### UNIVERSITE DE NANTES

### FACULTE DE MEDECINE

Année 2006

# CANAUX K<sup>+</sup> ET QT LONG ACQUIS

## THESE DE DOCTORAT

Ecole doctorale CHIMIE-BIOLOGIE Discipline: Sciences de la Vie et de la Santé Spécialité Physiologie

présentée et soutenue publiquement par

# AZIZA EL HARCHI Le 27 octobre 2006, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs	Mr COULOMBE Alain, Directeur de recherche, INSERM U621, CHUPS Jussieu, Paris
rapponouro	Mr. FAIVRE Jean-François, Professeur, Université de Poitiers, CNRS UMR 6187
Examinateurs:	<ul> <li>Mme LEMARCHAND Patricia, Professeur, Université de Nantes, INSERM U533</li> <li>Mr BENDAHHOU Saïd, Chargé de recherche, IPMC-UMR6097, Valbonne</li> <li>Mr ESCANDE Denis, Professeur, Université de Nantes, INSERM U533</li> </ul>
Directeur de thèse Membre invité	Mr CHARPENTIER Flavien, Chargé de recherche, INSERM U533, Nantes
	Mr VASSORT Guy, Directeur de recherche, INSERM U637, Montpellier

# SOMMAIRE

UNIVERSITE DE NANTES	1
FACULTE DE MEDECINE	1
THESE DE DOCTORAT.	<b>1</b>
presentee et soutenue publiquement par	1
Aziza EL HARCHI	1
Le 27 octobre 2006, devant le jury ci-dessous	1
Rapporteurs	1
Directeur de thèse	1
Membre invité	1
SOMMAIRE	1
LISTE DES FIGURES	5
LISTE DES TABLEAUX	7
	_
LISTE DES ABREVATIONS	8
AVANT PROPOS	. 10
INTRODUCTION	. 12
I. REPOLARISATION VENTRICULAIRE CARDIAQUE	13
I A Mésonismes isniques du notontial d'action ventuisulaire	15
I.A. I. La phase de dépolarisation : PHASE 0	15
I A 1 a Le courant INa	15
I A 2 La phase de repolarisation précoce · PHASE 1	15
I.A.3 La phase de plateau: PHASE 2	
I.A.3.a Le courant Na+ retardé (INa retardé).	16
I.A.3.b Les courants Ca2+	17
I.A.3.c Le courant d'échange Na/Ca.	18
I.A.4 La phase de repolarisation tardive: PHASE 3	19
I.A.4 a Les courants K+ retardés.	19
I.A.4.b Les courants K+ rectifiants entrants	20
I.A.5 Le potentiel diastolique: PHASE 4	21
I.A.6 La période réfractaire.	22
I.A.7 Origines de l'hétérogénéité de la repolarisation ventriculaire	23
I.A.7.a Hétérogénéité cellulaire: fibres de Purkinje et myocarde contractile	23
I.A.7.b Hétérogénéité transmurale et apico-basale	24
I.B Bases moléculaires des courants ioniques	26

I.B.1 Le pore: une structure fondamentale de la perméabilité ionique	
I.B.2 Le voltage-sensor : dase moleculare de la sensionne aux variations de potentiel	
I.D.2.a Le segment 54	
I.B.2.0 Wouvements du segment 54 et couplage	,
I B 3 a Canaux Na+	
Sous-unité a des canaux Na+	
Sous-unités B des canaux Na+	
I B 3 h Canaux Ca2+	
Sous-unité a des canaux Ca2+	
Sous-unité B des canaux Ca2+	
Sous unités auxiliaires des canaux Ca2+	
I B 3 c Canaux K+	
Sous unités $\alpha$ des canaux K+ à six segments transmembranaires et un nore	
Sous unités $\beta$ des canaux $K + \hat{\alpha}$ six segments transmembranaires et un pore	40 41
Sous unités $\alpha$ des canaux K+ à deux segments transmembranaires et un pore	۲۲ ۸۸
sous unites a des canada R + a deux segments transmentoranaries et un pore	
II. TROUBLES DE LA REPOLARISATION VENTRICULAIRE	47
Intervalle QT	
II.A Le syndrome du QT long	47
II.A.1 Le syndrome du QT long congénital	
II.A.2 Le syndrome du QT long acquis	49
II.A.2.a Induction médicamenteuse	50
Les anti-arythmiques	50
II.A.2.b Conditions physiopathologiques	53
Remodelage électrique dans les cardiomyopathies hypertrophiques et dilatées	
Remodelage électrique et bradycardie consécutive à un bloc auriculo-ventriculaire	
Rôle du remodelage électrique dans l'induction du processus hypertrophique	
II.B Le syndrome du QT court	57
II.C Mecanismes ioniques à l'origine des troubles du rythme associés aux anomalies de	la
repolarisation	58
II.C.1 Torsades de pointes et syndrome de QT long	60
II.C.1.a Origines des torsades de pointes	60
II.C.1.b Mécanismes ioniques à l'origine des torsades de pointes : les EADs	61
II.C.2 Rôle du phénomène d'alternance dans la genèse des troubles du rythme	
II.C.2.a Rôle des courants K+	63
II.C.2.b Rôle du Ca2+ intracellulaire	64
III. HERG ET LE SYNDROME DU QT LONG ACQUIS : UNE CIBLE PRIVILÉGIÉE	DES
AGENTS PHARMACOLOGIQUES	66
III.A Relation structure - fonction	
III A 1 Structure de la sous-unité $\alpha$	
III A 1 a Le pore	
III A 1 b Voltage-sensor	
III A 2 Extrémités N et C-terminales	
L'extrémité N-terminale	71
L'extrémité C-terminale	
III B Propriétés du courant macroscopique	72
III.B 1 Bases moléculaires de l'activation et de la désactivation	1 <b>3</b> 72

III.C Régulations de la conductance unitaire
III.C.1 Sensibilité aux cations monovalents.       77
III.C.2 Sensibilité aux cations divalents
III.D Pharmacologie
III.D.1 Bases structurales de l'inhibition pharmacologique
III.D.1.a Déterminants moléculaires intra pore
III.D.1.b Mécanisme de "trapping"
III.D.2. Différentes méthodes de criblage des inhibiteurs de hERG
III.D.2.a Tests in vitro actuels : avantages et limites
III.D.2.b Développement des nouveaux tests in vitro : avantages et limites
MATERIEL ET METHODES
I MODELES BIOLOGIQUES UTILISES
I.A Méthodes de culture des cellules COS-7 91
I.A.1 Conservation des cellules dans l'azote liquide
I.A.2 Milieux de culture
I.A.3 Repiquage
I.A.4. Transfection des cellules par vecteurs synthétiques de type polymère
I.B Les Modèles animaux
I.B.1 Les souris
I.B.2 Isolement des cardiomyocytes ventriculaires de souris
I.B.2.a La dissociation cellulaire
I.B.2.b La remontée calcique
II. LES TECHNIQUES ELECTROPHYSIOLOGIQUES
II A Le natch-clamn 96
II A 1 Principe
II A 2 Dispositif expérimental et composition des solutions
II A 3 Les différentes configurations du patch-clamp
II A 4 Perméabilité membranaire, notentiel d'inversion et différenciation des courants 100
II A 5 Stratégies nour la différenciation des courants des cardiomyocytes
II A 5 a Mesure des courants K+
II A 5 h Mesure du courant ICa L dans le projet amiodarone
II A 5 c Mesure du courant INa dans le projet amiodarone
II.A.6 Enregistrement des courants K+ dans les cellules COS-7
II B Ftudes electrocardiographiques 105
RESULTATS 107
REMODELAGE ELECTRIQUE INDUIT PAR UN TRAITEMENT CHRONIQUE À
L'AMIODARONE CHEZ LA SOURIS
Introduction 108
Résultats et discussion
Conclusions

REMODELAGE ELECTRIQUE INDUIT PAR UN BAV CHEZ LA SOURIS	112
Introduction	112
Résultats et discussion	113
Conclusions	116
EFFET D'UNE SUR-EXPRESSION DE HERG DANS L'INDUCTION DES TROUE	BLES DU
RYTHME	118
Introduction	118
Résultats et discussion	119
Conclusion	122
HERG: UNE CIBLE PRIVILÉGIÉE DES AGENTS PHARMACOLOGIQUES	124
Introduction	124
Matériels et Méthodes	126
Résultats	130
Expérimental	136
Discussion	140
DISCUSSION GENERALE	146
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	153
CANAUX K+ ET QT LONG ACQUIS	154
K+ channels and acquired long QT	154
L'Institut du thorax, INSERM U533-Faculté de Médecine-1, rue Gaston Veil 44035 N	antes154

# Liste des figures

**Figure 1**: Représentation des principaux courants ioniques participant au PA ventriculaire humain et murin

Figure 2: Hétérogénéité transmurale de la repolarisation ventriculaire

Figure 3: Relation évolutive supposée entre les différentes familles de canaux

**Figure 4**: Assemblage moléculaire des sous-unités  $\alpha$  des canaux Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> dépendant du potentiel (Kv) et K<sup>+</sup> à rectification entrante (Kir) et leur insertion au sein de la bicouche lipidique

Figure 5: Représentation schématique du déplacement des ions K<sup>+</sup> au sein du pore

Figure 6: Hypothèses de déplacement du segment S4 au sein de la bicouche lipidique

**Figure 7**: Interactions moléculaires possibles couplant les mouvements du "voltage sensor" à l'ouverture de la porte d'activation

Figure 8: Structure des sous-unité α et β d'un canal Na<sup>+</sup>

**Figure 9**: Structure d'une sous-unité  $\alpha$  et des différentes sous-unités régulatrices d'un canal Ca<sup>2+</sup> de type L

Figure 10: Définition de l'intervalle QT

Figure 11: Structure de l'amiodarone et des hormones thyroïdiennes

Figure 12: Exemple d'un rythme sinusal dégradé en torsades de pointes

**Figure 13**: Hypothèse de l'évolution de l'onde de dépolarisation d'un rythme sinusal physiologique (NSR) vers la tachycardie ventriculaire (VT) et la fibrillation ventriculaire (VF)

**Figure 14**: Théorie du mécanisme d'induction des torsades de pointes dans le syndrome de QT long

Figure 15: Post-dépolarisations précoces

Figure 16: Principe de restitution de la durée du PA

**Figure 17**: Régulation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire en condition physiologique et en condition d'alternance électrique

**Figure 18**: Relation courant potentiel du courant  $I_{Kr}$ **Figure 19**: PA-clamp ventriculaire

Figure 20: Modèle de Markov des différentes configurations du canal hERG

**Figure 21** : Topologie de la sous-unité  $\alpha$  du canal hERG

**Figure 22**: Localisation des résidus Tyr-652 et Phe-656 dans le domaine de S6 et alignement des acides aminés de ce segment pour hERG et d'autres canaux Kv

**Figure 23**: Traces de courants typiques obtenues à partir d'un ovocyte injecté avec l'ARNm de eag ou de A345R eag

Figure 24: Interaction entre le voltage-sensor et le pore de Kv1.2

**Figure 25**: Le canal D540K HERG est ouvert pour des potentiels hyperpolarisés mais pas le canal sauvage

Figure 26: Effets du Na<sup>+</sup> sur les différentes conformations du canal hERG

**Figure 27**: Interactions possibles entre les charges positives du segment S4, les charges négatives des résidus E518 et E519 de la boucle S3-S4 et le Ca<sup>2+</sup> extracellulaire

Figure 28: Topologie du pore de hERG et sites de liaison des agents pharmacologiques

**Figure 29**: Mécanisme de rétention ("trapping") des agents pharmacologiques de classe III au sein du pore de hERG

**Figure 30**: Représentation schématique du dispositif expérimental utilisé pour la technique de patch-clamp

Figure 31: Les différentes configurations du patch-clamp

Figure 32: Position des ondes P, Q, R, S, T et V d'un ECG de souris

# Liste des Tableaux

**Tableau 1**: Sous-unités α des canaux K<sup>+</sup> dépendant du potentiel exprimées dans le cœur

**Tableau 2**: Sous-unités auxiliaires  $\beta$  des canaux K<sup>+</sup> dépendant du potentiel exprimées dans le cœur

**Tableau 3** : Sous-unités α des courants K<sup>+</sup> rectifiants entrants cardiaques

Tableau 4: Syndromes de QT long congénitaux

**Tableau 5**: Composition des solutions pour l'isolement des cardiomyocytes ventriculaires de souris

**Tableau 6**: Composition des milieux intracellulaire et extracellulaire pour l'enregistrement des courants K<sup>+</sup> des cardiomyocytes ventriculaires de souris

**Tableau 7**: Composition des milieux intracellulaire et extracellulaire pour l'enregistrement de  $I_{Ca,L}$  dans les cardiomyocytes ventriculaires de souris

**Tableau 8**: Composition des milieux intracellulaire et extracellulaire pour l'enregistrement de  $I_{Na}$  dans les cardiomyocytes ventriculaires de souris

**Tableau 9**: Composition des milieux extracellulaire et intracellulaire pour l'enregistrement des courants K<sup>+</sup> dans les cellules COS-7

# Liste des Abrévations

- 4 A-P: 4 amino-pyridine
- ABC: ATP binding cassette
- AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
- ARN: Acide ribonucléique
- ATP: Adénosine triphosphate
- BAV : Bloc auriculo-ventriculaire
- BDM: butanedione 2,3 monoxime
- BSA: Bovine serum albumin
- Cav: canaux Ca<sup>2+</sup> dépendant du potentiel
- CICR: Calcium induced calcium release
- CMD : Cardiomyopathie dilatée
- CMH : Cardiomyopathie hypertrophique
- CNBD: Cyclic nucleotide binding domain
- CNG : Cyclic nucleotide gated channel

DTT : Dithiothréitol

- EAD : Early after depolarizations
- EMEA : European agency for the evaluation of medicinal products
- FDA : Food and Drug administration
- hERG : human ether-a-gogo related gene
- HpTx : heteropodatoxin
- KchAP: Kv Channel-Associated Protein
- KChIP: Kv Channel-Interacting Protein
- Kir: Canaux K<sup>+</sup> à rectification enrante
- Kv : Canaux K<sup>+</sup> dépendants du potentiel
- minK : Minimum K channel
- MiRP : minK related peptide
- MTS : Methylthiosulfonate
- Nav: canaux Na<sup>+</sup> dépendant du potentiel
- n-DEA: n déséthylamiodarone
- PA : Potentiel d'action
- PEI: Polyéthylèneimine
- PKA: Protéine Kinase A
- PKC: Protéine Kinase C
- RS: Réticulum sarcoplasmique
- SUR: Sulfonylurea receptor
- TdP: Torsades de pointes
- TEA: Tétraéthylammonium
- TTX: Tétrodotoxine

## **Avant propos**

Les maladies cardiovasculaires constituent en France la première cause de mortalité. Beaucoup de ces pathologies sont dites acquises et des facteurs environnementaux tels que le tabagisme ou l'alimentation expliquent leur forte prévalence dans les sociétés industrialisées. Une des conséquences des cardiopathies est la mort subite par arrêt cardiaque. Cette mort est due à une perte soudaine de la fonction du cœur alors que la victime n'avait ressenti aucun symptôme particulier. L'arrêt cardiaque est lié à une accélération brutale (tachycardie ventriculaire) et/ou à une désorganisation totale du rythme (fibrillation ventriculaire). Ce rythme irrégulier ou arythmie est inadéquat à une contraction efficace des ventricules, interrompant ainsi la circulation systémique.

Les anomalies de la fonction électrique du cœur sont dues principalement à des dysfonctionnements des canaux ioniques à l'origine des courants cardiaques. Ces dysfonctionnements peuvent être d'origine génétique, comme dans le syndrome du QT long congénital, ou acquise, comme dans le cas des cardiomyopathies ischémiques. Les recherches étiologiques montrent qu'environ 80% des morts subites d'origine cardiaque surviennent dans un contexte de pathologie coronarienne, 10-15% dans un contexte de cardiomyopathie (hypertrophique ou dilatée) et 5% des cas sont liés à des anomalies

génétiques des canaux ioniques, à des valvulopathies, des malformations congénitales etc... (Huikuri et coll., 2001).

Dans ces pathologies, l'altération des propriétés électriques, ou remodelage électrique, serait en grande partie liée à une modification de l'expression des gènes codant pour les canaux ioniques (remodelage ionique). Les progrès récents de la biologie moléculaire et de la transgenèse ont permis de disposer de modèles murins pour ces pathologies. L'avantage majeur de la souris est de pouvoir étudier à large échelle les modifications d'expression des gènes codant pour les canaux ioniques. Dans ce modèle, il est aussi possible de caractériser *ex vivo* et *in vivo* les conséquences physiopathologiques du remodelage.

L'implication du remodelage ionique dans la pathogènese des troubles du rythme cardiaques est l'objet de la première partie de cette thèse. Mon travail a consisté à évaluer sur le plan électrophysiologique les conséquences du remodelage ionique dans différents modèles de souris.

De nombreux agents pharmacologiques, à visée cardiaque ou non, sont à l'origine d'allongement de l'intervalle QT et peuvent pour certaines molécules déclencher des arythmies à l'origine de la mort subite. Le canal K<sup>+</sup> dépendant du potentiel hERG a été identifié comme la cible privilégiée de ces agents pharmacologiques. Ainsi, depuis 1997, l'une des recommandations des agences de sécurité du médicament (FDA aux Etats-Unis, EMEA en Europe) est de tester systématiquement les molécules en cours de développement pré-clinique sur le canal hERG. *In vitro*, le pouvoir bloquant d'une molécule est classiquement évalué par la technique de patch-clamp. Fiable et très largement utilisée, cette méthode offre néanmoins un faible débit d'analyse.

L'industrie pharmaceutique s'est donc tournée vers des méthodes d'analyses à haut débit qui présenteraient le même degré de fiabilité que la technique de patch-clamp (patch-clamp automatique, efflux de Rb<sup>+</sup> radioactifs et non radioactifs, sondes fluorescentes détectant les variations de potentiel membranaire...etc.). Mais les résultats obtenus à ce jour sont peu satisfaisants et des améliorations de ces différentes techniques sont encore nécessaires.

La deuxième partie de ma thèse a été consacrée au développement d'une technique d'analyse à haut débit des bloqueurs du canal hERG qui offrirait une fiabilité égale, sinon proche de celle obtenue en patch-clamp conventionnel.

# **INTRODUCTION**

### I. REPOLARISATION VENTRICULAIRE CARDIAQUE

Le fonctionnement de la pompe cardiaque est assuré par l'activation séquentielle de cellules contractiles et excitables hautement spécialisées: les cardiomyocytes. Les propriétés électriques de ces cellules se traduisent par la genèse et la propagation de potentiels d'action.

Un potentiel d'action (PA) est une onde de dépolarisation transitoire de la membrane plasmique, due à la mise en œuvre coordonnée de courants ioniques précis. Au niveau des ventricules, l'organisation spatio-temporelle de ces courants déclenche l'activité contractile des myocytes et permet une modulation de l'intensité des battements et une synchronisation de la contraction des cellules d'une même cavité. La force développée alors par les ventricules propulse le sang dans l'ensemble de l'organisme.

Le PA d'un cardiomyocyte ventriculaire comporte cinq phases successives:

- une phase rapide de dépolarisation (phase 0) amenant le potentiel membranaire de -80 mV à +30 mV. Cette phase est générée par une augmentation importante et brève de la perméabilité membranaire au Na<sup>+</sup> (I<sub>Na</sub>).
- une phase courte de repolarisation initiale ou précoce (phase 1) résultant de l'inactivation du courant Na<sup>+</sup> et de l'activation d'un courant repolarisant transitoire sortant (I<sub>to</sub>).
- une phase dite de plateau (phase 2) est liée à l'activation de conductances Ca<sup>2+</sup> (I<sub>Ca,L</sub>), Na<sup>+</sup> (I<sub>Na/Ca</sub>, I<sub>Na</sub> retardé et K<sup>+</sup> (I<sub>K</sub>). Au cours de cette phase, le potentiel membranaire est maintenu à une valeur proche de 0 mV.
- la phase terminale de repolarisation ou phase 3 intervient suite à l'inactivation du courant I<sub>Ca,L</sub> et à l'augmentation progressive des perméabilités K<sup>+</sup> I<sub>κ</sub> et I<sub>κ1</sub>.
- au cours de la phase 4 le potentiel membranaire ou potentiel diastolique est maintenu à -80 mV grâce au courant I<sub>K1</sub>. Dans le cas des cardiomyocytes des tissus de conduction, d'autres conductances entrent en jeu et vont s'opposer à l'effet hyperpolarisant d'I<sub>K1</sub> en générant une lente dépolarisation du potentiel membranaire. Ces courants correspondent au courant de fond net entrant I<sub>bg</sub> (bg=background) lié à l'activité des différentes pompes et échangeurs membranaires, au courant de pacemaker I<sub>f</sub> et au courant I<sub>Ca,T</sub>.

Dans ce travail, nous nous intéresserons aux courants ioniques participant aux différentes phases de la repolarisation ventriculaire. Dans une première partie, nous verrons le rôle physiologique et les bases moléculaires impliquées dans la genèse de ces courants. Une seconde partie sera consacrée au remodelage électrique associé aux troubles de la repolarisation.



Figure 1: Représentation des principaux courants ioniques participant au PA ventriculaire humain et murin. D'après Nerbonne et coll. (2001)

#### I.A MÉCANISMES IONIQUES DU POTENTIEL D'ACTION VENTRICULAIRE

#### I.A.1 La phase de dépolarisation : PHASE 0

#### I.A.1.a Le courant I<sub>Na</sub>

Le courant Na<sup>+</sup> ou I<sub>Na</sub> est le courant responsable de la phase 0 du PA de la cellule ventriculaire. C'est un courant entrant rapide activé par la dépolarisation de la membrane (seuil d'activation –55 mV environ). Il atteint une densité maximale pour un potentiel membranaire de –40 mV. Un mécanisme de rétrocontrôle positif est à l'origine de l'activation quasi-instantanée de la phase 0 du PA: la dépolarisation induite par l'entrée d'ions Na<sup>+</sup> augmente la probabilité d'ouverture des canaux Na<sup>+</sup>, ce qui augmente le niveau de dépolarisation et auto-entretient le phénomène.

Une caractéristique importante de ce courant est l'existence d'une inactivation rapide dépendante du potentiel ce qui favorise l'initiation de la phase précoce de la repolarisation.

#### I.A.2 La phase de repolarisation précoce : PHASE 1

L'aspect en encoche, ou "spike and dome" du PA est associé au courant  $I_{to}$  (pour "transient outward") (Antzelevitch and coll., 1991). Ce courant est formé d'une composante K<sup>+</sup> ( $I_{to1}$ ) sensible à la 4-aminopyridine (4-AP) et d'une composante portée par les ions Cl<sup>-</sup> qui dépend des variations de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire ( $I_{to2}$ ) (Coraboeuf et Carmeliet, 1982). Le courant  $I_{to}$  est, contrairement à l'Homme et au chien, le courant majoritaire de la repolarisation chez la souris (Xu et coll., 1999). En effet, chez l'Homme et le chien, la repolarisation est fortement dépendante de  $I_{Kr}$  et  $I_{Ks}$  alors que dans le ventricule de la souris adulte ces deux courants ne sont pas détectés (Lees-Miller et coll., 2003; Kupershmidt et coll., 1999).

De nombreuses études de caractérisations pharmacologiques et biophysiques de  $I_{to1}$  ont permis de mettre en évidence deux cinétiques distinctes. Ainsi, dans le ventricule de souris adulte, la composante transitoire  $I_{to,fast}$  ( $I_{to,f}$ ) et la composante  $I_{to,slow}$  ( $I_{to,s}$ ) ont été décrites.  $I_{to,f}$ présente une activation, une inactivation et une levée d'inactivation rapides (Xu et coll.,1999) et est bloqué spécifiquement par des toxines extraites d'un venin d'araignée, Heteropoda toxin-2 et 3 (Sanguinetti et coll., 1997).  $I_{to,s}$  présente une inactivation et une levée d'inactivation lentes. Sa distribution au sein du ventricule est différente de celle d' $I_{to,f}$  puisqu'il est retrouvé uniquement au niveau du septum (Xu et coll., 1999) alors que la composante rapide est détectée dans l'apex et le septum. Ainsi, les propriétés cinétiques et la régionalisation d' $I_{to,f}$  expliquent la contribution majeure de ce courant à la repolarisation précoce et au contrôle de la durée du PA chez la souris. Cette distribution hétérogène des deux composantes n'est pas propre à la souris et contribue chez de nombreuses espèces à l'hétérogénéité de la repolarisation (*cf.* § I.A.7.b). Ainsi chez l'Homme, il est observé une variation de la durée du PA ventriculaire associée à une différence de la densité et des cinétiques de  $I_{to1}$  dans les cellules sous-endocardiques par rapport aux cellules sous-épicardiques (Nabauer et coll., 1996). Chez le chien, la densité d' $I_{to,f}$  est 5 à 6 fois plus élevée dans les couches cellulaires sous-épicardique et mid-myocardique que dans la couche cellulaire sous-endocardique, alors que la densité de  $I_{to,s}$  est plus importante dans le sous-endocarde que dans le sous-épicarde (Liu et coll., 1993). Nous verrons par la suite les bases moléculaires de cette régionalisation des deux composantes d' $I_{to1}$ .

#### I.A.3 La phase de plateau: PHASE 2

#### I.A.3.a Le courant Na<sup>+</sup> retardé (I<sub>Na</sub> retardé)

Au cours de la phase de plateau, il subsiste un petit courant Na<sup>+</sup> qui participe au maintien d'une légère dépolarisation. L'existence de ce petit courant est liée à l'inactivation dépendante du potentiel du courant Na<sup>+</sup>. En effet, la cinétique d'inactivation de I<sub>Na</sub> ( $\tau_{inactivation}$ =10 à 15 ms) étant plus lente que sa cinétique d'activation ( $\tau_{activation}$ =1 ms), une faible fraction de canaux Na<sup>+</sup> restent ouverts pendant la phase de plateau du PA. Ce courant nommé courant de fenêtre (Attwell et coll., 1979) représente 1 à 2 % du courant Na<sup>+</sup> participant à la dépolarisation initiale (Noble, 1962).

En 1979, Coraboeuf et coll. ont montré que la phase de plateau du PA des fibres de Purkinje de chien est contrairement à la phase 0 du PA sensible à la tétrodotoxine (TTX) (Coraboeuf et coll., 1979). Dans leur étude, ces auteurs ont suggéré l'existence d'une conductance Na<sup>+</sup> de fond présentant une inactivation différente de I<sub>Na</sub>. Des enregistrements en configuration "inside-out" et "whole-cell", à partir de cellules ventriculaires de cobaye ont permis de mettre en évidence la présence d'un courant Na<sup>+</sup> pour des potentiels différents de ceux permettant l'activation du courant de fenêtre (Sakmann, 2000). Ce courant Na<sup>+</sup> retardé a en effet pu être mesuré pour des potentiels positifs, i.e pour des potentiels où selon le modèle prédictif de Hodgkin et Huxley I<sub>Na</sub> devrait normalement être nul (Noble et Noble, 2006). Le courant Na<sup>+</sup> retardé présenterait donc deux composantes: la première est liée au courant de fenêtre I<sub>Na</sub> et la seconde nommée I<sub>p</sub>Na (p pour "persistent") a été mise en évidence expérimentalement pour la première fois au niveau des fibres de Purkinje de chien et de lapin, dont le PA est plus sensible à la TTX que les PA des faisceaux de His ou du myocarde contractile (Gintant et coll., 1984 ;Carmeliet, 1987). I<sub>p</sub>Na a également été détecté au niveau des cardiomyocytes ventriculaires de rat (Patlak et Ortiz, 1985) mais aussi dans des cardiomyocytes

ventriculaires humains de cœurs sains (Maltsev et coll., 1998). Mais c'est surtout en condition physiopathologique et notamment dans les cœurs insuffisants, où il est surexprimé, qu'il a été le plus étudié (Undrovinas et coll., 2002). Le courant I<sub>P</sub>Na est modulé par les acides gras (Undrovinas et coll., 1992). Ces effets sur la durée du PA et l'hétérogénéité de son expression au sein du ventricule en font un acteur potentiel de la modulation de l'excitabilité des myocytes ventriculaires (Salata et coll., 1988; Sakmann et coll., 2000). Le courant retardé Na<sup>+</sup> joue un rôle important dans le repolarisation. En effet, il a été montré que ce courant participe à la durée plus longue du PA des cellules M chez le chien et contribue ainsi à l'hétérogénéité de la repolarisation au sein de la paroi ventriculaire (Zygmunt et coll., 2001). De même, des altérations de ce courant peuvent être à l'origine de troubles graves de la repolarisation comme le syndrome de QT long (Bennett et coll., 1995).

#### I.A.3.b Les courants Ca2+

Deux types de courants Ca<sup>2+</sup> ont été identifiés dans le myocarde ventriculaire: le courant Ca<sup>2+</sup> de type L (pour "long lasting"), I<sub>Ca,L</sub>, et le courant Ca<sup>2+</sup> de type T (pour "transient"), I<sub>Ca,T</sub>. Dans le ventricule adulte, I<sub>Ca,T</sub> est retrouvé uniquement au niveau des cellules de conduction du réseau de Purkinje et n'a été observé dans le myocarde ventriculaire que dans des modèles animaux d'hypertrophie (Nuss et Houser, 1993; Martinez et coll., 1999). Dans un modèle d'hypertrophie droite induite par la monocrotaline chez le rat, la ré-expression fonctionnelle de I<sub>Ca,T</sub> participe au remodelage du couplage excitation-contraction (Takebayashi et coll., 2006). La présence de ce courant dans les cardiomyopathies hypertrophiques serait liée à la ré-expression du programme fœtal. I<sub>Ca,T</sub> jouerait en effet un rôle prépondérant au cours du développement cardiaque. Il est détecté au cours du développement embryonnaire chez la souris, le rat et l'Homme (Bkaily et coll., 1992; Cribbs et coll., 2001; Ferron et coll., 2002) où il participe au niveau ventriculaire aux mécanismes de division cellulaire (Guo et coll., 1998).

Le courant Ca<sup>2+</sup> majoritaire des myocytes ventriculaires est I<sub>Ca,L</sub>. Son rôle principal est de permettre une entrée majeure de Ca<sup>2+</sup> durant la phase 2. Ce Ca<sup>2+</sup> entrant est l'élément initiateur du couplage excitation-contraction puisqu'il va déclencher la libération massive du Ca<sup>2+</sup> stocké dans le réticulum sarcosplasmique (RS) par le mécanisme de "Calcium Induced Calcium Release" (CICR) (Fabiato et Fabiato, 1978). L'augmentation de la concentration calcique intracellulaire provoque l'activation des protéines contractiles et déclenche la contraction. La stimulation  $\beta$ -adrénergique agit positivement sur ce mécanisme de CICR en induisant une augmentation d'I<sub>Ca,L</sub> par phosphorylation. Cette régulation positive du courant participe aussi au maintien du plateau.

Les cinétiques d'activation et d'inactivation de ce courant sont relativement lentes. Il s'active pour des potentiels membranaires peu négatifs (-40 mV) et participe au maintien du plateau du PA. L'inactivation de ce courant est dépendante du potentiel et de la concentration en Ca<sup>2+</sup> intracellulaire. La régulation par le Ca<sup>2+</sup> intracellulaire est modulée de façon indirecte par la fixation de la calmoduline sur l'extrémité C terminale du canal (Zühlke et coll., 1999). Ainsi, la sortie progressive du Ca<sup>2+</sup> du RS va participer à l'inactivation du courant (Sipido et coll., 1995) ce qui va limiter l'entrée du Ca<sup>2+</sup> au cours du plateau et précipiter la repolarisation membranaire.

Dans les cellules ventriculaires de rat et de cobaye, un courant Ca<sup>2+</sup> atypique a été décrit. Ce courant est bloqué par la TTX et les canaux responsables sont perméables à la fois au Ca<sup>2+</sup> et au Na<sup>+</sup>. Ils présentent cependant des cinétiques et des perméabilités différentes des canaux Na<sup>+</sup> classiques et des canaux Ca<sup>2+</sup> de type L et T (Aggarwal et coll., 1997). Certains auteurs suggèrent que ce courant serait engendré par une sous-population de canaux Na<sup>+</sup> dont la sélectivité serait altérée (Guatimosin et coll., 2001). En effet, en absence de Na<sup>+</sup> extracellulaire, il a été montré que lors d'une stimulation  $\beta$ -adrénergique les canaux Na<sup>+</sup> pouvaient devenir perméables au Ca<sup>2+</sup> (Santana et coll., 1998). A l'heure actuelle, aucune participation de I<sub>Ca,TTX</sub> au couplage excitation-contraction n'a pu être mise en évidence.

#### I.A.3.c Le courant d'échange Na/Ca

 $I_{Na/Ca}$  résulte de l'activité d'un transporteur qui assure l'échange réversible et électrogénique de trois ions Na<sup>+</sup> pour un ion Ca<sup>2+</sup> (Hinata et coll., 2002). Au cours de cet échange, les ions ne sont pas transportés simultanément mais séquentiellement (Niggli et Lederer, 1991). La source d'énergie utilisée pour générer ce courant d'échange est le gradient de concentration sodique crée par la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>. Cet échange dépend aussi du potentiel membranaire et des concentrations en Na<sup>+</sup> et en Ca<sup>2+</sup> de part et d'autre de la membrane plasmique (Blaustein et Lederer, 1999). Ainsi, en tout début de phase 2, la forte concentration de Na<sup>+</sup> va favoriser l'entrée de Ca<sup>2+</sup> ce qui se traduit en terme de courant par un I<sub>Na/Ca</sub> sortant. En revanche, au cours du plateau l'augmentation progressive du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire va favoriser l'extrusion du Ca<sup>2+</sup> hors de la cellule et un important I<sub>Na/Ca</sub> entrant est alors mesuré. Ce courant entrant s'oppose avec I<sub>Ca,L</sub> à la repolarisation cellulaire et donc favorise le maintien du plateau.

#### I.A.4 La phase de repolarisation tardive: PHASE 3

#### I.A.4.a Les courants K<sup>+</sup> retardés

Le courant K<sup>+</sup> retardé ou I<sub>K</sub> est un facteur déterminant de la durée du PA (Noble et Tsien, 1969). Son activation très lente par rapport aux autres courants et son absence en début de PA contribuent à l'existence du plateau. Ce courant est la résultante de deux composantes principales: une composante rapide I<sub>Kr</sub> et une composante lente I<sub>Ks</sub> (Li et coll., 1996). Ces courants ont été distingués sur la base de leurs propriétés biophysiques et pharmacologiques (Sanguinetti et Jurkiewicz, 1990).

- I<sub>Kr</sub> est la composante sensible à l'agent pharmacologique E-4031. Ce courant s'active rapidement à partir de 50 mV et atteint une valeur maximale pour un potentiel de 0 mV. Pour des dépolarisations plus importantes, I<sub>Kr</sub> diminue et la pente de la courbe courant-potentiel devient négative. Ce phénomène de rectification entrante résulte d'un processus d'inactivation rapide du canal qui sera discuté plus loin dans ce travail. I<sub>Kr</sub> est sensible au K<sup>+</sup> extracellulaire et il est bloqué par un grand nombre de molécules (Escande , 2000).
- I<sub>Ks</sub> s'active pour un potentiel membranaire moins négatif que celui d' I<sub>Kr</sub> (-30 mV). Son activation est lente (de l'ordre de la seconde) et incomplète au cours du PA. En outre, il ne s'inactive pas, c'est un courant rectifiant sortant. Ce courant est sensible à la stimulation β-adrénergique. La phosphorylation par la proteine Kinase A (PKA) augmente I<sub>Ks</sub> ce qui va limiter l'allongement de la durée du plateau provoquée par la stimulation β-adrénergique sur I<sub>Ca,L</sub> (Yang et coll., 1997b; Washizuka et coll., 1997). En système de ré-expression hétérologue, ce courant est sensible au chromanol 293B (Loussouarn et coll., 1997). Chez l'Homme et le cobaye, ce composé bloque le courant natif I<sub>Ks</sub> et induit un allongement de la durée du PA (Bosch et coll., 1998).

Chez les rongeurs,  $I_{Kr}$  et  $I_{Ks}$  ne sont pas les courants majeurs de la repolarisation ventriculaire. En effet, chez le rat ou la souris, une autre composante s'activant rapidement mais s'inactivant très lentement est décrite. Chez la souris adulte, par exemple, cette composante est formée de trois courants distingués sur la base de leurs cinétiques et de leur pharmacologie:  $I_{K,slow1}$ ,  $I_{K,slow2}$  et  $I_{ss}$  (Zhou et coll., 1998a; London et coll., 1998). La première composante ou  $I_{K,slow1}$  est sensible à la 4-AP et présente des propriétés biophysiques similaires à celles du courant  $I_{Kur}$ . Le courant  $I_{Kur}$  (pour "ultrarapid") est un courant s'activant rapidement et s'inactivant lentement (Snyders et coll., 1993). Il est sensible à la 4-AP et est présent uniquement à l'étage auriculaire chez l'Homme et le chien (Li et coll., 1996). Les similarités cinétiques et pharmacologiques entre le courant  $I_{K,slow1}$  ventriculaire de souris et le

courant  $I_{Kur}$  auriculaire sont en faveur d'une base moléculaire commune pour ces deux courants.

 $I_{K,slow2}$  s'inactive plus lentement qu' $I_{K,slow1}$  et est sensible au tétraéthylammonium (TEA). Le courant  $I_{ss}$  ("steady-state") qui s'active très lentement et ne s'inactive pas est un petit courant K<sup>+</sup> dont la nature exacte n'est pas encore connue.

#### I.A.4.b Les courants K<sup>+</sup> rectifiants entrants

Il existe dans le cœur trois principaux courants K<sup>+</sup> rectifiants entrants:  $I_{K1}$ ,  $I_{K,ATP}$  et  $I_{K,ach}$ .

La rectification entrante consiste en un courant plus important dans le sens entrant que dans le sens sortant pour une même variation de potentiel de membrane. Contrairement aux autres courants K<sup>+</sup> décrits précédemment, l'activation de ces courants n'est pas dépendante du potentiel.

- I<sub>K1</sub> participe à la phase 3 de la repolarisation mais c'est aussi le courant essentiel au maintien du potentiel de repos des cellules ventriculaires. Il stabilise le potentiel de repos à une valeur proche du potentiel d'équilibre du K<sup>+</sup> E<sub>K</sub>. Si une légère tendance à la dépolarisation ou à l'hyperpolarisation se manifeste, la forte perméabilité au K<sup>+</sup> due à I<sub>K1</sub> ramène le potentiel membranaire vers E<sub>K</sub>. Sa rectification entrante apparaît pour des potentiels positifs mais n'est pas liée à un processus d'inactivation. Elle correspond à une inhibition du courant par le Mg<sup>2+</sup> (Vanderberg, 1987) et les polyamines (Lopatin et coll., 1994) intracellulaires. Cette diminution du courant favorise les effets dépolarisants de I<sub>Na</sub> et donc la genèse d'un nouveau PA. Sa conductance unitaire varie entre 25 et 55 pS selon les espèces (Satoh, 1998; Veldkamp et coll., 1999; Nagashima et coll., 1996). Il est sensible au Ba<sup>2+</sup> extracellulaire et au Cs<sup>+</sup> intracellulaire.
- I<sub>K,ATP</sub> est régulé par l'ATP intracellulaire. Aux concentrations physiologiques, l'ATP inhibe le courant. En condition hypoxique ou d'inhibition métabolique, l'inhibition d' I<sub>K,ATP</sub> est levée et l'augmentation de la conductance K<sup>+</sup> générée induit un raccourcissement de la durée du PA. Ce mécanisme est observé dans le cœur ischémique (Knopp et coll., 1999) et permet de limiter les contractions cardiaques et donc la consommation d'ATP associée (Noma, 1983). I<sub>K,ATP</sub> réduit ainsi les lésions ischémiques en retardant la mort cellulaire (Lazdunski et coll., 1994). Sa densité dans le cœur est relativement élevée (Fujita et coll., 2000) et il est bloqué par le glibenclamide. Sa conductance unitaire est de l'ordre de 70 pS (Wu et coll., 2000).

 I<sub>K,ach</sub> a principalement été décrit dans le myocarde auriculaire et dans le nœud sinusal. Ce courant est néanmoins présent dans le ventricule mais à plus faible densité. Il est activé par la libération d'acétylcholine au niveau des terminaisons nerveuses du système parasympathique. La stimulation des récepteurs muscariniques M2 provoque l'activation du courant par l'intermédiaire d'une interaction directe avec les sous-unités βγ des protéines G (Wickman et coll., 1994). Sa conductance unitaire est d'environ 45 pS.

#### I.A.5 Le potentiel diastolique: PHASE 4

Le niveau basal du potentiel membranaire d'une cellule cardiaque est appelé potentiel de repos ou potentiel diastolique. Il résulte d'une différence de potentiel entre l'intérieur de la cellule, chargé négativement et l'extérieur, chargé positivement. Ce potentiel est le reflet de la différence des concentrations ioniques de part et d'autre de la membrane et de la perméabilité sélective de la membrane aux différentes espèces ioniques en présence.

La perméabilité potassique des myocytes ventriculaires contractiles est au repos 50 fois plus élevée que la perméabilité aux autres ions. Elle est assurée par le courant I<sub>K1</sub> mais dépend aussi d'un autre mécanisme actif: la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>. Cette pompe est une ATPase qui transporte contre leur gradient trois ions Na<sup>+</sup> vers l'extérieur et fait rentrer deux ions K<sup>+</sup>. C'est un transport électrogénique qui fonctionne toujours dans le même sens quelque soit le potentiel. La résultante de l'activité de la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> est un petit courant sortant qui participe à l'hyperpolarisation membranaire et qui est totalement inhibé par la strophanthidine (Gadsby et Nakao, 1989). Toute modification du rapport des concentrations en K<sup>+</sup> intracellulaire et extracellulaire, par exemple lors d'une ischémie, est susceptible de modifier le potentiel de repos (Whalley et coll., 1995).

Le potentiel diastolique des cellules automatiques du réseau de Purkinje et des faisceaux de His est caractérisé par une dépolarisation lente du potentiel membranaire. Ce phénomène actif est lié à l'activation de trois conductances différentes:

un courant de fond net entrant ou courant dit de "background" I<sub>bg</sub> qui présente deux composantes I<sub>bNa</sub> et I<sub>bCa</sub>. I<sub>bNa</sub> n'est pas sensible à la TTX et est indépendant du potentiel (Spindler et coll., 1998). Il participe à l'homeostasie du Na<sup>+</sup> et à la contraction cellulaire (Eisner, 1990). A ce jour, aucune origine moléculaire n'a pu être mise en évidence pour ce courant. Certains auteurs ont cependant suggéré qu'il résulterait de l'activité de la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> et de l'échangeur Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (Artigas et Gadsby, 2004; Hilgemann, 2004). I<sub>bCa</sub> est en partie porté par I<sub>Ca,L</sub>, le courant d'échange Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> et la pompe Ca<sup>2+</sup>-ATPase mais également par un autre

courant Ca<sup>2+</sup> activé par l'hyperpolarisation (Kupittayanant et coll., 2006). L'origine moléculaire de cette troisième composante est inconnue. Certains auteurs ont montré l'existence d'un courant Ca<sup>2+</sup> de type B (B pour "Background") activé par la chlorpromazine (Coulombe et coll., 1989; Lefevre et coll., 1995) et qui résulterait de l'activité de la pompe Ca<sup>2+</sup> ATPase (Antoine et coll., 2001; Pinet et coll., 2002). D'autres ont suggéré que ce courant pourrait dépendre également du courant Ca<sup>2+</sup> activé par l'étirement membranaire (Park et coll., 2002) et/ou du courant cationique non spécifique (Colquhoun et coll., 1981; Ehara et coll., 1988; Zygmunt et coll., 1998). Ce courant de fond existe aussi dans les cardiomyocytes contractiles mais est masqué par I<sub>K1</sub>. En effet, chez l'Homme et le lapin, la densité d'I<sub>K1</sub> est réduite dans les cellules de Purkinje par rapport au myocarde contractile (Han et coll., 2002; Cordeiro et coll., 1998).

- le courant de "pacemaker" l<sub>f</sub> qui est activé lors d'une hyperpolarisation (Brown et coll., 1979; 1986). Il est porté par les ions Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup> mais conduit préférentiellement les ions K<sup>+</sup>. Il est bloqué par le Cs<sup>+</sup> et sa conductance unitaire est estimé à 0.98 pS en présence de 70 mM K<sup>+</sup>. L'activation de ce courant est fortement modulée par l'AMP<sub>c</sub> intracellulaire (DiFrancesco et Tortora, 1991) et dépend aussi de la phosphorylation par la PKA (Chang et coll., 1991).
- le courant Ca<sup>2+</sup> de type T, I<sub>Ca,T</sub>, qui n'est pas présent dans les cardiomyocytes contractiles (*cf.* § I.A.3.b) (Tseng et Boyden, 1989), joue un rôle très important dans la régulation de la pente diastolique des cellules automatiques. En effet, l'inhibition de ce courant est à l'origine d'un ralentissement important de la pente de dépolarisation diastolique (Zhou et Lipsius, 1994).

## I.A.6 La période réfractaire

Au cours de la repolarisation, et ce, dès la fin de la phase 0 du PA, le tissu cardiaque n'est pas ou peu excitable. Cette période dite période réfractaire est capitale au bon fonctionnement du cœur car elle permet la relaxation complète du muscle cardiaque avant toute nouvelle activation. Deux types de périodes réfractaires sont classiquement distingués (Tomasseli et Roden, 2005):

 la période réfractaire absolue commence juste après la phase 0 et se prolonge au cours de la phase de plateau du PA. Au cours de cette période, les cardiomyocytes sont totalement réfractaires à une nouvelle stimulation et aucune dépolarisation membranaire ne se produit.  la période réfractaire relative est liée à la phase 3 du PA. Les cardiomyocytes peuvent répondre à un stimulus puissant et un nouveau PA peut être déclenché alors que la phase de repolarisation du PA précédent n'est pas achevée.

L'existence de la période réfractaire est liée à l'inactivation du courant Na<sup>+</sup> qui est complète au cours de la phase de plateau et partielle au cours de la phase 3. Durant la phase terminale de la repolarisation, l'activation des conductances K<sup>+</sup> permet un retour du potentiel membranaire vers des potentiels plus négatifs ce qui favorise la levée d'inactivation de I<sub>Na</sub>. Cette ré-activation de I<sub>Na</sub> pourrait déclencher une nouvelle dépolarisation, or, l'augmentation d'I<sub>k1</sub> va éloigner le potentiel de membrane du seuil de déclenchement du PA. Ce mécanisme permet de protéger le cœur contre le déclenchement de battements supplémentaires liés à des réactivations précoces du myocarde comme dans le cas des troubles du rythme ventriculaires. Dans certaines conditions et dans certaines régions cardiaques, ce mécanisme protecteur peut être défaillant. Ainsi, les cellules des fibres de Purkinje présentent une excitabilité dite supranormale (Spear et Moore, 1974). Dans ces cellules, l'existence d'une courte période au cours de laquelle le potentiel membranaire est plus proche du seuil d'activation de I<sub>Na</sub> que du potentiel de repos permet une ré-activation précoce de I<sub>Na</sub>. Cette caractéristique des fibres de Purkinje participe à l'hétérogénéité de la repolarisation au sein du myocarde et constitue une source importante d'arythmies par réentrées.

### I.A.7 Origines de l'hétérogénéité de la repolarisation ventriculaire

L'hétérogénéité de la repolarisation ventriculaire se manifeste à différents niveaux. Elle peut dépendre du type cellulaire. Les ventricules sont en effet constitués de deux types de cellules impliquées dans la fonction contractile: les cellules cardionectrices des fibres de Purkinje et des faisceaux de His et les cardiomyocytes contractiles. Les fibres de Purkinje sont responsables de la propagation rapide de l'influx électrique du nœud auriculo-ventriculaire vers les ventricules. Ce sont des cellules spécialisées qui présentent un PA aux caractéristiques différentes des cellules contractiles.

L'hétérogénéité de la repolarisation se manifeste aussi dans la différence de morphologie des PA au travers de la paroi du myocarde et/ou de l'axe apico-basal.

#### I.A.7.a Hétérogénéité cellulaire: fibres de Purkinje et myocarde contractile

Le PA des fibres de Purkinje présente de nombreuses caractéristiques qui le distinguent du PA des cardiomyocytes contractiles (dont les mécanismes ioniques ont été décrits dans les paragraphes précédents). Le potentiel membranaire des fibres de Purkinje (environ –90 mV)

est plus négatif que le potentiel membranaire des ventricules. De plus, il se caractérise par une pente de dépolarisation diastolique (cf. § I.A.5) qui est à la base de l'activité automatique de ces cellules (Hauswirth, 1968; Anumonwo et coll., 2001). La phase de plateau du PA des fibres de Purkinje se produit pour des potentiels négatifs alors que celle des ventricules est relativement positive (Han et coll., 2002). Chez le lapin, il a été montré que les cellules de Purkinje présente une phase 1 de repolarisation plus proéminente que celle des cardiomyocytes contractiles. Cette différence serait liée à un courant Ito plus important dans les cellules de Purkinje par rapport aux autres cellules ventriculaires (Cordeiro et coll., 1998). Dans cette même étude, la phase de plateau du PA des cellules de Purkinje est observée pour des potentiels plus négatifs que pour les cardiomyocytes ventriculaires. Cette observation est en corrélation avec les amplitudes des courants K<sup>+</sup> rectifiants retardés et de  $I_{K1}$  plus faibles dans les cellules de Purkinje par rapport aux myocytes contractiles. Une autre différence entre les deux types cellulaires est que pour des fréquences cardiagues faibles, la durée du PA des fibres de Purkinje augmente plus que celle des ventricules (Moore et coll., 1965). Cette propriété peut favoriser les réactivations précoces de I<sub>Na</sub> (cf. § I.A.6) et expliquer la contribution majeure des cellules de Purkinje dans la genèse des post-dépolarisations précoces et des troubles du rythme associés (Nattel et Quantz, 1988).

#### I.A.7.b Hétérogénéité transmurale et apico-basale

La paroi ventriculaire se subdivise en trois couches cellulaires: les cellules sousépicardiques, les cellules midmyocardiques et les cellules sous-endocardiques. Ces trois couches se distinguent à l'allure de leur PA. Ainsi, le PA des cellules sous-épicardiques se caractérise par un aspect en encoche ou "spike and dome" marqué par rapport aux cellules des couches midmyocardiques et sous-endocardiques. Cette morphologie particulière du PA diminue progressivement de l'épicarde vers l'endocarde et n'est pas observée au niveau des cellules sous-endocardiques (figure 2). Cette différence entre les différentes couches du myocarde ventriculaire est due principalement à la densité du courant K<sup>+</sup> I<sub>to</sub> (Antzelevitch et coll., 1991; Wettwer et coll., 1994). Ce courant est en effet moins important au niveau du midmyocarde et quasiment absent dans les cellules sous-endocardiques. Au niveau de l'endocarde, l'encoche du PA a complètement disparu et la phase 2 du PA sousendocardique présente une pente négative. Il existe donc un gradient transmural de repolarisation au sein du myocarde ventriculaire.

Les cellules du midmyocarde ou cellules M, jouent un rôle crucial dans l'hétérogénéité de la repolarisation. Dans ces cellules, la durée plus longue de la repolarisation est due à une faible densité du courant  $I_{Ks}$  et à la présence relativement importante du courant d'échange Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> et de  $I_{Na,late}$  par rapport aux cellules sous-endocardiques et sous-épicardiques (Liu

et coll., 1993). Ces conditions expliquent la grande sensibilité de la repolarisation des cellules M aux agents pharmacologiques comme la quinidine. En effet, de faibles concentrations de quinidine vont préférentiellement allonger le PA des cellules M en bloquant principalement le courant I<sub>Kr</sub> (courant K<sup>+</sup> majoritaire des cellules M). A de plus fortes concentrations, la dispersion de la repolarisation entre les différentes couches est atténuée car la quinidine bloque également les courants I<sub>ks</sub> et I<sub>Na</sub> (Antzelevitch et coll., 1999). La différence transmurale de la densité de l<sub>Ks</sub> est, chez l'Homme, liée à une expression différentielle des différentes isoformes du canal KvLQT1. En effet, dans le myocarde humain, l'isoforme 2, dominante-négative, de KvLQT1 représente dans le mid-myocarde, près de 32 % des ARNm totaux (isoforme1+isoforme2) codant pour le canal alors qu'elle ne représente que 25 % des ARN codant pour KvLQT1 dans les couches sous-épicardiques et sousendocardiques. Lorsque le ratio isoforme1/isoforme2 correspondant au midmyocarde est reproduit dans un système de ré-expression hétérologue, il en résulte une réduction de 75 % du courant  $I_{Ks}$  par rapport au courant obtenu avec les ratios correspondant aux tissus épicardiques et endocardiques (Péréon et coll., 2000). Ces résultats suggèrent qu'une expression différentielle de l'isoforme 2 de KvLQT1 est à l'origine des différentes densités du courant I<sub>Ks</sub> à travers la paroi du cœur.

Une hétérogénéité électrique a également été observée le long de l'axe apico-basal. Ainsi, chez le chien, les cardiomyocytes de la base du cœur présentent un PA relativement plus long que les cardiomyocytes de la partie basale du ventricule gauche (Szentadrassy et coll., 2005). Chez le lapin, le phénomène inverse est observé. La durée plus courte du PA est liée à un courant  $I_{Ks}$  important par rapport aux cellules de l'apex où seul  $I_{Kr}$  est observé (Cheng et coll., 1999).



Figure 2: Hétérogénéité transmurale de la repolarisation ventriculaire

#### I.B BASES MOLÉCULAIRES DES COURANTS IONIQUES

Les courants ioniques décrits précédemment sont la résultante de mouvements de charges (sous forme d'ions) de part et d'autre de la membrane plasmique. Plusieurs types de structures sont responsables de la perméabilité ionique des myocytes: les pompes, les échangeurs et les canaux ioniques. Les canaux ioniques constituent des éléments essentiels de la signalisation électrique. Ce sont des protéines enchâssées dans la bicouche lipidique qui assurent de façon sélective la diffusion d'ions en fonction du gradient électrochimique transmembranaire

Il existe une grande diversité structurale et mécanistique au sein des canaux ioniques, chacun ayant des propriétés biophysiques et des sensibilités aux agents pharmacologiques spécifiques. Il est d'usage de les classifier selon la nature des ions qu'ils conduisent, puis de les différencier, au sein des superfamilles ainsi définies, selon leur structure (figure 3).



Figure 3: Relation évolutive supposée entre les différentes familles de canaux

La superfamille des canaux à boucle P se subdivise en cinq sous familles: les canaux Na<sup>+</sup> (Nav), K<sup>+</sup> (Kv) et Ca<sup>2+</sup> (Cav) sensibles à la différence de potentiel transmembranaire, les canaux K<sup>+</sup> à deux boucles P, et les canaux K<sup>+</sup> à rectification entrante (Kir "inward rectifier"). Leur structure générale est relativement conservée d'un type à l'autre. Elle dérive d'une

structure commune formée de deux hélices  $\alpha$  transmembranaires reliées par une boucle extracellulaire formant le pore du canal. Les deux hélices  $\alpha$  riches en acides aminés hydrophobes assurent l'ancrage de la protéine au sein de la bicouche lipidique. Ce motif élémentaire associé en tétramère correspond à la structure des canaux Kir. Les canaux K<sup>+</sup> dépendant du potentiel ou Kv présentent aussi ce type d'organisation mais l'unité pore  $\alpha$ résulte de l'association en tétramère de quatre sous-unités indépendantes à 6 segments transmembranaires (notés de S1 à S6) chacune pouvant être identique ou différente. Contrairement aux canaux K<sup>+</sup>, la sous-unité  $\alpha$  des canaux Na<sup>+</sup> et Ca<sup>2+</sup> correspond au repliement d'une seule et même protéine qui est constituée de quatre domaines (DI à DIV) de 6 segments transmembranaires chacun. Ces segments, ou hélices  $\alpha$ , sont reliés entre eux à la face interne de la membrane par une boucle entièrement cytoplasmique. Les sous unités  $\alpha$  des canaux dépendant du potentiel sont associées à des sous-unités auxiliaires  $\beta$ (figure 4). Ces sous unités modulent l'activité du canal en agissant soit sur l'expression du canal à la membrane, soit en modulant les propriétés cinétiques du courant.



Figure 4: Assemblage moléculaire des sous-unités  $\alpha$  des canaux Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> dépendant du potentiel (Kv) et K<sup>+</sup> à rectification entrante (Kir) et leur insertion au sein de la bicouche lipidique: Haut: la sous-unité  $\alpha$  des canaux Cav (et Nav) correspond au repliement d'une unique protéine à quatre domaines (I à IV) tandis que la sous unité des Kv et Kir dépend de l'association en tétramère de sous unités différentes. Bas: représentation schématique de l'insertion des canaux au sein de la bicouche lipidique et de leurs interactions avec des sous unités auxiliaires. D'après Nerbonne et Kaas (2005).

La sous-unité  $\alpha$  des canaux K<sup>+</sup> à deux pores est constituée de quatre segments transmembranaires. Chaque sous-unité comporte une courte extrémité N-terminale

intracellulaire, une large boucle externe entre le premier segment transmembranaire M1 et le premier pore P1, et, une longue partie C-terminale intracellulaire. Les sous-unités  $\alpha$  s'associent en dimère via la boucle externe M1/P1 pour former un canal fonctionnel (Lesage et Lazdunski., 2000).

### I.B.1 Le pore: une structure fondamentale de la perméabilité ionique

L'électrophysiologie, complétée par une approche pharmacologique, ainsi que la génétique moléculaire ont permis d'entrevoir les bases structurales sur lesquelles repose la fonction pore sélective des cations mono- et divalents, principalement dans les cellules des eucaryotes. Elle repose sur les segments S5 (M1) et S6 (M2) et sur la boucle P qui les relie. En 1998, l'équipe de MacKinnon a cristallisé le canal K<sup>+</sup> KcsA de la bactérie *Streptomyces Lividans* (Doyle et coll., 1998). Cette étude cristallographique a permis de mettre à jour pour la première fois la structure d'un canal à boucle P. Son pore est délimité par l'orientation des hélices  $\alpha$  des deux segments transmembranaires M1 et M2 et il est compartimenté en un vestibule externe, un vestibule interne et une cavité centrale aqueuse. Tous ces compartiments sont constitués principalement de résidus hydrophobes. Le pore du canal KcsA est ainsi constitué de la face interne à la face externe (figure 5):

- d'un vestibule rempli d'un milieu aqueux, large conduit rigide de 1.8 nm de long, bordé par les acides aminés hydrophobes des segments M2 et délimité dans sa partie la plus cytosolique par un anneau d'acides aminés porteurs de charges négatives;
- d'une cavité sphérique remplie d'un milieu aqueux, centrée dans la membrane, de 1 nm de diamètre, bordée d'acides aminés hydrophobes et cernée par les quatre dipôles hélicoïdaux qui pointent leur pôle électronégatif vers le centre ce qui permet de diminuer la barrière énérgétique très forte que représente le centre de la membrane plasmique
- d'un conduit étroit, dépourvu quasi totalement d'eau, qui porte la séquence signature GYG des canaux K<sup>+</sup>. Des expériences de mutagenèse dirigée d'acides aminés du pore, réalisées sur le canal potassium Shaker, ont montré que cette séquence GYG est hautement conservée et confère au canal sa sélectivité ionique (Heginbotham et coll., 1992; 1994). Ce conduit forme le pore bordé d'atomes d'oxygène qui permettent une déshydratation des ions K<sup>+</sup>.
- d'un vestibule externe dans lequel débouche le conduit étroit, constitué d'une "tourelle" formée par les extrémités externes des segments M1 et M2, et rempli d'un milieu aqueux.

