

Année 2010

Mort subite et complexes moléculaires des canaux ioniques cardiaques

THESE DE DOCTORAT

Discipline : Sciences de la vie et de la santé

Spécialité : Physiologie

Présentée et soutenue publiquement par

Mohamed Yassine AMAROUCH

Le 14 décembre 2010, devant le jury ci-dessous :

- Rapporteurs* **Mr. ABRIEL Hugues**, Professeur des Universités, Université de Bern
Mr. FAIVRE Jean-François, Professeur des Universités,
Université de Poitiers
- Examineurs* **Mr. LE GUENNEC Jean-Yves**, Professeur des Universités,
Université de Montpellier 2
Mr. LE MAREC Hervé, Professeur des Universités,
Praticien Hospitalier, Université de Nantes
Mr. LOUSSOUARN Gildas, Chargé de recherche CNRS, Nantes
- Directeur de thèse* **Mme BARÓ Isabelle**, Directeur de Recherche CNRS, Nantes

Sommaire

Index des illustrations	1
Index des tableaux	3
Abréviations.....	4
Introduction générale.....	6
A. La mort subite et les troubles du rythme cardiaque	6
B. Génétique des troubles du rythme cardiaque	7
1. Approche d'identification de gènes morbides :.....	7
a) Modèles génétiques : du modèle monogénique au modèle polygénique. 7	
b) Méthodes d'étude génétique	8
2. Troubles du rythme cardiaques congénitaux.....	11
a) Syndrome de Brugada.....	11
➤ Historique	11
➤ Description clinique	12
➤ Tests pharmacologiques	13
➤ Epidémiologie.....	15
➤ Diagnostic différentiel : exemple de la dysplasie arythmogène du ventricule droit (DAVD).....	16
➤ Mécanismes responsables du syndrome de Brugada.....	17
➤ Relation génotype/phénotype.....	20
b) Le syndrome du QT court	22
➤ Historique	22
➤ Signes cliniques et diagnostic différentiel du syndrome du QT court congénital.....	23
➤ Epidémiologie.....	24
➤ Mécanismes responsables du syndrome du QT court	24
➤ Relation génotype/phénotype.....	25
c) Les syndromes chevauchants	26
C. Canaux ioniques et troubles du rythme cardiaque	28
1. Na _v 1.5, ses sous-unités régulatrices et les pathologies associées	28
a) Le canal sodique Na _v 1.5.....	28
b) Protéines régulatrices associées	31

➤ Les sous-unités auxiliaires β	32
c) Pathologies associées	37
2. $Ca_v1.2$, ses sous-unités régulatrices et les pathologies associées	38
a) Le canal $Ca_v1.2$	39
b) Protéines régulatrices associées	41
c) Pathologies associées	42
3. Les canaux K_v4 , leurs sous-unités régulatrices et les pathologies associées	43
a) Les canaux potassiques K_v4	44
b) Les protéines régulatrices associées.....	45
c) Pathologies associées	45
D. Objectifs de la thèse.....	45
Résultats et discussion	47
A. Tachycardie multifocale automatique du Purkinje.....	47
1. Introduction	47
2. Discussion.....	3
L'implication de la mutation R222Q dans l'apparition de l'arythmie	3
Lien entre la mutation, l'arythmie et la cardiomyopathie dilatée	5
Limites de l'étude	6
B. Etude de l'implication d'un mutant du canal $Ca_v1.2$ dans le Syndrome du QT court associé à un déficit en carnitine.	8
1. Introduction	8
2. Matériels et méthodes.....	11
a) Ré-expression hétérologue dans des cellules de mammifères.....	11
➤ Les cellules HEK tsA-201	11
b) Transfection transitoire des cellules HEK tsA201	12
➤ Agent de transfection	12
c) Analyse des courants ioniques, technique de <i>patch-clamp</i>	13
➤ Enregistrement des courants en <i>patch-clamp</i>	13
➤ Analyse du courant calcique I_{CaL}	14
➤ La courbe d'activation	15
➤ La courbe d'inactivation	16
d) Analyse biochimiques du canal calcique $Ca_v1.2$	16
➤ Western blot.....	16

➤ Biotinylation des canaux $Ca_v1.2$	17
e) Immunomarquages.....	18
f) Statistiques.....	19
3. Résultats.....	19
a) Effet du variant $Ca_v1.2$ A253P sur le courant $I_{Ca,L}$	19
b) Effet du variant A253P sur l'expression totale de $Ca_v1.2$	22
c) Effet du variant A253P sur l'expression membranaire de $Ca_v1.2$	24
4. Discussion.....	25
C. Etude de l'implication du variant T501M de la protéine DPPX dans le syndrome de Brugada.....	30
1. Introduction.....	30
2. Matériels et méthodes.....	32
a) Ré-expression hétérologue dans des cellules de mammifères.....	32
➤ Les cellules COS-7.....	32
➤ Protocoles de transfection du canal $K_v4.3$ et ses sous-unités régulatrices.....	33
b) Analyse du courant potassique I_{to}	34
➤ Le courant potassique I_{to}	34
➤ La courbe d'inactivation.....	34
➤ La levée de l'inactivation ou réactivation.....	35
c) Analyse biochimique du canal $K_v4.3$	35
➤ Western blot.....	35
➤ Biotinylation des canaux $K_v4.3$	36
d) Statistiques.....	36
3. Résultats.....	37
a) Effet du variant T501M de la protéine DPPX sur l'expression totale et membranaire de $K_v4.3$	37
b) Effet du variant T501M de la protéine DPPX sur le courant I_{to}	38
4. Discussion.....	41
Discussion générale et conclusion.....	44
Annexe 1 : L'activité électrique cardiaque et l'ECG.....	48
A. Naissance et conduction du PA dans le cœur.....	48
B. L'électrocardiogramme (ECG).....	49
Annexe 2 : Protéines régulatrices du canal sodique $Na_v1.5$	52

Annexe 3 : Protéines régulatrices du canal Calcique Ca _v 1.2.....	60
Annexe 4 : Protéines régulatrices du canal potassique K _v 4.3	66
Bibliographie.....	72

Index des illustrations

Figure 1: Mécanismes de la mort subite cardiaque par arythmie ventriculaire.	6
Figure 2: Electrocardiogramme d'un des 8 patients de la première publication décrivant les caractéristiques cliniques du syndrome de Brugada.	11
Figure 3: Représentation des trois types d'ECG, type I, II et III observés dans le syndrome de Brugada	12
Figure 4: ECG montrant l'action révélatrice des antiarythmiques de classe Ic dans le syndrome de Brugada.	15
Figure 5: Bases cellulaires du syndrome de Brugada selon l'hypothèse d'Antzelevitch	18
Figure 6 : Bases cellulaires du syndrome de Brugada selon l'hypothèse de Meregalli <i>et coll.</i>	19
Figure 7: ECG caractéristiques du syndrome du QT court.....	24
Figure 8: Représentation schématique de la structure du canal Nav1.5	29
Figure 9: Représentation schématique du canal sodique Nav1.5 et ses protéines régulatrices.....	31
Figure 10 : Alligement des séquences protéiques des sous-unités Na _v β1 humaine et de rat.	35
Figure 11: Représentation schématique des mutations du gène SCN5A et leurs localisations sur le canal Na _v 1.5.....	38
Figure 12: Schéma des sous-unités α1c, β et α2δ responsable du courant I _{Ca,L}	40
Figure 13 : L'élévation de la jonction complexe QRS segment ST est caractéristique du syndrome de repolarisation précoce.....	43
Figure 14: schéma de la sous-unité α. des canaux Kv4 à 6 segments transmembranaires.....	44
Figure 15 : Le variant A223P du canal calcique Ca _v 1.2.....	8
Figure 16 : Famille du propositus et ECG représentatifs du SQTC.	9
Figure 17 : Arbre généalogique de la famille porteuse du variant A223P et du mutant OCTN2.	10
Figure 18: Schéma d'une installation de patch clamp	14
Figure 19 : Séquence de stimulation et courant résultant.....	15
Figure 20 : Protocole de stimulation permettant l'estimation de l'activation.....	15
Figure 21: Protocole de stimulation permettant l'estimation de l'inactivation	16

Figure 22 : Technique de marquage des protéines de surface.....	18
Figure 23: Effets de la mutation A253P sur les caractéristiques biophysiques du courant $I_{Ca,L}$	20
Figure 24: Effet du variant A253P sur la dépendance au potentiel du canal Cav1.2.	21
Figure 25: Dépendance au potentiel de l'inactivation du canal $Ca_v1.2$	22
Figure 26 : Estimation de l'expression des protéines $Ca_v1.2$ WT et mutées A253P par la technique de Western blot.	23
Figure 27: Immunomarquages intracellulaires de la protéine $Ca_v1.2$ WT (gauche), mutée A253P (centre) et contrôle sur cellules non transfectées (droite).	23
Figure 28: Estimation de l'expression membranaire des protéines $Ca_v1.2$ WT et mutées A253P par la technique de biotinylation des protéines de surface cellulaire.	25
Figure 29 : Phénotype et génotype du <i>propositus</i>	30
Figure 30 : Arbre généalogique de la famille porteuse du variant T501M	31
Figure 31: Séquence de stimulation et courant résultant.....	34
Figure 32: Protocole de stimulation permettant l'estimation de l'inactivation	35
Figure 33: Protocole de stimulation permettant l'estimation de la levée d'inactivation	35
Figure 34 : Estimation de l'expression totale et membranaire de la protéine Kv4.3 par la technique de western blot et de biotinylation des protéines de surface cellulaire.	38
Figure 35 : Effet du variant T501M de la protéine DPPX sur la densité du courant I_{to}	39
Figure 36 : Effet du variant T501M sur la dépendance au potentiel de l'inactivation du courant I_{to}	40
Figure 37 : Effet de la protéine DPPX sauvage et mutée sur les cinétiques de levée d'inactivation du canal Kv4.3.	41
Figure 38 : Distribution du tissu nodal permettant la propagation du potentiel d'action cardiaque.....	48
Figure 39: Electrocardiogramme,	50
Figure 40: Mécanismes de la mort subite cardiaque par arythmie ventriculaire.	51

Index des tableaux

Tableau 1 : Distribution du diagnostic du syndrome de Brugada en fonction des dérivations précordiales droites.....	13
Tableau 2 : Comparatif clinique, génétique et pharmacologique du syndrome de Brugada et de la dysplasie arythmogène du ventricule droit.	17
Tableau 3: Troubles du rythme et anomalies structurales associés à des mutations <i>SCN5A</i>	27
Tableau 4: Effets de la surexpression de la sous unité $\beta 1$ sur le canal sodique cardiaque $Na_v1.5$	33

Abréviations

CCVD	Chambre de chasse du ventricule droit
Cellules ES	Cellules souches embryonnaires
Cellules iPS	Cellules souches pluripotentes induites
CMD	Cardiomyopathie dilatée
DAVD	Dysplasie arythmogène du ventricule droit
DHP	Dihydropyridines
DPPX	Dipeptidyl-aminopeptidase-like
ECG	Electrocardiogramme
GPD1L	Glycérol-3-Phosphate Pésydrogénase 1 Like
KChiP	Kv channel interacting protein
PA	Potentiel d'action
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
SBr	Syndrome de Brugada
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Polymorphisme d'un nucléotide unique)
SQTC	Syndrome du QT Court
SQTL	Syndrome du QT Long
VD	Ventricule droit
VSCC	Canaux dépendants du potentiel
WT	Wild Type (Type sauvage)
FHF1B	Facteur de Croissance Homologue du Fibroblaste

PTPH1	Les Protéines Tyrosine Phosphatases 1
GPD1-L	Glycérol-3-Phosphate Pésydrogénase 1 Like
MOG1	Melin Oigodendrocyte Gycoprotein 1 (Méline-Oigodendrocyte-Gycoprotéine)
eIF3	Eukaryotic Initiation Factor 3 (Facteur d'Initiation)
CaBP1	Calcium-Binding Protein 1 (protéine de liaison du calcium)
AKAP	A-kinase anchoring protein (protéine d'ancrage des kinases A)
PP2A	Protein phosphatase 2 (Protéine Phosphatase 2)
CSN	COP9 Signalosome
KChAP	K ⁺ channel-associated protein
SAP-97	Synapse Associated Protein 97
CaM	Calmoduline
CaMKII	Calmoduline kinase II

Introduction générale

A. La mort subite et les troubles du rythme cardiaque

La mort subite cardiaque est un problème majeur de santé publique puisqu'elle touche environ un individu sur mille par an dans les pays développés (40000 cas par an en France) (Jouven & Escande, 2006). Elle est définie comme une mort brutale survenant dans l'heure suivant l'apparition des premiers symptômes tels que des douleurs thoraciques ou l'essoufflement. Chez la moitié des victimes, il s'agit de la première et dernière manifestation d'une cardiopathie sous-jacente méconnue, le plus fréquemment une maladie coronarienne ou une cardiomyopathie dilatée ou hypertrophique. Le taux de survie est inférieur à 3% en France, on parle alors de « mort subite récupérée ». Le mécanisme létal est, dans 80% des cas, un trouble du rythme ventriculaire causé par l'instabilité électrique du cœur : torsades de pointes¹ ou tachycardie qui peuvent dégénérer en fibrillation (figure 1).

A



B

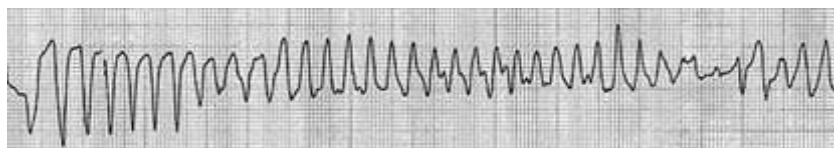


Figure 1: Mécanismes de la mort subite cardiaque par arythmie ventriculaire. A, tachycardie ventriculaire (www.frca.co.uk/images_main/resources/ECG/ECGresource37.jpg). B, torsades de pointes (Leyva & Foley, 2008).

Il existe différentes formes de troubles du rythme cardiaque :

- Les troubles du rythme primaires, sans cardiopathie sous-jacente (les syndromes du QT long et du QT court congénitaux, le syndrome de Brugada...).

¹ Torsades de pointes : c'est une forme particulière de tachycardie ventriculaire, due à un trouble de la repolarisation ventriculaire: QT allongé. A l'ECG, elles décrivent une sorte de torsion autour de la ligne isoélectrique.

- Les troubles du rythme causés par une maladie structurale cardiaque (cardiomyopathies dilatée et hypertrophique, malformations congénitales...).
- Les troubles du rythme associés à des affections génétiques neurologiques ou musculaires squelettiques (ataxie de Friedreich, myopathie de Duchenne...).

Environ 5 à 10% des cas de mort subite sont attribués aux troubles du rythme sans cardiopathie sous-jacente (Wever & Robles de Medina, 2004).

Le caractère brutal de la survenue des symptômes ainsi que le faible taux de survie après un épisode arythmique soulignent l'importance d'un dépistage précoce des patients à risque et de l'identification des bases moléculaires à l'origine de ces troubles du rythme. Ces marqueurs permettent, dans le cas du syndrome du QT long par exemple, la mise en place de diagnostic préventif, en particulier en cas d'histoire familiale de mort subite, et de développer des stratégies thérapeutiques autres que le défibrillateur cardiaque actuellement utilisé (Passman & Kadish, 2007).

B. Génétique des troubles du rythme cardiaque

1. Approche d'identification de gènes morbides :

a) Modèles génétiques : du modèle monogénique au modèle polygénique.

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

- Les pathologies **monogéniques**, où un gène majeur est à l'origine du mécanisme pathologique. C'est le cas du syndrome du QT court où le phénotype observé peut être associé à la mutation d'un seul gène (Brugada *et al.*, 2004; Bellocq *et al.*, 2004; Priori *et al.*, 2005; Antzelevitch *et al.*, 2007).
- Les pathologies **oligogéniques**, où l'association d'un nombre réduit de variants (compris entre 2 et quelques dizaines) est nécessaire pour développer une pathologie. Dans ce modèle, chaque variant pris séparément ne peut provoquer un phénotype pathologique. La maladie de Hirschsprung est un exemple de maladie oligogénique. C'est une anomalie du

fonctionnement de la partie terminale de l'intestin se traduisant par une constipation ou une occlusion intestinale. Cette anomalie est le résultat de l'absence de développement congénital des cellules neuroganglionnaires assurant la transmission des informations nécessaires à la régulation intestinale. Une étude a montré que la présence de trois variants de facteurs de susceptibilité situés dans 3 zones différentes du génome était nécessaire et suffisante pour développer cette maladie (Gabriel *et al.*, 2002).

- Les pathologies **polygéniques**, où la présence combinée de dizaines voire de centaines de variants est nécessaire à l'apparition du phénotype. Une étude menée par le consortium international sur la schizophrénie a permis de révéler une composante polygénique de la susceptibilité à cette maladie psychiatrique (Purcell *et al.*, 2009).

On pensait auparavant que les maladies rares pouvaient être expliquées par l'identification de variants rares à effet fort et que les pathologies fréquentes comme l'hypertension artérielle, étaient associées à des variants retrouvés fréquemment dans la population générale (Doris, 2002). Cependant, il est difficile de classer les maladies génétiques en fonction de leur modèle génétique. On parle aujourd'hui plutôt d'un continuum entre les formes monogéniques, oligogéniques et polygéniques. En effet, au sein de la majorité des maladies monogéniques on constate des défauts de pénétrance et d'expressivité que l'on peut attribuer à la présence de variants à effet mineur (Kaab & Schulze-Bahr, 2005). De même, un modèle polygénique d'une maladie fréquente, ne permet pas toujours d'expliquer tous les cas rencontrés.

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

b) Méthodes d'étude génétique

L'identification des gènes morbides² est basée, à ce jour, sur deux approches principales : par l'approche d'analyse de liaison au niveau du génome entier (ou clonage positionnel) et par l'approche « gène candidat ».

² Gène morbide : gène responsable d'un phénotype pathologique.

- **L'approche « génome entier »** : elle permet d'identifier la région chromosomique, locus, à l'intérieur de laquelle se situe le gène responsable d'une maladie génétique monogénique. Le grand intérêt de cette technique est qu'elle fait abstraction de toute hypothèse physiopathologique initiale. L'analyse de liaison familiale a permis d'élucider les bases moléculaires à l'origine de certaines maladies monogéniques rares. Le gène *Ank-2* est un exemple d'identification de gène morbide dans le syndrome du QT long de type 4 par cette méthode (Schott *et al.*, 1995; Mohler *et al.*, 2003). Cependant, un nombre considérable de loci identifiés n'ont pas abouti à l'identification du gène en cause. Ceci peut s'expliquer par le fait (i) que la liaison peut être due au hasard (faux positif), (ii) que le nombre de gènes à explorer dans ces régions est trop important, (iii) que tous les gènes du locus ne sont pas encore identifiés ou (iv) que les régions non codantes et les petits réarrangements génomiques (délétions, duplications, inversions), non détectables par cette approche, pourraient avoir un rôle majeur dans le développement des pathologies. En effet, ce dernier argument s'illustre par le fait que l'approche génome entier est basée sur le suivi de la transmission de certains marqueurs génétiques, les microsatellites³, entre les différentes générations. Certes, cette approche permet de mettre en évidence un ou plusieurs loci contenant des marqueurs retrouvés systématiquement chez les individus atteints et absents chez les individus sains. Cependant, n'étant pas quantitative, elle ne permet pas de détecter les réarrangements génomiques, telle que la duplication d'un gène, du fait de la transmission de marqueurs microsatellites identiques de ce gène.

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

- **L'approche « gène candidat »** : selon le phénotype observé et les données de la littérature, on peut émettre des hypothèses sur la physiopathologie de la maladie et les voies impliquées, et rechercher des variants dans des gènes « candidats » dont l'expression et la fonction présumée sont compatibles avec

³ Les microsatellites : sont des marqueurs génétiques constitués de répétitions (10 à 60 fois) de courtes séquences nucléotidiques d'une à quatre paires de bases.

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

Pour les maladies communes, **l'étude d'association**, une alternative à l'analyse de liaison familiale et à l'approche « gène candidat » a été développée pour identifier des facteurs génétiques de susceptibilité. Le principe consiste à comparer la fréquence d'un marqueur génétique (« single nucleotide polymorphism » ou SNPs⁴) chez les sujets atteints par une même pathologie mais non apparentés et chez les témoins.

⁴ Les SNPs pour « single nucleotide polymorphism », onstituent la forme la plus abondante de variations génétiques dans le génome humain. C'est un type de polymorphisme de l'ADN dans lequel deux chromosomes diffèrent sur un segment donné par une seule paire de bases.

2. Troubles du rythme cardiaques congénitaux

a) Syndrome de Brugada

➤ Historique

Osher et Wolff ont été les premiers à identifier un profil électrocardiographique particulier, comprenant un aspect de bloc de branche⁵ droit, un sus-décalage du segment ST et une inversion de l'onde T dans les dérivation précordiales droites V1 à V3 chez des sujets asymptomatiques (OSHER & WOLFF, 1953). Martini et coll. ont ensuite retrouvé ce profil ECG particulier chez trois patients ayant fait des morts subites récupérées (Martini *et al.*, 1989). Chez ces patients, une cardiomyopathie du ventricule droit fut diagnostiquée à partir des résultats de biopsie de ventricule droit chez un patient et de l'échographie chez deux patients. Plusieurs auteurs avaient conclu que des anomalies structurales étaient responsables de ce profil électrocardiographique particulier (Martini *et al.*, 1989;Corrado *et al.*, 1996).

Les frères Brugada furent les premiers à faire l'hypothèse qu'il s'agissait d'une maladie cardiaque fonctionnelle. En 1992, ils décrivent, chez un groupe de 8 patients dont 6 hommes, cet aspect atypique de l'ECG associé à des troubles du rythme et de la conduction, un risque de mort subite par tachycardie ventriculaire polymorphe et une présomption d'hérédité. Tous ces patients présentaient un sus-décalage du segment ST dans les dérivation V1 à V3 et un bloc de branche droit sans allongement de l'intervalle QT (Figure 2).

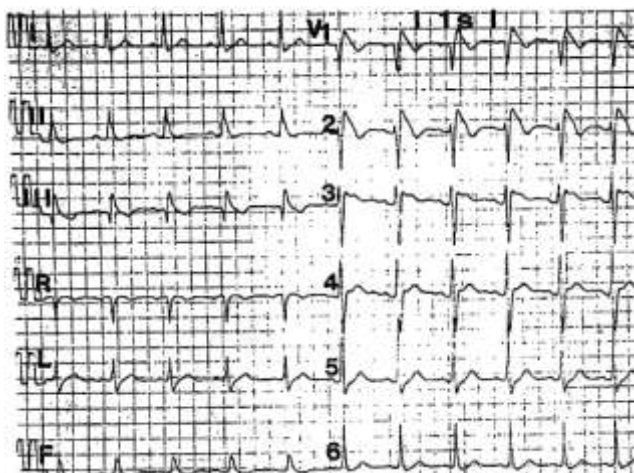


Figure 2: Electrocardiogram d'un des 8 patients de la première publication décrivant les caractéristiques cliniques du syndrome de Brugada. L'ECG révèle un sus-décalage persistant du segment ST dans les dérivation précordiales V1, V2 et V3 supérieur à 0.1 mV ainsi qu'un bloc de branche droit sans allongement de l'intervalle QT (Brugada & Brugada, 1992).

⁵ Un bloc de branche est un trouble de la conduction cardiaque dont le blocage est situé sur une des branches du faisceau de His au niveau des ventricules cardiaques.

➤ Description clinique

Le syndrome de Brugada (SBr) se manifeste à l'ECG par une élévation du segment ST sur au moins 2 dérivations précordiales droites (V1-V3) quelques fois accompagnée d'un aspect de bloc de branche droit, un intervalle QT normal, une prédisposition aux arythmies ventriculaires mortelles et l'absence de maladie cardiaque structurale (Antzelevitch *et al.*, 2005a). L'aspect de bloc de branche peut être absent chez certains patients (Hermida *et al.*, 2000). Dans de nombreux cas, l'intervalle HV, intervalle représentant le temps de conduction intraventriculaire, serait allongé reflétant un retard de la conduction (Brugada & Brugada, 1992; Miyazaki *et al.*, 1996).

Trois types de syndrome de Brugada sont différenciés suivant l'intensité du sus-décalage et la morphologie du segment ST. Le SBr de type I se définit par un segment ST convexe, sus-décalé d'au moins 0,2 mV et suivi d'une onde T négative. Celui de type II se caractérise par un segment ST en selle et surélevé d'au moins 0,2 mV mais pouvant décroître dans le temps à 0,1 mV. Le SBr de type III est observé pour un segment ST convexe ou en selle sus-décalé de plus de 0,2 mV au point J puis de moins de 0,1 mV. Dans ces deux derniers types l'onde T est positive (Figure 3).

