one site was sufficient to decrease the interaction of FGF13 or CaM with the channel, additional co-immunoprecipitations were performed with the single alanine or glutamate phosphomutant channels. Consistent with the electrophysiological findings, no changes in binding affinity were observed with any of the single phosphomutant channels (**Supplementary Figure 2**). Together, therefore, these biochemical analyses suggest that phosphorylation at both serines 1933 and 1984 are necessary to decrease the interaction of FGF13 and CaM with the channel.

Discussion

The results presented here provide the first phosphorylation map of native mouse Nav1.5 channel subunits purified from failing ventricles, and delineate two novel C-terminal serines, at positions 1938 and 1989, which show increased phosphorylation in failing ventricles. Further mechanistic analyses in HEK293 cells revealed that mimicking phosphorylation at both sites (in the human sequence) impairs the regulation of Nav1.5 channels by FGF13, resulting in decreased channel availability and increased late Na⁺ current. Overall, these results provide evidence for a novel phosphorylation-dependent mechanism that acts at the level of the Nav1.5 channel macromolecular complex through regulation of specific protein/protein interaction.

Regulation of Nav1.5 Channel Phosphorylation in Heart Failure

The present phosphoproteomic analysis confidently identified a total of nineteen native phosphorylation sites on the Nav1.5 channel proteins purified from mouse ventricles, of which nine are novel. Consistent with our previous MS analysis (Marionneau et al., 2012), and with another phosphoproteomic analysis of Nav1.5 channels from the Bers group (Herren et al., 2015), the great majority (13 out of 19) of identified phosphorylation sites are located in the first intracellular linker loop of the channel, suggesting critical roles for this region in mediating phosphorylation-dependent regulation of cardiac Nav1.5 channels. To our surprise, however, none of these thirteen phosphorylation sites identified in the first linker loop, including phosphoserine 571 which was reported to be upregulated in human, dog and mouse failing ventricles (Koval et al., 2012; Toischer et al., 2013), appeared to be regulated in the failing CaMKII δ_c -Tg ventricles, compared with the non-failing WT ventricles. Note that no relative quantification could be obtained for the low abundance phosphopeptides assigning phosphoserines 516 and 1888, and that the region surrounding threonine 594 was not covered (**Figure 2B**), precluding possible detection and quantification of phosphothreonine 594. The only two/three phosphorylation sites showing significant and consistent abundance changes in the failing CaMKII δ_c -Tg, compared with the non-failing WT, ventricles are located in the CTD of Nav1.5, at position(s) 1937 and/or 1938 and at position 1989. Although localization(s) of phosphorylation could not be discriminated in between serines 1937 or 1938 in the singly phosphorylated peptide allowing quantification (presence in the CaMKII δ_c -Tg IPs, and absence in the WT IPs), we focused our attention on serine 1938 (human serine 1933) because serine 1937 is not well conserved across species and especially is absent in human. Finally, it is also important to note here that the relative quantification of the doubly phosphorylated peptide supporting phosphorylation at both serines 1937 and 1938 (**Table 1**) could not be obtained because of low abundance, yet this peptide was only detected in the CaMKII δ_c -Tg IPs.

The inactivation gating defects of Nav1.5 channels in heart failure have been reported to be associated, at least in part, with the activation of specific kinases, among which CaMKII represents the best candidate (Maltsev et al., 2008b; Toischer et al., 2013; Wagner et al., 2006). The present phosphoproteomic analyses were purposely undertaken from the CaMKII δ_c -Tg mice, which develop heart failure upon increased CaMKII δ_c expression and activity in the ventricles (Wagner et al., 2006; Zhang et al., 2003). While the MS analyses were performed from this mouse model, no such direct link can be made concerning the involvement of specific kinase(s) in the phosphorylation of serines 1937 and 1989. Consistent with the possible implication of CaMKII δ_c , however, the *in vitro* phosphoproteomic analyses from the Bers group demonstrated that human phosphoserine 1933 is CaMKII-dependent (Herren et al., 2015). Likewise, it is interesting to note that phosphoserine 1989 is located in a well-conserved consensus CaMKII phosphorylation site (Songyang et al., 1996). On the other hand, one could also suggest a putative role for the Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3) (Shavkunov et al., 2013) which, similar to the regulatory mechanism demonstrated here, has been shown to

regulate the assembly of the neuronal Nav-FGF14 channel complex. Further experiments, using for example the high-throughput split-luciferase complementation assay (Shavkunov et al., 2013), will be required to survey the involved kinase pathway(s).

Regulation of Nav1.5 Channel Complex Composition in Heart Failure

The MS analyses performed here also revealed different relative compositions of associated/regulatory proteins in Nav1.5 channel complexes in the CaMKII δ_c -Tg ventricles, compared with the WT ventricles. Of particular interest in the context of this study, the FGF13 and CaM relative abundances in the CaMKII δ_c -Tg IPs, compared with the WT IPs, are lower (2-fold abundance ratios) than the 3-fold abundance ratios obtained for Nav1.5 or other associated/regulatory proteins including ankyrin-G, plakophilin-2 or $\alpha 1$ -syntrophin. Tentative co-immunoprecipitation experiments aimed at validating these alterations in FGF13 or CaM interactions with Nav1.5 in the CaMKII δ_c -Tg, compared with the WT, ventricles were inconclusive because of low western blot signals and great inter-individual variability (data not shown). Consistent with these MS findings, however, co-immunoprecipitation experiments performed in HEK293 cells demonstrated that mimicking phosphorylation at serines 1933 and 1984 decreases the binding affinity of FGF13 and CaM with the channel. Although additional experiments are required to confirm this interpretation in the present (CaMKII δ_c -Tg) as well as other models of heart failure, it is tempting to suggest that these findings together reflect decreased binding of FGF13 and CaM upon increased phosphorylation at serines 1933 and 1984.

Impairment of FGF13-Dependent Nav1.5 Channel Inactivation by Phosphorylation

Because our MS findings all converged on the possible involvement of the CTD of Nav1.5 in dysregulating Nav1.5 channels in heart failure, and that, on the other hand, this region is particularly well-recognized for its role in mediating regulation of Nav channel inactivation through the binding of the iFGFs (Bosch et al., 2015; Goetz et al., 2009; Shavkunov et al., 2013; Wang et al., 2012; Wang et al., 2011a; Wang et al., 2011b) and CaM (Chagot et Chazin, 2011; Gabelli et al., 2014; Kim et al., 2004; Sarhan et al., 2012; Shah et al., 2006; Wang et al., 2012; Wang et al., 2014), we first characterized the roles of FGF13 in regulating Nav1.5 channels in HEK293 cells. Our findings are in accordance with previous data demonstrating a key role for FGF13 in increasing steady-state Nav1.5 channel availability, although the amplitude of the presently observed effect is smaller than previously reported effects of FGF13 or other iFGFs (Bosch et al., 2015; Goetz et al., 2009; Shavkunov et al., 2013; Wang et al., 2012; Wang et al., 2011a; Wang et al., 2011b). Interestingly, our data also provide a novel role for FGF13 in decreasing the late Na⁺ current. Together, therefore, these results suggest that the binding of FGF13 regulates the inactivation properties of Nav1.5 channels from both closed and open states. The observed decrease in peak Na⁺ current density upon FGF13 co-expression was somewhat surprising in light of previous findings in native cardiomyocytes demonstrating a decreased Nav1.5 channel cell surface expression upon FGF13 knockdown (Wang et al., 2011a). This observation is nonetheless reminiscent of previous investigations of iFGFs-dependent regulation of Nav channels from the Pitt group which reported the same disparate effects on peak Na⁺ current density in native (increase) and heterologous (decrease) cells (Yan et al., 2014), and may reflect differences in channel cellular and molecular environment.

Determination of the impact of phosphorylation at serines 1933 and 1984 in the regulation of Nav1.5 channels first revealed that the binding of FGF13 and CaM to Nav1.5 is reduced with the double glutamate phosphomutant, compared with the WT, channels, suggesting that phosphorylation at these serines disables the interaction of FGF13 and CaM with the channel. Most importantly, this reduced interaction, as assessed by co-immunoprecipitation, correlates with an impairment of functional modulation. Indeed, all the effects of FGF13 on Nav1.5-

generated currents but those on the peak density were nearly completely abolished, therefore resulting in decreased channel availability and increased late Na⁺ current with the double glutamate phosphomutant. Mimicking phosphorylation at only one site, however, did not lead to any consistent alterations in the interaction of FGF13 or CaM with the channel nor in the functional regulation by FGF13, suggesting that phosphorylation at both sites are necessary to disable FGF13/CaM bindings and associated regulation of inactivation. Whether phosphorylation or FGF13 influence the Ca²⁺/CaM dependence of Nav1.5 channel inactivation remains to be investigated.

Potential Roles for Phosphorylation at Serines 1933 and 1984 and for the Impairment of iFGF Regulation of Nav1.5 Channels in the Arrhythmias Associated with Heart Failure

By identifying two novel Nav1.5 phosphorylation sites upregulated in failing ventricles, and demonstrating roles for these sites in altering Nav1.5 channel inactivation in a similar way to most of the previously described Nav channel defects in heart failure, our results provide consistent evidence for a model in which increased Nav1.5 phosphorylation at serines 1933 and 1984 in heart failure may contribute in altering Nav1.5 channel inactivation and providing arrhythmic substrates. The functional consequences of the impaired binding of FGF13 to Nav1.5 by phosphorylation, as observed in HEK293 cells, which include a decreased channel availability and an increased late Na⁺ current, are indeed consistent with most of the Nav channel defects previously described in failing ventricles (Aiba et al., 2013; Maltsev et al., 2008b; Maltsev et Undrovinas, 2008; Toischer et al., 2013; Valdivia et al., 2005; Wagner et al., 2006). Interestingly, and in line with these findings, the Mohler group recently reported a novel LQT3-causing mutation at p.H1849R in the CTD of Nav1.5, which also results in an impairment of iFGF-mediated regulation of Nav1.5 channels (Musa et al., 2015). Altogether, therefore, these findings suggest that some of the arrhythmias associated with Nav1.5 channels in both inherited (CTD-mutated LQT3 patients) and acquired (heart failure) diseases may arise from similar mechanisms implying the disruption of iFGF modulation. Additional evidences allowing generalization of the role of this mechanism in heart failure are nonetheless warranted, including validation, in human as well as other animal models of heart failure, of increased Nav1.5 CTD phosphorylation and altered Nav1.5-iFGF interaction.

Funding: This work was supported by the *Agence Nationale de la Recherche* [ANR-15-CE14-0006-01 to C.M., ANR-12-BSV1-0013-01 to F.C.]; the Marie Curie 7th Framework Program of the European Commission [PIRG06-GA-2009-256397 to C.M.]; the *Fondation d'entreprise Genavie* (to C.M.); and the National Institutes of Health [UL1 TR000448 and P41 GM103422-35 to R.R.T., NIH R01 HL034161 to J.M.N.]. S.B. was supported by a *Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire-Société Française de Cardiologie* predoctoral fellowship [eOTP 1518DASS]. The content of the research reported is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official view of the funding agencies.

Acknowledgements: The expert technical assistance of Aurore Girardeau, Petra Erdmann-Gilmore, Alan E. Davis and James P. Malone is gratefully acknowledged.

Conflict of Interest: none declared.

References

1. Aiba T, Barth AS, Hesketh GG, Hashambhoy YL, Chakir K, Tunin RS, Greenstein JL, Winslow RL, Kass DA, Tomaselli GF. Cardiac resynchronization therapy improves altered Na channel gating in canine model of dyssynchronous heart failure. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2013;**6**:546-554.
2. Maltsev VA, Undrovinas A. Late sodium current in failing heart: friend or foe? *Prog Biophys Mol Biol* 2008;**96**:421-451.
3. Toischer K, Hartmann N, Wagner S, Fischer TH, Herting J, Danner BC, Sag CM, Hund TJ, Mohler PJ, Belardinelli L, Hasenfuss G, Maier LS, Sossalla S. Role of late sodium current as a potential arrhythmogenic mechanism in the progression of pressure-induced heart disease. *J Mol Cell Cardiol* 2013;**61**:111-122.
4. Wagner S, Dybkova N, Rasenack EC, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P, Maier SK, Zhang T, Hasenfuss G, Brown JH, Bers DM, Maier LS. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na⁺ channels. *J Clin Invest* 2006;**116**:3127-3138.
5. Maltsev VA, Reznikov V, Undrovinas NA, Sabbah HN, Undrovinas A. Modulation of late sodium current by Ca²⁺, calmodulin, and CaMKII in normal and failing dog cardiomyocytes: similarities and differences. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;**294**:H1597-1608.
6. Valdivia CR, Chu WW, Pu J, Foell JD, Haworth RA, Wolff MR, Kamp TJ, Makielski JC. Increased late sodium current in myocytes from a canine heart failure model and from failing human heart. *J Mol Cell Cardiol* 2005;**38**:475-483.
7. Ashpole NM, Herren AW, Ginsburg KS, Brogan JD, Johnson DE, Cummins TR, Bers DM, Hudmon A. Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase II (CaMKII) Regulates Cardiac Sodium Channel NaV1.5 Gating by Multiple Phosphorylation Sites. *J Biol Chem* 2012;**287**:19856-19869.
8. Herren AW, Weber DM, Rigor RR, Margulies KB, Phinney BS, Bers DM. CaMKII Phosphorylation of Na(V)1.5: Novel in Vitro Sites Identified by Mass Spectrometry and Reduced S516 Phosphorylation in Human Heart Failure. *J Proteome Res* 2015;**14**:2298-2311.
9. Glynn P, Musa H, Wu X, Unudurthi SD, Little S, Qian L, Wright PJ, Radwanski PB, Gyorke S, Mohler PJ, Hund TJ. Voltage-Gated Sodium Channel Phosphorylation at Ser571 Regulates Late Current, Arrhythmia, and Cardiac Function In Vivo. *Circulation* 2015;**132**:567-577.
10. Koval OM, Snyder JS, Wolf RM, Pavlovicz RE, Glynn P, Curran J, Leymaster ND, Dun W, Wright PJ, Cardona N, Qian L, Mitchell CC, Boyden PA, Binkley PF, Li C, Anderson ME, Mohler PJ, Hund TJ. Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II-Based Regulation of Voltage-Gated Na⁺ Channel in Cardiac Disease. *Circulation* 2012;**126**:2084-2094.
11. Chagot B, Chazin WJ. Solution NMR structure of Apo-calmodulin in complex with the IQ motif of human cardiac sodium channel NaV1.5. *J Mol Biol* 2011;**406**:106-119.
12. Gabelli SB, Boto A, Kuhns VH, Bianchet MA, Farinelli F, Aripirala S, Yoder J, Jakoncic J, Tomaselli GF, Amzel LM. Regulation of the NaV1.5 cytoplasmic domain by calmodulin. *Nat Commun* 2014;**5**:5126.
13. Wang C, Chung BC, Yan H, Lee SY, Pitt GS. Crystal structure of the ternary complex of a NaV C-terminal domain, a fibroblast growth factor homologous factor, and calmodulin. *Structure* 2012;**20**:1167-1176.
14. Wang C, Chung BC, Yan H, Wang HG, Lee SY, Pitt GS. Structural analyses of Ca(2+)-CaM interaction with NaV channel C-termini reveal mechanisms of calcium-dependent regulation. *Nat Commun* 2014;**5**:4896.
15. Kim J, Ghosh S, Liu H, Tateyama M, Kass RS, Pitt GS. Calmodulin mediates Ca²⁺ sensitivity of sodium channels. *J Biol Chem* 2004;**279**:45004-45012.

16. Sarhan MF, Tung CC, Van Petegem F, Ahern CA. Crystallographic basis for calcium regulation of sodium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;**109**:3558-3563.
17. Shah VN, Wingo TL, Weiss KL, Williams CK, Balsler JR, Chazin WJ. Calcium-dependent regulation of the voltage-gated sodium channel hH1: intrinsic and extrinsic sensors use a common molecular switch. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;**103**:3592-3597.
18. Goetz R, Dover K, Laezza F, Shtraizent N, Huang X, Tchetchik D, Eliseenkova AV, Xu CF, Neubert TA, Ornitz DM, Goldfarb M, Mohammadi M. Crystal structure of a fibroblast growth factor homologous factor (FHF) defines a conserved surface on FHF for binding and modulation of voltage-gated sodium channels. *J Biol Chem* 2009;**284**:17883-17896.
19. Wang C, Hennessey JA, Kirkton RD, Graham V, Puranam RS, Rosenberg PB, Bursac N, Pitt GS. Fibroblast growth factor homologous factor 13 regulates Na⁺ channels and conduction velocity in murine hearts. *Circ Res* 2011;**109**:775-782.
20. Wang C, Hoch EG, Pitt GS. Identification of novel interaction sites that determine specificity between fibroblast growth factor homologous factors and voltage-gated sodium channels. *J Biol Chem* 2011;**286**:24253-24263.
21. Bosch MK, Carrasquillo Y, Ransdell JL, Kanakamedala A, Ornitz DM, Nerbonne JM. Intracellular FGF14 (iFGF14) Is Required for Spontaneous and Evoked Firing in Cerebellar Purkinje Neurons and for Motor Coordination and Balance. *J Neurosci* 2015;**35**:6752-6769.
22. Shavkunov AS, Wildburger NC, Nenov MN, James TF, Buzhdygan TP, Panova-Elektronova NI, Green TA, Veselenak RL, Bourne N, Laezza F. The fibroblast growth factor 14.voltage-gated sodium channel complex is a new target of glycogen synthase kinase 3 (GSK3). *J Biol Chem* 2013;**288**:19370-19385.
23. Gabelli SB, Yoder JB, Tomaselli GF, Amzel LM. Calmodulin and Ca control of voltage gated Na channels. *Channels (Austin)* 2015:0.
24. Musa H, Kline CF, Sturm AC, Murphy N, Adelman S, Wang C, Yan H, Johnson BL, Csepe TA, Kilic A, Higgins RS, Janssen PM, Fedorov VV, Weiss R, Salazar C, Hund TJ, Pitt GS, Mohler PJ. SCN5A variant that blocks fibroblast growth factor homologous factor regulation causes human arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;**112**:12528-12533.
25. Zhang T, Maier LS, Dalton ND, Miyamoto S, Ross J, Jr., Bers DM, Brown JH. The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res* 2003;**92**:912-919.
26. Marionneau C, Lichti CF, Lindenbaum P, Charpentier F, Nerbonne JM, Townsend RR, Merot J. Mass Spectrometry-Based Identification of Native Cardiac Nav1.5 Channel alpha Subunit Phosphorylation Sites. *J Proteome Res* 2012;**11**:5994-6007.
27. Neubert H, Bonnert TP, Rumpel K, Hunt BT, Henle ES, James IT. Label-free detection of differential protein expression by LC/MALDI mass spectrometry. *J Proteome Res* 2008;**7**:2270-2279.
28. Polpitiya AD, Qian WJ, Jaitly N, Petyuk VA, Adkins JN, Camp DG, 2nd, Anderson GA, Smith RD. DAnTE: a statistical tool for quantitative analysis of -omics data. *Bioinformatics* 2008;**24**:1556-1558.
29. Abriel H, Rougier JS, Jalife J. Ion channel macromolecular complexes in cardiomyocytes: roles in sudden cardiac death. *Circ Res* 2015;**116**:1971-1988.
30. Songyang Z, Lu KP, Kwon YT, Tsai LH, Filhol O, Cochet C, Brickey DA, Soderling TR, Bartleson C, Graves DJ, DeMaggio AJ, Hoekstra MF, Blenis J, Hunter T, Cantley LC. A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: primary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, CDK5, and Erk1. *Mol Cell Biol* 1996;**16**:6486-6493.
31. Yan H, Pablo JL, Wang C, Pitt GS. FGF14 modulates resurgent sodium current in mouse cerebellar Purkinje neurons. *Elife* 2014;**3**:e04193.

Figure Legends

Figure 1. Immunoprecipitation of Nav channel complexes from adult WT and CaMKII δ_c -Tg mouse ventricles. (A) Representative Nav $_V$ 1.5 western blots (probed with an anti-Nav $_V$ 1.5 rabbit polyclonal antibody) of total lysates and immunoprecipitated (IP) proteins from adult WT and CaMKII δ_c -Tg mouse ventricles with the anti-Nav $_V$ PAN monoclonal antibody (m α Nav $_V$ PAN). (B) Mean \pm SEM relative Nav $_V$ 1.5 protein abundance in WT (n=4) and CaMKII δ_c -Tg (n=4) IPs. * p <0.05, Mann-Whitney test. (C) SYPRO Ruby stained-gel of m α Nav $_V$ PAN-IPs from WT and CaMKII δ_c -Tg mouse ventricles. Relative abundance of proteins running at the molecular weight of Nav α subunits is higher in CaMKII δ_c -Tg IPs than in WT IPs.

Figure 2. MS protein identification in immunoprecipitated Nav channel complexes from WT and CaMKII δ_c -Tg mouse ventricles. (A) Nav α subunits identified using the LTQ-Orbitrap XL, LTQ-Orbitrap Elite and TripleTOF 5600 Plus mass spectrometers. The average numbers of exclusive unique peptides and total spectra for each Nav α subunit, and the percent amino acid sequence coverages obtained for Nav $_V$ 1.5, including or excluding transmembrane domains (TD), are presented. In addition to Nav $_V$ 1.5 which is the most abundant protein in the m α Nav $_V$ PAN-IPs, Nav $_V$ 1.4 is also detected and the greater sensitivity of the Orbitrap Elite and TripleTOF mass spectrometers allowed the identification of Nav $_V$ 1.7, Nav $_V$ 1.8 and Nav $_V$ 1.3. (B) Amino acid sequence coverage obtained for the (mouse) Nav $_V$ 1.5 protein (NP_001240789). Detected peptides are highlighted in yellow; identified phosphorylation sites are highlighted in blue (sites already identified in our previous MS analyses) and red (newly-identified sites in the present study); transmembrane segments (S1-S6) in each domain (I-IV) are in bold and underlined in black; loops I, II and III correspond to interdomains I-II, II-III and III-IV, respectively; and binding sites for intracellular Fibroblast Growth Factors (iFGF) and calmodulin (IQ-motif) are boxed in green and orange, respectively. (C) The relative abundances of Nav α subunits and previously characterized Nav $_V$ 1.5 channel associated/regulatory proteins in the CaMKII δ_c -Tg IPs (n=4) *versus* the WT IPs (n=4) were calculated from the entire (Orbitrap XL) MS1 peptide data set using the DAnTE statistical software. ** p <0.01, *** p <0.001.

Figure 3. Localization of MS-identified *in situ* phosphorylation sites on the mouse ventricular Nav $_V$ 1.5 α subunit protein. Among the nineteen phosphorylation sites identified, ten (in blue) had already been identified in our previous MS analyses and nine (in red) are novel. Four and two phosphorylation site locations are possible at amino acids 36 to 42 and 524 to 525, respectively. The three newly-identified C-terminal phosphoserines at positions 1888, 1937 and 1938 (pS1888, pS1937 and pS1938) are in close proximity to the binding sites for intracellular Fibroblast Growth Factors (iFGF) and calmodulin (IQ-motif).

Figure 4. Quantification analysis of Nav $_V$ 1.5 phosphorylation sites in the CaMKII δ_c -Tg, *versus* the WT, m α Nav $_V$ PAN-IPs. (A) The relative abundances of 32 Nav $_V$ 1.5 phosphopeptides allowing assignments of the listed phosphorylation sites, in the CaMKII δ_c -Tg (n=4), *versus* the WT (n=4), IPs, were calculated using label-free quantification of the (Orbitrap XL) MS1 data. The mean \pm SEM relative abundance of unphosphorylated Nav $_V$ 1.5 peptides in the CaMKII δ_c -Tg, *versus* the WT, IPs was calculated from 86 unphosphorylated Nav $_V$ 1.5 peptides (minimum Scaffold peptide probability scores of 95%). Consistent with the biochemistry data (**Figure 1**) and the DAnTE protein statistical analysis (**Figure 2C**), the unphosphorylated Nav $_V$ 1.5 peptides are 3.6-fold more represented in the CaMKII δ_c -Tg IPs than in the WT IPs (red dashed line). The relative abundances of individual Nav $_V$ 1.5 phosphopeptides are significantly (* p <0.05, Mann-Whitney test) different in the CaMKII δ_c -Tg, compared with the WT, IPs. (B) Tukey

whisker analysis of Nav1.5 peptide relative abundance in CaMKII δ_c -Tg, *versus* WT, IPs. Out of the 118 (86 unphosphorylated and 32 phosphorylated) Nav1.5 peptides, only the phosphopeptides AT(pS)DNLPVR, RL(pS)(pS)GTEDGGDDR and AL(pS)AVSVLTSALEELEESHRK (\dagger marked with a symbol in **Figure 4A**), exhibiting phosphorylation(s) on serines 1989 (pS1989), 483 and 484 (pS483 and pS484) and 664 (pS664), respectively, present fold change ratios (8.96-, 7.13- and 0.58-fold) significantly different from the median ratio. (C) Mean \pm SEM intensities of phosphopeptides Q(-17.03)QAGSSGLSDEDAPER, assigning pS1937 and/or pS1938 (absence in WT IPs and presence in CaMKII δ_c -Tg IPs), and AT(pS)DNLPVR, assigning pS1989 (8.96-fold change ratio), in WT (n=4) and CaMKII δ_c -Tg (n=4) IPs. * p <0.05, Mann-Whitney test (D) Conservation of the two C-terminal Nav1.5 serines 1938 and 1989 across orthologs.

Figure 5. Phosphorylation at serines 1933 and 1984 disrupts FGF13-dependent regulation of steady-state Nav1.5 channel availability. Whole cell voltage-clamp recordings were obtained forty-eight hours following transfection of HEK293 cells with Nav1.5-WT (black), Nav1.5-WT + FGF13 (green), Nav1.5-S1933E-S1984E + FGF13 (Nav1.5-EE + FGF13, red), and Nav1.5-S1933A-S1984A + FGF13 (Nav1.5-AA + FGF13, blue) using the protocols illustrated in each panel. (A) Mean \pm SEM peak Na⁺ current (I_{Na}) densities are plotted as a function of test potential. (B) Voltage-dependence of current activation. Mean \pm SEM normalized conductances (G_{Na}) are plotted as a function of test potential and fitted using a Boltzmann equation. (C) Voltage-dependence of steady-state current inactivation. Mean \pm SEM normalized current amplitudes are plotted as a function of prepulse potential and fitted using a Boltzmann equation. FGF13 significantly (p <0.01 *versus* Nav1.5-WT) shifts the voltage-dependence of Nav1.5 channel inactivation towards depolarized potentials, an effect reversed with the Nav1.5-EE phosphomutant (p <0.01 *versus* Nav1.5-WT + FGF13). Detailed densities, properties and statistics are provided in **Table 2**.

Figure 6. Phosphorylation at serines 1933 and 1984 disrupts the FGF13-dependent decrease in I_{NaL} . TTX-sensitive late Na⁺ current (I_{NaL}) recordings were obtained forty-eight hours after transfection of HEK293 cells in two different data sets. The first data set (A and B) was obtained from cells expressing Nav1.5-WT (black), Nav1.5-WT + FGF13 (green) and Nav1.5-S1933E-S1984E + FGF13 (Nav1.5-EE + FGF13, red); the second data set (C and D) from cells expressing Nav1.5-WT (black), Nav1.5-WT + FGF13 (green) and Nav1.5-S1933A-S1984A + FGF13 (Nav1.5-AA + FGF13, blue). (A and C) Representative TTX-sensitive I_{NaL} recordings evoked by prolonged depolarizations (350 ms at -20 mV) from a holding potential of -120 mV. (B and D) Distributions and mean \pm SEM relative percentages of the TTX-sensitive late Na⁺ current, compared with the peak Na⁺ current (% I_{NaL}/I_{Na}). * p <0.05, ** p <0.01 *versus* Nav1.5-WT; ### p <0.001 *versus* Nav1.5-WT + FGF13; ns, non-significant; Mann-Whitney test. Detailed percentages, amplitudes and statistics are provided in **Supplementary Table 6**.

Figure 7. Phosphorylation at serines 1933 and 1984 decreases the interaction of FGF13 and CaM with Nav1.5. Forty-eight hours following transfection of HEK293 cells with Nav1.5-WT, Nav1.5-S1933A-S1984A (Nav1.5-AA), Nav1.5-S1933E-S1984E (Nav1.5-EE) and/or FGF13, cell lysates were prepared and used for immunoprecipitations (IPs) with the α NavPAN antibody. (A) Representative western blots of the lysates (left panel) and the immunoprecipitates (right panel) with the monoclonal anti-NavPAN, anti-FGF13 and anti-CaM antibodies. Relative mean \pm SEM FGF13 (B) and CaM (C) abundances in α NavPAN-IPs from cells expressing Nav1.5-WT (WT, n=8), Nav1.5-AA (AA, n=8) and Nav1.5-EE (EE, n=8). ** p <0.01, *** p <0.001 *versus* Nav1.5-WT, Mann-Whitney test. FGF13 and CaM abundances in each IP were first normalized to immunoprecipitated Nav1.5 in the same blot

and then expressed relative to FGF13 or CaM abundances in IPs from cells expressing Nav1.5-WT.