La cristallisation en 2005 du canal neuronal Kv1.2 a montré que la structure ancestrale du pore de KcsA est fortement conservée des procaryotes aux eucaryotes (Long et coll., 2005a). Ce canal shaker comme tous les canaux Kv est constitué par l'assemblage de 4 sous-unités α identiques. Chaque sous-unité comprend 6 segments transmembranaires divisés en 2 modules fonctionnels distincts. Le premier module S1-S4 détecte les variations de potentiel membranaire et le second S5-S6 forme le pore. Comme dans le canal KcsA, il possède un filtre de sélectivité au K<sup>+</sup> défini par la séquence Thr-Val-Gly-Tyr-Gly. Au sein de chaque sous-unité, les chaînes latérales des résidus thréonine et les atomes d'oxygène des groupes carbonyl des quatre autres résidus du filtre de sélectivité se font face. Les atomes d'oxygène délimitent une zone de faible hydratation qui permet le transport en file indienne des ions K<sup>+</sup> (Doyle et coll., 1998). Du côté intracellulaire, les extrémités C-terminales des segments S6 interagissent pour délimiter le diamètre du pore. A l'état fermé, les 4 hélices s'entrecroisent de sorte à rendre impossible le passage des ions K<sup>+</sup>. Sous l'effet d'une dépolarisation, les hélices s'écartent et ouvrent ainsi le passage (Doyle et coll., 1998). Dans le canal Kv1.2, d'autres séquences, non retrouvées dans le canal KcsA, ont été mises en évidence. Par exemple, la séquence Pro-X-Pro de la face interne du segment S6 est très conservée dans la famille des canaux Shaker des mammifères mais absente dans le canal procarvote. Cette séquence a été identifiée par l'équipe de MacKinnon comme un des éléments du pore qui participe au mécanisme de couplage entre le pore et le "voltagesensor"(Long et coll., 2005b).



Figure 5: Représentation schématique du déplacement des ions K<sup>+</sup> au sein du pore. Les hélices  $\alpha$  et les boucles P délimitent une cavité centrale aqueuse. Les ions se déplacent en "file indienne" et sont stabilisés au sein de la cavité par des interactions électrostatiques établies par les extrémités C-terminales des hélices  $\alpha$ . *D'après Doyle et coll. (1998).* 

Cette modélisation de l'organisation structurale du pore vient appuyer l'hypothèse de Hodgkin et Keynes sur le mécanisme de perméation des ions K<sup>+</sup> (Hodgkin et Keynes, 1955). Leur hypothèse initiale consistait à décrire le déplacement des ions K<sup>+</sup> comme un déplacement en file indienne, à raison de deux ou trois ions par pore. Cette vision est aujourd'hui confirmée au vu des calculs théoriques et de la structure cristallographique du canal KcsA et du canal Kv1.2.

Les canaux Na<sup>+</sup> et Ca<sup>2+</sup> possèdent également des résidus spécifiques du pore qui leur confèrent leur sélectivité ionique.

Dans le cas des canaux  $Ca^{2+}$  dépendant du potentiel, la sélectivité au  $Ca^{2+}$  est associée à quatre résidus glutamate (motif EEEE), un dans chacune des régions P des domaines I à IV de la sous-unité  $\alpha$  (Yang et coll., 1993). Les canaux Na<sup>+</sup> possèdent également un filtre de sélectivité, la séquence DEKA (asp-glu-lys-ala). La lysine du domaine III du canal semble être un résidu critique, conférant au canal son imperméabilité au  $Ca^{2+}$  et sa perméabilité sélective au Na<sup>+</sup> (Favre et coll., 1996).

I.B.2 Le "voltage-sensor": base moléculaire de la sensibilité aux variations de potentiel.

#### I.B.2.a Le segment S4

Dès 1952, Hodgkin et Huxley se sont intéressés au concept de dépendance au potentiel. Dans leur premiers travaux, ces auteurs évoquent l'existence de particules chargées dans la membrane et dont le déplacement se produit avant tout courant ionique avéré. Ces mouvements de charge créent un courant particulier qu'ils appellent courant de porte ("gating current"). Il s'agit d'une composante du courant capacitif global qui est transitoire sortante à l'application d'une dépolarisation et transitoire entrante lors du retour au potentiel initial. L'amplitude de ce courant est d'environ 1 fA soit un courant 1000 fois plus petit qu'un courant ionique et 100 fois plus petit que le niveau de bruit de la plupart des systèmes de patch-clamp. L'étude du courant de porte consiste donc en une analyse de bruit (Sigg et coll., 1994). Des mesures du courant de porte ont estimé qu'un déplacement intramembranaire de 12 charges élémentaires (e<sub>0</sub>) par canal est nécessaire à l'activation des canaux K<sup>+</sup> dépendant du potentiel (Sigg et Bezanilla, 1997). Cependant, aucune relation linéaire n'a pu être établie entre le nombre de charges élémentaires et l'amplitude du courant de porte.

Introduction

En 1984, Noda et coll ont analysé la séquence du segment S4 d'un canal Na<sup>+</sup> dépendant du potentiel. La présence importante de résidus chargés positivement a conduit les auteurs à proposer le segment S4 comme candidat potentiel aux mécanismes de détection des variations de potentiel membranaire (Noda et coll., 1984). Par la suite, l'étude des effets de mutations neutralisant les charges positives du segment S4 de nombreux canaux dépendant du potentiel ont montré la contribution de ce segment à la détection des variations de potentiel (Aggarwall et MacKinnon, 1996; Seoh et coll., 1996). Plus récemment, l'immobilisation du segment S4 et les réductions consécutives du courant de porte et de l'activation ont définitivement attribué le rôle de "voltage sensor" à ce segment (Horn et coll., 2000; Ding et Horn., 2001).

#### I.B.2.b Mouvements du segment S4 et couplage

De nombreuses descriptions du déplacement du segment S4 sont trouvées dans la littérature. La plus communément admise est celle d'un mouvement de translation perpendiculaire à la bicouche lipidique qui conduirait le segment à sortir en partie du côté extracellulaire (Cha et coll., 1999; Horn et coll., 2000). D'autres auteurs ont décrit ce déplacement comme un mouvement de translation-rotation autour de l'axe de l'hélice a (Figure. 6) (Starace et coll., 1997). Ce mouvement de translation-rotation a été étudié dans de nombreux canaux dépendant du potentiel soit par fluorescence de la rhodamine soit par la cinétique d'association de dérivés MTS avec des résidus cystéines implantés à la place d'acides aminés naturels du segment S4 (Bezannila, 2002). Les variations de la cinétique d'association au cours de dépolarisations membranaires croissantes montrent que certains acides aminés du segment S4 disparaissent progressivement de la face interne de la membrane, tandis que d'autres apparaissent simultanément à la face externe. Ce mouvement de charges semble correspondre à une torsion-translation du segment S4 en trois étapes de 60° chacune. En 2003, Jiang et coll. ont décrit un nouveau modèle de déplacement du "voltage sensor": "the voltage sensor paddle" (Figure 6). A partir de cristaux du canal KvAP, un canal K<sup>+</sup> dépendant du potentiel isolé de la bactérie Aeropyrum pernix, l'équipe de MacKinnon a proposé une nouvelle structure dans laquelle le segment S4 et une partie du segment S3 (hélice S3b) constituent une entité externe au canal. Cette structure nommée rame se déplace au sein de la bicouche lipidique sous l'effet d'un champ électrique du côté intracellulaire vers le côté extracellulaire de la membrane, ce déplacement étant directement couplé aux mécanismes d'ouverture du canal. Ce dernier modèle reste cependant très controversé et certains auteurs estiment qu'il ne refléterait pas totalement le déplacement du "voltage sensor" du canal shaker (Gonzalez et coll., 2005).

31



**Figure 6: Hypothèses de déplacement du segment S4 au sein de la bicouche lipidique. (A)** Sous-unité α d'un canal K<sup>+</sup> dépendant du potentiel. Le segment S3 est divisé en deux hélices S3a et S3b. Le segment S4 est en rouge. **(B)** Modèle conventionnel du déplacement du segment S4. Deux des quatre sous unités sont représentées. Sous l'effet d'une dépolarisation, les segments S4 se déplacent au sein de la protéine du côté intracellulaire de la membrane vers le côté extracellulaire suivant un mouvement de translation-rotation. **(C)** Dans le nouveau modèle du "voltage sensor paddle", les hélices S3b et S4 constituent une structure externe au reste de la protéine. Le déplacement induit un changement de conformation directement couplé au mécanisme d'ouverture de la porte d'activation. **D'après Horn R (2005).** 

Si le couplage entre les mouvements du "voltage-sensor" et l'ouverture de la porte d'activation est aujourd'hui largement admis (Sigworth, 1994; Sigg et Bezanilla, 1997), les bases moléculaires de ce couplage, et notamment, les interactions possibles entre différentes régions du canal restent à mettre en évidence. Jusqu'à présent, trois mécanismes ont été proposés. Ces mécanismes sont illustrés dans la figure 7: le déplacement du segment S4 peut induire un déplacement de la boucle extracellulaire S3S4 qui interagirait ainsi avec la partie supérieure du pore (a). Il pourrait aussi induire un déplacement de la boucle intracellulaire S4S5. Cette boucle viendrait ainsi se lier à l'extrémité C-terminale des segments S6 qui délimitent la porte d'activation (b). Un troisième mécanisme consisterait en une interaction directe du segment S4 avec les hélices  $\alpha$  S6 (c).

32


Figure 7: Interactions moléculaires possibles couplant les mouvements du "voltage sensor" à l'ouverture de la porte d'activation. Par souci de clarté, seules deux sous unités du tétramère sont représentées. Le segment S4 en rose est situé à proximité du pore délimité par les segments S5-S6. La porte d'activation se situe au niveau des extrémités C-terminales des segments S6. Le mécanisme de couplage peut être médié par trois interactions différentes: (a) la boucle S3S4 se déplace pour interagir avec la partie supérieure du pore (b) la boucle S4S5 se lie à l'extrémité C-terminale du segment S6 (c) le segment S4 pourrait interagir directement avec les régions transmembranaires du pore. D'après Horn (2002).

Lors d'une dépolarisation, il a été observé que les mouvements du segment S4 du canal *shaker* induisent un déplacement de la boucle S3S4 (Bezanilla, 2000). Cependant, la délétion totale de cette boucle affecte fortement la fonction du canal sans l'abolir (Gonzalez et coll., 2001). Toutefois, le rôle de la boucle S3S4 dans le mécanisme de couplage n'est pas à négliger. En effet, la taille et la fonction de cette boucle varient fortement d'un canal à l'autre. Ainsi, dans le canal eag (ether-à-go-go) la mutation d'un seul résidu (A345E) de la boucle S3S4 rend l'ouverture de la porte d'activation totalement indépendante aux variations de potentiel membranaire (Tang et Papazian, 1997).

Des mutations ponctuelles dans la boucle S4S5 induisent des changements drastiques des mouvements de porte du canal qui peuvent conduire comme dans le cas du canal shaker à une abolition de la fonction (McCormack et coll., 1991). Ce deuxième mécanisme a été suggéré suite aux travaux de nombreuses équipes (Lu et coll., 2001b; Ding et Horn, 2002; Tristani-Firouzi et coll., 2002). Ces auteurs ont émis l'hypothèse d'une interaction entre la boucle S4S5 et l'extrémité C-terminale du segment S6. Cette interaction permettrait ainsi un rapprochement moléculaire entre le voltage sensor et le pore. Cette hypothèse a été confirmée par les derniers travaux de l'équipe de McKinnon sur le canal Kv1.2 (Long et coll., 2005b). Dans cette étude, les auteurs décrivent une liaison de type ligand-récepteur entre le S4S5 et les quatre extrémités C-terminales S6. Cette interaction étant facilitée selon eux par l'existence du motif pro-X-pro évoqué précédemment. Ce motif induirait une courbure dans l'hélice  $\alpha$  et favoriserait ainsi son interaction avec la boucle S4S5. Expérimentalement, il a été montré que des mutations ponctuelles soit dans l'extrémité C-terminale du S6 soit dans

la boucle S4S5 du canal hERG entraînent une déstabilisation de l'état fermé du canal (Ferrer et coll., 2006). Cependant, bien que ces études démontrent la participation de ces deux éléments au couplage, elles ne mettent pas en évidence leur interaction moléculaire directe. Le dernier mécanisme proposé a été mis en évidence par des études de mutagenèse dirigée contre des résidus du segment S6 du canal *shaker*. L'implantation de résidus tryptophane en lieux et places de certains acides aminés du pore induit une perte de la sensibilité au potentiel, ce qui suggère l'existence de zones d'interaction protéines-protéines entre le pore et le "voltage sensor" (Li-Smerin et coll., 2000).

### I.B.3 Sous-unités $\alpha$ et $\beta$ des canaux de la repolarisation

### I.B.3.a Canaux Na<sup>+</sup>

#### Sous-unité α des canaux Na<sup>+</sup>

La sous-unité  $\alpha$  des canaux Na<sup>+</sup> dépendant du potentiel comporte quatre domaines homologues notés de I à IV, chacun de ces domaines étant constitué de six segments transmembranaires (S1 à S6). La forme cardiaque majoritaire est codée par le gène SCN5A. Cependant, plusieurs études ont démontré l'existence d'autres ARN messagers qui codent pour des sous-unités  $\alpha$  neuronales et squelettiques. Dans le myocarde de souris adulte, par exemple, la présence de ces autres sous-unités protéigues a été confirmée par des expériences d'immuno-histochimie. Ainsi, les sous-unités Nav1.1 (gène SCN1A), Nav 1.3 (gène SCN3A) et Nav1.6 (gène SCN8A) sont localisées au niveau des tubules transverses alors que la sous-unité Nav1.5 est localisée au niveau des disques intercalaires des cardiomyocytes (Cohen, 1996; Maier et coll., 2004). En outre, dans ces mêmes cellules, un pré-traitement à la TTX déplace la courbe d'activation de la composante neuronale sans affecter le courant I<sub>Na</sub> cardiaque (Maier et coll., 2003). La localisation et la sensibilité pharmacologique différentes de ces sous-unités pourraient être à l'origine de leur contribution différente au PA. Ainsi, contrairement à Nav1.5 qui joue un rôle majeur dans la conduction (Kucera et coll., 2002), les autres sous-unités participeraient au couplage excitation-contraction en conduisant l'onde de dépolarisation nécessaire à l'activation des canaux Ca<sup>2+</sup> de type L vers le centre du myocyte (Maier et coll., 2002). Ce courant Na<sup>+</sup> sensible à la TTX est généralement considéré comme négligeable. Cependant, l'application de cette toxine sur des cardiomyocytes de fibres de Purkinje de chien raccourcit la durée du PA (Coraboeuf et coll., 1979). Ces résultats suggèrent que les canaux Nav1.1, 1.3 et 1.6

pourraient être impliqués dans la genèse du courant de fenêtre sodique décrit précédemment.

Des études de relation structure-fonction ont montré que l'inactivation de ces canaux est une inactivation dite de type N. Elle correspond à l'obstruction du pore par un mécanisme de "ball and chain" qui dépend de l'interaction spécifique entre des séquences du segment S6 et de la boucle S4S5 du domaine IV (McPhee et coll., 1995; 1998). Ce processus est dépendant du potentiel et intervient dans une gamme de potentiels dépolarisés. Ainsi, au cours du plateau du PA seul subsiste le courant de fenêtre (voir IA).



**Figure 8: Structure des sous-unité**  $\alpha$  et  $\beta$  d'un canal Na<sup>+</sup>. Les hélices  $\alpha$  sont symbolisées par des cylindres.P: sites de phosphorylation par la PKA (cercle), par la PKC (losange).  $\Psi$ : sites de N-glycosilation, ++: S4 voltage sensor. D'après Catterall et coll., *IUPHAR Compendium of voltage-gated channels 2003b.* 

La boucle intracellulaire qui relie le domaine III au domaine IV est capital au processus d'inactivation dépendante du potentiel (Patton et coll., 1992). En effet, des mutations au sein de cette boucle peuvent conduire à un défaut sévère de la repolarisation lié à une absence ou à une réduction de l'inactivation des canaux. La conséquence de ces mutations est l'augmentation du  $I_{Na}$  retardé pendant la phase de plateau, ce qui va retarder la repolarisation et se traduire sur l'ECG par une augmentation de la durée de l'intervalle QT. Les patients

présentant ce phénotype sont prédisposés à la survenue de tachycardies ventriculaires voire de torsades de pointes. Ce syndrome du QT long est nommé LQT3 (Wang et coll., 1995).

A l'inverse, une réduction du courant  $I_{Na}$  est souvent décrite dans le cas de mutations associées au syndrome de Brugada. Cette perte de fonction du canal induit une hétérogénéité de la repolarisation qui favorise les mécanismes de réentrées et la survenue de fibrillations ventriculaires (Antzelevitch et coll., 2003). Nous reviendrons dans les chapitres suivants sur les troubles de la repolarisation et leurs pathologies associées.

#### Sous-unités β des canaux Na⁺

La fonction des canaux Na<sup>+</sup> peut être modulée par la présence de sous-unités auxiliaires: les sous-unités β. Ces protéines possèdent un seul domaine transmembranaire, une petite extrémité C-terminale cytosolique et un domaine N-terminal important. Trois sous-unités β différentes ont été identifiées dans le cœur: Nav B1, Nav B2 et Nav B3 codées respectivement par les gènes SCN1B, SCN2B et SCN3B. Les rôles de ces sous-unités dans la genèse du courant I<sub>Na</sub> cardiaque ne sont pas encore bien définis. La co-expression des sous-unités  $\beta$ 1 et  $\beta$ 3 avec le canal Nav1.5 dans l'ovocyte de xénope induit une augmentation similaire du nombre de canaux Nav1.5 exprimés à la membrane, suggérant que ces deux sous-unités participent à l'adressage membranaire des canaux Nav1.5. En revanche, les deux sous-unités ont, dans ce modèle, des effets différents sur les cinétiques d'activation et d'inactivation du courant Na<sup>+</sup> (Fahmi et coll., 2001). Il est possible que cet effet sur Nav1.5, caractérisé dans un modèle de ré-expression, n'ait pas véritablement de signification physiologique. En effet, une étude immuno-histochimique réalisée dans des cardiomyocytes ventriculaires de souris, a montré que la sous-unité  $\beta$ 2 est colocalisée avec la sous-unité  $\alpha$ Nav1.5 au niveau des disques intercalaires alors que les sous-unités ß1 et ß3 sont retrouvées au niveau des tubules T (Maier et coll., 2004). Ces derniers résultats sont en contradiction avec l'étude réalisée sur la souris invalidée pour le gène Scn2b(-/-). Cette souris présente en effet de profonds désordres neurologiques mais aucun phénotype cardiaque (Chen et coll., 2002). L'ensemble de ces résultats met en évidence la grande variabilité des interactions et des régulations entre les différentes sous-unités constituant le canal. A cette complexité s'ajoute le fait que ces sous-unités protéiques du fait de leur structure sont capables de participer à des processus d'adressage à la membrane et d'adhésion cellulaire. En effet, l'extrémité N-terminale de ces protéines possède des sites consensus de glycosylation et des motifs de type immunoglobulines (Isom et Catterall, 1996). Ces protéines appartiennent donc à la superfamille des immunoglobulines, qui comprend de nombreuses molécules d'adhésion cellulaire (CAM) avec lesquelles elles sont

susceptibles d'interagir. Elles peuvent aussi interagir directement avec des protéines du cytosquelette telles que les ankyrines. Ainsi, il a été montré dans des modèles de réexpression et dans des préparations de cerveau de rat que la sous-unité Nav β1 par son extrémité C-terminale interagit avec l'ankyrine B (Malhotra et coll., 2002). La souris hétérozygote ankyrine B +/- se caractérise par des défauts majeurs de l'activité électrique cardiaque attribués à des modifications de la fonction du canal et de son expression à la membrane (Chauhan et coll., 2000). L'enregistrement des conductances Na<sup>+</sup> unitaires des cardiomyocytes de ces souris montre une activité "en burst" ce qui correspond à des réouvertures précoces du canal et se traduit au niveau macroscopique par l'augmentation du courant Na<sup>+</sup> persistant. Ce phénotype est retrouvé dans le cas de la mutation perte de fonction E1425G de l'ankyrine B. Les patients porteurs de cette mutation présente le syndrome du QT long de type 4 (Mohler et coll., 2003).

## I.B.3.b Canaux Ca<sup>2+</sup>

### Sous-unité α des canaux Ca<sup>2+</sup>

Comme les canaux Na<sup>+</sup> dépendant du potentiel, la sous-unité  $\alpha$  des canaux Ca<sup>2+</sup> présente quatre domaines composés chacun de six segments transmembranaires. Quatre sous-familles distinctes de sous unités  $\alpha$  sont décrites: Cav1, Cav2, Cav3 et Cav4. Des études de ré-expression hétérologue de la sous-famille Cav1 ont montré que les sous-unités Cav1.1 ( $\alpha_{1S}$ ), Cav1.2 ( $\alpha_{1C}$ ), Cav1.3 ( $\alpha_{1D}$ ) et Cav1.4 ( $\alpha_{1F}$ ) participent à la genèse du courant Ca<sup>2+</sup> de type L alors que l'expression des sous-unités de la famille Cav3 ( $\alpha_{1G}$  et  $\alpha_{1H}$ ) est à l'origine du courant Ca<sup>2+</sup> de type T (Catterall, 2000; Perez-Reyes et Schneider, 1994). L'inactivation des canaux Ca<sup>2+</sup> de type L est dépendante du potentiel mais aussi de la concentration en Ca<sup>2+</sup> interne. Cette sensibilité au Ca<sup>2+</sup> intracellulaire requiert un "sensor" protéique: la calmoduline. Au cours du plateau du PA, l'augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire favorise la fixation du cation à la calmoduline. La protéine interagit alors avec les domaines EF de l'extrémité C-terminale de la sous-unité Cav1.2 ce qui précipiterait l'inactivation du canal (Peterson et coll., 1999). Ce mécanisme permet de limiter l'entrée de Ca<sup>2+</sup> au cours du PA et d'amorcer la repolarisation.

Le courant Ca<sup>2+</sup> de type T résultant de l'activité de sous-unités  $\alpha$  de type Cav 3.1 ( $\alpha_{1G}$ ) et Cav 3.2 ( $\alpha_{1H}$ ) est beaucoup moins bien connu que le type L. Il est principalement impliqué dans l'activité des cellules automatiques des noeuds et des réseaux de conduction (Mangoni et coll., 2006), mais il peut être ré-exprimé dans des conditions physiopathologiques. Dans ce

cas, sa présence pourrait correspondre à une ré-expression du programme fœtal puisque dans le myocarde humain, il a été montré que l'expression de l'isoforme majoritaire  $\alpha_{1G}$  Cav 3.1 diminue progressivement au cours du développement (Monteil et coll., 2000). Ses propriétés pharmacologiques diffèrent selon les espèces considérées et leur interprétation est délicate en raison de l'existence de plusieurs formes d' $\alpha_{1G}$ , issues d'épissages alternatifs différents (Chemin et coll., 2001).

Le courant I<sub>Ca, TTX</sub> mis en évidence dans les cardiomyocytes ventriculaires de rat et de cobaye n'a à ce jour aucune structure moléculaire définie. Certains auteurs ont proposé que ce courant serait généré par des canaux Na<sup>+</sup> dont la sélectivité serait modifiée en absence d'ions Na<sup>+</sup> dans le milieu extracellulaire (Cole et coll., 1997). Or, ce mode de fonctionnement particulier des canaux Na<sup>+</sup> nommé "slip-mode conductance" nécessite une activation par la PKA (Santana et coll., 1998). I<sub>Ca, TTX</sub> n'ayant pas besoin de cette activation par la PKA, ce courant est probablement porté par une nouvelle population de canaux non identifiée pour le moment.

#### Sous-unité β des canaux Ca<sup>2+</sup>

Une des particularités des canaux  $Ca^{2+}$  est l'abondance relative de leurs sous-unités régulatrices. En effet, plus de 20 gènes codent pour des sous-unités auxiliaires. Ces protéines peuvent être cytoplasmiques (sous-unités  $\beta$ ), situées à la surface externe du sarcolemme (sous-unités  $\alpha 2\delta$ ) ou transmembranaires (sous-unités  $\gamma$ ).

Le canal Ca<sup>2+</sup> cardiaque de type L (figure 9) est formé par l'association non-covalente d'une sous-unité Cav1.2, avec les sous-unités régulatrices  $\beta$ ,  $\alpha 2\delta$  (Leung et coll., 1987). Le peptide  $\alpha 2$  est entièrement extracellulaire (Brickley et coll., 1995) et il est ancré à la membrane via un pont di-sulfure avec le peptide  $\delta$  (Ellis et coll., 1988; De Jongh et coll., 1990). Contrairement aux canaux Ca<sup>2+</sup> de type L, les sous-unités  $\alpha$  des canaux Ca<sup>2+</sup> de type T ne semblent être associées à aucune sous-unité régulatrice. Quatre isoformes de sous-unités  $\beta$  ont été identifiées: Cav $\beta$ 1, Cav $\beta$ 2, Cav $\beta$ 3 et Cav $\beta$ 4. La sous-unité la plus exprimée dans le cœur étant la sous unité  $\beta$ 2 (Perez-Reyes et coll., 1992). Toutes les sous-unités  $\beta$  possèdent deux domaines extrêmement conservés encadrés par trois régions à séquences variables. Les domaines conservés sont impliqués dans l'interaction avec la sous-unité  $\alpha$  tandis que les régions variables jouent un rôle dans la modulation des propriétés des canaux Ca<sup>2+</sup> résultant de la co-expression des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  (Pragnell et coll., 1994).



Figure 9: Structure d'une sous-unité  $\alpha$  et des différentes sous-unités régulatrices d'un canal Ca<sup>2+</sup> de type L. Les hélices  $\alpha$  sont symbolisées par des cylindres. D'après Catterall et coll., *IUPHAR Compendium of voltage-gated channels 2003a.* 

#### Sous unités auxiliaires des canaux Ca2+

Dans des systèmes de ré-expression hétérologue, cette modulation de la fonction des canaux  $Ca^{2+}$  par les sous-unités  $\beta$  induit une augmentation de la densité de courant. Cette augmentation est un effet combiné de l'élévation de l'expression des canaux à la surface membranaire, de la stabilisation du complexe  $\alpha/\beta$  à la membrane et de l'augmentation de la probabilité d'ouverture des canaux (Yamaguchi et coll., 1998). Il a été montré en outre que la co-expression des sous-unités  $\beta$  modifie les cinétiques et la propriété de dépendance au potentiel de l'activation et de l'inactivation du courant  $Ca^{2+}$  (Moreno et coll., 1997).

L'interaction entre la sous-unité  $\alpha$  et la sous-unité  $\beta$  se fait au niveau d'une région extrêmement conservée de la sous-unité  $\alpha$ . Cette séquence localisée sur la boucle intracellulaire qui relie les domaines I et II (Pragnell et coll., 1994) est capitale au mécanisme d'interaction de la sous-unité  $\alpha$  aux différentes sous-unités  $\beta$ . En effet, une mutation ponctuelle de cette séquence (G406R) est à l'origine du syndrome de Timothy. Ce syndrome affecte de nombreux systèmes au sein de l'organisme (système nerveux, système immunitaire...etc). Au niveau cardiaque, les patients souffrent d'arythmies sévères. Dans les systèmes de ré-expression héterologue, le défaut d'interaction entre la forme mutée (G406R) de la sous-unité Cav1.2 et la sous-unité  $\beta$  est à l'origine d'une réduction de la dépendance au potentiel de l'inactivation des canaux. Il en résulte un courant Ca<sup>2+</sup> persistant qui prolonge la durée du plateau du PA (Splawski et coll., 2004).

La sous-unité  $\alpha 2\delta$  est codée par quatre gènes différents. Le rôle de ces sous-unités auxiliaires contrairement aux sous-unités  $\beta$  est peu connu et dépend fortement de l'identité des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  co-exprimées (Singer et coll., 1991; Bangalore et coll., 1996). Il n'existe pas de preuve directe de la présence au niveau cardiaque de sous-unités auxiliaires de type  $\gamma$ . Ces sous-unités sont retrouvées exclusivement associées aux formes neuronales et squelettiques des canaux Ca<sup>2+</sup>.

### I.B.3.c Canaux K<sup>+</sup>

Dans le myocarde des mammifères, les canaux K<sup>+</sup> dépendant du potentiel sont les principaux acteurs de la repolarisation. Il existe une très grande diversité des canaux K<sup>+</sup>. En effet, plus de quatre-vingt gènes codant pour des canaux K<sup>+</sup> ou pour des sous-unités régulatrices ont été identifiés. Ces canaux ont d'abord été distingués sur la base de leurs propriétés pharmacologiques et biophysiques. Deux classes principales de canaux K<sup>+</sup> dépendant du potentiel sont ainsi généralement décrites: les canaux à l'origine des courants K<sup>+</sup> transitoires sortants (I<sub>to</sub>) et les canaux responsables de la composante K<sup>+</sup> retardée à rectification sortante (I<sub>K</sub>). Tous ces canaux qu'ils dépendent du potentiel ou non appartiennent tous à la superfamille des canaux à boucle P.

#### Sous unités $\alpha$ des canaux $K^{\dagger}$ à six segments transmembranaires et un pore

La sous-unité  $\alpha$  des canaux K<sup>+</sup> dépendant du potentiel est constituée de 6 segments transmembranaires notés de S1 à S6. L'unité pore est constituée par l'association en tétramère de quatre sous-unités  $\alpha$ . Un grand nombre de gènes codant pour ces sous-unités ont été identifiés et leur terminologie a été systématisée dans une nomenclature internationale (Gutman et coll., 2003). La grande diversité des canaux K<sup>+</sup> ne repose pas seulement sur le grand nombre de gènes, mais aussi, sur l'existence de variants issus d'épissages alternatifs (Attali et coll., 1992) et de la possibilité d'association entre sous-unités différentes au sein du tétramère (Covarrubias et coll., 1991). Dans la classification internationale des canaux K<sup>+</sup>, douze sous-familles de sous-unités  $\alpha$  notées de Kv1 à Kv12 sont répertoriées. L'expression hétérologue des sous-familles Kv1 à Kv4 est à l'origine de canaux fonctionnels aux propriétés biophysiques et pharmacologiques distinctes (Covarrubias et coll., 1991). En revanche, les sous-unités  $\alpha$  Kv2 induit une diminution de l'amplitude des courants K<sup>+</sup> générés par les protéines canaux Kv2 (Salinas et

coll., 1997). Néanmoins, leur rôle fonctionnel dans le myocarde n'est pas encore prouvé. Les sous-familles Kv7 et Kv11 correspondent respectivement aux sous-familles KCNQ et KCNH. Deux membres importants de chacune de ces familles sont les canaux codés par les gènes KCNQ1 et KCNH2 qui ont été identifiés respectivement comme les locus mutés dans les syndromes QT long de type 1 (Keating et coll., 1991) et de type 2 (Sanguinetti et coll., 1995). De toutes les sous-unités a fonctionnelles identifiées, seules quelques-unes sont exprimées dans le cœur (tableau 1). Bien que de nombreuses études de ré-expression hétérologue aient permis la caractérisation biophysique (amplitude, cinétiques. sensibilités pharmacologiques) des courants générés par ces sous-unités, les corrélations directes avec les propriétés des courants natifs des cardiomyocytes sont difficiles à mettre en évidence. Cette difficulté tiendrait au fait que l'environnement jouerait un rôle capital sur l'expression des canaux et les propriétés des courants (Petersen et Nerbonne, 1999). Cet environnement comprend le niveau relatif d'expression des différentes sous-unités α mais aussi l'association avec différentes sous-unités régulatrices β.

Courant	Protéine	Gène	Pharmacologie
I <sub>to,fast</sub>	Kv4.2	KCND2	HpTX2, HpTX3
	Kv4.3	KCND3	
to,slow	Kv1.4	KCNA4	
IKur OU IK,slow1	Kv1.5	KCNA5	4AP
K,slow2	Kv2.1	KCNB1	TEA
I <sub>Kr</sub>	Kv11.1 (Erg1)	KCNH2	E-4031
Ks	Kv7.1 (KvLQT1)	KCNQ1	Chromanol 293B

Tableau 1: Sous-unités α des canaux K<sup>+</sup> dépendant du potentiel exprimées dans le cœur

### Sous unités $\beta$ des canaux $K^{+}$ à six segments transmembranaires et un pore

La première sous-unité régulatrice des canaux K<sup>+</sup> dépendant du potentiel à avoir été clonée est la sous-unité  $\beta$  minK (minimum K<sup>+</sup> channel). Mise en évidence dans le cœur humain, cette petite protéine transmembranaire de 130 acides aminés avait d'abord été identifiée comme une sous-unité  $\alpha$  dans un modèle de ré-expression dans l'ovocyte de xénope (Murai et coll., 1989; Folander et coll., 1990). Par la suite, d'autres études ont montré que l'expression de cette sous-unité module en fait le courant généré par une sous-unité  $\alpha$ endogène de l'ovocyte, la protéine KvLQT1 (Sanguinetti et coll., 1996). Les propriétés du courant résultant proches de celles du courant natif I<sub>Ks</sub> des cardiomyocytes, ont suggéré que l'association de la sous-unité  $\alpha$  KvLQT1 à la sous-unité  $\beta$  minK est à l'origine du courant I<sub>Ks</sub> cardiaque (Barhanin et coll., 1996). Dans le cœur de cobaye, la sous-unité minK est exprimée dans les ventricules et dans les cellules du nœud sinusal (Freeman et Kass, 1993). La co-expression de formes mutées de minK avec KvLQT1 induit des modifications des propriétés biophysiques du courant. Ces modifications peuvent être délétères et sont à l'origine de troubles sévères de la repolarisation (LQT1) (Splawski et coll., 1997). Des expériences de double-hybride utilisant l'extrémité C-terminale de minK comme appât ont montré que minK interagirait directement avec le pore de KvLQT1 (Romey et coll., 1997). Les auteurs de cette étude ont proposé que cette interaction modulerait la conductance unitaire du canal selon un mécanisme de "foot-in-the-door". D'autres techniques comme l'étude de la vitesse d'association des dérivés MTS avec des résidus cystéines implantés à la place d'acides aminés naturels du domaine transmembranaire de minK (Wang et coll. 1996). Cependant aucune preuve de l'interaction directe entre ces deux protéines n'a pu être mise en évidence dans le tissu cardiaque natif (Nerbonne et Kass, 2005).

La sous-unité minK pourrait en outre s'associer à d'autres sous-unités  $\alpha$ . En effet, plusieurs travaux ont décrit un effet de la co-expression de la protéine minK sur l'activité du canal hERG (Mc Donald et coll., 1997; Ohyama et coll., 2001) et l'utilisation d'antisens dirigé contre minK dans des cellules AT1 diminue l'amplitude du courant I<sub>Kr</sub> (Yang, 1995a). Cependant, aucune preuve de l'existence d'une interaction fonctionnelle entre hERG et minK n'a été démontrée dans le myocarde.

MinK appartient à la sous-famille des sous-unités  $\beta$  à un domaine transmembranaire. Les protéines de cette famille sont codées par les gènes de la famille KCNE dont trois des membres KCNE1, KCNE2 et KCNE3 sont exprimées dans le cœur. KCNE1 code pour la protéine MinK. KCNE2 code pour la protéine MIRP1 (Minimum K<sup>+</sup> Channel Related Peptide). Certains auteurs ont suggéré que l'association de cette protéine avec le canal hERG est à l'origine du courant cardiaque I<sub>Kr</sub> (Abbott et coll., 1999). Cependant l'existence de cette association reste controversée, d'autant plus que MIRP1 semble également réguler l'activité d'autres canaux comme Kv4.2 (Zhang et coll., 2001) ou HCN (Yu et coll., 2001). De plus, il a été montré que l'expression de KCNE2 est faible au niveau des ventricules mais très importante au niveau des sinus (Decher et coll., 2003) et des fibres de Purkinje (Pourrier et coll., 2003). La troisième protéine de cette sous-famille KCNE3 ou MiRP2 co-exprimée avec KvLQT1 est à l'origine d'un courant K<sup>+</sup> constitutivement actif (Schroeder et coll., 2000). Elle est abondamment exprimée dans le muscle squelettique, dans les tissus épithéliaux et relativement peu dans le cœur. Cette sous-unité comme minK et MIRP1 s'associerait avec d'autres sous unités α. Elle abolit le courant généré par la protéine hERG (Li et coll., 2006) et module les cinétiques d'activation et de désactivation du courant généré par la protéine Kv2.1 (McCrossan et coll., 2003). Sa sur-expression par injection adénovirale dans le

ventricule gauche de cobaye est à l'origine d'une accélération de la repolarisation (Mazhari et coll., 2002).

Les sous-unités  $\beta$  cytoplasmiques ou Kv $\beta$  sont des protéines cytosoliques ou périmembranaires (Scott et coll., 1994) d'environ 300 acides aminés. Trois gènes différents *KCNAB1-3* codent pour les protéines Kv $\beta$ 1, Kv $\beta$ 2 et Kv $\beta$ 3. Dans le cœur, seuls sont exprimés les variants Kv $\beta$ 1.1, Kv $\beta$ 1.2, Kv $\beta$ 1.3 et Kv $\beta$ 2 issus des épissages alternatifs de *KCNAB1* et *KCNAB2* respectivement. Ces sous-unités ont été identifiées pour la première fois dans le cerveau en association avec une sous-unité  $\alpha$  Kv1 (Muniz et coll., 1992). Les études de ré-expression hétérologue suggèrent une interaction spécifique avec les sous-unités Kv1 (Nakahira et coll., 1996; Sewing et coll., 1996). Les sous-unités  $\alpha$  Kv1 suivant un rapport stoechiométrique 1:1 (Gulbis et coll., 2000) et par leur extrémité COOH terminale avec les canaux de la famille Kv4 (Yang et coll., 2001). Dans le cœur humain, Kv $\beta$ 1.1 et Kv $\beta$ 1.3 modifieraient les propriétés biophysiques du canal Kv1.5 en augmentant la sensibilité du canal au potentiel et en induisant une activation rapide et partielle du courant aux potentiels positifs (England et coll., 1995). Kv $\beta$ 2 pourrait accélérer l'inactivation du courant généré par Kv1.4 et favoriser l'expression membranaire de Kv1.2 (Shi et coll., 1996).

Les sous-unités Kvβ participent également aux processus de régulation des canaux par phosphorylation. En effet, ces protéines sont capables de lier des protéines adaptatrices, elles-mêmes possédant des sites de liaison à la PKC, permettant ainsi la localisation dans l'environnement du canal de certaines isoformes de la PKC (Gong et coll., 1999).

Plus récemment deux autres types de sous-unités auxiliaires ont été identifiés. Il s'agit des KChIP (Kv Channel-Interacting Protein) et des KChAP (Kv Channel-Associated Protein). Ces protéines ont été mises en évidence par la technique de double hybride en utilisant comme appât l'extrémité NH2 terminale de Kv4.2 (Wible et coll., 1998; An et coll., 2000). Les KChIP sont des protéines cytoplasmiques de 200 à 300 acides aminés, sensibles au Ca<sup>2+</sup>, présentant des motifs "EF-hand like" communs à de nombreuses protéines impliquées dans la signalisation calcique. Ces protéines augmentent l'expression membranaire de Kv4.2 et Kv4.3 et modulent les cinétiques d'activation et de réactivation des courants générés par ces protéines (An et coll., 2000). Trois membres ont été identifiés mais seule la sous-unité KChIP2 est fortement exprimée dans le cœur (Patel et coll., 2002). Chez l'Homme et le chien, son expression est supérieure dans l'épicarde par rapport à l'endocarde (Rosati et coll., 2001). Cette expression différentielle est à l'origine du gradient du courant I<sub>to,f</sub> au sein du ventricule. Chez la souris, le même gradient d'I<sub>to,f</sub> est observé. Cependant, dans ce modèle, le gradient serait dû à une expression variable de Kv4.2 (*Kcnd2*), elle même sous le contrôle de *Irx5* (Costantini et coll., 2005).

Les KChAP ont la spécificité de pouvoir se lier aussi bien à des sous-unités  $\alpha$  qu'à des sousunités auxiliaires  $\beta$  mais contrairement aux Kv $\beta$  et aux KChIP, elles ne modifient pas les propriétés électrophysiologiques des canaux auxquels elles sont associées (Wible et coll., 1998; Kuryshev et coll., 2001). Ces protéines appartiennent à la famille des inhibiteurs des protéines de la famille STAT qui sont des régulateurs de nombreux facteurs de transcription. Elles joueraient en outre un rôle dans les processus apoptotiques (Wible et coll., 2002). Bien que l'expression de ces protéines au niveau cardiaque soit clairement établie, leurs implications physiologiques dans le trafic des protéines et la modulation des courants K<sup>+</sup> ne sont pas encore déterminées.

Famille	Sous-unité	Gène	Courant
Κνβ	Κνβ1	KCNAB	I <sub>to,f</sub> ??, I <sub>K,slow1</sub> ??
	Κνβ2	1	I <sub>to,s</sub> ??
	Κνβ3	KCNAB	
		2	
		KCNAB	
		3	
KCNE	MinK	KCNE1	Ks
	MiRP1	KCNE2	I <sub>Kr</sub> ??, I <sub>to,f</sub> ??
	MiRP2	KCNE3	
KChAP	KChAP	PIAS3	l <sub>to,f</sub> ??, l <sub>κ</sub> ??,
KChIP	KchlP1	KCNIP1	
	KchlP2	KCNIP2	I to,f ??, autres ??
	KchlP3	KCNIP3	

Tableau 2: Sous-unités auxiliaires β des canaux K<sup>+</sup> dépendant du potentiel exprimées dans le cœur

Sous unités  $\alpha$  des canaux  $K^*$  à deux segments transmembranaires et un pore

La sous-unité α des canaux K<sup>+</sup> à rectification entrante (Kir) est formée de deux segments transmembranaires M1 et M2 équivalents aux segments S5 et S6 des canaux dépendant du potentiel. La propriété de rectification entrante se traduit par un état de conductance moindre du canal pour des potentiels positifs. Ce mécanisme est consécutif à la liaison des ions Mg<sup>2+</sup> et des polyamines (putrescine, spermine et spermidine) à un ou deux acides aminés, localisés dans le segment M2 (Matsuda et coll., 1987; Lopatin et coll., 1994).

Les sous-unités des canaux Kir s'associent en homotétramères, parfois en hétérotétramères, pour former le pore du canal. Elles sont codées par les gènes de la famille *KCNJ* et sont

Courant	Protéine	Gène	Pharmacologie
I <sub>K1</sub>	Kir2.1	KCNJ2	Terikalant ,Ba <sup>2+</sup>
	Kir2.2	KCNJ12	Terikalant ,Ba <sup>2+</sup>
	Kir2.3	KCNJ4	Terikalant ,Ba²+
I <sub>K, ATP</sub>	Kir6.1	KCNJ8	Glibenclamide
	Kir6.2	KCNJ11	Glibenclamide
K, ach	Kir3.1	KCNJ3	Terikalant
	Kir3.4	KCNJ5	Terikalant

regroupées en sept sous familles différentes toutes exprimées au niveau cardiaque, sous

l'appellation Kir1 à Kir7 (tableau 3).

Tableau 3 : sous-unités α des courants K<sup>+</sup> rectifiants entrants cardiaques

La sous-famille des canaux Kir "classiques" comprend les sous-unités Kir2.1, Kir2.2, Kir2.3 et Kir2.4. Dans des systèmes de ré-expression hétérologue, il a été montré que les propriétés des courants générés par ces sous-unités sont proches des caractéristiques du courant cardiaque  $I_{K1}$  (Nichols et coll., 1996). La relation moléculaire directe entre le courant  $I_{K1}$  et les sous-unités Kir2x a été mise en évidence pour la première fois dans un modèle de souris invalidée pour le gène *Kcnj2* (protéine Kir2.1) (Zaritsky et coll., 2001). Dans ce modèle, malgré l'absence de la protéine Kir2.1, il subsiste un courant K<sup>+</sup> rectifiant entrant mais aux propriétés distinctes de celles du  $I_{K1}$  endogène. Ce courant est absent des cardiomyocytes ventriculaires isolés des souris invalidées pour le gène *Kcnj1* qui code pour la sous-unité Kir2.2 (Zaritsky et coll., 2001). Ces observations suggèrent que chez la souris des associations hétéromultimériques entre les sous-unités  $\alpha$  Kir2.1 et Kir2.2 sont à l'origine du  $I_{K1}$  cardiaque. Plus récemment, des études biochimiques ont confirmé et généralisé cette hypothèse à d'autres modèles (McLerie et Lopatin, 2003; Zobel et coll., 2003).

Des mutations du gène *KCNJ2* sont associées au syndrome d'Andersen (Plaster et coll., 2001; Jongsma et Wilders, 2001) caractérisé par des atteintes des systèmes nerveux central et périphérique ainsi qu'à un allongement de l'intervalle QT (LQT7). Au niveau moléculaire, ce syndrome serait dû à un effet dominant-négatif des canaux mutés sur les canaux sauvages (Bendahhou et coll., 2003).

La sous-famille des canaux Kir activés par les protéines G regroupe les sous-unités Kir3.1, Kir3.2, Kir3.3 et Kir3.4 exprimées surtout à l'étage auriculaire. Ces canaux sont activés par une interaction directe avec leur extrémité C-terminale des sous-unités  $\beta\gamma$  des récepteurs muscariniques (Logothetis et coll., 1987). Ces sous-unités s'associeraient en hétérotétramères (Krapivinsky et coll., 1995) et forment le canal K<sup>+</sup> activé par l'acétylcholine ou l'adénosine I<sub>Kach</sub>.

La sous famille des canaux Kir inhibés par l'ATP intracellulaire regroupe les sous-unités Kir6.1 et Kir6.2. Co-exprimées avec les sous-unités régulatrices SUR (sulfonylurea receptor), ces canaux sont à l'origine de I<sub>KATP</sub>. Au niveau cardiague, ce courant résulte de l'association de sous-unités α Kir6.2 aux protéines SUR. En effet, dans un modèle de souris invalidée pour le gène Kcnj11 (Kir6.2), les enregistrements en patch-clamp réalisés sur les cardiomyocytes ventriculaires isolés de ces animaux ne révèlent pas la présence de I<sub>KATP</sub> (Suzuki et coll., 2001). Les protéines SUR: SUR1, SUR2A et SUR2B sont des protéines ABC (ATP Binding Cassette) à 17 segments transmembranaires et deux sites de fixation aux nucléotides cycliques. SUR1 est codée par le gène ABCC8, SUR2A et SUR2B sont les deux isoformes résultant de l'épissage alternatif du gène ABCC9. Au niveau cardiague, SUR2A est la sous-unité la plus exprimée. La stœchiométrie de l'association des sous-unités Kir6.x et SUR est de 4 sous-unités  $\alpha$  Kir6.x pour 4 sous-unités  $\beta$  SUR (Clement et coll., 1997). Les propriétés pharmacologiques et biophysiques du courant I<sub>KATP</sub> cardiaque sont proches de celles obtenues en co-exprimant Kir6.2 et SUR2A (Babenko et coll., 1998). Cependant, le traitement de cardiomyocytes de rats nouveaux nés avec un siRNA dirigé contre la sousunité SUR1 induit une réduction marquée de la densité d'I<sub>KATP</sub> (Yokoshiki et coll., 1999). L'ensemble de ces résultats suggère la grande complexité des associations des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  au sein des hétéromultimères du tissu natif (Pountney et coll., 2001).

## II. TROUBLES DE LA REPOLARISATION VENTRICULAIRE

Nous venons de voir que la phase de repolarisation ventriculaire dépend de l'enchaînement séquentiel d'activation et d'inactivation de canaux ioniques d'origines moléculaires très différentes. Ces activations coordonnées sont capitales puisqu'elles vont déterminer la durée de la phase de repolarisation et donc l'enchaînement des cycles cardiaques. Sur l'ECG de surface, la durée de la repolarisation ventriculaire est reflétée par l'intervalle QT (figure 10). Cet intervalle correspond à la durée séparant le début de la dépolarisation et la fin de la repolarisation des ventricules. Dans certaines conditions, cet intervalle peut être allongé: c'est le syndrome du QT long (LQT). A l'inverse, il peut être raccourci, on parle alors du syndrome du QT court (SQT pour "short QT").



Figure 10: Définition de l'intervalle QT

## II.A LE SYNDROME DU QT LONG

Chez l'Homme, la limite supérieure de l'espace QT normal, corrigée en fonction de la fréquence cardiaque (QTc=QT/ $\sqrt{RR}$ ) selon la formule de Bazzett, a été fixée arbitrairement à 440 ms. Un sujet sain a donc un QTc inférieur à 440 ms, alors qu'un sujet atteint à un QTc supérieur à 440 ms.

La manifestation clinique du syndrome du QT long est caractérisée par des syncopes répétées dues à des épisodes de tachycardie ventriculaire polymorphe (torsades de pointes) qui peuvent conduire dans certains cas à des morts subites (Kaas et Moss, 2003). Sur la

base des données cliniques, deux types de syndromes de QT long ont été distingués: les formes congénitales et les formes acquises.

## II.A.1 Le syndrome du QT long congénital

Le syndrome du QT long congénital est rare et a été décrit pour la première fois en 1957 par Jervell et Lange-Nielsen. Dans leur étude, les auteurs décrivent une famille dont certains membres présentent un intervalle QT allongé associé à une surdité bilatérale. Ils constatent par ailleurs une forte proportion de mort subite. Ils suggèrent alors q'un phénomène d'asystolie serait à l'origine de la mort subite (Jervell et Lange-Nielsen, 1957). Le syndrome qu'ils décrivent et qui portera leur nom correspond en fait à la forme héréditaire, transmise sur un mode autosomique récessif, du syndrome du QT long congénital. Le variant Romano-Ward du QT long congénital a été décrit en 1963 par Romano (Romano et coll., 1963), puis en 1964 par Ward (Ward, 1964). Il est caractérisé par un QT long à l'ECG, des syncopes et parfois des morts subites. Dans les familles atteintes, l'anomalie génétique est transmise selon un mode autosomique dominant et il n'est jamais fait état de surdité associée. Le syndrome de Romano-Ward est beaucoup plus fréquent que le syndrome du QT long congénital.

Le caractère héréditaire du syndrome de QT long, bien que supposé dès l'identification de la pathologie par l'incidence familiale élevée du phénotype, n'a pu être mis en évidence qu'au cours des années 90. Aujourd'hui, il est d'usage de classer ces syndromes en fonction de leur mode de transmission. Ainsi, les syndromes rares du type Jervell et Lange-Nielsen regroupent le syndrome JLN1 dû à une mutation du gène KCNQ1 et le syndrome JLN2 lié à une mutation de la sous-unité régulatrice KCNE1. Les syndromes de type Romano-Ward se subdivisent en 6 syndromes notés de LQT1 à LQT6, chacun étant la conséquence de mutations sur 6 gènes différents. Ces gènes codent pour KCNQ1 (LQT1), KCNH2 (LQT2), SCN5A (LQT3), ANK B (LQT4), KCNE1 (LQT5), KCNE2 (LQT6). D'autres canalopathies peuvent être associée à des allongements de l'intervalle QT. Il s'agit des syndromes d'Andersen (ou LQT7) et de Timothy (ou LQT8). Le premier est lié à des mutations sur le gène KCNJ2 et le second à des mutations sur le gène CACNA1C. Contrairement aux autres formes de QT long congénital, les troubles de la repolarisation associés à ces deux syndromes ne sont pas la seule anomalie constatée. Les patients souffrent en effet de nombreux désordres affectant plusieurs systèmes de l'organisme (atteintes des systèmes immunitaires et nerveux dans le cas du syndrome de Timothy; du système nerveux, des muscles squelettiques dans le syndrome d'Andersen). Une incidence élevée de fiibrillation

auriculaire est également observée dans la forme LQT4. D'un point de vue clinique, une corrélation relativement nette a été montrée entre les différentes origines génétiques du syndrome et les facteurs déclenchant les épisodes de syncopes ou les morts subites. Les troubles du rythme associés au LQT1 sont déclenchés par le stress ou lors d'un exercice physique (Schwartz et coll., 2001). Des stimuli auditifs sont à l'origine des troubles de la repolarisation associés au LQT2 (Wilde et coll., 1999). Ces troubles surviennent au repos et notamment pendant le sommeil chez les patients présentant un syndrome de LQT3. Des observations fournies par le registre international du syndrome de QT long, suggèrent que la mortalité dépend du substrat génétique de la pathologie. Ainsi, la forme du syndrome associé à des mutations de SCN5A (LQT3) est celle pour laquelle le pronostique est le plus mauvais. Les patients LQT3 font peu de syncopes mais la survenue d'un épisode est beaucoup plus fréquemment mortelle que dans le cas des autres patients (Zareba et coll., 1998). A ce jour, la thérapie la plus efficace reste celle des ß-bloquants pour les formes les plus répandues de QT long (LQT1,LQT2 et LQT5). Pour les patients qui ne répondent pas à ce traitement, l'implantation d'un défibrillateur ou la dénervation sympathique du cœur gauche sont des alternatives couramment proposées (Antzelevitch et Oliva, 2006).

Syndrome	Gène	Protéine	Fonction
Romano-Ward			
LQT1	KCNQ1	KvLQT1	Courant I <sub>Ks</sub>
LQT2	KCNH2	hERG	Courant I <sub>Kr</sub>
LQT3	SCN5A	SCN5A	Courant I <sub>Na</sub>
LQT4	AnK2	Ankyrine B	Ancrage de canaux
LQT5	KCNE1	minK	
LQT6 Jervell&Lang-	KCNE2	mirp1	Courant I <sub>kr</sub>
Nielsen			
JLN1	KCNQ1	KvLQT1	Courant I <sub>Ks</sub>
JLN2 Andersen	KCNE1	minK	Courant I <sub>Ks</sub>
LQT7 Timothy	KCNJ2	Kir 2.1	Courant I <sub>K1</sub>
LQT8	CACNA1C	Cav1.2	Courant I <sub>Ca,L</sub>

#### Tableau 4: Syndromes de QT long congénitaux

## II.A.2 Le syndrome du QT long acquis

L'une des causes de syndrome du QT long acquis est celle de l'induction médicamenteuse. En effet, un certain nombre de médicaments cardiaques ou non cardiaques induisent un allongement de l'intervalle QT et peuvent pour certaines molécules être à l'origine de tachycardies ventriculaires et de mort subite (Escande, 2000). L'allongement de la durée de la repolarisation est aussi observé dans les cardiomyopathies dilatées (CMD) et hypertrophiques (CMH) (Roden et coll., 1996) ou associé à une bradycardie consécutive à un bloc auriculo-ventriculaire (Volders et coll., 1998).

### II.A.2.a Induction médicamenteuse

Des syncopes associées à un début de traitement à la quinidine étaient connues dès 1920, mais ce n'est que vers 1960 grâce aux suivis électrocardiographiques qu'un allongement du QT et des épisodes de tachycardie ventriculaire polymorphe (torsades de pointes) ont été identifiés comme mécanisme sous-jacent (Selzer et Wray,1964).

Un allongement de l'intervalle QT peut être aussi observé lors de l'administration de médicaments qui ne sont pas des anti-arythmiques. Ainsi, des molécules qui sont ou qui ont été couramment utilisées dans la pharmacopée humaine sont à l'origine d'allongements de l'intervalle QT associés à des torsades de pointes (Escande, 2000). Le rôle central du canal hERG dans ces mécanismes sera discuté dans le dernier chapitre (chapitre III). Nous verrons en détail la structure moléculaire de ce canal et les propriétés biophysiques qui en découlent. Puis, nous traiterons de sa sensibilité vis à vis d'une grande variété de molécules, et, des contraintes générées par cet effet indésirable dans le cadre du développement préclinique des médicaments.

### Les anti-arythmiques

Il existe plusieurs familles de médicaments pour traiter les troubles du rythme. La classification des anti-arythmiques de Vaughan-Williams, divise cette classe médicamenteuse en 4 groupes (Vaughan-Williams, 1970). Cette classification est basée sur l'action des anti-arythmiques sur le PA. Parmi ces agents, les molécules appartenant aux classes la (exemple: la quinidine) et III (exemple: methanesulfonanilides) allongent la durée de la repolarisation et peuvent être à l'origine d'épisodes de torsades de pointe (Selzer et Wray, 1964; Roden et coll., 1986).

### Anti-arythmique de classe la

Le principal représentant de cette catégorie est la quinidine. Elle agit en ralentissant la dépolarisation et la repolarisation par son action préférentielle sur les canaux Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup>. La quinidine est utilisée pour le traitement d'entretien et pour prévenir la récidive des troubles atriaux. La disopyramide est également un anti-arythmique de cette sous-classe qui est utilisée dans le traitement des troubles auriculaires et ventriculaires (Hancox, 2000). Cette

molécule a un effet préférentiel sur les canaux Na<sup>+</sup> (Grant et coll., 1996) mais inhibe aussi le courant  $I_{Kr}$  en système de ré-expression hétérologue (Paul et coll., 2001). Les antiarythmiques de classe la sont des molécules efficaces mais qui provoquent un allongement de l'intervalle QT dépendant de la dose, de la susceptibilité individuelle, et de la kaliémie (Escande, 2000). Ils font donc courir un risque élevé de torsades de pointe.

#### Anti-arythmique de classe III

Le mode d'action principal de ces molécules est l'inhibition des courants K<sup>+</sup> et plus particulièrement de I<sub>Kr</sub>. Parmi ces agents, les molécules de la famille des méthanesulfonanilides (E-4031, dofetilide, ibutilide) inhibent de manière spécifique le courant I<sub>Kr</sub> (Sanguinetti et Jurkiewicz, 1990; Carmeliet et coll., 1992; Jurkiewicz et Sanguinetti, 1993; Yang et coll., 1995b; Spector et coll., 1996b). Les anti-arythmiques de classe III sont indiqués aussi bien lors d'arythmie auriculaire que d'arythmie ventriculaire. La diminution des courants K<sup>+</sup> a deux effets: l'allongement de l'intervalle QT et par voie de conséquence une augmentation de la dispersion de l'intervalle QT qui, comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents sont des facteurs arythmogènes. Cette activité pro-arythmique des agents de classe III a été mise en évidence pour la première fois en 1995 lors de l'étude SWORD (Survival With Oral d-Soltalol). Cette étude clinique qui portait sur les effets du d-sotalol chez des patients en post-infarctus s'est révélée alarmante (Waldo et coll., 1996). En effet, le taux de mortalité chez les patients traités au d-sotalol était supérieur au groupe placebo. L'essai clinique a donc été arrêté.