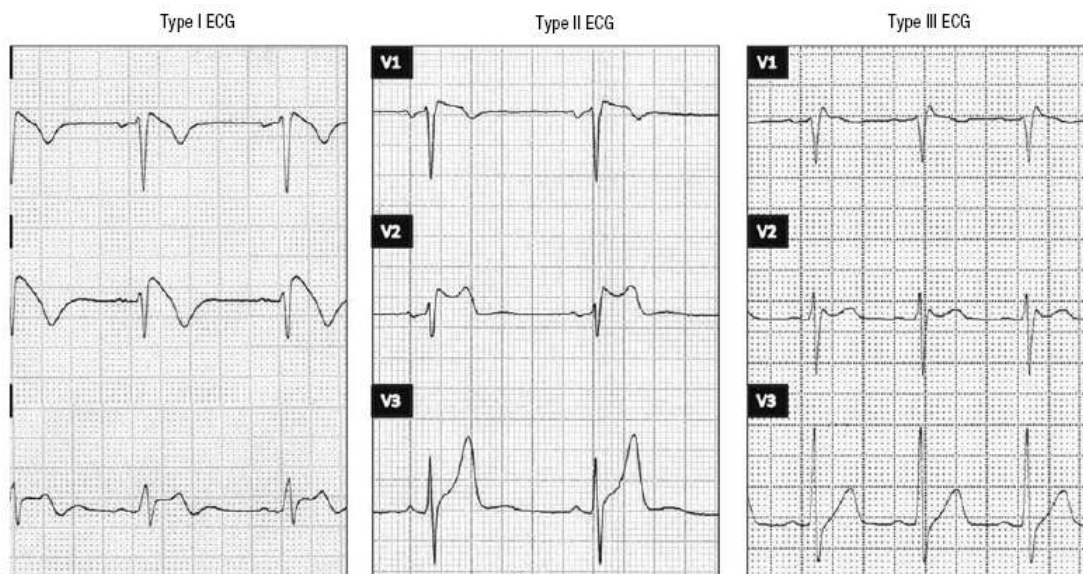


Figure 3: Représentation des trois types d'ECG, type I, II et III observés dans le syndrome de Brugada (Benito *et al.*, 2009)

Comme décrit précédemment, un des critères importants du diagnostic du syndrome de Brugada est l'élévation du segment ST sur au moins 2 dérivation précordiales droites. Récemment, l'équipe de Pedro Brugada a publié une étude cherchant à élargir ce critère de diagnostic (Richter *et al.*, 2010). Cette étude a inclus 186 patients ayant une élévation du segment ST sur au moins une dérivation précordiale droite. Elle a mis en évidence que 10% de ces patients présentent cette élévation sur les trois dérivation (V1-V2-V3), 62% sur deux dérivation et 46% sur seulement une dérivation. Dans le sous-groupe de patients ayant cet aspect électrocardiographique sur deux dérivation, l'association V1-V2 représente 98% des cas et V2-V3, 2% des cas (tableau 1). Enfin, dans le sous-groupe avec un diagnostic sur une seule dérivation, il n'y a aucun patient avec cet aspect sur la dérivation V3. La comparaison du profil clinique des sous-groupes présentant une élévation du segment ST sur une et deux dérivation ne révèle pas de différence significative entre ces groupes en termes d'apparition des événements arythmiques. Les auteurs de cette étude ont donc suggéré un élargissement des critères de diagnostic du syndrome de Brugada en se basant plus sur les dérivation V1-V2 et en incluant tous les patients ayant une élévation du segment ST sur une seule dérivation (Richter *et al.*, 2010).

Tableau 1 : Distribution du diagnostic du syndrome de Brugada en fonction des dérivation précordiales droites (Richter *et al.*, 2010). RPL : right precordial lead (dérivation précordial droite).

All ECGs with ≥ 1 diagnostic RPL, n = 376 (186 subjects)						
No. of diagnostic RPLs	3		2		1	
ECGs, n (%)	27 (7)		205 (55)		144 (38)	
Patients, n (%)	19 (10)		116 (62)		86 (46)	
	ECGs with 2 diagnostic RPLs, n = 205 (116 subjects)			ECGs with 1 diagnostic RPL, n = 144 (86 subjects)		
Diagnostic RPLs	V1 + V2	V2 + V3	V1 + V3	V1	V2	V3
ECGs, n (%)	203 (99)	2 (1)	0 (0)	76 (53)	68 (47)	0 (0)
Patients, n (%)	114 (98)	2 (2)	0 (0)	41 (48)	45 (52)	0 (0)
Patients, % n*	61	1	0	22	24	0

➤ Tests pharmacologiques

Les anomalies électrocardiographiques associées au syndrome de Brugada peuvent être variables dans le temps chez un même patient, l'ECG pouvant être à certains moments strictement normal. Ces variations dépendent de la régulation du cœur par le système nerveux autonome et de l'administration de certains

antiarythmiques (Miyazaki *et al.*, 1996). L'effort physique, les bêta-stimulants, les alphabloquants tendent à minorer les manifestations électriques tandis que le repos, les bêtabloquants, les alphasimétriques, la stimulation vagale, les antiarythmiques de classe I, notamment l'ajmaline et la flécaïnide, exacerbent ces manifestations électriques (Miyazaki *et al.*, 1996).

La spécificité du diagnostic et du pronostic des SBr de types II et III n'est pas clairement établie. La détection de ces deux types à l'ECG conduit à proposer un test pharmacologique visant à clarifier le diagnostic en vue de la révélation d'un SBr de type I. Ce test peut également permettre de diagnostiquer le syndrome chez un individu ayant un ECG de base normal. Les antiarythmiques bloqueurs des canaux sodiques, comme l'ajmaline et la flécaïnide, utilisés par voie intraveineuse, peuvent démasquer les anomalies électrocardiographiques (Figure 4). Ils sont proposés à titre diagnostique dans les formes douteuses : ajmaline (1 mg/kg en injection intraveineuse lente sur 5 min), et flécaïnide (2 mg/kg en injection intraveineuse lente sur 10 min) (Brugada *et al.*, 2000). Le test est réalisé sous monitoring électrocardiographique continu en salle d'électrophysiologie. Il est considéré comme positif lorsqu'un sus-décalage de ST > 1 mm se produit dans les dérivations précordiales droites. La valeur prédictive exacte du test pharmacologique chez les apparentés (qui ont un tracé douteux ou normal) n'est pas encore bien établie mais un travail récent réalisé dans 4 familles avec mutation identifiée dans le gène *SCN5A* trouve une sensibilité de 80% et une spécificité de 95% pour le test à l'ajmaline (Hong *et al.*, 2004). Chacune de ces molécules possède des limites : la flécaïnide serait moins efficace et produirait des faux négatifs (Wolpert *et al.*, 2005a), alors que l'ajmaline entraînerait des faux positifs (Hong *et al.*, 2004).

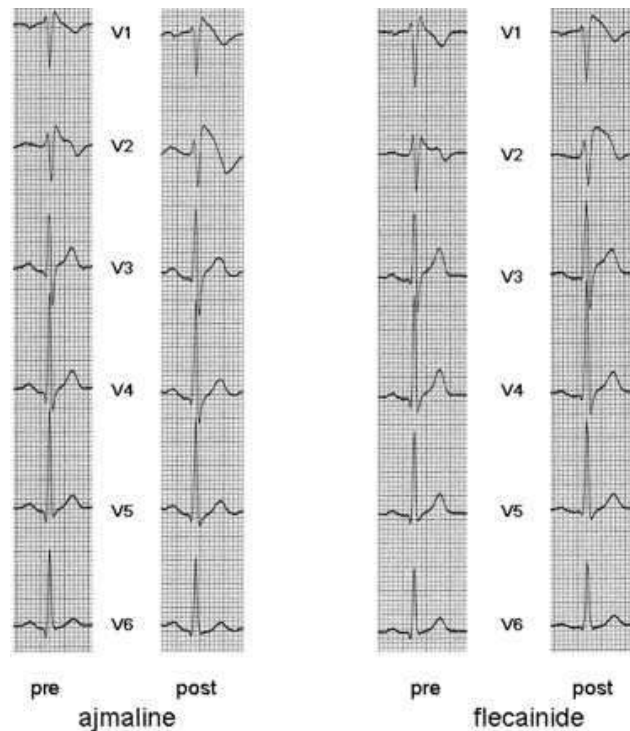


Figure4: ECG montrant l'action révélatrice des antiarythmiques de classe Ic dans le syndrome de Brugada. ECG des dérivations précordiales avant et après injection intraveineuse de 1mg/kg d'ajmaline (gauche) ou de 2mg/kg flécaïnide (droite). Induction d'un sus-décalage du segment ST, caractéristique du SBr chez un même patient. D'après (Wolpert *et al.*, 2005a).

➤ Epidémiologie

Le syndrome de Brugada touche environ 1 caucasien sur 2000 (0,05% de la population générale), cette prévalence varie selon les études et peut aller jusqu'à 0,12% des individus ayant un SBr de type I, voire 0,26% si l'on compte les aspects de type II et III (Gallagher *et al.*, 2008) . La variation de cette prévalence peut se comprendre par la faible pénétrance du SBr d'environ 32%. Cette pénétrance peut être augmentée par l'utilisation d'un test pharmacologique et passer à 79% (Hong *et al.*, 2004) . L'âge moyen d'apparition des premiers symptômes est de 40 ans avec une distribution très hétérogène (de 2 jours à 84 ans) (Antzelevitch *et al.*, 2005b). Le SBr a une prédominance masculine : 71 à 80% des cas selon les études (Eckardt, 2007; Benito *et al.*, 2008).

➤ **Diagnostic différentiel : exemple de la dysplasie arythmogène du ventricule droit (DAVD)**

Un des critères importants pour la pose du diagnostic du SBr est la normalité structurale du cœur. Une échocardiographie est réalisée systématiquement. Certains centres pratiquent des biopsies ventriculaires afin de s'assurer du caractère non fibrosé du tissu et d'établir un diagnostic différentiel avec la dysplasie arythmogène du ventricule droit (DAVD) (Frustaci *et al.*, 2005).

La DAVD a un profil électrocardiographique proche de celui retrouvé dans le cas du SBr. En effet, l'ECG des personnes atteintes de la DAVD peut présenter un sus-décalage du segment ST, des tachycardies polymorphes (30% des cas de DAVD), des troubles de la conduction avec une prédominance masculine (Corrado *et al.*, 2001). En revanche, les gènes impliqués sont différents, il existe des modifications structurelles et fonctionnelles cardiaques dans la DAVD, et enfin les patients souffrant de cette atteinte présentent le plus souvent des tachycardies ventriculaires monomorphes (70%) lors d'une stimulation adrénergique ou d'exercice (tableau 2).

Comme décrit précédemment, une des propriétés importantes pour la pose du diagnostic du SBr est la normalité structurale du cœur. Cependant, plusieurs études laissent suspecter l'existence d'un lien entre la DAVD et le SBr. En effet, un patient atteint du SBr avec d'importants troubles du rythme a dû être transplanté, à cause d'une hypertrophie et fibrose du ventricule droit (Ayerza *et al.*, 2002; Coronel *et al.*, 2005). De plus, une autre étude rapporte 13 cas de mort subite pour lesquels l'ECG montrait un sus-décalage du segment ST et un bloc de branche droit. Leur décès est survenu pendant une période de repos et de sommeil pour 11 d'entre eux (Corrado *et al.*, 2001). Ces signes cliniques rappellent ceux du SBr, cependant 12 de ces patients présentaient une dysplasie myocardique.

Tableau 2 : Comparatif clinique, génétique et pharmacologique du syndrome de Brugada et de la dysplasie arythmogène du ventricule droit.

	Syndrome de Brugada	Dysplasie arythmogène du ventricule droit
Description clinique		
Sus-décalage du segment ST	Oui	30% des cas
Dérivations	V1-V2-V3	
Type de tachycardie ventriculaire	Polymorphe	Monomorphe (70%) Polymorphe (30%)
Trouble de la conduction	Aspect de bloc de branche droit	
Prédominance	Masculine	
Atteinte structurale du cœur	Non	Fibrose Dilatation modérée du ventricule droit
Moyenne d'âge de dépistage	35 - 40 ans	
Prévalence	Masculine	
Génétique		
Héritabilité	Autosomique dominant	Autosomique dominant et récessif
Gènes impliqués	<p><i>SCN5A</i> <i>GPD1-L</i> <i>CACNA1C</i> <i>CACNB2</i> <i>SCN1b</i> <i>KCNE3</i> <i>SCN3b</i></p>	<p><i>TGF-beta3</i> <i>RyR2</i> <i>TMEM43</i> <i>JUP</i> <i>DSP</i> <i>PKP2</i> <i>DSG2</i> <i>DSC2</i></p>

➤ Mécanismes responsables du syndrome de Brugada

Le sus-décalage observé sur l'ECG des patients atteints du syndrome de Brugada serait le fait de l'existence d'un gradient de potentiel transmural important pendant la phase de repolarisation. Ce gradient est dû à une forte hétérogénéité de

l'amplitude du plateau du potentiel d'action entre les cellules réparties dans la paroi du ventricule droit (Yan & Antzelevitch, 1999).

La phase de repolarisation rapide initiale du potentiel d'action (PA) résulte essentiellement de l'inactivation des canaux sodiques et de l'activation du courant transitoire sortant I_{to} . A la différence des cellules de l'endocarde, les potentiels d'action des cellules de l'épicarde présentent une phase 1 plus prononcée, dite en « encoche ». Le courant potassique, I_{to} , présent dans les cellules de l'épicarde et pratiquement absent des cellules de l'endocarde, serait le principal courant responsable de la différence de morphologie entre les potentiels d'action des cellules de la paroi ventriculaire (Antzelevitch *et al.*, 1991; Wettwer *et al.*, 1994; Nabauer *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1998; Yan & Antzelevitch, 1999). La perte du plateau de potentiel d'action est due essentiellement au déséquilibre entre les courants impliqués dans la phase 1 (figure 5). En théorie, une réduction des courants entrants I_{Na} ou $I_{Ca,L}$, ou une augmentation des courants sortants tels que I_{to} ou $I_{K_{ATP}}$ ou $I_{K_{ACh}}$ peut contribuer à la perte du plateau de potentiel d'action (Lukas & Antzelevitch, 1993; Yan & Antzelevitch, 1999).

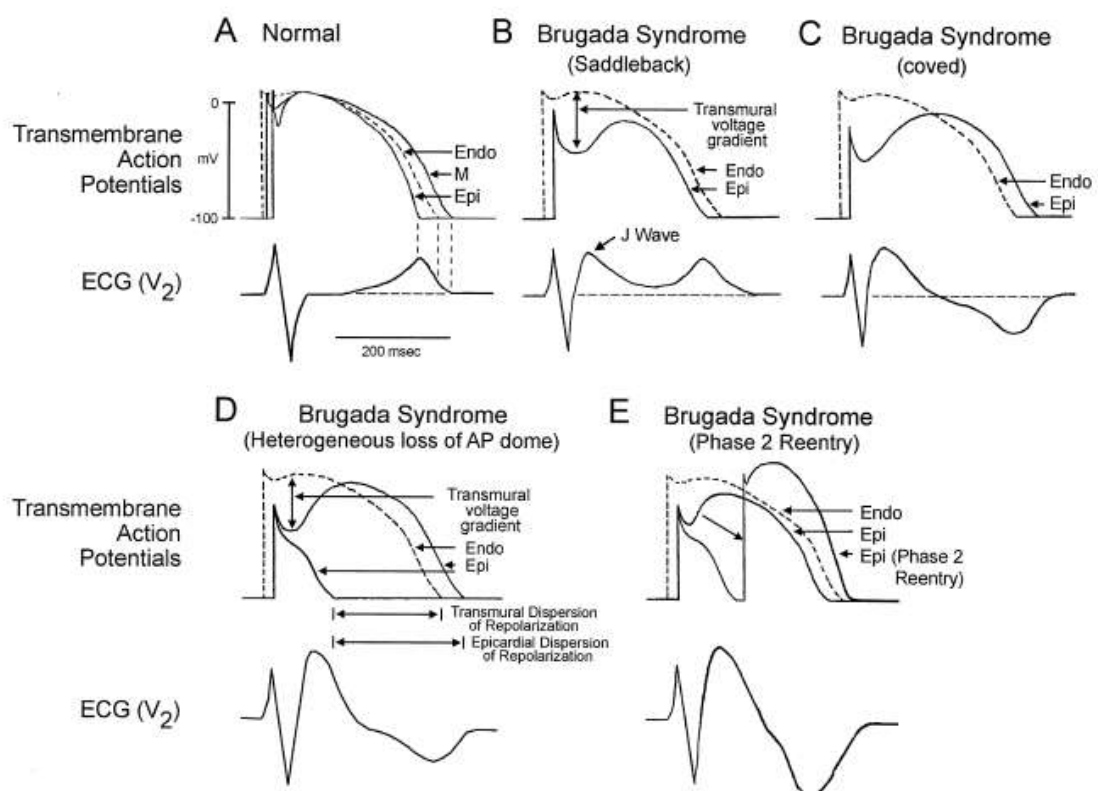


Figure 5: Bases cellulaires du syndrome de Brugada selon l'hypothèse d'Antzelevitch (Naccarelli & Antzelevitch, 2001)

D'autre part, une deuxième hypothèse a été avancée pour expliquer le profil électrocardiographique du SBr. Elle est basée sur le retard de conduction dans la chambre de chasse du ventricule droit (CCVD). Le potentiel d'action de la CCVD (Figure 6B, haut) serait retardé par rapport à celui du reste ventricule droit (Fig. 6B, bas). Au cours du cycle cardiaque le potentiel de membrane du VD serait alors plus positif que dans CCVD, agissant ainsi comme une source de stimulation pour ce dernier (Figure. 6C, a). Ceci va se traduire au niveau de la dérivation précordiale droite V2 par une élévation du segment ST (Figure. 6D). Dans la phase suivante du cycle cardiaque (à la suite de la remontée (Fig. 6F) du potentiel d'action retardé du CCVD), les gradients de potentiel entre les VD et CCVD seront inversés, le potentiel de membrane serait maintenant plus positif dans le CCVD. Le sens de dépolarisation va être alors à l'opposé de ce qui est décrit précédemment. Ce qui se traduit au niveau de l'ECG par une onde T négative (Meregalli *et al.*, 2005).

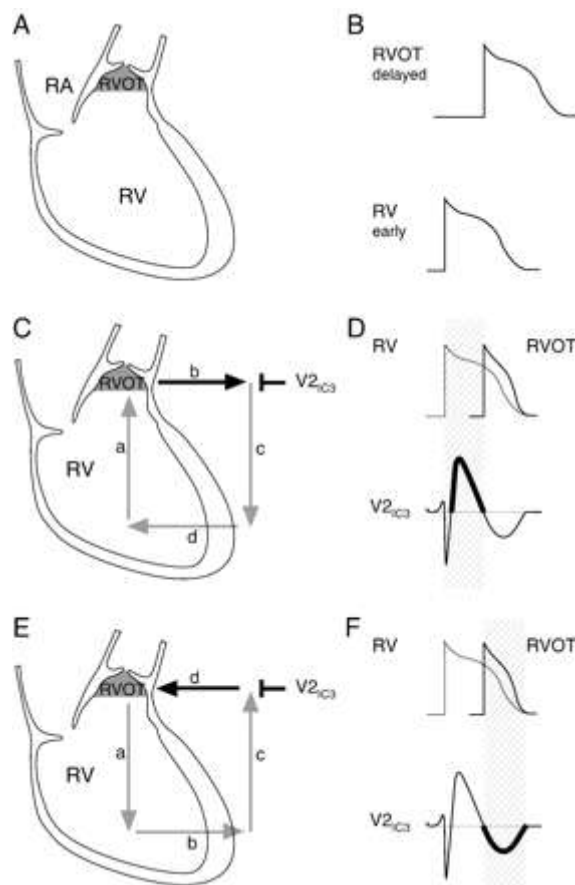


Figure 6 : Bases cellulaires du syndrome de Brugada selon l'hypothèse de Meregalli *et coll* (Meregalli *et al.*, 2005)

Les deux hypothèses présentées plus haut ne sont pas opposées mais complémentaires malgré les nombreux points de contradiction.

De mon point de vue, l'hypothèse d'Antzelevitch et coll reste dominante. Elle présente l'avantage de s'appuyer sur des données expérimentales, notamment celles démontrant que l'activation du courant I_{to} ou le blocage des courants sodiques et calciques sur des préparations de ventriculaires de chien augmente l'hétérogénéité de la repolarisation ventriculaire (Fish & Antzelevitch, 2004). Un autre argument majeur en faveur de l'hypothèse d'Antzelevitch et coll, est la normalisation de l'ECG à un rythme cardiaque élevé. En effet, si l'aspect de Brugada était essentiellement dû aux troubles de conduction, on observerait une exacerbation du phénotype des patients atteints du SBr à rythme cardiaque élevé. Si le mécanisme impliqué était celui de l'hétérogénéité de la repolarisation, l'accélération du rythme cardiaque normaliserait l'ECG. A l'exception de l'étude de Amin et coll où l'accélération du rythme augmente le sus décalage du segment ST (Amin *et al.*, 2009), la majorité des autres études montrent une normalisation de l'ECG (Stix *et al.*, 2000; Esperer *et al.*, 2007). Ceci va dans le sens de l'hypothèse d'Antzelevitch et coll.

Comme pour de nombreuses autres maladies, il n'existe probablement pas qu'un seul mécanisme mais plusieurs en fonction du fond génétique des patients. L'existence d'anomalies structurales ou de troubles de conduction, en particulier chez les patients porteurs des mutations perte de fonction du canal sodique, peuvent participer au phénotype mais ne sont pas nécessaires pour générer un aspect de Brugada.

➤ **Relation génotype/phénotype**

Les mutations dans le gène *SCN5A* restent de loin les plus fréquemment identifiées dans le SBr avec une prévalence d'environ 15%. Cependant aucune relation génotype/phénotype parfaite n'a été observée au sein d'une famille suffisamment informative. Plusieurs hypothèses peuvent être émises. La faible pénétrance⁶ (32%) conduit à considérer, dans les études familiales, un nombre élevé d'individus chez qui la mutation est présente mais non pénétrante. Ceci rend l'identification des zones de liaisons plus difficile. De plus, la nette prédominance masculine de 8:1 rend le phénotype très variable en fonction du sexe des patients

⁶ Pénétrance : rapport entre le nombre d'individus malades porteurs d'une mutation donnée et le nombre total d'individus porteurs de cette mutation

(Benito *et al.*, 2008). Cette variabilité peut être expliquée par les différences hormonales entre les deux sexes. En effet, Matsuo rapporte deux cas de patients ayant un ECG de type Brugada avant castration, puis une normalisation de l'ECG après opération (Matsuo *et al.*, 2003). De plus, Di Diego et coll. montrent que le courant potassique I_{to} est plus grand dans les cellules épicrodiques ventriculaires de chien mâle, ce qui laisse entendre que le gradient transmural entre l'épicrode et l'endocarde est lui aussi augmenté chez les hommes (Di Diego *et al.*, 2002). Cette dernière hypothèse ne peut être vraie que si les densités du courant I_{to} sont identiques dans les tissus endocardiens des deux sexes.

Environ 80% des cas de SBr ne sont pas expliqués par une mutation du gène *SCN5A*. Ceci suggère l'existence d'autres gènes morbides et donc l'hétérogénéité de ce syndrome. En 2002, London et coll. ont identifié, dans une grande famille, un nouveau locus appelé Brugada Syndrome 2 (SBr2) proche de *SCN5A* sur le chromosome 3 (3p22-25) (Weiss *et al.*, 2002). En 2007, une approche familiale a permis d'identifier une mutation, A280V, sur le gène codant pour la glycerol-3-phosphate dehydrogenase like (*GPD1L*) dans le locus SBr2 (London *et al.*, 2007). Des études, effectuées sur des cellules HEK, suggèrent que ce variant altère l'adressage des canaux sodiques, produit du gène *SCN5A*, $Na_v1.5$, à la membrane expliquant la diminution de densité du courant sodique cardiaque (London *et al.*, 2007; Valdivia *et al.*, 2009). Deux mutations dans le gène *SCN1B* codant la sous-unité $Na_v\beta1$ du canal sodique cardiaque ont été identifiées par notre équipe et réduisent le courant sodique (Watanabe *et al.*, 2008). Autres approches gène candidat ont abouti à l'identification de nouveaux gènes pour le SBr. Ils ne sont associés cependant qu'à de rares cas. Un cas sporadique de SBr a été décrit avec une mutation dans la sous-unité $Na_v\beta3$ régulatrice du canal $Na_v1.5$, codée par le gène *SCN3B*, entraînant aussi une perte de fonction du canal sodique cardiaque dans les cellules HEK tsA201. Le mécanisme est double: la mutation L10P de la sous-unité $Na_v\beta3$ modifie les propriétés biophysiques du canal sodique ainsi que son adressage à la membrane (Hu *et al.*, 2009). L'implication potentielle de la sous-unité $Na_v\beta3$ dans les troubles du rythme chez l'homme avait déjà été suggérée par l'exploration électrophysiologique de la souris invalidée pour *SCN3B* montrant une susceptibilité plus importante à développer des tachycardies ventriculaires mono ou polymorphes (Hakim *et al.*, 2008). D'autre part, une mutation a été identifiée dans le gène *KCNE3* (R99H) codant une sous-unité β de canaux potassiques, MiRP2.

Delpon et coll. montrent une co-immunoprécipitation de MiRP2 et de $K_v4.3$, canal potassique, et le gain de fonction engendré par la mutation sur le courant I_{to} (Delpon *et al.*, 2008). Enfin, trois mutations dans les gènes *CACNA1C* et *CACNB2* codant respectivement les sous-unités α , $Ca_v1.2$ et $\beta 2$ du canal calcique du courant de type L, provoquent une perte de fonction (Antzelevitch *et al.*, 2007) et mènent au phénotype chevauchant de SBr et du syndrome du QT court.