Table 1. Phosphorylation sites, phosphopeptides and site-discriminating ions identified in immunoprecipitated Nav1.5 α subunits from adult WT and/or CaMKII δ_c -Tg mouse ventricles using MS

Phosphorylation site	MS machine	Phosphopeptide sequence	m/z (charge)	b ion	Phospho b ion	y ion	Phospho y ion
pS36, pT38, pS39 and/or pS42	Elite	35-GSATSQESREGLPEEEAPRPQLDLQASK	773.365 (+4)	(-)	b12 (-, 21.7)	y16 (+2, 72.4) y16 (+3, 24.3)	(-)
pS457 + pS460	TTOF	452-GVDTV(pS)RS(pS)LEMSPLAPVTNHER	661.305 (+4)	b5 (-, 1.1)	b6 (-, 2.7) b7 (+1, 3.0) b8 (-, 0.4) b11 (-, 3.2)	y12 (+1, 4.2) y13 (+2, 1.1)	y18 (-, 0.4) y20 (+3, 0.4)
pS460	Elite	452-GVDTVSR(pS)LEMSPLAPVTNHER	854.739 (+3)	b8 (+1, 2.3)	b11 (+1, 11.9)	y12 (+1, 3.0)	(-)
pS483 + pS484	TTOF	481-RL(pS)(pS)GTEDGGDDRLPK	621.596 (+3)	b2 (-, 37.6)	b3 (-, 2.1) b6 (+1, 2.0)	y12 (+1, 3.0)	y13 (-, 1.9)
pS483 or pS484 + pT486	TTOF	480-KRLSSGTEDGGDDRLPK	664.294 (+3)	b3 (-, 16.7)	b6 (-, 19.5) b9 (+1, 7.6)	y10 (+1, 10.2)	y11 (-, 6.0)
pS483 + pS484 + pT486	TTOF	481-RL(pS)(pS)G(pT)EDGGDDRLPK	648.251 (+3)	b2 (-, 98.9)	(-)	y9 (+1, 83.8)	(-)
pS484	TTOF	482-LS(pS)GTEDGGDDRLPK	542.906 (+3)	b2 (+, 20.2)	b3 (-, 9.2)	y12 (+1, 40.9)	y13 (+2, 22.3)
pS497	TTOF	482-LSSGTEDGGDDRLPK(pS)DSEDPGR	618.266 (+4)	b12 (-, 2.4)	(-)	y7 (+1, 18.6)	y8 (-, 6.1) y12 (+2, 5.1)
pS499	XL	497-SD(pS)EDGPR	471.665 (+2)	b2 (-, 2.1)	b5 (-, 7.8)	y4 (-, 19.6)	y6 (-, 16.6)
pS510	Elite	505-ALNQL(pS)LTHGLSR	745.380 (+2)	b4 (+1, 10.5)	b9 (+2, 13.8)	y7 (+1, 29.4)	y8 (-, 5.4)
pS510	Elite	505-ALNQL(pS)LTHGLSR	497.256 (+3)	b3 (-, 5.5)	b9 (+2, 11.3)	y7 (+1, 12.4)	y10 (-, 6.8) y11 (+2, 5.0)
pS516	TTOF	505-ALNQLSLTHGL(pS)R	497.260 (+3)	b8 (-, 36.7)	(-)	(-)	y3 (-, 6.3) y4 (-, 2.8)
pS524 and/or pS525	Elite	524-SSRGSIFTR	619.290 (+2)	(-)	(-)	y7 (-, 28.3)	(-)
pS539	TTOF	536-DQG(pS)EADFADDENSTAGESESHK	845.312 (+3)	b2 (+1, 29.9) b3 (-, 6.6)	b7 (+1, 10.4)	y17 (-, 29.8) y18 (+2, 9.0)	(-)
pS571	TTOF	569-RP(pS)TQGQPGFGTSAPGHVNLGK	569.029 (+4)	b2 (+1, 63.5)	b4 (+1, 2.0)	y15 (-, 100) y19 (-, 8.2)	y20 (-, 1.8)
pS664	XL	662-AL(pS)AVSVLTSALLEEESHK	783.731 (+3)	(-)	b3 (-, 0.8) b5 (-, 2.0)	y17 (-, 27.0)	y19 (-, 34.4)
pS1012	TTOF	993-KPAALATHSQLPSC(+57)IAAPR(pS)PPPPEVEK	758.148 (+4)	b18 (-, 14.2)	(-)	y8 (-, 100)	y11 (+1, 4.6)
pS1888	TTOF	1884-AANP(pS)KISYEPITTLR	647.994 (+3)	(-)	(-)	y10 (+1, 12.6) y11 (+2, 2.1)	(-)
pS1937 and/or pS1938	TTOF	1933-Q(-17)QAGSSGLSDEDAPER	855.334 (+2)	b4 (+1, 23.8)	b7 (-, 8.1)	y10 (+1, 37.1)	(-)
pS1937 + pS1938	TTOF	1934-QAG(pS)(pS)GLSDEDAPER	560.211 (+3)	(-)	(-)	y10 (+1, 7.6)	y11 (-, 3.0)
pS1989	TTOF	1987-AT(pS)DNLPVR	526.742 (+2)	b2 (-, 2.9)	b5 (-, 4.8)	y6 (-, 15.4)	y7 (-, 19.7)

The site-discriminating ions observed in the high- (LTQ-Orbitrap Elite or TripleTOF 5600 Plus) or low- (LTQ-Orbitrap XL) resolution MS/MS spectra of each annotated Nav1.5 phosphopeptide support the assignment of the indicated phosphorylation site(s). The charge state as well as the percentage of maximum intensity of each observed unphosphorylated and phosphorylated site-discriminating (b and y) ion are reported in parentheses; the (-) symbol indicates that the charge state could not be determined.

Table 2. Voltage-gated Na⁺ current densities and properties in transiently transfected HEK293 cells

		Nav _v 1.5-WT	Nav _v 1.5-WT + FGF13	Nav _v 1.5-EE + FGF13	Nav _v 1.5-AA + FGF13
I _{Na} (pA/pF)		-137.9 ± 14.9 (19)	-91.5 ± 8.9 (31)*	-87.8 ± 7.1 (19)**	-99.0 ± 15.9 (12)
Time to peak (ms)		0.76 ± 0.02 (19)	0.82 ± 0.02 (31)	0.79 ± 0.02 (19)	0.78 ± 0.03 (14)
Time course of inactivation	τ _{fast} (ms)	0.81 ± 0.03 (19)	0.84 ± 0.02 (31)	0.88 ± 0.02 (19)	0.85 ± 0.03 (14)
	τ _{slow} (ms)	5.3 ± 0.3 (19)	5.1 ± 0.3 (31)	6.1 ± 0.3 (19)	4.1 ± 0.3 (14)
	A _{fast} /A _{slow}	17.3 ± 1.7 (19)	15.7 ± 1.7 (31)	14.4 ± 2.2 (19)	15.4 ± 1.2 (14)
Voltage-dependence of activation	V _{1/2} (mV)	-41.1 ± 0.4 (19)	-41.0 ± 0.4 (31)	-41.7 ± 0.4 (19)	-40.6 ± 0.7 (14)
	k (mV)	6.1 ± 0.1 (19)	5.9 ± 0.1 (31)	6.2 ± 0.1 (19)	-5.9 ± 0.1 (14)
Voltage-dependence of inactivation	V _{1/2} (mV)	-83.8 ± 0.5 (19)	-81.8 ± 0.4 (34)**	-83.3 ± 0.4 (27) [#]	-81.9 ± 0.4 (13)*
	k (mV)	5.1 ± 0.11 (19)	4.5 ± 0.04 (34)***	4.4 ± 0.04 (27)***	4.5 ± 0.06 (13)**
Recovery from inactivation	τ _{rec} (ms)	6.9 ± 0.5 (13)	6.0 ± 0.3 (26)	6.8 ± 0.3 (18)	5.4 ± 0.3 (12)*

The peak Na⁺ current density (I_{Na}), time to peak and time course of inactivation properties presented were determined from analyses of records obtained on depolarizations to -20 mV (HP=-120 mV). All values are means ± SEM. The number of cells analyzed is provided in parentheses. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 versus Nav_v1.5-WT; [#]p<0.05 versus Nav_v1.5-WT + FGF13; Mann-Whitney test.

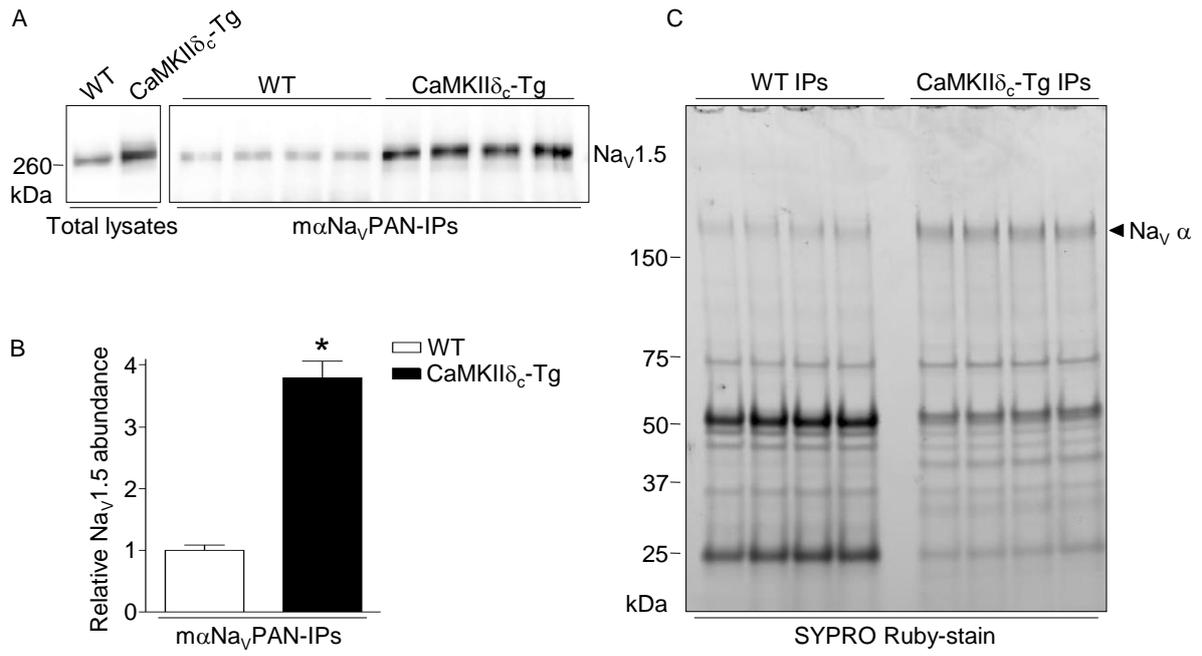


Figure 1. Burel et al.

A

Protein		LTQ-Orbitrap XL	LTQ-Orbitrap Elite	TripleTOF 5600 Plus
Na _v 1.5	Average number of unique peptides (total spectra)	50 (95)	57 (177)	84 (524)
	Amino acid sequence coverage	27%	28%	32%
	Amino acid sequence coverage (excluding TD)	36%	38%	43%
Na _v 1.4	Average number of unique peptides (total spectra)	4 (5)	6 (7)	16 (30)
Na _v 1.7	Average number of unique peptides (total spectra)	-	1 (1)	4 (4)
Na _v 1.8	Average number of unique peptides (total spectra)	-	1 (1)	2 (2)
Na _v 1.3	Average number of unique peptides (total spectra)	-	-	3 (3)

B

1 **MANFLLPK**GTSSFRFRTR**ESLAAIEKR**MAEQAR**CSATSCE**SREGLPEEEAPRPQLDQASKKLPDLYGN
 N-TERM
 71 **FPRELI**GEPLELDLPFYSTQKTFIVLN**KGRTIFR**FSATN**ALYVLS**PFHVRRAAV**KILVHSLF**SM**IMCT**
 N-TERM IS1
 141 **ILTNCFVMAQ**HDPFPWTR**YVEYTF**TAIV**TFESL**VK**ILAR**GFCLHAFTFLRD**PWNWLD**FSIV**MAV**Y**SENI**
 IS2 IS3
 211 KLG**NLSALR**TF**FRVLRAL****ITISV**IPGL**NTIV**GAL**IQSVK**KLAD**VMVLT**VF**CLSVF**AL**IGLQ**LF**MGNL**R**RHC**
 IS4 IS5
 281 VRN**TFEL**ANG**TSV**EADG**I**W**MSLD**VY**LN**DPAN**YLL**KN**GT**TD**VLL**CG**NS**SDAG**TC**PEG**YR**CL**KAG**EN**PDH**
 351 G**YTS**FD**S**PAN**AFL**AL**FR****LMTQ**DC**NE**LY**QQT**LR**SAG**K**IVM**IF**FML**V**IFL**GS**FY**LV**NL**IL**AV**MA**Y**EE**QN**
 IS6
 421 Q**ATI**A**E**TE**E**KE**KRF**Q**E**AM**E**ML**KKE**HE**AL**T**IG**VD**TV**S**RS**S**LE**MS**PL**AP**VT**N**H**ER**SKRR****KRL****SSC****ED**GG
 Loop I
 491 **DDR**LP**K**S**ED**GP**R**AL**N**Q**L**S**L**TH**GI****RT**SM**R**FR**SS**RG**S**I**PT**FR**RR**D**QC****EAD**FAD**EN**ST**AG**E**S**ES**H**RT**S**
 Loop I
 561 **L**LV**FW**PL**R**RP**ST**Q**Q**GP**G**FT**S**AP**H**GN**K**R**N**ST**VD**NC**GV**V**SL**L**G**AG**DA**E**AT**S**FG**SH**LL**R**PI**V**LD**R**FP**DT
 Loop I
 631 T**TP**SE**EP**GG**P**Q**ML**TF**Q**AP**CA**D**G**FE**EP**GA**R**Q**R****AL**S**AV**S**V**L**T**S**A**LE**E**E**S**H**R**K**CP**PC**W**NR**FA**Q**H**Y**LI**W**EC**C
 Loop I
 701 P**L**W**MS**I**K**Q**K**V**K**F**V**W**DP**F**AD**L**IT**M**C**I**V**L**T**LF**MA**L**E**H**Y**N**M**T**A**E**F**E**M**L**Q**V**GN**L**V**F**T**G**I**P**T**A**E**M**T**F**K**I**L**A
 IS1 IS2
 771 **L**DP**Y**Y**F**Q**Q**W**NI**F**DS**I**V**L**S**I**M**EL**GL**S**R**M**GN**L**S**V**LR**S**F**RL**RV**F**K**L**A**K**SW**PT**L**N**L**I**K**I**I**EN**S**V**G**AL**G**
 IS3 IS4
 841 **N**L**T**L**V**L**A**I**V**I**F**AV**V**GM**Q**LF**G**K**NY**S**EL**R**H**R**I**S**DS**G**LL**P**R**W**H**M**D**FF**H**A**FL**I**I**F**R**I**LC**G**E**W**I**E**T**M**W**DC**M**E
 IS5
 911 V**S**G**Q**S**L**CL**L**V**L**V**L**V**M**I**GN**L**V**LN**L**FL**ALL**S**S**F**S**AD**N**L**T**AP**ED**DE**G**M**N**L**Q**L**A**L**A**R**I**Q**R**L**F**V**K**R**TT**W
 IS6 Loop II
 981 **D**FC**CG**LL**R**RR**PK**PA**AL**A**TH**S**Q**L**P**S**C**I**A**AP**R****FP**PP**E**VE**K**AP**P**AR**K**ET**R**F**E**E**K**RP**G**Q**T**FG**D**TE**P**VC**V**
 Loop II
 1051 I**A**V**A**ES**D**TD**D**Q**E**DE**EN**SL**T**EE**EE**SS**KQ**Q**ES**V**Y**SG**H**EP**P**Q**E**PR**AW**S**Q**V**SE**TT**S**E**A**E**A**ST**S**Q**AD**W**Q**
 Loop II
 1121 E**R**E**A**E**P**RA**P**CG**CE**T**P**DS**Y**SE**G**ST**AD**M**T**N**T**AD**L**E**Q**I**P**D**L**G**E**D**V**K**D**ED**CE**TE**G**CV**RR**CP**CC**M**VD**T**T**Q**AF**
 Loop II
 1191 **G**K**V**W**WR**L**R**K**T**C**Y**R**I**V**E**HS**WF**ET**FI**F**M**LL**SS**G**AL**A**F**E**D**I**V**LE**ER**K**IK**V**L**E**Y**A**D**R**M**F**T**Y**F**V**L**E**M**LL**K**
 IS1 IS2
 1261 **W**V**A**Y**GF**K**K**Y**FT**N**ANC**W**L**D**L**I**V**D**S**L**V**S**L**V**ANT**L**G**FA**EM**GP**IK**SL**R**L**R**L**R**L**R**L**S**RF**E**G**M**R**V**V**N**AL
 IS3 IS4
 1331 V**G**A**I**P**S**IM**N**V**L**V**CL**I**F**W**L**I**F**S**IM**GN**L**F**AG**K**FG**R**C**IN**Q**TE**G**D**L**PL**N**Y**T**I**V**W**N**K**SE**CE**S**FN**V**T**G**E**L**Y**W**K
 IS5
 1401 V**K**V**N**FD**N**V**G**AG**Y**L**ALL**Q**V**AT**FK**W**M**D**I**M**YA**AV**D**SR**G**Y**E**EQ**P**Q**W**ED**N**L**Y**M**Y**I**F**V**V**F**I**I**EG**S**F**TL**N**L**F**I**G**
 IS6
 1471 **V**I**I**DN**FN**Q**Q**K**K**L**G**Q**D**I**F**M**TE**EQ**K**Y**YN**AM**K**K**L**G**SK**K**P**Q**R**P**I**PR**L**N**K**Y**Q**GF**I**D**IV**T**K**Q**AF**D**V**T**IM**FL
 Loop III IVS1
 1541 **I**CL**N**M**V**T**M**V**ET**DD**S**PE**K**V**N**I**L**A**K**IN**L**L**F**V**IF**T**G**EC**I**V**K**MA**L**R**H**Y**Y**FT**NS**W**N**I**F**D**F**V**V**I**L**S**I**V**G**V
 IS2 IVS3
 1611 **L**S**D**I**I**Q**Y**FF**S**PT**L**FR**V**I**R**L**A**R**I**GR**L**LR**IG**AK**G**IR**T**LL**F**AL**M**MS**L**PA**L**FN**I**GL**L**L**F**L**V**M**F**I**S**I**F**GM**A**
 IVS4 IVS5
 1681 **N**F**A**V**Y**W**E**AG**I**DD**M**FN**F**Q**T**F**AN**S**ML**CL**F**Q**I**T**S**AG**W**D**GL**L**S**PI**L**NT**G**PP**Y**CD**N**L**P**NS**NG**SR**GC**SP**AV**
 1751 **G**IL**F**FT**Y**I**I**S**L**I**V**V**N**MY**IA**IL**EN**S**V**ATE**ES**TE**PL**SE**DD**F**DM**F**Y**E**I**W**E**K**F**D**PE**AT**Q**F**I**E**L**AL**S**D**F**
 IS6 C-TERM
 1821 **A**D**A**L**S**E**P**L**R**I**A**K**P**N**Q**I**S**L**IN**M**DL**P**M**V**S**D**R**I**H**C**MD**L**L**F**A**P**T**K**R**V**L**GS**SE**M**D**A**L**K**I**Q**ME**E**K**F**A**AN**S****R**I
 C-TERM IFGF-binding site
 1891 **S**Y**E**P**I**TT**L**LR**K**HE**V**S**A**T**VI**Q**R**FR**R**LL**Q**RS**V**K**AS**F**L**FR**Q**Q**AG****GL**S**D**E**D**A**P**E**R**E**G**L**I**AY**M**W**N**E**N**F
 IQ-motif C-TERM
 1961 **S**RR**S**GL**S**SS**S**IS**S**T**S**FP**PS**Y**S**V**S**T**R**A**T****DN**L**P**V**R**AS**D**YS**R**SE**D**L**A**D**F**PP**S**P**D**R**D**RES**IV**
 C-TERM

C

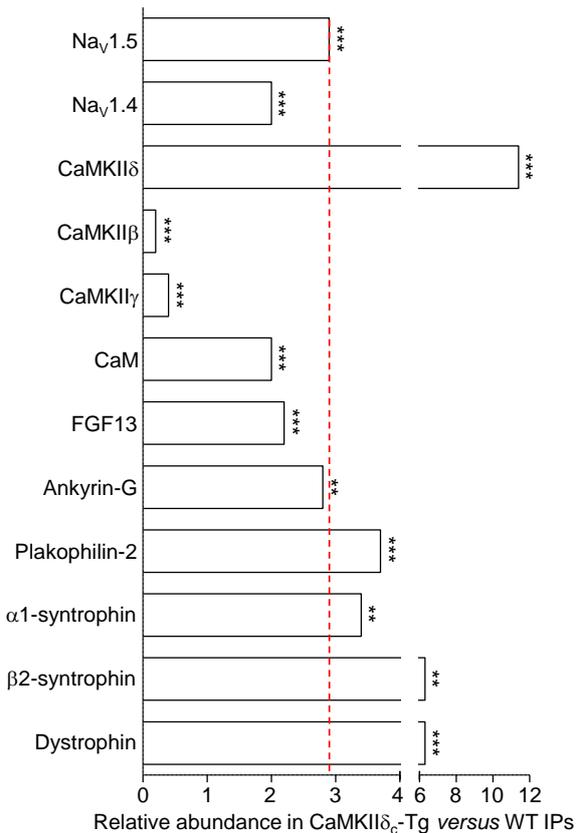


Figure 2. Burel et al.

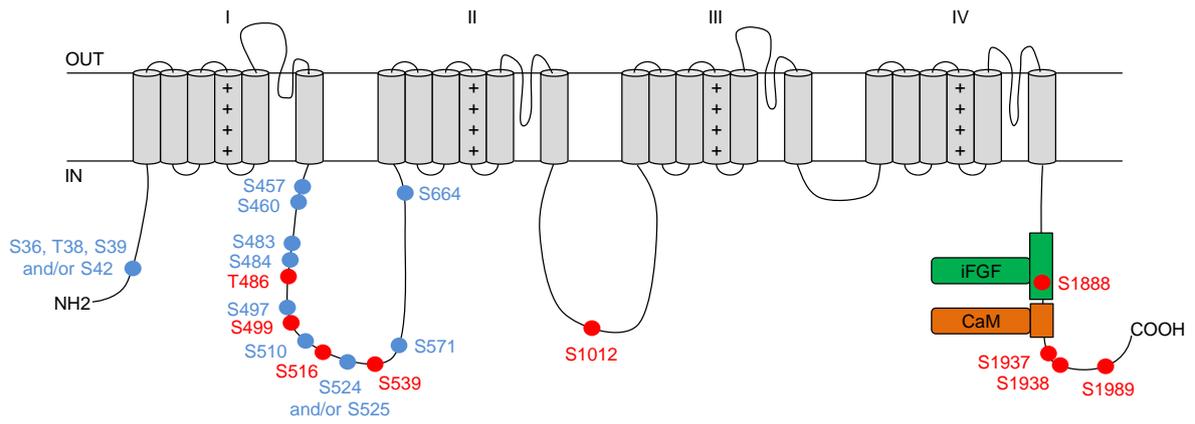


Figure 3. Burel et al.

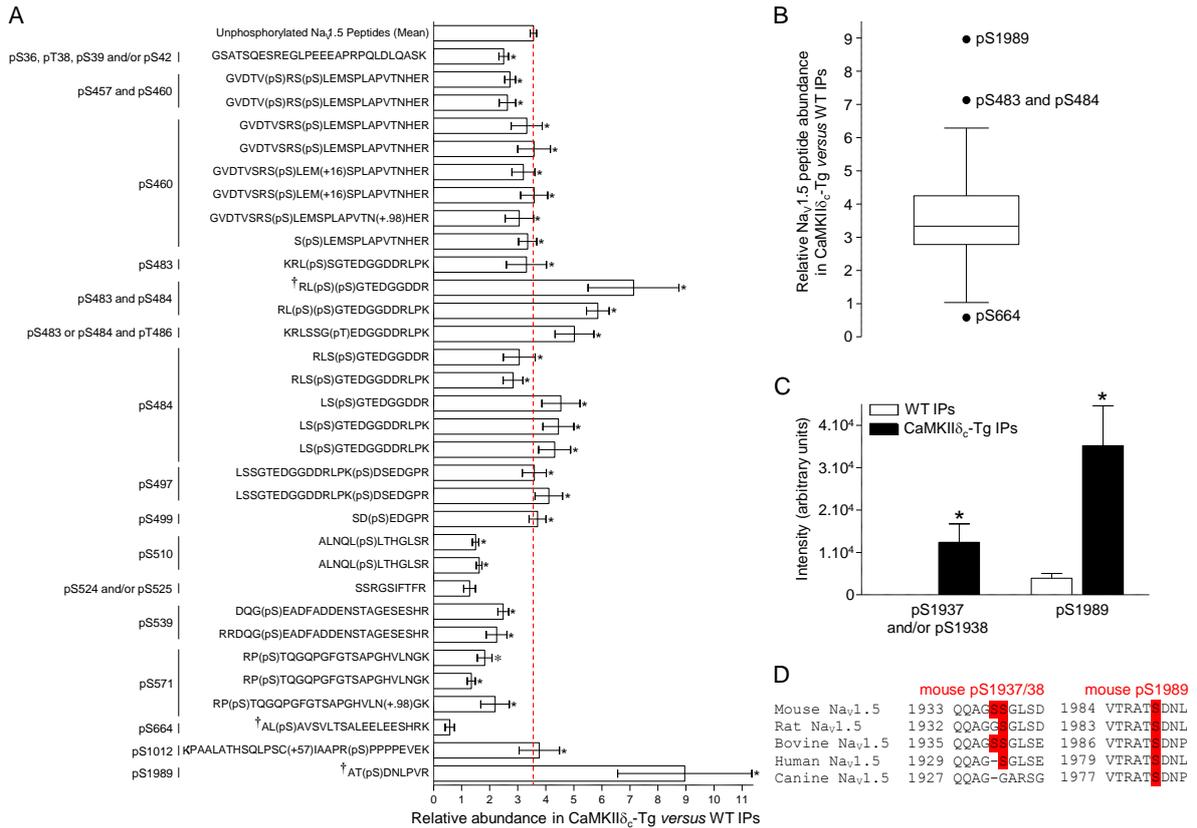


Figure 4. Burel et al.