A l'heure actuelle, l'amiodarone s'est révélée être l'anti-arythmique le plus efficace et le plus sûr dans la prise en charge des patients souffrant de troubles ventriculaires ou de fibrillation auriculaire (Nattel, 2003). En effet, cette molécule présente des effets pro-arythmiques modérés par rapport aux autres agents de la même classe. Cette particularité s'explique par un profil pharmacologique complexe car l'amiodarone présente aussi des effets de classe I (inhibiteur  $I_{Na}^+$ ), de classe II ( $\beta$  bloquant) et de classe IV (inhibiteur  $I_{Ca}^{2+}$ ). Ainsi, en traitement aigu, l'action de l'amiodarone est une action globale sur l'activité électrique cardiaque car elle ralentit la conduction, l'excitabilité des tissus cardiaques mais elle diminue aussi l'hétérogénéité transmurale de la repolarisation chez l'Homme (Drouin et coll., 1998) et chez le chien (Mérot et coll., 1999).

L'amiodarone est un dérivé benzofurane diiodé dont la structure présente certaines similarités avec celles des hormones thyroïdiennes (figure 11). Dans l'organisme, elle est métabolisée principalement en n-desethylamiodarone (n-DEA) par desalkylation. Les similarités structurales entre l'amiodarone, la n-DEA et les hormones thyroïdiennes suggèrent que cette molécule pourrait mimer les effets des hormones thyroïdiennes.

51



Figure 11: Structure de l'amiodarone et des hormones thyroïdiennes. D'après Newman et coll., 1998

De nombreuses études ont montré qu'un traitement chronique à l'amiodarone induit des changements électrophysiologiques en partie semblables à ceux observés dans l'hypothyroïdie. Ces effets sont la bradycardie, l'allongement de la repolarisation et des périodes réfractaires (Binah et coll., 1987; Sharp et coll., 1985). Plusieurs hypothèses ont été émises quant au mode d'interaction de l'amiodarone avec le métabolisme des hormones thyroïdiennes (pour revue Kodama, 1997). Il a été suggéré que l'amiodarone et son métabolite actif agirait directement sur l'expression des gènes codant pour les canaux ioniques en diminuant les taux plasmatiques de T3 et/ou en se fixant directement sur le récepteur nucléaire de T3 (Kodama , 1997; Drvota et coll., 1998). Certaines études se sont intéressées à cette hypothèse mais elles n'ont concerné qu'un nombre limité de canaux K<sup>+</sup> comme KvLQT1, hERG, Kv4.2 et Kv1.5 (Kodama et coll., 1999; Kamiya et coll., 2001b).

Nous avons traité pendant 6 semaines des souris avec plusieurs doses d'amiodarone (de 30, 90 et 180 mg/kg/jour d'amiodarone) afin de déterminer le profil des effets de cet antiarythmique sur l'expression des gènes codant pour l'ensemble des canaux ioniques cardiaques. L'objectif de cette étude, qui fait l'objet d'un article inclus dans cette thèse (Le Bouter, El Harchi et coll., 2004), était de **déterminer si l'effet chronique de l'amiodarone est dû en partie à un remodelage de l'expression des gènes codant pour les canaux ioniques**. L'exploration fonctionnelle de ce modèle a consisté à évaluer la répercussion de ces modifications d'expression sur un certain nombre de courants cibles de l'amiodarone ( $I_{Na}$ ,  $I_{Ca}$ ,  $I_{\kappa}$ ) pour une dose de 180 mg/kg/jour.

Les médicaments non-cardiaques

La mise en évidence du rôle de certains médicaments non-cardiagues dans l'induction d'allongement de l'intervalle QT et de torsades de pointes est plus récente (Priori, 1998). Les premiers cas rapportés étaient liés à la prise d'agents psychotropes comme le bepridil (Wooltorton et Mathie, 1993; Hohnloser, 1997). L'astemizole ou la terfenadine, qui sont des anti-histaminiques prescrits en traitement de fond, ont aussi été à l'origine de quelques cas de torsades de pointes (Zhou et coll., 1999; Woosley et coll., 1993). Bien que l'incidence de ces accidents rythmiques soient relativement basse, le risque encouru par rapport au bénéfice pour les patients présentant un allongement de l'intervalle QT est inacceptable. Ainsi, au cours des dix dernières années, l'utilisation de plusieurs médicaments non cardiaques a été restreinte et d'autres ont été retirés du marché (terfenadine, astemizole, grepafloxicin, terodoline, droperidol, lidoflazine, sertindole, levomethadyl et cisapride). Des listes répertoriant l'ensemble des molécules pouvant potentiellement allonger l'intervalle QT et /ou augmenter le risque de torsades de pointes sont disponibles sur de nombreux sites internet (http://www.torsades.org; http://www.fenichel.net; http://www.dml.georgetown.edu). Un inconvénient de ces listes est qu'elles ne distinguent pas les molécules en fonction de leur niveau de risque. Néanmoins, elles ont l'avantage d'être relativement exhaustives et de montrer que des molécules appartenant à des classes thérapeutiques très différentes peuvent avoir les mêmes effets secondaires cardiaques (Escande, 2000).

### II.A.2.b Conditions physiopathologiques

Les cardiopathies sont connues depuis longtemps pour altérer la fonction électrique cardiaque. L'allongement de l'intervalle QT associé à une bradycardie ou à une cardiomyopathie hypertrophique ou dilatée a été décrit dans de nombreux modèles animaux (Coulombe et coll., 1999; Tomaselli et Marban, 1999; Pinto et Boyden, 1999). L'altération des propriétés électriques des cardiomyocytes, ou remodelage électrique, serait en grande partie liée à une modification de l'expression des gènes codant pour les canaux ioniques (remodelage ionique). Elle peut aussi être consécutive à des altérations de l'homéostasie calcique comme c'est souvent le cas dans ce type de pathologie (Arai et coll., 1994; Morgan et coll., 1990).

Dans les modèles animaux mais aussi chez l'Homme, la diminution de la densité d'I<sub>to1</sub> est une constante (Oudit et coll., 2001; Beuckelmann et coll., 1993; Kaprielian et coll., 1999). Cette réduction associée à une sous-expression des canaux Kv4.2 et Kv4.3 apparaît précocement dans le processus pathologique ce qui suggère que ce courant joue un rôle clé dans l'initiation des cardiomyopathies (Huang et coll., 2000). Parallèlement, une augmentation des transitoires calciques et du courant  $I_{Ca,L}$  est fréquemment décrite (Bouchard et coll., 1995; Sah et coll., 2001). L'augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire permet dans un premier temps d'améliorer l'inotropisme cardiaque mais contribue aussi à l'activation de voies de signalisations impliquées dans les processus hypertrophiques (Wickenden et coll., 1998; Molkentin et coll., 1998).

#### Remodelage électrique dans les cardiomyopathies hypertrophiques et dilatées

L'hypertrophie et la dilatation sont des réponses adaptatives du cœur aux contraintes de pression et de volume. Elles sont associées à de nombreuses pathologies incluant l'insuffisance cardiaque, l'hypertension artérielle ou encore l'ischémie.

Dans l'hypertrophie, la réduction du courant K<sup>+</sup> transitoire sortant I<sub>to1</sub> est souvent observée. Cette diminution est largement due à une sous-expression des canaux Kv4.2 et Kv4.3 (Gidh-Jain et coll., 1996; Kaab et coll., 1998). L'altération transcriptionnelle de ces deux canaux est parfois partiellement compensée par une sur-expression de Kv1.4 (Matsubara et coll., 1993; Akar et coll., 2005) dont les caractéristiques biophysiques sont proches mais avec des cinétiques de réactivation nettement plus lentes. D'autres courants K<sup>+</sup> peuvent également être modifiés, mais de façon moins systématique que Ito1. Ainsi, le courant sortant retardé IK est soit diminué, comme chez le chat hypertrophié (Kleiman et Houser, 1989; 1990), soit inchangé, comme chez le cobaye (Ryder et coll., 1993) ou l'Homme en insuffisance cardiaque (Beuckelmann et coll., 1993). Les résultats concernant  $I_{K1}$  et son canal Kir2.1 varient également selon les modèles (pour revue Näbauer et Kääb, 1998). Enfin, dans les modèles d'hypertrophie induite chez les rongeurs, l'expression des canaux des courants K<sup>+</sup> rectifiants retardés, générés par les sous-unités a Kv1.2, Kv1.5 ou Kv2.1, peut être inchangée (Volk et coll., 2001; Takimito et coll., 1997) ou au contraire diminuée (Lee et coll., 1999). Selon les modèles, le courant I<sub>sus</sub> qui, chez la souris correspond à la sommation des courants I<sub>K, slow1</sub>, I<sub>K, slow2</sub> et I<sub>ss</sub> (Fiset et coll., 1997), peut être augmenté (Petrashevskaya et coll., 2002) ou au contraire diminué (Dong et coll., 2003; Kaprielian et coll., 1996; Thuringer et coll., 1996). Ces disparités entre les différents modèles dépendraient de la sévérité de l'hypertrophie (Wolk et coll., 2003). En effet, Dong et coll. ont observé dans leur modèle d'hypertrophie induite par une sur-expression de la calcineurine chez la souris, une

diminution de  $I_{to,f}$ ,  $I_{to,s}$  et  $I_{K,slow}$  (Dong et coll., 2003) alors que dans le même type de modèle Petrashevskaya et coll. ont observé uniquement une diminution de  $I_{to}$  (Petrashevskaya et coll., 2002). Une des différences majeures entre ces deux études est que dans l'étude de Dong l'hypertrophie est beaucoup plus sévère que dans le modèle de Petrashevskaya ce qui suggère que ce processus est lié ou influe sur le remodelage électrique.

Les perturbations de l'homéostasie calcique tiennent un rôle central dans le processus hypertrophique (Frey et coll., 2000; Wickenden et coll., 1998). Dans les modèles animaux, une augmentation des transitoires calciques (Wickenden et coll., 1998) ainsi que l'augmentation de  $I_{Ca,L}$  sont classiquement observées (Armoundas et coll., 2001). La variation de  $I_{Ca,L}$  est en relation directe avec la sévérité de l'hypertrophie. Une hypertrophie modérée est caractérisée par une augmentation notable d'  $I_{Ca,L}$  alors que dans l'hypertrophie sévère,  $I_{Ca,L}$  est invariant voir diminué (Armoundas et coll., 2001). Le courant d'échange Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> est généralement diminué alors que le niveau de transcrit et/ou de protéine NCX peut être augmenté (Wang et coll., 2001). Cette dissociation entre le niveau de protéine et l'activité de l'échangeur est liée au fait que ce courant d'échange est fortement dépendant du pH et des concentrations en Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> et ATP intracellulaires, dont les régulations sont perturbées dans ce type de pathologie (Armoundas et coll., 2003).

Dans les cardiomyopathies dilatées, le remodelage électrique observé est généralement similaire au remodelage électrique associé à l'hypertrophie. Ainsi, la sous-expression des canaux K<sup>+</sup> associée à l'allongement de l'intervalle QT est retrouvée dans de nombreux modèles. Cependant, les variations d'expression des canaux Ca<sup>2+</sup> de type L est plus controversée (Less et coll., 1999; Bodi et coll., 2003). En effet, de nombreuses études décrivent un allongement de l'intervalle QT associé à une réduction de I<sub>to1</sub> sans modification du courant Ca<sup>2+</sup> (Kaab et coll., 1996; Rozanski et coll., 1997; Pacioretty et coll., 1994).

### Remodelage électrique et bradycardie consécutive à un bloc auriculo-ventriculaire

D'une manière générale, la bradycardie chronique est à l'origine d'un allongement de l'intervalle QT associé à une susceptibilité accrue aux torsades de pointes et à un risque élevé de mort subite (Kurita et coll, 1992). Ce type de complication est observé chez des patients présentant un bloc auriculo-ventriculaire (BAV) complet qu'il soit de nature congénitale ou acquise (Sholler et Walsh, 1989; Gladman et coll, 1996). L'adaptation intrinsèque du cœur à la dissociation électrique entre les oreillettes et les ventricules se traduit par l'émergence de foyers ectopiques au sein du réseau de His-Purkinje. Le rythme idioventriculaire généré est plus lent que le rythme sinusal et donc inadéquat à une fonction efficace des ventricules. Cette défaillance évolue généralement vers l'hypertrophie

ventriculaire et est associé à un allongement de l'intervalle QT. La conséquence ultime de ce processus est l'insuffisance cardiaque (Vos, 2005).

Les premiers modèles animaux en BAV complet ont été développés dès le début du  $20^{\text{ème}}$  siècle (Erlanger et Blackman, 1910). De tous les modèles animaux, le chien est le plus utilisé car il a l'avantage de bien supporter le BAV. Contrairement aux petits animaux, il ne développe pas d'épisodes spontanés d'arythmies mais une susceptibilité accrue aux torsades de pointes après administration d'agents pro-arythmiques (Tsuji et coll, 2002). Chez le chien, le remodelage électrique observé est antérieur au processus hypertrophique et est principalement dû à une diminution des courants K<sup>+</sup> à rectification retardée (I<sub>Kr</sub>, I<sub>Ks</sub>) et à une augmentation du courant d'échange Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (Sipido et coll, 2000). En revanche, aucune variation de la densité du courant I<sub>to</sub> ou de I<sub>K1</sub> n'est observée (Volders, 1999). Chez le lapin, il est observé en outre une augmentation de la densité de I<sub>K1</sub> (Suto et coll, 2005). Dans ce dernier modèle, l'importance du remodelage électrique est proportionnel à l'ampleur de la bradycardie (Suto et coll, 2005) et n'est pas une conséquence de l'hypertrophie qui apparaît plus tardivement.

Nous avons développé un nouveau modèle de BAV complet chez la souris pour déterminer la cinétique d'apparition des différents processus et caractériser à large échelle le remodelage ionique associé. Cette étude génomique n'avait à ce jour jamais été réalisée dans les autres modèles animaux dont le génome n'est pas entièrement séquencé. En outre, dans ce modèle, nous avons voulu vérifier si la variation du courant repolarisant majoritaire (I<sub>to</sub>) est à l'origine où apparaît parallèlement au processus hypertrophique. Cette étude fait l'objet d'un article inclus dans cette thèse et fera l'objet d'une discussion ultérieure (Bignolais et coll., soumis).

### Rôle du remodelage électrique dans l'induction du processus hypertrophique

Dans l'hypertrophie, la surcharge calcique intracellulaire générée déclenche l'activation de plusieurs kinases et phosphatases impliquées dans des processus mitotiques (Vlahos et coll., 2003). Parmi les phosphatases, la calcineurine a été identifiée comme l'une des voies impliquées dans l'initiation de l'hypertrophie chez la souris (Molkentin et coll., 1998). La calcineurine est une phosphatase dépendante du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire. Elle déphosphoryle le facteur de transcription NFATc3 ("Nuclear Factors in Activated T cells") qui peut être alors transloqué dans le noyau où il interagit avec d'autres facteurs de transcription comme GATA4. Cette interaction permet la transcription de gènes impliqués dans le processus hypertrophique (Molkentin et coll., 1998). Dans une étude récente, il a été montré que l'activation de la voie de la calcineurine est à l'origine d'une sous-expression du gène Kv4.2 dans des cardiomyocytes de rats en culture (Perrier et coll., 2004). Dans ce modèle, les

auteurs ont montré que l'augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire via les canaux Ca<sup>2+</sup> de type L est à l'origine de la diminution du niveau de l'ARNm de Kv4.2. Cette réduction est prévenue par un pré-traitement avec un inhibiteur de la calcineurine (FK506) mais pas avec un inhibiteur de la calmoduline Kinase II, ce qui suggère que dans ce modèle l'expression de Kv4.2 est principalement dépendante de la voie de la calcineurine. Chez la souris, il a été montré que le gradient transmural ventriculaire d'Ito, est lié à l'expression différentielle de la calcineurine. En effet, son activité ainsi que celle du facteur de transcription NFATc3 sont plus importantes dans l'endocarde que dans l'épicarde alors que l'amplitude de l<sub>to,f</sub> est plus importante dans l'épicarde que dans l'endocarde. D'après les auteurs de cette étude, la voie calcineurine/NFATc3 participerait au gradient transmural de Ito, f en diminuant l'expression de Kv4.2 dans les couches cellulaires où son activité est la plus faible (Rossow et coll., 2006). L'ensemble de ces résulats suggèrent qu'I<sub>to</sub> et le processus hypertrophique seraient liés via la voie de la calcineurine. Le rôle de l<sub>to,f</sub> dans l'induction du processus hypertrophique est suspectée depuis longtemps mais reste très controversée (pour revue, Sanguinetti, 2002). En effet, dans certains modèles animaux, une dissociation entre la variation de I<sub>to,f</sub> et l'hypertrophie est clairement suggérée (Kuo et coll., 2001; Guo et coll., 2005). A l'inverse, d'autres modèles montrent que l'apparition du processus hypertrophique dépend des variations de l<sub>to,f</sub> et il a été montré que cette relation dépend de la voie de la calcineurine (Wickenden et coll., 1999; De Windt et coll., 2000; Sah et coll., 2002; Rossow et coll., 2004; Lebeche et coll., 2004; 2006). Ainsi, les modifications de l'homéostasie calcique, en modulant l'expression d'un certain nombre de canaux, participe au remodelage ionique et contribuent de manière indirecte à l'allongement de l'intervalle QT.

## **II.B LE SYNDROME DU QT COURT**

Le syndrome du QT court se caractérise à l'ECG par un intervalle QT inférieur à 300 ms. Depuis 2000, différentes études ont montré que ce syndrome représente un facteur de risque important pour la survenue de troubles du rythme ventriculaires (fibrillation ventriculaire) et atteint surtout les jeunes enfants et les adolescents (Algra et coll, 1993; Davies, 1999; Gussak et coll, 2002). En 2004, deux mutations faux-sens sur le gène *KCNH2* (hERG) ont été identifiées dans deux familles présentant un syndrome de QT court héréditaire (Brugada et coll, 2004). Ces deux mutations aboutissent à la même substitution N588K au niveau du pore du canal hERG. La ré-expression hétérologue de ce mutant est à l'origine d'un courant qui ne s'inactive pas et qui présente une cinétique de désactivation accélérée. Ce gain de fonction contribue à l'accélération de la repolarisation et donc au raccourcissement de l'intervalle QT. Dans une troisième famille, aucune mutation sur hERG

n'a pu être mise en évidence suggérant que ce syndrome est probablement génétiquement hétérogène. En effet, deux autres études ont identifié des mutations sur deux autres canaux. La première réalisée au laboratoire rapporte le cas d'un patient sujet à des épisodes de fibrillation ventriculaire idiopathique et présentant un intervalle QT anormalement court (Bellocq et coll, 2004). Chez ce patient, une mutation a été identifiée sur le gène *KCNQ1*. Il s'agit de la mutation V307L qui est une mutation gain de fonction. Dans un système de ré-expression hétérologue, la co-expression de la protéine KvLQT1 mutée et de la sous-unité régulatrice minK est à l'origine d'un courant dont la cinétique d'activation est fortement accélérée et un déplacement du potentiel de demi-activation pour des potentiels plus négatifs est également observé. Plus récemment, le cas clinique d'une petite fille présentant un QT court et une onde T asymétrique à l'enregistrement électrocardiographique a été rapporté (Priori et coll, 2005). L'analyse génétique a permis d'identifier une mutation sur le gène *KCNJ2* (G514A). Cette mutation est une mutation gain de fonction du courant l<sub>K1</sub> qui modélisée informatiquement est à l'origine d'une accélération de la phase tardive de la repolarisation.

## II.C MECANISMES IONIQUES À L'ORIGINE DES TROUBLES DU RYTHME ASSOCIÉS AUX ANOMALIES DE LA REPOLARISATION

D'un point de vue clinique, la principale manifestation d'un syndrome de QT long, outre l'allongement anormal de la repolarisation, réside dans la survenue de torsades de pointes (TdP) pouvant aboutir à la mort subite. Le nom de «torsade de pointes» a été utilisé pour la



première fois par Dessertenne en 1966 (Dessertenne, 1966). Il désigne une arythmie ventriculaire polymorphe caractérisée par une succession de complexes QRS d'amplitude variable. Le terme de «torsades de pointes» a été choisi pour rendre compte de la morphologie de l'onde R qui donne aux salves de tachycardies un aspect de torsion autour de la ligne isoélectrique. La fréquence de cette tachycardie est assez variable, de l'ordre de 160 à 330 bpm, et sa résolution spontanée est fréquente. Cependant, il arrive parfois qu'elle se dégrade en fibrillation ventriculaire (Figure 12).

## Figure 12: Exemples typiques d'enregistrements électrocardiographiques d'un rythme sinusal dégradé en torsades de pointes.

La fibrillation ventriculaire peut aussi être une conséquence de l'émergence au sein du myocarde de circuits de réentrées fonctionnels. Les réentrées sont des anomalies de la conduction relativement complexes qui se propagent dans le tissu cardiaque sous forme d'onde simple (tachycardie ventriculaire) ou d'ondes multiples (fibrillation ventriculaire)

(figure 13). Ces ondes provoquent des réactivations aberrantes du myocarde et sont favorisées par l'hétérogénéité de la durée des périodes réfractaires et des PA. Leur initiation est liée aux phénomènes d'alternances de la durée des PA qui correspond à un déséquilibre du mécanisme de restitution de la durée du PA (Gilmour, 2003).



Figure 13: Hypothèse de l'évolution de l'onde de dépolarisation d'un rythme sinusal physiologique (NSR) vers la tachycardie ventriculaire (VT) et la fibrillation ventriculaire (VF). Gilmour (2003).

# II.C.1 Torsades de pointes et syndrome de QT long

## II.C.1.a Origines des torsades de pointes

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la pathogenèse des torsades de pointes. L'hypothèse majeure est celle du groupe d'Antzelevitch.

Dans le syndrome de QT long, les torsades de pointes sont induites par des activités déclenchées liées à l'apparition de post-dépolarisations précoces : les EAD (Early After Depolarization). Ces post-dépolarisations sont une conséquence directe de la réduction des courants ioniques repolarisants. Selon Antzelevitch, ces variations ioniques accentueraient de manière excessive l'hétérogénéité intrinsèque de la repolarisation existant au sein du myocarde ventriculaire. Cette hétérogénéité serait liée à la présence des cellules M dont le PA est allongé par rapport aux autres cellules ventriculaires. Dans un contexte de QT long congénital ou acquis, cette caractéristique des cellules M serait à l'origine d'une amplification de la dispersion transmurale de la repolarisation et des périodes réfractaires. Ce mécanisme fournirait ainsi un substrat aux blocs de conduction et aux phénomènes de réentrées assurant l'auto-entretien et la propagation de l'arythmie au sein du myocarde (Antzelevitch, 2005).

La bradycardie joue aussi un rôle capital dans la genèse des torsades de pointes (Kurita et coll, 1992). En effet, plus le rythme cardiaque est lent et plus la durée de la repolarisation

ventriculaire est allongée. Dans un contexte de bradycardie, la survenue de torsades de pointes peut être favorisée par l'hypokaliémie ou par l'administration d'agents proarythmiques (Viskin, 1999). En revanche, dans le cas des bradycardies consécutives à un BAV complet des épisodes spontanés de torsades de pointes sont observés (*cf.* § II.A.2.b). Enfin, la bradycardie par son effet sur l'intervalle QT et la durée des périodes réfractaires accentue l'hétérogénéité de la repolarisation ventriculaire, ce qui, comme nous venons de le voir est un facteur arythmogène important.



**Figure 14: Théorie du mécanisme d'induction des torsades de pointes dans le syndrome de QT long** CMH=cardiomyopathie hypertrophique, CMD=cardiomyopathie dilatée, EAD=post-dépolarisation précoces, cellules M=cellules du midmyocarde,

II.C.1.b Mécanismes ioniques à l'origine des torsades de pointes : les EADs

Les EADs prennent naissance le plus souvent dans le réseau de Purkinje ou dans la région sous-épicardique du myocarde ventriculaire riche en cellules M, dont les PA sont les plus longs et les plus sensibles à la fréquence cardiaque (Antzelevitch et coll., 1991)

Une EAD est une dépolarisation du potentiel membranaire qui survient avant la fin de la repolarisation et induit une interruption ou un retard de la repolarisation normale du PA (Cranefield, 1977, Cranefield et Aronson, 1991). Les oscillations du potentiel de membrane surviennent soit à la fin du plateau du PA, soit au cours de la phase rapide de la repolarisation (figure 15). Dans le premier cas, les EAD sont portées par le courant Na<sup>+</sup>

 $(I_{Na,late})$ , l'échangeur Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> et par le courant entrant non spécifique activé par le Ca<sup>2+</sup>. Dans le second cas, elles sont portées par le courant Ca<sup>2+</sup> de type L.

De nombreuses observations expérimentales (Sicouri et coll., 1994) ainsi que des modèles informatiques (Luo et Rudy, 1994) ont permis de montrer que les conditions qui tendent à augmenter la durée du PA favorisent l'émergence d'EAD. Ainsi, les patients atteints du syndrome de QT long sont potentiellement plus susceptibles de déclencher des troubles du rythme par la survenue d'EAD.





II.C.2 Rôle du phénomène d'alternance dans la genèse des troubles du rythme

La durée du PA est fortement dépendante de l'intervalle diastolique qui le précède. En effet, plus l'intervalle diastolique est court et plus la durée du PA qui suit sera courte et inversement. Cette relation dynamique correspond au concept de restitution de la durée du PA (Nolasco et Dahlen, 1968) (figure 16). Elle se caractérise par une droite dont la pente p donne une indication sur la survenue de troubles du rythme. Ainsi, lors d'une stimulation à fréquence élevée, si  $p \ge 1$ , une alternance d'amplitude et/ou de morphologie des PA est observée d'un cycle cardiaque à l'autre. Ces variations sont source d'une grande instabilité électrique et peuvent être le précurseur d'arythmies comme la fibrillation ventriculaire en favorisant les circuits de réentrée (Pastore et coll., 1999). Ce phénomène d'alternance serait dû principalement aux variations du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire et des amplitudes de  $I_{Ca}$  et de  $I_{K}$  (Fox et coll., 2002).



**Figure 16: Principe de restitution de la durée du PA. (**a)définition de la durée du PA (APD), de l'intervalle diastolique (DI), de la durée d'un cycle cardiaque (CL). La durée du n+1 ème PA ( $APD_{n+1}$ ) est une fonction de l'intervalle diastolique qui le précède ( $Dil_n$ ).(b) graphique représentant la relation entre la durée du PA( ordonnée) en fonction de la durée de l'intervalle diastolique précédent (abscisse). (c) graphique représentant la relation entre la durée du PA (ordonnée) et la durée du cycle (abscisse) X : cycle physiologique, •: durée de l'APD au cours de PA courts,  $\circ$ : durée de l'APD au cours de PA longs. **D'après Gilmour (2003).** 

#### II.C.2.a Rôle des courants K<sup>+</sup>

Dans son modèle informatique du PA ventriculaire, l'équipe de Gilmour a montré que les alternances de la durée de la repolarisation peuvent être supprimées en augmentant l'amplitude des courants  $I_{K1}$ ,  $I_{Kr}$  et  $I_{Ks}$  (Fox et coll., 2002). Sur le plan expérimental, la surexpression du canal hERG par transfection adénovirale dans les myocytes ventriculaires de chien supprime l'apparition des alternances lors de cycles rapides de stimulation (Hua et coll., 2004). L'augmentation de  $I_{Kr}$  semble donc avoir un effet anti-arythmique certain, notamment pour des rythmes cardiaques rapides. Chez la souris transgénique surexprimant le canal hERG, nous avons également observé cet effet protecteur. L'article publié en 2004 est inclus dans cette thèse et fera l'objet d'une discussion ultérieure (Royer, Demolombe et coll., 2005).

## II.C.2.b Rôle du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire

Le rôle prépondérant du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire et de sa régulation dans la genèse des alternances est défendue principalement par les travaux de l'équipe de David Eisner (pour revue: Eisner et coll., 2006). Dans des conditions physiologiques, le Ca<sup>2+</sup> qui pénètre par les canaux Ca<sup>2+</sup> de type L va activer les récepteurs à la ryanodine, qui sont des canaux Ca<sup>2+</sup> exprimés à la surface du RS. Cette activation permet la libération des stocks de Ca<sup>2+</sup> du RS. Le Ca<sup>2+</sup> est ensuite soit recapté dans le reticulum par la SERCA2 soit extrudé de la cellule par l'échangeur Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (figure 17A). Dans des conditions d'instabilité du niveau de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire, ce mécanisme de rétrocontrôle est défaillant et le stock de Ca2+ du RS varie d'un cycle à l'autre. Ces variations peuvent être dues à une diminution de la quantité de Ca<sup>2+</sup> recapté par l'échangeur Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>, la conséquence directe étant une augmentation du niveau de Ca<sup>2+</sup> disponible pour le battement suivant, et donc une contraction beaucoup plus large. Au cycle suivant, les stocks du réticulum étant faible, la transitoire calcique résultante ne permet pas le déclenchement d'une contraction efficace permettant ainsi la reconstitution des stocks du reticulum (figure 17B). Une autre cause des alternances du Ca<sup>2+</sup> pourrait être liée à une perte de synchronisme entre la recapture par la SERCA2 et le relarguage du Ca<sup>2+</sup> par les récepteurs à la ryanodine. Ce défaut pouvant être la conséquence d'un délai dans la diffusion du Ca2+ au sein du réticulum ou à une levée d'inactivation des récepteurs à la ryanodine beaucoup plus lente (Kodama et coll., 2004).

Les canaux  $Ca^{2+}$  de type L participent aussi aux mécanismes d'alternances électriques. En effet, durant un intervalle diastolique long, les canaux  $Ca^{2+}$  de type L sont totalement réactivés et le courant résultant augmente d'autant la durée du plateau du PA. La conséquence principale de cette augmentation est une libération massive de  $Ca^{2+}$  par le réticulum sarcoplasmique qui va inactiver les canaux  $Ca^{2+}$ . Ce PA long est suivi par un intervalle diastolique court au cours duquel la levée d'inactivation des canaux  $Ca^{2+}$  est partielle. Le courant résultant l<sub>Ca</sub> est faible et est à l'origine du raccourcissement de la phase de plateau du PA qui suit. Cette réduction de la phase de plateau permet la reconstitution du stock  $Ca^{2+}$  du reticulum sarcoplasmique. Un nouveau cycle peut alors démarrer (Gilmour, 2003).



Figure 17: Régulation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire en condition physiologique (A) et en condition d'alternance électrique (B). D'après Eisner DA. et coll. (2006)

# III. HERG ET LE SYNDROME DU QT LONG ACQUIS : UNE CIBLE PRIVILÉGIÉE DES AGENTS PHARMACOLOGIQUES

Chez l'Homme, la phase de repolarisation du PA ventriculaire est largement dépendante du courant K<sup>+</sup> retardé I<sub>K</sub> dont les deux composantes principales sont les courants I<sub>Kr</sub> et I<sub>Ks</sub>. Ces deux courants peuvent être facilement différenciés sur la base de leurs propriétés biophysiques et pharmacologiques. I<sub>Kr</sub> est la composante de I<sub>K</sub> sensible à l'agent antiarythmique de classe III E-4031 (Sanguinetti et Jurkiewicz., 1990). Dans le chapitre précédent, nous avons vu que le rôle critique de hERG dans la repolarisation apparaît soit dans un contexte de mutations du gène *KCNH2* (syndrome du QT long congénital) soit lors du blocage du canal par des agents pharmacologiques (syndrome du QT long acquis). L'inhibition d'I<sub>Kr</sub> par de fortes doses d'agents pharmacologiques comme la quinidine et le sotalol est connue depuis longtemps. D'autres médicaments non cardiaques comme des antihistaminiques, des antibiotiques ou encore des antipsychotiques présentent cet effet secondaire indésirable et peuvent être à l'origine d'arythmies ventriculaires et de mort subite (Haverkamp et coll., 2000). Cette caractéristique de hERG serait due en partie à la structure de son pore différente de celle des autres canaux K<sup>+</sup> dépendant du potentiel.

Dans cette dernière partie introductive, nous verrons d'abord comment la structure moléculaire de ce canal explique les propriétés biophysiques et pharmacologiques uniques du courant  $I_{Kr}$ . Puis, nous traiterons de la sensibilité de hERG vis à vis d'une grande variété de molécules et des contraintes générées par cet effet indésirable dans le cadre du développement pré-clinique des médicaments. Enfin, un paragraphe sera consacré aux développements actuels des tests de screening à haut débit des inhibiteurs de hERG.

## **III.A RELATION STRUCTURE - FONCTION**

Le courant  $I_{Kr}$  s'active pour un potentiel seuil de –50 mV environ et atteint son maximum pour un potentiel de 0 mV (Sanguinetti et coll., 1995). Au delà, la relation courant-potentiel de  $I_{Kr}$ présente une réduction de pente caractéristique (figure 18). Ce phénomène est une conséquence directe du processus d'inactivation du canal (Spector et coll., 1996a).



**Figure 18: Relation courant potentiel du courant I**<sub>kr</sub>**. A et B.** Enregistrements obtende du courant (mV) au ré-expression hétérologue dans l'ovocyte de xénope. La membrane de l'ovocyte est stimulée avec des sauts de potentiel de 4 s entre –50 mv et +40 mV. Par souci de clarté, les traces entre –50 mV à –10 mV (A) et 0 à + 40 mV (B) ont été représentées séparément .C. Relation courant-potentiel obtenue à parti des enregistrements en A et B. **D'après Sanguinetti et coll., 1995** 

L'inactivation du canal se produit pour des potentiels plus négatifs que ceux nécessaires à son activation (V<sub>0.5 inactivation</sub>  $\approx$  - 85 mV; V<sub>0.5 activation</sub>  $\approx$  - 20 mV). Cette propriété particulière limite la contribution du courant I<sub>Kr</sub> dans la phase de plateau du PA ventriculaire mais lui donne un rôle crucial lors de la phase tardive de la repolarisation. En effet, au cours de la phase 2 de la repolarisation, le canal est inactivé et c'est seulement en début de phase 3 que la réactivation du courant est suffisante pour influer sur le décours de la repolarisation. Au cours de la phase tardive, le retour progressif vers des potentiels membranaires plus électronégatifs favorise la désactivation du courant (figure 19).



**Figure 19: PA-clamp ventriculaire.** Courant E-4031 sensible typique (bleu) obtenu après la stimulation d'une cellule COS-7 transfectée avec le canal hERG. La stimulation correspond à un PA ventriculaire humain (tracé noir) (PCL=1000ms). **D'après Royer et coll., 2005**.

Sur la base des propriétés du courant unitaire, un modèle cinétique du fonctionnement du canal a été proposé (Kiehn et coll., 1998). Dans ce modèle, hERG présente 3 configurations fermées (notées de C1 à C3), une configuration ouverte (O) et une configuration inactivée (I). Les transitions entre ces différentes configurations se font selon des mécanismes dépendant du potentiel (figure 20).



Figure 20: Modèle de Markov des différentes configurations du canal hERG. D'après Clancy et Rudy, 2001.

Les changements conformationnels ("gating") mis en jeu lors de ces transitions ont été étudiés par des expériences de fluorimétrie (Smith et Yellen, 2002). Dans ces expériences, une sonde fluorescente marquant 3 résidus consécutifs situés à l'extrémité N-terminale du segment S4 a permis de corréler les mouvements du "voltage-sensor" aux propriétés du courant ionique. Les auteurs de ce travail distinguent deux cinétiques de variation de fluorescence:

- une composante rapide qui correspond aux cinétiques d'inactivation et de levée d'inactivation (transition O-I)
- une composante lente corrélée aux cinétiques d'activation et de désactivation du canal (transition O-C)

Ces processus d'activation / désactivation et d'inactivation / levée d'inactivation dépendent de réarrangements moléculaires précis entre différents domaines de la sous-unité α.

## III.A.1 Structure de la sous-unité α

Le canal hERG appartient à la superfamille des canaux K<sup>+</sup> à six segments transmembranaires et un pore (*cf.* § I.B.3.b). Comme tous les canaux K<sup>+</sup> dépendant du potentiel, chaque sous-unité  $\alpha$  se subdivise en deux modules fonctionnels. Le premier module, ou module S1-S4, est à l'origine de la détection des variations du potentiel membranaire. Cette fonction est assurée principalement par le segment S4 ou "voltage-sensor" qui possède 7 acides aminés chargés positivement répartis le long du segment S4 tous les 3 à 4 résidus (Tseng, 2001). Le second module est constitué des hélices S5-S6 reliées par une boucle P. Au sein du tétramère, les quatre modules S5-S6 se font face et
délimitent le pore du canal du côté extracellulaire. L'extrémité intracellulaire du pore ou vestibule est délimitée par les extrémités C-terminales des hélices α S6 (Mitcheson et coll., 2000a).



Figure 21 : Topologie de la sous-unité  $\alpha$  du canal hERG.

## III.A.1.a Le pore

Le filtre de sélectivité Thr-Val-Gly-Tyr-Gly des canaux K<sup>+</sup> dépendant du potentiel est localisé au niveau de l'extrémité C-terminale de la boucle P soit du côté extracellulaire du pore. (Long et coll., 2005a). Dans le canal hERG, la thréonine est substituée par une sérine et la tyrosine par un résidu phénylalanine (Ser-Val-Gly-Phe-Gly). Ces substitutions sont sans conséquence sur la perméabilité aux ions K<sup>+</sup> (Sanguinetti et Tristani-Firouzi, 2006). Cependant, d'autres mutations de cette séquence sont à l'origine d'une perte de sélectivité du canal au K<sup>+</sup> (Lees-Miller et coll., 2000; Teng et coll., 2003).

Une autre particularité du pore de ce canal est l'absence du motif pro-X-pro qui est présent au sein du pore des autres canaux Kv et permet une courbure de l'hélice S6. Dans son étude de cristallisation du canal Kv1.2, l'équipe de MacKinnon a identifié ce motif comme un des éléments du pore qui participe au mécanisme de couplage entre le pore et le "voltagesensor " (Long et coll., 2005b) (*cf.* § I.B.1). En lieu et place de ce motif, hERG possède la séquence IIe-Phe-Gly. L'introduction du motif pro-X-pro dans le pore de hERG est à l'origine d'un courant qui ne se désactive pas et qui est moins sensible aux inhibiteurs de hERG (Fernandez et coll., 2004). Ces résultats suggèrent que la séquence IIe-Phe-Gly est capitale au bon fonctionnement du canal. La perte de sensibilité pharmacologique étant probablement due, selon les auteurs, aux changements conformationnels déficients au sein du canal muté.

Au sein du pore se trouvent des résidus qui constituent la base structurale des mécanismes d'inhibition par les agents pharmacologiques. Ces résidus sont situés au niveau du segment S6 (Tyr652, Phe 656) et de la boucle P (Thr623 et Ser624) (Kamiya et coll., 2006). La mise en évidence de l'implication de ces acides aminés dans l'inhibition pharmacologique de hERG ainsi que les mécanismes d'interactions entre ces résidus et différentes molécules seront discutés dans le chapitre suivant.



Figure 22: Localisation des résidus Tyr-652 et Phe-656 dans le domaine de S6 et alignement des acides aminés de ce segment pour hERG et d'autres canaux Kv. Fernandez et coll., 2004

## III.A.1.b Voltage-sensor

Dans l'étude de Smith et Yellen, l'analyse par fluorimétrie du déplacement du segment S4 suggère qu'il existe deux types de mouvements (lents et rapides) du segment S4, et que ces mouvements précèdent l'ouverture du canal (Smith et Yellen, 2002). La composante lente du déplacement du S4 lors de la dépolarisation est le facteur limitant associé aux cinétiques lentes d'activation et de désactivation du courant. Des expériences de mutagenèse dirigée sur les arginines et les lysines du segment S4 ont permis de mettre en évidence le rôle

particulier des acides aminés R531 et R534 dans la stabilisation du canal à l'état ouvert, l'acide aminé K525 étant plutôt impliqué dans la stabilisation du canal à l'état fermé (Subbiah et coll., 2004). Les segments S1 et S2 participeraient aussi à ces mécanismes. En effet, la substitution par des cystéines de certains résidus chargés négativement induit, lors d'un traitement par le DTT (dithiothreitol), des modifications importantes des processus d'activation et de désactivation (Liu et coll., 2003).

### III.A.2 Extrémités N et C-terminales

#### L'extrémité N-terminale

La boucle N-terminale de la sous-unité  $\alpha$  comporte un domaine PAS (PAS: acronyme des noms des produits des gènes *Per, Arnt, Sim*) qui est une structure tertiaire de 135 acides aminés composée d'hélices  $\alpha$  et de feuillets  $\beta$ . Ce motif est connu pour être impliqué dans les mécanismes d'interactions protéines-protéines qui participent notamment aux processus de régulation transcriptionnelle chez les eucaryotes (Morais Cabral et coll., 1998). Dans le canal hERG, cette structure n'aurait vraisemblablement pas ce type de fonction mais serait plutôt impliquée dans la tétramérisation et le contrôle du transport de la protéine vers la membrane plasmique. Une mutation de ce domaine (T65P) est en effet associée à une rétention des canaux mutés dans les compartiments intracellulaires (Paulussen et coll., 2002). En outre, ce motif interagirait directement avec la boucle intracellulaire S4-S5 et participerait ainsi au processus de désactivation du courant (Chen et coll., 1998).

#### L'extrémité C-terminale

L'extrémité C-terminale comporte un domaine de liaison aux nucléotides cycliques (CNBD). Des mutations dans ce domaine sont à l'origine d'une rétention des canaux mutés dans les compartiments intracellulaires (Akhavan et coll., 2005). Cependant, la fixation de l'AMPc sur ce site ne provoque qu'une légère variation de la dépendance au potentiel de l'activation (Cui et coll., 2000). Les nucléotides cycliques ne participeraient donc pas à la régulation de l'activation de l'activation de hERG.

D'un point de vue structural, la présence de ce domaine suggère que hERG se rapprocherait du canal eag de la drosophile. En effet, le canal eag est un canal K<sup>+</sup> dépendant du potentiel à 6 segments transmembranaires et un pore dont la structure est proche de celle de hERG (le canal eag comme hERG ne possède pas le motif pro-X-pro des canaux K<sup>+</sup> dépendant du potentiel) (Sanguinetti et Mitcheson, 2005). Il possède un site de fixation aux nucléotides

cycliques mais, contrairement à hERG, son activation est modulée par l'AMP<sub>c</sub> (Brüggemann et coll., 1993). Ces deux canaux eag et hERG pourraient dériver d'un ancêtre commun avec les canaux sensibles aux nucléotides cycliques (CNG) (Jan et Jan, 1992). Les canaux CNG conduisent préférentiellement le Na<sup>+</sup> et le Ca<sup>2+</sup> et participent aux mécanismes de transduction sensorielle dans les systèmes olfactif et visuel. Ils comportent 6 segments transmembranaires, une boucle P et un segment S4 alors que leur activation est totalement indépendante du potentiel (Jan et Jan., 1990). Dans leur étude de 1997, Tang et Papazian se sont intéressés au segment S4 des canaux CNG. Leur but était de comprendre pourquoi ce segment n'assure pas la fonction de "voltage-sensor" alors qu'il présente une structure riche en acides aminés chargés positivement. Ils ont ainsi démontré que le segment S4 du canal rolf ("rat olfactory channel") assure une fonction de "voltage-sensor" quand il est introduit en lieu et place du segment S4 du canal eag (Tang et Papazian., 1997). En revanche, la substitution de la boucle S3S4 de eag par la boucle S3S4 de rolf est à l'origine d'un déplacement de la courbe d'activation du courant vers des potentiels hyperpolarisés. Cette déstabilisation de l'état ouvert du canal serait due principalement en partie à un résidu localisé en position 345 de la boucle S3S4 de eag. En effet, la neutralisation de l'arginine 345 (substitution A345R ou A345E) induit une déstabilisation de l'état ouvert du canal ce qui se traduit par une activation pour des potentiels membranaires plus négatifs que pour le canal sauvage (figure 23). Ainsi, dans le canal eag, la boucle S3S4 jouerait un rôle important dans la régulation des mécanismes de transduction des mouvements du "voltage-sensor".



**Figure 23: Traces de courants typiques obtenues à partir d'un ovocyte injecté avec l'ARNm de eag ou de A345R eag.** Le protocole utilisé pour activer le courant du canal eag consiste en des sauts de potentiel d'une durée de 150 ms variant de –80 mV à +70 mV par incréments de 10 mV. Ces stimulations sont appliquées à partir d'un potentiel de repos de –90 mV. Pour le canal mutant, les sauts de potentiels varient entre –130 mV et +70 mV par incréments de 20 mV et sont d'une durée de 250 ms. Ils sont appliqués à partir d'un potentiel de repos de –150 mV. D'après Tang et Papazian, 1997

canal hERG a conservé ce rôle majeur de la boucle S3-S4 dans les mécanismes de

transduction des variations du potentiel membranaire. Notre but était d'obtenir un canal, qui, contrairement aux autres mutants existant, conserve un **pore intact** et donc une **sensibilité aux agents pharmacologiques non modifiée**.

## III.B PROPRIÉTÉS DU COURANT MACROSCOPIQUE

## III.B.1 Bases moléculaires de l'activation et de la désactivation

Dans la plupart des canaux Kv, le mécanisme d'activation reposerait sur l'interaction de la boucle intracellulaire S4-S5 et de l'extrémité cytoplasmique C-terminale du segment S6 (*cf.* § I.B.2.b). Cette interaction existerait vraisemblablement dans le canal hERG car des mutations de la boucle S4-S5 et/ou de la boucle C-terminale de S6 modifient fortement la dépendance au potentiel et les cinétiques d'activation et de désactivation du canal (Sanguinetti et Xu, 1999; Lees-Miller et coll., 2000; Ferrer et coll., 2006).

Contrairement aux autres canaux Kv, hERG ne possède pas de motif pro-X-pro dans le segment S6 mais un motif Phe-IIe-Gly. La substitution des prolines de ce motif par des glycines ou des alanines modifie considérablement les propriétés biophysiques des canaux Kv suggérant que ce motif participe à la constitution de la porte d'activation (Labro et coll., 2003). En effet, les prolines de ce motif, en formant des coudes dans la structure de l'hélice  $\alpha$ , confèrent au segment S6 la flexibilité nécessaire pour l'ouverture du canal. Dans le segment S6 de hERG, on retrouve une glycine (en position 648) également très conservée au sein de la famille des Kv et des canaux KcsA (canal K<sup>+</sup> de la bactérie *Streptomyces Lividans*) et MthK (canal K<sup>+</sup> dépendant du Ca<sup>2+</sup> de la bactérie *Methanobacterium thermoautrophicum*). Cette glycine est située au niveau de la zone charnière permettant la flexibilité du canal (Jiang et coll., 2002). Cependant, la mutation de ce résidu n'empêche pas l'ouverture du canal (Mitcheson et coll., 2000a).

D'après les derniers travaux du groupe de McKinnon (Long et coll., 2005a), la courbure de S6 favoriserait l'interaction entre son extrémité C-terminale et la boucle S4-S5. Ce rapprochement moléculaire serait à l'origine de la constriction plus ou moins importante de l'entrée du pore des canaux Kv (figure 24).



**Figure 24:** Interaction entre le voltage-sensor et le pore de Kv1.2. (A) Le segment S6 (gris et vert) comporte un motif Pro-Val-Pro qui correspond aux résidus 405 to 407 figurés en jaune, la boucle S4-S5 et le segment S5 de la même sous-unité (residus 311 à 342) sont représentés en gris et en vert. Les atomes de carbone des chaînes latérales de la boucle S4-S5 sont représentés en jaune, les atomes d'oxygène en rouge et d'azote en bleu. Vue latérale du canal à proximité de l'interface du milieu intracellulaire (en bas) et de la bicouche lipidique (en haut). (B) Les sphères rouges représentent les résidus de la boucle S4-S5 qui sont en contact direct avec les résidus du segment S6 (sphère bleue) (C) Vue latérale de la conformation ouverte du canal montant les interactions physiques entre les boucles S4-S5 (rouge), les segments S5 (gris) et les segments S6 (bleu) de chaque sous-unité. (D) Modèle hypothétique du processus de désactivation du canal Kv1.2 La transition de l'état ouvert à l'état fermé résulterait d'un déplacement vers le côté intracellulaire de l'extrémité N-terminale de la boucle S4-S5. Sur les représentations (A) à (D) les sphères vertes représentent les ions K<sup>+</sup>. D'après Long et coll., 2005b.

D'un point de vue fonctionnel, il a été montré que des mutations de résidus acides de la boucle S4-S5 (D540 et E544) en résidus basiques ou neutres altèrent les cinétiques d'activation et de désactivation du courant (Sanguinetti et Xu, 1999; figure 25). La mutation D540K a un effet particulièrement marqué puisqu'elle déstabilise la conformation fermée du canal qui devient alors capable de s'ouvrir en réponse à une hyperpolarisation membranaire, soit pour des valeurs de potentiel où le canal sauvage est normalement stabilisé à l'état fermé. L'acide aspartique 540 de hERG semble donc participer au couplage entre le segment S4 et la porte d'activation. Les auteurs de cette étude proposent que la boucle S4-S5, en réponse aux mouvements de S4, peut venir interagir avec la face interne du pore et stabiliser le canal à l'état fermé.



**Figure 25**: Le canal D540K HERG est ouvert pour des potentiels hyperpolarisés mais pas le canal sauvage *A*, protocole utilisé en potentiel imposé et permettant d'observer les courants activés par l'hyperpolarisation. *B*, Courants macroscopiques observés à partir d'un ovocyte exprimant le canal hERG. La repolarisation membranaire genère un courant présentant deux phases. Une première phase correspond à un courant transitoire entrant lié à la levée d'inactivation. Cette transitoire est suivie par un courant qui décroît progressivement au cours du temps (désactivation). *C*, Courants macroscopiques observés à partir d'un ovocyte exprimant le canal D540K hERG. La repolarisation membranaire induit une transitoire entrante similaire à celle du canal sauvage. Cependant, contrairement à hERG, le courant du canal D540K présente une lente augmentation du courant ou réactivation qui est d'autant plus importante que le potentiel imposé est négatif. *D*, Réactivation par l'hyperpolarisation du courant généré par le canal D540K HERG. Les potentiels hyperpolarisants sont appliqués à partir d'un potentiel de repos de -100 mV sans dépolarisation préalable. Ces courants ont été enregistrés à partir du même ovocyte qu'en C. **D'après Sanguinetti et Xu (1999).** 

Dans une autre étude, la même équipe a montré que la mutation R665A, située sur l'extrémité C-terminale du segment S6, supprime le phénomène d'ouverture induit par l'hyperpolarisation du canal mutant D540K (Tristani-Firouzi et coll., 2002).

Dans le canal sauvage, il existerait donc une interaction électrostatique entre l'arginine 665 située sur la boucle S4S5 et l'acide aspartique 540 situé au niveau de la porte d'activation du canal. Cette interaction stabilise le canal à l'état fermé lors de l'hyperpolarisation. Plus récemment, l'utilisation de chimères entre hERG et le canal EAG a permis de déterminer les résidus de la boucle S4-S5 et de l'extrémité C-terminale de S6 qui sont indispensables à l'activation du canal (Ferrer et coll., 2006). Dans cette même étude, l'oxydation des résidus cystéines situés en lieu et place des résidus natifs d'intérêt a permis de mettre en évidence de façon claire la proximité moléculaire ainsi que l'existence d'une interaction fonctionnelle

entre ces deux régions. L'ensemble de ces résultats suggère que la boucle S4S5 agit comme un transducteur des mouvements du segment S4 sous l'effet des variations du potentiel membranaire. Cependant, à l'heure actuelle, aucune interaction moléculaire directe n'a pu être mise en évidence que ce soit dans le canal hERG ou dans les autres Kv.

Le domaine N-terminal du canal hERG joue un rôle clé dans le processus de désactivation. En effet, la délétion des acides aminés 2 à 354 ( $\Delta$ 2-354) (Spector et coll., 1996a; Wang et coll., 1998) ou 2 à 373 ( $\Delta$ 2-373) (Schonherr et Heinemann, 1996) de ce domaine induit une accélération de la désactivation. D'autres travaux ont par la suite montré que seule la séquence 2-16 est déterminante dans la régulation de la désactivation par le domaine N-terminal (Wang et coll., 2000). Les auteurs de cette étude ont démontré que ce peptide stabilise le canal dans sa conformation ouverte en interagissant avec la boucle S4S5.

## III.B.2 Bases moléculaires de l'inactivation

L'inactivation rapide du canal est altérée principalement par des mutations de la boucle P (boucle S5-P) et/ou de la partie C-terminale du segment S6 (Schonherr et Heinemann, 1996; Fan et coll., 1999). Ces mutations sont localisées sur des positions équivalentes à celles qui dans le canal shaker sont à l'origine d'une suppression de l'inactivation de type C (Hoshi et coll., 1991). Dans le canal shaker, l'inactivation de type C résulte d'un réarrangement conformationnel simultané des quatre sous-unités  $\alpha$  (Panyi et coll., 1995). Ce réarrangement induit une réduction du diamètre du pore du côté extracellulaire et empêche le passage des ions K<sup>+</sup> (Starkus et coll., 1997). L'inactivation de hERG est supprimée par la mutation S631V qui est l'homologue de la mutation T449V à l'origine de l'élimination de l'inactivation de type C du canal shaker (Zou et coll., 1998). L'inactivation de hERG n'est cependant pas affectée par la suppression de la boucle N-terminale qui dans le canal shaker supprime l'inactivation rapide de type N (Spector et coll., 1996a). L'inactivation de hERG procède donc uniquement d'un mécanisme de type C mais qui est beaucoup plus rapide que celui des autres canaux Kv. Cette différence cinétique pourrait être due à une flexibilité plus grande des éléments du pore de hERG par rapport à ceux du canal shaker permettant une constriction plus rapide du diamètre du pore (Fan et coll., 1999). Cette différence pourrait aussi être liée à la taille de la boucle S5-P de hERG (39 acides aminés) qui est beaucoup plus longue que celles des autres canaux Kv (5 à 10 acides aminés en moyenne) (Tseng, 2001). Dans la boucle S5-P du canal shaker, au niveau du filtre de sélectivité, il existe des résidus capables d'établir des liaisons hydrogène entre eux. Ces résidus qui sont très conservés dans de nombreux canaux Kv, ne sont pas retrouvés dans la séquence de hERG. Les liaisons hydrogène permettent la stabilisation du pore dans une conformation ouverte. L'absence de ces liaisons

pourrait ainsi expliquer la plus grande flexibilité des mouvements du pore de hERG (Tseng, 2001).

D'autres études biophysiques se sont intéressées aux relations existant entre les mouvements du "voltage-sensor" et les cinétiques d'activation et d'inactivation. Des expériences de "cysteine-scanning" sur une cinquantaine de résidus bordant le pore ont permis de proposer un modèle selon lequel les déplacements de l'hélice  $\alpha$  du pore sont couplés aux mouvements du "voltage-sensor". Lors de la dépolarisation, l'orientation de cette hélice dans le pore est modifiée, obstruant sa face externe et provoquant l'inactivation du canal (Liu et coll., 2002). Une étude portant sur la mesure des courants de porte semble suggérer que le déplacement rapide de charges associé à l'inactivation de hERG est dépendant du déplacement lent de charges associé à l'ouverture du canal. Les auteurs de ce travail suggèrent donc que le processus d'inactivation serait en partie couplé au processus d'activation (Piper et coll., 2003).

## En résumé,

- le processus d'activation dépendrait de l'interaction électrostatique entre des résidus spécifiques de la boucle S4-S5 (acide aspartique 540 principalement et acide glutamique 544) avec l'extrémité C-terminale du segment S6 (arginine 665). Ce processus dépendrait également de la présence du motif Phe-Ile-Gly.
- Le processus de désactivation serait dû à l'interaction des quatre boucles N-terminal intracellulaires du canal (résidus 2-16) avec la boucle S4S5.
- L'inactivation reposerait principalement sur l'existence de résidus situés dans la boucle S5-P et/ou dans la partie C-terminale du segment S6. Un seul résidu clé a été identifié: la sérine 631 dont la mutation est à l'origine d'une suppression de l'inactivation de type C.

# **III.C RÉGULATIONS DE LA CONDUCTANCE UNITAIRE**

## III.C.1 Sensibilité aux cations monovalents

L'élévation de la concentration extracellulaire en K<sup>+</sup> provoque une augmentation du courant généré par le canal hERG (Sanguinetti et coll., 1995). Cet effet est paradoxal puisque l'augmentation de la concentration en K<sup>+</sup> extracellulaire ([K<sup>+</sup>]<sub>e</sub>) induit une réduction du gradient électrochimique de part et d'autre de la membrane, ce qui par conséquent, diminue la force électromotrice à l'origine du déplacement des ions K<sup>+</sup>. L'augmentation de [K<sup>+</sup>]<sub>e</sub> est à l'origine d'une réduction de l'inactivation de type C et une augmentation de la conductance unitaire du canal (Yang et coll., 1997a; Wang et coll., 1997). L'élévation de [K<sup>+</sup>]<sub>e</sub> pourrait aussi induire de manière compétitive une diminution de l'inhibition induite par le Na<sup>+</sup>.

Dans des systèmes de ré-expression hétérologue et en absence de K<sup>+</sup>, il a été en effet montré que l'élévation de la concentration en Na<sup>+</sup> extracellulaire ([Na<sup>+</sup>]<sub>e</sub>) inhibe le courant (IC<sub>50</sub> 3 mM) en se fixant à l'extrémité extracellulaire du pore et accélère aussi la cinétique de levée d'inactivation (Mullins et coll., 2002). En 2004, la même équipe a montré que ces effets dépendent du potentiel et plus précisément des changements conformationnels induits lors de la dépolarisation membranaire (Mullins et coll., 2004). En étudiant la sensibilité au [Na<sup>+</sup>]<sub>e</sub> du courant généré par le canal mutant D540K (*cf.* § III.B .1), les auteurs ont montré que le courant activé par l'hyperpolarisation est augmenté par le Na<sup>+</sup><sub>e</sub> tandis que le courant activé par la dépolarisation est lui inhibé. Cette étude a permis de mettre en évidence une relation nette entre l'inhibition du Na<sup>+</sup><sub>e</sub> et les changements conformationnels induits par la dépolarisation et plus précisément sur l'inactivation.

Dans une étude récente, l'effet conformation-dépendant du Na<sup>+</sup><sub>e</sub> a été confirmé dans un modèle de ré-expression hétérologue de canaux mutés ne s'inactivant pas ou présentant une accélération de la cinétique d'inactivation (Gang et Zhang, 2006). Les auteurs de ces travaux ont montré qu'en absence de K<sup>+</sup><sub>e</sub>, le canal hERG est capable de générer un courant Na<sup>+</sup> uniquement dans la conformation inactivée. Ils distinguent en fait deux sous-états inactivés, un sous-état qu'il nomme l<sup>p</sup> qui conduit le Na<sup>+</sup> et un sous-état l<sup>c</sup> qui correspond à l'inactivation classique de type C. I<sup>p</sup> précéderait la conformation l<sup>c</sup> et serait liée à une constriction partielle du pore au début de l'inactivation du canal (figure 26).