Une étude récente effectuée au sein de notre laboratoire (Probst *et al.*, 2009) a démontré que des variants retrouvés dans le gène *SCN5A* et provoquant une perte de fonction du canal sodique $Na_v1.5$ ne permettent pas à eux seuls d'expliquer le SBr. La relation génotype/phénotype *SCN5A*/SBr de 13 familles comportant 115 patients mutés a été étudiée. Ces familles présentent toutes un défaut de ségrégation entre la mutation familiale du gène *SCN5A* et le phénotype du SBr. Il a été aussi noté que les patients mutés pour le gène *SCN5A* ont en moyenne un intervalle PR et QRS plus long que les non-porteurs ce qui démontre que ces mutations ont cependant un effet fonctionnel. Ces données sont cohérentes avec la description de mutations dans le gène *SCN5A* corrélées à un ralentissement de la conduction cardiaque (Smits *et al.*, 2002; Probst *et al.*, 2006; Yokokawa *et al.*, 2007).

L'association du SBr et du gène *SCN5A* apparaît donc plus complexe que la relation entre la perte de fonction du courant I_{Na} et le ralentissement de la conduction cardiaque. L'étude de Probst et coll montre que le modèle monogénique, initialement décrit, ne permet pas de comprendre le mécanisme électrophysiologique et empêche une bonne prédiction du risque rythmique. Les mutations perte de fonction du canal sodique constitueraient plus une base génétique des troubles de conduction que du SBr pour lequel ces mutations ne représentent qu'un variant probablement fort mais ni nécessaire ni suffisant à l'apparition de ce syndrome.

b) Le syndrome du QT court

➤ Historique

Le syndrome du QT court (SQTC) congénital est une entité cardiologique qui associe un intervalle QT court sur l'ECG de surface avec un risque élevé de syncope ou de mort subite par arythmie ventriculaire maligne.

Dans les années 90, une étude rétrospective de Holter sur plus 6500 patients a déterminé que le risque de mort subite à 2 ans était 2 fois plus élevé chez les

personnes ayant un intervalle QTc < 400ms (Algra *et al.*, 1993). En 2000, Gussak et coll. ont été les premiers à considérer cet aspect électrocardiographique comme une nouvelle entité clinique en publiant une étude présentant une fibrillation auriculaire paroxystique familiale associée à un QT court ne s'adaptant pas à la fréquence cardiaque (Gussak *et al.*, 2000).

L'étude de deux familles a ensuite confirmé que ce syndrome était associé à une incidence plus élevée de mort subite familiale (Gussak *et al.*, 2000). Tous les patients présentaient à l'exploration électrophysiologique des périodes réfractaires courtes au niveau auriculaire et ventriculaire et chez une grande majorité la fibrillation ventriculaire était induite par stimulation ventriculaire programmée.

L'identification de mutations dans le gène *KCNH2* un an plus tard dans ces deux familles, a permis de révéler la base génétique du SQTC. Ce gène code le canal $K_v11.1$ responsable du courant repolarisant I_{kr} . L'étude fonctionnelle de cette première mutation (N588K) a montré un gain de fonction du courant I_{kr} (Brugada *et al.*, 2004). La troisième famille rapportée dans cet article ne possédait pas de mutation du gène *KCNH2* ce qui suggère que, comme les autres arythmies cardiaques, le SQTC est génétiquement hétérogène. En effet, 7 mutations différentes ont été décrites à ce jour. Ceci illustre l'hétérogénéité du syndrome puisqu'elles sont réparties sur 5 gènes déjà identifiés dans le syndrome du QT long (Brugada *et al.*, 2004; Belloq *et al.*, 2004; Hong *et al.*, 2005; Priori *et al.*, 2005; Antzelevitch *et al.*, 2007).

➤ **Signes cliniques et diagnostic différentiel du syndrome du QT court congénital.**

Les signes caractéristiques de ce syndrome sont : (i) un intervalle QT très court. Aucun consensus n'est encore admis sur ce paramètre, on parle d'intervalle QT raccourci quand il est inférieur à 360 ms et d'un intervalle QT court quand il est inférieur à 320 ms (Viskin, 2009). (ii) Une onde T pointue d'une grande amplitude est observée, elle commence dès la fin de l'onde S (Figure 7).

La durée de l'intervalle QT est un paramètre dynamique qui diminue, chez l'homme, avec une augmentation du rythme cardiaque. Les patients atteints du SQTC ont une absence totale d'adaptation de la durée du QT aux variations de la fréquence cardiaque (Wolpert *et al.*, 2005b). Ces manifestations cliniques sont extrêmement variables allant de l'absence de symptômes à l'arrêt cardiaque en

passant par les syncopes à répétitions. La survenue d'une arythmie cardiaque par fibrillation auriculaire peut être le premier signe de la maladie. Les troubles du rythme surviennent indépendamment au repos, à l'effort ou lors d'un stress. D'autre part, le raccourcissement de l'intervalle QT peut être secondaire à d'autres facteurs tels que l'acidose, l'hyperkaliémie, l'hypercalcémie, l'hyperthermie, la tachycardie ou le surdosage en digitalique.

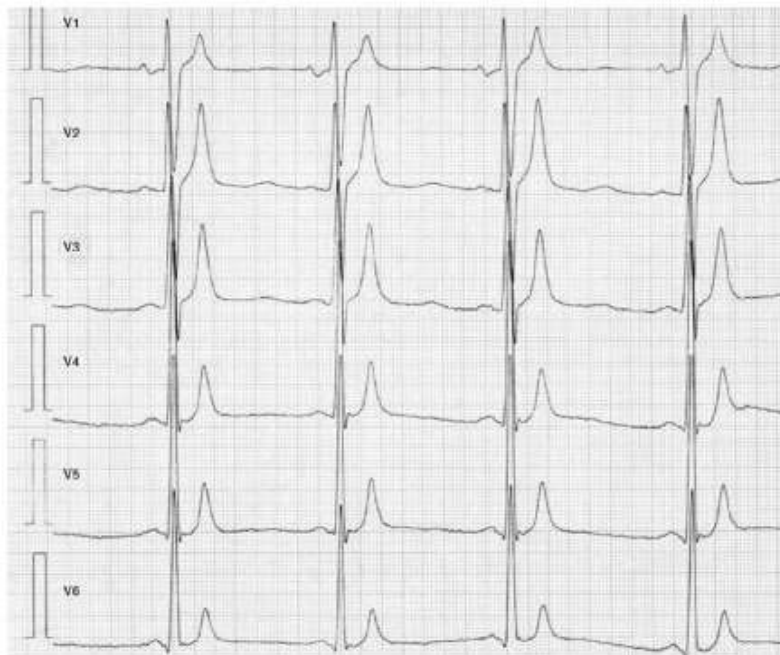


Figure 7: ECG caractéristiques du syndrome du QT court (Schimpf *et al.*, 2008).

➤ **Epidémiologie**

L'incidence d'un QT inférieur à 350 ms varie de 0,01 à 0,3% en fonction de la population étudiée (Moriya *et al.*, 2007; Anttonen *et al.*, 2007). Un intervalle QT raccourci ne permet pas de prédire à lui seul le risque rythmique. Cependant lorsqu'il est accompagné de fibrillation auriculaire, de syncope inexplicée, de fibrillation ventriculaire ou d'une histoire familiale de mort subite, alors le SQTC peut être évoqué.

➤ **Mécanismes responsables du syndrome du QT court**

La forme de l'onde T de l'électrocardiogramme est la résultante de l'hétérogénéité de la repolarisation entre les cellules de la paroi ventriculaire. Cette hétérogénéité est due à une expression différentielle des canaux ioniques.

Chez des patients atteints du syndrome du QT court, il a été démontré une augmentation de l'hétérogénéité de la repolarisation ventriculaire et une réduction des périodes réfractaires par rapport aux individus sains (Anttonen *et al.*, 2008). Les modifications observées peuvent être responsables des phénomènes de réentrées pouvant déclencher des contractions ventriculaires prématurées.

➤ Relation génotype/phénotype

Les formes de SQTC ayant une explication moléculaire sont rares, 7 mutations différentes ont été décrites à ce jour. L'origine génétique du SQTC a été confirmée par l'identification de la mutation N588K du canal potassique $K_v11.1$. Cette mutation entraîne un gain de fonction de ce canal en abolissant son inactivation. La conséquence est un raccourcissement du PA ventriculaire et de la période réfractaire (Brugada *et al.*, 2004). Deux autres gènes codant pour des canaux potassiques (*KCNQ1* et *KCNJ2*) ont rapidement été identifiés. La première mutation dans $K_v7.1$ (V307L), étudiée par notre équipe, a pu être associée au SQTC d'un patient isolé. La ré-expression de ce variant montre un gain de fonction du courant I_{Ks} dû à un décalage de la courbe d'activation vers des potentiels plus négatifs et à une accélération des cinétiques d'activation (Bellocq *et al.*, 2004). Une seconde mutation a été identifiée dans ce gène, V141M. Elle a été rapportée comme responsable de la fibrillation auriculaire et du SQTC en entraînant un gain de fonction du courant I_{Ks} (Hong *et al.*, 2005). La ré-expression du canal V141M- $K_v7.1$ dans l'ovocyte du Xénope génère un courant potassique activé en permanence et d'une densité plus grande, en comparaison avec $K_v7.1$ sauvage. La mutation D172N du canal rectifiant entrant $K_{ir}2.1$ a ensuite été identifiée chez un homme et sa fille au QTc inférieur à 320 ms. Ce canal responsable du courant repolarisant I_{K1} nécessaire pour le maintien du potentiel de repos au niveau du potentiel d'action ventriculaire. L'étude électrophysiologique de la mutation D172N montre un gain de fonction du courant repolarisant I_{K1} (Priori *et al.*, 2005). En effet, une augmentation de l'amplitude du courant I_{K1} est observée entre les potentiels allant de -75 à -45 mV. Ce gain de fonction qui, introduit dans un modèle informatique de potentiel d'action ventriculaire, provoque une accentuation de la phase de repolarisation et donc un raccourcissement du potentiel d'action ventriculaire (Priori *et al.*, 2005).

En 2007, une étude menée par Antzelevitch et coll a abouti à l'identification de deux gènes supplémentaires *CACNA1C* et *CACNB2* codant respectivement la

sous-unités $\alpha 1c$, $Ca_v1.2$ et $\beta 2a$ du canal calcique. Trois mutations [(*CACNA1C* (A39V), *CACNA1*(G490R) et *CACNB2* (S481L)], ont été rapportées chez des patients présentant en plus du raccourcissement de l'intervalle QT un SBr (Antzelevitch *et al.*, 2007).

c) Les syndromes chevauchants

Plusieurs troubles du rythme tels que le SBr, le syndrome du QT long (SQTL) et le SQTC ont été initialement considérés comme des entités cliniques séparées. Cependant, des données récentes indiquent des chevauchements dans la présentation clinique et des modifications biophysiques complexes associées aux mutations des gènes impliqués dans ces syndromes.

Plusieurs études portant sur le gène *SCN5A* font état de phénotypes différents pour une même mutation (Bezzina *et al.*, 1999). Plus surprenant encore, ce phénomène peut se rencontrer au sein d'une même famille (Kyndt *et al.*, 2001).

La plus surprenante association phénotypique est celle du SBr et SQTL3 du fait de l'opposition des effets des mutations associées à ces syndromes. En effet, les mutations de *SCN5A* impliquées dans le SBr induisent une perte de fonction du canal sodique $Na_v1.5$ alors que dans le cas du SQTL il s'agit de mutations entraînant un gain de fonction. Des études de la mutation *SCN5A-1795insD* par différentes approches, modèle informatique et modèle de souris transgéniques hétérozygotes pour cette mutation ont montré qu'à elle seule, la mutation, est suffisante pour causer plusieurs phénotypes (Clancy & Rudy, 2002; Remme *et al.*, 2006). Les souris transgéniques hétérozygotes pour cette mutation reproduisent plusieurs aspects électrocardiographiques observés chez les patients ayant un syndrome chevauchant SQTL-SBr. En effet, ces souris présentent : (i) un rythme cardiaque ralenti. (ii) un complexe QRS élargi, signe de troubles de conduction. (iii) un intervalle QT prolongé reflétant un retard de la repolarisation ventriculaire.

Des expériences de *patch-clamp* sur des cardiomyocytes isolés de souris transgéniques pour la mutation *SCN5A-1795insD* ont mis en évidence un allongement de la durée du potentiel d'action ventriculaire dû à l'augmentation du courant sodique persistant. Cet allongement est plus prononcé à des basses fréquences de stimulation. Ceci pourrait donc expliquer l'apparition d'un SQTL à un rythme cardiaque ralenti. D'autre part, la caractérisation fonctionnelle du courant sodique chez ces souris a aussi mis en évidence une diminution de l'amplitude du

courant au pic pouvant expliquer les troubles de conduction et le SBr (Remme *et al.*, 2006).

Par ailleurs, en se basant sur des modèles informatiques de potentiel d'action des différentes couches cellulaires cardiaques, Clancy et Rudy ont suggéré une explication cellulaire à la co-existence du SBr et du SQTL chez les porteurs de la mutation *SCN5A-1795insD*. A basses fréquences de stimulation, les cellules M mutées présentent un potentiel d'action d'une durée plus longue par rapport aux cellules M WT. Cet allongement peut expliquer l'apparition d'un QT long à ces fréquences là. En revanche, l'accélération de la cadence de stimulation provoque une diminution du courant sodique due à une diminution du nombre des canaux $Na_v1.5$ disponibles. Cette diminution induit un déséquilibre des courants entrants et sortants au niveau épicaudique induisant une perte de plateau du PA de ces cellules. Ceci augmente l'hétérogénéité de la repolarisation entre les différentes couches musculaires cardiaques et peut donc donner, à l'ECG, un aspect de SBr (Clancy & Rudy, 2002).

En plus du SBr et du SQTL, les mutations *SCN5A* ont également été trouvées dans d'autres arythmies ou des anomalies structurales cardiaques (tableau 3).

Tableau 3: Troubles du rythme et anomalies structurales associés à des mutations *SCN5A*

Pathologie	référence
Fibrillations ventriculaires idiopathiques	(Akai <i>et al.</i> , 2000)
Mort subite du nourrisson	(Wang <i>et al.</i> , 2007a)
Dysfonction sinusale	(Benson <i>et al.</i> , 2003)
Paralysie auriculaire associée à un SBr	(Takehara <i>et al.</i> , 2004)
Cardiomyopathie dilatée associée à des anomalies du système de conduction ou de la fibrillation auriculaire	(Olson <i>et al.</i> , 2005)
Tachycardies ventriculaires monomorphes et anomalies structurales du ventricule droit	(Frigo <i>et al.</i> , 2007)
Association d'un orage rythmique dans un contexte d'infarctus du myocarde	(Hu <i>et al.</i> , 2007)

Antzelevitch et coll ont également montré l'implication du gène *CACNA1C* chez des patients présentant un SBr isolé mais aussi chez des patients associant un SBr et un intervalle QT court (Antzelevitch *et al.*, 2007).

Les syndromes chevauchants augmentent la difficulté pour les cliniciens à choisir un traitement adapté. En effet, le traitement à la flécaïnide pour diminuer la durée de l'intervalle QT dans le cadre d'un SQTL de type 3 peut déclencher une surélévation du segment ST caractéristique du SBr et augmenter le risque de développer des arythmies ventriculaires (Priori *et al.*, 2000).

C. Canaux ioniques et troubles du rythme cardiaque

1. Na_v1.5, ses sous-unités régulatrices et les pathologies associées

Les canaux sodiques dépendants du potentiel ont un rôle fondamental dans l'excitabilité des neurones et des cardiomyocytes. En effet, le courant sodique I_{Na} est responsable de la phase de dépolarisation rapide du potentiel d'action ventriculaire. Ces canaux sont formés d'une sous-unité canalaire α de la famille des Na_v, régulée par différentes sous-unités auxiliaires.

Dans le cœur, les sous-unités α sont codées par plusieurs gènes. Celles dont l'expression a été détectée dans le tissu cardiaque sont Na_v1.5 (*SCN5A*, 3p21), Na_v1.1(*SCN1A*, 2q24.3), Na_v1.3 (*SCN3A*, 2q24), Na_v1.4 (*SCN4A*, 17q23-q25.3) et Na_v1.6(*SCN8A*, 12q13) (Haufe *et al.*, 2005). Na_v1.5 est l'isoforme majoritairement exprimée dans le cœur. Elle a été également décelée dans le cerveau (Hartmann *et al.*, 1999;Donahue *et al.*, 2000;Wang *et al.*, 2008) et dans le muscle squelettique où elle est exprimée uniquement durant le stade néonatal et dans certains cas de myopathies (Kallen *et al.*, 1990;Filatov & Rich, 2004).

a) Le canal sodique Na_v1.5

C'est en 1996 que l'isoforme Na_v1.5 du canal sodique a été identifiée pour la première fois dans les ventricules cardiaques (Cohen, 1996). Elle est codée par le gène *SCN5A* (Wang *et al.*, 1996), localisée sur le chromosome 3q21-24 (George, Jr. *et al.*, 1995). Cette isoforme est préférentiellement exprimée au niveau des jonctions cellulaires ou disques intercalaires. En effet, Kucera et coll ont montré une co-localisation des canaux sodiques cardiaques avec la connexine 43 au niveau des disques intercalaires des myocytes ventriculaires (Kucera *et al.*, 2002). Na_v1.5 est

aussi exprimé d'une manière homogène au sarcolème et au niveau des tubules T (Scriven *et al.*, 2000;Brette & Orchard, 2006).

Le canal sodique $Na_v1.5$ appartient à la grande famille des canaux ioniques dépendants du potentiel. C'est une sous-unité α de 260 kDa hautement glycosylée, à laquelle peuvent être associée plusieurs sous-unités auxiliaires β de 30-40 kDa. Cette protéine est formée de quatre domaines transmembranaires homologues (DI à DIV) (figure 8). Chaque domaine contient six segments (S1-S6) divisés en deux modules fonctionnels distincts (Gellens *et al.*, 1992) :

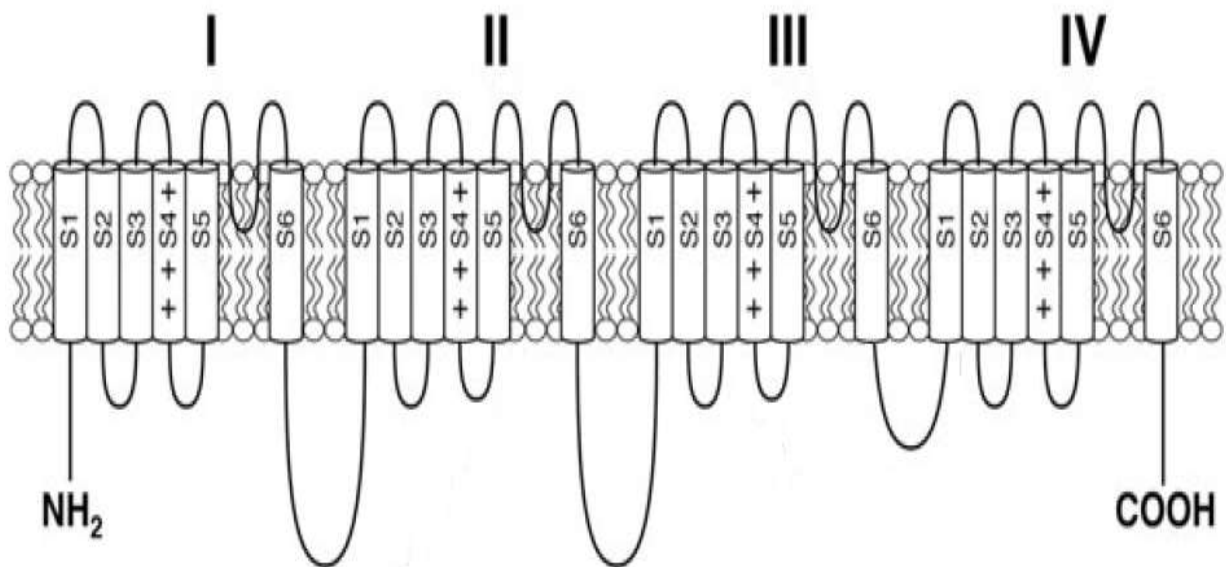


Figure 8: Représentation schématique de la structure du canal $Nav1.5$ (d'après Zakon *et al.*, 2008)

Les segments S1 à S4 constituent les «domaines voltage-sensors » contrôlant l'ouverture et la fermeture dépendantes du potentiel. Le segment S4, est un élément-clé dans le mécanisme de régulation par le potentiel. Ce segment est riche en résidus chargés positivement tels que l'arginine et la lysine. Ils lui confèrent sa sensibilité au potentiel qui se traduit par un mouvement du segment S4 à travers la membrane entraînant le changement de conformation du canal de l'état fermé à l'état ouvert. La substitution des résidus positifs par d'autres résidus neutres ou chargés négativement entraîne une modification de la sensibilité des canaux sodiques au potentiel. En effet, en utilisant l'ovocyte de Xénope comme modèle de ré-expression, la mutagenèse dirigée des différentes charges positives des segments S4 des domaines I et II du canal sodique $Na_v1.2$, modifie les cinétiques et la dépendance au potentiel de l'activation et de l'inactivation de ce canal (Stuhmer *et al.*, 1989). En

1997, l'équipe de Goldin a effectué une étude similaire en neutralisant les différentes charges des segments S4 des différents domaines transmembrinaires du canal $Na_v1.2$ (Kontis *et al.*, 1997). Les résultats diffèrent de ceux obtenus par Stühmer et coll. Pour une même mutation, R220Q par exemple, Stühmer et coll décrivent un décalage à la fois des courbes d'activation et d'inactivation vers des potentiels plus négatifs. Alors que Kontis et coll décrivent une accélération des cinétiques d'activation et pas de décalage de la dépendance au potentiel de l'activation. L'utilisation de l'ovocyte de Xénope comme système de ré-expression peut être à l'origine de ces différences du fait de l'existence d'autres conductances sodiques endogènes dans ce modèle (Krafte & Volberg, 1992).

Le pore du canal est formé par l'association des segments S5 et S6 des 4 domaines. Les segments S5 et S6 sont reliés par la boucle P (Chiamvimonvat *et al.*, 1996; Yamagishi *et al.*, 1997). De plus, la présence dans les segments P d'un filtre sélectif, constitué par le motif DEKA (Asp-Glu-Lys-Ala) est déterminante dans la sélectivité de ces canaux. La troncation de ce motif altère la sélectivité du canal sodique (Hilber *et al.*, 2005).

D'autres régions participent également à la régulation des canaux sodiques tels que l'interdomaine I-II. Cette partie du canal possède plusieurs sites de phosphorylation par la protéine kinase AMPc-dépendante (PKA) (Zhou *et al.*, 2002). L'interdomaine III-IV agit comme une porte d'inactivation qui se lie au site intracellulaire du pore pour l'inactiver (Vassilev *et al.*, 1988). Il s'agit de l'inactivation de type « ball and chain ». Le peptide IFM (Ile-Phe-Met) localisé au niveau de cet interdomaine constitue la particule d'inactivation. La substitution de ces trois résidus par des glutamines empêche le canal de s'inactiver alors que l'application intracellulaire de peptides renfermant ce motif rétablit cet état fonctionnel du canal sodique (Eaholtz *et al.*, 1994).

La queue C-terminale semble aussi jouer un rôle important dans le processus d'inactivation des canaux sodiques (Deschenes *et al.*, 2001; Cormier *et al.*, 2002). Il a été rapporté que la substitution de cette région du canal provoque une accélération de l'inactivation (Mantegazza *et al.*, 2001).

La queue C-terminale jouerait un rôle stabilisateur de l'état inactivé du canal en interagissant avec l'interdomaine III-IV de $Nav1.5$. Cette interaction est nécessaire pour la stabilisation de l'état inactivé du canal (Motoike *et al.*, 2004).

b) Protéines régulatrices associées

D'un point de vue moléculaire, un courant ionique ne dépend pas uniquement de la nature du canal. L'adressage vers la membrane plasmique de la protéine-canal, la cinétique et la dépendance au potentiel du courant dépendent aussi de facteurs propres à chaque type cellulaire et, en particulier, de l'expression de différentes protéines régulatrices. Les protéines-canal s'inscrivent au sein de complexes canaux comprenant différents constituants. Ainsi, le canal sodique cardiaque $Na_v1.5$ interagit avec plusieurs protéines (Figure 9). L'identité et les effets fonctionnels des principales protéines régulatrices de $Na_v1.5$ sont résumés dans l'annexe 2.