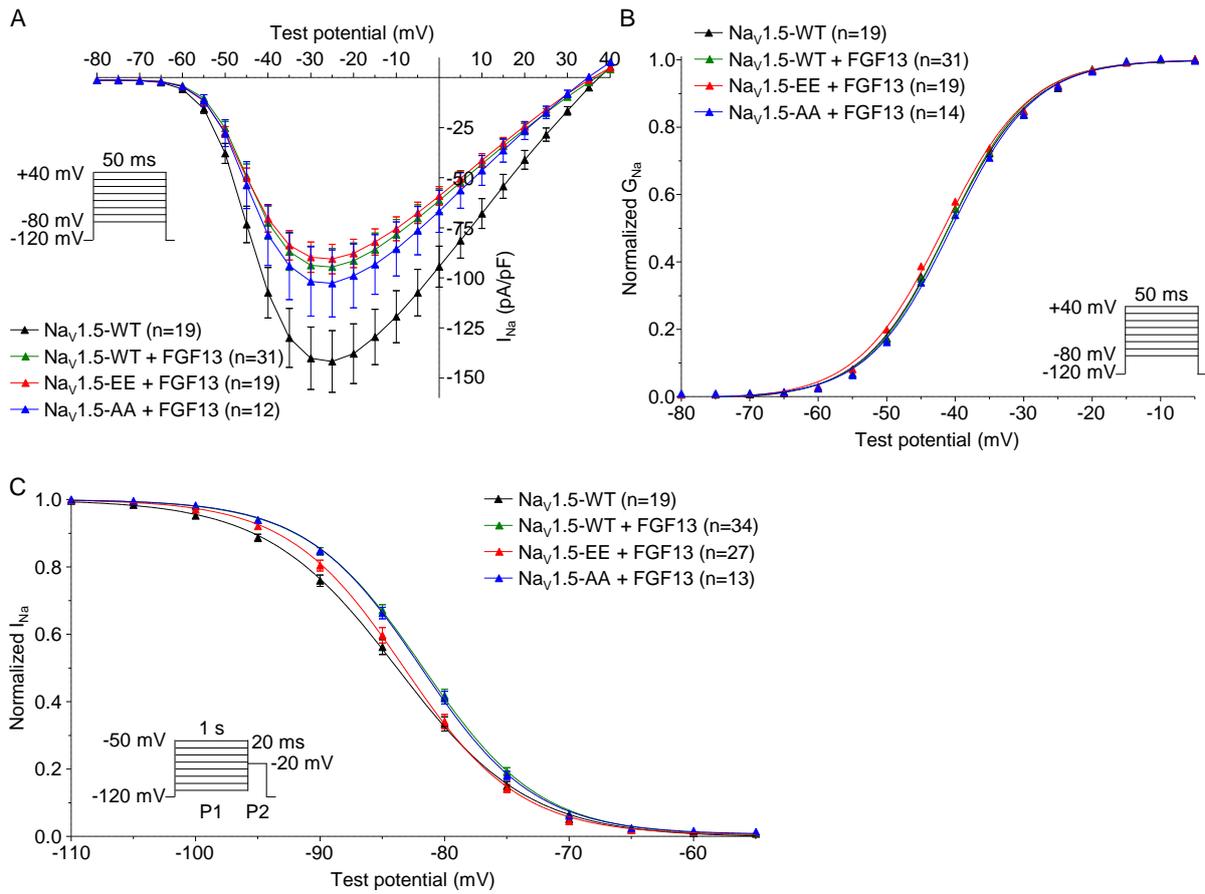


Figure 5. Burel et al

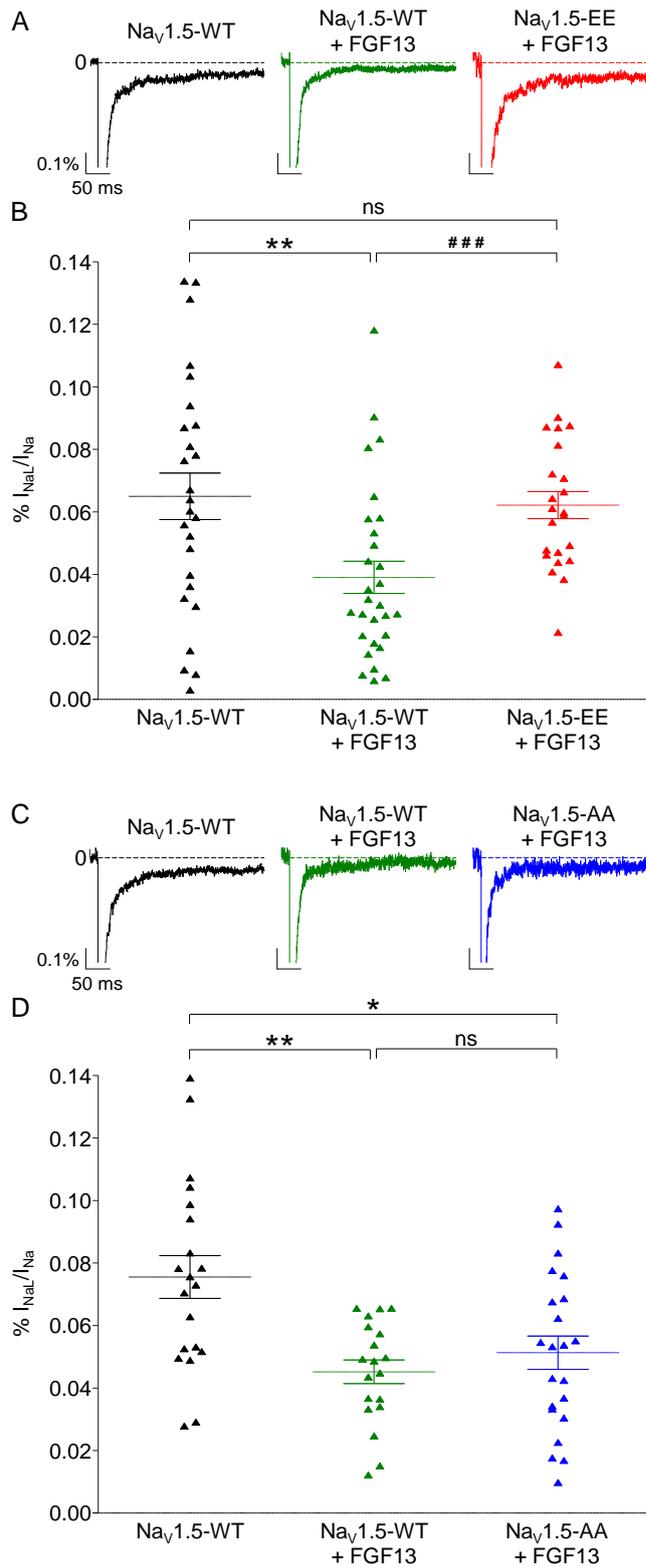


Figure 6. Burel et al

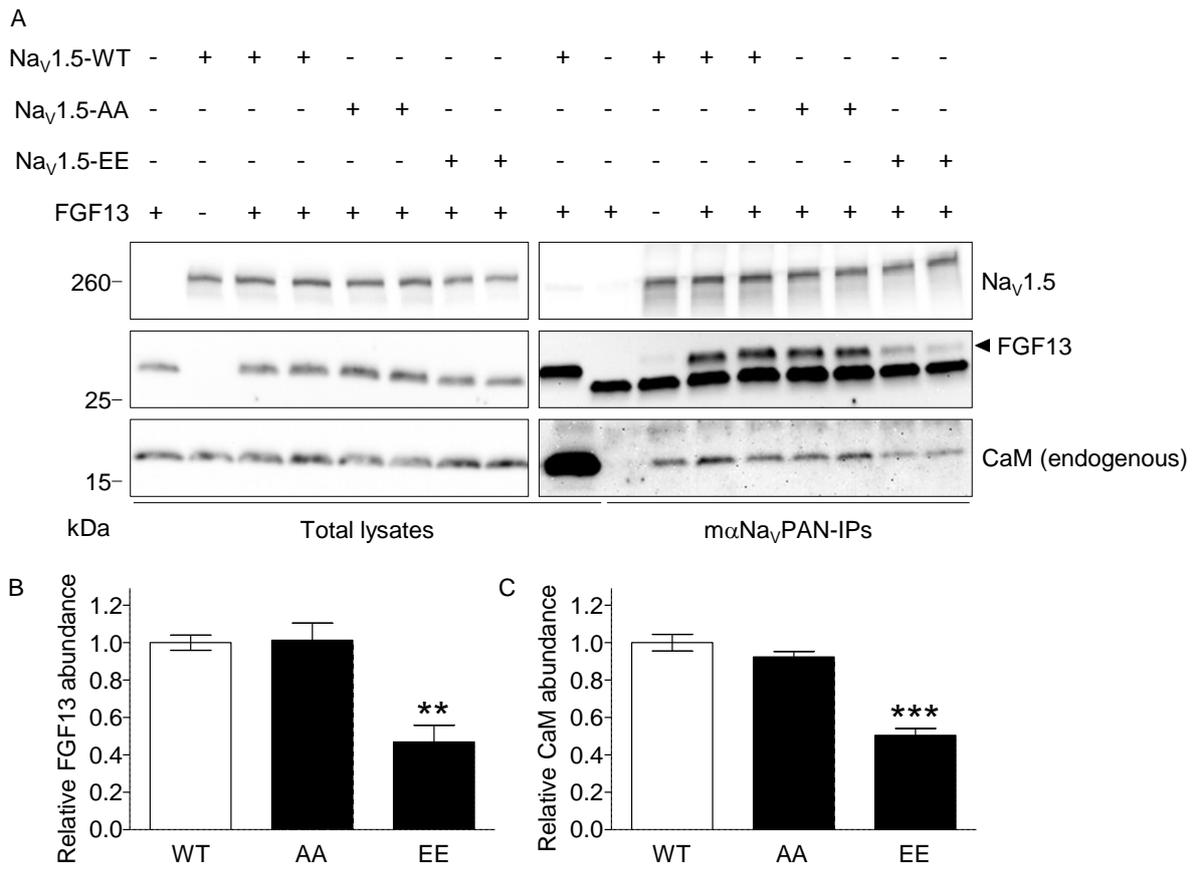


Figure 7. Burel et al

Supplementary Data

Burel et al.

Supplementary Materials and Methods

Animals were handled in accordance with the guidelines from Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes. Experimental protocols were approved by the local animal care and use committee (*Comité d’Ethique pour l’Expérimentation Animale des Pays de la Loire, authorization CEAA.2010.9*). Generation and characterization of the CaMKII δ_c -Tg mouse line have been described previously (Zhang et al., 2003). Cardiac tissues for *in vitro* experiments were harvested after euthanasia of the animals by cervical dislocation.

Immunoprecipitations of Nav Channel Complexes

Flash-frozen ventricles from four 13 months-old CaMKII δ_c -Tg and four age- and sex-matched wild-type (WT) mice were homogenized as described previously (Marionneau et al., 2012) in ice-cold lysis buffer containing 20 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.5% amidosulfobetaine (Sigma), 1X complete protease inhibitor cocktail tablet (Roche), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, Interchim), 0.7 μ g/ml pepstatin A (Thermo Fisher Scientific) and 1X Halt phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific). After 15-min rotation at 4°C, 8 mg of the pooled WT or CaMKII δ_c -Tg ventricular soluble protein fractions were pre-cleared with 200 μ L of protein G-magnetic beads (Pierce) for 1 hr and subsequently used for immunoprecipitations (IP) with 48 μ g of an anti-NavPAN monoclonal antibody (m α NavPAN, Sigma), raised against the SP19 epitope (Vassilev et al., 1988) located in the third intracellular linker loop and common to all Nav α subunits. Prior to the IP, antibodies were cross-linked to 200 μ l of protein G-magnetic beads using 20 mM dimethyl pimelimidate (Thermo Fisher Scientific) (Schneider et al., 1982). Protein samples and antibody-coupled beads were mixed for 2 hr at 4°C. Magnetic beads were then collected, washed rapidly four times with ice-cold lysis buffer, and isolated protein complexes were eluted from the beads in 2% Rapigest (Yu et al., 2004) (Waters), 8 M urea (Sigma), 100 mM Tris (pH 8.5) at 37°C for 30 min.

For co-immunoprecipitations of heterologously expressed proteins, Human Embryonic Kidney 293 (HEK293) cells were washed twice with PBS and lysed in lysis buffer (as above) 48 hours after transfection. Soluble protein fractions were collected and incubated with 12.5 μ L of m α NavPAN-coupled magnetic beads (as above). After 2-hr incubation at 4°C, beads were washed four times in lysis buffer, and protein complexes were eluted with 1X SDS sample buffer at 60°C for 5 min.

Gel Electrophoreses and Western Blot Analyses

Ten percent of the immunoprecipitated mouse ventricular Nav channel protein complexes were fractionated on one-dimensional polyacrylamide gels and analyzed using either SYPRO Ruby (Life Technologies) staining or western blotting using a rabbit polyclonal anti-Nav1.5 antibody (Rb α Nav1.5, Alomone, #ASC-005) as described previously (Marionneau et al., 2012). Western blot analyses of protein eluates from co-immunoprecipitations of heterologously expressed proteins were performed using the following primary antibodies: mouse monoclonal anti-NavPAN (1:2000, m α NavPAN, Sigma); mouse monoclonal anti-FGF13 (1:500, UC Davis/NINDS/NIMH NeuroMab Facility, clone N91/27); and rabbit monoclonal anti-calmodulin (1:300, Abcam, EP799Y). Bound antibodies were detected using horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies (Santa

Cruz Biotechnology), and protein signals were visualized using the SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce). The intensities of co-immunoprecipitated FGF13 or calmodulin bands were normalized to the intensities of immunoprecipitated Nav1.5 bands from the same IP sample in the same blot, and relative FGF13 or calmodulin abundances in immunoprecipitations from cells expressing Nav1.5 phosphomutants are expressed relative to abundances in immunoprecipitations from cells expressing Nav1.5-WT.

In-Solution Endoprotease Digestions

Samples for mass spectrometry were prepared as described previously (Marionneau et al., 2012). Briefly, eluted proteins were precipitated using the 2D protein clean up kit (GE Healthcare). The resulting pellets were dissolved in 8 M urea, 100 mM Tris (pH 8.5), reduced with 5 mM Tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP, pH 8.0) for 30 min at room temperature, and alkylated with 10 mM iodoacetamide (BioRad) for 30 min at room temperature. Samples were then digested with 1 μ g endoproteinase Lys-C (Roche) overnight at 37°C, and subsequently with 4 μ g of trypsin (Sigma) overnight at 37°C. Peptides were acidified with formic acid to a final concentration of 1%, extracted with NuTip porous graphite carbon wedge tips (Glygen), and eluted with aqueous acetonitrile (ACN, 60%) containing formic acid (FA, 0.1%). The extracted peptides were dried, dissolved in aqueous ACN/FA (1%/1%), stored at -80°C and subsequently analyzed using one-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometric experiments (LC-MS/MS).

Mass Spectrometric Analyses

Peptide mixtures were analyzed using nano-LC-MS on three high resolution hybrid mass spectrometers, a linear quadrupole ion trap Orbitrap XL (LTQ-Orbitrap XL) (Marionneau et al., 2012), an LTQ-Orbitrap Elite (Michalski et al., 2012) (both from Thermo Fisher Scientific), and a TripleTOF[®] 5600 Plus (Andrews et al., 2011) (SCIEX). The chromatograph was a 2D Plus (Eksigent) LC with a Nanoflex module and AS2 autosampler in dual cHiPLC columns (ChromXP C₁₈ 200 μ m x 15 cm; particle size 3 μ m, 120 Å) configuration. The mobile phases were 1% FA in water (A) and 1% FA in ACN (B). The liquid chromatographs were interfaced to the mass spectrometers through a nanospray source (PicoView PV550, New Objective). The samples were loaded in a volume of 5-10 μ L at a flow rate of 1.5 μ L/min followed by organic gradient elution of peptides (800 nL/min). The LC conditions for analyses on the LTQ-Orbitrap XL and LTQ-Orbitrap Elite were performed after equilibrating the columns in 98% solvent A and 2% solvent B followed by 2% B, 0-5 min; 2% to 25% B, 5-110 min; 25% to 80% B, 110-170 min; 80% to 2% B, 170-175 min; and isocratic elution at 2% B, 175-190 min. The survey scans (m/z 350-2000) (MS1) were acquired at high-resolution (60,000 at m/z 400) in the Orbitrap XL, and the MS2 spectra were acquired in the linear ion trap at low-resolution, both in profile mode. The maximum injection times for the MS1 scans in the Orbitrap and the LTQ were 500 and 200 ms, respectively. The automatic gain control targets for the Orbitrap and the LTQ were 5×10^5 and 3×10^4 , respectively, with maximum injection times of 100 ms for the MS2 scans. The MS1 scans were followed by three MS2 events in the linear ion trap with collision activation in the ion trap (parent threshold 1000, isolation width 2.0 Da, normalized collision energy 30%, activation Q 0.250, and activation time 30 ms). Dynamic exclusion was enabled (-0.20/+1.0 Da) for 90 s after MS2 acquisitions. A repeat count of 1, a repeat duration of 45 s, and a maximal exclusion list size of 500 were used. The following ion source parameters were used: capillary temperature 200°C, source voltage 3.0 kV, source current 100 μ A, capillary voltage 33 V, and tube lens 120 V. Data were acquired using XCalibur, version 2.2 SP1 (Thermo Fisher Scientific). For data acquisition on the LTQ-Orbitrap Elite, the following modifications were employed. The survey scans (m/z = 300-1650) were acquired at a resolution of 120,000 with a target value of $1e6$ ions. The HCD MS2 acquisitions

were performed for the top 15 most intense ions at a resolution of 15,000, a target value of 40,000 and a low mass setting of 120 m/z . For CID, a collision energy of 40% was used with an activation time of 100 ms. Dynamic exclusion was enabled (30 s) without MS2 acquisition of +1 charged parent ions. The data were acquired using Xcalibur, version 2.0.7 (Thermo Fisher Scientific).

The LC-MS analysis on the TripleTOF® 5600 Plus mass spectrometer was obtained using the following gradient elution program: 0 time, 98% A, 2% B; 5 min, 2% A, 98% B; 415 min, 65% A, 35% B; and 440 min, 20% A, 80% B. Initial chromatographic conditions were restored in 5 min and maintained for 20 min. The ion spray voltage was set at 2.9 kV, the curtain gas at 10 PSI, the nebulizer gas at 14 psi, and the interface heater temperature set at 175°C. The MS1 data were acquired at a resolution of 25,000 with a scan range of 400-1200 m/z in 250 ms. The top 50 product ions were selected for MS2 acquisition with a dwell time of 100 ms. Four time bins were summed for each scan at a frequency of 15.4 kHz (through monitoring of the 40 GHz multichannel TDC detector with four-anode/channel detection). A rolling collision energy was applied to all precursor ions for collision-induced dissociation using the equation: $CE = slope * m/z + intercept$, where the slope for all charge states above +2 is 0.0625 and the intercept is -3, -5 and -6 for +2, +3 and +4, respectively.

MS Data Processing and Analyses

The LC-MS raw files from the LTQ-Orbitrap XL and Elite were processed using MASCOT Distiller (version 2.3.02, Matrix Science) with settings previously described (Marionneau et al., 2012). The TripleTOF data were processed using the SCIEX MS Data Converter (version 1.3, SCIEX), converting the raw data files (*.wiff) to mgf files. The resulting MS2 centroided files were used for database searching with MASCOT (version 2.3.02) against the UNIPROT mouse protein database (downloaded on May 02, 2011 with 72,510 entries for the XL data, and on December 20, 2011 with 77,200 entries for the Elite and the TripleTOF data) using the following parameters: trypsin as the enzyme, MS tolerances of 50 (XL), 10 (Elite) and 25 (TripleTOF) ppm, MS/MS tolerances of 0.8 (XL), 0.05 (Elite) and 0.1 (TripleTOF) Da, with a fixed carbamidomethylation of Cys residues and variable modifications being oxidation (Met), pyro-glutamination (Gln) and phosphorylation (Ser, Thr and/or Tyr), a maximal number of missed cleavages of 4, and +1, +2, +3 and +4 charge states. Scaffold (versions 3.1.4.1 (XL), 4.4.3 (Elite) and 3.6.4 (TripleTOF), Proteome Software) was used to validate MS2-based peptide and protein identifications with the Peptide (Keller et al., 2002) and Protein (Nesvizhskii et al., 2003) Prophet algorithms using thresholds of 50% and 95%, respectively. **Supplementary Tables 1, 2 and 3** provide the complete lists of identified peptides and proteins using the LTQ-Orbitrap XL, Elite and the TripleTOF mass spectrometers, respectively.

Phosphopeptide spectra were manually interpreted by comparing the observed mass values from the spectrum in XCalibur (LTQ-Orbitrap XL and Elite data) or PeakView (TripleTOF data) with the theoretical parent and fragment $N_{av}1.5$ ion mass values from MS-Product (prospector.ucsf.edu). Annotations of MS2 spectra were first automated using a java-based software (<http://code.google.com/p/code915/source/browse/trunk/proteomics/src/fr/inserm/umr915/proteomics/MassSpecProduct.java>) which matches observed m/z values with theoretical fragment masses from MS-Product, and definitive annotations were subsequently obtained by manual verification and interpretation. Mass accuracy tolerances of 20 ppm or 0.5 Da were used as guidelines for high- and low-resolution spectral annotations, respectively, and only those ions with mass errors within these ranges were included to determine residue coverage and location of phosphorylation site(s). Additionally, for spectral annotation of high-resolution MS2 data, charge states of observed parent and fragment ions were determined, and only precursor, b- and

y-ions with confirmed charge states (*i.e.* with at least the presence of the ^{13}C isotope peak) were used. The phosphorylation site assignments were based on the presence or absence of the unphosphorylated and phosphorylated b- and y-ions flanking the site(s) of phosphorylation, ions that we call site-discriminating ions throughout this manuscript. When site-discriminating ions were not all detected, assignments of phosphorylation sites were narrowed down to one, two (for pS524 and/or pS525) or four (for pS36, pT38, pS39 and/or pS42) possibility(ies) by elimination. In addition to mass accuracy and charge state, the relative percentage of maximum intensity of site-discriminating ions or of any supporting ions in each analyzed spectrum was also considered for spectral annotation. Representative MS1 and MS2 spectra used for each of the phosphorylation site assignments are presented in **Supplementary Figures 1**. The definition of all observed site-discriminating ions, as well as the calculated mass errors and charge state confirmations for all supporting b- and y-ions (as well as for, when detected, the loss of phosphoric acid peaks) are summarized in **Table 1** and **Supplementary Tables 4**.

The label-free quantitative MS analysis of protein abundance in the IPs was performed from the entire (LTQ-Orbitrap XL) MS1 peptide data set using the DAnTE (Data Analysis Tool Extension) software (Karpievitch et al., 2009; Polpitiya et al., 2008; Taverner et al., 2012).

To perform label-free quantitative analyses of mass spectra of precursor ions (MS1 peptides) data, the LTQ-Orbitrap XL MS1 and MS2 data from quadruplicate analyses of αNav PAN-IPs from WT and CaMKII δ_{c} -Tg mouse ventricles were imported into Rosetta ElucidatorTM (version 3.3, Rosetta Biosoftware) for retention time and m/z alignment of the peptide ion chromatograms using previously described parameters (Neubert et al., 2008). Peak intensities of MS1 peptide features were quantified, and normalization of intensities across samples was performed using the average signal intensities obtained in each sample. Ion chromatograms and isotopic distributions of aligned Nav1.5 peptides were all visually inspected.

Plasmids

The simple and double Nav1.5 phosphomutant constructs were generated by mutating the serines 1933 and/or 1984 to alanine(s) (A) or glutamate(s) (E) by site-directed mutagenesis of the pCI-Nav1.5 plasmid containing the human Nav1.5 hH1C cDNA (Makielski et al., 2003) (NCBI Reference Sequence NM_000335) using the QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent Technologies) with the following primers (with mutations underlined): Nav1.5-S1933A-F 5'-cagcaggcgggcccgcggcctctccga, Nav1.5-S1933A-R 5'-tcggagaggccggcggcccgcctgctg, Nav1.5-S1933E-F 5'-cgtcagcaggcgggcccgaaggcctctccgaagag, Nav1.5-S1933E-R 5'-ctcttcggagaggccttcgcccgcctgctgacg, Nav1.5-S1984A-F 5'-tgtcactagagccaccgcccgaataacctccaggtg, Nav1.5-S1984A-R 5'-cacctggagggtatcggcgggtgctctagtgaca, Nav1.5-S1984E-F 5'-agtgtcactagagccaccggaagataacctccaggtg, Nav1.5-S1984E-R 5'-ccgcacctggagggtatcttcgggtgctctagtgacact. The mutated constructs were then digested with restriction endonucleases to excise the mutated fragments, which were then subcloned into the original pCI-Nav1.5 plasmid. The human Nav β 1 cDNA (NM_001037, a gift from A. L. George) was subcloned into pRc/CMV. The human transcript variant 2 of FGF13 (FGF13-2, NM_001139500), subcloned into pCMV6-XL5, was purchased from Amsbio. All constructs were sequenced to insure that no unintentional mutations were introduced.

Cell Culture and Transient Transfections

Human Embryonic Kidney 293 (HEK293) cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Life Technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin, in 37°C, 5% CO₂: 95% air incubator. Cells were transiently transfected at 70-80% confluence in 35 mm dishes with 0.9 μg of the WT

or phosphomutant Nav1.5 plasmid, 0.45 µg of the Navβ1 plasmid, with or without 0.45 µg of the FGF13 plasmid using 2 µL of Lipofectamine 2000 (Life technologies) following the manufacturer's instructions. For patch-clamp recordings, transfections also contained 0.2 µg of the pEGFP plasmid (Enhanced Green Fluorescent Protein plasmid, Clontech), so that the EGFP expression serves as a marker of transfection. The absolute amounts of the various constructs were calculated and the empty pcDNA3.1 plasmid (Life Technologies) was used as a filler plasmid to keep the total DNA constant at 2 µg in each transfection.

Electrophysiological Recordings from HEK293 Cells

Whole cell Nav currents were recorded at room temperature from transiently transfected HEK293 cells using an Axopatch 200A amplifier (Axon Instruments) 48 hours after transfection. Voltage-clamp protocols were applied using the pClamp 10.2 software package (Axon Instruments) interfaced to the electrophysiological equipment using a Digidata 1440A digitizer (Axon Instruments). Current signals were filtered at 5 kHz prior to digitization at 50 kHz and storage. Patch-clamp pipettes were pulled from borosilicate glass (OD: 1.5 mm, ID: 0.86 mm, Sutter Instrument) using a P-97 micropipette puller (Sutter Instrument), coated with wax, and fire-polished to a resistance between 1.5 and 2.5 MΩ when filled with internal solution. The internal solution contained (in mM): NaCl 5, CsCl 105, HEPES 10, Glucose 5, EGTA 10, CaCl₂ 8.7 (1 µM free [Ca²⁺], calculated with MaxChelator, <http://maxchelator.stanford.edu>) and Mg-ATP 5 (1 mM free [Mg²⁺], MaxChelator) (pH 7.2 with CsOH, ~300 mosM). The external (low Na⁺) solution contained (in mM): NaCl 25, CsCl 94, TEA-Cl (tetraethylammonium chloride) 25, HEPES 10, Glucose 5, CaCl₂ 1, MgCl₂ 2 (pH 7.4 with CsOH, ~300 mosM). All the chemicals were purchased from Sigma. After establishing the whole cell configuration, three minutes were allowed to ensure stabilization of the voltage-dependence of inactivation properties, at which time 25 ms voltage steps to ± 10 mV from a holding potential (HP) of -70 mV were applied to allow measurement of whole cell membrane capacitance, input and series resistances. Only cells with access resistance < 7 MΩ were used, and input resistances were typically > 5 GΩ. After compensation of series resistance (80%), the membrane was held at a HP of -120 mV, and the voltage-clamp protocols were carried out as indicated below. Leak currents were always < 200 pA at the HP (-120 mV), and corrected offline. Cells exhibiting peak current amplitudes < 500 or > 5000 pA were excluded from analyses.

Data were compiled and analyzed using ClampFit 10.2 (Axon Instruments), Microsoft Excel, and Prism (GraphPad Software). Whole cell membrane capacitance (C_m) was determined by analyzing the decays of capacitive transients elicited by the 25 ms voltage steps to ± 10 mV from the HP (-70 mV) prior to compensation. C_m was calculated by dividing the integrated capacitive transients by the voltage. Input resistance was calculated from the steady-state currents elicited by the same ±10 mV steps (from the HP). Series resistance was calculated by dividing the decay time constants of the capacitive transients (fit with a single exponential) by the C_m. To determine the current-voltage relationships, currents were elicited by 50-ms depolarizing pulses from -80 to +40 mV in 5-mV increments from a HP of -120 mV (5-s interpulse duration). Peak current amplitudes at each voltage step were defined as the maximal current amplitudes. Current amplitudes were corrected by leak currents (calculated at each voltage step from the leak current measured at the HP), and normalized to the C_m. To analyze the voltage-dependence of activation properties, current amplitudes at each voltage step were transformed to conductances (G), and conductance-voltage relationships were fitted with the Boltzmann equation $G = G_{\max} / (1 + \exp(- (V_m - V_{1/2}) / k))$, in which V_{1/2} is the membrane potential for half-activation and k the slope factor. The time course of inactivation of macroscopic current was fitted with the double exponential function $I(t) = A_{\text{slow}} \times \exp(-t/\tau_{\text{slow}}) + A_{\text{fast}} \times \exp(-t/\tau_{\text{fast}}) + A_0$, in which A_{slow} and A_{fast} are the amplitudes of the slow and fast

inactivating current components, respectively, and τ_{slow} and τ_{fast} are the decay time constants of A_{slow} and A_{fast} , respectively. A standard two-pulse protocol was used to generate the voltage-dependence of steady-state inactivation curves: from a HP of -120 mV, cells were stepped to 1-s conditioning potentials varying from -120 to -50 mV (prepulse) in 5-mV increments, followed by 20-ms test pulses to -20 mV. Current amplitudes measured at each test pulse were normalized to the maximal current amplitude (I_{max}), and the steady-state inactivation curves were fitted with the Boltzmann equation $I = I_{\text{max}} / (1 + \exp((V_m - V_{1/2}) / k))$, in which $V_{1/2}$ is the membrane potential for half-inactivation and k the slope factor. Recovery from inactivation was assessed using a three-pulse protocol with a test pulse (at -20 mV) at variable times (from 1 to 200 ms at -120 mV) after a 1-s conditioning pulse to -20 mV (from a HP of -120 mV). The time course of recovery from inactivation was analyzed by fitting the current amplitudes measured at each test pulse normalized to the current amplitudes measured during each conditioning pulse with the single exponential function $I(t) = A \times (1 - \exp(-t / \tau_{\text{rec}}))$.