**Figure 26: Effets du Na<sup>+</sup> sur les différentes conformations du canal hERG.** Dans ce modèle, hERG présente deux sous-états inactivés. I<sup>p</sup> est le seul sous-état conduisant le Na<sup>+</sup>. **D'après Gang et Zhang, 2006**.

Le canal hERG est perméant au Rb<sup>+</sup> et au Cs<sup>+</sup> avec une perméabilité relative par rapport au K<sup>+</sup> de 1.25 pour le Rb<sup>+</sup> et de 0.56 pour le Cs<sup>+</sup>. Ces deux cations ralentissent la cinétique et modifient les propriétés de dépendance au potentiel de l'inactivation (V<sub>0.5inact</sub> K<sup>+</sup> = -69.4 mV V<sub>0.5inact</sub> Cs<sup>+</sup> = -30.7 mV; V<sub>0.5inact</sub> Rb<sup>+</sup> = -35.8 mV ). Ils n'ont cependant pas ou peu d'effet sur l'activation du courant (Youm et coll., 2004). La substitution du K<sup>+</sup> par le Rb<sup>+</sup> est à l'origine d'une diminution de la sensibilité du canal aux agents pharmacologiques se fixant préférentiellement à l'état inactivé (Rezazadeh et coll., 2004). Il a été suggéré que le

déplacement de la courbe d'inactivation vers des potentiels positifs est à l'origine d'une réduction de la sensibilité du canal pour certaines molécules (Mitcheson et coll., 2000a). Ainsi, en déplaçant la courbe d'inactivation du courant vers des potentiels plus positifs, la conductance du Rb<sup>+</sup> serait à l'origine d'une perte d'affinité des agents pharmacologiques pour le canal hERG.

### III.C.2 Sensibilité aux cations divalents

Le courant I<sub>Kr</sub> enregistré dans des cellules du nœud sinusal de lapin est sensible à la concentration en Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>e</sub>) et en Mg<sup>2+</sup> ([Mg<sup>2+</sup>]<sub>e</sub>) extracellulaires. Dans ces cellules, l'amplitude du courant diminue de façon dose-dépendante lorsque [Ca<sup>2+</sup>]<sub>e</sub> ou [Mg<sup>2+</sup>]<sub>e</sub> augmente et l'inhibition du courant dépend du temps et du potentiel (Ho et coll., 1996). Ces cations modifient également la sensibilité au potentiel du courant. Des résultats similaires ont été obtenus sur le canal ré-exprimé dans l'ovocyte de xénope (Ho et coll., 1998 et 1999) où l'application extracellulaire de Ca<sup>2+</sup> induit une diminution de l'amplitude du courant, une accélération de la cinétique de désactivation et un déplacement important de son seuil d'activation vers des potentiels plus positifs. Pour de faibles [Ca<sup>2+</sup>]<sub>e</sub> (0.5 mM) l'inhibition est affectée par l'augmentation de [K<sup>+</sup>]<sub>e</sub>, alors que l'inhibition du courant par des [Ca<sup>2+</sup>]<sub>e</sub> élevées (5 mM) n'est pas modifiée par le niveau de [K<sup>+</sup>]<sub>e</sub>. Ces résultats suggèrent qu'il existe un mécanisme de compétition au niveau de la face externe du pore, entre le Ca<sup>2+</sup> et le K<sup>+</sup>. Dans ce modèle, des effets similaires du Mg<sup>2+</sup>, mais moins prononcés, ont également été observés.

D'autres cations divalents (Ba<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>) induisent des effets comparables à ceux du Ca<sup>2+</sup> et du Mg<sup>2+</sup>. Cependant, selon la nature du cation utilisé, le courant I<sub>Kr</sub> est plus ou moins affecté, suggérant un mécanisme de régulation différent selon l'encombrement stérique de chaque ion. Le canal hERG possèderait au moins deux sites de fixation pour les cations divalents. Un site serait impliqué dans la régulation de la sensibilité au potentiel et l'autre participerait à la modulation de la probabilité d'ouverture (Ho et coll., 1999). Un de ces sites serait localisé à proximité de l'extrémité N-terminale du segment S4, soit dans la boucle S3-S4. Ce site correspond à deux résidus non conservés (E518 et E519) qui jouent un rôle clé dans le processus d'activation du canal. Ces résidus sont en effet énergétiquement couplés dans la conformation ouverte du canal mais dissociés lorsque celui-ci est fermé (figure 27) (Johnson et coll., 2001). La neutralisation de la charge négative du résidu E518 déplace la dépendance au potentiel de l'activation du canal. Cette modification de charge n'affecte cependant pas l'affinité de l'état fermé du canal pour le Ca<sup>2+</sup>. La neutralisation de la

charge négative E519 ne semble pas affecter la fonction du "voltage-sensor" de hERG mais diminue l'affinité de la conformation fermée du canal pour le Ca<sup>2+</sup><sub>e</sub>.



**Figure 27**: Interactions possibles entre les charges positives du segment S4, les charges négatives des résidus E518 et E519 de la boucle S3-S4 et le Ca<sup>2+</sup> extracellulaire. Le résidu E519 constituerait le site de liaison au Ca<sup>2+</sup> dans la conformation fermée du canal. Lors de la dépolarisation, la charge négative de E518 interagirait de manière électrostatique avec les charges positives du S4, favorisant ainsi l'ouverture du canal. Le couplage énergétique entre les résidus E518 et E519 existant dans la conformation ouverte du canal permet au Ca<sup>2+</sup> de moduler de façon indirecte le mécanisme d'activation. D'après Johnson et coll., 2001.

Les résultats de ces travaux montrent que le Ca<sup>2+</sup> est un modulateur du processus d'activation du canal hERG et qu'il se lie de façon préférentielle à l'état fermé. Ils suggèrent aussi l'importance du rôle de la boucle S3-S4 dans le mécanisme d'activation dépendante du potentiel du canal hERG.

III.C.3 Sensibilité au pH

L'acidification (pH 7.4 à 6.4 ou 6) est à l'origine d'une accélération de la désactivation du courant généré par le canal hERG (Vereecke et Carmeliet, 2000; Jiang et coll., 1999). Cet effet n'induit pas ou peu de changement de l'amplitude du courant et de la dépendance au potentiel des autres mécanismes de "gating". Cet effet de H<sup>+</sup><sub>e</sub> est réduit par la suppression de la boucle N-terminale du canal (acides aminés 2-354) (Jiang et coll., 1999) et peut être empêché par un pré-traitement au DEPC (diethylpyrocarbonate) qui se lie de façon covalente aux chaînes latérales des résidus histidine et cystéine (Miles, 1977). Ces observations suggèrent que la protonation de résidus peut induire des changements allostériques dans le canal affectant la fixation de la boucle N-terminale aux structures moléculaires de la porte d'activation.

## **III.D PHARMACOLOGIE**

La sensibilité pharmacologique du canal hERG vis-à-vis de nombreuses molécules est à la base du syndrome de QT long acquis dans lequel un traitement pharmacologique induisant une inhibition du courant I<sub>Kr</sub> peut déclencher des arythmies. Parmi ces molécules, beaucoup sont ou ont été couramment utilisées dans la pharmacopée humaine. Ces molécules peuvent être des anti-arythmiques, des antibiotiques, des substances psycho-actives, des antihistaminiques et il n'est pas encore clairement établi pourquoi autant de substances, structurellement aussi différentes, ont la capacité de bloquer hERG malgré les nombreuses études de relation structure-fonction conduites ces dernières années.

Cette caractéristique est propre au canal hERG et constitue une préoccupation majeure pour l'industrie pharmaceutique contrainte à optimiser les tests précliniques des molécules en cours de développement.

Les molécules à l'origine d'une inhibition de hERG sont les anti-arythmiques appartenant aux classes la et III et certains médicaments à visée non cardiaque. Les mécanismes d'action ainsi que les effets secondaires indésirables de ces molécules ont été exposés dans le paragraphe II.A.2.a.

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons aux déterminants moléculaires du canal impliqués dans l'inhibition par les agents pharmacologiques.

# III.D.1 Bases structurales de l'inhibition pharmacologique

Au niveau moléculaire, la grande majorité des molécules à l'origine d'un allongement de l'intervalle QT ont été identifiées comme des inhibiteurs directs du canal hERG et les mécanismes moléculaires de l'inhibition pharmacologique par ces molécules ont fait l'objet de très nombreuses études. Ainsi, des molécules comme le bepridil (Chouabe et coll., 1998), le cisapride (Walker et coll., 1999), le ketoconazole (Chen et Woosley, 1993), le sertindole (Rampe et coll., 1998), l'astemizole (Salata et coll., 1995), la terfenadine (Salata et coll., 1995) ou encore l'amitriptyline (Terschemacher et coll., 1999) ont été identifiées comme des inhibiteurs spécifiques de hERG et ont permis de déterminer en partie les régions du canal impliquées dans l'inhibition.

## III.D.1.a Déterminants moléculaires intra pore

Des expériences d'alanine-scanning ont été réalisées pour identifier les résidus susceptibles d'interagir avec les agents pharmacologiques (Mitcheson et coll., 2000a). Des mutations ont été réalisées au sein du pore et les canaux mutés résultants ont été testés pour leur

sensibilité à différentes substances pharmacologiques. Les mutations de trois résidus situés à la base du pore (Thr 623, Ser 624 et Val 625) et de trois résidus (Gly 648, Tyr 652 et Phe 656) localisés dans le segment S6 induisent une diminution de l'affinité du MK499, un agent anti-arythmique de classe III. Les mêmes résidus sont impliqués dans la liaison du cisapride, de la terfenadine et d'autres molécules appartenant à des classes thérapeutiques diverses (Sanguinetti et Mitcheson, 2005). L'ensemble de ces études a montré que la tyrosine 652 et la phénylalanine 656 sont des résidus clés et qu'ils constitueraient le site principal de liaison des agents pharmacologiques. En effet, tous les canaux de la famille des canaux K<sup>+</sup> dépendant du potentiel présentent un motif Thr-Ser[Thr]-Val situé juste avant la séquence du filtre de sélectivité aux ions K<sup>+</sup>. De même tous les canaux ont dans une position homologue la glycine 648 qui contribue à rendre plus flexible le segment S6 (cf. § III.B .1). Il est donc difficile de comprendre pourquoi ces acides aminés participent dans le canal hERG à l'inhibition par les agents pharmacologiques alors qu'ils n'ont pas ce rôle dans les autres canaux Kv. En revanche, les deux résidus du segment S6 (Tyr 652 et Phe 656) ne sont pas conservés, les autres canaux Kv possèdent en effet un résidu isoleucine et un résidu valine au niveau des positions homologues correspondantes. Plusieurs expériences de mutagenèse dirigée ont permis de caractériser les propriétés physicochimiques des interactions de ces deux résidus avec un certain nombre d'agents pharmacologiques. Ainsi, il a été montré que l'inhibition par le cisapride ou la terfenadine dépend de la présence d'un résidu aromatique en position 652 suggérant l'importance possible d'une interaction de type π-cation entre une charge positive portée par une amine de la molécule et le nuage électronique du noyau aromatique d'un résidu du pore. L'interaction avec la phénylalanine est de nature hydrophobe et ne dépend pas de la présence du noyau aromatique. D'autres études incluant le dofetilide, la quinidine, la chloroquine, la vesnarinone, le clofilium, l'ibutilide, la lifoflazine ou encore le propafenone confirment l'importance de ces deux résidus pour l'inhibition pharmacologique de hERG (Sanchez-Chapula et coll., 2002; Sanchez-Chapula et coll., 2003; Kamiya et coll., 2001a; Ridley et coll., 2004; Perry et coll., 2004).



Figure 28: Topologie du pore de hERG et sites de liaison des agents pharmacologiques. Les résidus clés interagissant avec les agents pharmacologiques sont la thréonine 623 (en orange), la serine 624 (en blanc) mais surtout la tyrosine 652 (en jaune) et la phénylalanine 656 (en rose). Les hélices  $\alpha$  (en bleu) correspondent aux segments S5-S6 qui délimitent le pore du canal. D'après Sanguinetti et Tristani-Firouzi (2006).

L'absence du motif pro-X-pro dans le segment S6 a également été suggéré comme un déterminant moléculaire de l'inhibition par les agents pharmacologiques. Son absence favoriserait en effet une augmentation du volume de la cavité centrale du pore. Lors de la fermeture de la porte d'activation, cette propriété permettrait de conserver les molécules au sein du pore (effet dit de "trapping") et donc de prolonger l'effet inhibiteur (Sanguinetti et Mitcheson, 2005). Ce mécanisme n'est cependant pas suffisant pour expliquer la sensibilité particulière du canal aux agents pharmacologiques. En effet, le canal eag qui ne possède pas de motif pro-X-pro et qui comporte une tyrosine et une phénylalanine dans des positions homologues du segment S6 de hERG est insensible à la plupart des molécules qui bloquent hERG. Pour l'équipe de Sanguinetti, cette différence entre les deux canaux résiderait dans des déplacements différents des segments S6 qui dans le canal hERG conduiraient à exposer les résidus critiques au niveau de la cavité centrale.

## III.D.1.b Mécanisme de "trapping"

Ce mécanisme correspond à une rétention des agents pharmacologiques et/ou des particules chargées au sein du pore des canaux après la fermeture de la porte d'activation. Ce phénomène a déjà été décrit pour de nombreux canaux dépendant du potentiel. Ainsi, il a été montré que des particules chargées comme le TEA (tetraéthylammonium) et ses dérivés amines quaternaires sont piégés dans la cavité centrale du pore d'une forme mutante du canal *shaker* (Holmgren et coll., 1997). Cette mutation correspond à la substitution d'un résidu du segment S6 (I470C) et est associée à un ralentissement de la cinétique

d'inactivation. Néanmoins, les auteurs de cette étude n'ont pu établir de relation entre l'effet sur la cinétique d'inactivation et la capacité du canal muté à conserver le TEA au sein du pore à l'état fermé. Ce mécanisme a aussi été observé pour des canaux non mutés comme les canaux Na<sup>+</sup> après inhibition par des anesthésiques locaux (Strichartz, 1973; Qu et coll., 1995). De nombreux canaux K<sup>+</sup> dépendant du potentiel présentent aussi cette propriété vis à vis des anti-arythmiques (Carmeliet, 1992 et 1993) et/ou des aminopyridines (Wagoner et Oxford, 1990; Kirsch et Drewe, 1993). De même, les cations divalents comme le Ba<sup>2+</sup> sont eux-aussi piégés (Armstrong et coll., 1980).

Dans le cas du canal hERG, la levée de l'inhibition par les methanesulfonanilides (MK499, E-4031, dofetilide, d-sotalol) serait ralentie par le même type de mécanisme (Carmeliet, 1992; Ficker et coll., 1998). En effet, dans le cas du canal muté D540K (*cf*.§ III.B.1), il est observé une levée d'inhibition par le MK499 lors de l'hyperpolarisation de la membrane. Ce phénomène se traduit par une perte de sensibilité pour le MK499 par rapport au canal sauvage qui n'est pas ouvert par l'hyperpolarisation membranaire (Mitcheson et coll., 2000b). Ces résultats suggèrent que l'inhibition par les methanesulfonanilides nécessite l'ouverture de la porte d'activation et que lors de l'inactivation puis de la désactivation du canal, ces molécules restent piégées dans le pore (figure 29). Il a été montré en outre qu'un grand nombre de molécules se fixent préférentiellement à l'état ouvert et/ou inactivé du canal (Ficker et coll., 1998; Wang et coll., 1997). Pour le groupe de Sanguinetti, l'inactivation jouerait un rôle important en favorisant la stabilisation de la molécule au sein du pore avant que la fermeture de la porte d'activation (désactivation) ne permette de bloquer l'agent pharmacologique dans le vestibule du canal (Tristani-Firouzi et coll., 2001). Ainsi, lors d'une nouvelle dépolarisation membranaire, l'agent pharmacologique exerce déjà son effet



Figure 29: Mécanisme de rétention ("trapping") des agents pharmacologiques de classe III au sein du pore de hERG. Tristani –Firouzi et coll., (2001).

## III.D.2. Différentes méthodes de criblage des inhibiteurs de hERG

L'usage des tests *in vitro* est recommandé pour l'évaluation des effets des nouvelles molécules pharmacologiques et de leurs métabolites sur les mécanismes de la repolarisation ventriculaire et plus particulièrement sur  $I_{Kr}$  (Haverkamp et coll., 2000).

#### III.D.2.a Tests in vitro actuels : avantages et limites

Il existe quatre catégories de modèles *in vitro* utilisées pour l'évaluation des effets des molécules sur les mécanismes de la repolarisation. Ces tests sont:

 la détermination de l'IC<sub>50</sub> des agents pharmacologiques par la techique de patchclamp. Ce test repose sur l'utilisation de systèmes de ré-expression hétérologue comme les lignées de mammifères (HEK293, CHO ou COS-7) exprimant de façon stable le canal hERG. Ces systèmes ont été préférés au modèle de microinjection d'ARN dans l'ovocyte de *Xenopus laevis* car la surface de la bicouche lipidique est plus étendue et constitue une limitation importante dans l'évaluation des IC<sub>50</sub> (elles sont généralement surestimées). Si la valeur d'IC<sub>50</sub> d'une molécule pour le canal hERG est une information importante, elle est néanmoins insuffisante pour conclure quant au pouvoir arythmique d'un agent pharmacologique. En effet, certaines molécules peuvent allonger la durée de l'intervalle QT en inhibant d'autres canaux que hERG comme l'ibutilide par exemple (Lee, 1992; January et Riddle, 1989; Busch et coll., 1994). D'autres tests sont donc nécessaires.

- les cardiomyocytes isolés constituent un modèle idéal pour l'évaluation des effets des molécules sur l'ensemble des courants natifs. Ce modèle est cependant inadapté à l'évaluation des effets des molécules sur la durée du PA dû à un manque de stabilité de la durée des PA même en stimulant à fréquence constante (Coronel et coll., 1997).
- la mesure de PA sur biopsie est beaucoup plus stable et fiable par rapport au PA cellulaire. Cependant, de nombreux facteurs doivent être pris en considération lors du choix des biopsies. Parmi ces paramètres, le choix de l'espèce est déterminant. En effet, le modèle du chien, proche de l'Homme est généralement utilisé mais il semblerait que les préparations provenant des fibres de Purkinje et/ou de la couche midmyocardique sont plus sensibles aux inhibiteurs de I<sub>Kr</sub> (Haverkamp et coll., 2000). Cette observation suggère que l'hétérogénéite transmurale de la repolarisation est aussi un facteur déterminant pour ces études (Antzelevitch et coll., 1999). Le sexe peut aussi être un paramètre non négligeable car il a été montré que les femmes (ou les femelles) ont un intervalle QT plus long que les hommes (ou les mâles) (Lehmann et coll., 1996; Drici et coll., 1996). Le choix de la fréquence de stimulation est aussi un facteur important car il influe directement sur la durée de la repolarisation. Plusieurs fréquences doivent donc être testées.
- l'enregistrement d'ECGs et de PA sur des cœurs de lapin et/ou de cobaye perfusés par la technique de Langhendorff est aussi utilisé pour le screening des inhibiteurs de l<sub>Kr</sub> (Pinney et coll., 1995; Eckardt et coll., 1998). Cependant, dans ce modèle, l'absence d'effet sur la repolarisation ne permet pas d'exclure totalement une molécule. En effet, certaines molécules doivent d'abord être métabolisées par l'organisme avant d'exercer leur effet inhibiteur. Ces informations ne sont données que par l'utilisation de modèles *in vivo*. De plus, l'allongement de la repolarisation peut être due à une bradycardie consécutive à une inhibition des courants impliqués dans la genèse du PA sinusal.

Ces tests apportent donc des informations importantes sur l'inhibition pharmacologique par les molécules non cardiaques mais ils doivent impérativement être complétés par des tests *in vivo*.

L'interprétation de ces tests peut être limitée en outre par des facteurs comme la solubilité de la molécule, l'absorption du produit vis-à-vis du verre ou du plastique ou encore la cytotoxicité de la molécule.

Enfin, une des limites majeures de l'ensemble de ces techniques *in vitro* reste leur faible débit d'analyse.

### III.D.2.b Développement des nouveaux tests in vitro : avantages et limites

Le patch-clamp reste la méthode de référence en pharmacologie de sécurité pour la détermination des IC50 des inhibiteurs de hERG (cf. ICHS7B 2005, cité dans Cavero et Crumb, 2005). Cette technique devient cependant moins intéressante lorsque l'on souhaite cribler un grand nombre de molécules. Des systèmes de screening à haut débit sont en cours de développement ou réadaptés aux nouveaux besoins comme la mesure d'efflux de Rb<sup>+</sup> radioactif (Rb<sup>86</sup>) et non radioactif (Rb<sup>+</sup>). Le Rb<sup>+</sup> avait été précédemment utilisé comme traceur biologique du fonctionnement des canaux K<sup>+</sup> (Castelletti et coll., 1989; Linde et coll., 1997) et Na<sup>+</sup> (Ponzio et coll., 1980) dépendant du potentiel. L'industrie pharmaceutique s'est tournée vers cette méthode pour développer un nouveau test de screening à haut débit des inhibiteurs de hERG. Les premiers essais se sont néanmoins révélés infructueux. Cette technique présente en effet une sensibilité inférieure par rapport à la méthode de patchclamp conventionnel et pour certaines molécules donne des valeurs d'IC<sub>50</sub> aberrantes (Cheng et coll., 2002; Rezazadeh et coll., 2004). Les problèmes liés spécifiquement à la mesure d'efflux de Rb<sup>+</sup> via le canal hERG seront abordés dans la deuxième partie des résultats. Nous verrons comment l'utilisation du mutant que nous avons mis au point améliore de façon non négligeable l'efficacité et la sensibilité de cette technique.

Le dofetilide et l'astemizole radiomarqués (Chiu et coll., 2004; Diaz et coll., 2004) ont été utilisés pour des études de "binding" sur le canal hERG. Cette technique pourrait constituer une alternative intéressante mais une étude rapporte que le dofetilide marqué peut se fixer sur les membranes de cellules HEK 293 B non transfectées (Finlayson et coll., 2001). En outre, il existe des écarts importants entre les résultats obtenus avec cette nouvelle technique et les résultats obtenus par la technique de patch-clamp conventionnelle (Netzer et coll., 2003).

D'autres techniques basées sur les propriétés physico-chimiques de la membrane comme les sondes fluorescentes (FLIRP: Fluorometric Imaging Plate Reader) détectant les variations de potentiel membranaire ont été proposées (Tang et coll., 2001). Ces techniques sont cependant coûteuses et génèrent des faux-positifs. Elles ne feront donc probablement pas l'objet d'un développement industriel.

Ces dernières années, des systèmes automatiques de patch-clamp ont été développés (Schroeder et coll., 2003; Sorota et coll., 2005; Bridgland-Taylor et coll., 2006). L'avantage de cette technique par rapport aux autres méthodes pré-citées est que le potentiel membranaire est contrôlé, ce qui permet d'être dans des conditions proches du patch-clamp conventionnel. Cependant, il semblerait que cette technique soit moins sensible que le patch-clamp conventionnel et qu'elle ne présenterait en outre pas un avantage majeur par rapport aux efflux de Rb<sup>+</sup> (Sorota et coll., 2005). De nombreuses mises au point sont en effet encore nécessaires comme la définition du mode et du temps d'application des molécules (Sorota et coll., 2005) ou encore de la densité cellulaire (Bridgland-Taylor et coll., 2006). Dans leur étude Bridgland-Taylor et coll. ont montré que la perte de sensibilité pour les agents pharmacologiques est directement liée à la densité cellulaire. Plus la confluence cellulaire est élevée et plus la surface membranaire est importante, ce qui selon les auteurs de cette étude favorise les liaisons non spécifiques et donc l'augmentation des IC<sub>50</sub>.

D'une manière générale, ces techniques à haut débit pourront être utilisées dans le cadre d'un pré-criblage des molécules mais ne se substitueront en aucun cas, du moins pour le moment, au patch-clamp conventionnel qui reste la technique de choix.

# **MATERIEL ET METHODES**

Dans ce chapitre sont exposés les protocoles des différentes techniques que j'ai utilisées au cours de ma thèse. Les protocoles relatifs aux autres techniques (enregistrements et stimulations endocavitaires, RT-PCR quantitative) sont présentés dans les manuscrits des articles.

Les études de ré-expression hétérologues ont été réalisées à partir d'une lignée de COS-7, qui est une lignée cellulaire issue de fibroblastes de rein de singe vert d'Afrique immortalisées par transformation avec un mutant du virus simien SV40 (Gluzman, 1981). Ce type de modèle constitue un système d'étude plus simple qu'un organe ou un organisme entier permettant de s'affranchir de toute influence environnementale (hormones, cytokines, neurotransmetteurs). Du fait de l'absence ou du très faible niveau de courant K<sup>+</sup> endogène, cette lignée est classiquement utilisée comme système d'expression hétérologue des canaux K<sup>+</sup>.

Les études portant sur l'implication du remodelage électrique dans les modèles murins sont basées sur l'étude des courants ioniques natifs de cardiomyocytes ventriculaires fraîchement isolés et d'enregistrement d'ECGs de surface pour l'étude des effets de l'amiodarone.

# I MODÈLES BIOLOGIQUES UTILISES

# I.A MÉTHODES DE CULTURE DES CELLULES COS-7

## I.A.1 Conservation des cellules dans l'azote liquide

Les cellules sont conservées dans des tubes cryogéniques stériles placés dans l'azote liquide. Pour la congélation, les cellules sont dissociées et ramenées à  $2x10^6$  cellules/1.5 ml de milieu de culture contenant 13 % de DMSO et 20 % de sérum, elles sont ensuite réparties dans des tubes cryogéniques ( $2.5x10^6$  cellules/tube). Les cellules sont refroidies 1h à 4°C puis pré-congelées 24h à 48h à -80°C et enfin conservées dans l'azote liquide.

Pour remettre les cellules en culture après conservation dans l'azote liquide, il faut procéder à une décongélation rapide par immersion du tube à 37°C. Les cellules sont ensuite centrifugées à 900 tours/minute dans 5 ml de milieu de culture afin d'éliminer le DMSO. Le culot est repris dans 10 ml de milieu de culture et les cellules sont réparties dans des flasques de culture (25 cm<sup>2</sup>).

# I.A.2 Milieux de culture

Les lignées cellulaires utilisées sont des cellules adhérentes qui sont cultivées dans des flasques et repiquées tous les quatre jours. Les cultures sont maintenues à 37°C dans un incubateur humidifié en présence de 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules COS-7 sont cultivées dans un milieu "Dulbecco's Modified Eagle Medium" complémenté par 10% de sérum de veau fœtal, 2 mM de L-glutamine, 100 UI/mI de pénicilline et 100 µg/mI de streptomycine.

# I.A.3 Repiquage

Chaque lignée est repiquée lorsque les cellules ont atteint 80 à 90% de confluence. Le repiquage est réalisé en cinq étapes:

le milieu de culture est remplacé par 2 ml de tampon phosphate: NaCl (137 mM), KCl (2.7 mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (8 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.5 mM) à pH=7.4 contenant 0.1% d'EDTA pendant 2 à 3 minutes.

- Afin de détacher les cellules de leur support, elles sont traitées avec 1 ml d'une solution à 0.25% de trypsine, solubilisée dans du PBS/EDTA, pendant 3 minutes. L'action enzymatique est arrêtée par addition de milieu de culture.
- Afin d'éliminer la trypsine du milieu de culture, les cellules sont centrifugées pendant 10 minutes à 1000 tours/minutes (Eppendorf, centriguge 5810R). Le culot est resuspendu dans 5 ml de milieu de culture.
- Les cellules sont mécaniquement individualisées avec une pipette pasteur pendant 2 minutes jusqu'à l'obtention d'une suspension de cellules isolées.
- La concentration en cellules de cette suspension est ensuite estimée sur une lame de Malassez après coloration au bleu de trypan 0.05%. Le taux d'ensemencement standard est de 2.10<sup>4</sup> cellules/cm<sup>2</sup> (il permet un repiquage des cellules tous les 4 à 5 jours), soit 5.10<sup>5</sup> cellules par flaque de 25 cm<sup>2</sup>. Cette quantité souhaitée est atteinte par dilution avec du milieu de culture. Le taux d'ensemencement est ensuite adapté au type d'expérience et au support.

# I.A.4. Transfection des cellules par vecteurs synthétiques de type polymère

Le polyéthylèneimine (PEI) est un polymère cationique capable de transfecter des lignées cellulaires en culture ainsi que des organes chez des animaux vivants (Boussif et coll., 1995). Plusieurs PEI sont actuellement commercialisés: PEI 800kDa, PEI 25 kDa, PEI 22 kDa (Boussif et coll., 1995; 1996). Nous avons utilisé le PEI 22kDa.

Les cellules sont transfectées quand elles atteignent 60-70% de confluence. Les plasmides sont dilués dans du NaCl 150 mM et sont mélangés à du PEI dilué dans du NaCl 150 mM. Ce mélange est laissé 30 minutes à température ambiante afin que les complexes PEI/ADN se forment. Le nombre d'équivalents est le rapport du nombre d'atomes d'azote de PEI sur le nombre de phosphate de l'ADN. Pour un rapport de 5 équivalents, la stoechiométrie du mélange est de 30 nmol d'atomes d'azote de PEI pour 2 µg d'ADN. En routine, nous utilisons 2 µg d'ADN par boîtes de cellules à transfecter (boîte de Pétri de 35 mm de diamètre). Les cellules transfectées sont ensuite incubées à 37 °C pendant 12 à 48 heures selon les expériences.

Pour les expériences de patch-clamp, le plasmide d'intérêt est transfecté avec un plasmide codant pour la GFP (Green Fluorescent Protein) afin de pouvoir repérer ultérieurement les cellules transfectées. Nous avons utilisé un autre système de détection pour notre étude sur le mutant de hERG. En effet, le plasmide utilisé est un plasmide pIRES dont la deuxième séquence codante correspond au récepteur CD8. Les cellules transfectées sont détectées

en utilisant de petites billes de latex CD8 (Dynabeads<sup>®</sup>) qui se fixent spécifiquement au récepteur.

# I.B LES MODÈLES ANIMAUX

# I.B.1 Les souris

Dans le projet amiodarone, les souris utilisées sont des souris de souche C57BLJ6 (Charles River). Ces souris ont atteint l'âge adulte (9 semaines) et seul les mâles sont choisis afin de s'affranchir des variations hormonales du cycle des femelles.

Les souris traitées ont reçu un régime alimentaire complémenté à l'amiodarone (Sanofi Synthelabo) pendant 6 semaines. La prise journalière est de 180 mg/kg. Des souris témoins ont reçu la même nourriture sans amiodarone.

Les souris ont été pesées avant, pendant et après le traitement. Ce suivi a été réalisé à raison d'une pesée par semaine.

Les dosages plasmatiques des hormones thyroïdiennes T3 et rT3 des souris traitées et non traitées ont été effectués à l'école vétérinaire de Lyon sur un autre lot de souris recevant le même traitement.

Dans le projet de la souris transgénique sur-exprimant le canal hERG, la souche des souris utilisées pour la transgenèse est un fond génétique stable de type FVB. Le transgène d'intérêt a été mis sous le contrôle d'un promoteur α-MHC et l'ADN a été ensuite microinjecté dans le pronucléus d'un œuf fécondé. Les souris transgéniques (F0) sont accouplées avec des souris sauvages pour obtenir la lignée stable (F1).

Les souris utilisées pour l'étude du bloc auriculo-ventriculaire (BAV) complet chez la souris sont de souche CD1. Elles ont été choisies car de toutes les souches disponibles au laboratoire, ces souris résistent le mieux au BAV.

# I.B.2 Isolement des cardiomyocytes ventriculaires de souris

Ce protocole est réalisé en deux temps: la dissociation cellulaire et la réintroduction calcique.

# I.B.2.a La dissociation cellulaire

Les solutions de dissociation sont préparées à partir d'une solution de Tyrode contenant: NaCl 130 mM, Na H<sub>2</sub>PO4 1.2mM, KCl 5.4 mM, MgSO<sub>4</sub> (7 H<sub>2</sub>O) 1.2 mM, HEPES 10 mM, glucose 10mM, le pH est ajusté à 7.4 avec de la soude (NaOH). Cinq solutions sont utilisées (I, II, III, IV et V), leurs compositions sont présentées dans le tableau 5.

	l	II		IV	V
BDM	10 mM	-	-	-	-
Taurine	-	-	20 mM	20 mM	20 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM	-	25 µM	50 µM	50 µM
BSA	-	-	-	5 mg/ml	-

Tableau 5: composition des solutions pour l'isolement des cardiomyocytes ventriculaires de souris

BDM: butanedione 2,3 monoxime ; BSA : albumine bovine

La solution III correspond à la solution enzymatique dans laquelle est ajouté extemporanément de la collagénase la (6.5 U/ml, Sigma aldrich<sup>®</sup>) et de la protéase XIV (0.88 U/ml Sigma aldrich<sup>®</sup>). Pour l'isolement des cardiomyocytes ventriculaires des souris en BAV, nous avons utilisé la collagénase de type II (73.7 U/ml Worthington<sup>®</sup>). Le BDM ou butanedione 2,3 monoxime et la taurine sont utilisés pour limiter le phénomène de paradoxe calcique et les effets délétères de l'ischémie (pour revue: Sellin et Mcardle, 1994; Satoh et Sperelakis 1998). La BSA ou albumine bovine est ajouté ex tempora à la solution IV qui permet de stopper la réaction enzymatique.

Les souris sont anesthésiées et héparinées par une injection intrapéritonéale d'étomidate (15 mg/kg) et d'héparine (héparine sodique, 500 Ul/5 ml, Dakota®pharm). Dix minutes après l'injection, l'animal est placé sur le ventre et euthanasié par dislocation cervicale. La cage thoracique est alors ouverte, le bloc cœur-poumons est prélevé rapidement et est placé dans un bêcher contenant la solution I froide et oxygénée (*cf.* tableau 5).

Le cœur est rincé et les poumons retirés. Sous la loupe binoculaire, l'aorte est canulée et l'ensemble cœur-canule monté sur une seringue de 10 ml contenant la solution l.

Puis, le cœur est lentement perfusé afin de chasser le sang des coronaires (celles-ci se décolorent). Cette perfusion permet de vérifier que la canule a bien été introduite dans l'aorte.

L'ensemble cœur-canule est ensuite fixé sur la colonne de Langhendorf pour y être perfusé pendant 4 min. avec la solution I chauffée à  $37^{\circ}$ C et oxygénée (100% O<sub>2</sub>). Cette étape permet au cœur de retrouver une bonne activité contractile et de chasser le sang restant dans les cavités cardiaques.

Le cœur est ensuite perfusé avec une solution 0 Ca<sup>2+</sup>: solution II (37°C, 100% O<sub>2</sub>); l'arrêt de l'activité contractile permet de vérifier la bonne perfusion des cellules myocardiques. L'absence de Ca<sup>2+</sup> fragilise les liaisons intercellulaires, ce qui marque le début de la dissociation cellulaire. Puis, la solution III est perfusée pendant 10 à 20 min. Tout au long de

la digestion la solution est recyclée. Après quelques minutes, le cœur prend un aspect filamenteux, ses parois deviennent lâches, le débit du perfusa s'accélère et contient quelques débris. Ces repères sont les indicateurs d'une bonne digestion enzymatique. Celleci est arrêtée par la perfusion de la solution IV qui contient 50µM de Ca<sup>2+</sup> et de l'albumine bovine (fraction V) pendant 2-3 min.

L'ensemble cœur-canule est alors retiré de la colonne et placé dans une boîte de Pétri contenant la solution V. Les oreillettes sont retirées et les ventricules coupés en de petits cubes, ces petits morceaux sont ensuite introduits dans un tube à centrifugeuse. Les cellules sont libérées en agitant doucement la solution à l'aide d'une pipette pasteur polie. Le surnageant est filtré sur toile de nylon (diamètre des pores =  $200 \ \mu$ M) jusqu'à l'obtention d'un culot dense et d'une suspension cellulaire limpide.

Les cellules sont mises au repos pendant au moins 15 min. à l'obscurité et à l'air libre afin de favoriser les échanges gazeux. Les cellules vivantes ("rod-shaped myocytes") sédimentent plus rapidement que les cellules mortes ("round myocytes").

# I.B.2.b La remontée calcique

Elle se fait progressivement et en présence de taurine pour limiter les effets du paradoxe calcique (Yamauchi-Takihara et coll., 1988).

Après trituration et filtration, le surnageant obtenu est réparti en 3 tubes. Les volumes sont complétés à 5 ml avec la solution V oxygénée. Après 10 à 15 min de sédimentation, le surnageant est retiré et les culots sont repris dans 5 ml de solution V additionnée de 0.75  $\mu$ l de CaCl<sub>2</sub> 0.5 M, pour atteindre une concentration finale en Ca<sup>2+</sup> de 125  $\mu$ M. La même opération est répétée toutes les 15 minutes par reprise du surnageant et resuspension douce du culot pour les paliers suivants qui sont de 250  $\mu$ M, 500  $\mu$ M et 1 mM.

Ce protocole de renouvellement du surnageant permet d'éliminer un maximum de cellules mortes du culot et de donner une bonne densité de myocytes vivants pour l'analyse électrophysiologique.

# **II. LES TECHNIQUES ELECTROPHYSIOLOGIQUES**

# **II.A LE PATCH-CLAMP**

## II.A.1 Principe

Le patch-clamp est une technique permettant de mesurer les fluctuations de courant générées par des canaux ioniques, directement à partir de membranes biologiques. Cette technique a été introduite suite aux travaux de Neher et Sakman en 1976, puis complétée par la suite (Neher et Sakman, 1976; Hamill et coll., 1981; Horn et Marty, 1988). Il s'agit d'une variante de la technique de potentiel imposé qui consiste à imposer à la membrane cellulaire un potentiel constant et à mesurer les courants transmembranaires résultants. Contrairement aux mesures en potentiel imposé, qui nécessitent l'introduction de deux microélectrodes dans la cellule (de taille relativement importante), les mesures de patch-clamp ne nécessitent qu'une seule microélectrode et est donc applicable à des cellules de mammifères de diamètre souvent inférieur à 30 µm.

La technique de patch-clamp consiste à poser la pointe d'une fine pipette en verre, dont l'extrémité à un diamètre d'environ 1 µm, sur une membrane cellulaire. Ceci permet d'isoler électriquement un petit morceau de membrane (patch). Une légère aspiration exercée à l'intérieur de la pipette augmente le contact entre la pipette et la membrane, si bien que la résistance électrique de la jonction pipette-membrane augmente jusqu'à des valeurs de l'ordre du gigaOhm, le contact est alors appelé "gigaseal". Cette très grande résistance permet l'isolation électrique parfaite du morceau de membrane et permet d'enregistrer des courants de l'ordre du picoampère à travers les canaux contenus dans le morceau de membrane.

# II.A.2 Dispositif expérimental et composition des solutions

Pour les cellules COS-7 transfectées de façon transitoire, un ensemencement est réalisé dans des boîtes de Pétri et la dilution des cellules est choisie de façon à ce qu'elles soient isolées le jour de l'étude. Pour les cardiomyocytes fraîchement isolés, les cellules sont ensemencées 30 minutes avant l'expérimentation pour permettre aux cellules d'adhérer au fond de la boîte. La boîte de Pétri contenant les cellules est placée dans une chambre annulaire en laiton posée sur la platine d'un microscope inversé (*Modèle CK2, Olympus*). Le microscope est couplé à une lampe à fluorescence (*Modèle TH3, Olympus*) permettant de repérer le cas échéant les cellules transfectées avec l'ADNc codant pour la GFP.

Les cellules sont perfusées en continu avec une solution de tyrode maintenue ou non à 35°C par l'intermédiaire d'un circuit d'eau portée à température par un chauffage thermostaté (*Polystat 22, Bioblock Scientific*). La solution de tyrode pour les cellules COS-7 est composée de: NaCl 145 mM, KCl 4 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, HEPES 5 mM, glucose 5 mM, pH 7.4 avec NaOH . Pour les cardiomyocytes ventriculaires, sa composition est la suivante: NaCl 130 mM, KCl 5.4 mM, NaH<sub>2</sub>PO4 1.2 mM, MgSO4 (7 H<sub>2</sub>O) 1.2 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, HEPES 10 mM, glucose 10 mM, pH 7.4 avec NaOH.

Les pipettes de verre sont étirées à partir de tubes à hématocrites (*Kimble*) avec une étireuse verticale (*Modèle P-30, Sutter Instrument & Co*) pour que leur résistance soit comprise entre 2.5 et 3.5 Mohm lorsqu'elles sont remplies de la solution de pipette. La composition de la solution de pipette ou solution dite intracellulaire dépend du type cellulaire mais surtout des courants étudiés. Le détail de la composition de ces solutions est rapportée dans les tableaux 6, 7, 8 et 9. La pipette chargée de solution ionique est montée sur un porte-électrode relié à un micromanipulateur permettant de la placer avec précision sur la cellule. La pipette est connectée par un fil d'argent chloruré à un amplificateur de patch-clamp (*Axopatch 200A, Axon instruments*) qui permet d'imposer un potentiel et de mesurer le courant. Une électrode de référence Ag/AgCl (*Phymep*) est plongée dans le bain et le potentiel de jonction est compensé.

Un système de microperfusion permet de perfuser la cellule avec un milieu extracellulaire et de changer rapidement la solution de perfusion au cours de l'expérimentation. Ce dispositif est constitué de tubes en Tygon (diamètre interne de 0.25 mm) accolés parallèlement les uns aux autres. Les milieux de perfusion contenus dans des seringues reliées à ce système sont appliqués localement par gravité (figure 30).

Le potentiel est piloté et les courants enregistrés par ordinateur. Pour les études avec les cellules COS-7, la température des cellules et des perfusions est maintenue à 35°C tout au long de l'expérimentation par le chauffage thermostaté. La température du bain dans la boîte de Pétri est régulièrement contrôlée au cours de l'expérimentation. Pour les cardiomyocytes, nous avons travaillé à température ambiante excepté pour la mesure des courants K<sup>+</sup> de la souris transgénique  $\alpha$ -MHC-hERG.



**Figure 30** : **Représentation schématique du dispositif expérimental utilisé pour la technique de patch-clamp.** (A) Vue d'ensemble du dispositif expérimental. STIM: stimulateur, AMP: amplificateur, OSC: oscilloscope, LAB: interface Labmaster et ORD: ordinateur. (B)Représentation du dispositif expérimental au voisinage de la cellule. (C) Schéma illustrant le principe de la configuration entière. Rm: résistance membranaire, Cm: capacité membranaire, R: résistance de la pipette, AOP: amplificateur opérationnel, RCR: résistance de contre-réaction et REF: électrode de référence

# II.A.3 Les différentes configurations du patch-clamp

Il existe différentes configurations d'association entre la pipette et la cellule, permettant d'étudier l'activité soit des canaux présents sur l'ensemble de la membrane cellulaire (courant macroscopique), soit de quelques canaux présents dans le morceau de membrane piégé sous la pipette. Les différentes configurations d'enregistrement sont représentées dans la figure. Seule la configuration "cellule-entière" a été utilisée dans les articles présentés dans ce travail.



Figure 31: Les différentes configurations du patch-clamp

En configuration "cellule-entière", le courant mesuré est la somme des courants unitaires traversant l'ensemble de la membrane et les propriétés du courant macroscopique mesuré correspondent à l'intégration des propriétés de chacun des canaux présents à la surface membranaire. Dans ces conditions, le courant l est donné par:

## I=G(E<sub>m</sub>-E<sub>x</sub>) avec G=N.g<sub>x</sub>.P<sub>o</sub>

où G est la conductance macroscopique,  $E_m$  est la valeur du potentiel membranaire,  $E_x$  est la valeur du potentiel d'inversion de l'ion X, P<sub>o</sub> est la probabilité d'ouverture du canal, g<sub>x</sub> est la conductance unitaire du canal pour l'ion X et n est le nombre total de canaux présents à la membrane cellulaire.

La résistance électrique entre le milieu intra-pipette et le milieu intracellulaire est appelée résistance série R<sub>s</sub>. De façon schématique, on peut considérer que cette résistance est la somme de la résistance de la pipette R<sub>pip</sub> et de la résistance de la portion de membrane située sous la pipette R<sub>patch</sub>. On a donc R<sub>s</sub>= R<sub>pip</sub> + P<sub>patch</sub>. Pour pouvoir imposer à la membrane un potentiel proche de celui désiré, la R<sub>s</sub> doit être négligeable par rapport à la résistance de la membrane cellulaire. La valeur de R<sub>s</sub> est principalement déterminée par la résistance du patch car le morceau de membrane piégé sous la pipette augmente considérablement R<sub>s</sub> (R<sub>pip</sub> est négligeable par rapport à R<sub>patch</sub>). Pour supprimer ou rendre négligeable cette résistance, on détruit le morceau de membrane situé sous la pipette, soit par aspiration, soit en appliquant un potentiel élevé, sans pour autant affaiblir la liaison entre le verre et la membrane cellulaire (seal). On obtient ainsi un accès électrique à la face interne de la membrane cellulaire ainsi qu'un accès physique direct au milieu intracellulaire dont on contrôle la composition. Dans cette configuration, les éléments libres du cytosol dialysent vers le milieu intrapipette et sont donc fortement dilués. Une des conséquences de ce phénomène est une diminution au cours du temps des courants enregistrés. L'addition de métabolites énergétiques comme les sels d'ATP ou la phosphocréatine permet de limiter en partie ce phénomène.

# II.A.4 Perméabilité membranaire, potentiel d'inversion et différenciation des courants

Dans les conditions standard de potentiel imposé, le courant membranaire mesuré  $I_m$  depuis un potentiel de maintien à un potentiel fixé E est donné par la relation:

## $I_m = I_i + I_c + I_f = I_i + Cm (dE/dt)$

où l<sub>i</sub> est le courant porté par les ions traversant la membrane via les canaux ioniques, l<sub>c</sub> est le courant capacitif membranaire, l<sub>f</sub> est le courant de fuite et Cm la capacité membranaire. Si le seal est parfait, l<sub>f</sub> est négligeable ou nul. Si le protocole de stimulation utilise des variations de potentiel sous forme de créneaux instantanés à partir d'un potentiel de maintien fixe dE/dt s'annule très rapidement. De plus il est possible de compenser le courant capacitif en injectant dans le système un courant équivalent, mais de signe opposé. Il en résulte que le courant mesuré est égal au courant porté par les ions traversant la membrane via les canaux ioniques exprimés à la surface cellulaire.

Pour caractériser la nature ionique du courant enregistré dans des conditions expérimentales données, il faut tenir compte de la nature des ions en présence, de leurs concentrations de part et d'autre de la membrane et du potentiel membranaire imposé. On peut alors mesurer l'intensité du courant pour différents potentiels afin d'établir la relation courant/potentiel (courbe I/V). Cette relation permet de déterminer le potentiel d'inversion du courant, c'est à dire la valeur du potentiel pour lequel le courant net est nul. Les courants supérieurs à cette valeur, positifs, sont qualifiés de courants sortants, les courants inférieurs à cette valeur, négatifs sont dits entrants. La valeur du potentiel d'inversion du courant est d'autant plus proche du potentiel d'équilibre thermodynamique d'une espèce ionique donnée que cette espèce est perméante au travers de la membrane. Dans le cas général, où plusieurs espèces ioniques perméables (A et B) sont en présence, le potentiel d'inversion E<sub>inv</sub> est donné par l'équation de Goldman-Hodgkin-Katz:

## $E_{inv} = (RT/zF) \log ((P_A[A]_e + P_B[B]_e) / (P_A[A]_i + P_B[B]_i))$

où R est la constante des gaz parfaits, T est la température absolue en kelvin, z la somme des charges portées par les différentes espèces ioniques, F est la constante de Faraday,  $P_x$  la perméabilité membranaire pour l'espèce ionique X,  $[X]_e$  et  $[X]_i$  les concentrations respectivement extracellulaires et intracellulaires de l'ion X. La valeur théorique du potentiel membranaire pour laquelle le courant porté par les ions X sera nul est celle du potentiel d'équilibre thermodynamique  $E_x$ , donné par la relation de Nernst:

## E<sub>x</sub> = 2,3 (RT/zF) log<sub>10</sub> ([X]<sub>e</sub>/[X]<sub>i</sub>)

Expérimentalement, pour enregistrer un courant correspondant au passage d'une seule espèce ionique, on peut supprimer les échanges d'ions indésirables en remplaçant ces ions perméants par des molécules non perméantes de mêmes charges. Ainsi la valeur de E<sub>inv</sub> tend vers le potentiel d'équilibre thermodynamique de la seule espèce perméante au travers de la membrane. On a alors:

#### $E_{inv} = E_x$ soit $E_{inv} = 2,3$ (RT/zF) $log_{10}$ ([X]<sub>e</sub>/[X]<sub>i</sub>)

Le courant est d'autant plus pur que le potentiel d'inversion mesuré est proche du potentiel d'équilibre thermodynamique de l'ion perméant.

Les problèmes de la caractérisation du courant varient suivant le modèle d'étude: système de ré-expression hétérologue ou cellules fraîchement dissociées. Dans le premier cas, il faut

se placer dans des conditions où les courants d'intérêt sont largement majoritaires sinon les seuls. Cette condition dépend du choix du modèle d'expression (les cellules COS-7 présentent un faible niveau de courants endogènes) mais aussi des conditions de transfection. Il est en effet possible de moduler la quantité d'ADN apportée aux cellules à transfecter. Dans le cas des cardiomyocytes, seuls les protocoles de stimulation et les agents pharmacologiques permettent la discrimination des différentes composantes du courant mesuré.

## II.A.5 Stratégies pour la différenciation des courants des cardiomyocytes

### II.A.5.a Mesure des courants K<sup>+</sup>

L'utilisation des agents pharmacologiques permet de supprimer les échanges ioniques indésirables en remplaçant les ions perméants par des molécules non perméantes et portant les mêmes charges. Ainsi, dans toutes nos études sur les cardiomyocytes fraîchement isolés, nous avons substitué les ions Na<sup>+</sup> par la N-méthyl-D-glucamine. Dans l'étude amiodarone, les canaux Ca2+ ont été inhibés en traitant les cellules avec 2 mM de chlorure de cobalt. A cette concentration les effets sur le courant  $I_{to}$  sont limités (Agus et coll., 1991). Les courants membranaires ont été mesurés par la technique de patch-clamp en configuration cellule-entière. Les courants K<sup>+</sup> I<sub>to</sub>, I<sub>K, slow</sub> et I<sub>ss</sub> ont été activés en appliquant toutes les 15 secondes des sauts de potentiel de 400 ms ou de 4 sec. Ces sauts de potentiels sont compris entre -40 mV et +50 mV et sont appliqués à partir d'un potentiel membranaire de -70 mV. Les amplitudes d'Ito et de IK, slow ont été déterminées à partir du protocole de 400 ms. L'amplitude d'I<sub>to</sub> correspond à la valeur de courant obtenu au tout début de la dépolarisation (courant au pic). L'amplitude d' IK, slow est reflétée par la valeur du courant résiduel en fin de dépolarisation. De la même manière, le courant Iss est mesuré à partir du protocole de 4 sec et son amplitude correspond à celle du courant résiduel de fin de dépolarisation (Xu et coll., 1999).

Pour l'étude des courants K<sup>+</sup> de la souris transgénique hERG, nous avons choisi de travailler avec la nifédipine. En effet, I<sub>Kr</sub> est inhibé par les ions  $Co^{2+}$  qui agissent en accélérant la désactivation du courant; mais il est insensible aux dihydropyridines (Sanguinetti et Jurkiewicz, 1991).

Dans le projet BAV, nous nous sommes basés sur les travaux récents de l'équipe de Fiset. Leur protocole consiste en une distinction des courants K<sup>+</sup> de la souris sur la base de leur sensibilité à la 4-AP mais aussi sur la base de leurs propriétés biophysiques et notamment de leurs cinétiques d'inactivation (Brouillette et coll., 2004). Les avantages et les inconvénients des différentes approches de la mesure des courants K<sup>+</sup> dans ces modèles de souris seront abordés ultérieurement.

Tableau 6: Composition des milieux intracellulaire et extracellulaire pour l'enregistrement des courants
K⁺ des cardiomyocytes ventriculaires de souris

	Milieu Extracellulaire	Milieu intracellulaire
N-methyl-D-Glucamine	130 mM	
Na <sub>2</sub> -phosphocreatine		5 mM
KCI	5.4 mM	20 mM
K-aspartate		110 mM
K <sub>2</sub> ATP		5 mM
MgCl <sub>2</sub> (6 H <sub>2</sub> O)		2 mM
$MgSO_4$ (7 $H_2O$ )	1.2 mM	
CaCl <sub>2</sub>	1 mM	1 mM
EGTA		5 mM
HEPES	10 mM	5 mM
Glucose	10 mM	
Mannitol	10 mM	
рН	7.4 avec HCI	7.2 avec KOH

# II.A.5.b Mesure du courant $I_{Ca,L}$ dans le projet amiodarone

 Tableau 7: Composition des milieux intracellulaire et extracellulaire pour l'enregistrement de I<sub>Ca,L</sub> dans les cardiomyocytes ventriculaires de souris

	Milieu Extracellulaire	Milieu intracellulaire
N-methyl-D-Glucamine	130 mM	

NL L L L		0.0 14
Na <sub>2</sub> -phosphocreatine		3.6 MM
CsCl	5.4 mM	50 mM
Acide aspartique		75 mM
MgATP		5 mM
MgCl <sub>2</sub> (6 H <sub>2</sub> O)	0.5 mM	
CaCl <sub>2</sub>	1.8 mM	1 mM
EGTA		10 mM
HEPES	10 mM	5 mM
Glucose	10 mM	
Mannitol	10 mM	
TEACI		20 mM
рН	7.4 avec HCI	7.2 avec CsOH

II.A.5.c Mesure du courant I<sub>Na</sub> dans le projet amiodarone

# Tableau 8: Composition des milieux intracellulaire et extracellulaire pour l'enregistrement de I<sub>Na</sub> dans les cardiomyocytes ventriculaires de souris

	<b>.</b>	• • • • • • • • • • •
	Milieu Extracellulaire	Milieu intracellulaire
NaCl	10 mM	
N-methyl-D-glucamine	126.9 mM	
KCI		
CsCl	5.4 mM	60 mM
Ac. aspartique		50 mM
Na₂ATP		5 mM
CaCl <sub>2</sub>	2 mM	1 mM
MgCl <sub>2</sub>	1.06 mM	1 mM
EĞTA		11 mM
HEPES	10 mM	10 mM
Glucose	10 mM	
рН	7.3 avec CsOH	7.4 avec NaOH

L'enregistrement du courant  $I_{Na}$  a été réalisé par l'équipe de Hugues Abriel (Lausanne, Suisse).

Les pipettes utilisées ont une résistance comprise entre 1 et 2 Mohm, une fois remplie de solution intrapipette. Le Na<sup>+</sup> extérieur est substitué partiellement par de la N-methyl-D-glucamine et le K<sup>+</sup> est substitué totalement par le Cs<sup>+</sup>. Les enregistrements ont été réalisés à température ambiante (22 à 24°C). Les cellules sont perfusées en continu par une solution de: NaCl 136.9 mM, KCl 5.4 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.06 mM, HEPES 10 mM, glucose 10 mM, pH 7.4 avec NaOH.

Afin de s'affranchir des effets directs de l'amiodarone sur l'inactivation du canal Na<sup>+</sup>, un potentiel membranaire de –120 mV est imposé avant d'appliquer des sauts de potentiel.

II.A.6 Enregistrement des courants K<sup>+</sup> dans les cellules COS-7
Dans ce modèle, le seul courant mesuré est généré par l'activité des canaux codés par le plasmide transfecté. En effet, les cellules COS-7 possèdent une conductance K<sup>+</sup> endogène très faible et négligeable par rapport aux conductances générées par les canaux que nous avons ré-exprimés de façon hétérologue dans ces cellules. La composition des solutions utilisées pour l'enregistrement des courants K<sup>+</sup> dans ce modèle de ré-expression hétérologue est indiquée dans le tableau suivant:

	Milieu extracellulaire	Milieu intracellulaire
NaCl	145 mM	
KCI	4 mM	74.5 mM
K-aspartate		70.5 mM
K₂ATP		2 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM	0.3 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM	
EGTA		2 mM
HEPES	5 mM	5 mM
Glucose	5 mM	
Mannitol	30 mM	
pH	7.4 avec HCI	7.2 avec KOH

Tableau 9: composition des milieux extracellulaire et intracellulaire pour l'enregistrement des courants K<sup>+</sup> dans les cellules COS-7

## **II.B ETUDES ELECTROCARDIOGRAPHIQUES**

Dans l'étude sur les effets de l'amiodarone, des ECG de surface ont été réalisés afin de vérifier les effets du traitement chronique sur l'activité électrique globale du coeur. Ces mesures ont été réalisées au cours de la cinquième semaine de traitement sur les deux groupes de souris: traité et non traité.

L'ECG est effectué de la façon suivante: les souris sont anesthésiées par injection intrapéritonéale de 15 mg/kg d'étomidate (Hypnomidate<sup>®</sup> 2 mg/ml, *Janssen Cilag*) et placées en décubitus dorsal sur une planche en bois sous une cage de Faraday. Deux électrodes sous-cutanées sont placées au niveau des deux pattes antérieures (dérivation D1). Les électrodes sont reliées à un amplificateur et l'acquisition des données a été réalisée avec le logiciel IOX 1.585 (*EMKA Technologie*). L'analyse est effectuée avec le logiciel ECG auto 1.5.77 (*EMKA Technologie*).

Au cours de l'analyse, nous avons considéré:

- L'intervalle RR ou rythme cardiaque.
- la largeur de l'onde P qui correspond à la dépolarisation auriculaire.
- l'intervalle PR qui reflète le temps de conduction auriculo-ventriculaire (AV)

- la largeur du complexe QRS principalement due à la dépolarisation ventriculaire
- les intervalles QV et QT correspondant aux phases de repolarisation précoce et tardive des ventricules puisque chez la souris l'onde T est biphasique. Ces deux valeurs sont corrigées suivant la formule de Mitchell: QTc = QT/(RR/100)<sup>1/2</sup> (Mitchell et coll., 1998) afin d'obtenir des valeurs de QT et QV corrigées par rapport à un cycle sinusal moyen de 100 ms.