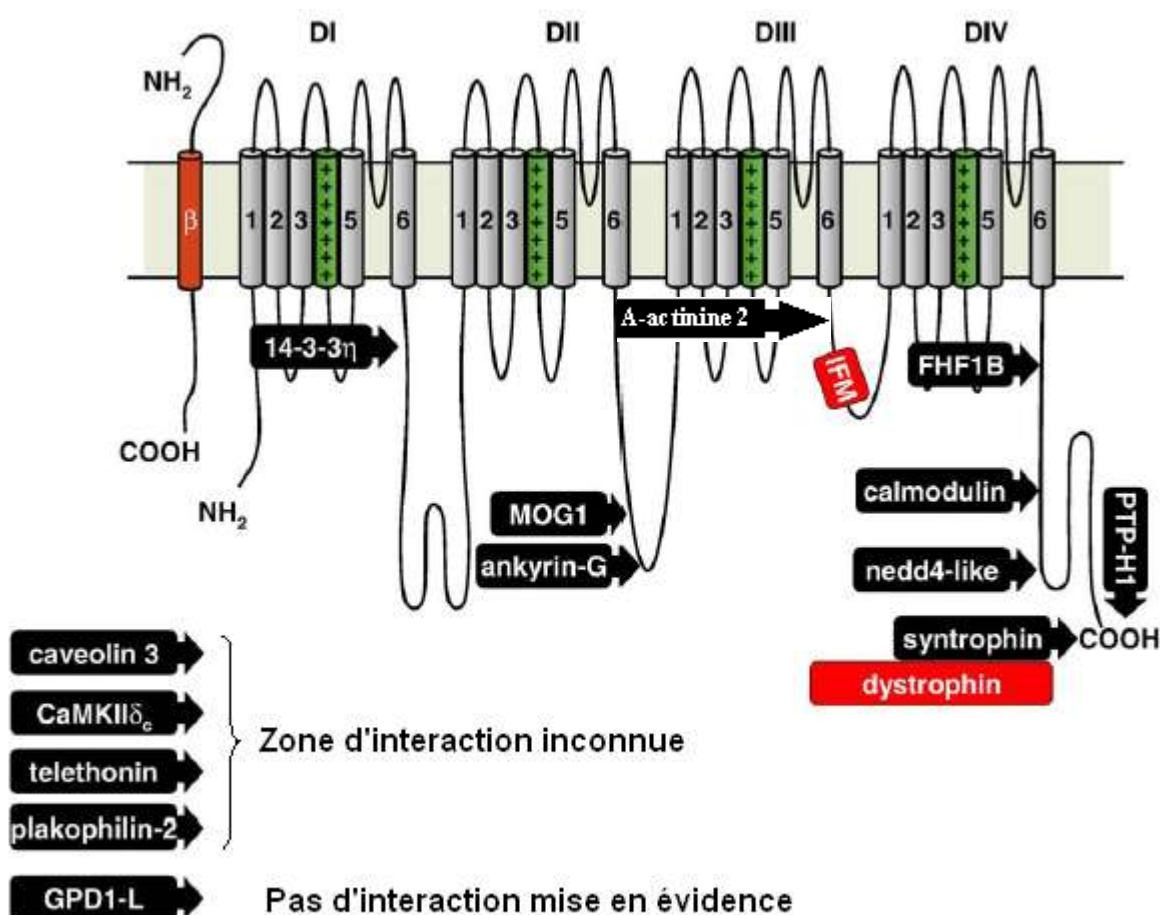


Figure 9: Représentation schématique du canal sodique $Nav1.5$ et ses protéines régulatrices (Abriel, 2010)

L'identification des protéines partenaires des canaux ioniques ainsi que l'étude de leurs effets sur le fonctionnement du canal sont actuellement basées sur l'utilisation de systèmes d'expressions hétérologues comme les cellules de type

COS, HEK ou CHO. Comme illustré dans l'annexe 2, les effets fonctionnels des protéines régulatrices des canaux ioniques peuvent être très variables en fonction des systèmes d'expression cellulaire, des protocoles ou encore des isoformes protéiques utilisés. Pour illustrer mes propos, je vais détailler le cas des sous-unités auxiliaires β des canaux sodiques.

➤ Les sous-unités auxiliaires β

Les sous-unités $\text{Na}_v\beta$ sont des glycoprotéines transmembranaires. Elles sont constituées d'une grande partie extracellulaire N-terminale contenant un domaine de type immunoglobuline, un segment transmembranaire et une partie C-terminale intracellulaire. Quatre sous-unités $\text{Na}_v\beta$ ont été décrites dans la littérature, $\text{Na}_v\beta 1$ (*SCN1B*), $\text{Na}_v\beta 2$ (*SCN2B*), $\text{Na}_v\beta 3$ (*SCN3B*) et $\text{Na}_v\beta 4$ (*SCN4B*) (Isom *et al.*, 1992; Isom *et al.*, 1995; Morgan *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2003). Les sous-unités $\text{Na}_v\beta 1$ et $\text{Na}_v\beta 3$ s'associent d'une manière non covalente aux canaux sodiques dépendants du potentiel, tandis que cette liaison se fait par des ponts disulfures pour les sous-unités $\text{Na}_v\beta 2$ et $\beta 4$ (Messner & Catterall, 1985; Morgan *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2003). Les études immunohistochimiques sur le cœur de souris ont démontré la localisation de $\text{Na}_v 1.5$, des sous-unités $\text{Na}_v\beta 2$ et $\beta 4$ dans les disques intercalaires (Maier *et al.*, 2004) alors que les sous-unités $\text{Na}_v\beta 1$ et $\beta 3$ sont surtout présentes dans les tubules T où une fraction de $\text{Na}_v 1.5$ a été également détectée (Dhar *et al.*, 2001).

D'autres études ont montré l'existence de transcrits alternatifs de la sous-unité $\text{Na}_v\beta 1$ chez le rat (Kazen-Gillespie *et al.*, 2000) et chez l'homme (Qin *et al.*, 2003).

Le rôle physiopathologique des sous-unités $\text{Na}_v\beta$ a été mis en évidence, pour la première fois, par l'identification d'une mutation dans le gène *SCN4B* chez des patients atteints du syndrome du QT long de type 10 (Medeiros-Domingo *et al.*, 2007). L'étude fonctionnelle de cette mutation dans les cellules HEK293 a révélé une augmentation du courant sodique persistant. Par la suite, d'autres mutations des gènes codant pour d'autres isoformes de la sous-unité β ont été identifiées chez des patients atteints de troubles du rythme cardiaque (Hu *et al.*, 2009; Watanabe *et al.*, 2009). L'isoforme β la plus étudiée est $\text{Na}_v\beta 1$. L'effet de cette sous-unité sur le fonctionnement de $\text{Na}_v 1.5$ *in vitro* fait l'objet d'une controverse (tableau 4).

Tableau 4: Effets de la sur-expression de la sous unité $\beta 1$ sur le canal sodique cardiaque $Na_v1.5$

Type cellulaire	Espèce de la sous-unité $Na_v\beta 1$	Espèce de la protéine canal $Na_v1.5$	Effet de la sur-expression de $Na_v\beta 1$	Auteur
Ovocyte de Xénope	Rat	Rat	- Augmentation de I_{Na} au pic. - Aucun effet sur les paramètres biophysiques du canal sodique.	(Qu <i>et al.</i> , 1995)
	Rat	Humain	- Augmentation de I_{Na} au pic. - Accélération de la cinétique de levée d'inactivation.	(Fahmi <i>et al.</i> , 2001)
	Humain	Humain	Aucun effet	(Makita <i>et al.</i> , 1994)
HEK tsA 201	Humain	Humain	- Aucun effet sur l'amplitude de I_{Na} . - Décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs.	(Dhar <i>et al.</i> , 2001)
	Humain	Humain	- Augmentation de l'amplitude de I_{Na} au pic. - Augmentation du courant sodique persistant. - Ralentissement des cinétiques d'inactivation. - Décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus positifs.	(Maltsev <i>et al.</i> , 2009)

HEK293	Rat	Humain	- Facilitation de l'adressage du canal à la membrane.	(Zimmer <i>et al.</i> , 2002)
	Rat	Humain	- Décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus positifs. - Diminution du courant sodique persistant.	(Valdivia <i>et al.</i> , 2002)

Un des arguments majeurs en faveur de l'utilisation des systèmes d'expressions hétérologues pour la caractérisation fonctionnelle d'une mutation ou l'étude de l'effet fonctionnel d'une protéine régulatrice du canal sodique $Na_v1.5$ est l'absence d'expression endogène de ce canal. Cependant, dans l'exemple pris ici (l'effet de la sous-unité $Na_v\beta1$), il existe une grande disparité dans les résultats obtenus en fonction du système d'expression cellulaire utilisé (tableau 4). Cette disparité peut aussi exister au sein d'un même modèle cellulaire. Ceci suggère fortement que l'effet de $Na_v\beta1$ est influencé par d'autres paramètres dépendants ou non du modèle cellulaire utilisé. En effet, l'existence d'une conductance sodique endogène régie par le canal $Na_v1.7$ ainsi que l'expression endogène de $Na_v\beta1A$ ont été mise en évidence dans les cellules HEK293 (Moran *et al.*, 2000; He & Soderlund, 2010). L'expression de ces protéines est un des éléments pouvant expliquer les différences des résultats observés entre ce modèle cellulaire et les autres systèmes d'expressions hétérologues. En plus de l'existence de conductances endogènes, d'autres facteurs peuvent expliquer cette variabilité intercellulaire tels que la différence d'expression de protéines partenaires du canal sodique $Na_v1.5$ selon le système d'expression. Ces partenaires peuvent être des sous-unités auxiliaires et/ou des sous-unités α canalaires. En effet, dans une étude à laquelle l'équipe a participé, il a été démontré que les sous-unités α des canaux ioniques peuvent interagir entre elles, c'est le cas par exemple de l'interaction directe entre les canaux $K_v7.1$ et $K_v11.1$ où le canal $K_v7.1$ joue un rôle dans l'adressage à la membrane du canal $K_v11.1$ (Biliczki *et al.*, 2009). D'autre part, et comme on peut constater dans le

tableau 4, il existe une variabilité intracellulaire de l'effet de la sous-unité $\text{Na}_v\beta 1$. Ceci peut être dû à l'utilisation des protéines $\text{Na}_v\beta 1$ provenant d'espèces différentes. Cependant, cette explication me semble peu probable du fait : (i) l'utilisation de $\text{Na}_v\beta 1$ provenant de la même espèce et dans le même modèle cellulaire ne donne pas forcément les mêmes résultats (tableau 4). (ii) l'alignement des séquences protéiques des sous-unités $\text{Na}_v\beta 1$ humaine et de rat montre un très fort degré d'identité de ces deux séquences (97%, figure 10). Cet argument est à nuancer. Les deux séquences diffèrent au niveau de plusieurs acides aminés. Deux substitutions (du rat à l'humain) retiennent l'attention :

- La substitution W18C, pourrait provoquer des modifications fonctionnelles de la sous-unité $\text{Na}_v\beta 1$ en créant de nouvelles interactions par des ponts dissulfures.
- La substitution A191T pourrait être à l'origine de la création de nouveaux sites de phosphorylation et donc modifier la fonction de $\text{Na}_v\beta 1$.

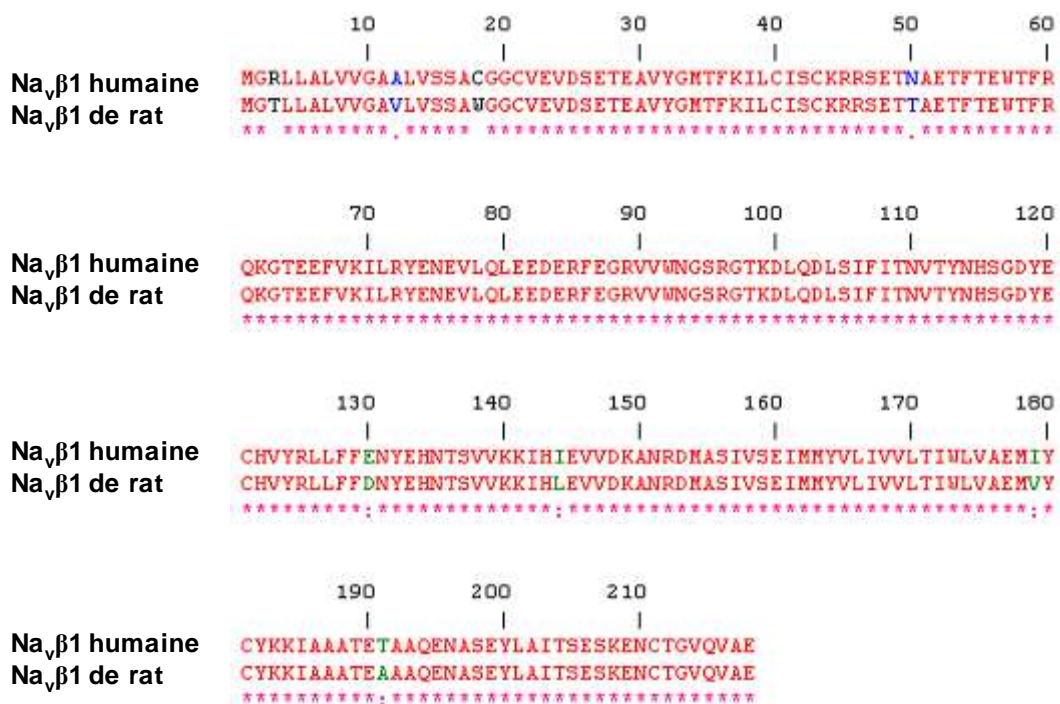


Figure 10 : Alignement des séquences protéiques des sous-unités $\text{Na}_v\beta 1$ humaine et de rat.

Partant de cette observation, une alternative au système de ré-expression consiste à étudier la régulation du canal sodique $\text{Na}_v 1.5$ par la sous-unité $\text{Na}_v\beta 1$ directement dans les cardiomyocytes. Des souris KO pour le gène *SCN1B* ont été générées. Les résultats obtenus par Lopez-Santiago et coll mettent en évidence

chez ces souris un allongement de l'intervalle QT qui a pour origine un allongement du potentiel d'action ventriculaire. Cet effet serait dû à une augmentation à la fois du courant sodique au pic et du courant sodique persistant (Lopez-Santiago *et al.*, 2007). Cependant, ces résultats ne permettent pas d'établir un mécanisme clair permettant d'expliquer le phénotype des souris. La protéine $\beta 1$ régulerait d'autres canaux ioniques. En effet, en 2008, Deschênes et coll ont montré, dans un modèle de cardiomyocytes néonataux de rat, l'implication de cette protéine dans la régulation du canal potassique $K_v4.3$ (Deschenes *et al.*, 2008). L'extinction de l'expression de $Na_v\beta 1$ provoque une diminution des niveaux d'expression de $Na_v1.5$, $KChIP2$ et de $K_v4.3$, ce qui se traduit au niveau fonctionnel par une diminution du courant I_{to} et I_{Na} . On peut donc imaginer que le phénotype des souris dans l'étude de Lopez-Santiago est le résultat d'une combinaison de multiples modifications de l'activité des canaux ioniques régulée par $Na_v\beta 1$ et non pas des seules modifications du courant sodique.

Un modèle cellulaire alternatif permettant la caractérisation fonctionnelle de mutations identifiées chez des patients atteints d'une maladie cardiaque vient de voir le jour. Il s'agit des cellules-souches pluripotentes induites (cellules iPS). Ces cellules représentent une avancée majeure dans la recherche biomédicale. Elles sont obtenues à partir de cellules adultes différenciées, des fibroblastes cutanés, reprogrammées par l'expression de 4 facteurs de transcription (Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc). Elles présentent toutes les caractéristiques des cellules-souches embryonnaires (cellules ES) sans leurs inconvénients (difficulté d'obtention, problèmes éthiques et légaux liés à la destruction d'embryons) (Takahashi & Yamanaka, 2006).

Comme les cellules ES, les cellules iPS peuvent être re-différenciées. Récemment, Moretti et coll ont réussi à obtenir des cellules iPS à partir de fibroblastes de peau de patients atteints du syndrome de QT long de type 1. Le criblage des gènes des patients atteints a mis en évidence une mutation faux-sens R190Q de la protéine $K_v7.1$. Ces cellules ont été re-différenciées en différents types cellulaires cardiaques (ventriculaires, atriales et nodales). En comparaison avec celles dérivées de patients contrôles, ces cellules présentent une durée de potentiel d'action prolongée et une susceptibilité plus importante à développer des arythmies (Moretti *et al.*, 2010). La caractérisation fonctionnelle de cette mutation, en utilisant la lignée dérivée de ces patients, a permis de mettre en évidence un effet dominant

négalif de cette mutation. Ceci se traduit par une diminution de 70 à 80% du courant I_{Ks} (Moretti *et al.*, 2010).

On peut donc constater que les cellules iPS re-différenciées en cardiomyocytes peuvent permettre d'étudier les mécanismes cellulaires associés au phénotype dans le contexte génétique exact du patient. Elles constituent un modèle complémentaire aux systèmes d'expressions hétérologues et des approches d'inactivations de gènes chez les souris transgéniques.

Dans la même optique, l'équipe de Ieda et coll a réussi à re-différencier des fibroblastes de peau directement en cardiomyocytes sans passer par l'étape de genèse de cellules iPS. Cela a été rendu possible grâce à l'infection de ces fibroblastes par les facteurs de transcription Gata4, Mef2c et Tbx5 (Ieda *et al.*, 2010).

Malgré l'avancée qu'elles présentent dans la recherche sur les pathologies humaines, les iPS ont cependant l'inconvénient d'être obtenues à l'aide de vecteurs viraux ou de plasmides pouvant être mutagènes ou oncogènes, ce qui peut induire des modifications génomiques de ces cellules.

c) Pathologies associées

Comme vu précédemment, on peut classer les mutations de *SCN5A* selon leurs conséquences fonctionnelles et y associer un phénotype particulier. Les mutations entraînant une perte de fonction sont associées au syndrome de Brugada et aux troubles de conduction et celles entraînant un gain de fonction sous la forme d'un courant Na^+ persistant au syndrome du QT long. Cependant, comme vu plus haut, la même mutation peut donner deux phénotypes différents (*cf* syndrome chevauchant). Un grand nombre de ces mutations a été répertorié dans la revue récente de Ruan et coll (figure 11) (Ruan *et al.*, 2009).

(Transient ou Tiny (Nowycky *et al.*, 1985). C'est un courant activé par des faibles dépolarisations, rapidement inactivé, et ayant une petite conductance élémentaire (Williams *et al.*, 1997). (ii) Les canaux de type HVA (High Voltage Activated), responsables du courant calcique de type L (Long Lasting). Ils s'activent pour de fortes dépolarisations, avec une inactivation très lente et une conductance élémentaire assez élevée (Fox *et al.*, 1987).

Dans le muscle cardiaque, le muscle lisse et le muscle squelettique, la majorité des canaux calciques fait partie de la famille des HVA. La caractéristique essentielle des canaux de type L est leur sensibilité aux antagonistes calciques comme la famille des dihydropyridines (DHP) (Flockerzi *et al.*, 1986; Takahashi *et al.*, 1987), les phenylalkylamines et les benzothiazepines. Ces canaux sont aussi impliqués dans la libération d'hormones par les cellules endocrines (Milani *et al.*, 1990) et dans la régulation de l'expression des gènes dans les neurones (Bean, 1989). Plusieurs isoformes de la sous-unité $\alpha 1$ ont été caractérisés dans des tissus différents : la sous-unité $\alpha 1s$ dans le muscle squelettique (Tanabe *et al.*, 1987), $\alpha 1c$ dans le muscle cardiaque (Mikami *et al.*, 1989), $\alpha 1d$ dans les neurones (Snutch *et al.*, 1990) et $\alpha 1f$ dans la rétine (Morgans *et al.*, 2001).

a) Le canal $Ca_v1.2$

Au niveau cardiaque, ce sont des complexes protéiques formés de la sous-unité $\alpha 1c$ ou $Ca_v1.2$ formant le pore du canal, à laquelle sont associées les sous-unités régulatrices $\beta 2a$, $\alpha 2/\delta$ et γ selon une stœchiométrie de 1:1:1:1 (Catterall, 2000) ; figure 12). Ces canaux sont préférentiellement localisés au niveau des tubules T des cardiomyocytes ventriculaires (Wibo *et al.*, 1991; Carl *et al.*, 1995; Jurevicius & Fischmeister, 1997; Scriven *et al.*, 2000).

le domaine AID « Alpha Interacting Domain », correspondant à la séquence QQLEEDL-GY-WITQ-E, indispensable à l'interaction avec le domaine ABP, « α binding pocket », des sous-unités β des canaux calciques (Pragnell *et al.*, 1994; Van Petegem *et al.*, 2008). Cette interaction masque une séquence de rétention endoplasmique, et permet ainsi l'adressage du canal à la membrane (Bichet *et al.*, 2000). D'autre part, interdomaines I-II et III-IV sont impliqués dans le processus d'inactivation dépendante du potentiel et de type « Ball and chain » des canaux calciques de type L. En effet, l'interdomaine I-II agit comme une porte d'inactivation en se liant à la partie intracellulaire du pore du canal pour l'inactiver, tandis que l'interaction de cette boucle avec l'interdomaine III-IV favorise l'inactivation du canal (Bernatchez *et al.*, 2001; Berrou *et al.*, 2001; Geib *et al.*, 2002).

Les parties intracellulaires N et C-terminales contiennent de nombreuses zones d'interaction avec les protéines régulatrices de $Ca_v1.2$ qui modulent des paramètres biophysiques du canal tels que l'inactivation calcium-dépendante, le phénomène de la facilitation d'entrée de calcium ou encore l'adressage du canal à la membrane (*cf.* protéines régulatrices). D'autre part, l'épissage alternatif du canal calcique $Ca_v1.2$ donne lieu à des formes tronquées au niveau de sa queue C-terminale (Liao *et al.*, 2005). L'étude du rôle de cette troncation a révélée que la partie tronquée inhibe le canal calcique (Gao *et al.*, 2001; Hulme *et al.*, 2006). Par ailleurs, il a été rapporté que la translocation d'un fragment de la partie C-terminale de $Ca_v1.2$ dans le noyau joue un rôle de facteur de transcription (Gomez-Ospina *et al.*, 2006).

b) Protéines régulatrices associées

Les principales protéines, identifiées à ce jour, régulant le canal $Ca_v1.2$ ainsi que leurs effets sur son fonctionnement sont résumés dans le tableau de l'annexe 2.

L'importance de la régulation des canaux ioniques par leurs protéines partenaires et du système de ré-expression choisi prend tout son sens dans l'exemple du canal calcique $Ca_v1.2$. En effet, la ré-expression de ce dernier dans un système d'expression hétérologue est difficile. L'expérience acquise dans notre laboratoire, lors de l'étude de l'effet de certains variants de ce canal (*cf.* projet QT court), a montré l'importance du choix du modèle cellulaire pour la ré-expression du

canal $Ca_v1.2$. Seule l'utilisation des HEK tsA-201 nous a permis d'enregistrer un courant calcique mesurable.

c) Pathologies associées

Plusieurs mutations de *CACNA1C* et de *CACNB2* ont été associées à certains troubles de rythme cardiaques. En 2004, Splawski et coll ont identifié la mutation G406R du gène *CACNA1C* chez des patients atteints du syndrome de Timothy. Ce syndrome se caractérise par l'atteinte de plusieurs organes dont le cœur. A ce niveau, les patients présentent un allongement de l'intervalle QT (QTL de type 8) (Splawski *et al.*, 2004). L'étude fonctionnelle de cette mutation dans des cellules HEK293 a mis en évidence un fort ralentissement des cinétiques d'inactivation dépendantes du potentiel pouvant expliquer l'allongement du QT observé chez ces patients (Barrett & Tsien, 2008). En 2007, Antzelevitch et coll ont identifié les mutations G490R et A39V du gène *CACNA1C* et S481L du gène *CACNB2* chez des patients atteints du syndrome de Brugada associé ou non au syndrome du QT court (Antzelevitch *et al.*, 2007). Ces trois mutations provoquent une réduction de l'amplitude du courant calcique au pic. Plus récemment la mutation T11I du gène *CACNB2b* a été identifiée chez un patient atteint du syndrome de Brugada. Sa caractérisation fonctionnelle montre que la présence de cette mutation n'affecte pas la densité du courant au pic. En revanche, une accélération des cinétiques d'inactivation est observée induisant ainsi une perte de fonction du canal calcique $Ca_v1.2$ (Cordeiro *et al.*, 2009).

D'autre part, Antzelevitch et coll ont récemment identifié les gènes *CACNA1C*, *CACNB2* et *CACNA2D1* comme de nouveaux gènes de susceptibilité dans le cas du syndrome de la repolarisation précoce (Burashnikov *et al.*, 2010). Ce syndrome a été récemment décrit comme nouveau syndrome de la mort subite cardiaque par fibrillation ventriculaire sur cœur sain. Il se caractérise par une élévation de la jonction QRS-ST avec un point J $\geq 0,1$ mV dans les dérivations latérales (V4-V6, D1, aVL) ou inférieures (DII, DIII, aVF), ou un défaut à la fin du complexe QRS (encoche ou empâtement ; figure 13). Cet aspect électrocardiographique a été retrouvé plus fréquemment chez les patients avec une fibrillation ventriculaire (31% versus 5%) que dans une population contrôle (Haissaguerre *et al.*, 2008).

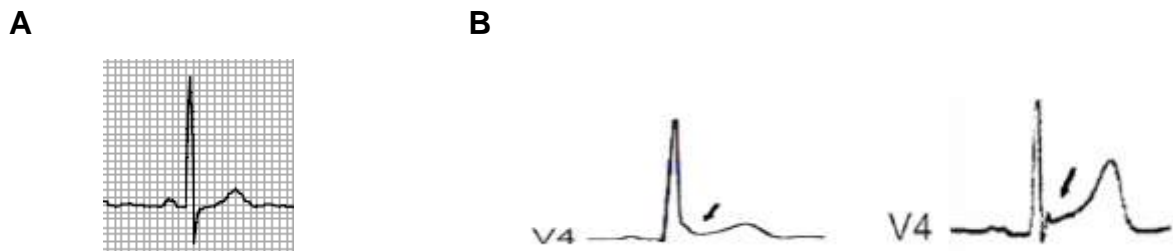


Figure 13 : L'élévation de la jonction complexe QRS segment ST est caractéristique du syndrome de repolarisation précoce. (A) ECG d'un individu sain ; (B) ECG d'individus atteints du syndrome de repolarisation précoce enregistrés dans la dérivation latérale V4 (Haissaguerre *et al.*, 2008)

3. Les canaux K_v4 , leurs sous-unités régulatrices et les pathologies associées

Les canaux potassiques participent à de nombreuses fonctions biologiques et sont notamment responsables du maintien du potentiel transmembranaire, des différentes phases de repolarisation du potentiel d'action des cellules ventriculaires cardiaques. Ces canaux sont hautement sélectifs aux ions K^+ . Ces protéines membranaires représentent le groupe de canaux le plus diversifié, aussi bien en termes de types identifiés, qu'en termes de phénomènes biologiques dans lesquels ils sont impliqués.