In experiments aimed at recording the tetrodotoxin (TTX)-sensitive late Na^+ current, cells were bathed in external (full Na^+) solution containing (in mM): NaCl 140, CsCl 5, HEPES 10, Glucose 5, CaCl_2 1, MgCl_2 2 (pH 7.4 with CsOH, ~300 mosM). Repetitive 350-ms test pulses to -20 mV from a HP of -120 mV (5-s interpulse duration) were applied to cells superfused locally with external (full Na^+) solutions supplemented with 20 mM mannitol, in the absence and in the presence of 30 μM TTX (Tocris Bioscience). Only cells exhibiting peak current amplitudes > 5000 pA were used (those with peak current < 5000 pA did not show measurable late Na^+ current), and cells with difference in leak current amplitudes before and after TTX application > 2 pA at -20 mV (calculated from leak currents at -120 mV) were excluded from analyses. TTX-sensitive currents from individual cells were determined by offline digital subtraction of average leak-subtracted currents obtained from 5 records in the absence and in the presence of TTX after achieving steady state. The amplitude of TTX-sensitive late Na^+ current was defined as the steady-state current amplitude (A_0) obtained by fitting the inactivation decay of macroscopic TTX-sensitive current with the double exponential function $I(t) = A_{\text{slow}} \times \exp(-t/\tau_{\text{slow}}) + A_{\text{fast}} \times \exp(-t/\tau_{\text{fast}}) + A_0$. For each cell, the TTX-sensitive late Na^+ current amplitude was normalized to the TTX-sensitive peak Na^+ current amplitude, and expressed as a percentage of the TTX-sensitive peak Na^+ current.

Statistical Analyses

Results are expressed as means \pm SEM, and statistical analyses were performed using the nonparametric Mann-Whitney test. Tukey whisker analyses and plots were performed using Prism (GraphPad Software).

References

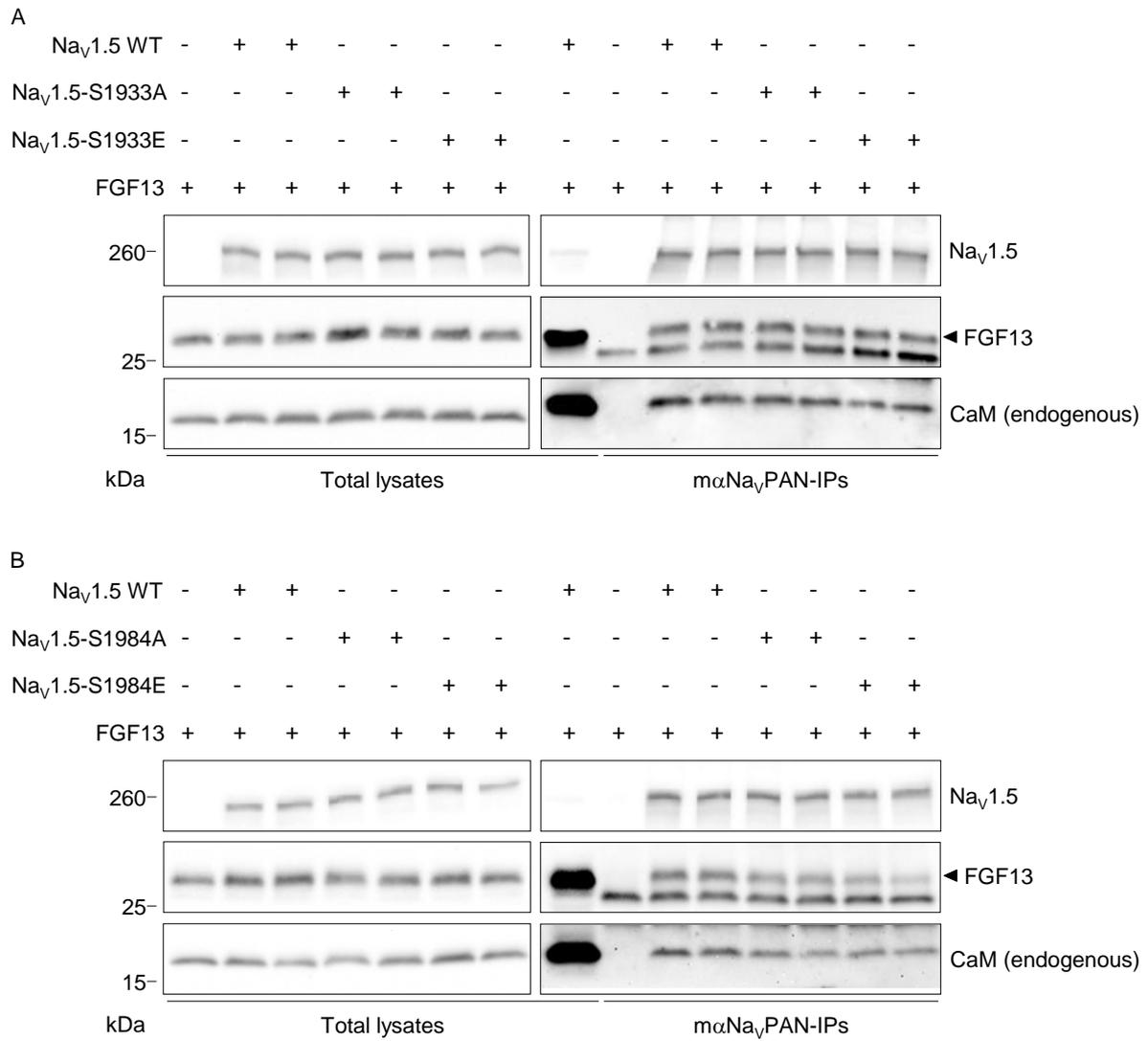
1. Zhang T, Maier LS, Dalton ND, Miyamoto S, Ross J, Jr., Bers DM, Brown JH. The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res* 2003;**92**:912-919.
2. Marionneau C, Lichti CF, Lindenbaum P, Charpentier F, Nerbonne JM, Townsend RR, Merot J. Mass Spectrometry-Based Identification of Native Cardiac Nav1.5 Channel alpha Subunit Phosphorylation Sites. *J Proteome Res* 2012;**11**:5994-6007.
3. Vassilev PM, Scheuer T, Catterall WA. Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. *Science* 1988;**241**:1658-1661.
4. Schneider C, Newman RA, Sutherland DR, Asser U, Greaves MF. A one-step purification of membrane proteins using a high efficiency immunomatrix. *J Biol Chem* 1982;**257**:10766-10769.
5. Yu YQ, Gilar M, Gebler JC. A complete peptide mapping of membrane proteins: a novel surfactant aiding the enzymatic digestion of bacteriorhodopsin. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2004;**18**:711-715.
6. Michalski A, Damoc E, Lange O, Denisov E, Nolting D, Muller M, Viner R, Schwartz J, Remes P, Belford M, Dunyach JJ, Cox J, Horning S, Mann M, Makarov A. Ultra high resolution linear ion trap Orbitrap mass spectrometer (Orbitrap Elite) facilitates top down LC MS/MS and versatile peptide fragmentation modes. *Mol Cell Proteomics* 2012;**11**:O111 013698.
7. Andrews GL, Simons BL, Young JB, Hawkrigde AM, Muddiman DC. Performance characteristics of a new hybrid quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometer (TripleTOF 5600). *Anal Chem* 2011;**83**:5442-5446.
8. Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E, Aebersold R. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal Chem* 2002;**74**:5383-5392.
9. Nesvizhskii AI, Keller A, Kolker E, Aebersold R. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 2003;**75**:4646-4658.
10. Karpievitch Y, Stanley J, Taverner T, Huang J, Adkins JN, Ansong C, Heffron F, Metz TO, Qian WJ, Yoon H, Smith RD, Dabney AR. A statistical framework for protein quantitation in bottom-up MS-based proteomics. *Bioinformatics* 2009;**25**:2028-2034.
11. Polpitiya AD, Qian WJ, Jaitly N, Petyuk VA, Adkins JN, Camp DG, 2nd, Anderson GA, Smith RD. DAnTE: a statistical tool for quantitative analysis of -omics data. *Bioinformatics* 2008;**24**:1556-1558.
12. Taverner T, Karpievitch YV, Polpitiya AD, Brown JN, Dabney AR, Anderson GA, Smith RD. DanteR: an extensible R-based tool for quantitative analysis of -omics data. *Bioinformatics* 2012;**28**:2404-2406.
13. Neubert H, Bonnert TP, Rumpel K, Hunt BT, Henle ES, James IT. Label-free detection of differential protein expression by LC/MALDI mass spectrometry. *J Proteome Res* 2008;**7**:2270-2279.
14. Makielski JC, Ye B, Valdivia CR, Pagel MD, Pu J, Tester DJ, Ackerman MJ. A ubiquitous splice variant and a common polymorphism affect heterologous expression of recombinant human SCN5A heart sodium channels. *Circ Res* 2003;**93**:821-828.

Legend of Supplementary Figures 1. Representative high- or low-resolution tandem mass (MS2) spectra of singly, doubly or triply phosphorylated Nav1.5 tryptic peptides (listed in **Table 1**) demonstrating the phosphorylation of the serines 36, 39, 42 and/or the threonine 38 (pS36, pT38, pS39 and/or pS42), the serines 457 (pS457), 460 (pS460), 483 (pS483), 484 (pS484), 497 (pS497), 499 (pS499), 510 (pS510), 516 (pS516), 524 and/or 525 (pS524 and/or pS525), 539 (pS539), 571 (pS571), 664 (pS664), 1012 (pS1012), 1888 (pS1888), 1937 (pS1937), 1938 (pS1938) and 1989 (pS1989), and the threonine 486 (pT486). The small insets show representative spectra of precursor ions (MS1 spectra) that were used and fragmented to produce the MS2 spectra. The presence of the y- (highlighted in blue) and b- (in red) ion series describing the amino acid sequences, of the loss of phosphoric acid peaks (in green) as well as of the unphosphorylated and phosphorylated site-discriminating (or supporting) ions unambiguously supported the assignments of the indicated phosphorylation site(s). The charge state confirmations and the percentage of maximum intensities of site-discriminating ions are presented in **Table 1**, and the complete list of assigned ions is given in **Supplementary Tables 4**.

Legend of Supplementary Figure 2. Single phosphorylations at serines 1933 or 1984 do not change the binding affinity of FGF13 or CaM with Nav1.5. Forty-eight hours following transfection of HEK293 cells with cDNA constructs encoding Nav1.5-WT, serine to alanine (Nav1.5-S1933A, Nav1.5-S1984A) or serine to glutamate (Nav1.5-S1933E, Nav1.5-S1984E) single Nav1.5 phosphomutants and/or FGF13, cell lysates were prepared and used for immunoprecipitations (IPs) with the m α NavPAN antibody. Western blot analyses of the lysates (left panel) and the immunoprecipitates (right panel) with the monoclonal anti-NavPAN, anti-FGF13 and anti-CaM antibodies showed no significant differences in the relative abundances of FGF13 or CaM in Nav1.5 immunoprecipitations from cells expressing the single phosphomutants at positions 1933 (**A**) or 1984 (**B**), compared with cells expressing the WT channel.

Legend of Supplementary Tables 1, 2 and 3. Lists of identified peptides and proteins using the LTQ-Orbitrap XL (1), the LTQ-Orbitrap Elite (2) and the TripleTOF 5600 Plus (3) mass spectrometers. In each peptide data table (spreadsheets #1), the MASCOT ion score, the observed m/z and the calculated mass error (in ppm) are shown. In the protein tables (spreadsheets #2), the percent protein identification probability, the exclusive unique peptide and spectrum counts, the exclusive spectrum count and the percent amino acid sequence coverage are indicated.

Legend of Supplementary Tables 4. The calculated mass errors (in ppm) and charge state confirmations (presence or absence of the ^{13}C isotopic peak) for all supporting b- and y-ions (as well as for the loss of phosphoric acid peaks) observed in the high- or low-resolution MS2 spectra of each annotated Nav1.5 phosphopeptide (listed in **Table 1** and represented in **Supplementary Figures 1**) are summarized. Spreadsheet titles indicate the m/z values of the presented phosphopeptides.



Supplementary Figure 2. Burel et al

Supplementary Table 5. Voltage-gated Na⁺ current densities and properties in transiently transfected HEK293 cells

	Na _v 1.5-WT	Na _v 1.5-WT + FGF13	Na _v 1.5-EE + FGF13	Na _v 1.5-S1933E + FGF13	Na _v 1.5-S1984E + FGF13	Na _v 1.5-AA + FGF13	Na _v 1.5-S1933A + FGF13	Na _v 1.5-S1984A + FGF13
I _{Na} (pA/pF)	-137.9 ± 14.9 (19)	-91.5 ± 8.9 (31)*	-87.8 ± 7.1 (19)**	-107.8 ± 10.1 (26)	-97.6 ± 8.8 (16)*	-99.0 ± 15.9 (12)	-97.6 ± 17.1 (6)	-83.9 ± 10.8 (8)*
Time to peak (ms)	0.76 ± 0.02 (19)	0.82 ± 0.02 (31)	0.79 ± 0.02 (19)	0.77 ± 0.01 (26)	0.76 ± 0.02 (16)	0.78 ± 0.03 (14)	0.72 ± 0.02 (6)	0.74 ± 0.02 (8)
Time course of inactivation	0.81 ± 0.03 (19)	0.84 ± 0.02 (31)	0.88 ± 0.02 (19)	0.86 ± 0.02 (26)	0.86 ± 0.02 (16)	0.85 ± 0.03 (14)	0.73 ± 0.01 (6)	0.79 ± 0.02 (8)
τ _{fast} (ms)	5.3 ± 0.3 (19)	5.1 ± 0.3 (31)	6.1 ± 0.3 (19)	5.1 ± 0.3 (26)	5.9 ± 0.6 (16)	4.1 ± 0.3 (14)	4.0 ± 0.4 (6)	4.7 ± 0.3 (8)
τ _{slow} (ms)	17.3 ± 1.7 (19)	15.7 ± 1.7 (31)	14.4 ± 2.2 (19)	21.4 ± 2.9 (26)	20.5 ± 4.9 (16)	15.4 ± 1.2 (14)	18.3 ± 5.5 (6)	18.3 ± 4.8 (8)
A _{fast} /A _{slow}	-41.1 ± 0.4 (19)	-41.0 ± 0.4 (31)	-41.7 ± 0.4 (19)	-39.9 ± 0.3 (26)	-40.7 ± 0.5 (16)	-40.6 ± 0.7 (14)	-41.9 ± 0.5 (6)	-40.9 ± 0.6 (8)
Voltage-dependence of activation	6.1 ± 0.1 (19)	5.9 ± 0.1 (31)	6.2 ± 0.1 (19)	6.0 ± 0.1 (26)	6.1 ± 0.1 (16)	5.9 ± 0.1 (14)	5.9 ± 0.2 (6)	5.9 ± 0.2 (8)
Voltage-dependence of inactivation	-83.8 ± 0.5 (19)	-81.8 ± 0.4 (34)**	-83.3 ± 0.4 (27)*	-81.0 ± 0.3 (24)***	-82.9 ± 0.4 (15)	-81.9 ± 0.4 (13)*	-83.0 ± 0.3 (9)	-82.1 ± 0.3 (11)*
k (mV)	5.1 ± 0.11 (19)	4.5 ± 0.04 (34)***	4.4 ± 0.04 (27)***	4.5 ± 0.05 (24)***	4.5 ± 0.05 (15)***	4.5 ± 0.06 (13)**	4.5 ± 0.08 (9)**	4.5 ± 0.07 (11)**
Recovery from inactivation	6.9 ± 0.5 (13)	6.0 ± 0.3 (26)	6.8 ± 0.3 (18)	5.3 ± 0.2 (21)*	6.3 ± 0.3 (11)	5.4 ± 0.3 (12)*	6.1 ± 0.4 (8)	5.9 ± 0.4 (10)

The peak Na⁺ current density (I_{Na}), time to peak and time course of inactivation properties presented were determined from analyses of records obtained on depolarizations to -20 mV (HP=-120 mV). All values are means ± SEM. The number of cells analyzed is provided in parentheses. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 versus Na_v1.5-WT; #p<0.05 versus Na_v1.5-WT + FGF13; Mann-Whitney test.

Supplementary Table 6. Late Na⁺ current amplitudes in transiently transfected HEK293 cells

	Na _v 1.5-WT	Na _v 1.5-WT + FGF13	Na _v 1.5-EE + FGF13	Na _v 1.5-S1933E + FGF13	Na _v 1.5-S1984E + FGF13
%I _{NaL} /I _{Na}	0.065 ± 0.007 (26)	0.039 ± 0.005 (29)**	0.062 ± 0.004 (23)###	0.061 ± 0.007 (19)#	0.072 ± 0.009 (21)##
I _{NaL} (pA)	-6.17 ± 0.84 (26)	-2.76 ± 0.45 (29)***	-4.46 ± 0.31 (23)###	-4.47 ± 0.64 (19)#	-4.48 ± 0.44 (21)###

	Na _v 1.5-WT	Na _v 1.5-WT + FGF13	Na _v 1.5-AA + FGF13	Na _v 1.5-S1933A + FGF13	Na _v 1.5-S1984A + FGF13
%I _{NaL} /I _{Na}	0.076 ± 0.007 (20)	0.045 ± 0.004 (19)**	0.051 ± 0.005 (22)*	0.058 ± 0.011 (13)	0.055 ± 0.006 (13)
I _{NaL} (pA)	-6.04 ± 0.72 (20)	-3.60 ± 0.48 (19)*	-3.82 ± 0.37 (22)*	-4.78 ± 0.89 (13)	-5.15 ± 0.88 (13)

The TTX-sensitive late (I_{NaL}) and peak (I_{Na}) Na⁺ current amplitudes were measured at -20 mV (HP=-120 mV). All values are means ± SEM. The number of cells analyzed is provided in parentheses. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 versus Na_v1.5-WT; #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 versus Na_v1.5-WT + FGF13; Mann-Whitney test.

II.3. Résultat supplémentaire

Nous avons montré que le fait de mimer la phosphorylation des S1933 et S1984 diminue l'interaction du FGF13 et de la CaM avec le canal Nav1.5. Nous avons donc ensuite cherché à déterminer si l'interaction du FGF13 et de la CaM avec Nav1.5 est dépendante de l'interaction de l'une et/ou l'autre des deux protéines avec le canal. La CaM étant présente de façon endogène dans les cellules HEK293, nous avons réalisé une immunoprécipitation à partir de cellules HEK293 transfectées avec le canal Nav1.5, en présence ou en absence de FGF13. La **Figure 20** illustre les résultats obtenus et montre que la co-immunoprécipitation de la CaM avec Nav1.5 est augmentée dans la condition où le FGF13 est exprimé, par rapport à la condition où il est absent. Ces résultats suggèrent donc que l'expression et/ou l'interaction de FGF13 avec le canal Nav1.5 augmente l'interaction de la CaM avec celui-ci.

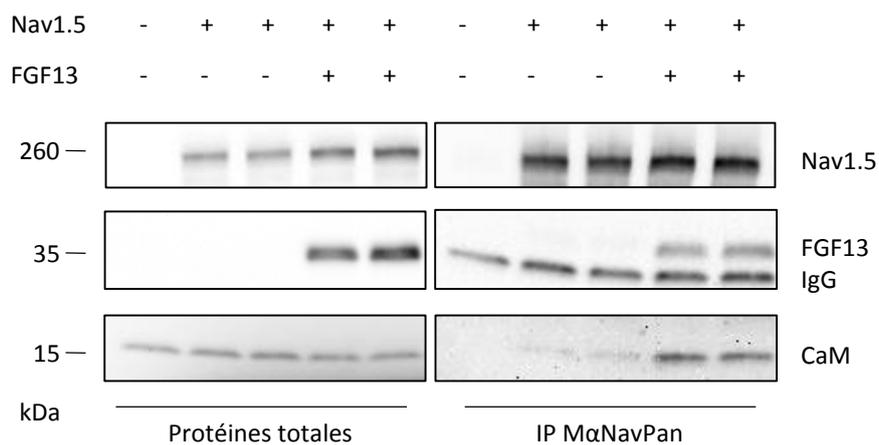


Figure 20. Effets du FGF13 sur l'interaction de la CaM avec le canal Nav1.5. Analyses par western blot des fractions totales (à gauche) et des fractions immunoprécipitées à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-NavPan (à droite), à partir de cellules HEK293 transfectées avec Nav1.5, en présence ou en absence de FGF13. CaM, Calmoduline ; FGF13, *Fibroblast Growth Factor 13* ; IgG, Immunoglobuline de type G ; IP, Immunoprécipitation.

II.4. Discussion

L'objectif de ce deuxième projet était de déterminer le rôle de la phosphorylation des sérines 1933 et 1984 dans les défauts d'inactivation des canaux Nav1.5 associés à l'insuffisance cardiaque. Ces deux sites étant localisés à proximité du domaine de liaison des FHF et de la CaM, nous avons émis l'hypothèse que la phosphorylation des S1933 et S1984 pouvait moduler les propriétés d'inactivation des canaux Nav1.5 en altérant l'interaction du FGF13 et de la CaM avec le canal. Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer le rôle du FGF13 sur les propriétés biophysiques des canaux Nav1.5. Nous avons montré que le FGF13 augmente la disponibilité des canaux Nav1.5, en décalant la courbe d'inactivation du courant I_{Na} vers des potentiels moins négatifs. Nous avons également montré pour la première fois que le FGF13 diminue le courant I_{NaL} . L'ensemble de ces résultats est cohérent avec les travaux précédents montrant que le FGF13 est impliqué dans la régulation de l'inactivation des canaux Nav1.5 (Wang et al., 2012; Wang et al., 2011a). Afin de déterminer le rôle de la phosphorylation des S1933 et S1984 dans la régulation des canaux Nav1.5 nous avons étudié l'effet des phosphomutants alanine (A) et glutamate (E), visant respectivement à éliminer ou mimer la phosphorylation au niveau de ces sites, sur les propriétés biophysiques des canaux Nav1.5. Les résultats obtenus dans les cellules HEK293 ont révélé que le double phosphomutant Nav1.5-S1933E-S1984E entraîne un décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs, c'est-à-dire une diminution de la disponibilité des canaux, par rapport à la condition où le canal Nav1.5-WT est co-transfecté avec le FGF13. Le double phosphomutant alanine ne montre pas de différence. De façon intéressante, les simples phosphomutants Nav1.5-S1933E et Nav1.5-S1984E ont des propriétés similaires au canal WT, suggérant que la phosphorylation des deux sérines est nécessaire pour induire un effet sur l'inactivation du canal Nav1.5. Les enregistrements du courant I_{NaL} réalisés en présence de FGF13 ont montré que le double phosphomutant Nav1.5-S1933E-S1984E induit une augmentation du courant I_{NaL} par rapport à la condition où le canal WT est exprimé, alors que ni le double phosphomutant alanine, ni les simples phosphomutants alanine ou glutamate n'induisent de différence. Ceci est cohérent avec les effets obtenus sur les propriétés d'inactivation et suggère que la phosphorylation des deux sérines est nécessaire pour induire un effet.

Nous avons ensuite émis l'hypothèse que les effets observés étaient dus à une altération de l'interaction du FGF13 et de la CaM avec Nav1.5. Dans ce but, des expériences de co-immunoprécipitation ont été réalisées dans les cellules HEK293 transfectées avec le canal Nav1.5-WT ou les différents phosphomutants, et le FGF13, afin d'étudier le rôle de la phosphorylation de ces deux sérines dans la régulation de cette interaction. Ces expériences ont dans un premier temps permis de montrer que le FGF13 et la CaM (endogène) co-immunoprécipitent avec le canal Nav1.5, ce qui est cohérent avec les études de structure et d'interaction qui ont montré l'existence d'un complexe ternaire Nav1.5/FGF13/CaM (Chagot et Chazin, 2011; Gabelli et al., 2014; Potet et al., 2009; Sarhan et al., 2009; Wang et al., 2012; Wang et al., 2014). Nous avons également montré que l'expression du FGF13 augmente l'interaction de la CaM avec le canal Nav1.5, suggérant que la liaison du FGF13 à Nav1.5 favorise l'interaction de la CaM avec le canal et la régulation du canal par le Ca^{2+} /CaM. Ces résultats suggèrent que le FGF13 et la CaM coopèrent pour réguler l'inactivation des canaux Nav1.5, et il reste donc à démontrer le rôle respectif du FGF13 et de la CaM dans ces mécanismes. De façon intéressante, ces résultats sur l'interaction du FGF13 et de la CaM avec le canal Nav1.5 sont cohérents avec le fait qu'une perte d'interaction de Nav1.5 avec la CaM, par mutation du motif IQ (Kim et al., 2004), ou avec le FGF13 dans le cadre du LQTS de type 3 (Musa et al., 2015), altère l'inactivation du canal et augmente le courant I_{NaL} , ce qui renforce l'hypothèse d'une action coopérative de ces deux protéines dans la régulation de l'inactivation des canaux Nav1.5.

Nos travaux ont également permis de montrer que la co-immunoprécipitation du FGF13 et de la CaM est significativement diminuée dans la condition où le double phosphomutant S1933E-S1984E est exprimé, par rapport à la condition Nav1.5-WT, alors que le double phosphomutant S1933A-S1984A ne présente pas de différence d'interaction. L'expression des simples phosphomutants A et E n'induit pas non plus de différence d'interaction avec le canal par rapport à la condition contrôle, ce qui est en accord avec les résultats d'électrophysiologie. Ces résultats suggèrent donc que la phosphorylation des S1933 et S1984 diminue l'interaction de FGF13 et de la CaM avec le canal Nav1.5. De façon plus générale, l'ensemble des résultats présentés suggèrent que la phosphorylation des S1933 et S1984, dont l'abondance est augmentée dans un modèle d'insuffisance cardiaque, altère la

régulation de l'inactivation des canaux Nav1.5 dépendante du FGF13 et/ou de la CaM, en diminuant l'interaction du FGF13 et de la CaM avec le canal.

Il est aujourd'hui indispensable de confirmer ces résultats dans un modèle de cardiomyocytes. Pour cela, une approche d'extinction de Nav1.5 par shRNA (*short hairpin RNA*) puis de réexpression du canal sauvage ou des différents phosphomutants est en cours, dans des cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés en culture. Il est également indispensable de confirmer ces résultats dans un autre modèle animal d'insuffisance cardiaque, comme le modèle de constriction de l'aorte chez la souris ou le modèle d'insuffisance cardiaque induite chez le chien par un bloc de conduction suivie d'une stimulation cardiaque (Aiba et al., 2013; Houser et al., 2012). Il serait également particulièrement intéressant de déterminer l'abondance relative de ces deux sites de phosphorylation dans le cadre de la pathologie humaine. Dans le but de répondre à cette question et d'évaluer de façon plus large le profil de phosphorylation des canaux Nav1.5 dans l'insuffisance cardiaque, une approche de phosphoprotéomique sur les canaux Nav1.5 purifiés à partir de biopsies de ventricules de patients en insuffisance cardiaque est envisagée. Réaliser ces études dans d'autres modèles animaux et chez les patients en insuffisance cardiaque permettrait de confirmer nos résultats, mais aussi de déterminer le rôle de la phosphorylation des sérines 516 et 571, dont l'abondance a été décrite comme étant respectivement diminuée (Herren et al., 2015) et augmentée (Glynn et al., 2015a) dans l'insuffisance cardiaque, mais pour lesquelles notre étude n'a pas montré de différence d'abondance relative chez les souris en insuffisance cardiaque par rapport aux souris sauvages. L'existence d'un site de phosphorylation peut également être étudiée en utilisant des anticorps dirigés spécifiquement contre un site de phosphorylation. Dans ce but, nous avons fait générer des anticorps reconnaissant spécifiquement les sérines S1933 et S1984 phosphorylées (Covalab). Cependant, les différents tests réalisés en western blot ne nous ont pas permis d'obtenir de signal spécifique à Nav1.5 (données non présentées) et cette approche d'anticorps phosphospécifiques a donc été mise de côté pour l'instant.