Les paramètres étudiés sont mesurés sur 3 complexes successifs et sont moyennés



**S** Figure 32: Position des ondes P, Q, R, S, T et V d'un ECG de souris

# **RESULTATS**

# REMODELAGE ELECTRIQUE INDUIT PAR UN TRAITEMENT CHRONIQUE À L'AMIODARONE CHEZ LA SOURIS

#### Introduction

L'amiodarone est l'anti-arythmique de classe III le plus efficace et le plus utilisé dans le traitement de la fibrillation auriculaire et des tachycardies ventriculaires. Son profil pharmacologique est complexe, impliquant à la fois des effets à court terme et à long terme (pour revue, Kodama et coll., 1997). Les effets à court terme dépendent de son action directe sur l'activité des canaux ioniques. Décrit classiquement comme appartenant à la famille des anti-arythmiques de classe III (inhibiteurs des courants K<sup>+</sup>), elle possède également des effets de classe I (inhibiteurs I<sub>Na</sub><sup>+</sup>), de classe II (β-bloquants) et de classe IV (inhibiteurs I<sub>Ca</sub><sup>2+</sup>). Ces effets à court terme conduisent à une diminution de l'excitabilité et de la conduction auriculo-ventriculaire alors que ces effets sur la repolarisation varient d'un modèle à l'autre (Patterson et coll., 1986; Stark et coll., 1991; Kodama et coll., 1997). A long terme, en plus de son action directe sur les canaux, les effets de l'amiodarone sont plus larges. Sa structure iodée proche de celle des hormones thyroïdiennes lui permet d'agir sur le métabolisme thyroïdien en induisant une hypothyroïdie aux conséquences cardiaques multiples comme la bradycardie ou l'allongement de la repolarisation et des périodes réfractaires (Binah et coll., 1987; Sharp et coll., 1985).

Malgré les nombreuses données sur les propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques de l'amiodarone, son mécanisme d'action reste encore mal connu. Notre hypothèse est qu'un traitement chronique à l'amiodarone pourrait induire un remodelage de l'expression des gènes codant pour les canaux ioniques. Cet effet indirect de l'amiodarone sur les courants ioniques cardiaques a déjà été proposé (Dvrota et coll., 1998; Kodama et coll., 1997). Son mécanisme d'action serait lié à l'induction d'un syndrome hypothyroïdien qui est connu pour induire un remodelage important de l'expression des gènes codant pour les canaux ioniques.

Le but de cette étude a été d'évaluer le rôle du remodelage ionique dans les effets chroniques de l'amiodarone. Dans un premier temps, nous avons établi le profil d'expression des canaux ioniques chez les souris traitées grâce à la technique des puces à ADNc. L'impact de ces variations d'expression a été évalué sur la fonction des canaux par la mesure des densités de  $I_{to}$ ,  $I_{Na}$  et  $I_{K1}$ .

#### Résultats et discussion

#### <u>Modèle</u>

Des souris C57BLJ/6 mâles adultes (10 semaines) ont été traitées par l'administration orale d'amiodarone (30, 90 ou 180 mg/kg/jour) ou par son véhicule pendant 6 semaines. Nous avons évalué le niveau d'accumulation de l'amiodarone et de son métabolite actif, le ndésethylamiodarone (n-DEA) dans l'organisme des souris traitées par les dosages tissulaires et plasmatiques. Le statut hypothyroïdien de ces souris a également été contrôlé par l'analyse plasmatique des taux d'hormones T3 et rT3 (figure 1 et tableau 1 de l'article). Les conséquences électrophysiologiques du traitement ont été évaluées par la mesure d'ECGs de surface et par enregistrements et stimulations endocavitaires. Le groupe de souris traitées avec une dose de 30 mg/kg/jour ne présente aucune modification des paramètres ECGs. Un allongement dose-dépendant des intervalles RR, PR, QRS et QT a en revanche été observé pour les doses 90 et 180 mg/kg/jour. L'allongement de l'intervalle PR est associé à un ralentissement de le conduction supra-hissienne (intervalle AH) et infrahissienne (intervalle HV). Le ralentissement de la conduction intracardiaque est d'autant plus important que la dose utilisée pour le traitement est élevée (figure 2 et tableau 2 de l'article). Cependant, seul le traitement à une dose de 180 mg/kg/jour induit un allongement significatif de l'onde P et plus particulièrement de l'intervalle QTc . Nous avons donc utilisé les souris de ce groupe afin de caractériser le profil d'expression des canaux ioniques associé à un traitement chronique à l'amiodarone.

#### Effets sur le transcriptome ventriculaire

Le traitement chronique à 180 mg/kg/jour induit un remodelage qui touche plusieurs familles de gènes (figure 4 de l'article). Parmi les gènes différentiellement exprimés, se trouvent des gènes impliqués dans la conduction cardiaque comme les gènes *Scn4a*, *Scn5a* et *Scn1b* codant pour les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  des canaux Na<sup>+</sup> ou encore le gène *Gja1* codant pour la connexine 43. Ces variations sont concordantes avec la diminution du taux des protéines Nav1.5 (*Scn5a*) et connexine 43 mise en évidence par la technique de western blot. Dans la famille des canaux K<sup>+</sup>, les canaux Kv2.1 (*Kcnb1*), Kv1.5 (*Kcna5*) et Kv4.2 (*Kcnd2*) sont sous-exprimés chez les souris traitées par rapport aux souris non traitées. De façon surprenante, nous avons observé une augmentation de l'expression des sous-unités régulatrices Kv $\beta$ 1 (*Kcnab1*), MIRP-1 (*Kcne2*) MIRP-2 (*Kcne3*) mais aussi du gène *Kcna4* qui code pour la protéine Kv1.4 (à l'origine du courant I<sub>to.s</sub>).

L'homéostasie calcique est également modifiée. Ainsi, il est observé une diminution de l'expression du gène *Cacna1c* codant pour la sous-unité  $\alpha$  Cav1.2 et une diminution de l'expression des gènes codant pour deux de ses protéines régulatrices *Cacnb1* et *Cacnb2*.

#### Effets sur les courants membranaires et corrélations avec les données moléculaires

Les courants membranaires ont été mesurés par la technique de patch-clamp en configuration cellule entière. Nous avons étudié les principaux courants cardiaques ventriculaires à savoir  $I_{to}$ ,  $I_{K, slow}$ ,  $I_{ss}$ ,  $I_{K1}$ ,  $I_{Na}$  et  $I_{Ca, L}$ .

Pour les courants K<sup>+</sup>, nous avons observé une réduction significative des courants I<sub>to</sub> et I<sub>K, slow</sub> (figure 6A de l'article) ce qui est en accord avec les réductions d'expression observées des gènes *Kcnd2* (Kv4.2), *Kcna5* (Kv1.5) et *Kcnb1* (Kv2.1) (figure 4 de l'article). Nous n'avons observé en revanche aucune variation de I<sub>ss</sub> dont la nature moléculaire reste inconnue à ce jour. Enfin, le courant I<sub>K1</sub> (figure 6B de l'article) comme les niveaux d'expression des gènes *Kcnj2* (Kir2.1) et *Kcnj12* (Kir2.2) ne sont pas modifiés par le traitement chronique à une dose d'amiodarone de 180 mg/kg/jour. Ainsi, l'allongement de l'intervalle QTc est concordant avec la réduction des courants I<sub>to</sub> et I<sub>K, slow</sub> et le niveau d'expression des gènes correspondants. Ce résultat suggère que l'augmentation d'expression du gène *Kcna4* (Kv1.4) mais aussi de l'expression des gènes codant pour des sous-unités régulatrices (Kvβ1, MIRP-1 et MIRP-2) (figure 4 de l'article) ne constitueraient pas un mécanisme de compensation de la réduction des courants I<sub>to</sub> et I<sub>K, slow</sub>.

Le courant Na<sup>+</sup> cardiaque est diminué de façon significative chez les souris traitées par rapport au groupe de souris non traitées (figure 6C de l'article). Cette réduction est associée à une diminution nette du niveau d'expression du gène *Scn5a* et de l'expression de la protéine Nav1.5. Ainsi, le ralentissement de la conduction (allongement des intervalles PR, QRS, AH et HV) serait lié en partie à la diminution d'expression du gène *Scn5a*.

L'expression du gène *Cacna1c* qui code pour le canal Cav1.2 et des gènes codant pour les sous-unités régulatrices *Cacnb1* et *Cacnb2* sont diminuées, cependant, nous n'avons observé aucune variation de la densité de  $I_{Ca,L}$ . Ce résultat suggère que dans le cas du courant Ca<sup>2+</sup> des mécanismes post-transcriptionnels et/ou traductionnels pourraient participer à la régulation de l'expression membranaire de ce courant. Cette hypothèse est appuyée par le fait que dans notre modèle nous avons observé de nombreuses variations d'expression de gènes codant pour des sous-unités régulatrices de canaux ioniques. Ces protéines exerçant dans certains cas une régulation forte de l'amplitude du courant (Hanlon et Wallace, 2002), la relation nette entre la variation du niveau de transcrit et le niveau de courant membranaire n'est donc pas toujours systématique.

## Conclusions

Dans cette étude, nous avons montré que la variation d'expression des gènes codant pour les canaux ioniques est fortement corrélée aux modifications éléctrophysiologiques induites par un traitement chronique à l'amiodarone. Ces résultats suggèrent donc qu'une partie des effets chroniques de l'amiodarone est liée à ses effets sur l'expression des gènes cardiaques. Les mécanismes responsables de ce remodelage ionique peuvent être expliqués par deux hypothèses non-exclusives: (1) un effet direct de l'amiodarone et de son métabolite actif sur l'expression des gènes, (2) l'induction d'un syndrome hypothyroïdien. La première hypothèse est soutenue par deux travaux montrant l'effet de l'amiodarone et/ou de son métabolite actif dans la régulation de l'interaction entre un récepteur nucléaire et un co-activateur de la transcription (Van Beeren et coll., 2000) et dans la régulation du gène codant pour le récepteur au LDL (Bakker et coll., 1998). La seconde hypothèse est envisageable mais ne peut expliquer la totalité du remodelage expliqué. En effet, les modifications d'expression des gènes induites par l'hypothyroïdie dans le ventricule chez la souris sont proches, mais ne reflètent pas exactement celles obtenues dans la présente étude (Le Bouter et coll., 2003).

### REMODELAGE ELECTRIQUE INDUIT PAR UN BAV CHEZ LA SOURIS

#### Introduction

Le bloc auriculo-ventriculaire (BAV) complet qu'il soit de nature congénitale ou acquise (Sholler et coll, 1989; Gladman et coll, 1996) est une cause connue de mort subite d'origine cardiaque. L'adaptation intrinsèque du cœur à la dissociation électrique entre les oreillettes et les ventricules se traduit par l'émergence de foyers ectopiques au sein du réseau de His-Purkinje. Le rythme idioventriculaire généré est plus lent que le rythme sinusal et donc inadéquat à une fonction efficace des ventricules. Cette défaillance est à l'origine d'une surcharge de volume favorisant l'hypertrophie et est généralement associée à un allongement de l'intervalle QT. Le processus pathologique évolue ensuite généralement vers l'insuffisance cardiaque.

Différents modèles animaux en BAV complet ont déjà été décrits. De tous ces modèles, le chien est le plus utilisé car il a l'avantage de bien supporter le BAV. Contrairement aux petits animaux, il ne développe pas d'épisodes spontanés d'arythmies mais une susceptibilité accrue aux torsades de pointes après administration d'agents pro-arythmiques (Tsuji et coll, 2002). Le modèle du lapin est moins intéressant car il supporte difficilement le BAV et présente une incidence anormalement élevée de mort subite (Suto et coll., 2005). Dans ces deux modèles, le remodelage électrique précoce est associé à une réduction des courants majoritaires de la repolarisation:  $I_{Kr}$  et  $I_{Ks}$ . Les amplitudes des courants  $I_{to}$  et  $I_{K1}$  ne sont pas modifiées. Chez la souris, le courant majoritaire de la repolarisation est Ito. Des études biochimiques ont montré que sa composante rapide, Ito, est générée par l'assemblage hétéromultimérique des sous-unités Kv4.2 et Kv4.3 et de la sous-unité régulatrice KChIP2 (Guo et coll., 2002). Une étude récente réalisée dans un modèle de souris invalidée pour le gène Kcnd2 a montré que l<sub>to,f</sub> disparait dans les cardiomyocytes ventriculaires isolés de ces souris, ce qui suggère que le courant est fortement dépendant de l'expression de Kv4.2. Dans ce modèle, l'élimination de l<sub>to,f</sub> n'est pas suivie d'une hypertrophie des ventricules (Guo et coll., 2005). En revanche, chez la souris transgénique exprimant une forme tronguée de Kv4.2, l'hypertrophie est associée à une diminution de la densité de I<sub>to,f</sub> (Wickenden et coll., 1999).

Notre hypothèse est que ces différents processus sont en partie due à un remodelage ionique complexe. Nous avons donc développé un nouveau modèle de BAV complet chez la souris pour caractériser à large échelle le remodelage ionique associé à l'hypertrophie et au remodelage électrique. Notre but était de déterminer la cinétique d'apparition des différents processus, et le cas échéant, d'établir des relations de cause à effet. Dans notre modèle de souris en BAV complet, nous avons voulu vérifier si le remodelage électrique précoce est

associé à une modification de l'amplitude de  $I_{to,f}$ . Le deuxième objectif de cette étude était de déterminer si la variation du courant repolarisant majoritaire est à l'origine où apparaît parallèlement au processus hypertrophique.

#### Résultats et discussion

#### Modèle

Le BAV a été obtenu par ablation du faisceau de His par radiofréquence sur des souris mâles CD1<sup>®</sup> âgées de 10 semaines (figure 1 de l'article). Ces souris ont été réparties en 4 groupes pour étudier les conséquences moléculaires et électrophysiologiques du BAV à 12 heures, 1 jour (J1), 2 (J2) jours et 5 jours (J5) après ablation du faisceau de His. Deux autres groupes ont également été inclus dans cette étude et correspondent respectivement au groupe contrôle (n'ayant pas subi de chirurgie) et à un groupe ayant subi une chirurgie mais sans induction de BAV.

Le suivi télémétrique des souris nous a permis de mettre en évidence des épisodes spontanés de tachycardies ventriculaires polymorphes et ce dans les 24 heures qui suivent l'induction du BAV (figure 2A et 2B de l'article). Ces arythmies précédent l'augmentation du poids du cœur qui survient 2 jours après l'induction du BAV. Cette augmentation du poids du cœur est associée à des modifications d'expression des gènes codant pour des protéines contractiles et des marqueurs d'hypertrophie (figure 3 de l'article). Ainsi, l'actine  $\alpha$  squelettique et la chaîne lourde de la myosine  $\beta$  sont sur-exprimées de façon significative dans les cœurs de souris en BAV par rapport aux cœurs des souris n'ayant pas subi de BAV. De même, l'expression des gènes codant pour le procollagène ou le facteur natriurétique neuronal (BNP pour Brain natriuretic peptide) est augmentée de façon significative.

La fonction ventriculaire a également été explorée. A l'aide de cathéters des mesures de pression (millar), nous avons observé que 5 jours après l'induction du BAV, les souris conservent une fonction contractile ventriculaire et une pression systolique inchangée par rapport au groupe de souris contrôles. En revanche, la pression diastolique et la relaxation des ventricules sont diminuées.

#### Effets sur le transcriptome des canaux K<sup>+</sup>

Le profil d'expression des gènes des souris en BAV complet a été caractérisé par RT-PCR quantitative à l'aide de la technologie des *TaqMan Low Density Arrays* (TLDA, Applied Biosystems) ou cartes microfluides. Les résultats obtenus ont ensuite été analysés en

utilisant un système de hiérarchisation en 2 dimensions, ou clusterisation (figure 4 de l'article). Cette méthode nous a permis de mettre en évidence l'existence d'un remodelage ionique précoce, apparaissant dans les premières heures post-BAV et un remodelage ionique plus tardif, associé à l'hypertrophie et qui se met en place à partir de J2. Dans les premières heures post-BAV, l'adaptation au rythme idio-ventriculaire se traduit par une modification de l'expression des gènes codant pour des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  des canaux ioniques (figure 5, 6 et 7 de l'article). Parmi les variations observées, certaines sont transitoires et d'autres, au contraire, se maintiennent dans le temps. Ainsi, l'expression de la sous-unité  $\alpha$  Kv4.2 est diminuée de façon transitoire à J1 et J2 puis revient rapidement à son niveau contrôle à J5. De façon surprenante, l'expression du gène codant pour la sous-unité régulatrice de Kv4.2, *Kcnip2* (KChIP2), diminue progressivement jusqu'à J5 et ne revient pas à son niveau initial.

D'autres gènes codant pour des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de canaux K<sup>+</sup> dépendant du potentiel sont eux sur-exprimés chez les souris en BAV tels que *Kcna4* (Kv1.4), *Kcnb1* (Kv2.1), *Kcnq1* (KvLQT1) ou *Kcne1* (minK). A l'inverse, l'augmentation de l'expression du gène *Kcna5* (Kv1.5) est transitoire au cours des douze premières heures et revient rapidement à son niveau initial dès J1.

L'expression des gènes codant pour les sous-unités  $\alpha$  de canaux K<sup>+</sup> rectifiants entrants est également modifiée comme *Kcnj3* (Kir3.1) ou au contraire inchangée comme *Kcnj*2 (Kir2.1).

#### Effets sur les courants membranaires et corrélations avec les données moléculaires

L'hypertrophie ventriculaire est généralement associée à une réduction des courants K<sup>+</sup> majoritaires. Dans les modèles de chien et de lapin en BAV, il est ainsi observé une réduction des courants K<sup>+</sup> retardés qui sont les courants repolarisants majoritaires alors que le courant K<sup>+</sup> transitoire sortant I<sub>to,f</sub> est invariant. Chez la souris, la repolarisation dépend fortement du courant I<sub>to,f</sub>. Nous avons donc vérifié si les modifications d'expression observées pour Kv4.2 et KChIP2 ont une répercussion sur le niveau de courant I<sub>to</sub>. Le niveau d'expression de ces deux protéines a été étudié par la technique de western Blot et le courant par la technique de patch-clamp. Nous avons ainsi mis en évidence une correspondance nette entre les variations d'expression du transcrit et de la protéine Kv4.2 avec les variations de densité du courant I<sub>to</sub> (figure 8 de l'article). Ainsi, pour le courant I<sub>to,f</sub>, une relation directe existe entre le niveau de transcrits et le niveau de protéines fonctionnelles à la membrane. Ce résultat suggère que chez la souris le niveau de courant I<sub>to,f</sub> est déterminé principalement par le niveau d'expression de la protéine Kv4.2. Cette observation est appuyée par des études qui montrent que le gradient transmural de I<sub>to,f</sub>

est dépendant de l'expression différentielle de KChIP2 au sein des différentes régions du ventricule (Rosati et coll., 2003).

La diminution transitoire de  $I_{to,f}$  (J1) survient après l'apparition des épisodes de torsades de pointe (observables 12h après l'induction du BAV). La variation de  $I_{to,f}$  ne participe donc pas au remodelage électrique associé aux troubles du rythme. Dès les premières heures post-BAV, il est observé un allongement très important de l'intervalle QT. Or, l'allongement de l'intervalle QT consécutif à une bradycardie est une cause bien connue de survenue de torsades de pointes (Kurita et coll., 1992). Ainsi, comme chez le lapin, les troubles du rythme observés sont probablement une conséquence directe de la bradycardie (Tsuji et coll. 2002; Suto et coll., 2005) mais ils peuvent également être favorisés par la diminution d'expression des canaux.

Nous avons observé que l'expression des principaux marqueurs de l'hypertrophie n'est effective qu'à partir du 2<sup>ème</sup> jour après l'induction du BAV. Or, Ito, est diminué transitoirement à J1. A J5, il a retrouvé son niveau contrôle alors que l'augmentation des margueurs d'hypertrophie se confirme. Ces résultats suggèrent que l'hypertrophie ne serait pas liée, comme dans certains modèles, à la diminution de  $I_{to,f}$  (Sah et coll., 2002). Cependant, nous pensons que cette variation transitoire pourrait être suffisante pour déclencher les mécanismes à l'origine de l'hypertrophie. Les études sur la relation entre l'initiation du processus hypertrophique et les variations de  $I_{to,f}$  sont nombreuses mais contradictoires. Dans son modèle de souris invalidée pour Kcnd2 (Kv4.2<sup>-/-</sup>), Guo et coll. ont montré que la suppression de l<sub>to,f</sub> n'induit pas d'hypertrophie (Guo et coll., 2005). De même, elle n'est pas observée chez la souris invalidée pour le gène Kcnip2 (KChIP2 ---) (Kuo et coll., 2001) et la souris exprimant une autre forme tronquée de Kv4.2 (Kv4.2DN) (Guo et coll., 2002). Ce résultat diffère de ce qui a été observé chez la souris transgénique exprimant une forme tronquée de Kv4.2 (Kv4.2N) (Wickenden et coll., 1999). Dans ce modèle, l'hypertrophie est en effet associée à une diminution de l'amplitude d'I<sub>to,f</sub> et peut être prévenue par l'inhibition de la voie de la calcineurine et de I<sub>Ca,L</sub> (Sah et coll., 2002). La calcineurine est connue pour activer les voies de signalisations impliquées dans le processus hypertrophique ce qui suggère que dans ce modèle l'hypertrophie et la diminution de I<sub>to,f</sub> sont liées (De Windt et coll., 2000). Cependant, contrairement aux souris transgéniques Kv4.2DN et Kv4.2<sup>-/-</sup>, la souris Kv4.2N présente un remodelage structural important. En effet, ces souris présentent en plus de l'hypertrophie une dilatation des cavités ventriculaires et de la fibrose (Wickenden et coll., 1999). D'autres études réalisées à partir de cultures cellulaires de cardiomyocytes de rats nouveaux-nés (Kassiri et coll., 2002; Zobel et coll., 2002) ont mis en évidence une relation entre l'hypertrophie et la présence du courant Ito,f. Cette relation a également été mise en évidence in vivo dans un modèle de rat présentant une sténose de l'aorte ascendante (Lebeche et coll., 2004). Ces animaux se caractérisent par une hypertrophie

ventriculaire associée à une diminution de  $I_{to,f}$  et de l'expression des sous-unités Kv4.2 et Kv4.3. Dans ce modèle, la transfection adénovirale avec un vecteur codant pour la sousunité Kv4.3 permet de restituer le niveau de courant  $I_{to,f}$  et de stopper le processus hypertrophique. Cet effet d'une sur-expression de Kv4.3 est également à l'origine de l'inhibition du processus hypertrophique dans des cardiomyocytes de rats nouveaux-nés traités à l'angiotensine II (Lebeche et coll., 2006). L'ensemble de ces résultats suggère que le déclenchement de l'hypertrophie et les variations de densité de  $I_{to,f}$  sont liés. Il est cependant encore difficile de conclure sur la relation de cause à effet entre ces deux mécanismes.

#### Conclusions

Dans ce modèle, nous avons mis en évidence deux types de remodelage ionique. Un remodelage précoce lié aux troubles du rythme (avant J1) et un remodelage tardif lié à l'hypertrophie (à partir de J2). Contrairement aux modèles de chien et de lapin, une diminution transitoire de  $I_{to,f}$  est observée après la survenue des troubles du rythme et avant le processus hypertrophique. Nos résultats suggèrent que la variation d' $I_{to,f}$  dépendrait de mécanismes différents de ceux impliqués dans les troubles du rythme et/ou l'hypertrophie. Cependant, il reste difficile de conclure de façon définitive sur le rôle précis de la réduction de  $I_{to,f}$  sur l'hypertrophie. Cette diminution pourrait en effet constituer un signal déclencheur du remodelage ionique associé à l'hypertrophie qui permettent par exemple l'activation de voies transcriptionnelles

L'expression de Kv4.2 est régulée par des facteurs de transcription comme GATA4 (Jia et coll., 2003) et/ou Irx5 (Costantini et coll., 2005). Dans notre modèle, nous avons observé une modification de l'expression de ces facteurs de transcription. Cependant, ces variations ne permettent pas d'expliquer la variation d'expression de Kv4.2. Ainsi, Irx5 qui est un répresseur de l'expression de Kv4.2 est augmenté après la diminution transitoire de I<sub>to,f</sub>. Ces corrélations sont difficiles à mettre en évidence du fait de la complexité de notre modèle caractérisé par une activation de nombreuses voies de signalisation. Nous avons par exemple observé une élévation du tonus adrénergique qui est reflétée par la diminution de l'intervalle PP. De plus, l'existence d'un stress oxydatif et/ou métabolique fort est fortement suspectée. En effet, l'augmentation de l'expression de gènes comme *Kcnj3* (Kir 3.1) ou de gènes codant pour des facteurs de transcription comme ATF3, Jun ou Myc … etc met en évidence l'existence d'un stress cellulaire.

L'étude des relations entre la variation d'expression des facteurs de transcription et les variations d'expression des sous-unités  $\alpha$  correspondantes constituera une suite importante de cette étude. La recherche des différents couples facteurs de transcription/canaux sera

facilitée par une étude réalisée à partir d'un modèle plus simple de cardiomyocytes de souris nouveaux-nés en culture.

# EFFET D'UNE SUR-EXPRESSION DE HERG DANS L'INDUCTION DES TROUBLES DU RYTHME

#### Introduction

La repolarisation ventriculaire est un équilibre précaire qui met en jeu différentes conductances entrantes ( $I_{Na}$  retardé,  $I_{Ca}$ ) et sortantes ( $I_{to}$ ,  $I_{\kappa}$ ,  $I_{\kappa 1}$ ). L'activation séquentielle des courants va déterminer la durée de la repolarisation ce qui est un paramètre clé dans l'apparition des troubles du rythme. En effet, tout facteur qui va réduire les conductances K<sup>+</sup> et/ou augmenter les conductances Na<sup>+</sup> et Ca<sup>2+</sup> va allonger la durée de la repolarisation et favoriser la survenue de post dépolarisations précoces et de torsades de pointes. A l'inverse, l'accélération de la repolarisation (par réduction des conductances entrantes et/ou augmentation des courants K<sup>+</sup>) va accentuer la dispersion de la repolarisation et favoriser l'émergence de circuits de réentrées. Chez l'Homme, le courant I<sub>Kr</sub> a un rôle central dans la régulation de cette balance. Son inhibition est à l'origine d'un allongement de la durée de la repolarisation et des périodes réfractaires ce qui limite la survenue des troubles du rythme. L'inhibition de  $I_{kr}$  pourrait donc représenter une stratégie intéressante dans la prise en charge thérapeutique des troubles du rythme ventriculaires. Cependant, cette approche s'est révélée infructueuse et même délétère chez les patients souffrant de dysfonctions ventriculaires gauches sévères (Waldo et coll., 1996). En outre, le syndrome du QT long de type 2 est lié à des mutations sur le canal hERG. Ces anomalies sont à l'origine d'une perte de fonction du canal et peuvent déclencher des arythmies ventriculaires fatales (Curran et coll., 1995; Sanguinetti et coll., 1995). Enfin, il a été montré qu'un nombre croissant de médicaments non cardiaques peuvent induire des arythmies et conduire même à des morts subites en inhibant spécifiquement le courant lkr.

Des études récentes se sont intéressées au rôle potentiellement protecteur de  $I_{Kr}$  contre la survenue de troubles du rythme. Ainsi, dans son modèle informatique de PA ventriculaire, l'équipe de Gilmour a montré que les alternances de la durée de la repolarisation peuvent être supprimées en augmentant l'amplitude des courants  $I_{K1}$ ,  $I_{Kr}$  et  $I_{Ks}$  (Fox et coll., 2002). Sur le plan expérimental, la sur-expression du canal hERG par transfection adénovirale dans les myocytes ventriculaires de chien supprime l'apparition des alternances lors de cycles rapides de stimulation (Hua et coll., 2004). L'augmentation de  $I_{Kr}$  semble donc avoir un effet anti-arythmique certain, notamment pour des rythmes cardiaques rapides. Cependant, augmenter  $I_{Kr}$  de façon trop importante peut être également à l'origine de troubles du rythme. En effet, des mutations gain de fonction de la séquence codante de hERG ont été identifiées dans trois familles (Brugada et coll., 2004). Ces mutations conduisent à une suppression de l'inactivation de type C du canal ce qui a pour conséquence de raccourcir la durée de

l'intervalle QT. Ce syndrome de QT court est à l'origine de mort subite. Ainsi, augmenter  $I_{Kr}$  peut voir des effets aussi bien anti-arythmiques que pro-arythmiques.

C'est dans ce contexte que nous avons généré une souris sur-exprimant le gène *KCNH2* au niveau cardiaque. Notre but était d'évaluer les conséquences physiologiques de l'expression de hERG sur la repolarisation ventriculaire et de déterminer son rôle lors de l'initiation des troubles du rythme. Nous avons choisi de mener cette étude sur le cœur de souris adulte où le courant  $I_{Kr}$  n'est pas détecté au niveau ventriculaire. Notre stratégie a consisté à sur-exprimer le gène *KCNH2* sous la commande d'un promoteur cardiaque ( $\alpha$ -*MHC*). Notre hypothèse était que la sur-expression de hERG conduirait à un remaniement de l'expression du transcriptome ionique du cœur aboutissant à une réduction de l'expression des courants repolarisants endogènes. Ainsi dans ce modèle, la modulation de la durée de la repolarisation devrait dépendre en partie de la présence du courant  $I_{Kr}$ .

La première partie de cette étude a consisté en l'établissement et l'exploration phénotypique de la lignée de souris transgéniques  $\alpha$ -*MHC-hERG*. La deuxième partie de ce travail a été consacrée au rôle d'I<sub>Kr</sub> dans la repolarisation et notamment lors de la survenue de troubles du rythme. Notre but était de déterminer si la sur-expression de hERG a un effet protecteur ou au contraire favorable dans le déclenchement des arythmies.

#### Résultats et discussion

#### Rôle de hERG dans la repolarisation ventriculaire des souris transgéniques α-MHC-hERG

Dans cette première partie, la caractérisation moléculaire et cellulaire de ces souris a montré que l'expression du transgène est spécifique au cœur et est homogène au sein de celui-ci. Ces souris sont viables et ne présentent pas d'anomalie structurale cardiaque. Mon travail a consisté à vérifier que le produit du transgène est bien fonctionnel. J'ai donc réalisé des études de patch-clamp en configuration cellule-entière sur des cardiomyocytes ventriculaires de souris sauvages et transgéniques fraîchement isolés (figure 1C de l'article). Les souris transgéniques présentent un courant de queue sensible à l'E-4031 caractéristique de l<sub>Kr</sub> avec une amplitude maximale de 5.4 pA/pF et une cinétique de désactivation à deux constantes de temps ( $\tau_1 = 44 \pm 5$  ms et  $\tau_2 = 249 \pm 66$  ms à -50 mV, n=6 ). Aucun courant de queue sensible à l'E-4031 n'a été détecté au niveau des cardiomyocytes ventriculaires des souris sauvages. Cependant, hormis une morphologie de l'onde T plus négative pour les souris transgéniques, aucune différence notable n'a été détectée dans la mesure des paramètres ECGs de base entre les souris transgéniques et les souris sauvages (figure 2; tableau 1 de l'article). De plus, de façon surprenante l'E-4031 a très peu d'effet sur la repolarisation des

souris transgéniques (figure 2D de l'article). Ces résultats suggèrent que la contribution du courant  $I_{Kr}$  humain dans la repolarisation cardiaque chez les souris transgéniques serait faible par rapport aux courants endogènes repolarisants ( $I_{to}$  et  $I_{K,slow}$ ). Pour répondre à cette question, nous avons réalisé chez ces souris une injection de tédisamil qui est un inhibiteur des courants  $I_{to}$  et  $I_{K,slow}$  (Dukes et coll., 1990; Doggrell, 2001). Dans ces conditions, le QTc des souris transgéniques est significativement plus court que celui des souris sauvages ce qui montre que dans ces conditions hERG participe à la repolarisation (tableau 2 de l'article). Cet allongement est de 18 ms alors qu'il était de 5 ms en absence de tedisamil. L'expression de HERG crée donc une réserve de repolarisation.

#### Rôle de hERG lors de la survenue de troubles du rythme

Nous avons déclenché chez ces souris deux types de troubles du rythme: soit une tachycardie ventriculaire par injection intraveineuse de Ba<sup>2+</sup> (BaCl<sub>2</sub> 25 mg/kg dans la veine caudale de la souris; figure 3 de l'article) soit des arythmies auriculaires par stimulations rapides intracardiaques des oreillettes en présence d'un tonus vagal élevé (fréquence de cycle de 115 ms durant 2 secondes et injection de carbamylcholine; figure 4 de l'article). Dans les deux cas, les souris transgéniques sont beaucoup moins susceptibles au déclenchement de troubles du rythme que les souris sauvages. En effet, 9/10 souris sauvages présentent de courtes salves de tachycardie ventriculaire après injection de Ba<sup>2+</sup> alors que les souris transgéniques ne sont sujettes à ces arythmies qu'en présence de dofétilide (10 mg/kg i.p), un inhibiteur spécifique de hERG. De même, seulement 2/11 souris transgéniques présentent des épisodes de tachycardie auriculaire ou de fibrillation auriculaire après stimulation contre 11/15 souris sauvages. L'ensemble de ces résultats suggère que hERG exerce un effet protecteur lors du déclenchement de troubles du rythme aussi bien à l'étage ventriculaire qu'à l'étage auriculaire. Cet effet est en outre spécifique au courant Ikr. En effet, les souris sur-exprimant le concatémère hKCNQ1-hKCNE1 (à l'origine du courant  $I_{Ks}$ ) présentent une susceptibilité aux arythmies auriculaires similaire aux souris sauvages (figure 5 de l'article). Cette différence entre  $I_{Kr}$  et  $I_{Ks}$  pourrait être en partie due aux cinétiques des deux courants. C'est ce que nous avons voulu comprendre dans la troisième partie de cette étude.

# Mécanismes impliqués dans le rôle protecteur de hERG lors de la survenue de troubles du rythme

Le but de cette étude était de comprendre les mécanismes par lesquels le courant  $I_{Kr}$  empêche la survenue de troubles du rythme. Mon travail a consisté à ré-exprimer dans des

cellules COS-7 le canal hERG et le concatémère *hKCNQ1-hKCNE1*. Les cellules transfectées ont été stimulées par la technique de PA-clamp en utilisant des enregistrements de PA ventriculaires humains (durée moyenne de 300 ms) et de PA auriculaires de souris (durée moyenne de 50 ms). Les courants  $I_{Kr}$  et  $I_{Ks}$  sont identifiés respectivement comme le courant E-4031 sensible et HMR 1556 sensible.

La stimulation par le PA ventriculaire humain des cellules COS-7 exprimant le canal hERG provoque une activation rapide du courant qui s'inactive presque simultanément (figure 6B de l'article). Ce phénomène est à l'origine du délai d'activation du courant Ikr au cours du PA humain (Zhou et coll., 1998b). En début de phase 3, la repolarisation membranaire favorise la levée d'inactivation du courant qui augmente progressivement jusqu'à atteindre une valeur maximale pour un potentiel de  $-35,16 \pm 3,23$  mV. La repolarisation membranaire provoque ensuite la désactivation du courant qui est incomplète car un courant de fond E-4031 sensible subsiste au potentiel de repos. Bien que sa cinétique d'activation soit plus rapide que celle de  $I_{Ks}$ , la contribution de  $I_{Kr}$  au PA est beaucoup plus tardive. En effet, le courant  $I_{Ks}$ s'active beaucoup plus lentement mais atteint sa valeur maximale plus précocement que  $I_{kr}$  $(-7,38 \pm 3,35 \text{ mV})$ . Lors de la repolarisation membranaire,  $I_{Ks}$  se désactive progressivement jusqu'à s'annuler totalement. La faible contribution d'I<sub>ks</sub> est due principalement à sa cinétique d'activation très lente qui ne permet qu'à un faible pourcentage de canaux d'être activés au cours des 300 ms de stimulation. En effet, en système de ré-expression des dépolarisations supérieures à 1 s sont nécessaires à l'activation totale du courant (Barhanin et coll., 1996; Sanguinetti et coll., 1996).

Au cours des PA auriculaires de souris et ce quelle que soit la durée de cycle (100 ms et 600 ms), nous n'avons observé aucune activation de Iks. Ces rythmes rapides permettent en revanche l'activation de  $I_{Kr}$  (figure 6C de l'article). Pour une durée de cycle de 100 ms, le courant Ikr n'est pas totalement désactivé et lors du PA suivant les canaux hERG sont déjà ouverts. Cette caractéristique est à l'origine d'un courant transitoire dont l'amplitude est directement proportionnelle à la force électromotrice. La deuxième partie du courant (en forme de dôme) est comme lors de la stimulation avec le PA humain, liée à la levée d'inactivation et à la désactivation incomplète du courant lors de la repolarisation membranaire. Pour une durée de cycle de 600 ms, nous n'avons pas observé cette transitoire et le courant s'annule totalement au potentiel de repos. En revanche, le niveau de courant activé lors de la repolarisation est beaucoup plus important. Ceci pourrait expliquer la réduction de la pente de restitution de la durée du PA observé chez les souris transgéniques. Cette réduction de pente en s'opposant aux phénomènes d'alternances de la durée du PA constituerait un mécanisme protecteur contre la survenue des troubles du rythme. En effet, lors d'une stimulation à fréquence élevée, si  $p \ge 1$ , une alternance d'amplitude et/ou de morphologie des PA est observée d'un cycle cardiaque à l'autre. Ces

variations sont source d'une grande instabilité électrique et peuvent être le précurseur d'arythmies comme la fibrillation ventriculaire en favorisant les circuits de réentrée (Gilmour, 2003). Nous avons voulu tester cette hypothèse en utilisant un modèle informatique simulant la survenue de battements prématurés lors de la repolarisation membranaire.

Nous avons utilisé la modélisation informatique de Bondarenko et coll. (2004). Dans ce modèle de cardiomyocyte ventriculaire de souris, il est possible de reproduire un PA ventriculaire à partir des données expérimentales obtenues en patch-clamp lors de la mesure des courants membranaires. Dans un premier temps, ce modèle nous a permis de confirmer nos données expérimentales sur le comportement du courant  $I_{Kr}$  lors du PA auriculaire de souris. Nous avons aussi montré que lors d'une extrasystole le courant de fond résultant de la lente désactivation du courant est à l'origine d'une potentialisation de  $I_{Kr}$  qui s'opposerait à la dépolarisation membranaire (figure 6D de l'article).

#### Conclusion

Ces études montrent pour la première fois *in vivo* que l'expression de hERG peut protéger contre la survenue de troubles du rythme au niveau auriculaire et ventriculaire. En effet, jusqu'à présent seules quelques études *in vitro* avaient été réalisées. L'effet anti-arythmique de hERG avait ainsi été décrit dans des myocytes ventriculaires de lapin en culture primaire (Nuss et coll., 1999) et dans des cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) transfectées avec hERG (Lu et coll., 2001a).

Nous avons montré que l'effet protecteur est lié aux propriétés uniques du courant  $I_{Kr}$  (inactivation rapide et désactivation lente). Ces caractéristiques sont à l'origine, pour des cycles rapides de stimulation, de l'existence d'un courant de fond, résultant de la persistance au potentiel de repos d'un faible pourcentage de canaux à l'état ouvert. Dans leur étude sur les effets d'une sur-expression de hERG dans les cardiomyocytes ventriculaires de lapin, Nuss et coll. ont montré que l'effet protecteur est associé à une réduction de la durée du PA, à un allongement de la durée des périodes réfractaires et à une diminution de la survenue des post-dépolarisations précoces. Dans notre modèle, l'absence de susceptibilité aux troubles du rythme ventriculaires après injection intraveineuse de Ba<sup>2+</sup> chez les souris transgéniques pourrait être lié à un I<sub>Kr</sub> élevé. En effet, l'inhibition de I<sub>K1</sub> par le Ba<sup>2+</sup> est connue pour générer une activité automatique anormale au niveau des oreillettes, des ventricules et des fibres de Purkinje (Reid et Hecht, 1967; Toda, 1970; Anyukhovsky et Rosen, 1994). Chez les souris transgéniques hERG, la suppression d'I<sub>K1</sub> pourrait être compensée par la sur-expression de hERG. En outre, l'accumulation de courant observée lors d'une extrasystole (modèle informatique) peut s'opposer à toute nouvelle dépolarisation

membranaire empêchant ainsi la survenue de post dépolarisations précoces (EADs). Les mécanismes impliqués dans la protection contre le déclenchement des arythmies atriales sont plus compliqués à comprendre. En effet, le raccourcissement de la durée du PA en favorisant la diminution des périodes réfractaires permet l'établissement de circuits de réentrées à l'origine de troubles du rythme sévères. Dans ces conditions, il est donc difficile de concevoir un rôle protecteur de hERG vis-à-vis du déclenchement des troubles du rythme atriaux comme la fibrillation auriculaire. Cependant, une étude récente a montré que la surexpression de hERG permet de supprimer les phénomènes d'alternances électriques dans des cardiomyocytes ventriculaires de chien infectés par un adénovirus codant pour le canal hERG (Hua et coll., 2004). Dans notre modèle, nous avons observé que la sur-expression de hERG est associée à une réduction de la pente de restitution de la durée du PA. Or, cette valeur de pente est un facteur clé dans la survenue des phénomènes d'alternances électriques qui peuvent être à l'origine d'arythmies par ré-entrées (Baker et coll., 2000; Kim et coll., 2002). Ainsi, en réduisant la pente de restitution, la sur-expression de hERG s'oppose au phénomène d'alternance électrique et au développement de circuits de réentrées qui favorisent et entretiennent les troubles du rythme comme la fibrillation. De plus, nous avons montré que l'absence de désactivation de l<sub>kr</sub> pour une durée de cycle de 100 ms permet au courant de s'opposer à toute dépolarisation prématurée.

L'ensemble de ces résultats montre que la sur-expression de hERG dans le cœur de souris équivault à un allongement des périodes réfractaires et peut donc permettre une protection contre la survenue des troubles du rythme. Augmenter le niveau de I<sub>Kr</sub> pourrait constituer une stratégie thérapeutique intéressante. De plus, ce courant ne participant pas à la phase de plateau, cette stratégie serait sans effet sur la contractilité ventriculaire. Cependant, à l'heure actuelle, aucun agoniste complet de I<sub>Kr</sub> n'a pu être mis en évidence (Gilmour, 2003). Par ailleurs, il serait important de vérifier par une modélisation les effets d'une sur-expression de hERG sur la durée du PA humain. En effet, chez la souris la repolarisation dépend principalement de I<sub>to</sub> alors que chez l'Homme, elle est déterminée par I<sub>Kr</sub> et I<sub>Ks</sub>. Aussi, une sur-expression de hERG chez l'Homme pourrait avoir des effets beaucoup plus drastiques que chez la souris et pourrait être équivalente à l'expression d'une mutation gain de fonction qui est un facteur pro-arythmique (Brugada et coll., 2004).

### HERG: UNE CIBLE PRIVILÉGIÉE DES AGENTS PHARMACOLOGIQUES

Ce travail fait l'objet d'une demande de brevet auprès de l'INPI. La nature exacte et la localisation de la mutation réalisée dans le canal hERG ne seront donc pas exposées dans ces résultats.

#### Introduction

Dans le cœur humain, le courant  $I_{Kr}$  joue un rôle fondamental dans la repolarisation ventriculaire. Or, ce courant est inhibé par de nombreux agents pharmacologiques à visée non cardiovasculaire. Cette inhibition est à l'origine d'un allongement de l'intervalle QT et peut pour certaines molécules déclencher des arythmies à l'origine de mort subite (Escande, 2000). Ces effets secondaires indésirables constituent un frein important au développement pré-clinique des médicaments. Ainsi, en 1997, le CPMP (Committee for Proprietary Medicinal Product) a édité un ensemble de recommandations concernant les procédures d'évaluation du risque pro-arythmique des agents pharmacologiques. L'ensemble de ces recommandations ont ensuite été reprise par l'ICH (International Conference on Harmonization), qui, en 2001 a publié la première version de l'ICHS7B (ICHS7B guideline, cité dans Cavero et Crumb, 2005). Ces textes préconisent entre autres, d'évaluer les effets des molécules en cours de développement pré-clinique sur le courant I<sub>Kr</sub>. In vitro, le pouvoir bloquant d'une molécule est classiquement évalué par la technique de patch-clamp. Fiable et très largement utilisée, cette méthode offre néanmoins un faible débit d'analyse. L'industrie pharmaceutique s'est donc tournée vers des méthodes d'analyses à haut débit qui présenteraient le même degré de fiabilité que la technique de patch-clamp et permettraient une détection des molécules à risque très tôt lors de leur développement. Parmi les nombreuses techniques mises au point (patch-clamp automatique, efflux de Rb<sup>+</sup> radioactif et non radioactif, sondes fluorescentes détectant les variations de potentiel membranaire...etc.), la plus fiable est la mesure d'efflux de Rb<sup>+</sup> (Tang et coll., 2001). Cette méthode avait initialement été développée pour l'étude du fonctionnement des canaux K<sup>+</sup> (Castelletti et coll., 1989; Linde et coll., 1997) et Na<sup>+</sup> (Ponzio et coll., 1980) dépendant du potentiel. Les premiers essais pharmacologiques pour le canal hERG se sont néanmoins révélés infructueux (Cheng et coll., 2002). Cette technique présente en effet une sensibilité inférieure par rapport à la méthode de patch-clamp et pour certaines molécules donne des valeurs d'IC<sub>50</sub> aberrantes (Cheng et coll., 2002; Rezazadeh et coll., 2004). De nombreux facteurs sont à l'origine de la différence de sensibilité entre les deux techniques. Parmi ces facteurs, la concentration en K<sup>+</sup> extracellulaire ([K<sup>+</sup>]<sub>e</sub>) est un paramètre important. Le canal hERG est un canal dépendant du potentiel et il est activé par la dépolarisation membranaire.

Pour la mesure d'efflux, il est donc nécessaire d'augmenter  $[K^+]_e$  (> 50 mM) pour dépolariser la membrane et activer le canal. Or, l'élévation de  $[K^+]_e$  n'augmente pas seulement la conductance unitaire du canal mais affecte aussi l'inhibition par les agents pharmacologiques (Yang et Roden, 1996; Wang et coll., 1997). Une modification des propriétés de dépendance au potentiel de l'inactivation est également observée. Il a été observé en effet que des mutations à l'origine d'un déplacement de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs est à l'origine d'une perte de sensibilité pour les inhibiteurs de hERG (Mitcheson et coll., 2000a). Aussi, pour s'affranchir des effets de  $[K^+]_e$  en efflux de Rb<sup>+</sup>, il serait intéressant de disposer d'un mutant de hERG dont l'activation serait indépendante du potentiel pour pouvoir effectuer l'efflux à une  $[K^+]_e$  physiologique.

C'est pour répondre à cet objectif que nous avons mis au point une chimère entre le canal hERG et un canal indépendant du potentiel. Nous avons montré que l'expression de ce canal chimère dans des cellules COS-7 est à l'origine d'un courant dont l'activation est indépendante du potentiel. La modélisation informatique du courant généré par le canal chimère. montre que cette chimère n'existe que sous deux configurations: ouverte et inactivée et que la configuration fermée n'existe plus. Nous avons constaté en outre que la sensibilité pharmacologique pour des inhibiteurs connus de hERG est conservée et n'est pas affectée par les modifications des propriétés biophysiques du courant. Cette dernière caractéristique est fondamentale et fait de cette chimère un outil très intéressant pour une application en efflux de Rb<sup>+</sup>. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> obtenues en efflux de Rb<sup>+</sup> pour les inhibiteurs comme l'E-4031, le cisapride ou l'astemizole sont proches des valeurs obtenues par la technique de patch-clamp, ce qui n'a jamais été observé avec le canal sauvage. En revanche, pour les inhibiteurs plus faibles comme la risperidone et la fluoxetine, un déplacement de la valeur d'IC<sub>50</sub> est observé en efflux de Rb<sup>+</sup> par rapport à la valeur mesurée en patch-clamp.

Les premiers essais pharmacologiques sont prometteurs et suggèrent que notre chimère de hERG est un candidat intéressant pour un développement industriel.

#### Matériels et Méthodes

#### Culture cellulaire et transfection

Les méthodes de culture des cellules COS-7 et de leur transfection par l'agent Jet-PEI sont présentées dans le paragraphe I.A du chapitre matériels et méthodes de ce manuscrit. Pour les expériences de patch-clamp, les cellules ont été transfectées pour hERG avec un mélange plasmidique composé de : 40% de plasmide pSI-hERG et 60% de plamide pCI-GFP. Pour le canal chimère, les cellules ont été transfectées avec le plasmide pIRES<sub>2</sub> chimère-CD8. Pour les efflux de Rb<sup>+</sup>, les cellules ont été transfectées soit avec le plasmide pIRES<sub>2</sub> chimère-CD8 soit avec le plasmide pCI-GFP.

#### Electrophysiologie

#### Solutions

Les cellules sont perfusées en continu avec une solution de Tyrode composée de NaCl 145 mM, KCl 4mM , MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, HEPES 5 mM, glucose 5 mM, pH ajusté 7.4 avec NaOH. Le milieu intrapipette contient du: KCl 74.5 mM, K-aspartate 70.5 mM, HEPES 5 mM, EGTA 2 mM, K<sub>2</sub>ATP 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.3 mM pH 7.2 avec KOH. Pour enregistrer le courant I<sub>Kr</sub>, les cellules sont localement perfusées avec un milieu extracellulaire contenant : NaCl 145 mM, KCl 4 mM, MgCl<sub>2</sub>1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, HEPES 5 mM, glucose 5 mM, mannitol 30 mM, pH 7.4 avec NaOH. Le cisapride, la risperidone, l'astemizole et la fluoxetine ont été dilués dans le DMSO afin d'obtenir une concentration-mère de  $10-^2$  M. Les solutions stocks de mosapride et d'E-4031 ont été préparées dans de l'eau distillée. Le DMSO a été ajouté le cas échéant dans la solution contrôle en respectant la limite de 0.3 %. La valeur d'IC<sub>50</sub> a été calculée en utilisant l'équation de Hill: **y** =**a** + (*d*/(1+(**x**/c)<sup>b</sup>)) où **x** représente la concentration de la molécule, **b** le coefficient de Hill et **c** correspond à l'IC<sub>50</sub>.

#### Protocoles de stimulation

Les courants du canal sauvage et de la chimère ont été mesurés à 35°C en utilisant la configuration cellule entière de la technique de voltage-clamp. Pour l'étude biophysique des cinétiques d'inactivation et de levée d'inactivation de la chimère, les capacités et les résistances séries ont été compensées électroniquement. La capacité membranaire a été déterminée en analysant la cinétique du courant capacitif généré par une dépolarisation de 50 ms appliquée de –70 mV à –60 mV. L'étude des propriétés de dépendance au potentiel des courants a été réalisée à l'aide du protocole suivant: la membrane est maintenue à un

potentiel de repos de -80 mV puis des sauts de potentiel d'une durée de 500 ms sont appliqués entre -130 mV et +50 mV par incréments de 10 mV. Le courant de queue est ensuite activé à un potentiel de -60 mV pendant 3 sec. Les protocoles utilisés pour étudier l'inactivation et la levée d'inactivation du courant généré par le canal chimère seront détaillés dans le texte des résultats.

Le profil pharmacologique du canal chimère a été évalué à partir d'un protocole de rampe inverse d'une durée de 500 ms et correspond à une rampe de potentiel de +40 mV à -100 mV à partir d'un potentiel de repos de -80 mV. Ce protocole est répété toutes les 1.5 secondes.

#### Analyse

Les valeurs d'amplitude de courant ont été normalisées par rapport à la capacité membranaire. Les résultats sont exprimés sous la forme valeur moyenne ± SEM. La courbe d'activation de hERG est décrite par une fonction de Boltzmann dont l'équation est la suivante  $I_{queue}/I_{queue}$  max = 1/{1 + exp[-{ $V_{pp}-V_{0.5}$ }/k]} où  $I_{queue}$  max est la valeur du courant de queue ( $I_{queue}$ ) maximale,  $V_{pp}$  est la valeur de potentiel pour laquelle  $I_{queue}$  a été mesuré,  $V_{0.5}$  est la valeur de potentiel pour laquelle  $I_{queue}$  max et k est le facteur de pente de la sigmoïde. La désactivation du courant hERG est décrite par une biexponentielle:  $y = C + A1 \exp(-t/\tau_1) + A2 \exp(-t/\tau_2)$ , où  $\tau_1$  et  $\tau_2$  correspondent aux constantes de temps, A1 et A2 aux amplitudes de courant de chacune des composantes et C correspond au courant de base ( i.e, lorsque le courant hERG n'est pas activé).

L'inactivation est décrite par une fonction de Boltzmann d'équation:  $I_{ss}/I_0 = 1/\{1 + exp[(V_{pp} - V_{0.s})/k]\}$ . L'inactivation et la levée d'inactivation sont décrites à l'aide d'une mono exponentielle d'équation:  $y = C + A \exp(-t/\tau_1)$ .

#### Modélisation informatique

Pour étudier l'impact de la mutation sur les mécanismes de changement conformationnels du canal chimère, nous avons utilisé le modèle cinétique de Rudy (Clancy et Rudy, 2001). Dans ce modèle,  $I_{Kr}$  présente trois états fermés (C1, C2, C3), un état ouvert (O), et un état inactivé (I). Pour que ce modèle décrive le canal chimère de façon satisfaisante nous avons dû supprimer tous les états fermés et ne laisser que les états ouvert et inactivé. Les deux constantes de transition ont dû être légèrement modifiées pour bien décrire l'inactivation du canal chimère. La dépendance au K<sup>+</sup> extracellulaire de  $\tau$  mais aussi de G<sub>Kr</sub> (conductance maximale du courant) ont été conservées dans le modèle.

Protocole des efflux de Rb<sup>+</sup>.

Les cellules COS-7 sont repiquées dans des plaques 6 puits à une concentration de 100 000 cellules/ml puis placées dans un incubateur à 37°C et 5% CO<sub>2</sub> pendant toute la nuit. Le lendemain matin, les cellules sont mises à incuber en présence de complexes ADN/PEI, l'ADN correspondant soit au plasmide pIRES<sub>2</sub> chimère-CD8 soit au plasmide pCI-GFP. Après 8 heures d'incubation, les cellules transfectées sont repiquées dans des plaques 24 puits à raison de 200 000 cellules par puits et les plaques sont replacées pour la nuit dans l'incubateur. Les puits de ces plaques présentent un revêtement en poly-D-lysine (BD Biocoat<sup>®</sup>) ce qui permet une meilleure adhésion des cellules. Sur les 6 colonnes de la plaque 24 puits, une colonne (soit 4 puits) est ensemencée avec les cellules exprimant la GFP et les cinq autres avec les cellules exprimant le canal chimère. Après une nuit d'incubation, les cellules sont rincées deux fois avec le Tampon I dont la composition est la suivante: NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.8 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, glucose 5 mM, HEPES 25 mM; le pH est ajusté à 7.4 avec du NaOH. Les cellules sont ensuite mises à incuber pendant 4 heures à 37°C avec 1 ml de Tampon de charge (Tampon I + 5.4 mM de RbCl).

Pour la mesure d'efflux en présence d'un agent pharmacologique donné, des dilutions de la solution stock testée sont préparées dans le Tampon de charge et dans le Tampon 5 K<sup>+</sup>. Les solutions stocks des différentes molécules d'intérêt (E-4031, astemizole, risperidone, fluoxetine, cisapride et mozapride) sont les mêmes que celles utilisées pour les expériences de patch-clamp. Après la charge en Rb<sup>+</sup>, le surnageant est repris et remplacé par 1 ml de solution correspondant au Tampon de charge + un volume x de DMSO ou d'eau (pour les colonnes GFP et contrôle) ou au Tampon de charge + un volume x de la molécule testée (pour les autres conditions). Une nouvelle incubation d'1 heure à 37°C est réalisée.

A l'issue de cette incubation, deux rinçages avec 600 µl de Tampon 5 K<sup>+</sup> (Tampon I avec 5 mM KCI) sont effectués pour éliminer le Rb<sup>+</sup> du surnageant. Les cellules sont ensuite mises en présence de 600 µl de Tampon 5 K<sup>+</sup> + un volume x de DMSO ou d'eau (pour les colonnes GFP et contrôle) ou de 600 µl de Tampon 5 K<sup>+</sup> + un volume x de la molécule testée pour les autres colonnes. A intervalles réguliers (soit dans nos expériences à 3' et 7'), le surnageant des différents puits est collecté et remplacé par du milieu frais. Les aliquots ainsi obtenus sont transférés dans une plaque 24 puits pour analyse. A la fin du test, le Rb<sup>+</sup> restant dans les cellules est récupéré en ajoutant 1 ml de Tampon de lyse (Tampon I contenant 0.1% Triton X-100). Les concentrations en Rb<sup>+</sup> des surnageants t3' et t7' (Rb<sup>+</sup> SN) et des lysats cellulaires (Rb<sup>+</sup> lysat) sont ensuite analysés par spectrométrie d'absorption atomique (Atomic Absorption Spectrophotometer 2380, Perkin Elmer<sup>®</sup>). La quantité de Rb<sup>+</sup> contenue dans un échantillon est mesurée à une longueur d'absorption de 780 nm. Deux courbes de calibration comprise entre 0 et 1 mg/l Rb<sup>+</sup> ont été réalisées pour l'analyse. La première a été réalisée avec le Tampon de lyse et la seconde avec le Tampon 5 K<sup>+</sup>. Si, les échantillons ne sont pas dosés immédiatement après l'expérience, ils sont stockés à –20°C.

L'efflux de Rb<sup>+</sup> a été mesuré de façon indirecte en considérant le pourcentage de Rb<sup>+</sup> restant dans la cellule ou facteur **Q**. Ce facteur est calculé pour un temps donné (soit dans nos expériences à t=3' ou t=7') et est donné par la formule suivante:

 $\mathbf{Q} = (\mathbf{Rb}^{+}_{tot} - \mathbf{Rb}^{+}_{SN})/(\mathbf{Rb}^{+}_{tot}) \circ \mathbf{U} \mathbf{Rb}^{+}_{tot} = \mathbf{Rb}^{+}_{Iysat} + \mathbf{Rb}^{+}_{SN3'} + \mathbf{Rb}^{+}_{SN7'}$ 

A t3'  $\mathbf{Rb}^{+}_{sN} = \mathbf{Rb}^{+}_{sN3'}$  et à t7'  $\mathbf{Rb}^{+}_{sN} = \mathbf{Rb}^{+}_{sN3'} + \mathbf{Rb}^{+}_{sN7'}$  où  $\mathbf{Rb}^{+}_{sN3'}$  et  $\mathbf{Rb}^{+}_{sN7'}$  correspondent aux concentrations de  $\mathbf{Rb}^{+}$  des échantillons 3' et 7'.

La diminution progressive du  $Rb^+$  intracellulaire entre deux points  $t_1$  et  $t_2$  peut être modélisée par une pente **P** dont la valeur a été déterminée en utilisant la formule suivante:

$$P = [ln(Q_1)/ln(Q_2)]/(t_1-t_2)$$

où  $P_1$  et  $P_2$  correspondent au taux de Rb<sup>+</sup> restant respectivement aux temps  $t_1$  et  $t_2$ .

L'effet des agents pharmacologiques est reflété directement par la valeur de **P**. Plus l'inhibition est importante et plus la diminution de pente associée est élevée.