Plusieurs familles structurales de canaux K^+ ont été décrites. Parmi lesquelles, les K_v forment la famille des canaux potassiques dépendants du potentiel.

Le clonage du gène codant le canal Shaker de la Drosophile a conduit à l'identification de la première sous-unité α d'un canal K^+ de type dépendant du potentiel (Kamb *et al.*, 1987; Papazian *et al.*, 1987).

Par la suite, trois autres gènes de drosophile codant pour d'autres canaux potassiques : Shab, Shaw et Shal ont été identifiés (Butler *et al.*, 1989; Covarrubias *et al.*, 1991). Des homologues de ces quatre canaux sont retrouvés chez les mammifères. Ces canaux sont appelés K_v1 (homologues du Shaker), K_v2 (homologues du Shab), K_v3 (homologues du Shaw) et K_v4 (homologues du Shal) (Chandy & Gutman, 1993). D'autres gènes identifiés chez les mammifères ou les plantes sans équivalent chez la drosophile définissent de nouvelles sous-familles K_v5 , K_v6 , K_v7 (Zhao *et al.*, 1994), K_v8 (Hugnot *et al.*, 1996) et K_v9 (Salinas *et al.*, 1997).

a) Les canaux potassiques K_v4

Les canaux K_v4 sont exprimés dans de nombreux tissus avec un haut niveau d'expression dans le cerveau, les vaisseaux et le cœur. Dans ce dernier, ils sont responsables du courant transitoire sortant I_{to} impliqué dans la phase de repolarisation précoce du potentiel d'action ventriculaire. Ce courant est généré par les sous-unités canalaire $K_v4.2$ et $K_v4.3$ codés respectivement par les gènes *KCND2* et *KCND3*. $K_v4.3$ représente la forme prédominante chez l'homme et le chien et $K_v4.2$ la forme principale chez la souris (Dixon *et al.*, 1996;Kong *et al.*, 1998;Zhu *et al.*, 1999;Guo *et al.*, 2005;Gaborit *et al.*, 2007).

Contrairement au canaux sodiques et calciques, les canaux K_v4 s'organisent en homo ou hétérotétramères de sous-unités α qui forment le pore du canal (Christie *et al.*, 1990;Isacoff *et al.*, 1990;Ruppertsberg *et al.*, 1990;MacKinnon, 1991). Ces sous-unités sont formées de 6 segments transmembranaires S1 à S6 avec les extrémités N- et C-terminales intra-cytoplasmiques (figure 14). Le segment S4 possédant des résidus chargés positivement constitue le « voltage-sensor » du canal (Snyders, 1999). Entre les segments S5 et S6 se retrouve la boucle du pore P contenant le motif G(Y/F)G qui confère la sélectivité aux ions K^+ (Doyle *et al.*, 1998).

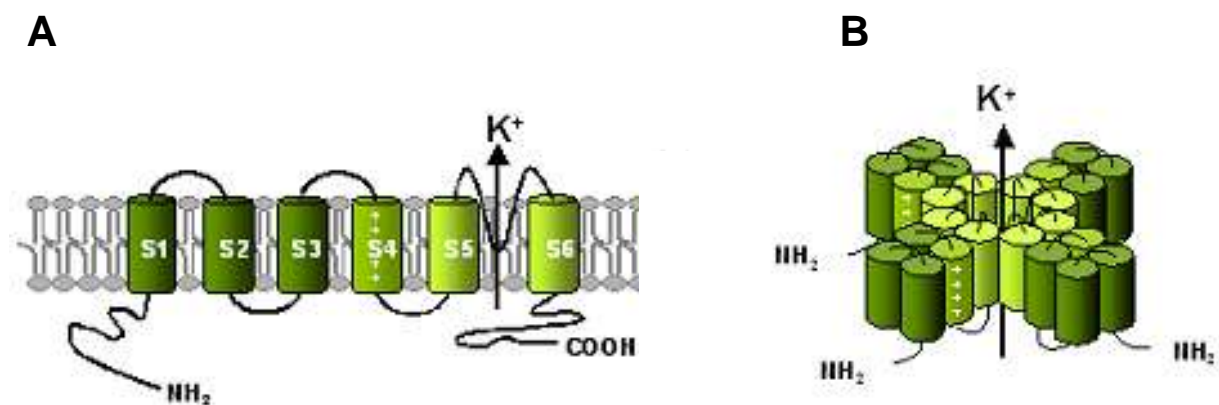


Figure 14: A, schéma de la sous-unité α des canaux K_v4 à 6 segments transmembranaires B, Schéma de la structure tétramérique d'un canal Kv

La partie intracellulaire N-terminale a un rôle important dans la régulation de ces canaux. En effet, le domaine de tétramérisation, T1, des sous-unités α est situé au niveau de cette extrémité (Shen & Pfaffinger, 1995). De plus, des expériences de mutagenèse dirigée dans ce domaine montrent qu'il peut y avoir un changement de la dépendance au potentiel de l'activation et de l'inactivation ainsi que l'accélération

ou le ralentissement de ces cinétiques (Cushman *et al.*, 2000). Enfin, l'extrémité N-terminale a été décrite pour être impliquée dans l'inactivation de type « ball and chain » des canaux K_v4 (Gebauer *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007b).

b) Les protéines régulatrices associées

Les canaux K_v4 interagissent avec un grand nombre de protéines régulatrices modulant leurs adressages vers la membrane plasmique, leurs cinétiques ou encore leur dépendance au potentiel. Les principales protéines interagissant avec les canaux K_v4 sont résumées dans l'annexe 3.

c) Pathologies associées

D'une manière surprenante, aucune pathologie n'a directement été liée à des mutations situées dans les gènes codant pour les canaux K_v4 . En revanche, plusieurs études ont mis en évidence l'association de mutations de gènes codant pour les protéines régulatrices des canaux K_v4 tels que la protéine DPPX dans la fibrillation ventriculaire idiopathique (Alders *et al.*, 2009). Cette protéine fait partie de la famille des sérines protéases mais est dépourvue de l'activité protéolytique caractéristique de ces protéines. Des études récentes ont montré que DPPX serait un régulateur potentiel des canaux potassiques dépendants du potentiel $K_v4.3$ et modifierait leurs propriétés biophysiques et leur expression (Radicke *et al.*, 2005). D'autre part, la mutation R99H de la protéine KCNE3 a été associée à des cas de syndrome de Brugada en provoquant une augmentation de la densité du courant I_{to} en comparant avec KCNE3 sauvage (Delpon *et al.*, 2008).

D. Objectifs de la thèse

Dans le cadre de ma thèse, je me suis intéressé aux bases moléculaires de certains troubles du rythme cardiaque pouvant conduire à la mort subite liée à des mutations génétiques.

Le premier travail présenté ici a été effectué en collaboration avec l'équipe de Cardiologie du CHU de Dijon. Une nouvelle arythmie cardiaque a été décrite. Chez le *propositus*, elle se manifeste sous la forme de contractions ventriculaires prématurées. Ces troubles du rythme ont pour origine des foyers ectopiques au niveau des fibres de Purkinje et sont sensiblement réduits par un traitement à la

quinidine. Un variant, R222Q, dans le gène *SCN5A* a été identifié chez les individus atteints de deux familles non liées. Dans ce projet, mon travail a été d'évaluer : (i) l'effet de ce variant sur l'activité du canal $Na_v1.5$ (ii) son implication dans l'apparition de cette arythmie cardiaque.

Le second projet a consisté à identifier les bases moléculaires du mécanisme conduisant au syndrome du QT court. En effet, le criblage d'une cohorte de patients atteints du syndrome du QT court a permis d'identifier le variant A223P dans le gène *CACNA1C*, gène codant pour le canal calcique $Ca_v1.2$, chez un patient. En plus du variant A223P, un variant du gène *OCTN2* qui code un transporteur de la carnitine. Ce projet a consisté à évaluer l'effet du variant A223P sur l'activité de $Ca_v1.2$ et d'étudier sa régulation potentielle par la carnitine.

Enfin, le dernier projet présenté était d'étudier l'effet d'un variant du gène *DPP6*, gène codant pour la protéine DPPX « Dipeptidyl-aminopeptidase-like protein ». Ce variant a été identifié chez une famille dont quelques membres sont atteints par le syndrome de Brugada. Il conduit, au niveau protéique, à la substitution d'une thréonine par une méthionine en position 501. Mon projet a été donc de caractériser l'effet du variant T501M à la fois sur le courant I_{to} régi par les canaux $K_v4.3$ et sur le déroulement du potentiel d'action.

Résultats et discussion

A. Tachycardie multifocale automatique du Purkinje

1. Introduction

Le canal sodique cardiaque dépendant du potentiel, $Na_v1.5$, joue un rôle fondamental dans les cellules cardiaques. Il est exprimé au niveau des disques intercalaires, sarcolème et au niveau des tubules T des cardiomyocytes de rat (Scriven *et al.*, 2000;Kucera *et al.*, 2002;Brette & Orchard, 2006). Au niveau fonctionnel, ce canal est responsable de la phase de dépolarisation rapide du potentiel d'action.

De nombreuses études ont associé certaines mutations du gène *SCN5A* à de nombreux troubles de rythme cardiaque d'origine héréditaire (Zimmer & Surber, 2008). Dans le cas du syndrome du QT long, il s'agit de mutations gain de fonction, avec un courant I_{Na} persistant retardant la repolarisation (Bennett *et al.*, 1995;Kambouris *et al.*, 1998). Dans le syndrome de Brugada et les troubles de conduction, il s'agit au contraire de mutations perte de fonction (Chen *et al.*, 1998;Schott *et al.*, 1999). En plus de ces syndromes, initialement considérés comme des entités cliniques indépendantes, plusieurs études portant sur le gène *SCN5A* font état de phénotypes différents pour une même mutation de ce gène (Bezzina *et al.*, 1999;Kyndt *et al.*, 2001). Ces nouvelles entités sont connues sous le nom de syndromes chevauchants.

Dans ce travail, initié par Gabriel Laurent de l'équipe de Cardiologie du CHU de Dijon, une nouvelle canalopathie sodique a été décrite. Elle se manifeste par une tachycardie multifocale automatique du Purkinje. Chez le *propositus*, elle entraîne des contractions ventriculaires prématurées associées à une cardiomyopathie dilatée. Ces troubles de rythme ont pour origine des foyers ectopiques au niveau des fibres de Purkinje et sont sensiblement réduits par un traitement à la quinidine.

Une enquête familiale a été menée et a permis d'identifier, chez deux familles non-apparentées, 11 hommes et 7 femmes sur trois générations atteints avec ces mêmes troubles du rythme. L'âge de diagnostic varie de 24 semaines de gestation à 37 ans. Trois femmes et deux hommes présentent en plus des troubles du rythme

une cardiomyopathie dilatée (CMD). De plus, trois hommes dont un enfant sont décédés d'une mort subite.

Par une approche gène candidat, plusieurs gènes connus pour avoir des mutations responsables d'arythmies cardiaques associées à une cardiomyopathie dilatée ont été séquencés. Il s'agit des gènes *LMNA* codant pour la lamine A/C, *ABCC9* codant pour la sous-unité régulatrice des K_{ATP} SUR2 et le gène *SCN5A*. Le variant R222Q a été identifié dans le gène *SCN5A* chez tous les individus atteints de ces familles. Ce résidu est très conservé entre les espèces et constitue la deuxième charge du segment S4 du domaine I de $Na_v1.5$. Ce variant est absent chez 300 sujets contrôles.

Pour évaluer l'incidence de cette mutation et éventuellement l'associer au phénotype observé, une étude électrophysiologique du canal $Na_v1.5$ muté ainsi que des simulations informatiques à l'aide de modèles mathématiques de potentiels d'action ont été réalisées.

Multifocal ectopic Purkinje tachycardia: a new SCN5A-related cardiac channelopathy

Gabriel Laurent, MD, PhD, Samuel Saal, MD, Mohamed Yassine Amarouch, M.Sc, Laurence Faivre, MD, PhD, Julien Barc, PhD, Christian Dina, PhD, Geraldine Bertaux, MD, Sylvie Falcon-Eicher, MD, Olivier Barthez, MD, Christel Thauvin-Robinet, MD, Philippe Charron, MD, PhD, Pascale Richard, MD, PhD, Alice Maltret, MD, Elisabeth Villain, MD, Estelle Baron, B.A, Jean Mérot, PhD, Rodolphe Turpault, PhD, Yves Coudière, PhD, Flavien Charpentier, PhD, Jean Jacques Schott, PhD, Isabelle Baró, PhD, Vincent Probst, MD, PhD, Gildas Loussouarn, PhD, Florence Kyndt, PharmD, PhD, Jean Eric Wolf, MD, PhD.

Dr Laurent, Dr Saal, and Mr Amarouch contributed equally to this work.

Dr Loussouarn, Dr Kyndt and Pr Wolf contributed equally to this work as senior authors.

Submitted

From the CHU Dijon, Service de Cardiologie, Hôpital le Bocage, Dijon, France (G. La, G.B., S.F.E., O.B., J.E.W.), the CHU Dijon, Centre de Génétique, Hôpital d'Enfants, Dijon, France (S.S., L.F., C.T.R.), the INSERM, UMR915, l'institut du thorax, Nantes, France (M.Y.A., E.B., I.B., J.B., C.D., F.C., J.J.S., J.M., V.P., G.L., F.K.), the CNRS, ERL3147, Nantes, France (M.Y.A., E.B., I.B., J.B., C.D., F.C., J.J.S., J.M., V.P., G.L., F.K.), the Université de Nantes, Nantes, France (M.Y.A., E.B., I.B., J.B., C.D., F.C., J.J.S., J.M., V.P., G.Lou., F.K., R.T., Y.C.), the Centre de Référence Maladies Cardiaques Héritaires, Groupe La Pitié Salpêtrière, France (P.C., P.R.), the Cardiologie Pédiatrique, Université Paris V René Descartes, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France (A.M., E.V.), the CHU Nantes, l'institut du thorax, France (F.C., J.J.S., V.P.), the CHU Nantes, Service de génétique médicale, Nantes, France (F.K.), the CNRS, UMR6629, Laboratoire de Mathématiques Jean Leray, Nantes, France (R.T., Y.C.).

ABSTRACT

The aim of this study was to describe a new familial cardiac phenotype and to elucidate the electrophysiological mechanism responsible for the disease. We identified two unrelated families comprising 15 individuals affected by multifocal ectopic Purkinje tachycardia (MEPT) characterized by narrow junctional and rare sinus beats competing with premature ventricular contractions (PVCs) with right and/or left bundle branch block patterns. Dilated cardiomyopathy was identified in 5 affected patients, and sudden death was reported in 4 individuals. Electrophysiological studies demonstrated that PVCs originated from the Purkinje tissue. Hydroquinidine treatment dramatically decreased the number of PVCs and normalized the contractile function in two patients. We used a candidate gene approach to identify the mutated gene. All the affected subjects carried the c.665G>A transition in the SCN5A gene. Patch-clamp studies and computational modeling of resulting p.Arg222Gln Nav1.5 revealed a net gain of function of the sodium channel in Purkinje and ventricular cells, leading to early afterdepolarizations in Purkinje cells responsible for PVCs. In conclusion, we identified a new SCN5A-related cardiac syndrome, MEPT. The SCN5A mutation leads to a gain of function of the sodium channel responsible for hyperexcitability of the fascicular-Purkinje system. This familial arrhythmia and tachycardia-induced DCM-syndrome is responsive to hydroquinidine.

Key words: cardiac arrhythmia, His-Purkinje system, ventricular tachycardia, dilated cardiomyopathy, *SCN5A* mutation sodium current, computer modeling.

Primary arrhythmogenic disorders of the heart are a major cause of sudden cardiac death in otherwise healthy individuals with structurally normal hearts. They include congenital forms of long QT syndromes (LQT), short QT syndromes, the Brugada syndrome, catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia and early repolarization syndrome (1;2). Mutations in several genes encoding ion channels and channel-interacting proteins have emerged over the last decade as the basis for a variety of inherited cardiac arrhythmias (2-4). Different mutations in a single gene may account for various disorders depending on the position of the mutation, the nature of the amino acid substituted, the type of the mutation (non sense, false sense...) and its functional consequences (5;6).

The SCN5A gene encodes the pore-forming subunit of the voltage-gated Na⁺ channel Nav1.5. In the heart, this channel plays a key role in rapid impulse propagation through the conduction system and in the excitability of atrial and ventricular cardiomyocytes. Mutations in *SCN5A* are responsible for a spectrum of hereditary arrhythmias, including type-3 LQT (LQT3), the Brugada syndrome, cardiac conduction disease, sinus node dysfunction (6-8), atrial fibrillation and dilated cardiomyopathy (9, 10, 11). LQT3 mutant channels are characterized by an altered function leading to a persistent Na⁺ current during depolarization or to other gain-of-function features, that all contribute to the lengthening of the action potential (AP) duration (9;10). On the other hand, mutations linked to the Brugada syndrome and cardiac conduction disease cause non-functional or dysfunctional channels, resulting in strongly reduced or no Na⁺ currents (11-13). In addition to these syndromes, originally regarded as independent entities, recent evidence shows considerable clinical overlap, implying new disease entities known as overlap syndromes of the cardiac Na⁺ channel (14;15).

In this article, we report a novel autosomal dominant form of cardiac arrhythmia identified in two unrelated families (based on chromosomal analysis) and characterized by multifocal ectopic Purkinje tachycardia (MEPT). This arrhythmia is due to the c.665G>A *SCN5A* mutation leading to a shift in p.Arg222Gln Nav1.5 voltage-dependency MEPT syndrome is characterized by frequent premature ventricular contractions (PVCs) originating from various ectopic foci along the fascicular-Purkinje system occasionally associated with non-sustained ventricular tachycardia (NSVT), secondary dilated cardiomyopathy and sudden death.

RESULTS

We identified 2 families presenting a remarkably uniform phenotype, segregating with an autosomal dominant pattern over three generations (Figure 1A). In Family 1, 11 individuals out of 18 family members were affected by multifocal ectopic Purkinje tachycardia (MEPT). In Family 2, 4 individuals (out of 5) were affected by MEPT. Patient characteristics are summarized in Tables 1 and 2.

Clinical phenotype of the Family 1 proband (patient III.1)

Patient III.1 was identified at the age of 10 after mild dyspnea while exercising. Her 12-lead surface ECG showed a chaotic cardiac rhythm comprising narrow junctional and rare sinus beats competing with various QRS complexes showing a right bundle branch block (RBBB) pattern, corresponding to PVCs (Figure 2A). There was an overdrive suppression of the PVCs during treadmill exercising. Signal averaged ECG did not show late potentials. A Holter monitoring device recorded a huge amount (>50000/24h) of repetitive polymorphic PVCs. The trans-thoracic echocardiogram (TTE) revealed a mild dilation of the left ventricle (TM long-axis parasternal diastolic diameter: 54 mm or 40 mm/m², above 97th percentile) (16), but a normal left ventricular ejection fraction at that time (LVEF: 62%). She remained asymptomatic until the age of 13 when she was referred for brief sudden loss of consciousness at rest. The ECG exhibited recurrent NSVTs with RBBB patterns, which were concomitant with several fainting episodes (Figure 2B). An electrophysiological (EP) study identified the origin of the PVCs as various ectopic foci along the left anterior and posterior fascicles (Figure 2D). At least 10 different trigger foci were identified and therefore no ablation procedure was proposed. No reentrant mechanism was clearly evidenced, as no PVCs were pacing-induced, and the PVC firing was fairly increased by isoproterenol infusion. At that time, a new TTE showed a markedly enlarged left ventricular diastolic diameter (LVEDD: 62 mm), and a decreased LVEF (32%). A dual chamber implantable cardioverter-defibrillator (ICD) was then implanted associated with oral hydroquinidine treatment. Once the measured plasma level of the drug reached 1 mg/L (normal range 1-3 mg/L), this medication succeeded in markedly reducing the number of PVCs (table 2). Six months later, the LVEF reached 55%, but the left ventricular diastolic diameter remained enlarged. To date (after one year on hydroquinidine), the PVC burden is <1% of the total beats

recorded via the ICD monitoring, and her heart is considered normal in TTE (LVEDD: 54 mm, EF: 55%).

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

Clinical phenotype of the Family 2 proband (patient III.1) and his twin brother (patient III.2)

Patient III.1 was identified at age 6 because of an irregular heart rate without any other symptoms. His twin brother was diagnosed at 12 with the same arrhythmia after experiencing syncope while cycling. A complete clinical evaluation including an echocardiography and a MRI came up normal, but his ECG showed frequent PVCs with a left bundle branch block (LBBB) pattern, and anterior and posterior axial deviation (Figure 2C). In both patients, the Holter ECG recorded tens of thousands of PVCs per 24 hours (Table 1). Exercise allowed a clear decrease of the number of PVCs. The patients were finally treated using hydroquinidine, which dramatically decreased the number of PVCs (Table 2).

Their father and grandmother had both been affected with DCM and PVCs, and one uncle had died suddenly at age 11.

A remarkably constant phenotype

Within these 2 families, 15 individuals were affected by MEPT. Patient characteristics are summarized in Tables 1 and 2. Despite the various ages at diagnosis, from 24 weeks of gestation to 37 years (mean age 18 years), the phenotype was remarkably constant: narrow sinus and junctional QRS complexes (10 individuals) competing with various complexes showing a RBBB pattern (8 individuals), corresponding to PVCs with anterior or posterior axes and/or PVCs with a LBBB pattern (7 individuals). We did not observe any QT prolongation, atrial arrhythmia, or atrio-ventricular conduction disturbances in these patients. PVCs were isolated, or paired (bigeminism) with normal QRS complexes. NSVTs were identified in 4 individuals. Among the affected patients, the most frequent symptoms were dyspnea during exercise (4 patients), syncope or presyncope (4 patients) and palpitations (2 patients). Sudden death was reported in one 4-month-old boy (III.12 family 1), an 11-year-old boy (II.3 family 2) and two adult males (29 and 50 years old; II.7 and I.1 in family 1). However, MEPT was clearly identified in only one of these cases (II.7

family 1) before sudden death. Episodes of syncope or fainting during polymorphic VT episodes (Holter or ICD monitorings) were reported in 3 females (figure 2B). A complete EP testing was performed in 5 cases with 3D mapping in 3 cases. In each case, we tried to identify the exact location of the PVC firing. Presystolic potentials recorded at ectopic sites always corresponded to Purkinje potentials during normal sinus beats. EP testing, using a 3D endocardial navigation system, clearly demonstrated that PVCs originated from more than 10 different foci along the extension of the left anterior and posterior fascicles. We also observed that the wider the PVCs, the more distal the firing from the left bundle (ECGs #6-7 in figure 2D). We did not record any PVCs originating from the myocardium itself and pacing could not induce VT or PVC. When tried on patient II.4 of family 1, radiofrequency applications did not eradicate PVCs as the whole Purkinje tissue was involved in triggering PVCs from varying sites. PVC firing was obviously rate dependent since the frequency of the PVCs constantly decreased either during an exercise test in 8 affected patients, or right atrial overdrive pacing (up to 130-150bpm) during EP testing in 3 patients. Although there was a clear overdrive suppression of PVCs, such a high pacing rate was not suitable for ICD implanted patients.

An echocardiography was performed in all affected patients and an MRI in 3 cases. These examinations identified DCM with low LVEF in 5 out of the 15 affected patients. The mean LVEF of the patients affected by DCM was 34%. It has to be noted that, regarding the very high frequency of the PVCs in these patients, the LVEF was particularly difficult to evaluate with significant variations between sinus beats and PVCs.

Antiarrhythmic treatment with class 1 beta-blockers or calcium-channel inhibitors failed to decrease the number of PVCs (patient III.6 of family 1; Table 2). Amiodarone treatment was partially successful in 2 cases. For patient II.1 of family 2, amiodarone and CRTD treatment were introduced simultaneously, partially normalizing the LVEF (from 20% to 45%).

Because of the family history of sudden death and low LVEF, an ICD was implanted in 4 patients, two of which had a cardiac resynchronization therapy defibrillator (CRTD). Most importantly, hydroquinidine was successful in 5 cases with a dramatic decrease in the number of PVCs per 24 hours from tens of thousands to less than 5000, and normalized the LVEF in two patients (II.4 and III.1, family 1). Patient II.4 of family 1 was initially treated for 2 years with a CRTD without any LVEF improvement,

but cardiac function did eventually normalize after the introduction of hydroquinidine. For patient III.1, the heart appeared normal in TTE after one year of treatment. Of note, under hydroquinidine treatment, all patients became free of symptoms and the PVC burden dropped to less than 5% of the total beats recorded via the ICD monitoring.

Mutation analysis

Genetic testing of both probands revealed that they were heterozygous for a c.665G>A transition in *SCN5A* exon 6 (Figure 1B), resulting in the substitution of an arginine for a glutamine at position 222 (p.Arg222Gln named R222Q, subsequently). This substitution is located in the voltage-sensing S4 segment of domain I of the cardiac Na⁺ channel Nav1.5 (Figure 1D). The mutation was 100% penetrant and absent in 600 control chromosomes. It strictly segregated with the cardiac arrhythmia in both families, consistent with a mutation-related disease (Figure 1A). The Arg222 (R222) amino-acid is highly conserved across species (Figure 1C).