Afin de compléter les résultats obtenus dans cette étude il serait également intéressant de déterminer quelle est la kinase impliquée dans la phosphorylation des S1933 et S1984. L'abondance relative de ces deux sites étant augmentée chez les souris CaMKII δ -Tg, surexprimant la CaMKII δ dans le cœur, et développant une insuffisance cardiaque, notre

première hypothèse est que les S1933 et S1984 sont phosphorylées par la CaMKII. Les travaux récents du groupe de Donald Bers vont d'ailleurs dans ce sens, puisqu'une approche de phosphoprotéomique menée dans des cellules HEK293 a permis d'identifier la S1933 comme étant une cible potentielle de la CaMKII (Herren et al., 2015). D'autre part, il est intéressant de noter que la sérine S1984 est située dans une séquence consensus de phosphorylation par la CaMKII. On ne peut cependant pas exclure que d'autres kinases soient impliquées dans cette phosphorylation. En particulier, il a récemment été montré par le groupe de Fernanda Laezza que la *Glycogen Synthase Kinase 3* (GSK3) est impliquée dans la régulation de la liaison du FGF14 avec les canaux Nav1.2 et Nav1.6 (Hsu et al., 2015; Shavkunov et al., 2013), suggérant que cette kinase pourrait également être impliquée dans la formation du complexe Nav1.5/FGF13/CaM.

Conclusion générale et perspectives

Les canaux Na^+ dépendants du voltage Nav1.5 sont des régulateurs clés de l'excitabilité cardiaque, et tout défaut de régulation de leur expression ou de leur fonctionnement, dans le cadre de pathologies héréditaires ou acquises, augmente le risque d'arythmies potentiellement létales. La phosphorylation constitue l'un des mécanismes majeurs de régulation de ces canaux, cependant les kinases et les sites de phosphorylation impliqués dans cette régulation, et leur pertinence dans les cardiomyocytes, restent assez mal caractérisés à l'heure actuelle. Le premier objectif de mon travail de thèse a été de déterminer le rôle des 19 sites de phosphorylation natifs des canaux Nav1.5 nouvellement identifiés par phosphoprotéomique dans la régulation de leur expression à la surface cellulaire. Les résultats de cette étude ne nous ont pas permis de révéler d'effet de ces sites de phosphorylation, ni des kinases décrites pour réguler les canaux Nav1.5 dans ce mécanisme de régulation. Ces travaux montrent les limites des modèles d'expression hétérologue pour l'étude de ces mécanismes, et l'importance de développer ce type de projet dans des cardiomyocytes. Ainsi, une des perspectives pour ce projet est de développer une approche similaire à celle présentée dans ce manuscrit, à partir de cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés en culture pour lesquels l'expression du canal Nav1.5 endogène sera éteinte par interférence ARN et les phosphomutants Nav1.5 seront ré-exprimés par infection adénovirale. Nous chercherons également à déterminer la ou les kinase(s) impliquée(s) dans la phosphorylation de ces sites ainsi que les mécanismes moléculaires régulés par cette phosphorylation, en étudiant son effet sur l'adressage membranaire, l'endocytose et le recyclage des canaux Nav1.5.

Le deuxième objectif de mon travail de thèse était de déterminer le rôle de la phosphorylation des canaux Nav1.5 dans les défauts d'inactivation associés à l'insuffisance cardiaque. L'approche de phosphoprotéomique a permis de montrer que deux des sites nouvellement identifiés, correspondant aux sérines 1933 et 1984 dans la séquence humaine de Nav1.5, et localisés à proximité des sites d'interaction du FGF13 et de la CaM, sont plus abondants chez les souris en insuffisance cardiaque par rapport aux souris sauvages. Nous avons donc cherché à déterminer le rôle de la phosphorylation de ces sérines dans la régulation des propriétés d'inactivation des canaux Nav1.5 par le FGF13 et la CaM. Nos travaux

ont confirmé que le FGF13 augmente la disponibilité des canaux Nav1.5, et nous avons montré pour la première fois qu'il diminue le courant I_{NaL} . Nous avons également montré que la phosphorylation des S1933 et S1984 altère les propriétés d'inactivation du canal en diminuant l'interaction du FGF13 et de la CaM avec Nav1.5. Il est à présent indispensable de déterminer si ce résultat se vérifie dans d'autres modèles animaux d'insuffisance cardiaque, ainsi que chez l'Homme, afin de confirmer la pertinence pathophysiologique de ces résultats. Il nous faudra également tester l'hypothèse de la perte d'interaction du FGF13 et de la CaM avec le canal dans les défauts d'inactivation des canaux Nav1.5 associés à l'insuffisance cardiaque dans ces modèles. La validation de l'augmentation de phosphorylation des sérines 1933 et 1984, et/ou plus largement de l'extrémité C-terminale des canaux Nav1.5, et son lien avec l'interaction du FGF13 et de la CaM avec le canal constituerait un argument fort en faveur du rôle de la phosphorylation des canaux Nav1.5 dans la régulation de leur inactivation par le FGF13 et la CaM. L'identification de la ou les kinase(s) impliquée(s) dans cette phosphorylation constitue également un objectif majeur de ce projet, car cela permettrait d'ouvrir la voie au développement d'approches thérapeutiques ciblant cette kinase et/ou la phosphorylation de certains sites cibles pour lutter contre les troubles du rythme associés aux défauts de phosphorylation des canaux Nav1.5 dans l'insuffisance cardiaque.

En conclusion, les résultats de ce projet de thèse ont permis de montrer que le canal Nav1.5 est fortement phosphorylé dans les ventricules, et que deux sites de phosphorylation nouvellement identifiés, les sérines 1933 et 1984, sont des cibles thérapeutiques potentielles dans le contexte des troubles du rythme associés à l'insuffisance cardiaque.

Références bibliographiques

Abriel, H. (2010). Cardiac sodium channel Na(v)1.5 and interacting proteins: Physiology and pathophysiology. *J Mol Cell Cardiol* *48*, 2-11.

Abriel, H., Kamynina, E., Horisberger, J.D., and Staub, O. (2000). Regulation of the cardiac voltage-gated Na⁺ channel (H1) by the ubiquitin-protein ligase Nedd4. *FEBS Lett* *466*, 377-380.

Abriel, H., Rougier, J.S., and Jalife, J. (2015). Ion channel macromolecular complexes in cardiomyocytes: roles in sudden cardiac death. *Circ Res* *116*, 1971-1988.

Ahern, C.A., Payandeh, J., Bosmans, F., and Chanda, B. (2016). The hitchhiker's guide to the voltage-gated sodium channel galaxy. *J Gen Physiol* *147*, 1-24.

Ahern, C.A., Zhang, J.F., Wookalis, M.J., and Horn, R. (2005). Modulation of the cardiac sodium channel Nav1.5 by Fyn, a Src family tyrosine kinase. *Circ Res* *96*, 991-998.

Aiba, T., Barth, A.S., Hesketh, G.G., Hashambhoy, Y.L., Chakir, K., Tunin, R.S., Greenstein, J.L., Winslow, R.L., Kass, D.A., and Tomaselli, G.F. (2013). Cardiac resynchronization therapy improves altered Na channel gating in canine model of dyssynchronous heart failure. *Circ Arrhythm Electrophysiol* *6*, 546-554.

Aiba, T., Farinelli, F., Kostecki, G., Hesketh, G.G., Edwards, D., Biswas, S., Tung, L., and Tomaselli, G.F. (2014). A mutation causing Brugada syndrome identifies a mechanism for altered autonomic and oxidant regulation of cardiac sodium currents. *Circ Cardiovasc Genet* *7*, 249-256.

Aiba, T., and Tomaselli, G.F. (2010). Electrical remodeling in the failing heart. *Curr Opin Cardiol* *25*, 29-36.

Amin, A.S., Asghari-Roodsari, A., and Tan, H.L. (2010). Cardiac sodium channelopathies. *Pflugers Arch* *460*, 223-237.

Anderson, M.E., Brown, J.H., and Bers, D.M. (2011). CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* *51*, 468-473.

Andrews, G.L., Simons, B.L., Young, J.B., Hawkrigde, A.M., and Muddiman, D.C. (2011). Performance characteristics of a new hybrid quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometer (TripleTOF 5600). *Anal Chem* *83*, 5442-5446.

Ashpole, N.M., Herren, A.W., Ginsburg, K.S., Brogan, J.D., Johnson, D.E., Cummins, T.R., Bers, D.M., and Hudmon, A. (2012). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) regulates cardiac sodium channel Nav1.5 gating by multiple phosphorylation sites. *J Biol Chem* *287*, 19856-19869.

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

- Ballou, L.M., Lin, R.Z., and Cohen, I.S. (2015). Control of cardiac repolarization by phosphoinositide 3-kinase signaling to ion channels. *Circ Res* *116*, 127-137.
- Banyasz, T., Szentandrassy, N., Magyar, J., Szabo, Z., Nanasi, P.P., Chen-Izu, Y., and Izu, L.T. (2015). An emerging antiarrhythmic target: late sodium current. *Curr Pharm Des* *21*, 1073-1090.
- Ben-Johny, M., Yang, P.S., Niu, J., Yang, W., Joshi-Mukherjee, R., and Yue, D.T. (2014). Conservation of Ca²⁺/calmodulin regulation across Na and Ca²⁺ channels. *Cell* *157*, 1657-1670.
- Biet, M., Barajas-Martinez, H., Ton, A.T., Delabre, J.F., Morin, N., and Dumaine, R. (2012). About half of the late sodium current in cardiac myocytes from dog ventricle is due to non-cardiac-type Na(+) channels. *J Mol Cell Cardiol* *53*, 593-598.
- Biswas, S., DiSilvestre, D., Tian, Y., Halperin, V.L., and Tomaselli, G.F. (2009). Calcium-mediated dual-mode regulation of cardiac sodium channel gating. *Circ Res* *104*, 870-878.
- Blesneac, I., Chemin, J., Bidaud, I., Huc-Brandt, S., Vandermoere, F., and Lory, P. (2015). Phosphorylation of the Cav3.2 T-type calcium channel directly regulates its gating properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* *112*, 13705-13710.
- Blich, M., Efrati, E., Marai, I., Suleiman, M., Gepstein, L., and Boulous, M. (2015). Novel Clinical Manifestation of the Known SCN5A D1790G Mutation. *Cardiology* *132*, 228-232.
- Boehmer, C., Wilhelm, V., Palmada, M., Wallisch, S., Henke, G., Brinkmeier, H., Cohen, P., Pieske, B., and Lang, F. (2003). Serum and glucocorticoid inducible kinases in the regulation of the cardiac sodium channel SCN5A. *Cardiovasc Res* *57*, 1079-1084.
- Bootman, M.D., Collins, T.J., Peppiatt, C.M., Prothero, L.S., MacKenzie, L., De Smet, P., Travers, M., Tovey, S.C., Seo, J.T., Berridge, M.J., *et al.* (2001). Calcium signalling--an overview. *Semin Cell Dev Biol* *12*, 3-10.
- Bosch, M.K., Carrasquillo, Y., Ransdell, J.L., Kanakamedala, A., Ornitz, D.M., and Nerbonne, J.M. (2015). Intracellular FGF14 (iFGF14) Is Required for Spontaneous and Evoked Firing in Cerebellar Purkinje Neurons and for Motor Coordination and Balance. *J Neurosci* *35*, 6752-6769.
- Catterall, W.A. (1986). Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels. *Annu Rev Biochem* *55*, 953-985.
- Catterall, W.A. (2010). Ion channel voltage sensors: structure, function, and pathophysiology. *Neuron* *67*, 915-928.
- Catterall, W.A., and Zheng, N. (2015). Deciphering voltage-gated Na(+) and Ca(2+) channels by studying prokaryotic ancestors. *Trends Biochem Sci* *40*, 526-534.

- Chagot, B., and Chazin, W.J. (2011). Solution NMR structure of Apo-calmodulin in complex with the IQ motif of human cardiac sodium channel NaV1.5. *J Mol Biol* 406, 106-119.
- Chambers, J.C., Zhao, J., Terracciano, C.M., Bezzina, C.R., Zhang, W., Kaba, R., Navaratnarajah, M., Lotlikar, A., Sehmi, J.S., Kooner, M.K., *et al.* (2010). Genetic variation in SCN10A influences cardiac conduction. *Nat Genet* 42, 149-152.
- Cormier, J.W., Rivolta, I., Tateyama, M., Yang, A.S., and Kass, R.S. (2002). Secondary structure of the human cardiac Na⁺ channel C terminus: evidence for a role of helical structures in modulation of channel inactivation. *J Biol Chem* 277, 9233-9241.
- Dalski, A., Atici, J., Kreuz, F.R., Hellenbroich, Y., Schwinger, E., and Zuhlke, C. (2005). Mutation analysis in the fibroblast growth factor 14 gene: frameshift mutation and polymorphisms in patients with inherited ataxias. *Eur J Hum Genet* 13, 118-120.
- Das, S., Aiba, T., Rosenberg, M., Hessler, K., Xiao, C., Quintero, P.A., Ottaviano, F.G., Knight, A.C., Graham, E.L., Bostrom, P., *et al.* (2012). Pathological role of serum- and glucocorticoid-regulated kinase 1 in adverse ventricular remodeling. *Circulation* 126, 2208-2219.
- de Lera Ruiz, M., and Kraus, R.L. (2015). Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications. *J Med Chem* 58, 7093-7118.
- Debonneville, C., Flores, S.Y., Kamynina, E., Plant, P.J., Tauxe, C., Thomas, M.A., Munster, C., Chraïbi, A., Pratt, J.H., Horisberger, J.D., *et al.* (2001). Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na(+) channel cell surface expression. *EMBO J* 20, 7052-7059.
- Deschenes, I., Neyroud, N., DiSilvestre, D., Marban, E., Yue, D.T., and Tomaselli, G.F. (2002). Isoform-specific modulation of voltage-gated Na(+) channels by calmodulin. *Circ Res* 90, E49-57.
- Deschenes, I., Trottier, E., and Chahine, M. (2001). Implication of the C-terminal region of the alpha-subunit of voltage-gated sodium channels in fast inactivation. *J Membr Biol* 183, 103-114.
- Dominguez-Rodriguez, A., Ruiz-Hurtado, G., Benitah, J.P., and Gomez, A.M. (2012). The other side of cardiac Ca(2+) signaling: transcriptional control. *Front Physiol* 3, 452.
- Erickson, J.R. (2014). Mechanisms of CaMKII Activation in the Heart. *Front Pharmacol* 5, 59.
- Frohnwieser, B., Chen, L.Q., Schreibmayer, W., and Kallen, R.G. (1997). Modulation of the human cardiac sodium channel alpha-subunit by cAMP-dependent protein kinase and the responsible sequence domain. *J Physiol* 498 (Pt 2), 309-318.

- Gabelli, S.B., Boto, A., Kuhns, V.H., Bianchet, M.A., Farinelli, F., Aripirala, S., Yoder, J., Jakoncic, J., Tomaselli, G.F., and Amzel, L.M. (2014). Regulation of the NaV1.5 cytoplasmic domain by calmodulin. *Nat Commun* 5, 5126.
- Gabelli, S.B., Yoder, J.B., Tomaselli, G.F., and Amzel, L.M. (2015). Calmodulin and Ca control of voltage gated Na channels. *Channels (Austin)*, 0.
- Glaaser, I.W., Bankston, J.R., Liu, H., Tateyama, M., and Kass, R.S. (2006). A carboxyl-terminal hydrophobic interface is critical to sodium channel function. Relevance to inherited disorders. *J Biol Chem* 281, 24015-24023.
- Glynn, P., Musa, H., Wu, X., Unudurthi, S.D., Little, S., Qian, L., Wright, P.J., Radwanski, P.B., Gyorke, S., Mohler, P.J., *et al.* (2015a). Voltage-Gated Sodium Channel Phosphorylation at Ser571 Regulates Late Current, Arrhythmia, and Cardiac Function in vivo. *Circulation*.
- Glynn, P., Musa, H., Wu, X., Unudurthi, S.D., Little, S., Qian, L., Wright, P.J., Radwanski, P.B., Gyorke, S., Mohler, P.J., *et al.* (2015b). Voltage-Gated Sodium Channel Phosphorylation at Ser571 Regulates Late Current, Arrhythmia, and Cardiac Function In Vivo. *Circulation* 132, 567-577.
- Goetz, R., Dover, K., Laezza, F., Shtraizent, N., Huang, X., Tchetchik, D., Eliseenkova, A.V., Xu, C.F., Neubert, T.A., Ornitz, D.M., *et al.* (2009). Crystal structure of a fibroblast growth factor homologous factor (FHF) defines a conserved surface on FHFs for binding and modulation of voltage-gated sodium channels. *J Biol Chem* 284, 17883-17896.
- Goldfarb, M. (2012). Voltage-gated sodium channel-associated proteins and alternative mechanisms of inactivation and block. *Cell Mol Life Sci* 69, 1067-1076.
- Goldin, A.L. (2003). Mechanisms of sodium channel inactivation. *Curr Opin Neurobiol* 13, 284-290.
- Groban, E.S., Narayanan, A., and Jacobson, M.P. (2006). Conformational changes in protein loops and helices induced by post-translational phosphorylation. *PLoS Comput Biol* 2, e32.
- Hallaq, H., Wang, D.W., Kunic, J.D., George, A.L., Jr., Wells, K.S., and Murray, K.T. (2012). Activation of protein kinase C alters the intracellular distribution and mobility of cardiac Na⁺ channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302, H782-789.
- Hallaq, H., Yang, Z., Viswanathan, P.C., Fukuda, K., Shen, W., Wang, D.W., Wells, K.S., Zhou, J., Yi, J., and Murray, K.T. (2006). Quantitation of protein kinase A-mediated trafficking of cardiac sodium channels in living cells. *Cardiovasc Res* 72, 250-261.
- Hennessey, J.A., Marcou, C.A., Wang, C., Wei, E.Q., Tester, D.J., Torchio, M., Dagradi, F., Crotti, L., Schwartz, P.J., Ackerman, M.J., *et al.* (2013). FGF12 is a candidate Brugada syndrome locus. *Heart Rhythm* 10, 1886-1894.

Herren, A.W., Bers, D.M., and Grandi, E. (2013). Post-translational modifications of the cardiac Na channel: contribution of CaMKII-dependent phosphorylation to acquired arrhythmias. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* *305*, H431-445.

Herren, A.W., Weber, D.M., Rigor, R.R., Margulies, K.B., Phinney, B.S., and Bers, D.M. (2015). CaMKII Phosphorylation of Na(V)1.5: Novel in Vitro Sites Identified by Mass Spectrometry and Reduced S516 Phosphorylation in Human Heart Failure. *J Proteome Res* *14*, 2298-2311.

Herzog, R.I., Liu, C., Waxman, S.G., and Cummins, T.R. (2003). Calmodulin binds to the C terminus of sodium channels Nav1.4 and Nav1.6 and differentially modulates their functional properties. *J Neurosci* *23*, 8261-8270.

Houser, S.R., Margulies, K.B., Murphy, A.M., Spinale, F.G., Francis, G.S., Prabhu, S.D., Rockman, H.A., Kass, D.A., Molkentin, J.D., Sussman, M.A., *et al.* (2012). Animal models of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association. *Circ Res* *111*, 131-150.

Hsu, W.C., Nenov, M.N., Shavkunov, A., Panova, N., Zhan, M., and Laezza, F. (2015). Identifying a kinase network regulating FGF14:Nav1.6 complex assembly using split-luciferase complementation. *PLoS One* *10*, e0117246.

Hudmon, A., and Schulman, H. (2002). Structure-function of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J* *364*, 593-611.

Hund, T.J., Koval, O.M., Li, J., Wright, P.J., Qian, L., Snyder, J.S., Gudmundsson, H., Kline, C.F., Davidson, N.P., Cardona, N., *et al.* (2010). A beta(IV)-spectrin/CaMKII signaling complex is essential for membrane excitability in mice. *J Clin Invest* *120*, 3508-3519.

Iqbal, S.M., Andavan, G.S., and Lemmens-Gruber, R. (2015). Differential modulation of fast inactivation in cardiac sodium channel splice variants by Fyn tyrosine kinase. *Cell Physiol Biochem* *37*, 825-837.

Jespersen, T., Gavillet, B., van Bemmelen, M.X., Cordonier, S., Thomas, M.A., Staub, O., and Abriel, H. (2006). Cardiac sodium channel Na(v)1.5 interacts with and is regulated by the protein tyrosine phosphatase PTPH1. *Biochem Biophys Res Commun* *348*, 1455-1462.

Kambouris, N.G., Hastings, L.A., Stepanovic, S., Marban, E., Tomaselli, G.F., and Balsler, J.R. (1998). Mechanistic link between lidocaine block and inactivation probed by outer pore mutations in the rat micro1 skeletal muscle sodium channel. *J Physiol* *512 (Pt 3)*, 693-705.

Karpievitch, Y., Stanley, J., Taverner, T., Huang, J., Adkins, J.N., Ansong, C., Heffron, F., Metz, T.O., Qian, W.J., Yoon, H., *et al.* (2009). A statistical framework for protein quantitation in bottom-up MS-based proteomics. *Bioinformatics* *25*, 2028-2034.

Keller, A., Nesvizhskii, A.I., Kolker, E., and Aebersold, R. (2002). Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal Chem* *74*, 5383-5392.

- Kemp, C.D., and Conte, J.V. (2012). The pathophysiology of heart failure. *Cardiovasc Pathol* 21, 365-371.
- Kim, J., Ghosh, S., Liu, H., Tateyama, M., Kass, R.S., and Pitt, G.S. (2004). Calmodulin mediates Ca²⁺ sensitivity of sodium channels. *J Biol Chem* 279, 45004-45012.
- King, J.H., Huang, C.L., and Fraser, J.A. (2013). Determinants of myocardial conduction velocity: implications for arrhythmogenesis. *Front Physiol* 4, 154.
- Koval, O.M., Snyder, J.S., Wolf, R.M., Pavlovicz, R.E., Glynn, P., Curran, J., Leymaster, N.D., Dun, W., Wright, P.J., Cardona, N., *et al.* (2012). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II-based regulation of voltage-gated Na⁺ channel in cardiac disease. *Circulation* 126, 2084-2094.
- Laezza, F., Gerber, B.R., Lou, J.Y., Kozel, M.A., Hartman, H., Craig, A.M., Ornitz, D.M., and Nerbonne, J.M. (2007). The FGF14(F145S) mutation disrupts the interaction of FGF14 with voltage-gated Na⁺ channels and impairs neuronal excitability. *J Neurosci* 27, 12033-12044.
- Lang, F., Stournaras, C., and Alesutan, I. (2014). Regulation of transport across cell membranes by the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. *Mol Membr Biol* 31, 29-36.
- Liu, C., Dib-Hajj, S.D., and Waxman, S.G. (2001). Fibroblast growth factor homologous factor 1B binds to the C terminus of the tetrodotoxin-resistant sodium channel rNav1.9a (NaN). *J Biol Chem* 276, 18925-18933.
- Liu, C.J., Dib-Hajj, S.D., Renganathan, M., Cummins, T.R., and Waxman, S.G. (2003). Modulation of the cardiac sodium channel Nav1.5 by fibroblast growth factor homologous factor 1B. *J Biol Chem* 278, 1029-1036.
- Liu, M., Sanyal, S., Gao, G., Gurung, I.S., Zhu, X., Gaconnet, G., Kerchner, L.J., Shang, L.L., Huang, C.L., Grace, A., *et al.* (2009). Cardiac Na⁺ current regulation by pyridine nucleotides. *Circ Res* 105, 737-745.
- Lou, J.Y., Laezza, F., Gerber, B.R., Xiao, M., Yamada, K.A., Hartmann, H., Craig, A.M., Nerbonne, J.M., and Ornitz, D.M. (2005). Fibroblast growth factor 14 is an intracellular modulator of voltage-gated sodium channels. *J Physiol* 569, 179-193.
- Lu, Z., Jiang, Y.P., Wu, C.Y., Ballou, L.M., Liu, S., Carpenter, E.S., Rosen, M.R., Cohen, I.S., and Lin, R.Z. (2013). Increased persistent sodium current due to decreased PI3K signaling contributes to QT prolongation in the diabetic heart. *Diabetes* 62, 4257-4265.
- Lu, Z., Wu, C.Y., Jiang, Y.P., Ballou, L.M., Clausen, C., Cohen, I.S., and Lin, R.Z. (2012). Suppression of phosphoinositide 3-kinase signaling and alteration of multiple ion currents in drug-induced long QT syndrome. *Sci Transl Med* 4, 131ra150.

Ma, J., Luo, A., Wu, L., Wan, W., Zhang, P., Ren, Z., Zhang, S., Qian, C., Shryock, J.C., and Belardinelli, L. (2012). Calmodulin kinase II and protein kinase C mediate the effect of increased intracellular calcium to augment late sodium current in rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 302, C1141-1151.

Maier, L.S., and Bers, D.M. (2002). Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *J Mol Cell Cardiol* 34, 919-939.

Makielski, J.C. (2015). Late sodium current: A mechanism for angina, heart failure, and arrhythmia. *Trends Cardiovasc Med*.

Makielski, J.C., and Farley, A.L. (2006). Na(+) current in human ventricle: implications for sodium loading and homeostasis. *J Cardiovasc Electrophysiol* 17 Suppl 1, S15-S20.

Makielski, J.C., Ye, B., Valdivia, C.R., Pagel, M.D., Pu, J., Tester, D.J., and Ackerman, M.J. (2003). A ubiquitous splice variant and a common polymorphism affect heterologous expression of recombinant human SCN5A heart sodium channels. *Circ Res* 93, 821-828.

Maltsev, V.A., Kyle, J.W., Mishra, S., and Undrovinas, A. (2008a). Molecular identity of the late sodium current in adult dog cardiomyocytes identified by Nav1.5 antisense inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295, H667-676.

Maltsev, V.A., Kyle, J.W., and Undrovinas, A. (2009). Late Na⁺ current produced by human cardiac Na⁺ channel isoform Nav1.5 is modulated by its beta1 subunit. *J Physiol Sci* 59, 217-225.

Maltsev, V.A., Reznikov, V., Undrovinas, N.A., Sabbah, H.N., and Undrovinas, A. (2008b). Modulation of late sodium current by Ca²⁺, calmodulin, and CaMKII in normal and failing dog cardiomyocytes: similarities and differences. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294, H1597-1608.

Maltsev, V.A., and Undrovinas, A. (2008). Late sodium current in failing heart: friend or foe? *Prog Biophys Mol Biol* 96, 421-451.

Maltsev, V.A., and Undrovinas, A.I. (2006). A multi-modal composition of the late Na⁺ current in human ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 69, 116-127.

Marionneau, C., and Abriel, H. (2015). Regulation of the cardiac Na⁺ channel Nav1.5 by post-translational modifications. *J Mol Cell Cardiol* 82, 36-47.

Marionneau, C., Lichti, C.F., Lindenbaum, P., Charpentier, F., Nerbonne, J.M., Townsend, R.R., and Merot, J. (2012). Mass spectrometry-based identification of native cardiac Nav1.5 channel alpha subunit phosphorylation sites. *J Proteome Res* 11, 5994-6007.

Michalski, A., Damoc, E., Lange, O., Denisov, E., Nolting, D., Muller, M., Viner, R., Schwartz, J., Remes, P., Belford, M., *et al.* (2012). Ultra high resolution linear ion trap Orbitrap mass spectrometer (Orbitrap

Elite) facilitates top down LC MS/MS and versatile peptide fragmentation modes. *Mol Cell Proteomics* **11**, O111 013698.

Mishra, S., Reznikov, V., Maltsev, V.A., Undrovinas, N.A., Sabbah, H.N., and Undrovinas, A. (2015). Contribution of sodium channel neuronal isoform Nav1.1 to late sodium current in ventricular myocytes from failing hearts. *J Physiol* **593**, 1409-1427.

Mori, M., Konno, T., Morii, T., Nagayama, K., and Imoto, K. (2003). Regulatory interaction of sodium channel IQ-motif with calmodulin C-terminal lobe. *Biochem Biophys Res Commun* **307**, 290-296.

Mori, M., Konno, T., Ozawa, T., Murata, M., Imoto, K., and Nagayama, K. (2000). Novel interaction of the voltage-dependent sodium channel (VDSC) with calmodulin: does VDSC acquire calmodulin-mediated Ca²⁺-sensitivity? *Biochemistry* **39**, 1316-1323.

Motoike, H.K., Liu, H., Glaaser, I.W., Yang, A.S., Tateyama, M., and Kass, R.S. (2004). The Na⁺ channel inactivation gate is a molecular complex: a novel role of the COOH-terminal domain. *J Gen Physiol* **123**, 155-165.

Munoz-Sanjuan, I., Smallwood, P.M., and Nathans, J. (2000). Isoform diversity among fibroblast growth factor homologous factors is generated by alternative promoter usage and differential splicing. *J Biol Chem* **275**, 2589-2597.