Au cours de nos expériences, nous avons observé l'existence d'un courant de fuite lié aux conductances K<sup>+</sup> endogènes des cellules COS-7. Pour s'affranchir de cette conductance, nous avons soustrait systématiquement la valeur de pente obtenue pour des cellules transfectées avec un plasmide codant pour la GFP aux valeurs de pente obtenues pour des cellules exprimant le canal chimère. Nous avons choisi cette méthode car de nombreux tests nous ont permis de montrer que la fuite de Rb<sup>+</sup> observée sur des cellules exprimant la GFP est égale à la fuite mesurée sur des cellules exprimant le canal chimère avec de l'E-4031 3.10<sup>-6</sup>M.

Pour établir la courbe dose-réponse d'une substance pharmacologique donnée, nous avons calculé un rapport de pente entre la valeur de pente obtenue en présence d'une concentration donnée et la valeur de pente obtenue en présence du véhicule. La valeur d'IC<sub>50</sub> a été calculée en utilisant l'équation de Hill:  $y = a + (d/(1 + (x/c)^b))$  où x représente la concentration de la molécule, **b** le coefficient de Hill et **c** l'IC<sub>50</sub>.

Toutes nos conditions ont été réalisées en quadruplate (n=4 puits).

#### Résultats

#### Caractérisation biophysique du mutant

#### Effet sur l'activation/désactivation

La figure 1 montre les propriétés de dépendance au potentiel du courant généré par le canal hERG ( $I_{hERG}$ ) et du courant généré par le canal chimère ( $I_{chimère}$ ). Le protocole utilisé pour activer les courants correspond à des sauts de potentiels d'une durée de 500 ms variant de –130 mV à +70 mV par incréments de 10 mV. Ces stimulations sont appliquées à partir d'un potentiel de repos ("Holding Potential") de –80 mV et sont suivies par un saut de potentiel de –60 mV d'une durée de 3000 ms pour enregistrer les courants de queue (figure 1A).

 $I_{hERG}$  s'active lentement uniquement en réponse aux dépolarisations membranaires (figure1B). La relation courant-potentiel présente une diminution de l'amplitude du courant pour des potentiels > +20 mV (figure 1D). Cette rectification entrante est caractéristique de hERG et est liée au processus d'inactivation (Sanguinetti et coll., 1995; Spector et coll., 1996a).

L'amplitude du courant de queue a été normalisée par rapport à l'amplitude du courant de queue maximal et les différentes valeurs obtenues ont été représentées en fonction du potentiel. La courbe d'activation ainsi obtenue montre que  $I_{hERG}$  s'active pour un potentiel seuil de -40 mV et qu'il est activé totalement pour un potentiel de +30 mV (figure 1E). Les paramètres de l'activation ont été calculés à l'aide d'une fonction de Boltzmann. La valeur du potentiel de demi-activation (V<sub>0.5</sub>) et la valeur du facteur de pente k sont respectivement de - 4.9 ± 2.3 mV et 8.9 ± 0.6 mV. Les cinétiques de désactivation de  $I_{hERG}$  ont également été étudiée. Le décours du courant de queue obtenu pour un potentiel de +20 mV est typiquement décrit par une bi-exponentielle dont les constantes sont égales à  $\tau_1 = 86.5 \pm 8.5$  ms et  $\tau_2 = 494.4\pm 55.2$  ms (n=8).

Le canal chimère est à l'origine d'un courant instantané (figure 1C). Ce courant est entrant pour des potentiels inférieurs à  $E_{\kappa}$  ( $E_{\kappa}$  théorique = -90 mV) et sortant pour des potentiels supérieurs. Comme  $I_{hERG}$ ,  $I_{chimère}$  présente une rectification entrante mais qui apparaît plus précocement (Vm = -30 mV) (figure 1D). En revanche, nous n'avons pas observé de désactivation (absence de courant de queue) du courant et sa courbe d'activation montre de plus qu'il est indépendant du potentiel (figure 1E).





Figure 1: A Propriétés de dépendance au potentiel de de I<sub>hERG</sub> et I<sub>chimère</sub>. A. Exemple de traces de I<sub>hERG</sub> obtenues a partir d'une cellule exprimant le canal hERG et stimulée à l'aide du protocole représenté dans l'encart à droite. La ligne en pointillée désigne le niveau 0 courant. B. Traces de l<sub>chimère</sub> obtenues à partir d'une cellule exprimant le canal chimère à l'aide du même protocole qu'en A. La ligne en pointillée désigne le niveau 0 courant. Noter l'absence de courant de queue pour Ichimère. C. Relations courant-potentiel de InERG et Ichimère. Contrairement à InERG, Ichimère est activé pour des potentiels inférieurs à Ek. Les deux courbes présentent une rectification caractéristique mais qui apparaît plus précocement pour Ichimére (-20 mV) que pour IhERG (+30 mV). Les résultats sont exprimés sous la forme valeur moyenne ± SEM. D. Courbes d'activation de I<sub>hERG</sub> et I<sub>chimère</sub> réalisées à partir des valeurs de lqueue. Les paramètres de la courbe d'activation de IhERG ont été calculés à partir d'une équation de Boltzmann. Noter l'absence de dépendance au potentiel de l'activation de Ichimère. Les résultats sont exprimés sous la forme valeur moyenne ± SEM.

#### Effet sur l'inactivation / levée d'inactivation

L'existence d'une rectification pour des potentiels positifs indique que l<sub>chimère</sub> conserverait une inactivation dépendante du potentiel. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons étudié les cinétiques d'inactivation et de levée d'inactivation de ce courant. L'inactivation a été étudiée à l'aide d'un protocole en trois parties utilisé classiquement pour étudier l'inactivation de  $I_{Kr}$  (Smith et coll., 1996; Spector et coll., 1996a; Wang et coll., 1997; Zhou et coll., 1998b). Dans ce protocole, la membrane est fortement dépolarisée à +60 mV à partir d'un potentiel de repos de –80 mV. Cette dépolarisation est suivie d'une hyperpolarisation (Vm= -100 mV) de 20 ms (entre 2 et 25 ms selon les études) pour permettre la ré-activation totale du courant. L'inactivation étant ensuite étudiée pour des potentiels variés. La levée d'inactivation est étudiée pour les mêmes potentiels mais en absence de l'hyperpolarisation.

Dans la figure 2 sont représentées les traces de courant caractéristiques obtenues à l'aide du protocole d'inactivation (figure 2A) et du protocole de levée d'inactivation (figure 2C).



**Figure 2:** Propriété de dépendance au potentiel de l'inactivation et de la levée d'inactivation de I<sub>chimère</sub>. A. Exemple de traces de l obtenues à l'aide du protocole représenté dans l'encart à droite. L'inactivation a été étudiée entre –130 mV et +70 mV par incréments de 20 mV toutes les 3 s. B. La partie encadrée correspond à un grossissement du courant transitoire. Par souci de clarté les courants mesurés pour les sauts de potentiels compris entre +30 mV et +70 mV n'ont pas été représentées. Les lignes en pointillés représente le niveau 0 courant. C. Traces de l obtenues avec un protocole permettant l'étude de la levée d'inactivation. Les potentiels utilisés varient entre –130 mV et +70 mV par incréments de 20 mV toutes les 3 s. D. Par souci de clarté, les traces de l obtenues pour les sauts de potentiels de –30 mV, +10 mV et +50 mV n'ont pas été représentées.

La dépolarisation à +60 mV a un rôle important pour l'étude des cinétiques d'inactivation du canal sauvage puisqu'elle permet de l'activer et de l'inactiver complètement (Zhou et coll.,

1998b). L'activation du canal chimère étant indépendante du potentiel, cette dépolarisation n'est pas nécessaire pour l'étude des cinétiques d'inactivation de  $I_{chimère}$ . Nous l'avons conservée afin de pouvoir comparer les cinétiques de  $I_{hERG}$  et de  $I_{chimère}$ . L'application d'une hyperpolarisation de 20 ms permet une réactivation totale du courant (figure 2B). Ce saut de potentiel est plus long que la durée du saut de potentiel utilisé dans les études de l'inactivation d'I<sub>Kr</sub> (Zhou et coll., 1998b). En effet, dans le cas de hERG, lors de l'hyperpolarisation, une désactivation partielle du courant peut se produire et fausser la mesure de la constante de temps d'inactivation. L'absence de désactivation de  $I_{chimère}$  permet donc de prolonger la durée de l'hyperpolarisation afin de s'assurer de la ré-activation totale du courant.

Le décours de l'inactivation et de la levée d'inactivation sont décrits par une monoexponentielle. Les constantes de temps obtenues sont représentées en fonction du potentiel dans le graphique de la figure 3.



Figure 3: Dépendance au potentiel des constantes de temps d'inactivation et de levée d'inactivation de l<sub>chimère</sub>

Les courbes obtenues correspondent à des courbes "en cloche" avec un maximum atteint pour un potentiel de –30 mV pour la levée d'inactivation et entre –30 et –10 mV pour l'inactivation. Leur superposition montre qu'aux potentiels étudiés l'inactivation et la levée d'inactivation ont des constantes de temps similaires. Ce comportement suggère l'existence de deux états uniques: ouvert et inactivé. Dans un tel modèle de Markov avec deux états, qui se rapproche du modèle de Hodgkin et Huxley, la cinétique d'arrivée à l'équilibre est la même que l'on parte d'un canal complètement ouvert ou complètement inactivé. Cette courbe en cloche est aussi typique de I<sub>hERG</sub> (Wang et coll., 1997) ce qui suggère que la propriété de dépendance au potentiel des cinétiques d'inactivation de I<sub>chimère</sub> sont peu modifiées. Nous avons également étudié la propriété de dépendance au potentiel de l'inactivation. La courbe d'inactivation a été établie à partir des valeurs de courant mesurés pour les sauts de potentiels entre –130 et +70 mV du protocole d'inactivation (figure 2A). L'amplitude du courant obtenue en fin de stimulation ( $I_{ss}$ ) a été rapportée à la valeur d'amplitude mesurée pour une ouverture maximale du canal ( $I_0$ ). La courbe d'inactivation ainsi obtenue (figure 4) présente une  $V_{0.5} = -47.1 \pm 2.1$  mV et un facteur k = 25.9 ± 1.5 (n=9). Dans une étude récente utilisant un système de ré-expression hétérologue comparable à notre modèle d'étude (CHO exprimant le canal hERG), la  $V_{0.5}$  d'inactivation de  $I_{hERG}$  a été évaluée à –70 ± 0.82 mV et le facteur k à –19.33 ± 0.73 mV pour une température de 37°C (Mc Pate et coll., 2005). Ces résultats indiquent que  $I_{chimère}$  présenterait un déplacement de la dépendance au potentiel de son inactivation par rapport à  $I_{hERG}$ . Même si le modèle d'étudier dans nos conditions expérimentales l'inactivation et la levée d'inactivation de  $I_{hERG}$ .



Figure 4: Courbe d'inactivation de  $I_{chimère}$ . La valeur mesurée de  $I_{ss}$  a été rapportée à la valeur  $I_0$  pour des sauts de potentiel compris entre -130 mV et +70 mV (protocole inactivation, figure 2A). Les valeurs ainsi obtenues sont représentées en fonction du potentiel et sont décrites par une équation de Boltzmann. La ligne noire correspond à la moyenne des fit individuels des courbes d'inactivation obtenues pour 9 cellules différentes. Les résultats sont des valeurs moyennes  $\pm$  SEM.

#### Modélisation informatique

L'ensemble de ces résultats suggère que le canal chimère existe uniquement sous deux conformations, ouverte et inactivée. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé le modèle de Markov (Clancy et Rudy, 2001). Ce modèle est intéressant car il prend en compte les changements conformationnels du canal. Pour modéliser le comportement du canal chimère, nous n'avons conservé dans ce modèle que les équations relatives aux transitions entre l'état ouvert et l'état inactivé (figure 5). Nous avons légèrement modifié les valeurs de ces transitions pour que le modèle corresponde aux données expérimentales.



**Figure 5: Modèle de Markov des différentes configurations de hERG.** Dans notre modélisation du comportement du canal chimère, seules les transitions entre l'état ouvert et l'état inactivé ont été conservées.

La figure 6 montre un exemple caractéristique des traces de courant obtenues avec le modèle modifié de Markov.



**Figure 6: Simulation informatique des propriétés de dépendance au potentiel de l'inactivation de I**<sub>chimère</sub>. Les valeurs des constantes de temps mesurées à partir de 9 cellules ont été rentrées dans le modèle pour la simulation. **A.** Traces de l obtenues expérimentalement. **B.** Traces de l obtenues avec le modèle informatique. **C.** Comparaison des courbes d'inactivation. **D.** Comparaison des valeurs de constantes de temps d'inactivations obtenues expérimentalement avec le fit des valeurs obtenues avec le modèle

Ces traces ont été obtenues en simulant la stimulation d'une cellule avec le protocole en trois parties utilisé pour étudier l'inactivation du courant. Comme pour les expériences de patch-clamp, la dépolarisation de 200 ms à +60 mV est à l'origine d'un courant instantané qui se ré-active totalement pour une hyperpolarisation de 20 ms à –100 mV. Les valeurs de la constante d'inactivation ont été calculées et comparées aux valeurs expérimentales. La courbe d'inactivation a également été réalisée. Ces résultats suggèrent que notre canal chimère n'a plus de porte d'activation fonctionnelle, mais une porte d'inactivation quasi-intacte.

# Pharmacologie

#### Patch-clamp

La sensibilité pharmacologique du canal chimère a été étudiée pour 6 molécules différentes connues pour inhiber hERG. Ces molécules ont été choisies en fonction de leur appartenance à leur classe thérapeutique et/ou à leur pouvoir inhibiteur:

- l'E-4031 qui est un bloqueur spécifique de hERG
- l'astemizole ou Hismanal<sup>®</sup> (antihistaminique)
- la risperidone ou Risperidal<sup>®</sup> (antipsychotique)
- le cisapride ou Propulsid<sup>®</sup> (prokinétique)
- la fluoxetine ou Prozac<sup>®</sup> (antidépresseur)
- le mosapride (prokinétique) qui est une molécule ne bloquant pas hERG (Potet et coll., 2001).

Le pouvoir inhibiteur de ces agents pharmacologiques a été évalué sur l<sub>chimère</sub> à l'aide d'un protocole de rampe (décrit dans le matériel et méthodes). Le pourcentage d'inhibition a été calculé pour un potentiel de –30 mV, i.e, pour le potentiel pour lequel l'amplitude du courant mesuré est la plus élevée.

Dans la figure 7 est représenté le courant généré par le canal chimère après stimulation avec le protocole de rampe. Dans cet exemple, le courant a été enregistré en condition contrôle (i.e après perfusion du véhicule) et en présence de deux concentrations différentes d'E-4031. Pour cette molécule, nous avons opté pour une méthode de perfusion croisée des différentes dilutions d'E-4031. En effet, la cinétique d'inhibition de l'E-4031 est relativement lente, il est donc difficile de réaliser une courbe effet-dose complète sur une seule cellule. Ainsi, pour une cellule donnée,  $I_{chimère}$  a été enregistré en présence de  $10^{-8}$  M/10<sup>-7</sup> M ou  $3.10^{-8}$  M/3.10<sup>-7</sup> M d'E-4031. La courbe effet dose ainsi obtenue présente une valeur d'IC<sub>50</sub> de 5.  $10^{-8}$ 

M qui est une valeur comprise dans la gamme de concentration donnée dans la littérature (Redfern et coll., 2003). Son coefficient de Hill est de 1.25.

Le même type d'enregistrement a été réalisé pour les autres molécules. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> obtenues ont été comparées aux valeurs d'IC<sub>50</sub> obtenues pour I<sub>hERG</sub> et sont rapportées dans le tableau 1. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> pour I<sub>hERG</sub> sont des valeurs de référence données dans la littérature.



Tableau 1: Valeurs d'IC<sub>50</sub> obtenues pour les 6 molécules testées dans cette étude pour I<sub>Chimère</sub> et comparaison avec les valeurs pour I<sub>hERG</sub> n= nombre de cellules

	E-4031	Astemizole	Cisapride	Risperidone	Fluoxetine	Mosapride
I <sub>chimère</sub> IC <sub>50</sub>	5 .10 <sup>-8</sup> M	2.1.10⁻ <sup>8</sup> M	7.2.10⁻ <sup>8</sup> M	3.7.10 <sup>-7</sup> M	1.10 <sup>-6</sup> M	-
n	9 -10	10	7	8	8	7
I <sub>herg</sub> IC <sub>50</sub>	2.5.10 <sup>-8</sup> M	1.10 <sup>-9</sup> M	2.4.10 <sup>-7</sup> M	3.10 <sup>-7</sup> M	3.10 <sup>-6</sup> M	-

La valeur d'IC<sub>50</sub> de l'E-4031 donnée pour l<sub>chimère</sub> a été obtenue par une méthode croisée. Ainsi, l'inhibition pour les concentrations  $10^{-8}$  M/ $10^{-7}$  M ont été calculées pour n=10 cellules et pour les concentrations  $3.10^{-8}$  M/ $3.10^{-7}$  M pour n=9 cellules. Pour l<sub>hERG</sub>, la valeur d'IC<sub>50</sub> pour l'E-4031 est une donnée interne non publiée. Pour le cisapride et le mosapride les résultats présentés proviennent d'une étude réalisée au laboratoire sur l'effet des prokinétiques (Potet et coll., 2001). Enfin pour l'astemizole et la risperidone, les valeurs d'IC<sub>50</sub> sont issues d'une revue qui porte sur les relations entre l'inhibition de I<sub>Kr</sub> et les effets sur le QT des médicaments non cardiaques (Redfern et coll., 2003). Dans une autre étude (Tang et coll., 2001), la valeur d'IC<sub>50</sub> mesurée pour le cisapride est de 4.5.10<sup>-8</sup> M et de 6.10<sup>-9</sup> M pour l'astemizole ce qui est proche de la valeur que nous avons mesuré pour l<sub>chimère</sub>. Ces disparités entre les différentes études dépendent du modèle utilisé (ovocyte de xénope ou cellule de mammifère) ou encore des conditions d'enregistrement électrophysiologiques (protocole de stimulation, température...). Ce sont des ordres de grandeur qui renseignent sur la puissance de bloc relatif d'un agent pharmacologique par rapport à un autre.

La comparaison des résultats obtenus pour le canal chimère avec les données de la littérature pour hERG montrent que le canal chimère conserve un profil pharmacologique similaire à celui de hERG. Il constitue donc un outil intéressant pour l'étude du profil pharmacologique en efflux de Rb<sup>+</sup>.



Figure 8: Courbes effets doses obtenues pour l'E-4031 avec la technique de patch-clamp A. et par la technique des efflux de  $Rb^+$  en B. La valeur d'IC<sub>50</sub> mesurée en patch est une valeur moyenne pour n=10 cellules et n=5 expériences pour les efflux de  $Rb^+$ 

Les écarts types plus importants pour les résultats obtenus avec la technique de mesure d'efflux suggèrent que cette technique est moins précise que la technique de patch-clamp bien que la valeur d'IC<sub>50</sub> pour l'E-4031 n'est pas modifiée. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> pour les autres molécules sont rapportées dans le tableau 2. Les valeurs des coefficients de Hill sont également rapportées.

Tableau 2: Valeurs des IC₅₀ et des coefficients de Hill obtenues avec la technique de patch-clamp et avec la technique de mesure d'efflux de Rb⁺ pour les 6 molécules testées. ND: non déterminée

	E-4031	Astemizole	Cisapride	Risperidone	Fluoxetine	Mosapride
Patch-clamp				_		
IC <sub>50</sub>	5 .10 <sup>-8</sup> M	2.1.10 <sup>-8</sup> M	7.2.10 <sup>-8</sup> M	3.7.10 <sup>-7</sup> M	1.10 <sup>-6</sup> M	-
Coeff. Hill	1.25	1.45	0.93	1.07	1.26	
Rb⁺						
IC <sub>50</sub>	5.1.10 <sup>-8</sup> M	4.3.10 <sup>-8</sup> M	1.3.10 <sup>-7</sup> M	ND	ND	-
Coeff. Hill	0.90	0.82	0.54	ND	ND	

Les valeurs d'IC<sub>50</sub> et de coefficient de Hill obtenues pour l'E-4031 (n=5 expériences), le cisapride (n=8 expériences) ou l'astemizole (n=5 expériences) sont proches de celles obtenues par la technique de patch-clamp. Ce résultat est intéressant car jusqu'à présent une augmentation des valeurs d'IC<sub>50</sub> était généralement décrite avec la technique d'efflux de Rb<sup>+</sup> par rapport à la technique de patch-clamp (Cheng et coll., 2002; Rezazadeh et coll.,2004). De même, nous n'avons observé aucune inhibition par le mosapride que ce soit en patch-clamp ou en efflux de Rb<sup>+</sup>. En revanche, en ce qui concerne la risperidone et la fluoxetine, une augmentation de la valeur d'IC<sub>50</sub> est observée. En effet, pour une concentration de 3.10<sup>-6</sup> M de risperidone qui induit une inhibition totale de l<sub>chimère</sub> en patch-clamp, il est observé une inhibition de 29 % (P<sub>risperidone</sub>/P<sub>véhicule</sub> = 0.71 ± 0.08, n = 4

expériences). De même, à une concentration de  $10^{-5}$  M de fluoxetine, le pourcentage d'inhibition est de 40 % environ ( $P_{fluoxetine} / P_{véhicule} = 0.57 \pm 0.03$ , n= 3 expériences) alors que l'inhibition de I<sub>chimère</sub> à cette même concentration est totale.

#### Discussion

Nous avons mis au point une chimère du canal hERG afin d'améliorer la sensibilité de la technique de mesure d'efflux de Rb<sup>+</sup>. Dans un premier temps, les propriétés de dépendance au potentiel de l'activation et de l'inactivation de cette chimère ont été étudiées. Nous avons également établi le profil pharmacologique pour six molécules différentes. Les propriétés biophysiques et pharmacologiques de ce canal montrent qu'il présente des avantages majeurs et que son utilisation pourrait potentiellement améliorer la technique des efflux.

#### Caractérisation des propriétés biophysiques du canal chimère et perspectives d'études

Dans cette étude, nous avons caractérisé les propriétés biophysiques d'une chimère réalisée entre le canal hERG et un canal indépendant du potentiel. Les propriétés de dépendance au potentiel de l'activation et de la désactivation du courant généré par la protéine chimère (I<sub>chimère</sub>) ont été comparées dans les mêmes conditions avec les propriétés de I<sub>hERG</sub>. Le courant l<sub>chimère</sub> est un courant dont l'activation est indépendante du potentiel et qui ne se désactive pas. Il conserve néanmoins une inactivation dépendante du potentiel dont les cinétiques sont proches de ce qui a été décrit dans la littérature pour le courant généré par le canal hERG (Zhou et coll., 1998b). Cependant la rectification de I<sub>chimère</sub> apparaît plus précocement que celle d'I<sub>hERG</sub> (-20 mV pour la chimère contre +30 mV pour hERG). De plus, la mesure de la V<sub>0.5</sub> inactivation de I<sub>chimère</sub> montre qu'il existerait une variation de la dépendance au potentiel de la courbe d'inactivation par rapport à celle de  $I_{hERG}$  (Mc Pate et coll., 2005). L'étude des cinétiques d'inactivation et de levée d'inactivation montrent que le comportement du canal chimère comme celui de hERG peut être modélisé par le modèle cinétique de Markov. L'absence d'activation et la persistance d'une inactivation dépendante du potentiel suggèrent que ce canal n'existe que sous deux conformations: ouverte et inactivée. C'est ce que nous avons confirmé avec le modèle informatique.

Le canal chimère pourrait par ailleurs, constituer un outil intéressant pour l'étude du couplage entre l'activation et l'inactivation du canal hERG. En effet, dans leur étude du déplacement du segment S4 de hERG, Smith et Yellen ont mis en évidence deux cinétiques: une cinétique lente liée au processus d'activation et une cinétique rapide qui serait liée à l'inactivation (Smith et Yellen, 2002). Cette relation est directe pour le processus d'activation
mais indirecte pour l'inactivation. En effet, bien qu'ils aient pu mettre en évidence une correspondance nette entre la cinétique rapide de déplacement du "voltage-sensor" et la cinétique d'inactivation, le signal rapide lié au déplacement de S4 n'est pas affecté par des mutations modifiant l'inactivation. Les propriétés biophysiques de la chimère suggèrent que les processus d'activation et d'inactivation seraient indépendants. Il serait donc intéressant d'étudier dans le canal chimère le déplacement du "voltage sensor" et d'étudier les corrélations probables de ses cinétiques avec celles de l'inactivation.

### Comparaison avec d'autres mutants ouverts en permanence

D'autres mutants de hERG décrits dans la littérature ont la capacité d'être ouverts en permanence. Le mutant D540K mis au point par l'équipe de Sanguinetti est activé aussi bien pour des potentiels hyperpolarisés que dépolarisés (Sanguinetti et coll., 1999) (cf. §.III.B.1 du chapitre introduction de ce manuscrit). Il n'est donc pas, contrairement au canal chimère, indépendant du potentiel mais présente une déstabilisation forte de l'état fermé ce qui lui permet de s'ouvrir pour des potentiels où il existe normalement sous une conformation fermée. Cette mutation est de plus à l'origine d'une réduction de l'inhibition par les agents pharmacologiques. En effet, l'inhibition de hERG procède en grande partie d'un mécanisme de "trapping" qui permet une rétention des molécules au sein du pore de hERG (cf. § III.D.2.b du chapitre introduction de ce manuscrit). Ce mécanisme repose principalement sur le processus d'inactivation du canal qui permet une stabilisation des molécules au sein du pore mais aussi sur le processus de désactivation qui permet de piéger la molécule (Tristani-Firouzi et coll., 2001). L'étude de l'inhibition de ce mutant D540K par le MK499 (une molécule de la famille des methanesulfonalinilides) a montré que la diminution de sensibilité observée est due à un mécanisme de "trapping" déficient lié à la déstabilisation de l'état fermé (Mitcheson et coll., 2000b).

L'introduction du motif pro-X-pro dans le pore de hERG est à l'origine d'un courant qui ne se désactive pas (Fernandez et coll., 2004). Ce motif est très conservé au sein de la famille des canaux K<sup>+</sup> dépendant du potentiel et participe au mécanisme de couplage entre le "voltage-sensor" et le pore (Long et coll., 2005b). En lieu et place de ce motif, hERG présente la séquence IIe-Phe-Gly. Le mutant pro-X-pro présente d'importantes modifications de ces propriétés biophysiques et il est également beaucoup moins sensible aux agents pharmacologiques que le canal sauvage.

Nous avons établi le profil pharmacologique du canal chimère afin de vérifier si les modifications des propriétés biophysiques observées pourraient être à l'origine d'une perte de sensibilité aux inhibiteurs de hERG. Six molécules ont été testées. Parmi elles, cinq sont des molécules connues pour inhiber  $I_{hERG}$  (E-4031, astemizole, cisapride, risperidone et

fluoxetine) et une molécule, le mosapride ne l'inhibe pas. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> obtenues et l'absence d'inhibition de l<sub>chimère</sub> par le mosapride montre que la sensibilité pharmacologique du canal chimère pour ces six molécules est similaire à celle du canal hERG. Ces résultats montrent que les changements conformationnels induits par la mutation dans le canal hERG modifie la propriété de dépendance au potentiel de l'activation et partiellement de l'inactivation, et ce, sans affecter la sensibilité pharmacologique du canal. Ils suggèrent en outre que la fermeture de la porte d'activation dans ce canal chimère n'est pas essentiel à l'inhibition du canal.

L'ensemble des propriétés biophysiques et pharmacologiques du canal chimère suggèrent donc qu'il pourrait améliorer la sensibilité des mesures d'efflux de Rb<sup>+</sup>.

#### Technique de la mesure d'efflux de Rb<sup>+</sup>

Les résultats obtenus en efflux de Rb<sup>+</sup> diffèrent des résultats classiquement décrits dans la littérature. En effet, une perte de sensibilité est généralement observée pour les inhibiteurs de hERG en efflux de Rb<sup>+</sup> par rapport à la technique de patch-clamp (Cheng et coll., 2002; Rezazadeh et coll., 2004; Sorota et coll, 2005). Cette différence peut être très importante. Ainsi, la valeur d'IC<sub>50</sub> de l'astemizole obtenue en efflux de Rb<sup>+</sup> est 150 fois supérieure à celle calculée par la technique de patch-clamp conventionnel (Rezazadeh et coll., 2004; Sorota et coll, 2005). Selon les études, cette IC<sub>50</sub> peut être multipliée par 40 (Rezazadeh et coll., 2004) ou 28 pour le cisapride (Sorota et coll, 2005). Pour l'E-4031, le facteur observé est moins important (il est de 8 dans l'étude de Cheng et coll. et de 17 environ dans l'étude de Sorota et coll.) Dans notre étude, nous avons observé une sensibilité pour l'E-4031, l'astemizole, le cisapride et le mosapride similaire pour les deux techniques. En revanche, une augmentation de la valeur d'IC<sub>50</sub> a été observée pour la risperidone et la fluoxetine qui sont des inhibiteurs plus faibles. Cette différence entre les inhibiteurs forts et faibles est difficile à comprendre. Une explication probable pourrait être liée au fait que la risperidone et la fluoxetine interagissent de façon moins forte que les autres molécules avec les résidus du pore impliqués dans l'inhibition pharmacologique (cf. § III.D.2.a). L'inhibition par ces molécules serait donc plus sensible aux différents rincages précédants la mesure d'efflux. La liaison des agents pharmacologiques aux acides aminés du pore dépend d'interactions très spécifiques. Il a été montré en effet que de faibles variations de la structure d'un agent pharmacologique peuvent modifier fortement l'interaction de la molécule avec les résidus du pore et donc affecter la puissance de bloc (Perry et coll., 2006). Nous envisageons donc de poursuivre la caractérisation pharmacologique en efflux de Rb<sup>+</sup> afin de vérifier si cette tendance se confirme pour d'autres inhibiteurs faibles de hERG.

De nombreux facteurs sont à l'origine de la disparité des résultats entre ces deux techniques. Dans leur étude de 2002, Cheng et coll. ont répertorié tout un ensemble de facteurs pouvant potentiellement perturber le calcul d'IC<sub>50</sub> par la technique des efflux. Parmi ces facteurs les plus importants sont:

- la durée de l'efflux
- le niveau d'efflux
- l'inhibition configuration dépendante
- la cinétique d'inhibition

Dans nos conditions expérimentales, la modulation du pourcentage d'efflux et l'inhibition configuration-dépendante restent des facteurs critiques.

### La durée de l'efflux

La mesure d'efflux sur une période de temps trop longue a un impact non négligeable sur l'évaluation de la puissance du bloc par les agents pharmacologiques. Cet effet est d'autant plus important que la molécule est un inhibiteur faible de hERG. Dans leur étude, Cheng et coll. (2002) ont montré que la cinétique d'efflux via le canal hERG est décrit par une monoexponentielle dont la constante de temps  $\tau$  est égale à 12,53'. Ils ont également réalisé une modélisation de l'inhibition de l'efflux par un agent pharmacologique idéal présentant une IC<sub>50</sub> de 1 nM et un coefficient de Hill de 1. Dans ce modèle, le rapport signal-bruit le plus élevé est obtenu pour un temps t = 40' or pour ce même temps le pourcentage d'inhibition est de 17% contre 46.6% à un temps de t = 4'. De plus, la courbe effet dose réalisée au temps 40'. Au cours de la mise au point de la technique d'efflux, nous avons constaté que les valeurs de pente les plus importantes sont calculées dans l'intervalle de temps entre 0'et 7'. Or, seul le calcul d'IC<sub>50</sub> pour un intervalle de temps compris entre 3' et 7' permet d'obtenir des valeurs d'IC<sub>50</sub> reproductibles ce qui n'était pas le cas pour des temps inférieurs (entre 0 et 3') ou supérieurs (entre 10' et 15').

## Le niveau d'efflux

Ce paramètre dépend du niveau d'expression du canal mais aussi de la concentration en K<sup>+</sup> extracellulaire. Pour augmenter le niveau d'expression, une des meilleures solutions serait d'utiliser une lignée cellulaire exprimant de façon stable le canal chimère. Cette méthode permet de diminuer le bruit de fond lié notamment aux efflux non spécifiques via les conductances K<sup>+</sup> endogènes, ce qui serait plus précis que notre méthode qui consiste à soustraire la valeur de pente mesurée à partir de cellules exprimant la GFP.

L'élévation de  $[K^+]_e$  est à l'origine d'une augmentation de la conductance unitaire du canal et d'une réduction de l'inactivation de type C (Yang et coll., 1997a; Wang et coll., 1997). Or,

l'élévation du K<sup>+</sup> extracellulaire module aussi de façon importante l'inhibition par les agents pharmacologiques. Ainsi, il a été montré qu'une augmentation de la concentration en K<sup>+</sup> extracellulaire de 1 mM à 8 mM multiplie par 30 la valeur d'IC<sub>50</sub> calculée pour le dofetilide (Yang et Roden, 1996). Cette dépendance au  $[K^*]_e$  constitue une des causes majeures de la différence de sensibilité entre la technique de patch-clamp et les efflux de Rb<sup>+</sup> avec le canal sauvage puisqu'il nécessite l'utilisation d'une [K<sup>+</sup>]<sub>e</sub> élevée pour la mesure d'efflux. Dans notre étude, nous avons montré que les inhibiteurs les plus puissants de l<sub>chimère</sub> (E-4031, astemizole, cisapride) conservent une valeur d'IC<sub>50</sub> non modifiée en efflux de Rb<sup>+</sup>. Ce résultat diffère de ce qui est observé pour le canal sauvage où une perte de sensibilité à un agent pharmacologique donné est classiquement observé (Yang et Roden., 1996). En revanche, cette perte de sensibilité est observée dans nos conditions pour les inhibiteurs plus faibles de l<sub>chimère</sub> (risperidone et fluoxetine). Ceci suggère que des facteurs autres que le K<sup>+</sup> peuvent être à l'origine d'une perte de sensibilité pharmacologique. Il a été montré en effet que le Rb<sup>+</sup> est à l'origine d'un déplacement de la sensibilité au potentiel de la courbe d'inactivation de hERG vers des potentiels plus positifs alors que l'activation n'est pas modifiée (Rezazadeh et coll., 2004). D'après les auteurs de cette étude, cet effet, combiné à un niveau de  $[K^+]_e$  élevé, est à l'origine du déplacement des valeurs d'IC<sub>50</sub> mesuré en efflux de Rb<sup>+</sup> pour l'E-4031, l'astemizole et le cisapride. Nous avons montré que le canal chimère présenterait un déplacement de la dépendance au potentiel de son inactivation vers des potentiels plus négatifs. De plus, nous n'avons pas observé de déplacement des valeurs d'IC<sub>50</sub> pour l'E-4031, l'astemizole et le cisapride dans nos expériences d'efflux. Ces résultats suggèrent que les effets du Rb<sup>+</sup> sur le canal chimère sont moins prononcés que sur le canal sauvage. Il sera donc important de vérifier cette observation en étudiant les effets du Rb<sup>+</sup> sur l'inactivation du canal chimère.

### L'inhibition configuration-dépendante

L'utilisation du canal chimère ne permet d'identifier que les molécules se fixant préférentiellement à l'état ouvert et/ou inactivé du canal et non pas à l'état fermé puisqu'il n'existe pas. A ce jour, seules deux molécules sont connues pour se fixer préférentiellement à l'état fermé du canal hERG: le ketoconazole et le Bem-k1 (Milnes et coll., 2003; Ridley et coll., 2006) ce qui est peu par rapport à l'immense majorité des molécules se fixant préférentiellement à l'état ouvert et /ou inactivé du canal. Nous envisageons par la suite d'étudier la sensibilité pharmacologique du canal chimère pour ces deux agents pharmacologiques.

### La cinétique d'inhibition

Dans le cas du canal hERG, l'efflux de Rb<sup>+</sup> est initié lors de l'ouverture du canal par la dépolarisation. Cette activation permet en outre aux agents pharmacologiques de pénétrer dans le pore et d'interagir avec des résidus spécifiques. En effet, la majorité des inhibiteurs de hERG entre dans le pore du canal du côté intracellulaire ce qui suggère que l'ouverture de la porte d'activation est indispensable au mécanisme de bloc par les agents pharmacologiques (Zhang et coll., 1999; 2001; Mitcheson et coll., 2000b). L'inhibition du canal hERG se fait donc graduellement ce qui permet un petit efflux de Rb<sup>+</sup>. Or, cette petite quantité de Rb<sup>+</sup> est prise en compte dans la mesure d'efflux final et peut participer ainsi au déplacement de la valeur d'IC<sub>50</sub>. La chimère étant en permanence ouverte, ce phénomène ne constitue pas un facteur limitant dans nos conditions expérimentales.

Cette étude est une première caractérisation biophysique et pharmacologique du canal chimère. Ceci implique que d'autres études devront être conduites, notamment une comparaison des propriétés électrophysiologiques de l'inactivation du canal chimère et du canal hERG. Cette comparaison entre hERG et la chimère devra également être réalisée en efflux de Rb<sup>+</sup> pour une concentration de 5 mM de K<sup>+</sup> extracellulaire mais aussi pour des concentrations plus élevées. Enfin, d'un point de vue pharmacologique, d'autres molécules devront être testées en efflux de Rb<sup>+</sup> et des tests comparatifs devront également être réalisée en partenariat avec un groupe industriel.

Les résultats de cette première étude suggèrent néanmoins que l'utilisation du canal chimère en efflux de Rb<sup>+</sup> présente de nombreux avantages par rapport à l'utilisation du canal sauvage. Cette chimère devrait ainsi permettre d'améliorer de façon non négligeable la sensibilité de la technique des efflux de Rb<sup>+</sup>.

## **DISCUSSION GENERALE**

Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés aux deux causes principales d'induction du syndrome du QT long acquis. Cet allongement peut être une conséquence des altérations fonctionnelles liées aux cardiomyopathies ou être consécutif à la prise de certains médicaments. Dans ces différentes études, nous nous sommes focalisés sur le rôle des courants K<sup>+</sup> dans les anomalies de la repolarisation et l'induction des troubles du rythme.

### Rôle du remodelage ionique dans les altérations des propriétés électriques

Les cardiomyopathies sont une cause bien connue d'allongement de l'intervalle QT et de nombreux modèles animaux ont été mis au point pour étudier les conséquences du remodelage électrique lié aux canaux K<sup>+</sup> notamment (Nerbonne et coll., 2004). Notre hypothèse de travail est que dans ces pathologies, l'altération des propriétés électriques serait en grande partie liée à une modification de l'expression des gènes codant pour les canaux ioniques. Dans l'étude des conséquences d'un BAV chez la souris ou d'un traitement chronique à l'amiodarone, nous avons voulu déterminer quelle était la part du remodelage ionique dans l'altération des propriétés électriques. Mon travail a consisté à établir des corrélations entre les variations d'expression de gènes codant pour des sous-unités de canaux participant à la repolarisation et les niveaux de courant mesurés correspondants. Dans l'étude sur l'amiodarone, une relation directe existe entre le niveau d'expression des sous-unités  $\alpha$  Kv4.2, Kv1.5, Kv2.1et Kir2.1 et les amplitudes des courants correspondants. De même, dans notre étude sur les conséquences du BAV, une relation directe a été observée entre le niveau d'expression de la sous-unité Kv4.2 et du courant I<sub>to.f</sub>. En revanche, dans l'étude des effets de l'amiodarone, la densité de l<sub>Ca.L</sub> n'est pas modifiée par le traitement alors que l'expression de la sous-unité  $\alpha$  Cav1.2 est diminuée de près de 50% par rapport au niveau d'expression mesuré chez les souris non traitées. Pour I<sub>Ca,L</sub>, cette discordance met en évidence le rôle non négligeable des régulations post-transcriptionnelles et des régulations de la fonction des sous unités  $\alpha$  par les sous-unités auxiliaires. Leur rôle est en effet important: ainsi il a été montré par exemple que des mutations de minK (Splawski et coll., 1997) et de MiRP1 (Abbott et coll., 1999), respectivement sous-unités  $\beta$  de KvLQT1 et de hERG sont à l'origine respectivement des syndromes du LQT5 et du LQT6. Les sous-unités auxiliaires exercent des fonctions très diverses qui vont de l'adressage membranaire des sous-unités  $\alpha$  à la modulation des propriétés biophysiques des courants (pour revue, Nerbonne et Kaas, 2005). Il semblerait en outre qu'une même sous-unité auxiliaire puisse interagir avec différentes sous-unités  $\alpha$  (comme minK par exemple), de même, les sous-unités  $\alpha$  peuvent s'associer avec plusieurs sous-unités auxiliaires au sein de complexes canalaires. Ces complexes interagissent avec de nombreuses protéines

d'ancrage comme l'ankyrine et/ou des protéines du cytosquelette. Ces interactions avec l'environnement protéique du canal peuvent être capitales comme dans le cas du canal Nav1.5 et de l'ankyrine B où des mutations de l'ankyrine B sont à l'origine du syndrome du LQT4 (Chauhan et coll., 2000; Schott et coll., 1995; Molher et coll., 2003). La complexité de ces interactions suggère que les régulations du courant membranaire sont très importantes et s'exercent à différents niveaux. Dans nos études, nous avons ainsi démontré que le remodelage ionique est un des acteurs majeurs à l'origine des modifications des propriétés électriques membranaires mais d'autres mécanismes tout aussi importants participent à la régulation des courants ioniques.

Les études récentes s'intéressent de plus en plus au rôle des facteurs de transcription dans la régulation de l'expression des gènes codant pour les canaux ioniques. Ainsi, chez la souris, il a été montré que le gradient transmural de l<sub>to,f</sub> serait dû à l'expression différentielle du facteur de transcription Irx5 (Costantini et coll., 2005). Ce gradient d'I<sub>to</sub> pourrait également dépendre de la voie de la calcineurine (calcineurine/NFATc3) (Rossow et coll., 2006). Dans notre étude sur les conséquences d'un BAV chez la souris, nous avons observé que la variation transitoire de I<sub>to</sub> est liée à la variation d'expression de la protéine Kv4.2. Dans ce modèle, nous avons observé une variation importante de l'expression des facteurs de transcription et il est difficile, à partir de ce modèle d'établir des corrélations entre le profil de variation des facteurs de transcription et les variations d'expression des sous-unités des canaux. En effet, dans notre modèle, de multiples voies de signalisation et notamment des voies de stress sont activées. Ces activations multiples sont liées au fait qu'outre la profonde bradycardie associée à l'allongement du QT et à l'hypertrophie, ces souris présentent également un tonus adrénergique élevé. L'existence d'un stress cellulaire et d'un déséquilibre métabolique important est plus que probable.

Dans notre étude sur les effets d'un traitement chronique à l'amiodarone, nous avons montré que cette molécule induit un remodelage ionique important. Ce remodelage procèderait d'un effet direct sur l'expression des gènes et nous avons montré qu'il est dose-dépendant. Il serait intéressant de déterminer les facteurs de transcription impliqués dans ce remodelage et d'identifier les voies de signalisation correspondantes. Cependant, un des inconvénients de ce modèle est que l'effet direct de la molécule sur les courants ioniques pourrait être toujours présent puisque l'amiodarone présente un fort taux d'accumulation tissulaire. Mais surtout, les souris traitées ne présentent pas de pathologie sous-jacente et il est donc probable qu'en condition physiopathologique les voies de signalisation activées soient différentes. Pour établir les couples facteurs de transcription/sous-unité  $\alpha$ , notre stratégie actuelle est d'appuyer nos études *in vivo* par des études menées sur des modèles moins intégrés. Dans des cultures de cardiomyocytes de souris nouveaux-nés, nous envisageons par une stratégie utilisant des siRNA d'identifier les facteurs de transcription régulant

l'expression des canaux Nav1.5, Kv4.2 et de la sous-unité KChIP2. Ces corrélations moléculaires seront ensuite validées par la mesure des courants ioniques. Par la suite, des souris invalidées pour les facteurs de transcription d'intérêt seront réalisées et les conséquences fonctionnelles de ces invalidations seront explorées *in vivo*.

D'un point de vue purement technique, la question soulevée par l'étude du rôle du remodelage ionique dans les altérations des propriétés électriques est celle de nos méthodes d'isolement des courant K<sup>+</sup> membranaires. En effet, le choix de la méthode est essentiel et doit prendre en considération le fait que chez la souris les trois composantes K<sup>+</sup> sortantes:  $I_{to}$ ,  $I_{K,slow}$  et  $I_{ss}$  présentent des propriétés biophysiques et pharmacologiques proches. Deux stratégies principales sont classiquement utilisées pour distinguer les différentes composantes de  $I_{K}$ . La première est une approche pharmacologique qui repose sur la sensibilité différentielle des différentes composantes de  $I_{K}$  à la 4-AP et au TEA (Xu et coll., 1999; Fiset et coll., 1997). La seconde consiste à distinguer les différents courants sur la base de leurs propriétés biophysiques. Dans cette méthode, l'inactivation du courant K<sup>+</sup> global est décrit par la somme d'exponentielles qui correspondent respectivement aux courants  $I_{to,s}$ ,  $I_{K,slow1}$  et  $I_{K,slow2}$ .

Dans l'étude des effets de l'amiodarone, nous avons choisi d'utiliser la stratégie de distinction des courants sur la base des propriétés pharmacologiques. Un inconvénient majeur est que la 4-AP est un inhibiteur non spécifique. Nous avons donc complété cette analyse par une analyse des cinétiques d'inactivation afin de différencier notamment les courants  $I_{K,slow}$  et  $I_{to}$ . Cependant, cette approche s'est révélée peu efficace pour la discrimination des courants et nous avons considéré que les amplitudes de  $I_{to}$  et de  $I_{K,slow}$  correspondent respectivement aux valeurs de courant mesurées en début et en fin des sauts de potentiels de 500 ms.  $I_{ss}$  correspond à la valeur du courant mesurée à la fin du saut de potentiel d'une durée de 4 s. (Xu et coll., 1999)

Dans l'étude sur le BAV chez la souris, nous avons utilisé la méthode développée par l'équipe de Céline Fiset. Cette approche repose sur le fait qu'un saut de potentiel à –40 mV pour une durée inférieure à 100 ms permet d'inactiver uniquement  $I_{to}$  sans affecter théoriquement  $I_{K, slow}$  qui lui est distingué sur la base de sa sensibilité à la 4-AP qui est supérieure à celle des autres courants (Brouillette et coll., 2004). Cette technique nous a permis ainsi de mesurer de façon satisfaisante les amplitudes respectives de  $I_{to}$  et de  $I_{K,slow}$ .

Toutes ces approches doivent être utilisées de façon complémentaire. En effet, l'étude des cinétiques d'inactivation des courants  $K^+$  est la seule méthode d'analyse qui nous a permis de distinguer de façon certaine les différentes composantes  $K^+$  ainsi que leurs pourcentages respectifs. Elle nous a permis ainsi de contrôler les résultats des analyses effectuées avec les deux autres approches.

### Pertinence du modèle de souris pour l'étude des anomalies de la repolarisation

De nombreuses études ont été réalisées pour caractériser la physiologie cardiaque de la souris (Berul et coll., 2003; Nerbonne et coll., 2004) et ces études ont mis en évidence des différences notables avec la physiologie cardiaque humaine. Ainsi, le cœur de souris adulte bat à une fréquence de 600 bpm (bpm pour battements par minute) alors que chez l'Homme cette fréquence est de 60-70 bpm. Une autre différence est que chez la souris adulte, le courant majoritaire de la repolarisation est le courant  $I_{to}$  alors que le courant  $I_{Kr}$  qui est essentiel à la repolarisation chez l'Homme, ne joue pas de rôle (Liu et coll., 2004). En effet, une étude réalisée à partir de cardiomyocytes ventriculaires de souris a montré qu'un courant unitaire généré par la protéine mERG (m pour "mouse") est mesuré en configuration "inside-out" de la technique de patch-clamp alors qu'aucun courant mlkr n'est détecté en configuration cellule-entière (Liu et coll., 2004). De plus, des enregistrements de PA ventriculaires en présence d'E-4031 ont confirmé le rôle négligeable de ml<sub>kr</sub> dans la repolarisation. Les auteurs de cette étude ont suggéré que l'absence de ml<sub>Kr</sub> serait liée aux concentrations physiologiques extracellulaires en Mg<sup>2+</sup> et en Ca<sup>2+</sup>. Les cations divalents sont en effet connus pour inhiber le courant  $I_{Kr}$  (Ho et coll., 1996; Johnson et coll., 2001) et selon Liu et coll., les concentrations physiologiques en Mg<sup>2+</sup> et en Ca<sup>2+</sup> empêchent l'activation du canal mERG alors que son expression membranaire est relativement importante (Pond et Nerbonne, 2001). Dans notre modèle de souris sur-exprimant hERG, cet effet des cations divalents pourrait expliquer en partie la faible contribution de  $I_{hERG}$  à la repolarisation chez la souris transgénique. Nous avons en effet observé que la composante liée à la surexpression de hERG reste faible comparativement aux courants K<sup>+</sup> endogènes et n'est visible qu'après inhibition de l<sub>to</sub> par le tedisamil. Cependant, contrairement aux souris surexprimant KvLQT1, nous avons montré que cette faible contribution de hERG est suffisante pour protéger contre la survenue des troubles du rythme. Cette propriété tient aux caractéristiques biophysiques de hERG qui lui permettent chez la souris de maintenir un courant de fond au potentiel de repos et d'augmenter ainsi la réserve de repolarisation.

De façon surprenante, nous avons observé que les troubles du rythme induits chez la souris sont proches de ceux observés chez l'Homme. Ainsi, malgré sa petite taille et sa fréquence cardiaque élevée, nos études et d'autres (Maguire et coll., 2003) montrent que l'induction de troubles du rythme dans le cœur de souris est réalisable et montrent que ce modèle est un outil utile à la compréhension des mécanismes impliqués dans les arythmies.

### Utilisation des efflux de Rb<sup>+</sup> pour la détection des inhibiteurs de hERG

La concentration en  $[K^+]_e$  est une des limites majeures à l'utilisation de la technique des efflux de Rb<sup>+</sup> pour la détection des inhibiteurs de hERG. Nous avons mis au point une chimère entre le canal hERG et un canal indépendant du potentiel afin de s'affranchir du processus d'activation et donc des effets du [K<sup>+</sup>]<sub>e</sub>. Notre étude est une première caractérisation biophysique et pharmacologique du canal chimère. En effet, d'autres études devront être conduites, notamment une comparaison des propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques de l'inactivation du canal chimère et du canal hERG. Cette comparaison devra également être réalisée en efflux de Rb<sup>+</sup> pour une concentration en K<sup>+</sup> extracellulaire de 5 mM afin de conclure définitivement sur l'avantage de la chimère par rapport au canal sauvage. De plus, d'un point de vue pharmacologique, d'autres molécules devront être testées. Ces tests seront réalisés sur un format de plaque 384 puits et automatisés car le format utilisé au cours de notre étude (24 puits) est inadapté pour une analyse à haut débit. L'automatisation mais aussi l'utilisation d'une lignée stable pour le canal chimère permettront de réduire le niveau de variabilité d'un test à l'autre. Ces études permettront entre autres de déterminer le seuil minimal d'inhibition pour les molécules présentant un déplacement de la valeur d' $IC_{50}$  en efflux par rapport au patch-clamp. Dans leur étude, Cheng et coll., ont montré que les molécules présentant une inhibition supérieure à 30 % en efflux de Rb<sup>+</sup> inhibent effectivement le courant I<sub>hERG</sub> en patch-clamp (Cheng et coll., 2002). De même, dans notre étude la risperidone présente une inhibition de 29 % en efflux à une concentration pour laquelle l'inhibition de l<sub>chimère</sub> est totale en patch-clamp. Pour pouvoir déterminer ce seuil, il sera donc capital de multiplier les tests afin d'éviter l'exclusion de molécules présentant un effet inhibiteur potentiel de hERG.

Nos premiers résultats sont encourageants. Cependant, cette méthode sera utilisée uniquement comme un moyen de filtrer les molécules et de réduire ainsi le nombre d'agents pharmacologiques à tester en patch-clamp conventionnel. Elle ne se substituera en aucun cas à la technique de patch-clamp qui reste la méthode de référence (ICHS7B guideline, cité dans Cavero et Crumb, 2005).

Cette restriction à l'utilisation des efflux pour la détection des inhibiteurs de hERG tient au fait que cette méthode comme beaucoup d'autres techniques de ce type est une méthode indirecte de l'évaluation des effets des agents pharmacologiques sur la fonction des canaux. L'évaluation par les systèmes de patch-clamp automatique est plus directe car cette technique permet d'évaluer les effets des agents pharmacologiques sur l<sub>Kr</sub>. Elle n'est cependant pas encore complètement au point et de nombreux problèmes techniques demeurent. Certaines études montrent même une perte de sensibilité pour les inhibiteurs de hERG par rapport au patch-clamp conventionnel (Sorota et coll., 2005). A l'heure actuelle, le

patch-clamp automatique n'offre donc pas plus d'avantages que notre test d'efflux de Rb<sup>+</sup>, qui, si les prochaines études le confirment pourrait faire l'objet d'un développement industriel prometteur.

# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

ABBOTT,G.W., SESTI,F., SPLAWSKI,I., BUCK,M.E., LEHMANN,M.H., TIMOTHY,K.W., KEATING,M.T. & GOLDSTEIN,S.A. (1999) MiRP1 forms  $I_{Kr}$  potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* **97**, 175-187.

AGGARWAL,R., SHOROFSKY,S.R., GOLDMAN,L. & BALKE,C.W. (1997) Tetrodotoxinblockable calcium currents in rat ventricular myocytes; a third type of cardiac cell sodium current. *J. Physiol* **505** (Pt 2), 353-369.

AGGARWAL,S.K. & MACKINNON,R. (1996) Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K<sup>+</sup> channel. *Neuron* **16**, 1169-1177.

AGUS,Z.S., DUKES,I.D. & MORAD,M. (1991) Divalent cations modulate the transient outward current in rat ventricular myocytes. *Am. J. Physiol* **261**, C310-C318.

AKAR,F.G., WU,R.C., JUANG,G.J., TIAN,Y., BURYSEK,M., DISILVESTRE,D., XIONG,W., ARMOUNDAS,A.A. & TOMASELLI,G.F. (2005) Molecular mechanisms underlying K<sup>+</sup> current downregulation in canine tachycardia-induced heart failure. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **288**, H2887-H2896.

AKHAVAN,A., ATANASIU,R., NOGUCHI,T., HAN,W., HOLDER,N. & SHRIER,A. (2005) Identification of the cyclic-nucleotide-binding domain as a conserved determinant of ion-channel cell-surface localization. *J. Cell Sci.* **118**, 2803-2812.

ALGRA,A., TIJSSEN,J.G, ROELANDT,J.R, POOL,J & LUBSEN,J. (1993) QT interval variables from 24 hour electrocardiography and the two year risk of sudden death. *Br. Heart J.* **70**, 43-48.

AN,W.F, BOWLBY,M.R., BETTY,M., CAO,J., LING,H.P., MENDOZA,G., HINSON,J.W., MATTSSON,K.I., STRASSLE,B.W., TRIMMER,J.S. & RHODES,K.J. (2000) Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature* **403**, 553-556.

ANTOINE,S., PINET,C. & COULOMBE,A. (2001) Are B-type  $Ca^{2+}$  channels of cardiac myocytes akin to the passive ion channel in the plasma membrane  $Ca^{2+}$  pump? *J. Membr. Biol.* **179**, 37-50.

ANTZELEVITCH,C., SICOURI,S., LITOVSKY,S.H., LUKAS,A., KRISHNAN,S.C., DI DIEGO,J.M., GINTANT,G.A. & LIU,D.W. (1991) Heterogeneity within the ventricular wall. Electrophysiology and pharmacology of epicardial, endocardial, and M cells. *Circ. Res.* **69**, 1427-1449.

ANTZELEVITCH,C., SHIMIZU,W., YAN,G.X., SICOURI,S., WEISSENBURGER,J., NESTERENKO,V.V., BURASHNIKOV,A., DI DIEGO,J., SAFFITZ,J. & THOMAS,G.P. (1999) The M cell: its contribution to the ECG and to normal and abnormal electrical function of the heart. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **10**, 1124-1152.

ANTZELEVITCH,C. (2003) Molecular genetics of arrhythmias and cardiovascular conditions associated with arrhythmias. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **14**, 1259-1272.

ANTZELEVITCH,C. (2005) Role of transmural dispersion of repolarization in the genesis of drug-induced torsades de pointes. *Heart Rhythm.* **2**, S9-15.

ANTZELEVITCH,C. & OLIVA,A. (2006) Amplification of spatial dispersion of repolarization underlies sudden cardiac death associated with catecholaminergic polymorphic VT, long QT, short QT and Brugada syndromes. *J. Intern. Med.* **259**, 48-58.

ANUMONWO, J.M., TALLINI, Y.N., VETTER, F.J. & JALIFE, J. (2001) Action potential characteristics and arrhythmogenic properties of the cardiac conduction system of the murine heart. *Circ. Res.* **89**, 329-335.

ANYUKHOVSKY, E.P. & ROSEN, M.R. (1994) Electrophysiologic effects of alprafenone on canine cardiac tissue. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **24**, 411-419.

ARAI,M., MATSUI,H. & PERIASAMY,M. (1994) Sarcoplasmic reticulum gene expression in cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ. Res.* **74**, 555-564.

ARMOUNDAS,A.A., WU,R., JUANG,G., MARBAN,E. & TOMASELLI,G.F. (2001) Electrical and structural remodeling of the failing ventricle. *Pharmacol. Ther.* **92**, 213-230.

ARMOUNDAS,A.A., HOBAI,I.A., TOMASELLI,G.F., WINSLOW,R.L. & O'ROURKE,B. (2003) Role of sodium-calcium exchanger in modulating the action potential of ventricular myocytes from normal and failing hearts. *Circ. Res.* **93**, 46-53.

ARMSTRONG, C.M. & TAYLOR, S.R. (1980) Interaction of barium ions with potassium channels in squid giant axons. *Biophys. J.* **30**, 473-488.

ARTIGAS,P. & GADSBY,D.C. (2004) Large diameter of palytoxin-induced Na/K pump channels and modulation of palytoxin interaction by Na/K pump ligands. *J. Gen. Physiol* **123**, 357-376.

ATTALI,B., ROMEY,G., HONORE,E., SCHMID-ALLIANA,A., MATTEI,M.G., LESAGE,F., RICARD,P., BARHANIN,J. & LAZDUNSKI,M. (1992) Cloning, functional expression, and regulation of two K<sup>+</sup> channels in human T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **267**, 8650-8657.

ATTWELL,D., COHEN,I., EISNER,D., OHBA,M. & OJEDA,C. (1979) The steady state TTX-sensitive ("window") sodium current in cardiac Purkinje fibres. *Pflugers Arch.* **379**, 137-142.

BABENKO,A.P., AGUILAR-BRYAN,L. & BRYAN,J. (1998) A view of sur/KIR6.X, KATP channels. *Annu. Rev. Physiol* **60**, 667-687.

BAKER,L.C., LONDON,B., CHOI,B.R., KOREN,G. & SALAMA,G. (2000) Enhanced dispersion of repolarization and refractoriness in transgenic mouse hearts promotes reentrant ventricular tachycardia. *Circ. Res.* **86**, 396-407.