Mutations in *LMNA* encoding lamin A/C and *ABCC9* encoding SUR2A have also been reported to be associated with DCM, but no mutation of these genes was detected by direct sequencing of the family 1 proband's DNA.

Haplotype analysis

To investigate whether a common ancestral chromosome accounted for the recurrence of the R222Q mutation in these two unrelated families, we constructed mutation-associated haplotypes by genotyping family members for ten microsatellite markers (Supplemental Figure 2).

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

control individuals). Our data demonstrates that a founder effect for the R222Q mutation in these two families is very unlikely.

Effects of R222Q mutation on Nav1.5 channel function in COS-7 cells

To investigate the functional consequences of the R222Q mutation on the Na⁺ channel activity, we used the whole-cell configuration of the patch-clamp technique (see Supplementary appendix). The presence of the mutation did not modify the Na⁺ current density (Figure 3A-B and Supplemental Table 1). The activation curve was shifted toward more negative potentials in the presence of the mutation (Figure 3A and Supplemental Table 1). Activation kinetics were accelerated in the mutant (Supplemental Figure 3A; two-way ANOVA, $p < 0.001$ *versus* WT). Inactivation voltage sensitivity was also changed (Figure 3B and Supplemental Table 1) which, combined with the activation curve shift, resulted in an increase of the window current, as illustrated in Supplemental Figure 4A. Each of these changes caused a gain of function of the mutant channel. However, inactivation onset kinetics were also accelerated causing a loss of function (Supplemental Figure 3B; two-way ANOVA $p < 0.001$ *versus* WT). Finally, kinetics of recovery from inactivation were not modified by the R222Q mutation (Supplemental Figure 3C).

A multicellular computer model to characterize the molecular and cellular events leading to PVCs.

Because of the multiple and opposite effects of the mutation on channel activation and inactivation, its net effect on the action potential (AP) is not straightforward. To get insights on this effect, we carried out computer simulations and evaluated the impact of the mutation on AP in single-cell models of Purkinje fibers (17) and ventricles (18) (see Supplemental Methods). The relative shift in activation and inactivation curves in the heterozygous state, as well as all other changes of the

biophysical parameters were compared to those experimentally measured in heterozygous state (see supplemental data). Despite that the transfected cell population may be a mixture of cells expressing mainly WT, R222Q or both Nav1.5 channels, the experimental 'heterozygous' parameters were successfully reproduced in both the ventricular (Supplemental Figure 4B) and the Purkinje (Supplemental Figure 4C) cell models. Single-cell models of Purkinje and ventricular cell AP were then run in WT and heterozygous conditions (see also Supplemental Results). In heterozygous conditions, early afterdepolarizations (EADs) occurred in Purkinje cell AP, correlated with an increased persistent Na⁺ current (Supplemental Figure 5). The ventricular AP was much less affected (Supplemental Figure 6).

To evaluate the possibility of a causal role of the mutation on the generation of PVCs, we built a multicellular model incorporating both cell models. In WT conditions, 1-Hz stimulation of the Purkinje fibers generated AP that propagated to the ventricle (Figure 3Ca, Supplemental Movie Aa). Interestingly, in the heterozygous conditions, EADs were generated in the Purkinje fibers and triggered premature APs, propagating into the ventricles (Figure 3Cb, Supplemental Movie Ab). Consistent with the disappearance of clinically observed PVCs during exercise, the triggered ventricular APs disappeared at higher pacing frequencies (2Hz, Figure 3Db, Supplemental Movie Bb). Altogether, these results (i) strongly suggest that the gain of function of the Na⁺ current predominantly affects the Purkinje cells, (ii) explain the fact that the entire Purkinje system was affected resulting in a wide variety of ectopic foci, and (iii) explain the frequency dependency of the PVCs.

DISCUSSION

We report a novel autosomal dominant form of cardiac arrhythmia characterized by multifocal ectopic Purkinje tachycardia (MEPT). MEPT syndrome is characterized by

frequent premature ventricular contractions originating from various ectopic foci along the fascicular-Purkinje system occasionally associated with non-sustained VTs and sudden death. In some patients, arrhythmias were associated with mild DCM. Hydroquinidine markedly reduced the number of PVCs and normalized the left ventricular function in patients with DCM. We may therefore assume that either the overall increase in heart rate or the high frequency of the PVCs may be involved in arrhythmia induced-DCM.

R222Q mutation causes the syndrome in two unrelated families

In family 1, 5 males and 6 females were affected in three generations. In family 2, 3 males and 1 female were affected in three generations. Several findings support the causative role of the R222Q *SCN5A* mutation in the pathogenesis of the disease in the two reported families: (i) the complete co-segregation of the mutation with the disease phenotype, (ii) the identification of the same mutation in two unrelated families with a remarkably uniform phenotype, (iii) the absence of the mutation in 300 ethnically matched control individuals and (iv) the high conservation of the R222 residue across species.

S4 segments of the voltage-dependent Na⁺ channels act in a cooperative manner in response to changes in the electric field (19). The mutated arginine is the second positively charged amino-acid in the first of the four voltage-sensing S4 segments of the Na⁺ channel. The role of this charge in voltage sensing explains the high impact of the mutation on the channel biophysical properties. The same mutation of the equivalent residue in rat Nav1.2, expressed in *Xenopus* oocytes, induced voltage shifts of activation and inactivation associated with accelerated activation kinetics (20;21). In this study, we confirmed a similar functional impact of the c.665G>A mutation in the *SCN5A* gene, leading to a voltage shift in Nav1.5 voltage-dependency.

Looking for a mechanistic link between the genotype and the phenotype, we simulated the effect of the mutated channel activity on the Purkinje and ventricular electrical activity. Several points suggest that the shift in Nav1.5 voltage-dependency is responsible for the PVCs originating from the fascicular-Purkinje system. First of all, one of the particularities of this arrhythmia is that ectopic foci were fired from

erratic locations of the Purkinje system, which made radiofrequency applications ineffective. The multicellular model shows that the impaired function of the Na⁺ channels is sufficient enough to trigger premature APs in the surrounding ventricular tissue, anywhere in the Purkinje system. Second of all, consistent with the disappearance of PVCs clinically observed during exercise, the triggered ventricular APs disappeared at higher pacing frequencies. Therefore, the model confirms the mechanism by which the Na⁺ channel alteration is responsible for the patients' phenotype.

Dilated cardiomyopathy is a secondary consequence of the mutation

DCM was diagnosed in three females and in two males, but is very likely a consequence of the arrhythmia, and not directly linked to the mutation, since in most of the cases, DCM was detected secondary to the arrhythmia disorders and regressed in all patients treated for arrhythmia. We cannot be sure whether it was the overall increase in heart rate or the frequency of the PVCs which was responsible for the development of tachy-cardiomyopathy. Besides, a direct role of the mutation cannot be completely ruled out since this mutation was already detected in patients referred for familial or idiopathic DCM (22;23). Although multifocal PVCs have been previously reported in one patient in a family with DCM, no detail regarding the electrophysiological status of the other family members was provided (23). Several *SCN5A* mutations associated with familial DCM-arrhythmia syndrome have already been described (R814W, D1275N, T220I and D1595H) (24;25). In these mutation carriers, predominant clinical findings were mainly sinus bradycardia, atrioventricular block, atrial fibrillation (AF) and/or atrial flutter (24-26).

The MEPT syndrome is quite different from these two *SCN5A*-related DCM for several reasons; First, DCM did appear to be secondary to cardiac arrhythmia (tachy-cardiomyopathy); there were seven patients with PVCs and/or junctional beats but no DCM, and all patients with DCM had frequent PVCs. Second, as opposed to R814W and D1595H mutations, none of our patients exhibited atrial arrhythmia or atrio-ventricular conduction disturbances. Third, the MEPT syndrome is clearly associated with frequent ventricular arrhythmia (PVC and NSVT) and sudden cardiac death.

There are clear evidence that the MEPT syndrome presents a genuine clinical phenotype, although further investigations are needed to better characterize this novel entity.

Specificity of multifocal ectopic Purkinje tachycardia

Ventricular arrhythmias originating from left ventricular fascicles have been described previously in patients with or without structural heart disease (ischemic or idiopathic cardiomyopathies) (27-30). Accounting for up to 30-50% of arrhythmias in non-ischemic DCM, bundle branch re-entrant VTs usually have a LBBB pattern and enlarged QRS complexes with a prolonged H to V interval during sinus rhythm (27). Such conduction abnormalities were not identified in any of our patients.

Fascicular VT is the most common form of idiopathic left VT occurring more frequently in young males without structural heart disease and with a particular sensitivity to verapamil (28). The ECG characteristics of our patients were different. Idiopathic VTs and bundle branch VTs typically present a single ECG morphology originating either near the posterior or the anterior left fascicle. In our patients, ECG characteristics demonstrated the varying origins of the PVCs, in either the left or right ventricle. EP testing using a 3D endocardial navigation system clearly demonstrated that, in the explored patients, the PVCs originated from more than 10 different foci along the extension of the left anterior and posterior fascicles. This phenomenon, which may be called “wandering PVCs”, was responsible for important changes in PVC morphology (shape and axis) from one beat to another. Like triggered activities, the PVC firing was fairly increased by isoproterenol infusion despite the increase in sinus rhythm at a lesser extent. As opposed to idiopathic fascicular VTs which are well known to be highly sensitive to verapamil, this treatment had no effect on the tested affected family members.

In conclusion, we described a new congenital cardiac arrhythmic syndrome, that we named multifocal ectopic Purkinje tachycardia. This syndrome is characterized by cellular hyperexcitability originating along the left fascicular-Purkinje system, sensitive to hydroquinidine and responsible in some cases for reversible DCM and most likely sudden cardiac death. Furthermore, we demonstrate that a fully penetrant SCN5A gain-of-function mutation triggers this new syndrome.

METHODS

An expanded Methods section is available in the supplementary appendix.

Clinical evaluation

Written informed consent was obtained from all participants according to guidelines of the local medical ethics committee. Standard 12-lead ECG, Holter recording and echocardiography were proposed to all participating family members. Electrophysiological studies were performed in 5 patients (see supplemental methods). Radiofrequency ablation was attempted in 1 patient (see Supplemental Methods).

Mutation analysis

Genomic DNA was extracted from peripheral blood lymphocytes using standard protocols. The proband (III.1) of family 1 was screened for mutations in known genes responsible for dilated cardiomyopathy (DCM) and arrhythmia, including *LMNA* encoding lamin A/C, *ABCC9* encoding SUR2A and *SCN5A* (25;31;32).

Screening for mutation was performed by a polymerase chain reaction amplification of coding regions and flanking intronic sequences followed by bidirectional sequencing of amplicons on an ABI PRISM 3730 DNA Sequence Detection System (Applied Biosystems). Six hundred control chromosomes from unrelated individuals (Human Random Control DNA) were screened by high resolution melting on Roche LightCycler 480.

Statistics

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

ACKNOWLEDGMENTS

The *Agence Nationale de la Recherche* financially supported R.T. and Y.C. (ANR-07-JCJC-0141), I.B. (ANR-09-GENO-003-01) and J.-J.S. (ANR-05-MRAR-028-01). J.-J.S. was also supported by a Leducq Foundation Trans-Atlantic Network of Excellence grant (05 CVD 01). The research leading to these results has also received funding from the *European Community's Seventh Framework Programme*

FP7/ 2007-2013 under grant agreement n° FP7-HEALTH-2009-single-stage 241526 (I.B. and F.C.). G.L. was financially supported by the *Association Française contre les Myopathies* (n°14120) and F.C. by the *Fondation pour la Recherche Médicale* (DVC20070409253).

Address correspondence to: Gabriel LAURENT, MD-PhD, Service de Cardiologie, 2 Boulevard Maréchal De Lattre de Tassigny, 21079 Dijon Cedex, France, Phone: +33 3.80.29.33.13 ; Fax : +33 3.80.29.33.33 ; e-mail : gabriel.laurent@chu-dijon.fr

FIGURES LEGENDS

Figure 1

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

Figure 2

Representative ECG tracings of the families. **(A)** Representative 12-lead surface ECG of family 1, 10-year old proband (individual III.1), showing a chaotic cardiac rhythm including normal sinus and junctional QRS complexes competing with various RBBB pattern complexes corresponding to PVCs. **(B)** Symptomatic NSVT recorded at 13 years old (RBBB pattern, QRS axis variation). QRS morphologies are changing from one beat to another. **(C)** Twelve-lead surface ECG of patient III.1 of family 2 showing a chaotic cardiac rhythm with rare sinus beats and alternant junctional rhythms with ventricular bigeminisms. PVCs were narrow QRS complexes with slight variations in shape and axis. **(D)** Activation mapping of 12 different PVCs in patient III.1 (family 1). A Multi-array balloon (NavX system) helped us to pinpoint the precise location of ectopic foci along the anterior and posterior regions of the left ventricle corresponding to the extension of the left anterior and posterior fascicles.

Figure 3

Experimental and simulated effects of R222Q mutation on Nav1.5 channel in COS-7 cells and in a multi-cellular model. **(A)** Relative peak conductance vs. membrane

potential curves for Nav1.5 channels in COS-7 cells transfected with WT or R222Q Nav1.5, in the presence of WT β 1 subunit. Solid curves: Boltzmann fits to the data show the mutation-dependent activation shift. Inset: stimulation protocol and superimposed Na^+ current recordings during 20-ms depolarizations to various potentials from -80 to $+0$ mV (holding potential: -100 mV; 10-mV increment; frequency: 0.5 Hz). Scale bars: 2 ms, 1000 pA. Bold trace and arrow: Na^+ current at -50 mV. **(B)** Steady-state channel availability curves for Nav1.5 channels. Data are mean normalized peak current (I/I_{max}) measured at -20 mV vs. prepulse voltage. Solid curves: Boltzmann fits to the data. Inset: stimulation protocol and superimposed Na^+ current recordings at -20 mV after 500-ms polarization to various potentials from -110 to -50 mV (holding potential: -100 mV; 10-mV increment; frequency: 0.25 Hz) in COS-7 cells transfected as in A. Scale bar: 2 ms. Bold trace and arrow: Na^+ current at -80 mV. **(C-D)** Effects of the R222Q mutation on a ventricular cardiomyocyte action potential (AP) obtained in the Purkinje/ventricle model. Simulated AP in a distal part of the ventricle in WT **(a)** and heterozygous **(b)** conditions with stimulation of a Purkinje cell at cycle length of 1 s **(C)** and 0.5 s **(D)**. Inset: dimensions of the calculation domain: Purkinje system, 5 x 17.5 mm; ventricle, 35 x 17.5 mm. Stimulation and recording sites are indicated.

Table 1 Clinical data of the family members.

Table 1. Clinical data of the family members.													
Patient	Age at diagnosis - yr	FU - yr	Gender	Symptoms	LVDd - mm/m ²	LVEF before medication - %	PVC morpho	PVC axis	Junction rhythm	NSVT	Total PVC/24h	EPS	PVC regression at exercise
Family 1													
I.1	29	-	M	SD	-	-	-	-	-	-	-	no	-
II.2	29	17	F	syncope	55	73	R	R and L	yes	no	62000	no	yes
II.4	37	8	F	dyspnea	61	35	R and L	R and L	yes	yes	>25000	yes	yes
II.6	25	20	F	dyspnea	48	59	R	R and L	no	no	-	no	-
II.7	23	27	M	dyspnea,SD	60	47	R	R and L	yes	no	-	no	yes
II.8	17	19	M	syncope	55	60	-	-	no	no	-	no	-
III.1	10	7	F	syncope	40	32	R and L	R and L	yes	yes	>50000	yes	yes
III.11	15	3	M	no	-	65	no	no	yes	no	11	no	-
III.12	4 months	-	M	SD	-	-	-	-	-	-	-	no	-
III.2	0*	5	F	no	33	60	-	-	yes	no	-	no	-
III.6	12	9	M	palpitations	51	47	R and L	R and L	yes	yes	>25000	yes	yes
III.7	17	5	M	dyspnea	46	67	R and L	R and L	yes	no	>25000	no	yes
III.9	25	3	F	no	-	65	no	no	yes	no	200	no	-
Family 2													
I.2	-	-	F	-	-	<45	-	-	-	-	-	no	-
II.1	35	8	M	palpitations	-	20	R and L	no	no	-	-	yes	-
II.3	11	0	M	SD	-	-	-	-	-	-	-	no	-
III.1	6	7	M	no	36	60	L	R and L	yes	no	18000	no	yes
III.2	12	0.5	M	presyncope	33	60	L	R and L	yes	no	86000	yes	yes

FU: follow-up; SD: sudden death. R PVC: premature ventricular contractions with right bundle branch block patterns; L PVC: premature ventricular contractions with left bundle branch block patterns, R PVC axis: PVC with a right axis; L PVC axis: PVC with a left axis; LVDd: left ventricular diastolic diameter; LVEF: left ventricular ejection fraction; NSVT: non-sustained ventricular tachycardia (< 30 s); EPS: electrophysiological study. *: 24 weeks of gestation.

Table 2. Follow up and treatment of the family members.

Table 2. Follow up and treatment of the family members.								
Patient	Treatment	ICD	CRTD	symptoms under treatment	PVC/24h under medication	LVEF under (before) medication - %	Sudden death	SCN5A mutation
Family 1								
I.1	-	no	no	-	-	-	yes	-
II.2	Hydroquinidine	yes	no	no	<5000	60 (73)	no	yes
II.4	Hydroquinidine	yes	yes	no	<5000	50 (35)	no	yes
II.6	Amiodarone	no	no	yes	4	-	no	yes
II.7	none	no	no	-	-	-	yes	yes
II.8	none	no	no	-	-	-	no	-
III.1	Hydroquinidine	yes	no	no	<5000	56 (32)	no	yes
III.11	none	no	no	-	-	-	no	yes
III.12	-	no	no	-	-	-	yes	-
III.2	none	no	no	-	-	-	no	yes
III.6	*	no	no	yes	-	-	no	yes
III.7	none	no	no	-	-	-	no	yes
III.9	none	no	no	-	-	-	no	yes
Family 2								
I.2	none	no	no	-	-	-	no	-
II.1	Amiodarone	yes	yes	yes	-	45 (20)	no	yes
II.3	-	no	no	-	-	-	yes	-
III.1	Hydroquinidine	no	no	no	2500	60 (60)	no	yes
III.2	Hydroquinidine	no	no	no	7700	60 (60)	no	yes

ICD: implantable cardioverter-defibrillator; CRTD: cardiac resynchronisation therapy defibrillator; PVC: premature ventricular contractions; LVEF: left ventricular ejection fraction. *: nadolol, sotalol, or verapamil. Hydroquinidine treatment and ICD implantation were proposed but refused by the patient.

Reference List

1. Haissaguerre,M., Derval,N., Sacher,F., Jesel,L., Deisenhofer,I., de Roy,L., Pasquie,J.L., Nogami,A., Babuty,D., Yli-Mayry,S. *et al.* 2008. Sudden cardiac arrest associated with early repolarization. *N.Engl.J Med.* 358:2016-2023.
2. Kaufman,E.S. 2009. Mechanisms and clinical management of inherited channelopathies: long QT syndrome, Brugada syndrome, catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, and short QT syndrome. *Heart Rhythm.* 6:S51-S55.
3. 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. *et al.* 2003. Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature* 421:634-639.
4. Watanabe,H., Koopmann,T.T., Le Scouarnec,S., Yang,T., Ingram,C.R., Schott,J.J., Demolombe,S., Probst,V., Anselme,F., Escande,D. *et al.* 2008. Sodium channel beta1 subunit mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans. *J Clin.Invest* 118:2260-2268.
5. Hedley,P.L., Jorgensen,P., Schlamowitz,S., Wangari,R., Moolman-Smook,J., Brink,P.A., Kanters,J.K., Corfield,V.A., and Christiansen,M. 2009. The genetic basis of long QT and short QT syndromes: a mutation update. *Hum.Mutat.* 30:1486-1511.
6. Zimmer,T. and Surber,R. 2008. SCN5A channelopathies--an update on mutations and mechanisms. *Prog.Biophys.Mol Biol.* 98:120-136.
7. Butters,T.D., Aslanidi,O.V., Inada,S., Boyett,M.R., Hancox,J.C., Lei,M., and Zhang,H. 2010. Mechanistic Links Between Na⁺ Channel (SCN5A) Mutations and Impaired Cardiac Pacemaking in Sick Sinus Syndrome. *Circ.Res.* 107:126-137.
8. Schott,J.J., Alshinawi,C., Kyndt,F., Probst,V., Hoorntje,T.M., Hulsbeek,M., Wilde,A.A., Escande,D., Mannens,M.M., and Le Marec,H. 1999. Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A. *Nat.Genet.* 23:20-21.
9. Bennett,P.B., Yazawa,K., Makita,N., and George,A.L., Jr. 1995. Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia. *Nature* 376:683-685.
10. Kambouris,N.G., Nuss,H.B., Johns,D.C., Tomaselli,G.F., Marban,E., and Balsler,J.R. 1998. Phenotypic characterization of a novel long-QT syndrome mutation (R1623Q) in the cardiac sodium channel. *Circulation* 97:640-644.
11. Chen,Q., Kirsch,G.E., Zhang,D., Brugada,R., Brugada,J., Brugada,P., Potenza,D., Moya,A., Borggrefe,M., Breithardt,G. *et al.* 1998. Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature* 392:293-296.

12. Probst,V., Kyndt,F., Potet,F., Trochu,J.N., Mialet,G., Demolombe,S., Schott,J.J., Baro,I., Escande,D., and Le Marec,H. 2003. Haploinsufficiency in combination with aging causes SCN5A-linked hereditary Lenegre disease. *J Am.Coll.Cardiol* 41:643-652.
13. Rook,M.B., Bezzina,A.C., Groenewegen,W.A., van Gelder,I.C., van Ginneken,A.C., Jongsma,H.J., Mannens,M.M., and Wilde,A.A. 1999. Human SCN5A gene mutations alter cardiac sodium channel kinetics and are associated with the Brugada syndrome. *Cardiovasc.Res.* 44:507-517.
14. Remme,C.A., Wilde,A.A., and Bezzina,C.R. 2008. Cardiac sodium channel overlap syndromes: different faces of SCN5A mutations. *Trends Cardiovasc.Med.* 18:78-87.
15. Neu,A., Eiselt,M., Paul,M., Sauter,K., Stallmeyer,B., Isbrandt,D., and Schulze-Bahr,E. 2010. A homozygous SCN5A mutation in a severe, recessive type of cardiac conduction disease. *Hum.Mutat.* 31:E1609-E1621.
16. Kampmann,C., Wiethoff,C.M., Wenzel,A., Stolz,G., Betancor,M., Wippermann,C.F., Huth,R.G., Habermehl,P., Knuf,M., Emschermann,T. *et al.* 2000. Normal values of M mode echocardiographic measurements of more than 2000 healthy infants and children in central Europe. *Heart* 83:667-672.
17. DiFrancesco,D. and Noble,D. 1985. A model of cardiac electrical activity incorporating ionic pumps and concentration changes. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 307:353-398.
18. Iyer,V., Mazhari,R., and Winslow,R.L. 2004. A computational model of the human left-ventricular epicardial myocyte. *Biophys.J* 87:1507-1525.
19. Chanda,B., Asamoah,O.K., and Bezanilla,F. 2004. Coupling interactions between voltage sensors of the sodium channel as revealed by site-specific measurements. *J Gen.Physiol* 123:217-230.
20. Kontis,K.J., Rounaghi,A., and Goldin,A.L. 1997. Sodium channel activation gating is affected by substitutions of voltage sensor positive charges in all four domains. *J Gen.Physiol* 110:391-401.
21. Stuhmer,W., Conti,F., Suzuki,H., Wang,X.D., Noda,M., Yahagi,N., Kubo,H., and Numa,S. 1989. Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* 339:597-603.
22. Hershberger,R.E., Parks,S.B., Kushner,J.D., Li,D., Ludwigsen,S., Jakobs,P., Nauman,D., Burgess,D., Partain,J., and Litt,M. 2008. Coding sequence mutations identified in MYH7, TNNT2, SCN5A, CSR3, LBD3, and TCAP from 313 patients with familial or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Clin.Transl.Sci.* 1:21-26.
23. Morales,A., Painter,T., Li,R., Siegfried,J.D., Li,D., Norton,N., and Hershberger,R.E. 2010. Rare variant mutations in pregnancy-associated or peripartum cardiomyopathy. *Circulation* 121:2176-2182.