Murphy, B.J., Rogers, J., Perdichizzi, A.P., Colvin, A.A., and Catterall, W.A. (1996). cAMP-dependent phosphorylation of two sites in the alpha subunit of the cardiac sodium channel. *J Biol Chem* **271**, 28837-28843.

Musa, H., Kline, C.F., Sturm, A.C., Murphy, N., Adelman, S., Wang, C., Yan, H., Johnson, B.L., Csepe, T.A., Kilib, A., *et al.* (2015). SCN5A variant that blocks fibroblast growth factor homologous factor regulation causes human arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 12528-12533.

Nelson, M.R., and Chazin, W.J. (1998). Structures of EF-hand Ca(2+)-binding proteins: diversity in the organization, packing and response to Ca²⁺ binding. *Biometals* **11**, 297-318.

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

Nesvizhskii, A.I., Keller, A., Kolker, E., and Aebersold, R. (2003). A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal Chem* **75**, 4646-4658.

Neubert, H., Bonnert, T.P., Rumpel, K., Hunt, B.T., Henle, E.S., and James, I.T. (2008). Label-free detection of differential protein expression by LC/MALDI mass spectrometry. *J Proteome Res* **7**, 2270-2279.

- Newton, A.C. (2003). Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem J* 370, 361-371.
- Noda, M., and Hiyama, T.Y. (2015). The Na(x) Channel: What It Is and What It Does. *Neuroscientist* 21, 399-412.
- Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y., Minamino, N., *et al.* (1984). Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 312, 121-127.
- Olsen, S.K., Garbi, M., Zampieri, N., Eliseenkova, A.V., Ornitz, D.M., Goldfarb, M., and Mohammadi, M. (2003). Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors share structural but not functional homology with FGFs. *J Biol Chem* 278, 34226-34236.
- Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N., and Catterall, W.A. (2011). The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* 475, 353-358.
- Peterson, B.Z., DeMaria, C.D., Adelman, J.P., and Yue, D.T. (1999). Calmodulin is the Ca²⁺ sensor for Ca²⁺ -dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron* 22, 549-558.
- Petitprez, S., Zmoos, A.F., Ogrodnik, J., Balse, E., Raad, N., El-Haou, S., Albesa, M., Bittihn, P., Luther, S., Lehnart, S.E., *et al.* (2011). SAP97 and dystrophin macromolecular complexes determine two pools of cardiac sodium channels Nav1.5 in cardiomyocytes. *Circ Res* 108, 294-304.
- Polpitiya, A.D., Qian, W.J., Jaitly, N., Petyuk, V.A., Adkins, J.N., Camp, D.G., 2nd, Anderson, G.A., and Smith, R.D. (2008). DANTE: a statistical tool for quantitative analysis of -omics data. *Bioinformatics* 24, 1556-1558.
- Potet, F., Chagot, B., Anghelescu, M., Viswanathan, P.C., Stepanovic, S.Z., Kupersmidt, S., Chazin, W.J., and Balsler, J.R. (2009). Functional Interactions between Distinct Sodium Channel Cytoplasmic Domains through the Action of Calmodulin. *J Biol Chem* 284, 8846-8854.
- Qi, D., Yang, Z., Robinson, V.M., Li, J., Gao, C., Guo, D., Kowey, P.R., and Yan, G.X. (2015). Heterogeneous distribution of INa-L determines interregional differences in rate adaptation of repolarization. *Heart Rhythm* 12, 1295-1303.
- Qu, Y., Rogers, J., Tanada, T., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (1994). Modulation of cardiac Na⁺ channels expressed in a mammalian cell line and in ventricular myocytes by protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3289-3293.
- Qu, Y., Rogers, J.C., Tanada, T.N., Catterall, W.A., and Scheuer, T. (1996). Phosphorylation of S1505 in the cardiac Na⁺ channel inactivation gate is required for modulation by protein kinase C. *J Gen Physiol* 108, 375-379.

- Remme, C.A., and Bezzina, C.R. (2010). Sodium channel (dys)function and cardiac arrhythmias. *Cardiovasc Ther* 28, 287-294.
- Remme, C.A., Verkerk, A.O., Hoogaars, W.M., Aanhaanen, W.T., Scicluna, B.P., Annink, C., van den Hoff, M.J., Wilde, A.A., van Veen, T.A., Veldkamp, M.W., *et al.* (2009). The cardiac sodium channel displays differential distribution in the conduction system and transmural heterogeneity in the murine ventricular myocardium. *Basic Res Cardiol* 104, 511-522.
- Remme, C.A., and Wilde, A.A. (2014). Targeting sodium channels in cardiac arrhythmia. *Curr Opin Pharmacol* 15, 53-60.
- Sag, C.M., Mallwitz, A., Wagner, S., Hartmann, N., Schotola, H., Fischer, T.H., Ungeheuer, N., Herting, J., Shah, A.M., Maier, L.S., *et al.* (2014). Enhanced late INa induces proarrhythmic SR Ca leak in a CaMKII-dependent manner. *J Mol Cell Cardiol* 76, 94-105.
- Saimi, Y., and Kung, C. (2002). Calmodulin as an ion channel subunit. *Annu Rev Physiol* 64, 289-311.
- Sarhan, M.F., Tung, C.C., Van Petegem, F., and Ahern, C.A. (2012). Crystallographic basis for calcium regulation of sodium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 3558-3563.
- Sarhan, M.F., Van Petegem, F., and Ahern, C.A. (2009). A double tyrosine motif in the cardiac sodium channel domain III-IV linker couples calcium-dependent calmodulin binding to inactivation gating. *J Biol Chem* 284, 33265-33274.
- Savio-Galimberti, E., Gollob, M.H., and Darbar, D. (2012). Voltage-gated sodium channels: biophysics, pharmacology, and related channelopathies. *Front Pharmacol* 3, 124.
- Schneider, C., Newman, R.A., Sutherland, D.R., Asser, U., and Greaves, M.F. (1982). A one-step purification of membrane proteins using a high efficiency immunomatrix. *J Biol Chem* 257, 10766-10769.
- Shah, V.N., Wingo, T.L., Weiss, K.L., Williams, C.K., Balsler, J.R., and Chazin, W.J. (2006). Calcium-dependent regulation of the voltage-gated sodium channel hH1: intrinsic and extrinsic sensors use a common molecular switch. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 3592-3597.
- Shavkunov, A.S., Wildburger, N.C., Nenov, M.N., James, T.F., Buzhdygan, T.P., Panova-Elektronova, N.I., Green, T.A., Veselenak, R.L., Bourne, N., and Laezza, F. (2013). The fibroblast growth factor 14.voltage-gated sodium channel complex is a new target of glycogen synthase kinase 3 (GSK3). *J Biol Chem* 288, 19370-19385.
- Shin, H.G., and Murray, K.T. (2001). Conventional protein kinase C isoforms and cross-activation of protein kinase A regulate cardiac Na⁺ current. *FEBS Lett* 495, 154-158.

Shy, D., Gillet, L., and Abriel, H. (2013). Cardiac sodium channel NaV1.5 distribution in myocytes via interacting proteins: the multiple pool model. *Biochim Biophys Acta* 1833, 886-894.

Smallwood, P.M., Munoz-Sanjuan, I., Tong, P., Macke, J.P., Hendry, S.H., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Nathans, J. (1996). Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors: new members of the FGF family implicated in nervous system development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9850-9857.

Snyder, P.M., Olson, D.R., Kabra, R., Zhou, R., and Steines, J.C. (2004). cAMP and serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) regulate the epithelial Na⁽⁺⁾ channel through convergent phosphorylation of Nedd4-2. *J Biol Chem* 279, 45753-45758.

Songyang, Z., Lu, K.P., Kwon, Y.T., Tsai, L.H., Filhol, O., Cochet, C., Brickey, D.A., Soderling, T.R., Bartleson, C., Graves, D.J., *et al.* (1996). A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: primary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, CDK5, and Erk1. *Mol Cell Biol* 16, 6486-6493.

Sossalla, S., Maurer, U., Schotola, H., Hartmann, N., Didie, M., Zimmermann, W.H., Jacobshagen, C., Wagner, S., and Maier, L.S. (2011). Diastolic dysfunction and arrhythmias caused by overexpression of CaMKIIdelta(C) can be reversed by inhibition of late Na⁽⁺⁾ current. *Basic Res Cardiol* 106, 263-272.

Steinberg, S.F. (2008). Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol Rev* 88, 1341-1378.

Sunami, A., Fan, Z., Nakamura, F., Naka, M., Tanaka, T., Sawanobori, T., and Hiraoka, M. (1991). The catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase directly inhibits sodium channel activities in guinea-pig ventricular myocytes. *Pflugers Arch* 419, 415-417.

Tan, H.L., Kupersmidt, S., Zhang, R., Stepanovic, S., Roden, D.M., Wilde, A.A., Anderson, M.E., and Balsler, J.R. (2002). A calcium sensor in the sodium channel modulates cardiac excitability. *Nature* 415, 442-447.

Tateyama, M., Rivolta, I., Clancy, C.E., and Kass, R.S. (2003). Modulation of cardiac sodium channel gating by protein kinase A can be altered by disease-linked mutation. *J Biol Chem* 278, 46718-46726.

Taverner, T., Karpievitch, Y.V., Polpitiya, A.D., Brown, J.N., Dabney, A.R., Anderson, G.A., and Smith, R.D. (2012). DanteR: an extensible R-based tool for quantitative analysis of -omics data. *Bioinformatics* 28, 2404-2406.

Toischer, K., Hartmann, N., Wagner, S., Fischer, T.H., Herting, J., Danner, B.C., Sag, C.M., Hund, T.J., Mohler, P.J., Belardinelli, L., *et al.* (2013). Role of late sodium current as a potential arrhythmogenic mechanism in the progression of pressure-induced heart disease. *J Mol Cell Cardiol* 61, 111-122.

Valdivia, C.R., Chu, W.W., Pu, J., Foell, J.D., Haworth, R.A., Wolff, M.R., Kamp, T.J., and Makielski, J.C. (2005). Increased late sodium current in myocytes from a canine heart failure model and from failing human heart. *J Mol Cell Cardiol* 38, 475-483.

Valdivia, C.R., Ueda, K., Ackerman, M.J., and Makielski, J.C. (2009). GPD1L links redox state to cardiac excitability by PKC-dependent phosphorylation of the sodium channel SCN5A. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297, H1446-1452.

van Swieten, J.C., Brusse, E., de Graaf, B.M., Krieger, E., van de Graaf, R., de Koning, I., Maat-Kievit, A., Leegwater, P., Dooijes, D., Oostra, B.A., *et al.* (2003). A mutation in the fibroblast growth factor 14 gene is associated with autosomal dominant cerebellar ataxia [corrected]. *Am J Hum Genet* 72, 191-199.

Vassilev, P.M., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (1988). Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. *Science* 241, 1658-1661.

Veerman, C.C., Wilde, A.A., and Lodder, E.M. (2015). The cardiac sodium channel gene SCN5A and its gene product NaV1.5: Role in physiology and pathophysiology. *Gene* 573, 177-187.

Wagner, S., Dybkova, N., Rasenack, E.C., Jacobshagen, C., Fabritz, L., Kirchhof, P., Maier, S.K., Zhang, T., Hasenfuss, G., Brown, J.H., *et al.* (2006). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na⁺ channels. *J Clin Invest* 116, 3127-3138.

Wagner, S., Maier, L.S., and Bers, D.M. (2015). Role of sodium and calcium dysregulation in tachyarrhythmias in sudden cardiac death. *Circ Res* 116, 1956-1970.

Wagner, S., Rokita, A.G., Anderson, M.E., and Maier, L.S. (2013). Redox regulation of sodium and calcium handling. *Antioxid Redox Signal* 18, 1063-1077.

Wagner, S., Ruff, H.M., Weber, S.L., Bellmann, S., Sowa, T., Schulte, T., Anderson, M.E., Grandi, E., Bers, D.M., Backs, J., *et al.* (2011). Reactive oxygen species-activated Ca/calmodulin kinase IIdelta is required for late I(Na) augmentation leading to cellular Na and Ca overload. *Circ Res* 108, 555-565.

Wang, C., Chung, B.C., Yan, H., Lee, S.Y., and Pitt, G.S. (2012). Crystal structure of the ternary complex of a NaV C-terminal domain, a fibroblast growth factor homologous factor, and calmodulin. *Structure* 20, 1167-1176.

Wang, C., Chung, B.C., Yan, H., Wang, H.G., Lee, S.Y., and Pitt, G.S. (2014). Structural analyses of Ca²⁺(+)/CaM interaction with NaV channel C-termini reveal mechanisms of calcium-dependent regulation. *Nat Commun* 5, 4896.

Wang, C., Hennessey, J.A., Kirkton, R.D., Graham, V., Puranam, R.S., Rosenberg, P.B., Bursac, N., and Pitt, G.S. (2011a). Fibroblast growth factor homologous factor 13 regulates Na⁺ channels and conduction velocity in murine hearts. *Circ Res* 109, 775-782.

Wang, C., Hoch, E.G., and Pitt, G.S. (2011b). Identification of novel interaction sites that determine specificity between fibroblast growth factor homologous factors and voltage-gated sodium channels. *J Biol Chem* 286, 24253-24263.

Wang, Y., Wagner, M.B., Kumar, R., Cheng, J., and Joyner, R.W. (2003). Inhibition of fast sodium current in rabbit ventricular myocytes by protein tyrosine kinase inhibitors. *Pflugers Arch* *446*, 485-491.

Watson, C.L., and Gold, M.R. (1997). Modulation of Na⁺ current inactivation by stimulation of protein kinase C in cardiac cells. *Circ Res* *81*, 380-386.

Wehrens, X.H., Lehnart, S.E., Reiken, S., Vest, J.A., Wronska, A., and Marks, A.R. (2006). Ryanodine receptor/calcium release channel PKA phosphorylation: a critical mediator of heart failure progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 511-518.

Wei, E.Q., Barnett, A.S., Pitt, G.S., and Hennessey, J.A. (2011). Fibroblast growth factor homologous factors in the heart: a potential locus for cardiac arrhythmias. *Trends Cardiovasc Med* *21*, 199-203.

Wilde, A.A., and Brugada, R. (2011). Phenotypical manifestations of mutations in the genes encoding subunits of the cardiac sodium channel. *Circ Res* *108*, 884-897.

Wingo, T.L., Shah, V.N., Anderson, M.E., Lybrand, T.P., Chazin, W.J., and Balsler, J.R. (2004). An EF-hand in the sodium channel couples intracellular calcium to cardiac excitability. *Nat Struct Mol Biol* *11*, 219-225.

Yan, H., Pablo, J.L., Wang, C., and Pitt, G.S. (2014). FGF14 modulates resurgent sodium current in mouse cerebellar Purkinje neurons. *Elife* *3*, e04193.

Yang, T., Atack, T.C., Stroud, D.M., Zhang, W., Hall, L., and Roden, D.M. (2012). Blocking Scn10a channels in heart reduces late sodium current and is antiarrhythmic. *Circ Res* *111*, 322-332.

Yarbrough, T.L., Lu, T., Lee, H.C., and Shibata, E.F. (2002). Localization of cardiac sodium channels in caveolin-rich membrane domains: regulation of sodium current amplitude. *Circ Res* *90*, 443-449.

Yu, Y.Q., Gilar, M., and Gebler, J.C. (2004). A complete peptide mapping of membrane proteins: a novel surfactant aiding the enzymatic digestion of bacteriorhodopsin. *Rapid Commun Mass Spectrom* *18*, 711-715.

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

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

Zhang, T., Maier, L.S., Dalton, N.D., Miyamoto, S., Ross, J., Jr., Bers, D.M., and Brown, J.H. (2003). The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res* *92*, 912-919.

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

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

Annexe

Dysfunction of the voltage-gated K⁺ channel beta-2 subunit in a familial case of Brugada syndrome

Portero et al., *KCNAB2* and Brugada Syndrome - In revision, *JAHA*

Vincent Portero^{1,2,3*}, PhD, Solena Le Scouarnec^{1,2,3,4*}, PhD, Zeineb Es-Salah-Lamoureux^{1,2,3*}, PhD, **Sophie Burel**^{1,2,3}, MS, Jean-Baptiste Gourraud^{1,2,3,5}, MD, PhD, Stéphanie Bonnaud^{1,2,3,5}, PhD, Pierre Lindenbaum^{1,2,3,5}, PhD, Floriane Simonet^{1,2,3}, MS, Jade Violleau^{1,2,3,5}, BS, Estelle Baron^{1,2,3}, BS, Eléonore Moreau³, MS, Carol Scott⁴, MS, Stéphanie Chatel⁵, PhD, Gildas Loussouarn^{1,2,3}, PhD, Thomas O'Hara⁶, PhD, Philippe Mabo⁷, MD, Christian Dina^{1,2,3,5}, PhD, Hervé Le Marec^{1,2,3,5}, MD, PhD, Jean-Jacques Schott^{1,2,3,5}, PhD, Vincent Probst^{1,2,3,5}, MD, PhD, Isabelle Baró^{1,2,3}, PhD, Céline Marionneau^{1,2,3}, PhD, Flavien Charpentier^{1,2,3,5#}, PhD, Richard Redon^{1,2,3,5#}, PhD

¹ Inserm, UMR 1087, l'institut du thorax, Nantes, France

² CNRS, UMR 6291, Nantes, France

³ Université de Nantes, Nantes, France

⁴ The Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, Cambridge, UK

⁵ CHU Nantes, l'institut du thorax, Service de Cardiologie, Nantes, France

⁶ Johns Hopkins University, Baltimore, USA

⁷ University Hospital of Rennes, France

* These authors contributed equally to this work.

These authors jointly directed this work.

Correspondence should be addressed to Richard Redon, Inserm UMR 1087 / CNRS UMR 6291, l'institut du thorax, IRS-UN, 8 Quai Moncousu, Nantes, France. E-mail: richard.redon@inserm.fr. Tel: +33 (0)2 28 08 01 41.

Journal Subject Codes: Arrhythmias; Electrophysiology; Genetics

Word count: **4061**

ABSTRACT

Background – The Brugada syndrome (BrS) is an inherited cardiac arrhythmia associated with high risk of sudden death. Although 20% of patients with BrS carry mutations in *SCN5A*, the molecular mechanisms underlying this condition are still largely unknown. This study aimed to identify the genetic defect causing BrS in a familial case for which *SCN5A* mutations had been excluded.

Methods and Results - We combined whole-exome sequencing and linkage analysis to identify the genetic variant likely causing BrS, followed by targeted sequencing of *KCNAB2* in 167 unrelated patients with BrS. We investigated the physiological effects of the detected variants by cellular electrophysiology and biochemistry.

Whole-exome sequencing identified six genetic variants co-segregating with the Brugada ECG pattern within the pedigree. *In silico* gene prioritization pointed to one variant residing in *KCNAB2*, which encodes the voltage-gated K⁺ channel β 2-subunit (Kv β 2-R12Q). Kv β 2 is widely expressed in the human heart and has been shown to interact with the fast transient outward K⁺ channel subunit Kv4.3, increasing its current density. By targeted sequencing, we found two additional rare missense variants in *KCNAB2* (L13F and V114I). Patch-clamp experiments performed in COS-7 cells expressing both Kv4.3 and Kv β 2 revealed a significant increase in the current density in presence of the R12Q and L13F Kv β 2 mutants. Although biotinylation assays showed no differences in the expression of Kv4.3, the total and submembrane expression of Kv β 2-R12Q were significantly increased in comparison to wild-type Kv β 2.

Conclusions - Altogether, our results indicate that Kv β 2 dysfunction can contribute to the Brugada ECG pattern.

Keywords: Clinical electrophysiology; Brugada syndrome; Genetics; Whole exome sequencing; Cardiac arrhythmia; Potassium ion channels; KCNAB2/Kv β 2

ABBREVIATIONS

BrS = Brugada Syndrome

SCD = sudden cardiac death

CGH = comparative genomic hybridization

SNP = simple nucleotide polymorphism

RVOT = right ventricular outflow tract

SNV = simple nucleotide variant

1 INTRODUCTION

2 Sudden cardiac death (SCD) is a major health burden in industrialized countries, with about
3 250,000 events recorded annually in the USA alone.¹ Although coronary artery disease
4 remains the first underlying cause of SCD, 5-10% of events occur in the absence of detectable
5 cardiac structural abnormalities.¹ A large proportion of these autopsy-negative cases are a
6 likely consequence of inherited cardiac arrhythmia disorders.^{1,2} Among such disorders,
7 Brugada syndrome (BrS), which affects about 1 in 2,500 individuals, is characterized by a
8 ST-segment elevation and a negative T-wave in the right precordial leads on the
9 electrocardiogram (ECG).³

10 Around 20% of patients with BrS carry loss-of-function mutations in the *SCN5A* gene,^{4,5}
11 which encodes the pore-forming subunit of the cardiac voltage-gated Na⁺ channel (Nav1.5).
12 Although this condition is usually described as a monogenic disease with autosomal dominant
13 transmission, family-based linkage analysis has most frequently failed to identify disease-
14 causing genes. Mutations in about 20 other genes have already been identified in patients with
15 BrS but around 70% of cases still remain genetically unexplained.⁴

16 While common genetic polymorphisms have been recently associated with the risk of BrS,⁶
17 familial case studies remain extremely useful to highlight rare variants with strong effect and
18 discover new genes involved in disease susceptibility. In this study, we combined whole-
19 exome sequencing, array-CGH, genome-wide SNP genotyping, cellular electrophysiology,
20 biochemistry and computer modeling to identify a gain-of-function mutation in the *KCNAB2*
21 gene, which encodes the voltage-gated K⁺ channel β 2-subunit (Kv β 2),⁷ as involved in this
22 cardiac arrhythmia disorder.

23

24 **METHODS**

25 **Clinical recruitment**

26 Patients with BrS as well as unaffected relatives were recruited following the French ethical
27 guidelines for genetic research, and under approval from the local ethical committee. Written
28 informed consent was obtained from every patient and family member. ECGs were
29 systematically recorded at baseline and under drug challenge tests, according to consensus
30 criteria.⁸ A Brugada type I ECG pattern was defined on the basis of a coved type ST elevation
31 at baseline or after a drug challenge test, in one or more right precordial leads.⁸ Holter recording,
32 echocardiography and electrophysiological investigations were performed in all patients
33 diagnosed with BrS. Two physicians evaluated each ECG independently.

34 **Linkage analysis**

35 SNP genotyping was performed on population-optimized Affymetrix Axiom Genome-Wide
36 CEU 1 array plates following the standard manufacturer's protocol. Fluorescence intensities
37 were quantified using the Affymetrix GeneTitan Multi-Channel Instrument, and primary
38 analysis was conducted with Affymetrix Power Tools following the manufacturer's
39 recommendations. After genotype calling, all individuals had a genotype call rate above 97%.
40 SNPs with a minor allele frequency (MAF) < 10%, a call rate < 95% or with $P < 1 \times 10^{-4}$ when
41 testing for Hardy-Weinberg equilibrium were excluded. We used the MERLIN algorithm⁹ to
42 detect chromosomal fragments co-segregating with the BrS phenotype, by testing a model of
43 autosomal dominant pattern of inheritance with incomplete penetrance (80%). The maximal
44 theoretical LOD score was 0.82 for this family. The threshold for selecting shared genomic
45 regions was set to 0.7 ($p = 0.05$ uncorrected for multiple testing).

46 **Array-CGH**

47 Array-CGH was performed on Agilent whole-genome 1M microarrays following the
48 manufacturer's recommendations. Variant calling was performed as previously described, after
49 exclusion of probes located within known copy-number variable intervals.^{10,11}

50 **Exome sequencing**

51 Enrichment in coding sequences was performed using the Agilent SureSelect in-solution
52 capture protocol, which targeted 39.3 Mb of exonic sequences (GENCODE custom design as
53 previously described¹²). The enriched library was sequenced on three lanes of an Illumina
54 Genome Analyzer IIx, producing 54-bp paired-end reads and 13.3 Gb of sequence for the
55 proband. Reads were aligned to the human genome assembly GRCh37 (BWA-MEM, version
56 0.7.5a), which led to a mean depth of 114x. Coverage of 10x or more was obtained for 90% of
57 the targeted positions, considering only reads with a mapping quality score above 30. Genetic
58 variations (single nucleotide variants and indels) were called using Samtools mpileup v0.1.19
59 and GATK Unified Genotyper v2.8 and were considered for further analyses if found by both
60 algorithms with a minimum quality score of 25 and a minimum mapping quality of 30.
61 Functional consequences were annotated using Ensembl VEP (Variant Effect Predictor).
62 Variants were considered as having a potential functional consequence if they were annotated
63 with one or more of the following SO terms for at least one RefSeq transcript:
64 “transcript_ablation” (SO:0001893), “splice_donor_variant” (SO:0001575),
65 “splice_acceptor_variant” (SO:0001574), “stop_gained” (SO:0001587), “frameshift_variant”
66 (SO:0001589), “stop_lost” (SO:0001578), “start_lost” (SO:0002012),
67 ”protein_altering_variant” (SO:0001818) “inframe_insertion” (SO:0001821),
68 “inframe_deletion” (SO:0001822), “missense_variant” (SO:0001583),
69 “transcript_amplification” (SO:0001889). Variants were considered as rare if the minor allele
70 frequency (MAF) was < 0.1% in the ExAC Non-Finnish European population (Exome
71 Aggregation Consortium, <http://exac.broadinstitute.org/>, version 0.3, 33,370 individuals).
72 Knime4Bio, a set of custom nodes for the interpretation of next-generation sequencing data
73 with KNIME,¹³ was used for all merging and filtering steps. Validation experiments and
74 familial segregation analyses were performed by capillary sequencing on Applied Biosystems
75 3730 DNA Analyzer, using standard procedures. Two *in silico* algorithms - Endeavour¹⁴

76 and Toppgene¹⁵ - were then applied to rank the putative disease-causing genes. Both tools were
77 accessed through the Internet by using the default prioritization parameters and based on 21
78 genes associated to BrS¹⁶ as the training gene set.

79

80 **Targeted sequencing**

81 We have developed a custom kit to capture and sequence the coding regions of *KCNAB2* as
82 well as 45 arrhythmia-susceptibility genes (Agilent Technologies HaloPlex capture, Illumina
83 sequencing). Among those 45 genes, 21 genes were previously linked to BrS (*SCN5A*, *SCN1B*,
84 *SCN2B*, *SCN3B*, *SCN10A*, *CACNA1C*, *CACNB2*, *CACNA2D1*, *KCNH2*, *KCNE3*,
85 *KCNE1L/KCNE5*, *KCND3*, *KCNJ8*, *ABCC9*, *TRPM4*, *HCN4*, *GPD1L*, *RANGRF/MOG1*,
86 *SLMAP*, *PKP2*, *FGF12*). In total, 167 BrS cases (unrelated index cases) as well as 167 control
87 individuals aged over 65-year old and showing no history of cardiac arrhythmia were
88 sequenced¹⁶. On average, >99.9% of the *KCNAB2* coding sequence was covered by at least ten
89 reads in cases and controls. Public databases of genetic variants, generated by sequencing
90 control or diseased individuals, were interrogated for *KCNAB2* variants of interest (1000
91 genomes Project, NHLBI GO Exome Sequencing Project and Exome Aggregation Consortium
92 (ExAC), Cambridge, MA, accessed in September 2015).

93 **Site-directed mutagenesis**

94 Three transcripts are described in the RefSeq database for *KCNAB2*. By RT-PCR experiments
95 on a panel of human tissue types, we identified NM_003636 as the main cardiac isoform (data
96 not shown). We cloned this isoform in a pCMV6 expression plasmid to perform functional
97 experiments. The human WT-*KCNAB2*, R12Q-*KCNAB2*, L13F-*KCNAB2* and V114I-*KCNAB2*
98 cDNAs were purchased from OriGene. The constructs were sequenced to ensure that there were
99 no other mutations.