BAKKER,O., HUDIG,F., MEIJSSEN,S. & WIERSINGA,W.M. (1998) Effects of triiodothyronine and amiodarone on the promoter of the human LDL receptor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **249**, 517-521.

BANGALORE,R., MEHRKE,G., GINGRICH,K., HOFMANN,F. & KASS,R.S. (1996) Influence of L-type Ca channel alpha 2/delta-subunit on ionic and gating current in transiently transfected HEK 293 cells. *Am. J. Physiol* **270**, H1521-H1528.

BARHANIN,J., LESAGE,F., GUILLEMARE,E., FINK,M., LAZDUNSKI,M. & ROMEY,G. (1996) K(V)LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the  $I(\kappa_s)$  cardiac potassium current. *Nature* **384**, 78-80.

BELLOCQ,C., VAN GINNEKEN,A.C., BEZZINA,C.R., ALDERS,M., ESCANDE,D., MANNENS,M.M., BARO,I. & WILDE,A.A. (2004) Mutation in the KCNQ1 gene leading to the short QT-interval syndrome. *Circulation* **109**, 2394-2397.

BENDAHHOU,S., DONALDSON,M.R., PLASTER,N.M., TRISTANI-FIROUZI,M., FU,Y.H. & PTACEK,L.J. (2003) Defective potassium channel Kir2.1 trafficking underlies Andersen-Tawil syndrome. *J. Biol. Chem.* **278**, 51779-51785.

BENNETT, P.B., YAZAWA, K., MAKITA, N. & GEORGE, A.L., Jr. (1995) Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia. *Nature* **376**, 683-685.

BERUL,C.I. (2003) Electrophysiological phenotyping in genetically engineered mice. *Physiol Genomics* **13**, 207-216.

BEUCKELMANN,D.J., NABAUER,M. & ERDMANN,E. (1993) Alterations of K<sup>+</sup> currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ. Res.* **73**, 379-385.

BEZANILLA, F. (2000) The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev.* **80**, 555-592.

BEZANILLA, F. (2002) Voltage sensor movements. J. Gen. Physiol 120, 465-473.

BINAH,O., RUBINSTEIN,I. & GILAT,E. (1987) Effects of thyroid hormone on the action potential and membrane currents of guinea pig ventricular myocytes. *Pflugers Arch.* **409**, 214-216.

BKAILY,G., SCULPTOREANU,A., JACQUES,D., ECONOMOS,D. & MENARD,D. (1992) Apamin, a highly potent fetal L-type Ca<sup>2+</sup> current blocker in single heart cells. *Am. J. Physiol* **262**, H463-H471.

BLAUSTEIN, M.P. & LEDERER, W.J. (1999) Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev.* **79**, 763-854.

BODI,I., MUTH,J.N., HAHN,H.S., PETRASHEVSKAYA,N.N., RUBIO,M., KOCH,S.E., VARADI,G. & SCHWARTZ,A. (2003) Electrical remodeling in hearts from a calciumdependent mouse model of hypertrophy and failure: complex nature of K<sup>+</sup> current changes and action potential duration. *J. Am. Coll. Cardiol.* **41**, 1611-1622.

BONDARENKO, V.E., SZIGETI, G.P., BETT, G.C., KIM, S.J. & RASMUSSON, R.L. (2004) Computer model of action potential of mouse ventricular myocytes. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **287**, H1378-H1403.

BOSCH,R.F., GASPO,R., BUSCH,A.E., LANG,H.J., LI,G.R. & NATTEL,S. (1998) Effects of the chromanol 293B, a selective blocker of the slow, component of the delayed rectifier K<sup>+</sup> current, on repolarization in human and guinea pig ventricular myocytes. *Cardiovasc. Res.* **38**, 441-450.

BOUCHARD,R.A., CLARK,R.B. & GILES,W.R. (1995) Effects of action potential duration on excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. Action potential voltage-clamp measurements. *Circ. Res.* **76**, 790-801.

BOUSSIF,O., LEZOUALC'H,F., ZANTA,M.A., MERGNY,M.D., SCHERMAN,D., DEMENEIX,B. & BEHR,J.P. (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 7297-7301.

BOUSSIF,O., ZANTA,M.A. & BEHR,J.P. (1996) Optimized galenics improve in vitro gene transfer with cationic molecules up to 1000-fold. *Gene Ther.* **3**, 1074-1080.

BRICKLEY,K., CAMPBELL,V., BERROW,N., LEACH,R., NORMAN,R.I., WRAY,D., DOLPHIN,A.C. & BALDWIN,S.A. (1995) Use of site-directed antibodies to probe the topography of the alpha 2 subunit of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *FEBS Lett.* **364**, 129-133.

BRIDGLAND-TAYLOR,M.H., HARGREAVES,A.C., EASTER,A., ORME,A., HENTHORN,D.C., DING,M., DAVIS,A.M., SMALL,B.G., HEAPY,C.G., ABI-GERGES,N., PERSSON,F., JACOBSON,I., SULLIVAN,M., ALBERTSON,N., HAMMOND,T.G., SULLIVAN,E., VALENTIN,J.P. & POLLARD,C.E. (2006) Optimisation and validation of a medium-throughput electrophysiology-based hERG assay using lonWorkstrade mark HT. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* **54**, 189-199.

BROUILLETTE, J., CLARK, R.B., GILES, W.R. & FISET, C. (2004) Functional properties of K<sup>+</sup> currents in adult mouse ventricular myocytes. *J. Physiol* **559**, 777-798.

BROWN,H., DIFRANCESCO,D. & NOBLE,S. (1979) Cardiac pacemaker oscillation and its modulation by autonomic transmitters. *J. Exp. Biol.* **81**, 175-204.

BROWN,H.F., NOBLE,D., NOBLE,S.J. & TAUPIGNON,A.I. (1986) Relationship between the transient inward current and slow inward currents in the sino-atrial node of the rabbit. *J. Physiol* **370**, 299-315.

BRUGADA,R., HONG,K., DUMAINE,R., CORDEIRO,J., GAITA,F., BORGGREFE,M., MENENDEZ,T.M., BRUGADA,J., POLLEVICK,G.D., WOLPERT,C., BURASHNIKOV,E., MATSUO,K., WU,Y.S., GUERCHICOFF,A., BIANCHI,F., GIUSTETTO,C., SCHIMPF,R., BRUGADA,P. & ANTZELEVITCH,C. (2004) Sudden death associated with short-QT syndrome linked to mutations in HERG. *Circulation* **109**, 30-35.

BRUGGEMANN,A., PARDO,L.A., STUHMER,W. & PONGS,O. (1993) Ether-a-go-go encodes a voltage-gated channel permeable to K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> and modulated by cAMP. *Nature* **365**, 445-448.

BUSCH,A.E., MALLOY,K., GROH,W.J., VARNUM,M.D., ADELMAN,J.P. & MAYLIE,J. (1994) The novel class III antiarrhythmics NE-10064 and NE-10133 inhibit IsK channels expressed in Xenopus oocytes and  $I_{Ks}$  in guinea pig cardiac myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**, 265-270.

CARMELIET, E. (1987) Slow inactivation of the sodium current in rabbit cardiac Purkinje fibres. *Pflugers Arch.* **408**, 18-26.

CARMELIET,E. (1992) Voltage- and time-dependent block of the delayed K<sup>+</sup> current in cardiac myocytes by dofetilide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **262**, 809-817.

CARMELIET,E. (1993) Use-dependent block and use-dependent unblock of the delayed rectifier K<sup>+</sup> current by almokalant in rabbit ventricular myocytes. *Circ. Res.* **73**, 857-868.

CASTELLETTI,L., MEMO,M., MISSALE,C., SPANO,P.F. & VALERIO,A. (1989) Potassium channels involved in the transduction mechanism of dopamine D2 receptors in rat lactotrophs. *J. Physiol* **410**, 251-265.

CATTERALL,W.A. (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 521-555.

CATTERALL, W.A., STRIESSNIG, J., SNUTCH, T.P. & PEREZ-REYES, E. (2003) International Union of Pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated ion channels: calcium channels. *Pharmacol. Rev.* **55**, 579-581.

CATTERALL, W.A., GOLDIN, A.L. & WAXMAN, S.G. (2003) International Union of Pharmacology. XXXIX. Compendium of voltage-gated ion channels: sodium channels. *Pharmacol. Rev.* **55**, 575-578.

CAVERO I & CRUMB W. (2005) ICH S7B draft guideline on the non-clinical strategy for testing delayed cardiac repolarisation risk of drugs: a critical analysis. *Expert Opin Drug Saf.* **4**: 509-530.

CHA,A., RUBEN,P.C., GEORGE,A.L., Jr., FUJIMOTO,E. & BEZANILLA,F. (1999) Voltage sensors in domains III and IV, but not I and II, are immobilized by Na<sup>+</sup> channel fast inactivation. *Neuron* **22**, 73-87.

CHANG,F., COHEN,I.S., DIFRANCESCO,D., ROSEN,M.R. & TROMBA,C. (1991) Effects of protein kinase inhibitors on canine Purkinje fibre pacemaker depolarization and the pacemaker current i(<sub>f</sub>). *J. Physiol* **440**, 367-384.

CHAUHAN,V.S., TUVIA,S., BUHUSI,M., BENNETT,V. & GRANT,A.O. (2000) Abnormal cardiac Na(<sup>+</sup>) channel properties and QT heart rate adaptation in neonatal ankyrin(B) knockout mice. *Circ. Res.* **86**, 441-447.

CHEMIN,J., MONTEIL,A., BOURINET,E., NARGEOT,J. & LORY,P. (2001) Alternatively spliced alpha(1G) (Ca(V)3.1) intracellular loops promote specific T-type Ca(<sup>2+</sup>) channel gating properties. *Biophys. J.* **80**, 1238-1250.

CHEN,C., BHARUCHA,V., CHEN,Y., WESTENBROEK,R.E., BROWN,A., MALHOTRA,J.D., JONES,D., AVERY,C., GILLESPIE,P.J., III, KAZEN-GILLESPIE,K.A., KAZARINOVA-NOYES,K., SHRAGER,P., SAUNDERS,T.L., MACDONALD,R.L., RANSOM,B.R., SCHEUER,T., CATTERALL,W.A. & ISOM,L.L. (2002) Reduced sodium channel density, altered voltage dependence of inactivation, and increased susceptibility to seizures in mice lacking sodium channel beta 2-subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 17072-17077.

CHEN, J., ZOU, A., SPLAWSKI, I., KEATING, M.T. & SANGUINETTI, M.C. (1999) Long QT syndrome-associated mutations in the Per-Arnt-Sim (PAS) domain of HERG potassium channels accelerate channel deactivation. *J. Biol. Chem.* **274**, 10113-10118.

CHEN,Y. & WOOSLEY,RL. (1993). Ketoconazole blocks potassium currents in feline heart. *Circulation* **88**, I-38

CHENG,C.S., ALDERMAN,D., KWASH,J., DESSAINT,J., PATEL,R., LESCOE,M.K., KINRADE,M.B. & YU,W. (2002) A high-throughput HERG potassium channel function assay: an old assay with a new look. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **28**, 177-191.

CHENG,J., KAMIYA,K., LIU,W., TSUJI,Y., TOYAMA,J. & KODAMA,I. (1999) Heterogeneous distribution of the two components of delayed rectifier K<sup>+</sup> current: a potential mechanism of the proarrhythmic effects of methanesulfonanilideclass III agents. *Cardiovasc. Res.* **43**, 135-147.

CHIU,P.J., MARCOE,K.F., BOUNDS,S.E., LIN,C.H., FENG,J.J., LIN,A., CHENG,F.C., CRUMB,W.J. & MITCHELL,R. (2004) Validation of a [3H]astemizole binding assay in HEK293 cells expressing HERG K<sup>+</sup> channels. *J. Pharmacol. Sci.* **95**, 311-319.

CHOUABE,C., DRICI,M.D., ROMEY,G., BARHANIN,J. & LAZDUNSKI,M. (1998) HERG and KvLQT1/IsK, the cardiac K<sup>+</sup> channels involved in long QT syndromes, are targets for calcium channel blockers. *Mol. Pharmacol.* **54**, 695-703.

CLANCY,C.E. & RUDY,Y. (2001) Cellular consequences of HERG mutations in the long QT syndrome: precursors to sudden cardiac death. *Cardiovasc. Res.* **50**, 301-313.

CLEMENT, J.P., KUNJILWAR, K., GONZALEZ, G., SCHWANSTECHER, M., PANTEN, U., AGUILAR-BRYAN, L. & BRYAN, J. (1997) Association and stoichiometry of K(ATP) channel subunits. *Neuron* **18**, 827-838.

COHEN,S.A. (1996) Immunocytochemical localization of rH1 sodium channel in adult rat heart atria and ventricle. Presence in terminal intercalated disks. *Circulation* **94**, 3083-3086.

COLE,W.C., CHARTIER,D., MARTIN,M. & LEBLANC,N. (1997) Ca<sup>2+</sup> permeation through Na<sup>+</sup> channels in guinea pig ventricular myocytes. *Am. J. Physiol* **273**, H128-H137.

COLQUHOUN, D., NEHER, E., REUTER, H. & STEVENS, C.F. (1981) Inward current channels activated by intracellular Ca in cultured cardiac cells. *Nature* **294**, 752-754.

CORABOEUF, E., DEROUBAIX, E. & COULOMBE, A. (1979) Effect of tetrodotoxin on action potentials of the conducting system in the dog heart. *Am. J. Physiol* **236**, H561-H567.

CORABOEUF, E. & CARMELIET, E. (1982) Existence of two transient outward currents in sheep cardiac Purkinje fibers. *Pflugers Arch.* **392**, 352-359.

CORDEIRO, J.M., SPITZER, K.W. & GILES, W.R. (1998) Repolarizing K<sup>+</sup> currents in rabbit heart Purkinje cells. *J. Physiol* **508** (Pt 3), 811-823.

CORONEL,R., OPTHOF,T., TAGGART,P., TYTGAT,J. & VELDKAMP,M. (1997) Differential electrophysiology of repolarisation from clone to clinic. *Cardiovasc. Res.* **33**, 503-517.

COSTANTINI,D.L., ARRUDA,E.P., AGARWAL,P., KIM,K.H., ZHU,Y., ZHU,W., LEBEL,M., CHENG,C.W., PARK,C.Y., PIERCE,S.A., GUERCHICOFF,A., POLLEVICK,G.D., CHAN,T.Y., KABIR,M.G., CHENG,S.H., HUSAIN,M., ANTZELEVITCH,C., SRIVASTAVA,D., GROSS,G.J., HUI,C.C., BACKX,P.H. & BRUNEAU,B.G. (2005) The homeodomain transcription factor Irx5 establishes the mouse cardiac ventricular repolarization gradient. *Cell* **123**, 347-358.

COULOMBE, A., DEROUBAIX, E. & CORABOEUF, E. (1999) Mécanismes ioniques des altérations de la repolarisation cardiaque dans les cardiopathies. *Méd. Sc.* **15**, 359-398.

COULOMBE, A., LEFEVRE, I.A., BARO, I. & CORABOEUF, E. (1989) Barium- and calciumpermeable channels open at negative membrane potentials in rat ventricular myocytes. *J. Membr. Biol.* **111**, 57-67.

COVARRUBIAS, M., WEI, A.A. & SALKOFF, L. (1991) Shaker, Shal, Shab, and Shaw express independent K<sup>+</sup> current systems. *Neuron* **7**, 763-773.

CRANEFIELD, P.F. (1977) Action potentials, afterpotentials, and arrhythmias. *Circ. Res.* **41**, 415-423.

CRANEFIELD, P.F. & ARONSON, R.S. (1991) Torsades de pointes and early afterdepolarizations. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **5**, 531-537.

CRIBBS,L.L., MARTIN,B.L., SCHRODER,E.A., KELLER,B.B., DELISLE,B.P. & SATIN,J. (2001) Identification of the t-type calcium channel (Ca(v)3.1d) in developing mouse heart. *Circ. Res.* **88**, 403-407.

CUI,J., MELMAN,Y., PALMA,E., FISHMAN,G.I. & MCDONALD,T.V. (2000) Cyclic AMP regulates the HERG K(<sup>+</sup>) channel by dual pathways. *Curr. Biol.* **10**, 671-674.

CURRAN,M.E., SPLAWSKI,I., TIMOTHY,K.W., VINCENT,G.M., GREEN,E.D. & KEATING,M.T. (1995) A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* **80**, 795-803.

DAVIES, D.P. (1999) Short QTc interval as an important factor in sudden infant death syndrome. *Arch. Dis. Child* **80**, 105-106.

DE JONGH,K.S., WARNER,C. & CATTERALL,W.A. (1990) Subunits of purified calcium channels. Alpha 2 and delta are encoded by the same gene. *J. Biol. Chem.* **265**, 14738-14741.

DE WINDT,L.J., LIM,H.W., HAQ,S., FORCE,T. & MOLKENTIN,J.D. (2000) Calcineurin promotes protein kinase C and c-Jun NH2-terminal kinase activation in the heart. Cross-talk between cardiac hypertrophic signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **275**, 13571-13579.

DECHER,N., BUNDIS,F., VAJNA,R. & STEINMEYER,K. (2003) KCNE2 modulates current amplitudes and activation kinetics of HCN4: influence of KCNE family members on HCN4 currents. *Pflugers Arch.* **446**, 633-640.

DESSERTENNE, F. (1966) La tachycardie ventriculaire à deux foyers opposés variables. *Arch. Mal Coeur Vaiss.* **59**, 263-272.

DIAZ,G.J., DANIELL,K., LEITZA,S.T., MARTIN,R.L., SU,Z., MCDERMOTT,J.S., COX,B.F. & GINTANT,G.A. (2004) The [3H]dofetilide binding assay is a predictive screening tool for hERG blockade and proarrhythmia: Comparison of intact cell and membrane preparations and effects of altering [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub>. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **50**, 187-199.

DIFRANCESCO, D. & TORTORA, P. (1991) Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* **351**, 145-147.

DING,S. & HORN,R. (2001) Slow photo-cross-linking kinetics of benzophenone-labeled voltage sensors of ion channels. *Biochemistry* **40**, 10707-10716.

DING,S. & HORN,R. (2002) Tail end of the s6 segment: role in permeation in shaker potassium channels. *J. Gen. Physiol* **120**, 87-97.

DOGGRELL,S.A. & NAND,V. (2001) Effects of tedisamil on cardiovascular tissues isolated from normo- and hypertensive rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* **6**, 261-272.

DONG,D., DUAN,Y., GUO,J., ROACH,D.E., SWIRP,S.L., WANG,L., LEES-MILLER,J.P., SHELDON,R.S., MOLKENTIN,J.D. & DUFF,H.J. (2003) Overexpression of calcineurin in mouse causes sudden cardiac death associated with decreased density of K<sup>+</sup> channels. *Cardiovasc. Res.* **57**, 320-332.

DOYLE,D.A., MORAIS,C.J., PFUETZNER,R.A., KUO,A., GULBIS,J.M., COHEN,S.L., CHAIT,B.T. & MACKINNON,R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* **280**, 69-77.

DRICI,M.D., BURKLOW,T.R., HARIDASSE,V., GLAZER,R.I. & WOOSLEY,R.L. (1996) Sex hormones prolong the QT interval and downregulate potassium channel expression in the rabbit heart. *Circulation* **94**, 1471-1474.

DROUIN, E., LANDE, G. & CHARPENTIER, F. (1998) Amiodarone reduces transmural heterogeneity of repolarization in the human heart. *J. Am. Coll. Cardiol.* **32**, 1063-1067.

DRVOTA,V., BLANGE,I., HAGGBLAD,J. & SYLVEN,C. (1998) Desethylamiodarone prolongation of cardiac repolarization is dependent on gene expression: a novel antiarrhythmic mechanism. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **32**, 654-661.

DUKES,I.D., CLEEMANN,L. & MORAD,M. (1990) Tedisamil blocks the transient and delayed rectifier K<sup>+</sup> currents in mammalian cardiac and glial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **254**, 560-569.

ECKARDT,L., HAVERKAMP,W., MERTENS,H., JOHNA,R., CLAGUE,J.R., BORGGREFE,M. & BREITHARDT,G. (1998) Drug-related torsades de pointes in the isolated rabbit heart: comparison of clofilium, d,I-sotalol, and erythromycin. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **32**, 425-434.

EHARA,T., NOMA,A. & ONO,K. (1988) Calcium-activated non-selective cation channel in ventricular cells isolated from adult guinea-pig hearts. *J. Physiol* **403**, 117-133.

EISNER, D.A. (1990) The Wellcome prize lecture. Intracellular sodium in cardiac muscle: effects on contraction. *Exp. Physiol* **75**, 437-457.

EISNER, D.A., LI, Y. & O'NEILL, S.C. (2006) Alternans of intracellular calcium: mechanism and significance. *Heart Rhythm.* **3**, 743-745.

ELLIS,S.B., WILLIAMS,M.E., WAYS,N.R., BRENNER,R., SHARP,A.H., LEUNG,A.T., CAMPBELL,K.P., MCKENNA,E., KOCH,W.J. & HUI,A. (1988) Sequence and expression of mRNAs encoding the alpha 1 and alpha 2 subunits of a DHP-sensitive calcium channel. *Science* **241**, 1661-1664.

ENGLAND,S.K., UEBELE,V.N., KODALI,J., BENNETT,P.B. & TAMKUN,M.M. (1995) A novel K<sup>+</sup> channel beta-subunit (hKv beta 1.3) is produced via alternative mRNA splicing. *J. Biol. Chem.* **270**, 28531-28534.

ERLANGER, J. &. BLACKMAN, J.R. (1910) Further studies in the physiology of heart block in mammals chronic auriculo-ventricular heart block in the dog, *Heart* **1**, 177–229.

ESCANDE,D. (2000) Pharmacogenetics of cardiac K(<sup>+</sup>) channels. *Eur. J. Pharmacol.* **410**, 281-287.

FABIATO,A & FABIATO,F.(1978) Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from adult human, dog, cat, rabbit, rat, and frog hearts and from fetal and new-born rat ventricles. *Ann N Y Acad Sci.*;**307**:491-522. No abstract available.

FAHMI,A.I., PATEL,M., STEVENS,E.B., FOWDEN,A.L., JOHN,J.E., III, LEE,K., PINNOCK,R., MORGAN,K., JACKSON,A.P. & VANDENBERG,J.I. (2001) The sodium channel beta-subunit SCN3b modulates the kinetics of SCN5a and is expressed heterogeneously in sheep heart. *J. Physiol* **537**, 693-700.

FAN,J.S., JIANG,M., DUN,W., MCDONALD,T.V. & TSENG,G.N. (1999) Effects of outer mouth mutations on hERG channel function: a comparison with similar mutations in the Shaker channel. *Biophys. J.* **76**, 3128-3140.

FAVRE,I., MOCZYDLOWSKI,E. & SCHILD,L. (1996) On the structural basis for ionic selectivity among Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, and Ca<sup>2+</sup> in the voltage-gated sodium channel. *Biophys. J.* **71**, 3110-3125.

FERNANDEZ,D., GHANTA,A., KAUFFMAN,G.W. & SANGUINETTI,M.C. (2004) Physicochemical features of the HERG channel drug binding site. *J. Biol. Chem.* **279**, 10120-10127.

FERRER,T., RUPP,J., PIPER,D.R. & TRISTANI-FIROUZI,M. (2006) The S4-S5 linker directly couples voltage sensor movement to the activation gate in the human ether-a'-go-go-related gene (hERG) K<sup>+</sup> channel. *J. Biol. Chem.* **281**, 12858-12864.

FERRON,L., CAPUANO,V., DEROUBAIX,E., COULOMBE,A. & RENAUD,J.F. (2002) Functional and molecular characterization of a T-type Ca(<sup>2+</sup>) channel during fetal and postnatal rat heart development. *J. Mol. Cell Cardiol.* **34**, 533-546.

FICKER, E., JAROLIMEK, W., KIEHN, J., BAUMANN, A. & BROWN, A.M. (1998) Molecular determinants of dofetilide block of HERG K<sup>+</sup> channels. *Circ. Res.* **82**, 386-395.

FINLAYSON,K., PENNINGTON,A.J. & KELLY,J.S. (2001) [3H]dofetilide binding in SHSY5Y and HEK293 cells expressing a HERG-like K<sup>+</sup> channel? *Eur. J. Pharmacol.* **412**, 203-212.

FISET,C., CLARK,R.B., LARSEN,T.S. & GILES,W.R. (1997) A rapidly activating sustained K<sup>+</sup> current modulates repolarization and excitation-contraction coupling in adult mouse ventricle. *J. Physiol* **504 (Pt 3)**, 557-563.

FOLANDER,K., SMITH,J.S., ANTANAVAGE,J., BENNETT,C., STEIN,R.B. & SWANSON,R. (1990) Cloning and expression of the delayed-rectifier IsK channel from neonatal rat heart and diethylstilbestrol-primed rat uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**, 2975-2979.

FOX,J.J., MCHARG,J.L. & GILMOUR,R.F., Jr. (2002) Ionic mechanism of electrical alternans. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **282**, H516-H530.

FREEMAN,L.C. & KASS,R.S. (1993) Expression of a minimal K<sup>+</sup> channel protein in mammalian cells and immunolocalization in guinea pig heart. *Circ. Res.* **73**, 968-973.

FREY,N., MCKINSEY,T.A. & OLSON,E.N. (2000) Decoding calcium signals involved in cardiac growth and function. *Nat. Med.* **6**, 1221-1227.

FUJITA,A. & KURACHI,Y. (2000) Molecular aspects of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the cardiovascular system and K+ channel openers. *Pharmacol. Ther.* **85**, 39-53.

GADSBY,D.C. & NAKAO,M. (1989) Steady-state current-voltage relationship of the Na/K pump in guinea pig ventricular myocytes. *J. Gen. Physiol* **94**, 511-537.

GANG,H. & ZHANG,S. (2006) Na<sup>+</sup> permeation and block of HERG potassium channels. *J. Gen. Physiol* **128**, 55-71.

GIDH-JAIN,M., HUANG,B., JAIN,P. & EL SHERIF,N. (1996) Differential expression of voltage-gated  $K^+$  channel genes in left ventricular remodeled myocardium after experimental myocardial infarction. *Circ. Res.* **79**, 669-675.

GILMOUR, R.F., Jr. (2003) A novel approach to identifying antiarrhythmic drug targets. *Drug Discov. Today* **8**, 162-167.

GINTANT, G.A., DATYNER, N.B. & COHEN, I.S. (1984) Slow inactivation of a tetrodotoxinsensitive current in canine cardiac Purkinje fibers. *Biophys. J.* **45**, 509-512. GLADMAN,G., DAVIS,A.M., FOGELMAN,R., HAMILTON,R.M. & GOW,R.M. (1996) Torsade de pointes, acquired complete heart block and inappropriately long QT in childhood. *Can. J. Cardiol.* **12**, 683-685.

GLUZMAN,Y. (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**, 175-182.

GONG,J., XU,J., BEZANILLA,M., VAN HUIZEN,R., DERIN,R. & LI,M. (1999) Differential stimulation of PKC phosphorylation of potassium channels by ZIP1 and ZIP2. *Science* **285**, 1565-1569.

GONZALEZ,C., ROSENMAN,E., BEZANILLA,F., ALVAREZ,O. & LATORRE,R. (2001) Periodic perturbations in Shaker K<sup>+</sup> channel gating kinetics by deletions in the S3-S4 linker. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 9617-9623.

GONZALEZ,C., MORERA,F.J., ROSENMANN,E., ALVAREZ,O. & LATORRE,R. (2005) S3b amino acid residues do not shuttle across the bilayer in voltage-dependent Shaker K<sup>+</sup> channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 5020-5025.

GRANT,A.O., JOHN,J.E., NESTERENKO,V.V., STARMER,C.F. & MOORMAN,J.R. (1996) The role of inactivation in open-channel block of the sodium channel: studies with inactivation-deficient mutant channels. *Mol. Pharmacol.* **50**, 1643-1650.

GUATIMOSIM,S., SOBIE,E.A., DOS SANTOS,C.J., MARTIN,L.A. & LEDERER,W.J. (2001) Molecular identification of a TTX-sensitive Ca(<sup>2+</sup>) current. *Am. J. Physiol Cell Physiol* **280**, C1327-C1339.

GULBIS, J.M., ZHOU, M., MANN, S. & MACKINNON, R. (2000) Structure of the cytoplasmic beta subunit-T1 assembly of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels. *Science* **289**, 123-127.

GUO,W., KAMIYA,K., KODAMA,I. & TOYAMA,J. (1998) Cell cycle-related changes in the voltage-gated Ca2+ currents in cultured newborn rat ventricular myocytes. *J. Mol. Cell Cardiol.* **30**, 1095-1103.

GUO,W., LI,H., AIMOND,F., JOHNS,D.C., RHODES,K.J., TRIMMER,J.S. & NERBONNE,J.M. (2002) Role of heteromultimers in the generation of myocardial transient outward  $K^+$  currents. *Circ. Res.* **90**, 586-593.

GUO,W., JUNG,W.E., MARIONNEAU,C., AIMOND,F., XU,H., YAMADA,K.A., SCHWARZ,T.L., DEMOLOMBE,S. & NERBONNE,J.M. (2005) Targeted deletion of Kv4.2 eliminates I(to,f) and results in electrical and molecular remodeling, with no evidence of ventricular hypertrophy or myocardial dysfunction. *Circ. Res.* **97**, 1342-1350.

GUSSAK,I., BRUGADA,P., BRUGADA,J., ANTZELEVITCH,C., OSBAKKEN,M. & BJERREGAARD,P. (2002) ECG phenomenon of idiopathic and paradoxical short QT intervals. *Card Electrophysiol. Rev.* **6**, 49-53.

GUTMAN,G.A., CHANDY,K.G., ADELMAN,J.P., AIYAR,J., BAYLISS,D.A., CLAPHAM,D.E., COVARRIUBIAS,M., DESIR,G.V., FURUICHI,K., GANETZKY,B., GARCIA,M.L., GRISSMER,S., JAN,L.Y., KARSCHIN,A., KIM,D., KUPERSCHMIDT,S., KURACHI,Y., LAZDUNSKI,M., LESAGE,F., LESTER,H.A., MCKINNON,D., NICHOLS,C.G., O'KELLY,I., ROBBINS,J., ROBERTSON,G.A., RUDY,B., SANGUINETTI,M., SEINO,S., STUEHMER,W., TAMKUN,M.M., VANDENBERG,C.A., WEI,A., WULFF,H. & WYMORE,R.S. (2003) International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol. Rev.* **55**, 583-586. HAMILL,O.P., MARTY,A., NEHER,E., SAKMANN,B. & SIGWORTH,F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* **391**, 85-100.

HAN,W., BAO,W., WANG,Z. & NATTEL,S. (2002) Comparison of ion-channel subunit expression in canine cardiac Purkinje fibers and ventricular muscle. *Circ. Res.* **91**, 790-797.

HANCOX,J.C., PATEL,K.C. & JONES,J.V. (2000) Antiarrhythmics--from cell to clinic: past, present, and future. *Heart* **84**, 14-24.

HANLON, M.R. & WALLACE, B.A. (2002) Structure and function of voltage-dependent ion channel regulatory beta subunits. *Biochemistry* **41**, 2886-2894.

HAUSWIRTH,O. (1968) Effects of Droperidol on sheep Purkinje fibers. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmakol.* **261**, 133-142.

HAVERKAMP,W., BREITHARDT,G., CAMM,A.J., JANSE,M.J., ROSEN,M.R., ANTZELEVITCH,C., ESCANDE,D., FRANZ,M., MALIK,M., MOSS,A. & SHAH,R. (2000) The potential for QT prolongation and proarrhythmia by non-antiarrhythmic drugs: clinical and regulatory implications. Report on a policy conference of the European Society of Cardiology. *Eur. Heart J.* **21**, 1216-1231.

HEGINBOTHAM,L., ABRAMSON,T. & MACKINNON,R. (1992) A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K+ channels. *Science* **258**, 1152-1155.

HEGINBOTHAM,L., LU,Z., ABRAMSON,T. & MACKINNON,R. (1994) Mutations in the K<sup>+</sup> channel signature sequence. *Biophys. J.* **66**, 1061-1067.

HILGEMANN,D.W. (2004) New insights into the molecular and cellular workings of the cardiac Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger. *Am. J. Physiol Cell Physiol* **287**, C1167-C1172.

HINATA,M., YAMAMURA,H., LI,L., WATANABE,Y., WATANO,T., IMAIZUMI,Y. & KIMURA,J. (2002) Stoichiometry of Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange is 3:1 in guinea-pig ventricular myocytes. *J. Physiol* **545**, 453-461.

HO,W.K., EARM,Y.E., LEE,S.H., BROWN,H.F. & NOBLE,D. (1996) Voltage- and timedependent block of delayed rectifier K<sup>+</sup> current in rabbit sino-atrial node cells by external  $Ca^{2+}$ and  $Mg^{2+}$ . *J. Physiol* **494 (Pt 3)**, 727-742.

HO,W.K., KIM,I., LEE,C.O. & EARM,Y.E. (1998) Voltage-dependent blockade of HERG channels expressed in Xenopus oocytes by external  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$ . *J. Physiol* **507 (Pt 3)**, 631-638.

HO,W.K., KIM,I., LEE,C.O., YOUM,J.B., LEE,S.H. & EARM,Y.E. (1999) Blockade of HERG channels expressed in Xenopus laevis oocytes by external divalent cations. *Biophys. J.* **76**, 1959-1971.

HODGKIN,A.L. & HUXLEY,A.F. (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol* **117**, 500-544.

HODGKIN,A.L. & KEYNES,R.D. (1955) The potassium permeability of a giant nerve fibre. *J. Physiol* **128**, 61-88.

HOHNLOSER, S.H. (1997) Proarrhythmia with class III antiarrhythmic drugs: types, risks, and management. *Am. J. Cardiol.* **80**, 82G-89G.

HOLMGREN,M., SMITH,P.L. & YELLEN,G. (1997) Trapping of organic blockers by closing of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels: evidence for a trap door mechanism of activation gating. *J. Gen. Physiol* **109**, 527-535.

HORN,R. & MARTY,A. (1988) Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *J. Gen. Physiol* **92**, 145-159.

HORN,R., DING,S. & GRUBER,H.J. (2000) Immobilizing the moving parts of voltage-gated ion channels. *J. Gen. Physiol* **116**, 461-476.

HORN,R. (2002) Coupled movements in voltage-gated ion channels. J. Gen. Physiol **120**, 449-453.

HORN,R. (2005) How ion channels sense membrane potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 4929-4930.

HOSHI,T., ZAGOTTA,W.N. & ALDRICH,R.W. (1991) Two types of inactivation in Shaker K<sup>+</sup> channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron* **7**, 547-556.

HUA,F., JOHNS,D.C. & GILMOUR,R.F., Jr. (2004) Suppression of electrical alternans by overexpression of HERG in canine ventricular myocytes. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **286**, H2342-H2351.

HUANG,B., QIN,D. & EL SHERIF,N. (2000) Early down-regulation of K<sup>+</sup> channel genes and currents in the postinfarction heart. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **11**, 1252-1261.

HUIKURI,HV., CASTELLANOS,A. & MYERBURG,MD. (2001) Sudden Death due to cardiac arrhythmias. *N Engl J Med.* **345**, 1473-1482.

ISOM,L.L. & CATTERALL,W.A. (1996) Na<sup>+</sup> channel subunits and Ig domains. *Nature* **383**, 307-308.

JAN, L.Y. & JAN, Y.N. (1990) A superfamily of ion channels. *Nature* **345**, 672.

JAN, L.Y. & JAN, Y.N. (1992) Tracing the roots of ion channels. Cell 69, 715-718.

JANUARY,C.T. & RIDDLE,J.M. (1989) Early afterdepolarizations: mechanism of induction and block. A role for L-type Ca<sup>2+</sup> current. *Circ. Res.* **64**, 977-990.

JERVELL,A. & LANGE-NIELSEN,F. (1957) Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval and sudden death. *Am. Heart J.* **54**, 59-68.

JIA,Y. & TAKIMOTO,K. (2003) GATA and FOG2 transcription factors differentially regulate the promoter for Kv4.2 K(<sup>+</sup>) channel gene in cardiac myocytes and PC12 cells. *Cardiovasc. Res.* **60**, 278-287.

JIANG,M., DUN,W. & TSENG,G.N. (1999) Mechanism for the effects of extracellular acidification on HERG-channel function. *Am. J. Physiol* **277**, H1283-H1292.

JIANG, Y., LEE, A, CHEN, J, CADENE, M., CHAIT, BT. & MACKINNON, R. (2002) The open pore conformation of potassium channels. *Nature*. **417**, 523-526.

JIANG, Y., RUTA, V, CHEN, J, LEE A & MACKINNON,R. (2003) The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K+ channel. *Nature*. **423**, 42-48.

JOHNSON, J.P., Jr., BALSER, J.R. & BENNETT, P.B. (2001) A novel extracellular calcium sensing mechanism in voltage-gated potassium ion channels. *J. Neurosci.* **21**, 4143-4153.

JONGSMA,H.J. & WILDERS,R. (2001) Channelopathies: Kir2.1 mutations jeopardize many cell functions. *Curr. Biol.* **11**, R747-R750.

JURKIEWICZ,N.K. & SANGUINETTI,M.C. (1993) Rate-dependent prolongation of cardiac action potentials by a methanesulfonanilide class III antiarrhythmic agent. Specific block of rapidly activating delayed rectifier K<sup>+</sup> current by dofetilide. *Circ. Res.* **72**, 75-83.

KAAB,S., NUSS,H.B., CHIAMVIMONVAT,N., O'ROURKE,B., PAK,P.H., KASS,D.A., MARBAN,E. & TOMASELLI,G.F. (1996) Ionic mechanism of action potential prolongation in ventricular myocytes from dogs with pacing-induced heart failure. *Circ. Res.* **78**, 262-273.

KAAB,S., DIXON,J., DUC,J., ASHEN,D., NABAUER,M., BEUCKELMANN,D.J., STEINBECK,G., MCKINNON,D. & TOMASELLI,G.F. (1998) Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a reduction in current density. *Circulation* **98**, 1383-1393.

KAMIYA,K., MITCHESON,J.S., YASUI,K., KODAMA,I. & SANGUINETTI,M.C. (2001a) Open channel block of HERG K(<sup>+</sup>) channels by vesnarinone. *Mol. Pharmacol.* **60**, 244-253.

KAMIYA,K., NISHIYAMA,A., YASUI,K., HOJO,M., SANGUINETTI,M.C. & KODAMA,I. (2001b) Short- and long-term effects of amiodarone on the two components of cardiac delayed rectifier K(<sup>+</sup>) current. *Circulation* **103**, 1317-1324.

KAMIYA,K., NIWA,R., MITCHESON,J.S. & SANGUINETTI,M.C. (2006) Molecular determinants of HERG channel block. *Mol. Pharmacol.* **69**, 1709-1716.

KAPRIELIAN,R., WICKENDEN,A.D., KASSIRI,Z., PARKER,T.G., LIU,P.P. & BACKX,P.H. (1999) Relationship between K<sup>+</sup> channel down-regulation and [Ca2+]i in rat ventricular myocytes following myocardial infarction. *J. Physiol* **517 (Pt 1)**, 229-245.

KAPRIELIAN R, KASSIRI Z, TSOPORIS J, DAWOOD F, LIU P.P, PARKER T.G & BACKX, P.H. (1996) Electrical, ionic and mechanical alterations in right ventricular myocardium isolated from rats with left coronary infarcts. *Circulation* **94** 1–159 (Abstract).

KASS,R.S. & MOSS,A.J. (2003) Long QT syndrome: novel insights into the mechanisms of cardiac arrhythmias. *J. Clin. Invest* **112**, 810-815.

KASSIRI,Z., ZOBEL,C., NGUYEN,T.T., MOLKENTIN,J.D. & BACKX,P.H. (2002) Reduction of I(to) causes hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. *Circ. Res.* **90**, 578-585.

KEATING,M., DUNN,C., ATKINSON,D., TIMOTHY,K., VINCENT,G.M. & LEPPERT,M. (1991) Consistent linkage of the long-QT syndrome to the Harvey ras-1 locus on chromosome 11. *Am. J. Hum. Genet.* **49**, 1335-1339.

KIEHN,J., KARLE,C., THOMAS,D., YAO,X., BRACHMANN,J. & KUBLER,W. (1998) HERG potassium channel activation is shifted by phorbol esters via protein kinase A-dependent pathways. *J. Biol. Chem.* **273**, 25285-25291.

KIM,B.S., KIM,Y.H., HWANG,G.S., PAK,H.N., LEE,S.C., SHIM,W.J., OH,D.J. & RO,Y.M. (2002) Action potential duration restitution kinetics in human atrial fibrillation. *J. Am. Coll. Cardiol.* **39**, 1329-1336.

KIRSCH,G.E. & DREWE,J.A. (1993) Gating-dependent mechanism of 4-aminopyridine block in two related potassium channels. *J. Gen. Physiol* **102**, 797-816.

KLEIMAN,R.B. & HOUSER,S.R. (1989) Outward currents in normal and hypertrophied feline ventricular myocytes. *Am. J. Physiol* **256**, H1450-H1461.

KLEIMAN,R.B. & HOUSER,S.R. (1990) Outward currents in hypertrophied feline ventricular myocytes. *Prog. Clin. Biol. Res.* **334**, 65-83.

KNOPP,A., THIERFELDER,S., KOOPMANN,R., BISKUP,C., BOHLE,T. & BENNDORF,K. (1999) Anoxia generates rapid and massive opening of KATP channels in ventricular cardiac myocytes. *Cardiovasc. Res.* **41**, 629-640.

KODAMA,I., KAMIYA,K. & TOYAMA,J. (1997) Cellular electropharmacology of amiodarone. *Cardiovasc. Res.* **35**, 13-29.

KODAMA,I., KAMIYA,K. & TOYAMA,J. (1999) Amiodarone: ionic and cellular mechanisms of action of the most promising class III agent. *Am. J. Cardiol.* **84**, 20R-28R.

KODAMA,M., KATO,K., HIRONO,S., OKURA,Y., HANAWA,H., YOSHIDA,T., HAYASHI,M., TACHIKAWA,H., KASHIMURA,T., WATANABE,K. & AIZAWA,Y. (2004) Linkage between mechanical and electrical alternans in patients with chronic heart failure. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **15**, 295-299.

KRAPIVINSKY,G., KRAPIVINSKY,L., WICKMAN,K. & CLAPHAM,D.E. (1995) G beta gamma binds directly to the G protein-gated K<sup>+</sup> channel, IKACh. *J. Biol. Chem.* **270**, 29059-29062.

KUCERA, J.P., ROHR, S. & RUDY, Y. (2002) Localization of sodium channels in intercalated disks modulates cardiac conduction. *Circ. Res.* **91**, 1176-1182.

KUO,H.C., CHENG,C.F., CLARK,R.B., LIN,J.J., LIN,J.L., HOSHIJIMA,M., NGUYEN-TRAN,V.T., GU,Y., IKEDA,Y., CHU,P.H., ROSS,J., GILES,W.R. & CHIEN,K.R. (2001) A defect in the Kv channel-interacting protein 2 (KChIP2) gene leads to a complete loss of I(to) and confers susceptibility to ventricular tachycardia. *Cell* **107**, 801-813.

KUPERSHMIDT,S., YANG,T., ANDERSON,M.E., WESSELS,A., NISWENDER,K.D., MAGNUSON,M.A. & RODEN,D.M. (1999) Replacement by homologous recombination of the minK gene with lacZ reveals restriction of minK expression to the mouse cardiac conduction system. *Circ. Res.* **84**, 146-152.

KUPITTAYANANT, P., TRAFFORD, A.W., DIAZ, M.E. & EISNER, D.A. (2006) A mechanism distinct from the L-type Ca current or Na-Ca exchange contributes to Ca entry in rat ventricular myocytes. *Cell Calcium* **39**, 417-423.

KURITA,T., OHE,T., MARUI,N., AIHARA,N., TAKAKI,H., KAMAKURA,S., MATSUHISA,M. & SHIMOMURA,K. (1992) Bradycardia-induced abnormal QT prolongation in patients with complete atrioventricular block with torsades de pointes. *Am. J. Cardiol.* **69**, 628-633.

KURYSHEV,Y.A., WIBLE,B.A., GUDZ,T.I., RAMIREZ,A.N. & BROWN,A.M. (2001) KChAP/Kvbeta1.2 interactions and their effects on cardiac Kv channel expression. *Am. J. Physiol Cell Physiol* **281**, C290-C299.

LABRO,A.J., RAES,A.L., BELLENS,I., OTTSCHYTSCH,N. & SNYDERS,D.J. (2003) Gating of shaker-type channels requires the flexibility of S6 caused by prolines. *J. Biol. Chem.* **278**, 50724-50731.

LAZDUNSKI,M., ALLARD,B., BERNARDI,H., DE WEILLE,J., FOSSET,M., HEURTEAUX,C. & HONORE,E. (1994) ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Ren Physiol Biochem.* **17**, 118-120.

LE BOUTER,S., DEMOLOMBE,S., CHAMBELLAN,A., BELLOCQ,C., AIMOND,F., TOUMANIANTZ,G., LANDE,G., SIAVOSHIAN,S., BARO,I., POND,A.L., NERBONNE,J.M., LEGER,J.J., ESCANDE,D. & CHARPENTIER,F. (2003) Microarray analysis reveals complex remodeling of cardiac ion channel expression with altered thyroid status: relation to cellular and integrated electrophysiology. *Circ. Res.* **92**, 234-242.

LEBECHE, D., KAPRIELIAN, R., DEL MONTE, F., TOMASELLI, G., GWATHMEY, J.K., SCHWARTZ, A. & HAJJAR, R.J. (2004) In vivo cardiac gene transfer of Kv4.3 abrogates the hypertrophic response in rats after aortic stenosis. *Circulation* **110**, 3435-3443.

LEBECHE, D., KAPRIELIAN, R. & HAJJAR, R. (2006) Modulation of action potential duration on myocyte hypertrophic pathways. *J. Mol. Cell Cardiol.* **40**, 725-735.

LEE,J.K., NISHIYAMA,A., KAMBE,F., SEO,H., TAKEUCHI,S., KAMIYA,K., KODAMA,I. & TOYAMA,J. (1999) Downregulation of voltage-gated K(<sup>+</sup>) channels in rat heart with right ventricular hypertrophy. *Am. J. Physiol* **277**, H1725-H1731.

LEE,K.S. (1992) Ibutilide, a new compound with potent class III antiarrhythmic activity, activates a slow inward Na<sup>+</sup> current in guinea pig ventricular cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **262**, 99-108.

LEES-MILLER, J.P., DUAN, Y., TENG, G.Q., THORSTAD, K. & DUFF, H.J. (2000) Novel gainof-function mechanism in K(<sup>+</sup>) channel-related long-QT syndrome: altered gating and selectivity in the HERG1 N629D mutant. *Circ. Res.* **86**, 507-513.

LEES-MILLER, J.P., GUO, J., SOMERS, J.R., ROACH, D.E., SHELDON, R.S., RANCOURT, D.E. & DUFF, H.J. (2003) Selective knockout of mouse ERG1 B potassium channel eliminates  $I_{(kr)}$  in adult ventricular myocytes and elicits episodes of abrupt sinus bradycardia. *Mol. Cell Biol.* **23**, 1856-1862.

LEFEVRE, T., CORABOEUF, E., GHAZI, A. & COULOMBE, A. (1995) Divalent cation channels activated by phenothiazines in membrane of rat ventricular myocytes. *J. Membr. Biol.* **147**, 147-158.

LEHMANN,M.H., HARDY,S., ARCHIBALD,D., QUART,B. & MACNEIL,D.J. (1996) Sex difference in risk of torsade de pointes with d,I-sotalol. *Circulation* **94**, 2535-2541.

LESAGE, F. & LAZDUNSKI, M. (2000) Molecular and functional properties of two-poredomain potassium channels. *Am. J. Physiol Renal Physiol* **279**, F793-F801.

LESS,H., SHILKRUT,M., RUBINSTEIN,I., BERKE,G. & BINAH,O. (1999) Cardiac dysfunction in murine autoimmune myocarditis. *J. Autoimmun.* **12**, 209-220.

LEUNG,A.T., IMAGAWA,T. & CAMPBELL,K.P. (1987) Structural characterization of the 1,4dihydropyridine receptor of the voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel from rabbit skeletal muscle. Evidence for two distinct high molecular weight subunits. *J. Biol. Chem.* **262**, 7943-7946.

LI-SMERIN,Y., HACKOS,D.H. & SWARTZ,K.J. (2000) A localized interaction surface for voltage-sensing domains on the pore domain of a K<sup>+</sup> channel. *Neuron* **25**, 411-423.

LI,G.R., FENG,J., YUE,L., CARRIER,M. & NATTEL,S. (1996) Evidence for two components of delayed rectifier K<sup>+</sup> current in human ventricular myocytes. *Circ. Res.* **78**, 689-696.

LI,Y., UM,S.Y. & MCDONALD,T.V. (2006) Voltage-gated potassium channels: regulation by accessory subunits. *Neuroscientist.* **12**, 199-210.

LINDE,C., LOFFLER,C. & QUAST,U. (1997) Inhibition by protein kinase C of the <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> efflux and vasorelaxation induced by P1075, a K(ATP) channel opener, in rat isolated aorta. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **356**, 425-432.

LIU,D.W., GINTANT,G.A. & ANTZELEVITCH,C. (1993) lonic bases for electrophysiological distinctions among epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes from the free wall of the canine left ventricle. *Circ. Res.* **72**, 671-687.

LIU,G.X., ZHOU,J., NATTEL,S. & KOREN,G. (2004) Single-channel recordings of a rapid delayed rectifier current in adult mouse ventricular myocytes: basic properties and effects of divalent cations. *J. Physiol* **556**, 401-413.

LIU,J., ZHANG,M., JIANG,M. & TSENG,G.N. (2002) Structural and functional role of the extracellular s5-p linker in the HERG potassium channel. *J. Gen. Physiol* **120**, 723-737.

LIU,J., ZHANG,M., JIANG,M. & TSENG,G.N. (2003) Negative charges in the transmembrane domains of the HERG K channel are involved in the activation- and deactivation-gating processes. *J. Gen. Physiol* **121**, 599-614.

LOGOTHETIS,D.E., KURACHI,Y., GALPER,J., NEER,E.J. & CLAPHAM,D.E. (1987) The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic  $K^+$  channel in heart. *Nature* **325**, 321-326.

LONDON,B., WANG,D.W., HILL,J.A. & BENNETT,P.B. (1998) The transient outward current in mice lacking the potassium channel gene Kv1.4. *J. Physiol* **509** (Pt 1), 171-182.

LONG,S.B., CAMPBELL,E.B. & MACKINNON,R. (2005a) Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K<sup>+</sup> channel. *Science* **309**, 897-903.

LONG,S.B., CAMPBELL,E.B. & MACKINNON,R. (2005b) Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science* **309**, 903-908.

LOPATIN,A.N., MAKHINA,E.N. & NICHOLS,C.G. (1994) Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature* **372**, 366-369.

LOUSSOUARN,G., CHARPENTIER,F., MOHAMMAD-PANAH,R., KUNZELMANN,K., BARO,I. & ESCANDE,D. (1997) KvLQT1 potassium channel but not IsK is the molecular target for trans-6-cyano-4-(N-ethylsulfonyl-N-methylamino)-3-hydroxy-2,2-dimethyl-chromane. *Mol. Pharmacol.* **52**, 1131-1136.

LU,Y., MAHAUT-SMITH,M.P., VARGHESE,A., HUANG,C.L., KEMP,P.R. & VANDENBERG,J.I. (2001a) Effects of premature stimulation on HERG K(<sup>+</sup>) channels. *J. Physiol* **537**, 843-851.

LU,Z., KLEM,A.M. & RAMU,Y. (2001b) Ion conduction pore is conserved among potassium channels. *Nature* **413**, 809-813.

LUO,C.H. & RUDY,Y. (1994) A dynamic model of the cardiac ventricular action potential. II. Afterdepolarizations, triggered activity, and potentiation. *Circ. Res.* **74**, 1097-1113.

MAGUIRE, C.T., WAKIMOTO, H., PATEL, V.V., HAMMER, P.E., GAUVREAU, K. & BERUL, C.I. (2003) Implications of ventricular arrhythmia vulnerability during murine electrophysiology studies. *Physiol Genomics* **15**, 84-91.

MAIER,S.K., WESTENBROEK,R.E., SCHENKMAN,K.A., FEIGL,E.O., SCHEUER,T. & CATTERALL,W.A. (2002) An unexpected role for brain-type sodium channels in coupling of cell surface depolarization to contraction in the heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 4073-4078.

MAIER,S.K., WESTENBROEK,R.E., YAMANUSHI,T.T., DOBRZYNSKI,H., BOYETT,M.R., ATTERALL,W.A. & SCHEUER,T. (2003) An unexpected requirement for brain-type sodium channels for control of heart rate in the mouse sinoatrial node. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 3507-3512.

MAIER,S.K., WESTENBROEK,R.E., MCCORMICK,K.A., CURTIS,R., SCHEUER,T. & CATTERALL,W.A. (2004) Distinct subcellular localization of different sodium channel alpha and beta subunits in single ventricular myocytes from mouse heart. *Circulation* **109**, 1421-1427.

MALHOTRA, J.D., KOOPMANN, M.C., KAZEN-GILLESPIE, K.A., FETTMAN, N., HORTSCH, M. & ISOM, L.L. (2002) Structural requirements for interaction of sodium channel beta 1 subunits with ankyrin. *J. Biol. Chem.* **277**, 26681-26688.

MALTSEV, V.A., SABBAH, H.N., HIGGINS, R.S., SILVERMAN, N., LESCH, M. & UNDROVINAS, A.I. (1998) Novel, ultraslow inactivating sodium current in human ventricular cardiomyocytes. *Circulation* **98**, 2545-2552.

MANGONI,M.E., TRABOULSIE,A., LEONI,A.L., COUETTE,B., MARGER,L., LE QUANG,K., KUPFER,E., COHEN-SOLAL,A., VILAR,J., SHIN,H.S., ESCANDE,D., CHARPENTIER,F., NARGEOT,J. & LORY,P. (2006) Bradycardia and slowing of the atrioventricular conduction in mice lacking CaV3.1/alpha1G T-type calcium channels. *Circ. Res.* **98**, 1422-1430.

MARTINEZ,M.L., HEREDIA,M.P. & DELGADO,C. (1999) Expression of T-type Ca(<sup>2+</sup>) channels in ventricular cells from hypertrophied rat hearts. *J. Mol. Cell Cardiol.* **31**, 1617-1625.

MATSUBARA,H., SUZUKI,J. & INADA,M. (1993) Shaker-related potassium channel, Kv1.4, mRNA regulation in cultured rat heart myocytes and differential expression of Kv1.4 and Kv1.5 genes in myocardial development and hypertrophy. *J. Clin. Invest* **92**, 1659-1666.

MATSUDA,H., SAIGUSA,A. & IRISAWA,H. (1987) Ohmic conductance through the inwardly rectifying K channel and blocking by internal Mg<sup>2+</sup>. *Nature* **325**, 156-159.

MAZHARI,R., NUSS,H.B., ARMOUNDAS,A.A., WINSLOW,R.L. & MARBAN,E. (2002) Ectopic expression of KCNE3 accelerates cardiac repolarization and abbreviates the QT interval. *J. Clin. Invest* **109**, 1083-1090.

MCCORMACK,K., TANOUYE,M.A., IVERSON,L.E., LIN,J.W., RAMASWAMI,M., MCCORMACK,T., CAMPANELLI,J.T., MATHEW,M.K. & RUDY,B. (1991) A role for hydrophobic residues in the voltage-dependent gating of Shaker K<sup>+</sup> channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 2931-2935.

MCCROSSAN,Z.A., LEWIS,A., PANAGHIE,G., JORDAN,P.N., CHRISTINI,D.J., LERNER,D.J. & ABBOTT,G.W. (2003) MinK-related peptide 2 modulates Kv2.1 and Kv3.1 potassium channels in mammalian brain. *J. Neurosci.* **23**, 8077-8091.

MCDONALD,T.V., YU,Z., MING,Z., PALMA,E., MEYERS,M.B., WANG,K.W., GOLDSTEIN,S.A. & FISHMAN,G.I. (1997) A minK-HERG complex regulates the cardiac potassium current  $I_{(\kappa_r)}$ . *Nature* **388**, 289-292.

MCLERIE, M. & LOPATIN, A.N. (2003) Dominant-negative suppression of  $I_{(\kappa_1)}$  in the mouse heart leads to altered cardiac excitability. *J. Mol. Cell Cardiol.* **35**, 367-378.

McPATE,MJ, DUNCAN RS, MILNES,JT, WITCHELL,HJ & HANCOX,JC.(2005) The N588K-HERG K<sup>+</sup> channel mutation in the 'short QT syndrome': mechanism of gain-in-function determined at 37 degrees C. *Biochem Biophys Res Commun.* **334**:441-449.

MCPHEE, J.C., RAGSDALE, D.S., SCHEUER, T. & CATTERALL, W.A. (1995) A critical role for transmembrane segment IVS6 of the sodium channel alpha subunit in fast inactivation. *J. Biol. Chem.* **270**, 12025-12034.

MCPHEE, J.C., RAGSDALE, D.S., SCHEUER, T. & CATTERALL, W.A. (1998) A critical role for the S4-S5 intracellular loop in domain IV of the sodium channel alpha-subunit in fast inactivation. *J. Biol. Chem.* **273**, 1121-1129.

MEROT, J., CHARPENTIER, F., POIRIER, J.M., COUTRIS, G. & WEISSENBURGER, J. (1999) Effects of chronic treatment by amiodarone on transmural heterogeneity of canine ventricular repolarization in vivo: interactions with acute sotalol. *Cardiovasc. Res.* **44**, 303-314.

MILES EW. (1977) Modification of histidyl residues in proteins by diethylpyrocarbonate. *Meth Enzymology* **47**, 431–443.

MILNES, J.T., DEMPSEY, C.E., RIDLEY, J.M., CROCIANI, O., ARCANGELI, A., HANCOX, J.C. & WITCHEL, H.J. (2003) Preferential closed channel blockade of HERG potassium currents by chemically synthesised BeKm-1 scorpion toxin. *FEBS Lett.* **547**, 20-26.

MITCHELL,G.F., JERON,A. & KOREN,G. (1998) Measurement of heart rate and Q-T interval in the conscious mouse. *Am. J. Physiol* **274**, H747-H751.

MITCHESON, J.S., CHEN, J., LIN, M., CULBERSON, C. & SANGUINETTI, M.C. (2000a) A structural basis for drug-induced long QT syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 12329-12333.

MITCHESON, J.S., CHEN, J. & SANGUINETTI, M.C. (2000b) Trapping of a methanesulfonanilide by closure of the HERG potassium channel activation gate. *J. Gen. Physiol* **115**, 229-240.

MOHLER, P.J., SCHOTT, J.J., GRAMOLINI, A.O., DILLY, K.W., GUATIMOSIM, S., DUBELL, W.H., SONG, L.S., HAUROGNE, K., KYNDT, F., ALI, M.E., ROGERS, T.B., LEDERER, W.J., ESCANDE, D., LE MAREC, H. & BENNETT, V. (2003) Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature* **421**, 634-639.