24. McNair,W.P., Ku,L., Taylor,M.R., Fain,P.R., Dao,D., Wolfel,E., and Mestroni,L. 2004. SCN5A mutation associated with dilated cardiomyopathy, conduction disorder, and arrhythmia. *Circulation* 110:2163-2167.
25. Olson,T.M., Michels,V.V., Ballew,J.D., Reyna,S.P., Karst,M.L., Herron,K.J., Horton,S.C., Rodeheffer,R.J., and Anderson,J.L. 2005. Sodium channel mutations and susceptibility to heart failure and atrial fibrillation. *JAMA* 293:447-454.
26. Nguyen,T.P., Wang,D.W., Rhodes,T.H., and George,A.L., Jr. 2008. Divergent biophysical defects caused by mutant sodium channels in dilated cardiomyopathy with arrhythmia. *Circ.Res.* 102:364-371.
27. Lopera,G., Stevenson,W.G., Soejima,K., Maisel,W.H., Koplan,B., Sapp,J.L., Satti,S.D., and Epstein,L.M. 2004. Identification and ablation of three types of ventricular tachycardia involving the his-purkinje system in patients with heart disease. *J Cardiovasc.Electrophysiol.* 15:52-58.
28. Nogami,A., Naito,S., Tada,H., Taniguchi,K., Okamoto,Y., Nishimura,S., Yamauchi,Y., Aonuma,K., Goya,M., Iesaka,Y. *et al.* 2000. Demonstration of diastolic and presystolic Purkinje potentials as critical potentials in a macroreentry circuit of verapamil-sensitive idiopathic left ventricular tachycardia. *J Am.Coll.Cardiol* 36:811-823.
29. Reithmann,C., Hahnefeld,A., Ulbrich,M., Matis,T., and Steinbeck,G. 2009. Different forms of ventricular tachycardia involving the left anterior fascicle in nonischemic cardiomyopathy: critical sites of the reentrant circuit in low-voltage areas. *J Cardiovasc.Electrophysiol.* 20:841-849.
30. Rodriguez,L.M., Smeets,J.L., Timmermans,C., Trappe,H.J., and Wellens,H.J. 1996. Radiofrequency catheter ablation of idiopathic ventricular tachycardia originating in the anterior fascicle of the left bundle branch. *J Cardiovasc.Electrophysiol.* 7:1211-1216.
31. Bienengraeber,M., Olson,T.M., Selivanov,V.A., Kathmann,E.C., O'Coirlain,F., Gao,F., Karger,A.B., Ballew,J.D., Hodgson,D.M., Zingman,L.V. *et al.* 2004. ABCC9 mutations identified in human dilated cardiomyopathy disrupt catalytic KATP channel gating. *Nat.Genet.* 36:382-387.
32. Wolf,C.M., Wang,L., Alcalai,R., Pizard,A., Burgon,P.G., Ahmad,F., Sherwood,M., Branco,D.M., Wakimoto,H., Fishman,G.I. *et al.* 2008. Lamin A/C haploinsufficiency causes dilated cardiomyopathy and apoptosis-triggered cardiac conduction system disease. *J Mol Cell Cardiol* 44:293-303.

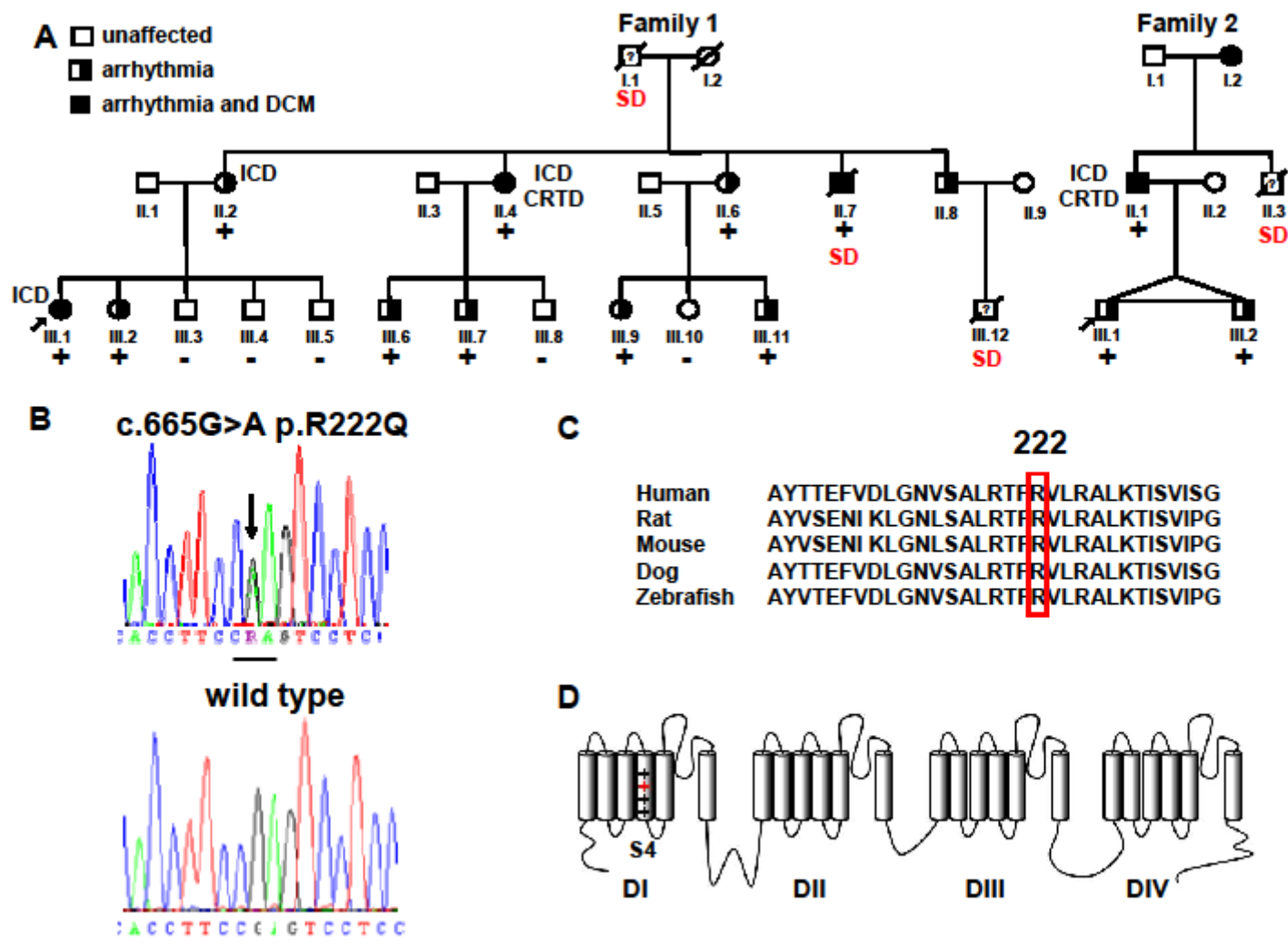


figure 1

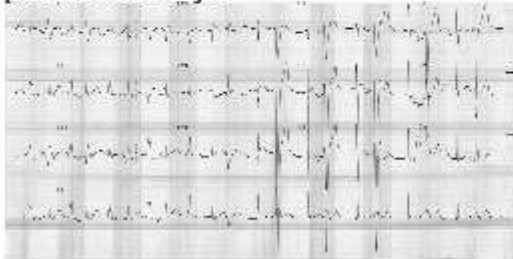
A patient III.1 family 1 at 10 years old



B patient III.1 family 1 at 13 years old



C patient III.1 family 2



D

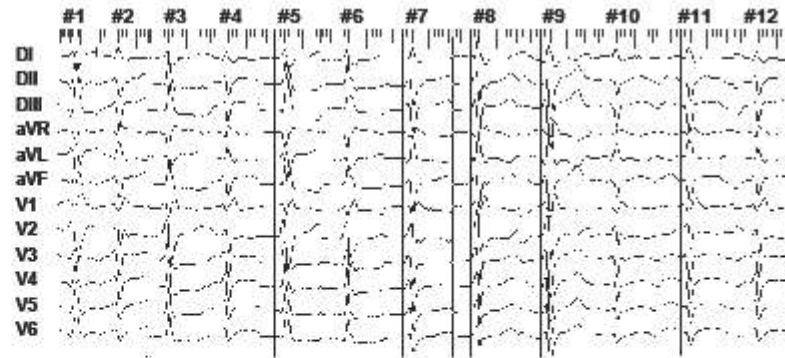
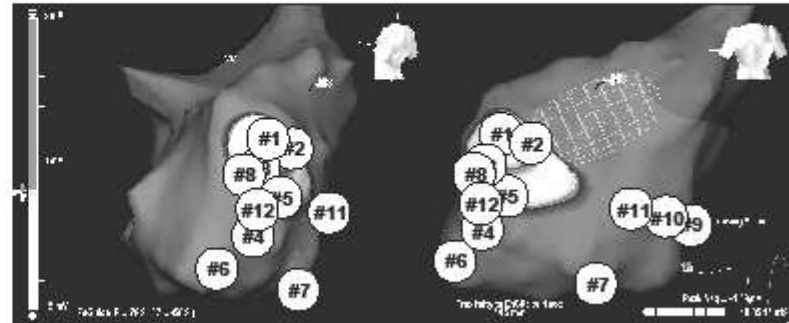
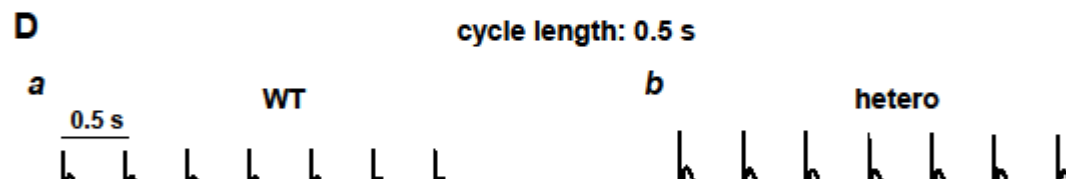
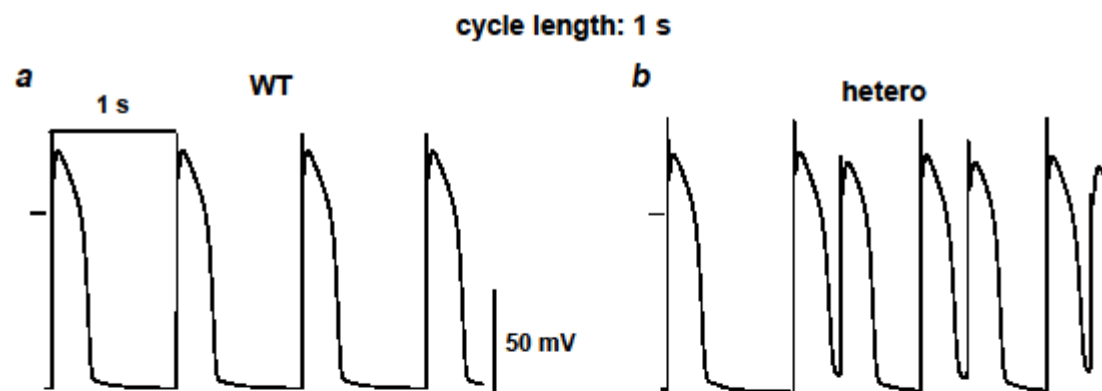
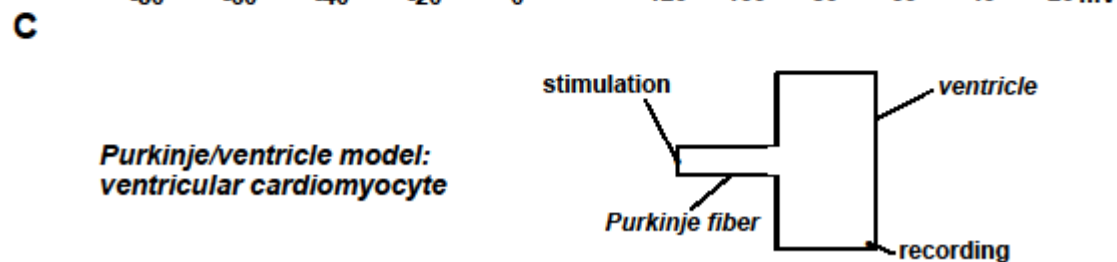
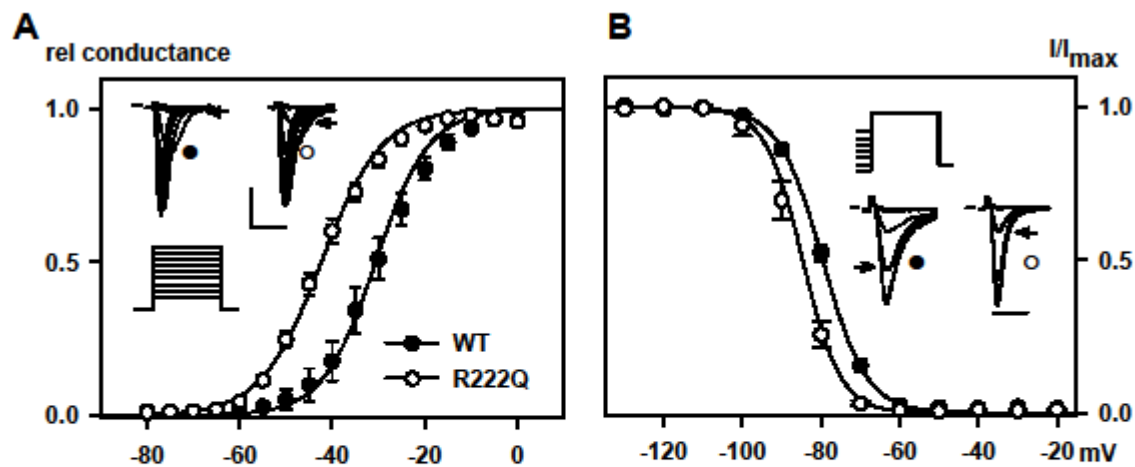


figure 2



Multifocal ectopic Purkinje tachycardia, a new SCN5A-related cardiac channelopathy

Gabriel Laurent, MD, PhD, Samuel Saal, MD, Mohamed Yassine Amarouch, M.Sc, Laurence Faivre, MD, PhD, Julien Barc, PhD, Christian Dina, PhD, Geraldine Bertaux, MD, Sylvie Falcon-Eicher, MD, Olivier Barthez, MD, Christel Thauvin-Robinet, MD, Philippe Charron, MD, PhD, Pascale Richard, MD, PhD, Alice Maltret, MD, Elisabeth Villain, MD, Estelle Baron, B.A, Jean Mérot, PhD, Rodolphe Turpault, PhD, Yves Coudière, PhD, Flavien Charpentier, PhD, Jean Jacques Schott, PhD, Isabelle Baró, PhD, Vincent Probst, MD, PhD, Gildas Loussouarn, PhD, Florence Kyndt, PharmD, PhD, Jean Eric Wolf, MD, PhD.

SUPPLEMENTARY APPENDIX

SUPPLEMENTAL METHODS

Invasive electrophysiological study

For standard electrophysiological (EP) study, a bipolar catheter was placed at the right atrial appendage; a quadripolar catheter recorded the proximal and distal part of the left bundle branch (transseptal approach when opened *foramen ovale* or aortic retrograde approach *via* the right femoral artery), and another quadripolar catheter recorded the proximal and distal parts of the His bundle. Intra-cardiac 3D navigation systems were used in three patients. Left ventricular geometry and PVCs activation mapping were done using multi-array technology (NavX system, St Jude Medical technology) in one patient (III.1 of family 1) and a CARTO XP mapping system (Biosense Webster, Johnson & Johnson) in two other patients (II.4 and III.6 of family 1). The precise location of PVC firing was based on the identification of pre-systolic Purkinje potentials, early endocardial activation mapping with a QS unipolar pattern of the electrogram and concordant pace mapping (Bard Electrophysiology Division, C. R. Bard, Inc. Lowell). Reentrant mechanisms were excluded since no VTs could be pacing-induced and no mid-diastolic potentials were recorded during VT (1-3).

Radiofrequency ablation

A radiofrequency (RF) procedure was performed in one patient using the CARTO XP system to determine optimal ablation sites (4;5). Several RF applications (60-s application, 35 W, 40 degrees with Navistar cool-tip catheter, Biosense Webster, Johnson & Johnson) at identified targets in a 3-cm² surface area did not eradicate PVCs.

Haplotypes

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

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

PCR was performed under the following conditions: denaturation at 94°C for 3 min; 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 55°C for 30 sec, and extension at 72°C for 1 min; final extension at 72°C for 10 min. Alleles were submitted to electrophoresis using an ABI PRISM 3730 DNA analyser, (PE Applied Biosystems), with ROX-500 size standard (PE Applied Biosystems). Genotype analysis was automated using GeneMapper software, version 4.0 (PE Applied Biosystems).

We estimated the age of the mutation using the Genin and collaborators method (6), based on the length of identity by state segments around the mutation. This method identifies the closest markers at which the two affected individuals do not share any allele on either side. The likelihood is built on the number of recombination events between the mutation and the neighboring genetic markers, with a correction through the possibility of mutation. Because we did not have even a single common allele in the haplotypic background, we created two dummy markers, with shared common allele by both affected individuals at a recombination fraction $\theta=0.0001$ both upstream and downstream the mutation. Thus, we were aiming at finding a lower threshold to the number of generations to the most recent common ancestor. We adopted a micro-satellite mutation rate of $m=3.10^{-3}$ (using the Stepwise Mutation Model), as proposed in the literature (7). It is noteworthy that the time to the Most Recent Common Ancestor is not necessarily the time to the mutation occurrence. Therefore, our number of generations is also a lower bound for the age of the allele.

Site-directed mutagenesis

Site-directed mutagenesis was performed on pCI-SCN5A (8) using the Quick-Change site-directed mutagenesis kit (Stratagene) according to the manufacturer's instructions. The construct was completely sequenced to ensure that there was no other mutation.

Cellular electrophysiology of Nav1.5 mutant R222Q

The African green monkey kidney fibroblast-like cell line (COS-7) was obtained from the American Type Culture Collection and cultured as previously described (9). Cells were transfected with DNA complexed to JetPEI (Polyplus-transfection) according to the manufacturer's instructions. Relative DNA concentrations were 10% pCI-Nav1.5 (WT or R222Q, or 5% of each for the heterozygous condition), 10% pRC-h β 1 (8) and 80% pEGFP (Clontech). At Eight hours post-transfection, the cells were isolated and seeded in plastic Petri dishes at low density. At twenty-four hours post-transfection, whole-cell currents were recorded at room temperature using the patch-clamp technique. The cells were continuously superfused with Tyrode solution containing (in mmol/L): NaCl 145, KCl 4, MgCl₂ 1, CaCl₂ 1, HEPES 5, glucose 5, pH adjusted to 7.4 with NaOH. Wax-coated pipettes (tip resistance: 1.8 to 3 M Ω) were filled with intracellular medium containing (in mmol/L): NaCl 10, CsCl 64.5, aspartic acid 70.5, HEPES 5, pH adjusted to 7.2 with CsOH. During data recording, the studied cell was locally superfused with extracellular medium containing (in mmol/L): NaCl 145, CsCl 4, CaCl₂ 1, MgCl₂ 1, HEPES 5, glucose 5, pH adjusted to 7.4 with NaOH; all products were purchased from Sigma. Stimulation, data recording through an A/D converter (Tecmar TM100 Labmaster, Scientific Solutions; 5 kHz filtering), and analysis were performed with Acquis1 software (Bio-Logic). All current measurements were normalized using the cell capacitance. Capacitance and series resistances were compensated (60-70% compensation) to obtain minimal contribution of capacitive transients using an Axopatch 200A amplifier (Axon Instruments, Inc).

Mathematical modeling of ventricular and Purkinje action potentials

Single-cell models

The same strategy was used for both models of the human Purkinje cells (10) and left-ventricular myocytes (11). The equations corresponding to the Na⁺ current were iteratively modified to reproduce the relative variation of 8 parameters due to the R222Q mutation (i.e. peak amplitude at -20 mV, half-activation potential, activation slope, time to peak at -20 mV, half-inactivation potential, inactivation slope and the kinetics of inactivation at -35 mV and recovery from inactivation at -100 mV). The other currents generating the action potential were not modified.

In the Purkinje cell model, the effects of the R222Q mutation were simulated by (i) modifying α_m and β_m to recapitulate the shift in the activation curve and (ii) modifying

β_h to recapitulate the shift in the inactivation with no change in the recovery from inactivation. The WT and R222Q Na^+ current formulations followed the DiFrancesco and Noble model (10) as such:

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

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

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

In the ventricular cell model, the effects of the R222Q mutation were simulated (i) by modifying all the forward transitions ($\alpha, \beta, \gamma, \gamma\gamma, \eta$) to recapitulate the shift in the activation curve and (ii) by decreasing the inactivation/activation coupling factor to recapitulate the smaller shift in the inactivation curve with no change in the recovery from inactivation kinetics. The WT and R222Q Na^+ current formulation followed model (11) as such:

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

The other transition constants were not changed.

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

Multicellular model

Both models of the human left-ventricular subepicardial myocytes and Purkinje cells were incorporated in a multicellular model. In this model, the propagation of the electrical waves in the cardiac tissues was described by the monodomain model (12). The membrane potential is described by a variable V following the partial differential equation:

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

Where t is the time in s, V is the transmembrane potential in mV, A_m is the ratio of membrane surface per cell volume unit [1e3 cm⁻¹], C_m is the membrane capacitance per surface unit [1e-3 mF.cm⁻²], and D is the average electrical conductivity of the tissue [20 mS.cm⁻¹ in Purkinje cells, and 1.3 mS.cm⁻¹ in ventricular cells]. The ionic current per surface unit I_{ion} [μA.cm⁻²] was computed according to the models introduced above. The values of D were adjusted to obtain a propagation speed in the range of around 180 cm/s in the Purkinje system, and 90 cm/s in the ventricle.

The numerical simulations were performed on a simplified 2D slice model described previously (13). The pacing site was located at the proximal part of the Purkinje fiber (see Figure. 4C). The ordinary differential equations of the ionic model were integrated by a mixed explicit-implicit method, with a 1-μs step. The computations were performed on a mesh with 2225 vertices using the cluster from the *Centre de Calcul Intensif des Pays de Loire*.

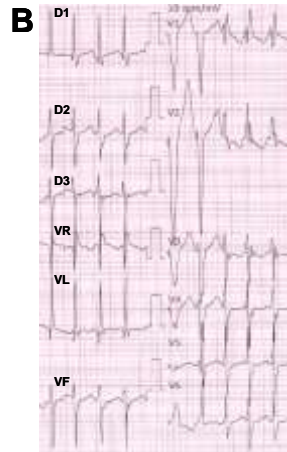
SUPPLEMENTAL RESULTS

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

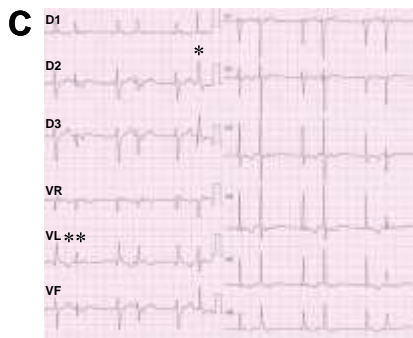
To get insights on the R222Q mutation effect on the action potentials (APs) at a cellular scale, we carried out computer simulations to evaluate the impact of the mutation on the Na⁺ current in unicellular models of Purkinje and ventricular cells (10;11). The models modifications operated to mimic the mutation-induced changes in the Na⁺ current have been detailed in the Supplemental Methods section. Interestingly, when the equations mimicking the heterozygous state of the patients were introduced into the ventricular cell model, minor changes in AP morphology were observed, at both slow (5-s cycle length) and normal (1-s cycle length) pacing rates (Supplemental Figure 6). Conversely, when the equations mimicking the heterozygous state were introduced in the Purkinje cell model, the effect was drastic AP could not be induced (not shown). AP could be generated only if the shift in the activation curve was reduced (4 instead of 6 mV), in order to limit the Na⁺ current increase (Supplemental Figure 5). But AP morphology was still highly affected. An incomplete repolarization of the cell was especially visible at a low stimulation rate (cycle length: 5 s) and full repolarization was restored by the following stimulation. This disappeared at higher pacing rates, consistent with PVCs disappearing during exercise (Supplemental Figure 5).