100

101

102 Cellular electrophysiology and modeling

103 The African green monkey kidney fibroblast-like cell line (COS-7) was obtained from the
104 American Type Culture Collection and cultured as previously described.¹⁷ Cells were
105 transfected with 2 µg of DNA complexed with JetPEI (Polyplus-transfection) according to the
106 manufacturer's instructions. For Kv4.3 experiments, DNA amounts were 100 ng of pCMV6-
107 *KCND3* (NM_004980.3), 500 ng of wild type (WT) or mutant pCMV6-*KCNAB2*
108 (NM_003636.2; 250 ng of WT and mutant in the heterozygous condition (Kv4.3/Kvβ2 ratio:
109 1:5) and 1400 ng pEGFP (Clontech). For Nav1.5 experiments, DNA amounts were 200 ng of
110 pCI-*SCN5A* (NM_000335.4), 200 ng of pRC-*SCN1B* (NM_001037), encoding the cardiac Na⁺
111 channel auxiliary subunit Navβ1, 600 ng of wild type (WT) or mutant pCMV6-*KCNAB2* and
112 1000 ng pEGFP. Eight hours post-transfection, the cells were isolated and seeded in plastic
113 Petri dishes at low density. Whole-cell currents were recorded at room temperature using the
114 patch-clamp technique, 24 (Nav1.5) to 48 hours (Nav1.5 or Kv4.3) post-transfection. The cells
115 were continuously superfused with Tyrode solution containing (in mmol/L): NaCl, 145; KCl,
116 4; MgCl₂, 1; CaCl₂, 1; HEPES, 5; glucose, 5; pH adjusted to 7.4 with NaOH. For K⁺ current
117 recordings, wax-coated pipettes (tip resistance: 1.8 to 3 MΩ) were filled with K⁺ intracellular
118 medium containing (in mmol/L): KCl, 150; MgCl₂, 1; EGTA, 5; HEPES, 10; pH adjusted to
119 7.2 with KOH. During Na⁺ current recording, the studied cell was locally superfused with
120 extracellular medium containing (in mmol/L): NaCl, 145; CsCl, 4; CaCl₂, 1; MgCl₂, 1; HEPES,
121 5; glucose, 5; pH adjusted to 7.4 with NaOH and the wax-coated pipette (tip resistance: 0.8 to
122 1.3 MΩ) was filled with Na⁺ intracellular medium containing (in mmol/L): CsCl, 80; gluconic
123 acid, 45; NaCl, 10; MgCl₂, 1; CaCl₂, 2.5; EGTA, 5; HEPES, 10; pH adjusted to 7.2 with CsOH.
124 All products were purchased from Sigma. Stimulation, data recording through an A/D converter
125 (Tecmar TM100 Labmaster, Scientific Solutions, or Digidata 1440A, Molecular Devices), and
126 analysis were performed with Acquis1 software (Bio-Logic) or Axon pClamp 10 (Molecular

127 Devices). All current amplitudes were normalized by cell capacitance. Capacitance and series
128 resistances were compensated to obtain minimal contribution of capacitive transients using a
129 VE-2 amplifier (Alembic Instrument) or an Axopatch 200A amplifier (Axon Instruments,
130 Molecular Devices).

131 Action potentials and pseudo-ECG were calculated as in Gima and Rudy (2002),¹⁸ by
132 simulating the heterogeneous transmural wedge of the right ventricular outflow tract (RVOT).

133 **Co-immunoprecipitation of heterologously expressed proteins**

134 Forty-eight hours after transfection (666 ng of pCMV6-*KCND3* and 1333 ng of pCMV6-
135 *KCNAB2*, Kv4.3/Kv β 2 ratio: 1:2), COS-7 cells were washed twice with PBS and lysed in ice-
136 cold lysis buffer containing 1X PBS, 1% Triton X-100 and complete mini EDTA-free protease
137 inhibitor mixture tablet (Roche). Cell lysates were used in immunoprecipitation experiments
138 with 5 μ g of anti-Kv4.3 rabbit polyclonal antibody (Rb α Kv4.3; Alomone Labs). Prior to
139 immunoprecipitation, antibodies were bound to 12.5 μ l of protein A-magnetic beads
140 (Invitrogen). Cell lysates and antibody-coupled beads were mixed for 2 h at 4°C. Magnetic
141 beads were then collected and washed three times with ice-cold lysis buffer, and isolated protein
142 complexes were eluted with 1X SDS sample buffer at 60°C for 10 min. Immunoprecipitated
143 proteins were analyzed by western blot as described previously.¹⁹ The Rb α Kv4.3 antibody used
144 for western blot was purchased from Alomone Labs, and the mouse monoclonal anti-Kv β 2 and
145 anti-transferrin receptor (TransR) antibodies were purchased from OriGene and Invitrogen,
146 respectively. Goat anti-rabbit or anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated secondary
147 antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology.

148 **Cell surface biotinylation assays**

149 Surface biotinylation of transfected COS-7 cells (Kv4.3/Kv β 2 ratio: 1:2) was completed as
150 described previously.¹⁹ Briefly, cells were incubated with 0.5 mg/ml EZ-Link Sulfo-NHS-SS-
151 Biotin (Pierce) in PBS, pH 7.4, for 30 min on ice. The biotinylation reaction was quenched with

152 Tris-saline solution (10 mmol/L Tris, pH 7.4, 120 mmol/L NaCl), and detergent-soluble cell
153 lysates were prepared. Biotinylated cell surface proteins were affinity-purified using
154 NeutrAvidin-conjugated agarose beads (Pierce), and analyzed by western blot as described
155 above. Bands corresponding to Kv4.3 and Kv β 2 were normalized to bands corresponding to
156 TransR from the same sample. Kv4.3 and Kv β 2 protein expression (total or biotinylated
157 fraction) in cells transfected with pCMV6-*KCNAB2*-R12Q alone or with pCMV6-*KCNAB2*-
158 WT (heterozygous condition) is expressed relative to Kv4.3 or Kv β 2 protein expression (total
159 or biotinylated fraction) in cells transfected with pCMV6-*KCNAB2*-WT alone.

160 **Statistics of functional studies**

161 Data are presented as means \pm SEM. The statistical analyses were achieved using SigmaPlot
162 (Systat Software Inc.). The statistical significance of the observed effects was assessed by the
163 Student t-test (or a Mann-Whitney rank sum test when needed), or 2-way ANOVA followed by
164 a Holm-Sidak test for multiple comparisons when needed. A value of $p < 0.05$ was considered
165 significant.

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177 **RESULTS**

178 **Clinical report of the familial case**

179 The proband (individual II:3; Fig. 1a) was diagnosed with BrS after having experienced
180 unexplained syncope. He had a permanent type-I BrS electrocardiographic pattern without
181 conduction disturbance (Fig. 2a). Electrophysiological studies confirmed normal conduction
182 with atrium-to-His bundle (AH) and His bundle-to-ventricle (HV) conduction times of 96 ms
183 and 57 ms, respectively. No arrhythmia could be induced during programmed ventricular
184 stimulation with a ventricular refractory period of 210 ms. Holter monitoring revealed a non-
185 sustained polymorphic ventricular tachycardia (Fig. 2b). No recurrence of syncope or
186 arrhythmia was observed after implantable cardioverter-defibrillator implantation.

187 By family screening, two asymptomatic first-degree relatives (individuals II:1 and II:4) were
188 diagnosed with BrS after ajmaline test (Fig. 2a). Individuals I:2 and II:2 did not present with
189 the ECG pattern typical of BrS, even after ajmaline test. Since individual I:1 was diagnosed
190 with a complete left-bundle branch block (LBBB) associated with a dilated cardiomyopathy
191 (Fig. 2a), no drug challenge was performed and his phenotype regarding BrS could not be
192 determined. Clinical data for this French family are described in Supplemental Table 1.

193 **Genetic investigations**

194 We first checked whether any variation in the *SCN5A* gene could explain this familial case of
195 BrS. No *SCN5A* mutation was detected in the proband by capillary sequencing. Moreover, no
196 rare copy-number variant could be identified by array-based CGH. We combined whole-
197 exome sequencing and linkage analysis to identify any novel genetic variant likely explaining
198 this familial case. Whole-exome sequencing led to the detection of 73,010 simple nucleotide
199 variants (SNVs, substitutions and indels) in the proband compared to the human reference
200 genome assembly (GRCh37). Only 173 of these SNVs were annotated as functional and rare
201 (MAF < 0.1% in ExAC Non-Finnish Europeans). In parallel, by linkage analysis on the
202 complete pedigree, we determined which chromosomal intervals contain haplotypes co-

203 segregating with cardiac electrical anomalies. Only 17% of the genome displayed haplotype-
204 sharing patterns in line with autosomal dominant inheritance (Fig. 1b). Within this portion of
205 the genome, we validated 11 rare non-synonymous variants carried by the 3 BrS affected
206 family members. Among these 11 variants, 6 co-segregated perfectly with Brugada ECG
207 phenotypes (Fig. 1c, Supplemental Table 2). These 6 co-segregating variants were each
208 located in *KCNAB2*, *LAMB2*, *GRAMD3*, *HARS2*, *TXN* and *PHF19*. *In silico* gene
209 prioritization using Endeavour¹⁴ and ToppGene¹⁵ identified the *KCNAB2* gene, which
210 encodes the voltage-gated K⁺ channel β 2-subunit (Kv β 2), as the most likely susceptibility
211 gene for BrS (see Methods, Fig. 1c and Supplemental Table 3). Kv β 2 has been shown to
212 interact with the Kv4.3 channel, which has itself been involved in the pathogenesis of BrS.²⁰
213 Noteworthy, the *KCNAB2* variant (NM_003636: c.35G>A; NP_003627: p.R12Q; Fig. 1d)
214 was inherited from the father (I.1; Fig. 1a) whose BrS phenotype could not be determined,
215 since no drug challenge test could be performed in the presence of dilated cardiomyopathy.
216 This variant was not detected in 308 healthy blood donors and is absent from the European
217 populations reported in public databases. It is reported in one out of 4,291 individuals from
218 East Asia in the Exome Aggregation Consortium (ExAC) database, with no available
219 phenotype information (ExAC East Asian Population MAF=0.01%, Total ExAC
220 MAF=8.4x10⁻⁶).

221 *KCNAB2* sequencing in 167 unrelated French patients with BrS (including the Kv β 2-R12Q
222 carrier) identified two additional rare missense variants. One variant, found in one female
223 patient (NM_003636: c.37C>T; NP_003627: p.L13F) is absent from public databases,
224 including ExAC. Her sister did not carry the variant but was diagnosed with BrS after
225 ajmaline test. The other variant (NM_003636: c.340G>A; NP_003627: p.V114I;
226 rs140319610), found in two patients, is reported as very rare in public databases
227 (MAF=4.5x10⁻⁵ in the ExAC European population based on data from 66,600 alleles). Both

228 V114I carriers had episodes of vasovagal syncope and were diagnosed after ajmaline test. By
229 applying the same targeted sequencing strategy, no rare coding variant was detected in the
230 *KCNAB2* gene among 167 unaffected French individuals.

231 No additional rare variants were identified in 21 previously reported BrS-susceptibility genes
232 (see list of genes in the Methods section). Regarding other arrhythmia-susceptibility genes, a
233 rare missense variant in the *ANK2* gene, of unknown significance, was detected in the carrier
234 of the Kv β 2-L13F variant and her affected sister.

235 **Electrophysiological analyses**

236 Whole-cell voltage-clamp analyses were performed in COS-7 cells co-expressing Kv4.3 and
237 Kv β 2. As shown in Fig. 3, the current generated by Kv4.3 in the presence of Kv β 2-R12Q was
238 3-times larger than in the presence of WT Kv β 2. The R12Q variant had no effect on steady-
239 state activation ($G-V_{1/2}$ WT = 1.8 ± 1.3 mV, n = 22; $G-V_{1/2}$ R12Q = 2.6 ± 1.1 mV, n = 17). In
240 contrast, the potential at which half of the channels are inactivated was slightly shifted toward
241 more negative potentials, from -53.4 ± 1.1 mV with WT Kv β 2 (n = 9) to -57.5 ± 1.2 mV with
242 Kv β 2-R12Q (n = 5; p < 0.05, Student t-test). Kinetics of activation, inactivation and recovery
243 from inactivation were not modified by the variant (not shown). . The L13F variant also
244 increased significantly the density of Kv4.3-generated current, whereas the V114I variant had
245 no effect (Fig. 3).

246 Because the major susceptibility gene for BrS identified to date is *SCN5A*¹⁶, we also
247 investigated the function of the Nav1.5 channels in the presence of Kv β 2-R12Q. As shown in
248 Supplemental Fig. 1 and Supplemental table 4, the Na⁺ current was not modified by the
249 presence of the R12Q mutation in Kv β 2.

250 **Biochemical analyses**

251 To gain insights into the total and cell surface expression of the Kv4.3-Kv β 2 protein
252 complexes, biochemical experiments were performed in transfected COS-7 cells. Our results
253 show that Kv β 2 co-immunoprecipitates with Kv4.3 channels, and that the R12Q mutation

254 does not prevent the interaction (Fig. 4a). In addition, although no significant changes in the
255 total and cell surface protein expression of Kv4.3 were observed (Fig. 4b & 4c), the Kv β 2
256 expression and its presence underneath the plasma membrane were significantly increased in
257 presence of the R12Q mutation (Fig. 4b & 4d). Similar findings were also obtained when the
258 Kv4.3 and Kv β 2 constructs were transfected at a 1:5 ratio (data not shown). The same pattern
259 was observed in the absence of Kv4.3 co-expression (Supplemental Fig. 2). On the contrary,
260 no changes in total or cell surface expression of Kv4.3 and Kv β 2 were observed in presence
261 of the L13F or V114I variant (Fig. 4e & 4f).

262 **Action Potential and ECG modeling**

263 Using the Gima-Rudy model, we simulated the RVOT electrical activity taking into account
264 the gain-of-function of the Kv β 2-R12Q variant on the Kv4.3 currents in the heterozygous
265 condition, as obtained from the electrophysiological data (Fig. 5a). The control ECG
266 presented no ST segment elevation, and an upright T-wave. $I_{to,f}$ was then increased from 1.5
267 to 2.5 folds, corresponding to the lower and average experimental current changes in the
268 heterozygous condition. As a result, the pseudo-ECG shape was progressively modified.
269 Increasing $I_{to,f}$ from 1.5 to 1.9-folds led to a progressive ST segment elevation and inversion
270 of the T wave, both typical for the BrS ECG pattern (Supplemental Fig. 3 and Fig. 5c). When
271 $I_{to,f}$ was increased up to 2.5-fold, a massive ST segment elevation persisted but the inverted T
272 wave disappeared. In order to understand the mechanisms underlying the ECG changes, we
273 focused on the 1.9 and 2.5-fold conditions. As illustrated in Fig. 5b, when $I_{to,f}$ was increased
274 by 1.9-fold, the subepicardial action potential showed an exaggerated phase-1 repolarization.
275 This induced a delayed plateau leading to a large heterogeneity in the transmural
276 depolarization gradient responsible for the ST segment elevation and inverted T wave (Fig. 5b
277 & d). The subepicardial delayed plateau was initiated by a late I_{Na} resurgence and sustained
278 by I_{CaL} increase (Supplemental Fig. 4). The 2.5-fold increase in current density induced a loss

279 of the action potential dome in the subepicardium (Fig. 5 and Supplemental Fig. 4). The mid-
280 myocardium plateau exhibited a deeper notch with no major change in duration. These results
281 highlight that because of ventricular transmural heterogeneity of electrical activity, a uniform
282 $I_{to,f}$ increase can cause a non-uniform loss of plateau. This allows late reactivations of more
283 repolarized regions driven by proximal and late appearing plateaus.

284

285 **DISCUSSION**

286 More than 20 genes have been involved in susceptibility to BrS.^{4,5} Gene finding has been
287 largely based so far on candidate gene approaches and only few mutations have been shown
288 to segregate in familial cases. Here we applied a hypothesis-free genome-wide screening
289 strategy on a familial case of BrS and identified one missense variant in the *KCNAB2* gene
290 co-segregating with the ECG anomalies. We then showed that the gain-of-function effect of
291 the resulting amino-acid substitution is causally related to the BrS phenotype.
292 Most of the genetic variants identified so far as causing BrS result in reduction of the cardiac
293 Na^+ current (I_{Na}). These mutations are located either in *SCN5A*,²¹ encoding the Nav1.5
294 channel, or in genes encoding regulatory subunits of Nav1.5.⁵ Mutations in *SCN10A* - which
295 encodes Nav1.8 - have also been reported as associated with BrS.²² Other mutations related to
296 BrS are located in genes encoding the $\alpha 1$ -, $\beta 2$ -, and $\alpha 2\delta 1$ -subunits of the L-type Ca^{2+} channel,
297 and reduce the L-type Ca^{2+} current ($I_{Ca,L}$).^{23,24} In the presence of the latter variants, the ECG
298 phenotype associates the typical BrS ST-segment pattern with a short QT interval. Finally, a
299 third group of BrS mutations increases the K^+ currents and more particularly the fast
300 component of the transient outward current, $I_{to,f}$. They are located in the *KCND3* gene,
301 encoding the Kv4.3 channel, and in the *KCNE3* gene, encoding a Kv4.3-interacting β -
302 subunit.^{20,25}

303 Our study confirms the involvement of $I_{to,f}$ in the pathogenesis of BrS. *KCNAB2* encodes
304 $Kv\beta 2$, a voltage-gated K^+ channel regulatory subunit related to the aldo-keto reductase
305 superfamily,⁷ that increases the density of $Kv4.3$ -generated currents, without affecting
306 measurably the time and/or voltage-dependence of the current properties.²⁶ Because *KCNAB2*
307 is expressed in human ventricles,²⁷ we hypothesized that the R12Q variant could modulate the
308 properties and/or the expression of $Kv4.3$ channels. Our results demonstrate that the R12Q
309 substitution in $Kv\beta 2$ increases the density of $Kv4.3$ -generated currents in COS-7 cells,
310 without affecting $Kv4.3$ biophysical properties. Biochemical experiments indicate the
311 presence of greater amounts of both total and cell surface $Kv\beta 2$ -R12Q without any changes in
312 $Kv4.3$ expression. These findings suggest that the p.R12Q mutation increases the stability of
313 the $Kv\beta 2$ protein, which results, by mass action, in greater density underneath the cell surface.
314 Additionally, although the mutation in $Kv\beta 2$ does not seem to alter the interaction with
315 $Kv4.3$, one could speculate that the increased expression of $Kv\beta 2$ increases the probability of
316 interaction between the two channel subunits and alters the functioning, either the open
317 probability or the conductance, of the channel. $Kv\beta 2$ has been shown to be a functional
318 oxidoreductase, which affects the biophysical properties of $Kv1$ channels by converting
319 NADPH cofactor to $NADP^+$.²⁸ The relevance of this catalytic activity in regulating Kv
320 channel functioning in cardiomyocytes remains unclear.²⁹ Additional studies will be required
321 to investigate its role in regulating the cardiac $Kv4.3$ -generated $I_{to,f}$ channels, as well as the
322 impact of the mutations in this regulation.

323 Since the major BrS-susceptibility gene identified so far is *SCN5A*, we also evaluated the
324 possible effects of $Kv\beta 2$ R12Q variant on the $Nav1.5$ current. We did not detect any changes
325 in Na^+ current. Additionally, *in silico* modeling results strongly suggest that the $I_{to,f}$ changes
326 are sufficient to affect the RVOT AP shape and ECG.

327 Screening for *KCNAB2* coding variation in additional unrelated patients allowed identifying a
328 second novel missense substitution, Kv β 2-L13F, carried by one index case among 167
329 patients with BrS. This variant produces a similar increase as Kv β 2-R12Q in the Kv4.3-
330 generated current density. The affected sister of the proband, however, does not carry the
331 substitution. Furthermore, in contrast to the results obtained with Kv β 2-R12Q, we observed
332 no changes of the Kv β 2-L13F protein fraction underneath the cell membrane. These results
333 suggest that the Kv β 2-L13F variant may not be associated with the BrS phenotype. Indeed,
334 one cannot exclude that BrS may be triggered by the rare *ANK2* variant of unknown
335 significance and carried by both affected sisters, or by any other rare and undetected genetic
336 variant. At last, distinct combinations of genetic determinants, including the Kv β 2-L13F
337 variant in one case, may result in similar ECG anomalies in both affected siblings. This
338 hypothesis is supported by the complex BrS-inheritance pattern observed in familial cases
339 with *SCN5A* mutations³⁰, and by the existence of common genetic polymorphism
340 predisposing to this rare disease.⁶

341 Overall, while rare coding variants in *KCNAB2* were detected in 4 out of 167 index cases with
342 BrS, no rare coding variants were found in this gene among a control population of 167
343 individuals. These results suggest that rare coding variants in *KCNAB2* might be more
344 prevalent among patients with BrS. Nevertheless, whether *KCNAB2* variants should be
345 considered as the primary cause for BrS remains an open question - and this holds true also
346 for previously reported variants in other ion channel subunits. There is indeed accumulating
347 evidence that BrS exhibits local structural anomalies³¹ that could lead to delayed segmented
348 conduction,³²⁻³⁴ which by itself could underlie the BrS phenotype.³⁵ In this context, a
349 genetically-inherited decrease in I_{Na} or $I_{Ca,L}$ or increase in I_{to} might only unmask or exacerbate
350 the BrS phenotype.

351

352

353 CONCLUSIONS

354 In conclusion, our results herein indicate that Kv β 2-mediated deregulation of Kv4.3-encoded
355 I_{to,f} channels is involved in the pathogenesis of BrS. Together with previous reports, our study
356 further emphasizes the critical role of the I_{Na}/I_{to} balance in BrS. This new finding also expands
357 the list of genes associated with susceptibility to BrS and may contribute to improve
358 molecular diagnosis of this cardiac arrhythmia disorder.

359

360 ACKNOWLEDGMENTS

361 The authors are grateful to Aurore Girardeau, Angélique Erraud, Patricia Charpentier
362 (Therassay core facility) and Juan-Eugenio Sandoval-Tortosa for technical assistance and to
363 Béatrice Delasalle and Ruben Coronel for fruitful discussions. They acknowledge the
364 members of the genomics and bioinformatics core facilities of Nantes (Biogenouest) for their
365 expert services.

366

367 FUNDING SOURCES

368 This work was supported by grants from the Leducq Foundation (CVD-05; Alliance against
369 Sudden Cardiac Death), the *Fondation pour la Recherche Médicale* (DEQ20140329545, to
370 J.J.S.), the Inserm (ATIP-Avenir program, to R.R.) and the French Regional Council of Pays-
371 de-la-Loire. Z.E.S.L. was supported by the *Fondation Lefoulon-Delalande*, the *Fondation*
372 *pour la Recherche Médicale*, and the *Fondation Genavie*. S.L.S. and C.S. were supported by
373 the Wellcome Trust (Grant no. WT098051). C.M. acknowledges financial support from the
374 Marie Curie 7th Framework Program of the European Commission (NavEx-256397) and the
375 *Fondation Genavie*.

376 DISCLOSURE

377 None.

REFERENCES

1. Chugh SS, Reinier K, Teodorescu C, Evanado A, Kehr E, Al Samara M, Mariani R, Gunson K, Jui J. Epidemiology of sudden cardiac death: clinical and research implications. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 2008;51(3):213–228.
2. Tester DJ, Ackerman MJ. Postmortem long QT syndrome genetic testing for sudden unexplained death in the young. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007;49(2):240–246.
3. Antzelevitch C, Brugada P, Borggrefe M, Brugada J, Brugada R, Corrado D, Gussak I, LeMarec H, Nademanee K, Perez Riera AR, Shimizu W, Schulze-Bahr E, Tan H, Wilde A. Brugada syndrome: report of the second consensus conference: endorsed by the Heart Rhythm Society and the European Heart Rhythm Association. *Circulation*. 2005;111(5):659–670.
4. Nielsen MW, Holst AG, Olesen S-P, Olesen MS. The genetic component of Brugada syndrome. *Frontiers in Physiology*. 2013;4:179.
5. Antzelevitch C, Yan G-X. J-wave syndromes: Brugada and early repolarization syndromes. *Heart Rhythm: The Official Journal of the Heart Rhythm Society*. 2015;12(8):1852–1866.
6. Bezzina CR, Barc J, Mizusawa Y, Remme CA, Gourraud J-B, Simonet F, Verkerk AO, Schwartz PJ, Crotti L, Dagradi F, Guicheney P, Fressart V, Leenhardt A, Antzelevitch C, Bartkowiak S, et al. Common variants at SCN5A-SCN10A and HEY2 are associated with Brugada syndrome, a rare disease with high risk of sudden cardiac death. *Nature Genetics*. 2013;45(9):1044–1049.
7. Gulbis JM, Mann S, MacKinnon R. Structure of a voltage-dependent K⁺ channel beta subunit. *Cell*. 1999;97(7):943–952.
8. Priori SG, Wilde AA, Horie M, Cho Y, Behr ER, Berul C, Blom N, Brugada J, Chiang C-E, Huikuri H, Kannankeril P, Krahn A, Leenhardt A, Moss A, Schwartz PJ, et al. HRS/EHRA/APHRS expert consensus statement on the diagnosis and management of patients with inherited primary arrhythmia syndromes: document endorsed by HRS, EHRA, and APHRS in May 2013 and by ACCF, AHA, PACES, and AEPC in June 2013. *Heart Rhythm: The Official Journal of the Heart Rhythm Society*. 2013;10(12):1932–1963.
9. Abecasis GR, Cherny SS, Cookson WO, Cardon LR. Merlin--rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nature Genetics*. 2002;30(1):97–101.
10. Conrad DF, Pinto D, Redon R, Feuk L, Gokcumen O, Zhang Y, Aerts J, Andrews TD, Barnes C, Campbell P, Fitzgerald T, Hu M, Ihm CH, Kristiansson K, Macarthur DG, et al. Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature*. 2010;464(7289):704–712.
11. Crooijmans RPMA, Fife MS, Fitzgerald TW, Strickland S, Cheng HH, Kaiser P, Redon R, Groenen MAM. Large scale variation in DNA copy number in chicken breeds. *BMC genomics*. 2013;14:398.
12. Coffey AJ, Kokocinski F, Calafato MS, Scott CE, Palta P, Drury E, Joyce CJ, Leproust EM, Harrow J, Hunt S, Lehesjoki A-E, Turner DJ, Hubbard TJ, Palotie A. The GENCODE exome: sequencing the complete human exome. *European journal of human genetics: EJHG*. 2011;19(7):827–831.
13. Lindenbaum P, Le Scouarnec S, Portero V, Redon R. Knime4Bio: a set of custom nodes for the interpretation of next-generation sequencing data with KNIME. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2011;27(22):3200–3201.
14. Tranchevent L-C, Barriot R, Yu S, Van Vooren S, Van Loo P, Coessens B, De Moor B, Aerts S, Moreau Y. ENDEAVOUR update: a web resource for gene prioritization in multiple species. *Nucleic Acids Research*. 2008;36(Web Server issue):W377–384.

15. Chen J, Xu H, Aronow BJ, Jegga AG. Improved human disease candidate gene prioritization using mouse phenotype. *BMC bioinformatics*. 2007;8:392.
16. Le Scouarnec S, Karakachoff M, Gourraud J-B, Lindenbaum P, Bonnaud S, Portero V, Duboscq-Bidot L, Daumy X, Simonet F, Teusan R, Baron E, Violleau J, Persyn E, Bellanger L, Barc J, et al. Testing the burden of rare variation in arrhythmia-susceptibility genes provides new insights into molecular diagnosis for Brugada syndrome. *Human Molecular Genetics*. 2015;24(10):2757–2763.
17. Loussouarn G, Park K-H, Bellocq C, Baró I, Charpentier F, Escande D. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PIP₂, controls KCNQ1/KCNE1 voltage-gated potassium channels: a functional homology between voltage-gated and inward rectifier K⁺ channels. *The EMBO Journal*. 2003;22(20):5412–5421.
18. Gima K, Rudy Y. Ionic current basis of electrocardiographic waveforms: a model study. *Circulation Research*. 2002;90(8):889–896.
19. Marionneau C, Carrasquillo Y, Norris AJ, Townsend RR, Isom LL, Link AJ, Nerbonne JM. The sodium channel accessory subunit Navβ1 regulates neuronal excitability through modulation of repolarizing voltage-gated K⁺ channels. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 2012;32(17):5716–5727.
20. Giudicessi JR, Ye D, Tester DJ, Crotti L, Mugione A, Nesterenko VV, Albertson RM, Antzelevitch C, Schwartz PJ, Ackerman MJ. Transient outward current (I_{to}) gain-of-function mutations in the KCND3-encoded Kv4.3 potassium channel and Brugada syndrome. *Heart rhythm: the official journal of the Heart Rhythm Society*. 2011;8(7):1024–1032.
21. Kapplinger JD, Tester DJ, Alders M, Benito B, Berthet M, Brugada J, Brugada P, Fressart V, Guerchicoff A, Harris-Kerr C, Kamakura S, Kyndt F, Koopmann TT, Miyamoto Y, Pfeiffer R, et al. An international compendium of mutations in the SCN5A-encoded cardiac sodium channel in patients referred for Brugada syndrome genetic testing. *Heart Rhythm: The Official Journal of the Heart Rhythm Society*. 2010;7(1):33–46.
22. Hu D, Barajas-Martínez H, Pfeiffer R, Dezi F, Pfeiffer J, Buch T, Betzenhauser MJ, Belardinelli L, Kählig KM, Rajamani S, DeAntonio HJ, Myerburg RJ, Ito H, Deshmukh P, Marieb M, et al. Mutations in SCN10A are responsible for a large fraction of cases of Brugada syndrome. *Journal of the American College of Cardiology*. 2014;64(1):66–79.
23. Antzelevitch C, Pollevick GD, Cordeiro JM, Casis O, Sanguinetti MC, Aizawa Y, Guerchicoff A, Pfeiffer R, Oliva A, Wollnik B, Gelber P, Bonaros EP, Burashnikov E, Wu Y, Sargent JD, et al. Loss-of-function mutations in the cardiac calcium channel underlie a new clinical entity characterized by ST-segment elevation, short QT intervals, and sudden cardiac death. *Circulation*. 2007;115(4):442–449.
24. Burashnikov E, Pfeiffer R, Barajas-Martinez H, Delpón E, Hu D, Desai M, Borggreffe M, Häissaguerre M, Kanter R, Pollevick GD, Guerchicoff A, Laiño R, Marieb M, Nademanee K, Nam G-B, et al. Mutations in the cardiac L-type calcium channel associated with inherited J-wave syndromes and sudden cardiac death. *Heart Rhythm: The Official Journal of the Heart Rhythm Society*. 2010;7(12):1872–1882.
25. Delpón E, Cordeiro JM, Núñez L, Thomsen PEB, Guerchicoff A, Pollevick GD, Wu Y, Kanters JK, Larsen CT, Hofman-Bang J, Burashnikov E, Christiansen M, Antzelevitch C. Functional effects of KCNE3 mutation and its role in the development of Brugada syndrome. *Circulation. Arrhythmia and electrophysiology*. 2008;1(3):209–218.
26. Yang EK, Alvira MR, Levitan ES, Takimoto K. Kvβ subunits increase expression of Kv4.3 channels by interacting with their C termini. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(7):4839–4844.
27. Gaborit N, Varro A, Le Bouter S, Szuts V, Escande D, Nattel S, Demolombe S. Gender-related differences in ion-channel and transporter subunit expression in non-diseased human hearts. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2010;49(4):639–646.