MOLKENTIN, J.D., LU, J.R., ANTOS, C.L., MARKHAM, B., RICHARDSON, J., ROBBINS, J., GRANT, S.R. & OLSON, E.N. (1998) A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* **93**, 215-228.

MONTEIL,A., CHEMIN,J., BOURINET,E., MENNESSIER,G., LORY,P. & NARGEOT,J. (2000) Molecular and functional properties of the human alpha(1G) subunit that forms T-type calcium channels. *J. Biol. Chem.* **275**, 6090-6100.

MOORE,E.N., PRESTON,J.B. & MOE,G.K. (1965) Durations of transmembrane action potentials and functional refractory periods of canine false tendon and ventricular myocardium: comparisons in single fibers. *Circ. Res.* **17**, 259-273.

MORAIS CABRAL, J.H., LEE, A., COHEN, S.L., CHAIT, B.T., LI, M. & MACKINNON, R. (1998) Crystal structure and functional analysis of the HERG potassium channel N terminus: a eukaryotic PAS domain. *Cell* **95**, 649-655.

MORENO,H., RUDY,B. & LLINAS,R. (1997) beta subunits influence the biophysical and pharmacological differences between P- and Q-type calcium currents expressed in a mammalian cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 14042-14047.

MORGAN, J.P., ERNY, R.E., ALLEN, P.D., GROSSMAN, W. & GWATHMEY, J.K. (1990) Abnormal intracellular calcium handling, a major cause of systolic and diastolic dysfunction in ventricular myocardium from patients with heart failure. *Circulation* **81**, III21-III32.

MULLINS, F.M., STEPANOVIC, S.Z., DESAI, R.R., GEORGE, A.L., Jr. & BALSER, J.R. (2002) Extracellular sodium interacts with the HERG channel at an outer pore site. *J. Gen. Physiol* **120**, 517-537.

MULLINS, F.M., STEPANOVIC, S.Z., GILLANI, N.B., GEORGE, A.L., Jr. & BALSER, J.R. (2004) Functional interaction between extracellular sodium, potassium and inactivation gating in HERG channels. *J. Physiol* **558**, 729-744.

MUNIZ,Z.M., PARCEJ,D.N. & DOLLY,J.O. (1992) Characterization of monoclonal antibodies against voltage-dependent K+ channels raised using alpha-dendrotoxin acceptors purified from bovine brain. *Biochemistry* **31**, 12297-12303.

MURAI,T., KAKIZUKA,A., TAKUMI,T., OHKUBO,H. & NAKANISHI,S. (1989) Molecular cloning and sequence analysis of human genomic DNA encoding a novel membrane protein which exhibits a slowly activating potassium channel activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **161**, 176-181.

NABAUER,M., BEUCKELMANN,D.J., UBERFUHR,P. & STEINBECK,G. (1996) Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle. *Circulation* **93**, 168-177.

NABAUER,M. & KAAB,S. (1998) Potassium channel down-regulation in heart failure. *Cardiovasc. Res.* **37**, 324-334.

NAGASHIMA,M., ISHII,K., TOHSE,N., TAIRA,N. & YABU,H. (1996) Unitary current through the inward rectifier  $K^+$  channel cloned from rabbit heart comparison with the native  $K^+$  channel. *J. Mol. Cell Cardiol.* **28**, 957-965.

NAKAHIRA,K., SHI,G., RHODES,K.J. & TRIMMER,J.S. (1996) Selective interaction of voltage-gated K<sup>+</sup> channel beta-subunits with alpha-subunits. *J. Biol. Chem.* **271**, 7084-7089.

NATTEL,S. & QUANTZ,M.A. (1988) Pharmacological response of quinidine induced early afterdepolarisations in canine cardiac Purkinje fibres: insights into underlying ionic mechanisms. *Cardiovasc. Res.* **22**, 808-817.

NATTEL,S. (2003) Drugs to promote sinus rhythm reversion and maintenance in atrial fibrillation why amiodarone is better. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **17**, 5-6.

NEHER,E. & SAKMANN,B. (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* **260**, 799-802.

NERBONNE, J.M., NICHOLS, C.G., SCHWARZ, T.L. & ESCANDE, D. (2001) Genetic manipulation of cardiac  $K(^+)$  channel function in mice: what have we learned, and where do we go from here? *Circ. Res.* **89**, 944-956.

NERBONNE, J.M. (2004) Studying cardiac arrhythmias in the mouse--a reasonable model for probing mechanisms? *Trends Cardiovasc. Med.* **14**, 83-93.

NERBONNE, J.M. & KASS, R.S. (2005) Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev.* **85**, 1205-1253.

NETZER,R., BISCHOFF,U. & EBNETH,A. (2003) HTS techniques to investigate the potential effects of compounds on cardiac ion channels at early-stages of drug discovery. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **6**, 462-469.

NEWMAN,C.M., PRICE,A., DAVIES,D.W., GRAY,T.A. & WEETMAN,A.P. (1998) Amiodarone and the thyroid: a practical guide to the management of thyroid dysfunction induced by amiodarone therapy. *Heart* **79**, 121-127.

NICHOLS,C.G., MAKHINA,E.N., PEARSON,W.L., SHA,Q. & LOPATIN,A.N. (1996) Inward rectification and implications for cardiac excitability. *Circ. Res.* **78**, 1-7.

NIGGLI,E. & LEDERER,W.J. (1991) Molecular operations of the sodium-calcium exchanger revealed by conformation currents. *Nature* **349**, 621-624.

NOBLE, D. (1962) A modification of the Hodgkin-Huxley equations applicable to Purkinje fibre action and pace-maker potentials. *J. Physiol* **160**, 317-352.

NOBLE, D. & TSIEN, R.W. (1969) Outward membrane currents activated in the plateau range of potentials in cardiac Purkinje fibres. *J. Physiol* **200**, 205-231.

NOBLE,D. & NOBLE,P.J. (2006) Late sodium current in the pathophysiology of cardiovascular disease: consequences of sodium-calcium overload. *Heart* **92 Suppl 4**, iv1-iv5.

NODA,M., SHIMIZU,S., TANABE,T., TAKAI,T., KAYANO,T., IKEDA,T., TAKAHASHI,H., NAKAYAMA,H., KANAOKA,Y., MINAMINO,N. & . (1984) Primary structure of Electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* **312**, 121-127.

NOLASCO, J.B. & DAHLEN, R.W. (1968) A graphic method for the study of alternation in cardiac action potentials. *J. Appl. Physiol* **25**, 191-196.

NOMA,A. (1983) ATP-regulated K<sup>+</sup> channels in cardiac muscle. *Nature* **305**, 147-148.

NUSS,H.B. & HOUSER,S.R. (1993) T-type Ca<sup>2+</sup> current is expressed in hypertrophied adult feline left ventricular myocytes. *Circ. Res.* **73**, 777-782.

NUSS,H.B., MARBAN,E. & JOHNS,D.C. (1999) Overexpression of a human potassium channel suppresses cardiac hyperexcitability in rabbit ventricular myocytes. *J. Clin. Invest* **103**, 889-896.

OHYAMA,H., KAJITA,H., OMORI,K., TAKUMI,T., HIRAMOTO,N., IWASAKA,T. & MATSUDA,H. (2001) Inhibition of cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> currents by an antisense oligodeoxynucleotide against IsK (minK) and over-expression of IsK mutant D77N in neonatal mouse hearts. *Pflugers Arch.* **442**, 329-335.

OUDIT,G.Y., KASSIRI,Z., SAH,R., RAMIREZ,R.J., ZOBEL,C. & BACKX,P.H. (2001) The molecular physiology of the cardiac transient outward potassium current (I(to)) in normal and diseased myocardium. *J. Mol. Cell Cardiol.* **33**, 851-872.

PACIORETTY, L.M., COOPER, B.J. & GILMOUR, R.F., Jr. (1994) Reduction of the transient outward potassium current in canine X-linked muscular dystrophy. *Circulation* **90**, 1350-1356.

PANYI,G., SHENG,Z. & DEUTSCH,C. (1995) C-type inactivation of a voltage-gated K<sup>+</sup> channel occurs by a cooperative mechanism. *Biophys. J.* **69**, 896-903.

PARK,J.Y., LEE,D., MAENG,J.U., KOH,D.S. & KIM,K. (2002) Hyperpolarization, but not depolarization, increases intracellular Ca(<sup>2+</sup>) level in cultured chick myoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290**, 1176-1182.

PASTORE, J.M., GIROUARD, S.D., LAURITA, K.R., AKAR, F.G. & ROSENBAUM, D.S. (1999) Mechanism linking T-wave alternans to the genesis of cardiac fibrillation. *Circulation* **99**, 1385-1394.

PATEL,S.P., CAMPBELL,D.L., MORALES,M.J. & STRAUSS,H.C. (2002) Heterogeneous expression of KChIP2 isoforms in the ferret heart. *J. Physiol* **539**, 649-656.

PATLAK, J.B.; ORTIZ, M. (1985) Slow currents through single sodium channels of the adult rat heart. *J.Gen.Physiol* **86**, 89-104.

PATTERSON, E., WALDEN, K.M., KHAZAELI, M.B., MONTGOMERY, D.G. & LUCCHESI, B.R. (1986) Cardiac electrophysiologic effects of acute and chronic amiodarone administration in the isolated perfused rabbit heart: altered thyroid hormone metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **239**, 179-184.

PATTON,D.E., WEST,J.W., CATTERALL,W.A. & GOLDIN,A.L. (1992) Amino acid residues required for fast Na(<sup>+</sup>)-channel inactivation: charge neutralizations and deletions in the III-IV linker. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 10905-10909.

PAUL,A.A., WITCHEL,H.J. & HANCOX,J.C. (2001) Inhibition of HERG potassium channel current by the class 1a antiarrhythmic agent disopyramide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**, 1243-1250.

PAULUSSEN,A., RAES,A., MATTHIJS,G., SNYDERS,D.J., COHEN,N. & AERSSENS,J. (2002) A novel mutation (T65P) in the PAS domain of the human potassium channel HERG results in the long QT syndrome by trafficking deficiency. *J. Biol. Chem.* **277**, 48610-48616.

PEREON,Y., DEMOLOMBE,S., BARO,I., DROUIN,E., CHARPENTIER,F. & ESCANDE,D. (2000) Differential expression of KvLQT1 isoforms across the human ventricular wall. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **278**, H1908-H1915.

PEREZ-REYES,E., CASTELLANO,A., KIM,H.S., BERTRAND,P., BAGGSTROM,E., LACERDA,A.E., WEI,X.Y. & BIRNBAUMER,L. (1992) Cloning and expression of a cardiac/brain beta subunit of the L-type calcium channel. *J. Biol. Chem.* **267**, 1792-1797.

PEREZ-REYES, E. & SCHNEIDER, T. (1994) Calcium channel: structure function and classification. *Drug Dev Res.* **33**, 295-318.

PERRIER,E., PERRIER,R., RICHARD,S. & BENITAH,J.P. (2004) Ca<sup>2+</sup> controls functional expression of the cardiac K<sup>+</sup> transient outward current via the calcineurin pathway. *J. Biol. Chem.* **279**, 40634-40639.

PERRY,M., DE GROOT,M.J., HELLIWELL,R., LEISHMAN,D., TRISTANI-FIROUZI,M., SANGUINETTI,M.C. & MITCHESON,J. (2004) Structural determinants of HERG channel block by clofilium and ibutilide. *Mol. Pharmacol.* **66**, 240-249.

PERRY,M., STANSFELD,P.J., LEANEY,J., WOOD,C., DE GROOT,M.J., LEISHMAN,D., SUTCLIFFE,M.J. & MITCHESON,J.S. (2006) Drug binding interactions in the inner cavity of HERG channels: molecular insights from structure-activity relationships of clofilium and ibutilide analogs. *Mol. Pharmacol.* **69**, 509-519.

PETERSEN,K.R. & NERBONNE,J.M. (1999) Expression environment determines K+ current properties: Kv1 and Kv4 alpha-subunit-induced K<sup>+</sup> currents in mammalian cell lines and cardiac myocytes. *Pflugers Arch.* **437**, 381-392.

PETERSON,B.Z., DEMARIA,C.D., ADELMAN,J.P. & YUE,D.T. (1999) Calmodulin is the Ca<sup>2+</sup> sensor for Ca<sup>2+</sup> -dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron* **22**, 549-558.

PETRASHEVSKAYA,N.N., BODI,I., RUBIO,M., MOLKENTIN,J.D. & SCHWARTZ,A. (2002) Cardiac function and electrical remodeling of the calcineurin-overexpressed transgenic mouse. *Cardiovasc. Res.* **54**, 117-132.

PINET,C., ANTOINE,S., FILOTEO,A.G., PENNISTON,J.T. & COULOMBE,A. (2002) Reincorporated plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase can mediate B-Type Ca<sup>2+</sup> channels observed in native membrane of human red blood cells. *J. Membr. Biol.* **187**, 185-201.

PINNEY,S.P., KOLLER,B.S., FRANZ,M.R. & WOOSLEY,R.L. (1995) Terfenadine increases the QT interval in isolated guinea pig heart. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **25**, 30-34.

PINTO, J.M. & BOYDEN, P.A. (1999) Electrical remodeling in ischemia and infarction. *Cardiovasc. Res.* **42**, 284-297.

PIPER,D.R., VARGHESE,A., SANGUINETTI,M.C. & TRISTANI-FIROUZI,M. (2003) Gating currents associated with intramembrane charge displacement in HERG potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 10534-10539.

PLASTER,N.M., TAWIL,R., TRISTANI-FIROUZI,M., CANUN,S., BENDAHHOU,S., TSUNODA,A., DONALDSON,M.R., IANNACCONE,S.T., BRUNT,E., BAROHN,R., CLARK,J., DEYMEER,F., GEORGE,A.L., Jr., FISH,F.A., HAHN,A., NITU,A., OZDEMIR,C., SERDAROGLU,P., SUBRAMONY,S.H., WOLFE,G., FU,Y.H. & PTACEK,L.J. (2001) Mutations in Kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen's syndrome. *Cell* **105**, 511-519.

POND,A.L. & NERBONNE,J.M. (2001) ERG proteins and functional cardiac  $I(_{\kappa r})$  channels in rat, mouse, and human heart. *Trends Cardiovasc. Med.* **11**, 286-294.

PONZIO,G., JACQUES,Y., FRELIN,C., CHICHEPORTICHE,R. & LAZDUNSKI,M. (1980) An in vitro system to study the action potential sodium channel. *FEBS Lett.* **121**, 265-268.

POTET,F., BOUYSSOU,T., ESCANDE,D. & BARO,I. (2001) Gastrointestinal prokinetic drugs have different affinity for the human cardiac human ether-a-gogo K(<sup>+</sup>) channel. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **299**, 1007-1012.

POUNTNEY,D.J., SUN,Z.Q., PORTER,L.M., NITABACH,M.N., NAKAMURA,T.Y., HOLMES,D., ROSNER,E., KANEKO,M., MANARIS,T., HOLMES,T.C. & COETZEE,W.A. (2001) Is the molecular composition of K(ATP) channels more complex than originally thought? *J. Mol. Cell Cardiol.* **33**, 1541-1546.

POURRIER, M., ZICHA, S., EHRLICH, J., HAN, W. & NATTEL, S. (2003) Canine ventricular KCNE2 expression resides predominantly in Purkinje fibers. *Circ. Res.* **93**, 189-191.

PRAGNELL,M., DE WAARD,M., MORI,Y., TANABE,T., SNUTCH,T.P. & CAMPBELL,K.P. (1994) Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the alpha 1-subunit. *Nature* **368**, 67-70.

PRIORI,S.G. (1998) Exploring the hidden danger of noncardiac drugs. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **9**, 1114-1116.

PRIORI,S.G., PANDIT,S.V., RIVOLTA,I., BERENFELD,O., RONCHETTI,E., DHAMOON,A., NAPOLITANO,C., ANUMONWO,J., DI BARLETTA,M.R., GUDAPAKKAM,S., BOSI,G., STRAMBA-BADIALE,M. & JALIFE,J. (2005) A novel form of short QT syndrome (SQT3) is caused by a mutation in the KCNJ2 gene. *Circ. Res.* **96**, 800-807.

QU,Y., ROGERS,J., TANADA,T., SCHEUER,T. & CATTERALL,W.A. (1995) Molecular determinants of drug access to the receptor site for antiarrhythmic drugs in the cardiac Na<sup>+</sup> channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 11839-11843.

RAMPE,D., MURAWSKY,M.K., GRAU,J. & LEWIS,E.W. (1998) The antipsychotic agent sertindole is a high affinity antagonist of the human cardiac potassium channel HERG. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **286**, 788-793.

REDFERN,W.S., CARLSSON,L., DAVIS,A.S., LYNCH,W.G., MACKENZIE,I., PALETHORPE,S., SIEGL,P.K., STRANG,I., SULLIVAN,A.T., WALLIS,R., CAMM,A.J. & HAMMOND,T.G. (2003) Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development. *Cardiovasc. Res.* **58**, 32-45.

REID,J.A. & HECHT,H.H. (1967) Barium-induced automaticity in right ventricular muscle in the dog. *Circ. Res.* **21**, 849-856.

REZAZADEH,S., HESKETH,J.C. & FEDIDA,D. (2004) Rb<sup>+</sup> flux through hERG channels affects the potency of channel blocking drugs: correlation with data obtained using a high-throughput Rb<sup>+</sup> efflux assay. *J. Biomol. Screen.* **9**, 588-597.

RIDLEY, J.M., DOOLEY, P.C., MILNES, J.T., WITCHEL, H.J. & HANCOX, J.C. (2004) Lidoflazine is a high affinity blocker of the HERG K(<sup>+</sup>)channel. *J. Mol. Cell Cardiol.* **36**, 701-705.

RIDLEY, J.M., MILNES, J.T., DUNCAN, R.S., MCPATE, M.J., JAMES, A.F., WITCHEL, H.J. & HANCOX, J.C. (2006) Inhibition of the HERG K<sup>+</sup> channel by the antifungal drug ketoconazole depends on channel gating and involves the S6 residue F656. *FEBS Lett.* **580**, 1999-2005.

RODEN,D.M., WOOSLEY,R.L. & PRIMM,R.K. (1986) Incidence and clinical features of the quinidine-associated long QT syndrome: implications for patient care. *Am. Heart J.* **111**, 1088-1093.

RODEN,D.M., LAZZARA,R., ROSEN,M., SCHWARTZ,P.J., TOWBIN,J. & VINCENT,G.M. (1996) Multiple mechanisms in the long-QT syndrome. Current knowledge, gaps, and future directions. The SADS Foundation Task Force on LQTS. *Circulation* **94**, 1996-2012.

ROMANO,C., GEMME,G. & PONGIGLIONE,R. (1963) Rare cardiac arrhythmias of the pediatric age. I. Repetitive paroxysmal tachycardia.]. *Minerva Pediatr.* **15**, 1155-1164.
ROMEY,G., ATTALI,B., CHOUABE,C., ABITBOL,I., GUILLEMARE,E., BARHANIN,J. & LAZDUNSKI,M. (1997) Molecular mechanism and functional significance of the MinK control of the KvLQT1 channel activity. *J. Biol. Chem.* **272**, 16713-16716.

ROSATI,B., PAN,Z., LYPEN,S., WANG,H.S., COHEN,I., DIXON,J.E. & MCKINNON,D. (2001) Regulation of KChIP2 potassium channel beta subunit gene expression underlies the gradient of transient outward current in canine and human ventricle. *J. Physiol* **533**, 119-125.

ROSATI,B., GRAU,F., RODRIGUEZ,S., LI,H., NERBONNE,J.M. & MCKINNON,D. (2003) Concordant expression of KChIP2 mRNA, protein and transient outward current throughout the canine ventricle. *J. Physiol* **548**, 815-822.

ROSSOW,C.F., MINAMI,E., CHASE,E.G., MURRY,C.E. & SANTANA,L.F. (2004) NFATc3induced reductions in voltage-gated K<sup>+</sup> currents after myocardial infarction. *Circ. Res.* **94**, 1340-1350.

ROSSOW,C.F., DILLY,K.W. & SANTANA,L.F. (2006) Differential calcineurin/NFATc3 activity contributes to the Ito transmural gradient in the mouse heart. *Circ. Res.* **98**, 1306-1313.

ROYER,A., DEMOLOMBE,S., EL HARCHI,A., LE QUANG,K., PIRON,J., TOUMANIANTZ,G., MAZURAIS,D., BELLOCQ,C., LANDE,G., TERRENOIRE,C., MOTOIKE,H.K., CHEVALLIER,J.C., LOUSSOUARN,G., CLANCY,C.E., ESCANDE,D. & CHARPENTIER,F. (2005) Expression of human ERG K<sup>+</sup> channels in the mouse heart exerts anti-arrhythmic activity. *Cardiovasc. Res.* **65**, 128-137.

ROZANSKI,G.J., XU,Z., WHITNEY,R.T., MURAKAMI,H. & ZUCKER,I.H. (1997) Electrophysiology of rabbit ventricular myocytes following sustained rapid ventricular pacing. *J. Mol. Cell Cardiol.* **29**, 721-732.

RYDER,K.O., BRYANT,S.M. & HART,G. (1993) Membrane current changes in left ventricular myocytes isolated from guinea pigs after abdominal aortic coarctation. *Cardiovasc. Res.* **27**, 1278-1287.

SAH,R., RAMIREZ,R.J., KAPRIELIAN,R. & BACKX,P.H. (2001) Alterations in action potential profile enhance excitation-contraction coupling in rat cardiac myocytes. *J. Physiol* **533**, 201-214.

SAH,R., OUDIT,G.Y., NGUYEN,T.T., LIM,H.W., WICKENDEN,A.D., WILSON,G.J., MOLKENTIN,J.D. & BACKX,P.H. (2002) Inhibition of calcineurin and sarcolemmal Ca<sup>2+</sup> influx protects cardiac morphology and ventricular function in K(v)4.2N transgenic mice. *Circulation* **105**, 1850-1856.

SAKMANN,B.F., SPINDLER,A.J., BRYANT,S.M., LINZ,K.W. & NOBLE,D. (2000) Distribution of a persistent sodium current across the ventricular wall in guinea pigs. *Circ. Res.* **87**, 910-914.

SALATA,J.J. & WASSERSTROM,J.A. (1988) Effects of quinidine on action potentials and ionic currents in isolated canine ventricular myocytes. *Circ. Res.* **62**, 324-337.

SALATA,J.J., JURKIEWICZ,N.K., WALLACE,A.A., STUPIENSKI,R.F., III, GUINOSSO,P.J., Jr. & LYNCH,J.J., Jr. (1995) Cardiac electrophysiological actions of the histamine H1-receptor antagonists astemizole and terfenadine compared with chlorpheniramine and pyrilamine. *Circ. Res.* **76**, 110-119.

SALINAS,M., DE WEILLE,J., GUILLEMARE,E., LAZDUNSKI,M. & HUGNOT,J.P. (1997) Modes of regulation of shab  $K^+$  channel activity by the Kv8.1 subunit. *J. Biol. Chem.* **272**, 8774-8780.

SANCHEZ-CHAPULA,J.A., NAVARRO-POLANCO,R.A., CULBERSON,C., CHEN,J. & SANGUINETTI,M.C. (2002) Molecular determinants of voltage-dependent human ether-a-go-go related gene (HERG) K<sup>+</sup> channel block. *J. Biol. Chem.* **277**, 23587-23595.

SANCHEZ-CHAPULA, J.A., FERRER, T., NAVARRO-POLANCO, R.A. & SANGUINETTI, M.C. (2003) Voltage-dependent profile of human ether-a-go-go-related gene channel block is influenced by a single residue in the S6 transmembrane domain. *Mol. Pharmacol.* **63**, 1051-1058.

SANGUINETTI,M.C. & JURKIEWICZ,N.K. (1990) Two components of cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J. Gen. Physiol* **96**, 195-215.

SANGUINETTI,M.C. & JURKIEWICZ,N.K. (1991) Delayed rectifier outward K<sup>+</sup> current is composed of two currents in guinea pig atrial cells. *Am. J. Physiol* **260**, H393-H399.

SANGUINETTI,M.C., JIANG,C., CURRAN,M.E. & KEATING,M.T. (1995) A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the  $I_{Kr}$  potassium channel. *Cell* **81**, 299-307.

SANGUINETTI,M.C., CURRAN,M.E., ZOU,A., SHEN,J., SPECTOR,P.S., ATKINSON,D.L. & KEATING,M.T. (1996) Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac  $I_{(Ks)}$  potassium channel. *Nature* **384**, 80-83.

SANGUINETTI,M.C., JOHNSON,J.H., HAMMERLAND,L.G., KELBAUGH,P.R., VOLKMANN,R.A., SACCOMANO,N.A. & MUELLER,A.L. (1997) Heteropodatoxins: peptides isolated from spider venom that block Kv4.2 potassium channels. *Mol. Pharmacol.* **51**, 491-498.

SANGUINETTI,M.C. & XU,Q.P. (1999) Mutations of the S4-S5 linker alter activation properties of HERG potassium channels expressed in Xenopus oocytes. *J. Physiol* **514 (Pt 3),** 667-675.

SANGUINETTI,M.C. (2002) Reduced transient outward K<sup>+</sup> current and cardiac hypertrophy: causal relationship or epiphenomenon? *Circ. Res.* **90**, 497-499.

SANGUINETTI,M.C. & MITCHESON,J.S. (2005) Predicting drug-hERG channel interactions that cause acquired long QT syndrome. *Trends Pharmacol. Sci.* **26**, 119-124.

SANGUINETTI, M.C. & TRISTANI-FIROUZI, M. (2006) hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature* **440**, 463-469.

SANTANA,L.F., GOMEZ,A.M. & LEDERER,W.J. (1998) Ca<sup>2+</sup> flux through promiscuous cardiac Na<sup>+</sup> channels: slip-mode conductance. *Science* **279**, 1027-1033.

SATOH,H. (1998) Inhibition by taurine of the inwardly rectifying K<sup>+</sup> current in guinea pig ventricular cardiomyocytes. *Eur. J. Pharmacol.* **346**, 309-313.

SATOH,H. & SPERELAKIS,N. (1998) Review of some actions of taurine on ion channels of cardiac muscle cells and others. *Gen. Pharmacol.* **30**, 451-463.

SCHONHERR,R. & HEINEMANN,S.H. (1996) Molecular determinants for activation and inactivation of HERG, a human inward rectifier potassium channel. *J. Physiol* **493** (Pt 3), 635-642.

SCHOTT, J.J., CHARPENTIER, F., PELTIER, S., FOLEY, P., DROUIN, E., BOUHOUR, J.B., DONNELLY, P., VERGNAUD, G., BACHNER, L., MOISAN, J.P. & . (1995) Mapping of a gene for long QT syndrome to chromosome 4q25-27. *Am. J. Hum. Genet.* **57**, 1114-1122.

SCHROEDER,B.C., WALDEGGER,S., FEHR,S., BLEICH,M., WARTH,R., GREGER,R. & JENTSCH,T.J. (2000) A constitutively open potassium channel formed by KCNQ1 and KCNE3. *Nature* **403**, 196-199.

SCHROEDER,K., NEAGLE,B., TREZISE,D.J. & WORLEY,J. (2003) lonworks HT: a new high-throughput electrophysiology measurement platform. *J. Biomol. Screen.* **8**, 50-64.

SCHWARTZ.P.J.. PRIORI,S.G., SPAZZOLINI,C., MOSS,A.J., VINCENT, G.M., NAPOLITANO,C., DENJOY,I., GUICHENEY,P., BREITHARDT,G., KEATING, M.T., TOWBIN, J.A., BEGGS, A.H., BRINK, P., WILDE,A.A., TOIVONEN,L., ZAREBA,W., TIMOTHY,K.W., ROBINSON, J.L., CORFIELD,V., WATTANASIRICHAIGOON,D., CORBETT, C., HAVERKAMP, W., SCHULZE-BAHR, E., LEHMANN, M.H., SCHWARTZ, K., COUMEL, P. & BLOISE, R. (2001) Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation* **103**, 89-95.

SCOTT,V.E., RETTIG,J., PARCEJ,D.N., KEEN,J.N., FINDLAY,J.B., PONGS,O. & DOLLY,J.O. (1994) Primary structure of a beta subunit of alpha-dendrotoxin-sensitive K<sup>+</sup> channels from bovine brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 1637-1641.

SELLIN,L.C. & MCARDLE,J.J. (1994) Multiple effects of 2,3-butanedione monoxime. *Pharmacol. Toxicol.* **74**, 305-313.

SELZER,A. & WRAY,H.W. (1964) Quinidine syncope. paroxysmal ventricular fibrillation occuring during treatement of chronic atrial arrhythmias. *Circulation* **30**, 17-26.

SEOH,S.A., SIGG,D., PAPAZIAN,D.M. & BEZANILLA,F. (1996) Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K<sup>+</sup> channel. *Neuron* **16**, 1159-1167.

SEWING,S., ROEPER,J. & PONGS,O. (1996) Kv beta 1 subunit binding specific for shaker-related potassium channel alpha subunits. *Neuron* **16**, 455-463.

SHARP,N.A., NEEL,D.S. & PARSONS,R.L. (1985) Influence of thyroid hormone levels on the electrical and mechanical properties of rabbit papillary muscle. *J. Mol. Cell Cardiol.* **17**, 119-132.

SHI,G., NAKAHIRA,K., HAMMOND,S., RHODES,K.J., SCHECHTER,L.E. & TRIMMER,J.S. (1996) Beta subunits promote K<sup>+</sup> channel surface expression through effects early in biosynthesis. *Neuron* **16**, 843-852.

SHOLLER, G.F. & WALSH, E.P. (1989) Congenital complete heart block in patients without anatomic cardiac defects. *Am. Heart J.* **118**, 1193-1198.

SICOURI,S., FISH,J. & ANTZELEVITCH,C. (1994) Distribution of M cells in the canine ventricle. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **5**, 824-837.

SIGG,D., STEFANI,E. & BEZANILLA,F. (1994) Gating current noise produced by elementary transitions in Shaker potassium channels. *Science* **264**, 578-582.

SIGG,D. & BEZANILLA,F. (1997) Total charge movement per channel. The relation between gating charge displacement and the voltage sensitivity of activation. *J. Gen. Physiol* **109**, 27-39.

SIGWORTH, F.J. (1994) Voltage gating of ion channels. Q. Rev. Biophys. 27, 1-40.

SINGER, D., BIEL, M., LOTAN, I., FLOCKERZI, V., HOFMANN, F. & DASCAL, N. (1991) The roles of the subunits in the function of the calcium channel. *Science* **253**, 1553-1557.

SIPIDO,K.R., CALLEWAERT,G. & CARMELIET,E. (1995) Inhibition and rapid recovery of Ca<sup>2+</sup> current during Ca<sup>2+</sup> release from sarcoplasmic reticulum in guinea pig ventricular myocytes. *Circ. Res.* **76**, 102-109.

SIPIDO,K.R., VOLDERS,P.G., DE GROOT,S.H., VERDONCK,F., VAN DE,W.F., WELLENS,H.J. & VOS,M.A. (2000) Enhanced Ca(<sup>2+</sup>) release and Na/Ca exchange activity in hypertrophied canine ventricular myocytes: potential link between contractile adaptation and arrhythmogenesis. *Circulation* **102**, 2137-2144.

SMITH,P.L., BAUKROWITZ,T. & YELLEN,G. (1996) The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature* **379**, 833-836.

SMITH,P.L. & YELLEN,G. (2002) Fast and slow voltage sensor movements in HERG potassium channels. *J. Gen. Physiol* **119**, 275-293.

SNYDERS, D.J., TAMKUN, M.M. & BENNETT, P.B. (1993) A rapidly activating and slowly inactivating potassium channel cloned from human heart. Functional analysis after stable mammalian cell culture expression. *J. Gen. Physiol* **101**, 513-543.

SOROTA,S., ZHANG,X.S., MARGULIS,M., TUCKER,K. & PRIESTLEY,T. (2005) Characterization of a hERG screen using the IonWorks HT: comparison to a hERG rubidium efflux screen. *Assay. Drug Dev. Technol.* **3**, 47-57.

SPEAR, J.F. & MOORE, E.N. (1974) Supernormal excitability and conduction in the His-Purkinje system of the dog. *Circ. Res.* **35**, 782-792.

SPECTOR, P.S., CURRAN, M.E., ZOU, A., KEATING, M.T. & SANGUINETTI, M.C. (1996a) Fast inactivation causes rectification of the I<sub>kr</sub> channel. *J. Gen. Physiol* **107**, 611-619.

SPECTOR,P.S., CURRAN,M.E., KEATING,M.T. & SANGUINETTI,M.C. (1996b) Class III antiarrhythmic drugs block HERG, a human cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> channel. Open-channel block by methanesulfonanilides. *Circ. Res.* **78**, 499-503.

SPINDLER,A.J., NOBLE,S.J., NOBLE,D. & LEGUENNEC,J.Y. (1998) The effects of sodium substitution on currents determining the resting potential in guinea-pig ventricular cells. *Exp. Physiol* **83**, 121-136.

SPLAWSKI,I., TRISTANI-FIROUZI,M., LEHMANN,M.H., SANGUINETTI,M.C. & KEATING,M.T. (1997) Mutations in the hminK gene cause long QT syndrome and suppress  $I_{Ks}$  function. *Nat. Genet.* **17**, 338-340.

SPLAWSKI,I., TIMOTHY,K.W., SHARPE,L.M., DECHER,N., KUMAR,P., BLOISE,R., NAPOLITANO,C., SCHWARTZ,P.J., JOSEPH,R.M., CONDOURIS,K., TAGER-FLUSBERG,H., PRIORI,S.G., SANGUINETTI,M.C. & KEATING,M.T. (2004) Ca(V)1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell* **119**, 19-31.

STARACE, D.M., STEFANI, E. & BEZANILLA, F. (1997) Voltage-dependent proton transport by the voltage sensor of the Shaker K<sup>+</sup> channel. *Neuron* **19**, 1319-1327.

STARK,G., STARK,U., WINDISCH,M., VICENZI,M., EGGENREICH,U., NAGL,S., KRAL,K., PILGER,E. & TRITTHART,H.A. (1991) Comparison of acute electrophysiological effects of amiodarone and its metabolite desethylamiodarone in Langendorff perfused guinea pig hearts. *Basic Res. Cardiol.* **86**, 136-147.

STARKUS, J.G., KUSCHEL, L., RAYNER, M.D. & HEINEMANN, S.H. (1997) Ion conduction through C-type inactivated Shaker channels. *J. Gen. Physiol* **110**, 539-550.

STRICHARTZ, G.R. (1973) The inhibition of sodium currents in myelinated nerve by quaternary derivatives of lidocaine. *J. Gen. Physiol* **62**, 37-57.

SUBBIAH,R.N., CLARKE,C.E., SMITH,D.J., ZHAO,J., CAMPBELL,T.J. & VANDENBERG,J.I. (2004) Molecular basis of slow activation of the human ether-a-go-go related gene potassium channel. *J. Physiol* **558**, 417-431.

SUTO,F., ZHU,W., CAHILL,S.A., GREENWALD,I., NAVARRO,A.L. & GROSS,G.J. (2005) Ventricular rate determines early bradycardic electrical remodeling. *Heart Rhythm.* **2**, 293-300.

SUZUKI,M., LI,R.A., MIKI,T., UEMURA,H., SAKAMOTO,N., OHMOTO-SEKINE,Y., TAMAGAWA,M., OGURA,T., SEINO,S., MARBAN,E. & NAKAYA,H. (2001) Functional roles of cardiac and vascular ATP-sensitive potassium channels clarified by Kir6.2-knockout mice. *Circ. Res.* **88**, 570-577.

SZENTADRASSY,N., BANYASZ,T., BIRO,T., SZABO,G., TOTH,B.I., MAGYAR,J., LAZAR,J., VARRO,A., KOVACS,L. & NANASI,P.P. (2005) Apico-basal inhomogeneity in distribution of ion channels in canine and human ventricular myocardium. *Cardiovasc. Res.* **65**, 851-860.

TAKEBAYASHI,S., LI,Y., KAKU,T., INAGAKI,S., HASHIMOTO,Y., KIMURA,K., MIYAMOTO,S., HADAMA,T. & ONO,K. (2006) Remodeling excitation-contraction coupling of hypertrophied ventricular myocytes is dependent on T-type calcium channels expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **345**, 766-773.

TAKIMOTO,K., LI,D., HERSHMAN,K.M., LI,P., JACKSON,E.K. & LEVITAN,E.S. (1997) Decreased expression of Kv4.2 and novel Kv4.3 K<sup>+</sup> channel subunit mRNAs in ventricles of renovascular hypertensive rats. *Circ. Res.* **81**, 533-539.

TANG,C.Y. & PAPAZIAN,D.M. (1997) Transfer of voltage independence from a rat olfactory channel to the Drosophila ether-a-go-go K<sup>+</sup> channel. *J. Gen. Physiol* **109**, 301-311.

TANG,W., KANG,J., WU,X., RAMPE,D., WANG,L., SHEN,H., LI,Z., DUNNINGTON,D. & GARYANTES,T. (2001) Development and evaluation of high throughput functional assay methods for HERG potassium channel. *J. Biomol. Screen.* **6**, 325-331.

TENG,G.Q., LEES-MILLER,J.P., DUAN,Y., LI,B.T., LI,P. & DUFF,H.J. (2003) [K(<sup>+</sup>)](<sub>o</sub>)-dependent change in conformation of the HERG1 long QT mutation N629D channel results in partial reversal of the in vitro disease phenotype. *Cardiovasc. Res.* **57**, 642-650.

TESCHEMACHER, A.G., SEWARD, E.P., HANCOX, J.C. & WITCHEL, H.J. (1999) Inhibition of the current of heterologously expressed HERG potassium channels by imipramine and amitriptyline. *Br. J. Pharmacol.* **128**, 479-485.

THURINGER, D., COULOMBE, A., DEROUBAIX, E., CORABOEUF, E. & MERCADIER, J.J. (1996) Depressed transient outward current density in ventricular myocytes from cardiomyopathic Syrian hamsters of different ages. *J. Mol. Cell Cardiol.* **28**, 387-401.

TODA,N. (1970) Barium-induced automaticity in relation to calcium ions and norepinephrine in the rabbit left atrium. *Circ. Res.* **27**, 45-57.

TOMASELLI,G.F. & MARBAN,E. (1999) Electrophysiological remodeling in hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc. Res.* **42**, 270-283.

TOMASELLI G.F. & RODEN D. (2005) Conceptual Basis for Cardiac Arrhythmology. Molecular and Cellular Basis of cardiac Electrophysiology. http://www.elsevierinternational.com/e-books/pdf/

TRISTANI-FIROUZI,M., CHEN,J., MITCHESON,J.S. & SANGUINETTI,M.C. (2001) Molecular biology of  $K(^{+})$  channels and their role in cardiac arrhythmias. *Am. J. Med.* **110**, 50-59.

TRISTANI-FIROUZI,M., CHEN,J. & SANGUINETTI,M.C. (2002) Interactions between S4-S5 linker and S6 transmembrane domain modulate gating of HERG K<sup>+</sup> channels. *J. Biol. Chem.* **277**, 18994-19000.

TSENG,G.N. & BOYDEN,P.A. (1989) Multiple types of Ca<sup>2+</sup> currents in single canine Purkinje cells. *Circ. Res.* **65**, 1735-1750.

TSENG,G.N. (2001) I(<sub>Kr</sub>): the hERG channel. *J. Mol. Cell Cardiol.* **33**, 835-849.

TSUJI,Y., OPTHOF,T., YASUI,K., INDEN,Y., TAKEMURA,H., NIWA,N., LU,Z., LEE,J.K., HONJO,H., KAMIYA,K. & KODAMA,I. (2002) Ionic mechanisms of acquired QT prolongation and torsades de pointes in rabbits with chronic complete atrioventricular block. *Circulation* **106**, 2012-2018.

UNDROVINAS,A.I., FLEIDERVISH,I.A. & MAKIELSKI,J.C. (1992) Inward sodium current at resting potentials in single cardiac myocytes induced by the ischemic metabolite lysophosphatidylcholine. *Circ. Res.* **71**, 1231-1241.

UNDROVINAS,A.I., MALTSEV,V.A., KYLE,J.W., SILVERMAN,N. & SABBAH,H.N. (2002) Gating of the late Na<sup>+</sup> channel in normal and failing human myocardium. *J. Mol. Cell Cardiol.* **34**, 1477-1489.

VAN BEEREN,H.C., BAKKER,O. & WIERSINGA,W.M. (2000) Desethylamiodarone interferes with the binding of co-activator GRIP-1 to the beta 1-thyroid hormone receptor. *FEBS Lett.* **481**, 213-216.

VANDENBERG,C.A. (1987) Inward rectification of a potassium channel in cardiac ventricular cells depends on internal magnesium ions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **84**, 2560-2564.

VAUGHAN WILLIAMS, E.M. (1970) The experimental basis for the choice of an antiarrhythmic drug. *Adv. Cardiol.* **4**, 275-289.

VELDKAMP,M.W., DE JONGE,B. & VAN GINNEKEN,A.C. (1999) Decreased inward rectifier current in adult rabbit ventricular myocytes maintained in primary culture: a single-channel study. *Cardiovasc. Res.* **42**, 424-433.

VEREECKE, J. & CARMELIET, E. (2000) The effect of external pH on the delayed rectifying K<sup>+</sup> current in cardiac ventricular myocytes. *Pflugers Arch.* **439**, 739-751.

VISKIN,S. (1999) Long QT syndromes and torsade de pointes. *Lancet* **354**, 1625-1633.

VLAHOS,C.J., MCDOWELL,S.A. & CLERK,A. (2003) Kinases as therapeutic targets for heart failure. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 99-113.

VOLDERS, P.G., SIPIDO, K.R., VOS, M.A., KULCSAR, A., VERDUYN, S.C. & WELLENS, H.J. (1998) Cellular basis of biventricular hypertrophy and arrhythmogenesis in dogs with chronic complete atrioventricular block and acquired torsade de pointes. *Circulation* **98**, 1136-1147.

VOLDERS,P.G., SIPIDO,K.R., VOS,M.A., SPATJENS,R.L., LEUNISSEN,J.D., CARMELIET,E. & WELLENS,H.J. (1999) Downregulation of delayed rectifier K(<sup>+</sup>) currents in dogs with chronic complete atrioventricular block and acquired torsades de pointes. *Circulation* **100**, 2455-2461.

VOLK,T., NGUYEN,T.H., SCHULTZ,J.H., FAULHABER,J. & EHMKE,H. (2001) Regional alterations of repolarizing  $K^+$  currents among the left ventricular free wall of rats with ascending aortic stenosis. *J. Physiol* **530**, 443-455.

VOS,M.A. (2005) Early rate control in complete atrioventricular block is warranted to prevent electrical remodeling: No role for ventricular activation? *Heart Rhythm.* **2**, 301-303.

WAGONER, P.K. & OXFORD, G.S. (1990) Aminopyridines block an inactivating potassium current having slow recovery kinetics. *Biophys. J.* **58**, 1481-1489.

WALDO,A.L., CAMM,A.J., DERUYTER,H., FRIEDMAN,P.L., MACNEIL,D.J., PAULS,J.F., PITT,B., PRATT,C.M., SCHWARTZ,P.J. & VELTRI,E.P. (1996) Effect of d-sotalol on mortality in patients with left ventricular dysfunction after recent and remote myocardial infarction. The SWORD Investigators. Survival With Oral d-Sotalol. *Lancet* **348**, 7-12.

WALKER,B.D., SINGLETON,C.B., BURSILL,J.A., WYSE,K.R., VALENZUELA,S.M., QIU,M.R., BREIT,S.N. & CAMPBELL,T.J. (1999) Inhibition of the human ether-a-go-go-related gene (HERG) potassium channel by cisapride: affinity for open and inactivated states. *Br. J. Pharmacol.* **128**, 444-450.

WANG,J., TRUDEAU,M.C., ZAPPIA,A.M. & ROBERTSON,G.A. (1998) Regulation of deactivation by an amino terminal domain in human ether-a-go-go-related gene potassium channels. *J. Gen. Physiol* **112**, 637-647.

WANG,J., MYERS,C.D. & ROBERTSON,G.A. (2000) Dynamic control of deactivation gating by a soluble amino-terminal domain in HERG K(<sup>+</sup>) channels. *J. Gen. Physiol* **115**, 749-758.

WANG,K.W., TAI,K.K. & GOLDSTEIN,S.A. (1996) MinK residues line a potassium channel pore. *Neuron* **16**, 571-577.

WANG,Q., SHEN,J., SPLAWSKI,I., ATKINSON,D., LI,Z., ROBINSON,J.L., MOSS,A.J., TOWBIN,J.A. & KEATING,M.T. (1995) SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* **80**, 805-811.

WANG,S., MORALES,M.J., LIU,S., STRAUSS,H.C. & RASMUSSON,R.L. (1997) Modulation of HERG affinity for E-4031 by [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> and C-type inactivation. *FEBS Lett.* **417**, 43-47.

WANG,Z., NOLAN,B., KUTSCHKE,W. & HILL,J.A. (2001) Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger remodeling in pressure overload cardiac hypertrophy. *J. Biol. Chem.* **276**, 17706-17711.

WARD,O.C. (1964) A new familial cardiac syndrome in children. J. Ir. Med. Assoc. 54, 103-106.

WASHIZUKA,T., HORIE,M., OBAYASHI,K. & SASAYAMA,S. (1997) Does tyrosine kinase modulate delayed-rectifier K channels in guinea pig ventricular cells? *Heart Vessels* **Suppl 12**, 173-174.

WETTWER, E., AMOS, G.J., POSIVAL, H. & RAVENS, U. (1994) Transient outward current in human ventricular myocytes of subepicardial and subendocardial origin. *Circ. Res.* **75**, 473-482.

WHALLEY, D.W., WENDT, D.J. & GRANT, A.O. (1995) Basic concepts in cellular cardiac electrophysiology: Part I: Ion channels, membrane currents, and the action potential. *Pacing Clin. Electrophysiol.* **18**, 1556-1574.

WIBLE,B.A., YANG,Q., KURYSHEV,Y.A., ACCILI,E.A. & BROWN,A.M. (1998) Cloning and expression of a novel K<sup>+</sup> channel regulatory protein, KChAP. *J. Biol. Chem.* **273**, 11745-11751.

WIBLE,B.A., WANG,L., KURYSHEV,Y.A., BASU,A., HALDAR,S. & BROWN,A.M. (2002) Increased K<sup>+</sup> efflux and apoptosis induced by the potassium channel modulatory protein KChAP/PIAS3beta in prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 17852-17862.

WICKENDEN, A.D., KAPRIELIAN, R., KASSIRI, Z., TSOPORIS, J.N., TSUSHIMA, R., FISHMAN, G.I. & BACKX, P.H. (1998) The role of action potential prolongation and altered intracellular calcium handling in the pathogenesis of heart failure. *Cardiovasc. Res.* **37**, 312-323.

WICKENDEN, A.D., LEE, P., SAH, R., HUANG, Q., FISHMAN, G.I. & BACKX, P.H. (1999) Targeted expression of a dominant-negative  $K(v)4.2 K(^{+})$  channel subunit in the mouse heart. *Circ. Res.* **85**, 1067-1076.

WICKMAN,K.D., INIGUEZ-LLUHL,J.A., DAVENPORT,P.A., TAUSSIG,R., KRAPIVINSKY,G.B., LINDER,M.E., GILMAN,A.G. & CLAPHAM,D.E. (1994) Recombinant G-protein beta gamma-subunits activate the muscarinic-gated atrial potassium channel. *Nature* **368**, 255-257.

WILDE,A.A., JONGBLOED,R.J., DOEVENDANS,P.A., DUREN,D.R., HAUER,R.N., VAN LANGEN,I.M., VAN TINTELEN,J.P., SMEETS,H.J., MEYER,H. & GEELEN,J.L. (1999) Auditory stimuli as a trigger for arrhythmic events differentiate HERG-related (LQTS2) patients from KVLQT1-related patients (LQTS1). *J. Am. Coll. Cardiol.* **33**, 327-332.

WOLK,R. (2003) Calcineurin, myocardial hypertrophy, and electrical remodeling. *Cardiovasc. Res.* **57**, 289-293.

WOOLTORTON, J.R. & MATHIE, A. (1993) Block of potassium currents in rat isolated sympathetic neurones by tricyclic antidepressants and structurally related compounds. *Br. J. Pharmacol.* **110**, 1126-1132.

WOOSLEY,R.L., CHEN,Y., FREIMAN,J.P. & GILLIS,R.A. (1993) Mechanism of the cardiotoxic actions of terfenadine. *JAMA* **269**, 1532-1536.

WU,S.N., LI,H.F. & CHIANG,H.T. (2000) Characterization of ATP-sensitive potassium channels functionally expressed in pituitary GH3 cells. *J. Membr. Biol.* **178**, 205-214.

XU,H., GUO,W. & NERBONNE,J.M. (1999) Four kinetically distinct depolarization-activated K+ currents in adult mouse ventricular myocytes. *J. Gen. Physiol* **113**, 661-678.

YAMAGUCHI,H., HARA,M., STROBECK,M., FUKASAWA,K., SCHWARTZ,A. & VARADI,G. (1998) Multiple modulation pathways of calcium channel activity by a beta subunit. Direct evidence of beta subunit participation in membrane trafficking of the alpha1C subunit. *J. Biol. Chem.* **273**, 19348-19356.

YAMAUCHI-TAKIHARA,K., AZUMA,J., KISHIMOTO,S., ONISHI,S. & SPERELAKIS,N. (1988) Taurine prevention of calcium paradox-related damage in cardiac muscle. Its regulatory action on intracellular cation contents. *Biochem. Pharmacol.* **37**, 2651-2658.

YANG,E.K., ALVIRA,M.R., LEVITAN,E.S. & TAKIMOTO,K. (2001) Kvbeta subunits increase expression of Kv4.3 channels by interacting with their C termini. *J. Biol. Chem.* **276**, 4839-4844.

YANG,J., ELLINOR,P.T., SATHER,W.A., ZHANG,J.F. & TSIEN,R.W. (1993) Molecular determinants of Ca2+ selectivity and ion permeation in L-type Ca2+ channels. *Nature* **366**, 158-161.

YANG,T., KUPERSHMIDT,S. & RODEN,D.M. (1995a) Anti-minK antisense decreases the amplitude of the rapidly activating cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> current. *Circ. Res.* **77**, 1246-1253.

YANG,T., SNYDERS,D.J. & RODEN,D.M. (1995b) Ibutilide, a methanesulfonanilide antiarrhythmic, is a potent blocker of the rapidly activating delayed rectifier K<sup>+</sup> current ( $I_{Kr}$ ) in AT-1 cells. Concentration-, time-, voltage-, and use-dependent effects. *Circulation* **91**, 1799-1806.

YANG,T. & RODEN,DM. (1996) Extracellular potassium modulation of drug block of  $I_{Kr}$ : implications for torsades de pointes and reverse use-dependence. *Circulation*. **93**:407-411.

YANG,T., SNYDERS,D.J. & RODEN,D.M. (1997a) Rapid inactivation determines the rectification and  $[K^+]_{\circ}$  dependence of the rapid component of the delayed rectifier K<sup>+</sup> current in cardiac cells. *Circ. Res.* **80**, 782-789.

YANG,W.P., LEVESQUE,P.C., LITTLE,W.A., CONDER,M.L., SHALABY,F.Y. & BLANAR,M.A. (1997b) KvLQT1, a voltage-gated potassium channel responsible for human cardiac arrhythmias. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 4017-4021.

YOKOSHIKI,H., SUNAGAWA,M., SEKI,T. & SPERELAKIS,N. (1999) Antisense oligodeoxynucleotides of sulfonylurea receptors inhibit ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in cultured neonatal rat ventricular cells. *Pflugers Arch.* **437**, 400-408.

YOUM,J.B., EARM,Y.E. & HO,W.K. (2004) Modulation of HERG channel inactivation by external cations. *Eur. Biophys. J.* **33**, 360-369.

YU,H., WU,J., POTAPOVA,I., WYMORE,R.T., HOLMES,B., ZUCKERMAN,J., PAN,Z., WANG,H., SHI,W., ROBINSON,R.B., EL MAGHRABI,M.R., BENJAMIN,W., DIXON,J., MCKINNON,D., COHEN,I.S. & WYMORE,R. (2001) MinK-related peptide 1: A beta subunit for the HCN ion channel subunit family enhances expression and speeds activation. *Circ. Res.* **88**, E84-E87.

ZAREBA,W., MOSS,A.J., SCHWARTZ,P.J., VINCENT,G.M., ROBINSON,J.L., PRIORI,S.G., BENHORIN,J., LOCATI,E.H., TOWBIN,J.A., KEATING,M.T., LEHMANN,M.H. & HALL,W.J. (1998) Influence of genotype on the clinical course of the long-QT syndrome. International Long-QT Syndrome Registry Research Group. *N. Engl. J. Med.* **339**, 960-965.

ZARITSKY,J.J., REDELL,J.B., TEMPEL,B.L. & SCHWARZ,T.L. (2001) The consequences of disrupting cardiac inwardly rectifying K(<sup>+</sup>) current (I(<sub>K1</sub>)) as revealed by the targeted deletion of the murine Kir2.1 and Kir2.2 genes. *J. Physiol* **533**, 697-710.

ZHANG,M., JIANG,M. & TSENG,G.N. (2001) minK-related peptide 1 associates with Kv4.2 and modulates its gating function: potential role as beta subunit of cardiac transient outward channel? *Circ. Res.* **88**, 1012-1019.

ZHANG,S., ZHOU,Z., GONG,Q., MAKIELSKI,J.C. & JANUARY,C.T. (1999) Mechanism of block and identification of the verapamil binding domain to HERG potassium channels. *Circ. Res.* **84**, 989-998.

ZHANG,S., RAJAMANI,S., CHEN,Y., GONG,Q., RONG,Y., ZHOU,Z., RUOHO,A. & JANUARY,C.T. (2001) Cocaine blocks HERG, but not KvLQT1+minK, potassium channels. *Mol. Pharmacol.* **59**, 1069-1076.

ZHOU, J., JERON, A., LONDON, B., HAN, X. & KOREN, G. (1998a) Characterization of a slowly inactivating outward current in adult mouse ventricular myocytes. *Circ. Res.* **83**, 806-814.

ZHOU,Z. & LIPSIUS,S.L. (1994) T-type calcium current in latent pacemaker cells isolated from cat right atrium. *J. Mol. Cell Cardiol.* **26**, 1211-1219.

ZHOU,Z., GONG,Q., YE,B., FAN,Z., MAKIELSKI,J.C., ROBERTSON,G.A. & JANUARY,C.T. (1998b) Properties of HERG channels stably expressed in HEK 293 cells studied at physiological temperature. *Biophys. J.* **74**, 230-241.

ZHOU,Z., VORPERIAN,V.R., GONG,Q., ZHANG,S. & JANUARY,C.T. (1999) Block of HERG potassium channels by the antihistamine astemizole and its metabolites desmethylastemizole and norastemizole. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **10**, 836-843.

ZOBEL,C., KASSIRI,Z., NGUYEN,T.T., MENG,Y. & BACKX,P.H. (2002) Prevention of hypertrophy by overexpression of Kv4.2 in cultured neonatal cardiomyocytes. *Circulation* **106**, 2385-2391.

ZOBEL,C., CHO,H.C., NGUYEN,T.T., PEKHLETSKI,R., DIAZ,R.J., WILSON,G.J. & BACKX,P.H. (2003) Molecular dissection of the inward rectifier potassium current (IK1) in rabbit cardiomyocytes: evidence for heteromeric co-assembly of Kir2.1 and Kir2.2. *J. Physiol* **550**, 365-372.

ZOU,A., XU,QP. & SANGUINETTI,MC.(1998) A mutation in the pore region of HERG K<sup>+</sup> channels expressed in Xenopus oocytes reduces rectification by shifting the voltage dependence of inactivation. *J Physiol.* **509** (Pt 1):129-137.

ZUHLKE,R.D., PITT,G.S., DEISSEROTH,K., TSIEN,R.W. & REUTER,H. (1999) Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature* **399**, 159-162.

ZYGMUNT,A.C., GOODROW,R.J. & WEIGEL,C.M. (1998) INaCa and ICI(Ca) contribute to isoproterenol-induced delayed after depolarizations in midmyocardial cells. *Am. J. Physiol* **275**, H1979-H1992.

ZYGMUNT,A.C., EDDLESTONE,G.T., THOMAS,G.P., NESTERENKO,V.V. & ANTZELEVITCH,C. (2001) Larger late sodium conductance in M cells contributes to electrical heterogeneity in canine ventricle. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **281**, H689-H697.

## Sites internet:

http://www.torsades.org ; http://www.fenichel.net ; http://www.dml.georgetown.edu

## CANAUX K<sup>+</sup> ET QT LONG ACQUIS

Le syndrome du QT long acquis est une anomalie de la repolarisation cardiaque à l'origine de troubles du rythme et de mort subite. Dans ce travail, nous avons montré que l'allongement de l'intervalle QT consécutif à un bloc auriculo-ventriculaire ou à un traitement chronique à l'amiodarone chez la souris est en partie dû à un remodelage du transcriptome des canaux ioniques. Le QT long acquis d'origine médicamenteuse est généralement lié à l'inhibition du canal K<sup>+</sup> hERG, cible de nombreux agents pharmacologiques à visée non cardiaque. Cette inhibition peut être à l'origine d'arythmies sévères ce qui oblige l'industrie pharmaceutique à tester l'innocuité sur hERG de leur molécules en développement. Or, à l'heure actuelle, les techniques de détection à haut débit des inhibiteurs de ce canal sont peu fiables. Nous avons donc développé une nouvelle technique basée sur l'utilisation d'un canal hERG muté. Enfin, nous avons montré que la sur-expression de hERG *in vivo* augmente la réserve de repolarisation et peut exercer un effet anti-arythmique.

Mots clés: repolarisation - QT long acquis - remodelage électrique - hERG - pharmacologie de sécurité

## K<sup>+</sup> CHANNELS AND ACQUIRED LONG QT

Acquired long QT syndrome is an abnormality of cardiac repolarization that causes arrhythmias and sudden death. In this work, we showed that QT prolongation related to a atrioventricular block or to a long-term amiodarone treatment in the mouse is due, in a large part, to modifications of ion channel gene expression. Acquired long QT related to medication is generally due to a block of the hERG channel the target of numerous non-cardiovascular drugs. This inhibition can cause severe arrhythmias and led the pharmaceutical industry to assess the innocuity of their candidate drugs on hERG channel. But, at this time, high throughput assay methods for drugs screening are not efficiency. Therefore, we have develop a new screening method using a mutated hERG channel. At last, we have shown *in vivo* that hERG over expression increases repolarization reserve and can exert antiarrhythmic activity.

Keywords: repolarization - acquired long QT - electrical remodeling - hERG - safety pharmacology

## L'INSTITUT DU THORAX, INSERM U533-FACULTÉ DE MÉDECINE-1, RUE GASTON VEIL 44035 NANTES