28. Weng J, Cao Y, Moss N, Zhou M. Modulation of voltage-dependent Shaker family potassium channels by an aldo-keto reductase. *The Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(22):15194–15200.
29. Kilfoil PJ, Tipparaju SM, Barski OA, Bhatnagar A. Regulation of ion channels by pyridine nucleotides. *Circulation Research*. 2013;112(4):721–741.
30. Probst V, Wilde AAM, Barc J, Sacher F, Babuty D, Mabo P, Mansourati J, Le Scouarnec S, Kyndt F, Le Caignec C, Guicheney P, Gouas L, Albuissou J, Meregalli PG, Le Marec H, et al. SCN5A mutations and the role of genetic background in the pathophysiology of Brugada syndrome. *Circulation. Cardiovascular Genetics*. 2009;2(6):552–557.
31. Catalano O, Antonaci S, Moro G, Mussida M, Frascaroli M, Baldi M, Cobelli F, Baiardi P, Nastoli J, Bloise R, Monteforte N, Napolitano C, Priori SG. Magnetic resonance investigations in Brugada syndrome reveal unexpectedly high rate of structural abnormalities. *European Heart Journal*. 2009;30(18):2241–2248.
32. Ikeda T, Sakurada H, Sakabe K, Sakata T, Takami M, Tezuka N, Nakae T, Noro M, Enjoji Y, Tejima T, Sugi K, Yamaguchi T. Assessment of noninvasive markers in identifying patients at risk in the Brugada syndrome: insight into risk stratification. *Journal of the American College of Cardiology*. 2001;37(6):1628–1634.
33. Postema PG, van Dessel PFHM, de Bakker JMT, Dekker LRC, Linnenbank AC, Hoogendijk MG, Coronel R, Tijssen JGP, Wilde AAM, Tan HL. Slow and discontinuous conduction conspire in Brugada syndrome: a right ventricular mapping and stimulation study. *Circulation. Arrhythmia and Electrophysiology*. 2008;1(5):379–386.
34. Postema PG, van Dessel PFHM, Kors JA, Linnenbank AC, van Herpen G, Ritsema van Eck HJ, van Geloven N, de Bakker JMT, Wilde AAM, Tan HL. Local depolarization abnormalities are the dominant pathophysiologic mechanism for type 1 electrocardiogram in brugada syndrome a study of electrocardiograms, vectorcardiograms, and body surface potential maps during ajmaline provocation. *Journal of the American College of Cardiology*. 2010;55(8):789–797.
35. Hoogendijk MG, Potse M, Vinet A, de Bakker JMT, Coronel R. ST segment elevation by current-to-load mismatch: an experimental and computational study. *Heart Rhythm: The Official Journal of the Heart Rhythm Society*. 2011;8(1):111–118.

FIGURE LEGENDS**Fig. 1 Genetic investigations in a familial case of BrS**

(a) Pedigree of the Kv β 2-R12Q family. R12Q + signs represent carriers of the heterozygous R12Q mutation. R12Q – signs represent mutation-negative family members. (b) LOD score profile obtained by genome-wide linkage analysis. The red line indicates the LOD score threshold of 0.7 used to filter DNA variants of interest (maximum theoretical LOD score: 0.82). (c) Number of DNA variants selected through successive filtering steps. Variants were considered as having a potential functional consequence if they were annotated as “transcript_ablation”, “splice_donor_variant”, “splice_acceptor_variant”, “stop_gained”, “frameshift_variant”, “stop_lost”, “start_lost”, “protein_altering_variant”, “inframe_insertion”, “inframe_deletion”, “missense_variant”, and/or “transcript_amplification” by Ensembl Variant Effect Predictor. (d) Capillary sequencing confirmed that all affected siblings carry a missense variant in the *KCNAB2* gene (NM_003636: c.35G>A; NP_003627: p.Arg12Gln; R12Q), inherited from their father who presents with cardiac conduction abnormalities. The variant was not detected in their unaffected mother and sister (as shown in panel a)

Fig. 2 Electrocardiographic patterns of family members

(a) Twelve-lead electrocardiograms of the proband and his relatives at baseline or/and during ajmaline test. (b) Event of ventricular tachycardia recorded in the proband

Fig. 3 Effects of Kv β 2 mutations on Kv4.3-generated currents

(a) Superimposed representative currents, activated by a 1-s pulse every 5 s (only the first 180 ms are shown) to various potentials (from -50 mV to +60 mV, 10-mV increments;

holding potential: -80 mV; only pulses at -20, 0, +20, +40 and +60 mV are shown) obtained from four different COS-7 cells expressing Kv4.3 and either wild-type (WT; top left), R12Q (top right), V114I (bottom left) or L13F (bottom right) Kv β 2. **(b)** Tukey plots of peak K⁺ current densities recorded at +60 mV in cells transfected as in (A). Sample size is indicated in brackets, only outlier values are represented as empty symbols (*, ***: $p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively, *versus* WT; Mann-Whitney rank sum test) **(C)** Mean current density/voltage relationship of Kv4.3-generated currents in cells transfected as in (A). *, **, ***: $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively, *versus* WT (2-way ANOVA followed by a Holm-Sidak post-hoc test)

Fig. 4 Effects of Kv β 2 variants on Kv β 2 and Kv4.3 expression

(a) Western blot analyses of total lysates (left) and Rb α Kv4.3 immunoprecipitates (IP, right) probed with anti-Kv4.3, anti-Kv β 2 and anti-Transferrin receptor (TransR) antibodies revealed that the R12Q mutation does not alter the co-immunoprecipitation of Kv β 2 with Kv4.3. **(b)** Representative western blots of Kv4.3 and Kv β 2 of the total (left) and biotinylated (right) fractions from transfected COS-7 cells. Western blot analyses of β -actin confirmed that biotinylated fractions are not contaminated by cytoplasmic proteins. **(c)** and **(d)** Kv4.3 and Kv β 2 of the of both fractions from COS-7 cells transfected with Kv4.3 + Kv β 2-WT ($n = 16-17$ samples), Kv4.3 + Kv β 2-WT + Kv β 2-R12Q (heterozygous condition, $n = 4-5$) or Kv4.3 + Kv β 2-R12Q ($n = 16-17$). Expression of Kv4.3 and Kv β 2 in each sample was normalized to the TransR protein in the same blot and then expressed relative to Kv4.3 or Kv β 2 in cells expressing Kv4.3 + Kv β 2-WT. Whereas no changes in Kv4.3 were observed, relative Kv β 2 total and submembrane expression was significantly (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$; Mann-Whitney rank sum test) higher in cells transfected with Kv4.3 + Kv β 2-R12Q than in cells expressing Kv4.3 + Kv β 2-WT. Kv β 2 submembrane expression was also significantly (* $p < 0.05$)

increased when expressed in the heterozygous condition. On the contrary, no changes in Kv4.3 (E) and Kv β 2 (F) total and cell surface expression were observed in presence of the L13F or V114I variants

Fig. 5 Modeling the effect of the R12Q variant at the heterozygous state

(a) The Kv4.3 current density is increased by an averaged factor of 2.5 at +60 mV, and by a minimal factor of 1.5 when considering only the lower limit for the heterozygous R12Q condition. (b) Action potentials of the subendocardial (endo), midmyocardial (mid) and subepicardial (epi), corresponding respectively to cells 15, 80 and 150 in a 165-cell fiber (thin, dashed, thick lines, respectively) in control condition (black) and in presence of a 1.9-fold (red) or a 2.5-fold (blue) increase in $I_{to,f}$. Shown is the 10th beat at 1 Hz. (c) Corresponding right ventricular outflow tract wedge pseudo-ECG, in arbitrary units (a.u.). (d) Heat map of voltage in space and time (vertical and horizontal axes, respectively) in control condition, and in the presence of a 1.9-fold and 2.5-fold increase in $I_{to,f}$. Stimulation (stim) was given on cell 1. In all conditions, there was zero I_{to} in subendocardium, and 85% as much I_{to} in midmyocardium as in subepicardium

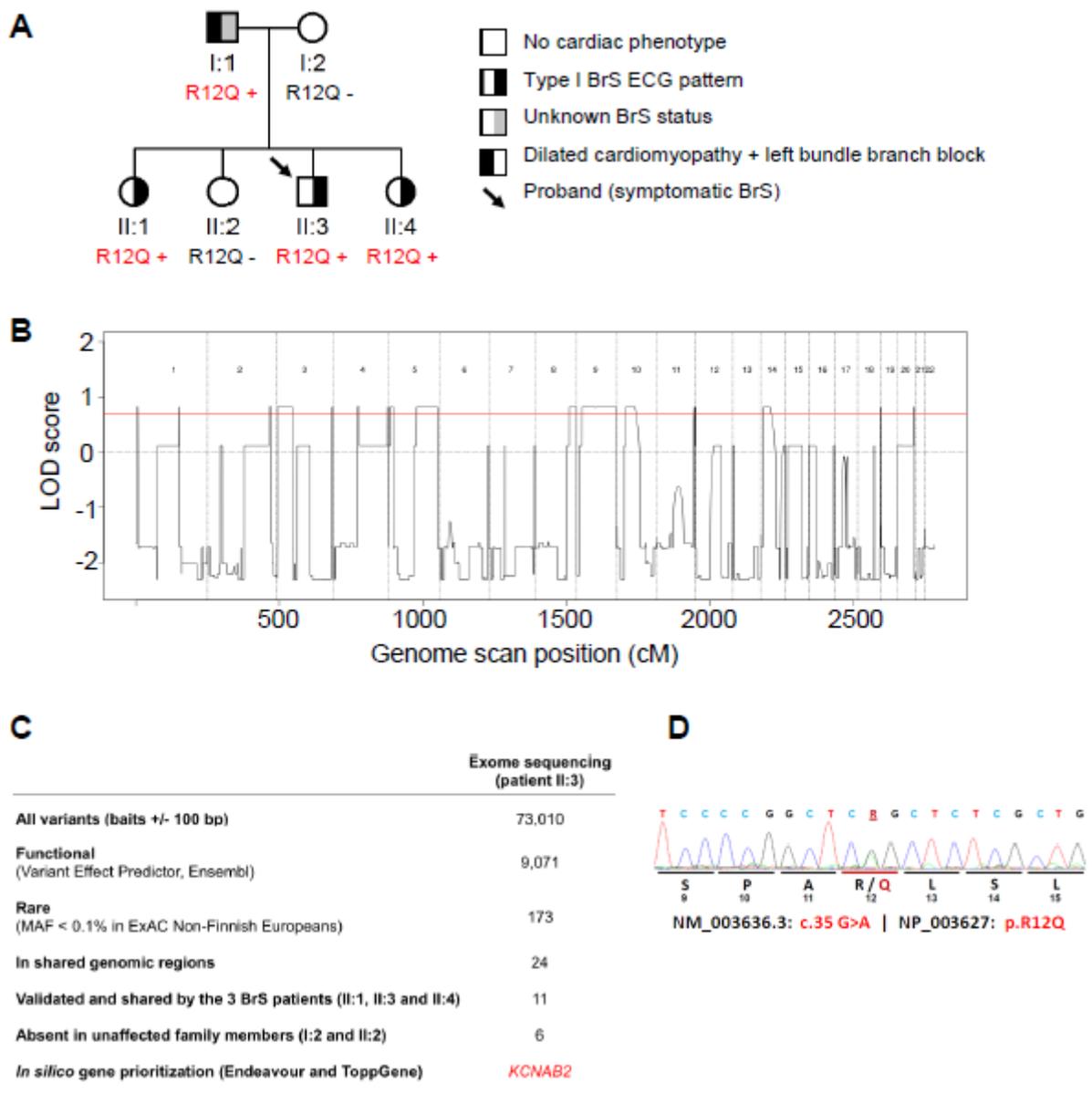


Figure 1. Portero et al, en révision



Figure 2. Portero et al, en révision

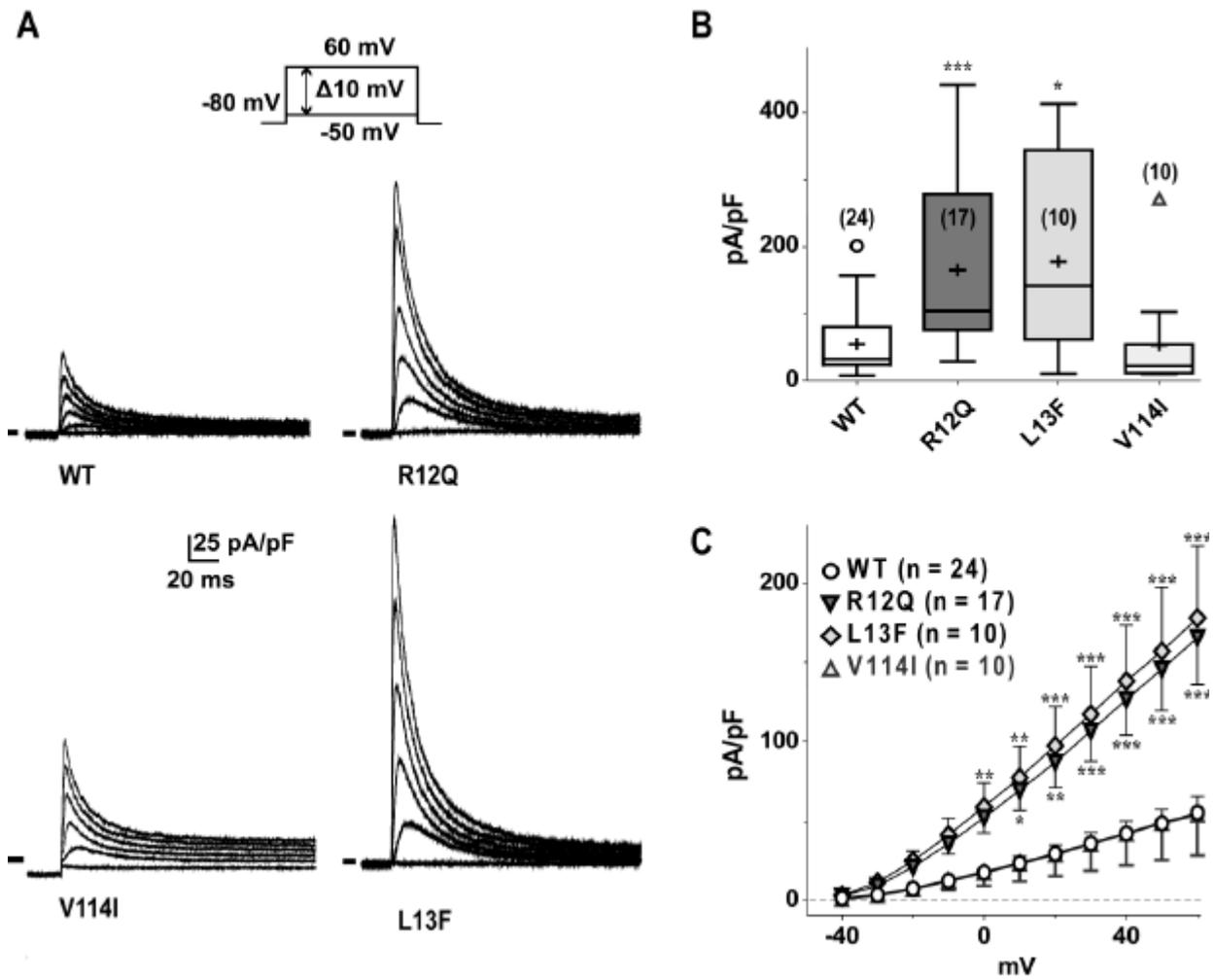


Figure 3. Portero et al, en révision

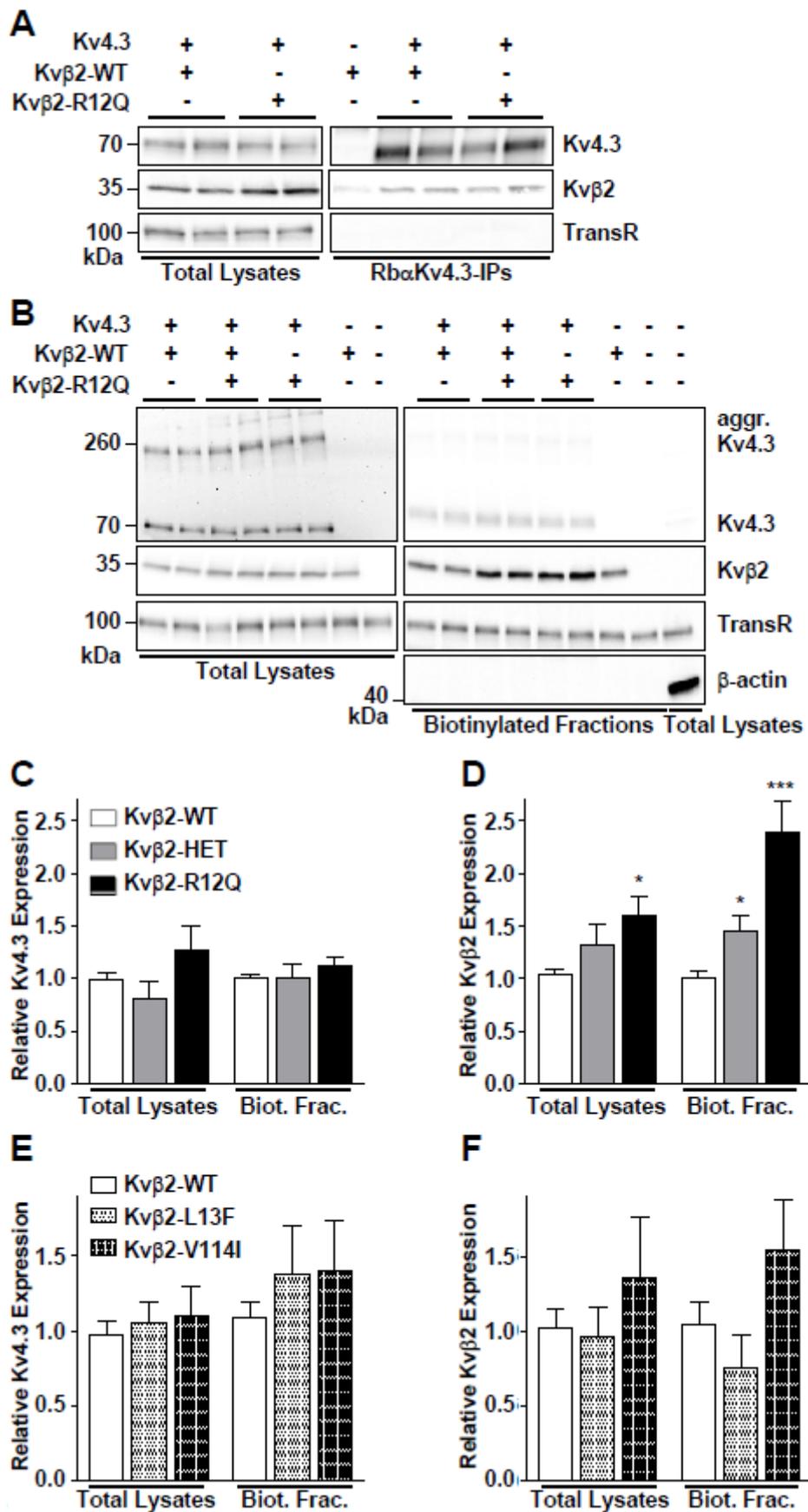


Figure 4. Portero et al, en révision

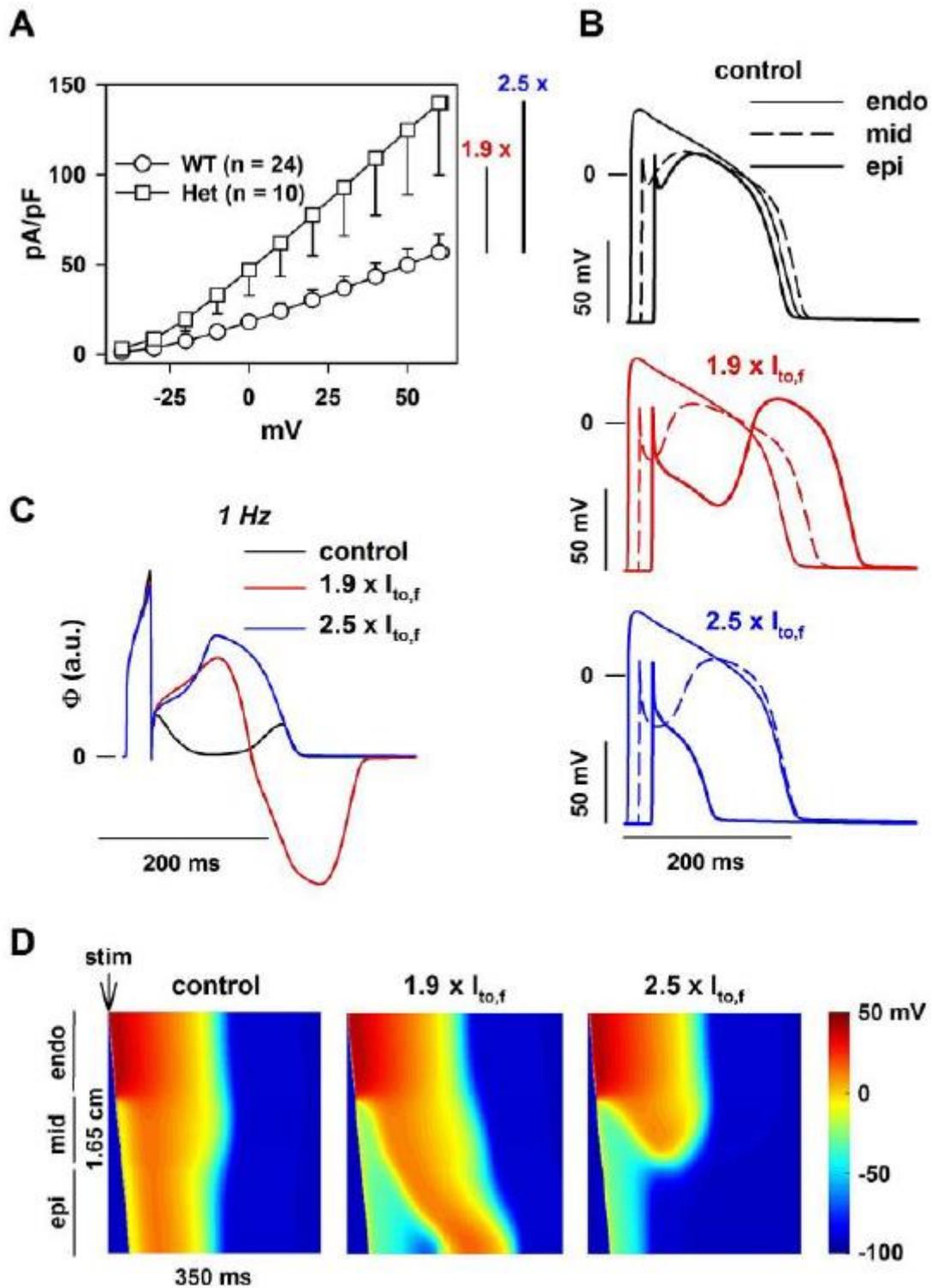


Figure 5. Portero et al, en révision

Thèse de Doctorat

Sophie BUREL

Phosphorylation des canaux Nav1.5 et régulation de l'excitabilité cardiaque normale et pathologique

Nav1.5 channels phosphorylation in the regulation of normal and diseased cardiac excitability

Résumé

Les canaux Nav1.5 sont des régulateurs clés de l'excitabilité cardiaque, et tout défaut de leur régulation augmente le risque d'arythmies. Plusieurs études ont suggéré que les défauts d'inactivation des canaux Nav1.5 dans l'insuffisance cardiaque sont associés à leur état de phosphorylation. Une approche de phosphoprotéomique développée au laboratoire a permis d'identifier *in situ* 19 sites de phosphorylation natifs des canaux Nav1.5 purifiés à partir de ventricules de souris sauvages ou développant une insuffisance cardiaque. Deux de ces sites, les phosphosérines 1938 et 1989, sont plus abondants chez les souris en insuffisance cardiaque comparé aux souris sauvages. De façon intéressante ces sites sont localisés à proximité des domaines de liaison du FGF13 et de la Calmoduline, deux protéines clés dans l'inactivation du canal. Mon premier objectif de thèse a été de déterminer le rôle de la phosphorylation dans la régulation de l'expression des canaux Nav1.5 à la surface cellulaire en criblant, dans des cellules HEK293, le rôle de chaque site identifié et celui des kinases connues pour réguler Nav1.5. Mon deuxième objectif a été de déterminer le rôle de la phosphorylation des sérines 1938 et 1989 dans la régulation de l'inactivation des canaux Nav1.5. Nous avons montré que la phosphorylation de ces deux sérines diminue l'interaction de FGF13 et de la Calmoduline avec Nav1.5 et altère les propriétés d'inactivation du canal. En conclusion, ces travaux ont révélé que le canal Nav1.5 est fortement phosphorylé et que deux des sites de phosphorylation identifiés constituent des cibles potentielles dans les défauts d'inactivation des canaux Nav1.5 dans l'insuffisance cardiaque.

Mots clés

Canal Nav1.5 ; Phosphorylation ; FGF13 ; Propriétés d'inactivation ; Insuffisance cardiaque

Abstract

Nav1.5 channels are key determinants of myocardial excitability and defects in their functioning or regulation increase the risk of life-threatening arrhythmias. Several studies have suggested the role of phosphorylation in the inactivation defects of Nav1.5 channels in heart failure. A phosphoproteomic approach in the laboratory led to the identification of 19 native phosphorylation sites on the Nav1.5 channel proteins purified from wild-type mouse ventricles or from ventricles isolated from failing mice. Two of these sites, the phosphoserines 1938 and 1989, are more abundant in the failing, compared with the non-failing wild-type, conditions. Interestingly, these two sites are located near the binding sites for FGF13 and Calmodulin, two key regulatory proteins of Nav1.5 channel inactivation. The first objective of my thesis was to determine the role of phosphorylation in the regulation of Nav1.5 channel cell surface expression, by screening in HEK293 cells the role of each identified site as well as of kinases previously described to regulate Nav1.5 channels. My second objective was to determine the role of phosphorylation at serines 1938 and 1989 in regulating the inactivation properties of Nav1.5 channels. The results showed that phosphorylation at these two serines decreases the interaction of FGF13 and Calmodulin with Nav1.5 and alters the inactivation properties of the channel. In conclusion, these studies demonstrated that the Nav1.5 channels are highly phosphorylated in ventricles and suggested that two of the newly identified phosphorylation sites constitute novel potential targets in the inactivation defects of Nav1.5 channels in heart failure.

Key Words

Nav1.5 channel; Phosphorylation; FGF13; Inactivation properties; Heart failure