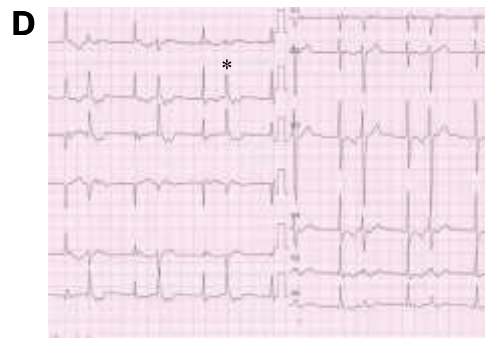
patient II.4 family 1



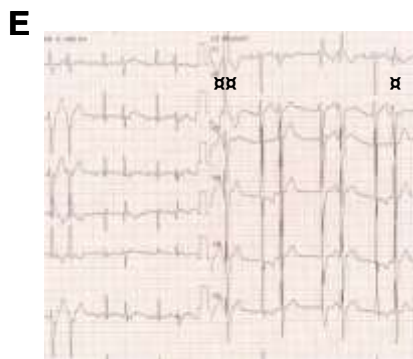
patient II.4 family 1



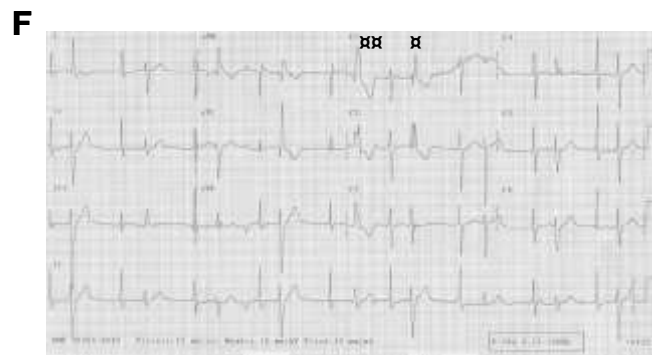
patient III.6 family 1



patient III.7 family 1



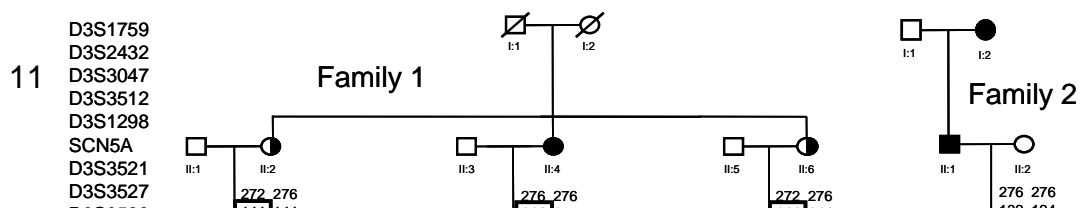
patient II.6 family 1



patient II.7 family 1

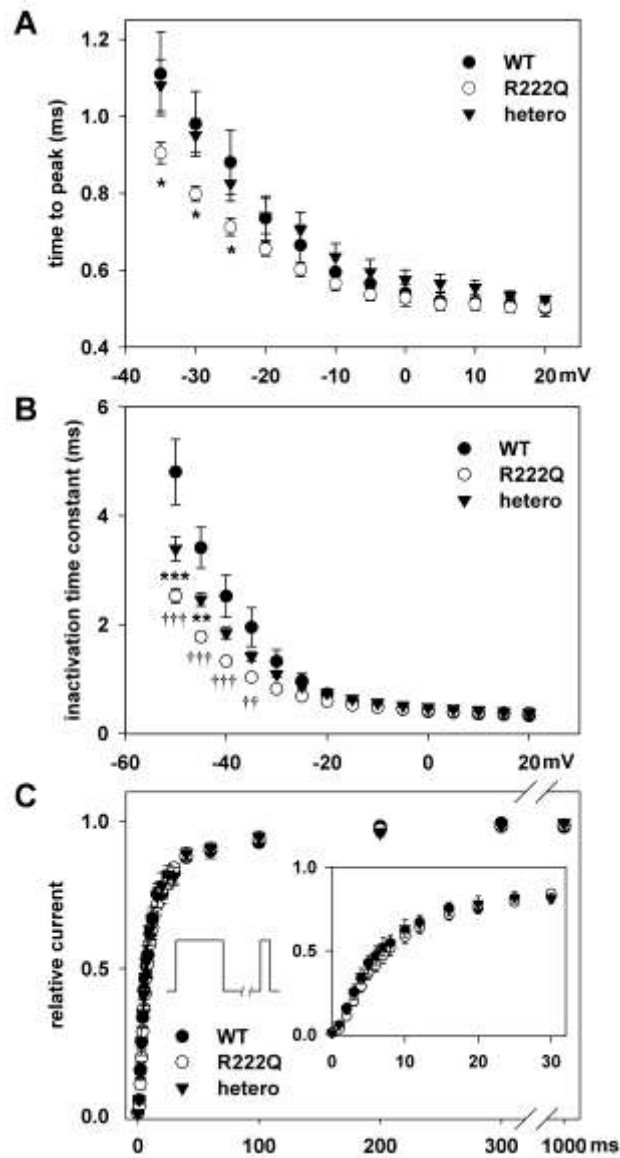
Supplemental Figure 1

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



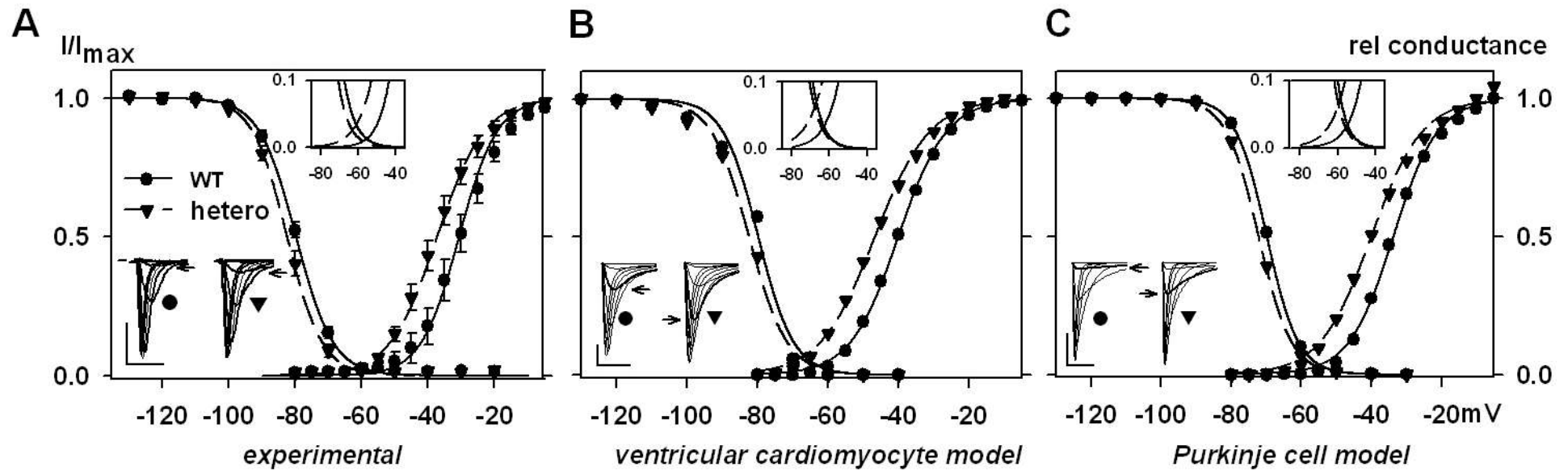
Supplemental Figure 2

Haplotype analysis of chromosome 3 in selected members for families 1 and 2. Females are represented by circles and males are represented by squares. Members affected with arrhythmia are indicated with a half-filled symbol. Members affected with arrhythmia and DCM are indicated in black. Ten microsatellite markers (D3S1759, D3S2432, D3S3047, D3S3512, D3S1298, intragenic *SCN5A* marker, D3S3521, D3S3527, D3S3522 and D3S3559) spanning the region of chromosome 3 where the *SCN5A* gene lies, were analyzed. The disease-associated haplotype is indicated by a black frame. The disease haplotype in family 2 differed from that in family 1, showing that the R222Q mutation has arisen independently in these two families.



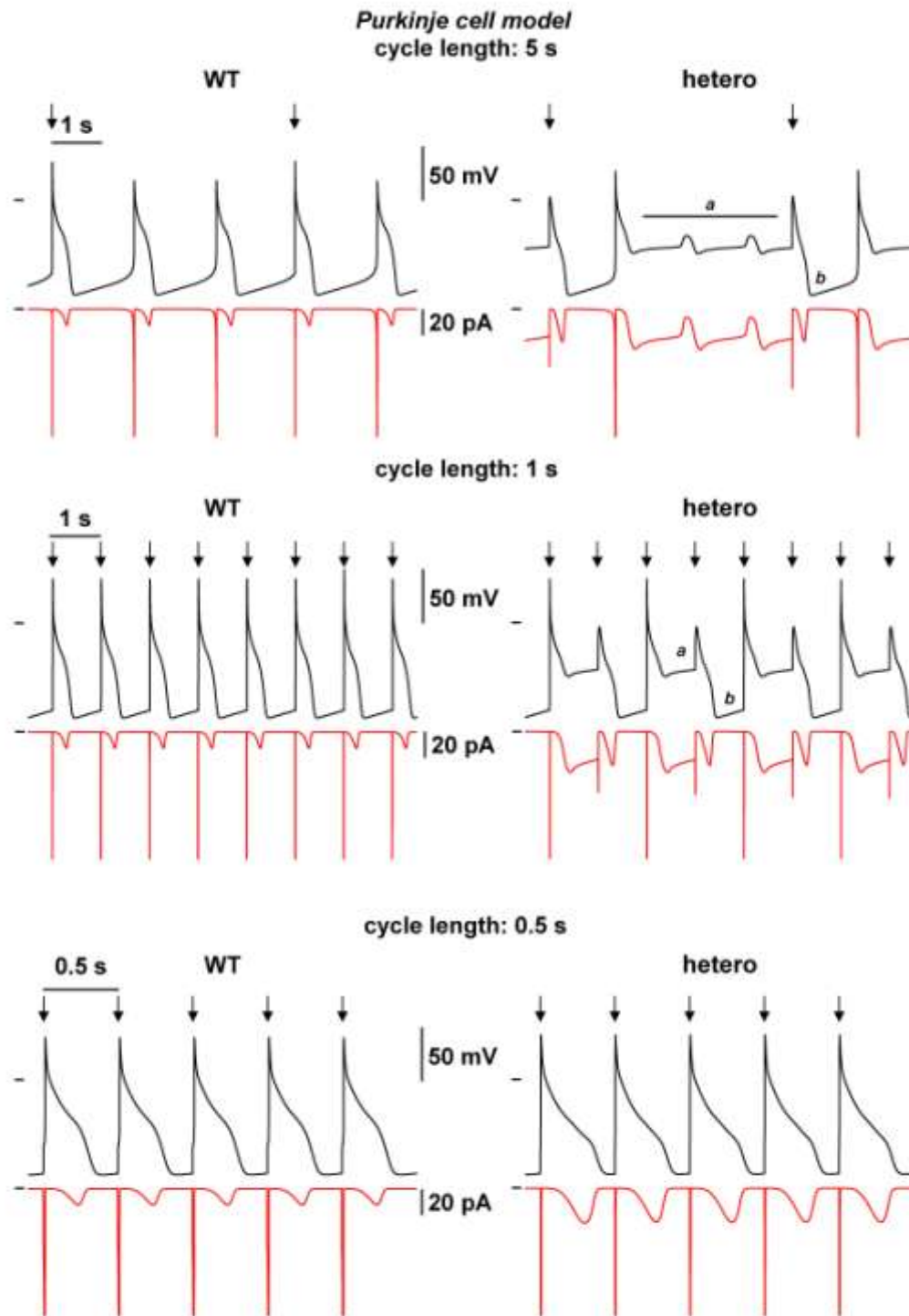
Supplemental Figure 3

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



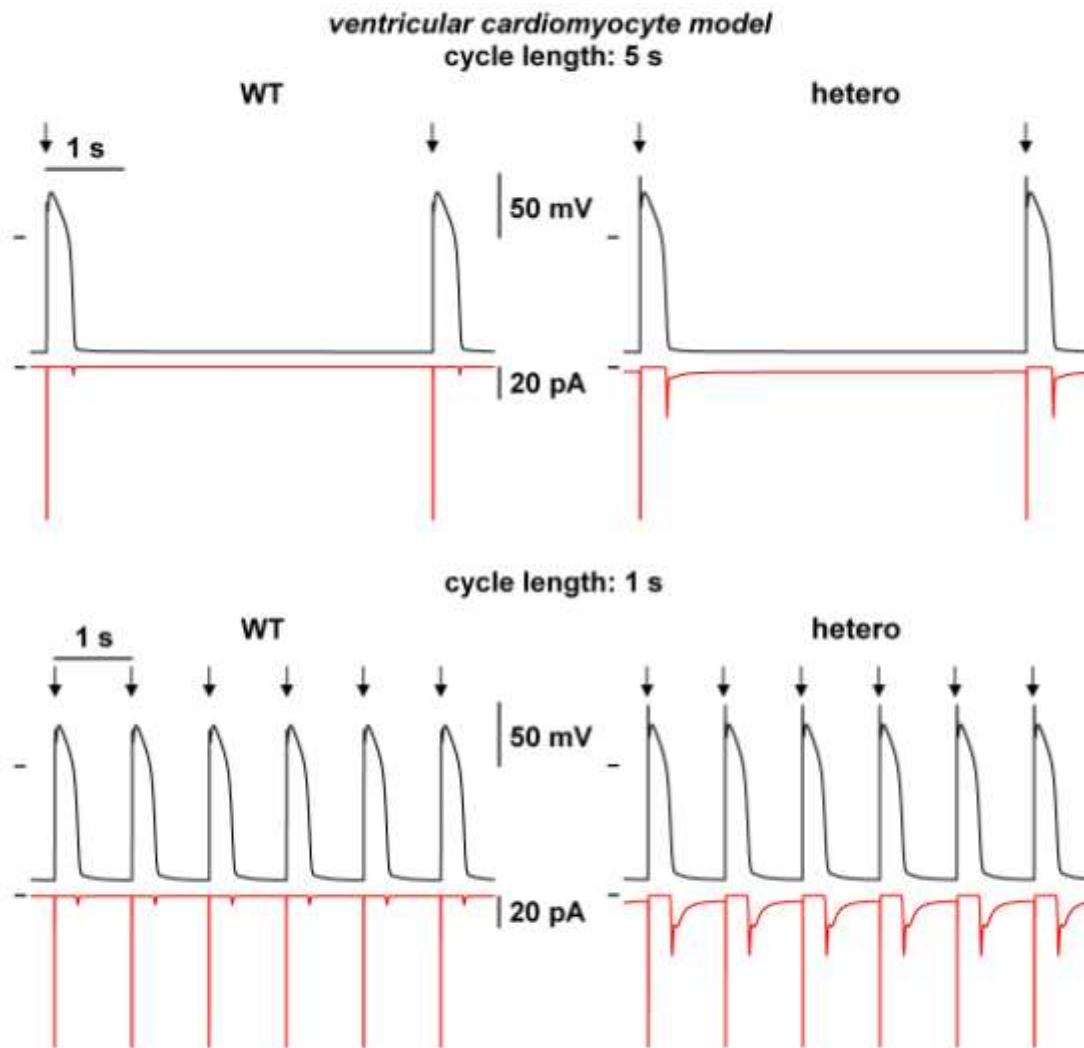
Supplemental Figure 4

(A) Superimposed activation and inactivation curves of WT (circles, solid line) and heterozygous (triangles, dashed line) channels obtained experimentally. Bottom inset: superimposed Na⁺ current recordings using the same voltage protocol as in figure 3. Scale bars: 2 ms, 1000 pA. Top inset: magnification of the window current. (B) and (C) Simulated curves of WT (circles, solid line) and heterozygous (triangles, dashed line) channels; activation and inactivation in ventricular cardiomyocyte (B) and Purkinje cell (C) models. Bottom inset, simulated Na⁺ currents as in A. Scale bars: 1 ms, 100 pA (D) and 5 ms, 100 pA (E). Top inset, magnification of the window current.



Supplemental Figure 5

Effects of the R222Q mutation on Purkinje cell action potential (AP) and Na^+ current obtained in the single-cell model. Simulated Purkinje cell AP (black) and late Na^+ current (red) in WT (left) and heterozygous (right) conditions at cycle lengths of 5 s (top), 1 s (middle) and 0.5 s (bottom). Arrows: external stimulus.



Supplemental Figure 6

Effects of the R222Q mutation on the ventricular cardiomyocyte action potential (AP) and Na⁺ current obtained in single-cell model. Simulated ventricular cardiomyocyte AP (black) and late Na⁺ current (red) in WT (left) and heterozygous (right) conditions at cycle lengths of 5 s (top) and 1 s (bottom). Arrows: external stimulus.

Supplemental movies

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

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

	current density	activation		inactivation		recovery from inactivation
	Peak at -20mV (pA/pF)	$V_{1/2}$ (mV)	k (mV)	$V_{1/2}$ (mV)	k (mV)	$t_{1/2}$ (ms)
WT	-205.8±29.3 (36)	-30.6±2.1 (9)	5.7±0.3 (9)	-79.6±0.7 (10)	5.6±0.2 (10)	7.6±0.6 (6)
heterozygous	-196.5±17.6 (48)	-37.2±1.6* (9)	7.1±0.3** (9)	-82.2±1* (9)	5.3±0.1 (9)	7.9±1.1 (8)
R222Q	-250.4±24.8 (44)	-42.3±1.0*** (11)	6.5±0.4 (11)	-84.6±0.7*** (8)	4.8±0.2** (8)	8.8±0.9 (8)

(n): number of cells; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$ vs. WT; $V_{1/2}$ and k; voltage for half-activation or -inactivation of the Na⁺ current and slope; $t_{1/2}$: time to reach 50% recovery of the Na⁺ current.

SUPPLEMENTAL REFERENCES

- (1) Nogami A, Naito S, Tada H et al. Demonstration of diastolic and presystolic Purkinje potentials as critical potentials in a macroreentry circuit of verapamil-sensitive idiopathic left ventricular tachycardia. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36(3):811-23.
- (2) Reithmann C, Hahnefeld A, Ulbrich M, Matis T, Steinbeck G. Different forms of ventricular tachycardia involving the left anterior fascicle in nonischemic cardiomyopathy: critical sites of the reentrant circuit in low-voltage areas. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2009; 20(8):841-9.
- (3) Tanner H, Hindricks G, Volkmer M et al. Catheter ablation of recurrent scar-related ventricular tachycardia using electroanatomical mapping and irrigated ablation technology: results of the prospective multicenter Euro-VT-study. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2010; 21(1):47-53.
- (4) Lopera G, Stevenson WG, Soejima K et al. Identification and ablation of three types of ventricular tachycardia involving the his-purkinje system in patients with heart disease. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2004; 15(1):52-8.
- (5) Rodriguez LM, Smeets JL, Timmermans C, Trappe HJ, Wellens HJ. Radiofrequency catheter ablation of idiopathic ventricular tachycardia originating in the anterior fascicle of the left bundle branch. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1996; 7(12):1211-6.
- (6) Genin E, Tullio-Pelet A, Begeot F, Lyonnet S, Abel L. Estimating the age of rare disease mutations: the example of Triple-A syndrome. *J Med Genet* 2004; 41(6):445-9.
- (7) Brinkmann B, Klintschar M, Neuhuber F, Huhne J, Rolf B. Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *Am J Hum Genet* 1998; 62(6):1408-15.
- (8) Kyndt F, Probst V, Potet F et al. Novel SCN5A mutation leading either to isolated cardiac conduction defect or Brugada syndrome in a large French family. *Circulation* 2001; 104(25):3081-6.

- (9) Loussouarn G, Park KH, Bellocq C et al. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PIP₂, controls KCNQ1/KCNE1 voltage-gated potassium channels: a functional homology between voltage-gated and inward rectifier K⁺ channels. *EMBO J* 2003; 22(20):5412-21.
- (10) DiFrancesco D, Noble D. A model of cardiac electrical activity incorporating ionic pumps and concentration changes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1985; 307(1133):353-98.
- (11) Iyer V, Mazhari R, Winslow RL. A computational model of the human left-ventricular epicardial myocyte. *Biophys J* 2004; 87(3):1507-25.
- (12) Keener J, Sneyd J. *Mathematical Physiology*, 2nd edition. Springer, 2001.
- (13) Aslanidi OV, Stewart P, Boyett MR, Zhang H. Optimal velocity and safety of discontinuous conduction through the heterogeneous Purkinje-ventricular junction. *Biophys J* 2009; 97(1):20-39.

2. Discussion

Dans cette étude, une nouvelle arythmie cardiaque a été décrite : tachycardie multifocale automatique du Purkinje. Elle se manifeste sous la forme de contractions ventriculaires prématurées associées ou non à une CMD.

Chez les individus atteints des deux familles étudiées, le séquençage des gènes impliqués dans l'association de troubles du rythme et de la cardiomyopathie dilatée a permis d'identifier la mutation c.665 G>A dans le gène *SCN5A*. Cette mutation se traduit au niveau protéique par la substitution d'une arginine par une glutamine en position 222. La caractérisation fonctionnelle de cette mutation a mis en évidence un changement de la dépendance au potentiel de l'activation et de l'inactivation : la présence de cette mutation accélère les cinétiques d'activation et d'inactivation et décale leurs courbes vers des potentiels plus négatifs augmentant ainsi le courant sodique de fenêtre.

Afin de relier les changements biophysiques, induits par la mutation R222Q, au phénotype des patients, des simulations informatiques ont été réalisées. En présence de cette mutation, les cellules de Purkinje montrent une hyperexcitabilité comparée aux myocytes ventriculaires provoquant ainsi l'apparition de potentiels d'action prématurés au niveau du ventricule.

L'implication de la mutation R222Q dans l'apparition de l'arythmie

Plusieurs arguments suggèrent fortement l'implication de cette mutation dans l'apparition de l'arythmie : (i) chez les membres des deux familles, porteurs de la mutation (7 hommes, 6 femmes dans la première et 3 hommes dans la deuxième famille), une pénétrance complète est observée. En effet, tous les individus atteints sont porteurs de la mutation R222Q. (ii) L'identification de la même mutation chez deux familles non apparentées, (iii) la similarité du phénotype chez les individus porteurs, (iv) l'absence de cette mutation chez 300 sujets contrôles. Par ailleurs, l'implication directe de la mutation R222Q dans l'apparition de la cardiomyopathie dilatée ne peut pas être complètement écartée. En effet, cette mutation a déjà été identifiée chez des patients atteints d'une forme familiale ou idiopathique de CMD (Hershberger *et al.*, 2008; Morales *et al.*, 2010). Dans ces dernières études, bien que

des contractions ventriculaires prématurées multifocales aient été rapportées chez un des patients atteints, aucun détail concernant le statut électrophysiologique des autres membres de la famille n'a été fourni (Morales *et al.*, 2010).

D'un point de vu structural, la position de la mutation R222Q et la substitution d'un acide aminé chargé positivement par un autre neutre suggèrent déjà un impact potentiel de cette mutation sur le fonctionnement du canal Na_v1.5. En effet, cette mutation est localisée au niveau de la deuxième charge du segment S4 du domaine I. Ce segment est un élément clé dans le mécanisme de régulation par le potentiel. Il est riche en acides aminés chargés positivement. Ces résidus confèrent la sensibilité au potentiel aux canaux sodiques qui se traduit par un changement de conformation de ces canaux de l'état fermé à l'état ouvert (Chanda *et al.*, 2004). La neutralisation de ces résidus pourrait induire des modifications de la dépendance au potentiel des canaux sodiques de la famille des Na_v. En effet, Stuhmer *et coll* et Kontis *et coll* ont mis en évidence de multiples changements de la dépendance au potentiel de l'activation et de l'inactivation du canal Na_v1.2 en neutralisant les acides aminés chargés des différents segments S4 de celui ci (Stuhmer *et al.*, 1989;Kontis *et al.*, 1997). Dans ces études, la mutation R220Q du canal Na_v1.2, équivalente à la mutation R222Q du canal Na_v1.5 accélère les cinétiques d'activation et d'inactivation et décale leurs courbes vers des potentiels plus négatifs (Stuhmer *et al.*, 1989;Kontis *et al.*, 1997). Dans notre étude, la caractérisation fonctionnelle de la mutation R222Q donne des résultats, en terme de modification de la dépendance au potentiel et d'accélération des cinétiques d'activation et d'inactivation, cohérents avec ceux obtenus par ces équipes.

Afin de relier les changements biophysiques provoqués par la présence de la mutation R222Q au phénotype des patients, des simulations informatiques ont été réalisées en se basant sur des modèles unicellulaires de potentiel d'action de cellules de Purkinje (DiFrancesco & Noble, 1985) et de cellules ventriculaires (Iyer *et al.*, 2004). En présence de la mutation R222Q et pour une durée de cycle de stimulation d'une seconde, les cellules de Purkinje montrent une hyperexcitabilité comparée au myocytes ventriculaires. En effet, à l'état hétérozygote, on observe de fortes modifications de la forme du potentiel d'action des cellules de Purkinje. Ces modifications traduisent l'apparition de post-dépolarisations précoces (EAD) corrélées avec une augmentation du courant sodique persistant. Pour une durée de cycle plus courte (0.5 s), on observe une disparition des EAD et une normalisation de

la forme du potentiel d'action de ces cellules. En revanche, la présence de cette mutation ne provoque pas d'importante modification du potentiel d'action ventriculaire. Ces résultats peuvent expliquer les données cliniques concernant l'origine des troubles du rythme et leurs disparitions lors d'un test d'effort. Par ailleurs, la capacité des anomalies apparues au niveau des fibres de Purkinje à déclencher des contractions ventriculaires prématurées a été étudiée. Pour se faire, nous avons construit, en collaboration avec l'équipe du laboratoire de mathématiques Jean Leray à Nantes, un modèle multicellulaire regroupant les modèles cellulaires de Purkinje et de ventricule. Ces simulations montrent, en condition sauvage, une propagation normale des potentiels d'actions en provenance des cellules de Purkinje au niveau ventriculaire. En revanche, la présence de la mutation R222Q à l'état hétérozygote provoque l'apparition de potentiels d'action prématurés au niveau ventriculaire. Ces derniers disparaissent lorsque le rythme cardiaque est accéléré.

L'ensemble de ces données renforce et confirme le lien entre le génotype et le phénotype observés.

Lien entre la mutation, l'arythmie et la cardiomyopathie dilatée

Chez les deux familles présentant une tachycardie multifocale automatique du Purkinje, une CMD a été diagnostiquée chez trois femmes et deux hommes. Cette cardiomyopathie pourrait être définie, dans ce cas, comme étant une cardiomyopathie rythmique, c'est à dire que sa survenue est la conséquence des troubles du rythme observés chez ces patients. En effet, plusieurs arguments tendent à confirmer cette hypothèse : (i) il n'existe aucun cas de CMD isolée chez ces deux familles, cette atteinte structurale étant toujours associée aux troubles du rythme, (ii) l'amélioration de la fonction cardiaque après le traitement des troubles du rythme. Cette amélioration se traduit par une augmentation de la fraction d'éjection systolique à plus de 50-60% au lieu de 30-45% (valeurs permettant d'établir un diagnostic de cardiomyopathie dilatée). Cependant, dans deux autres études, la mutation R222Q a été associée à des cas de CMD familiales ou idiopathiques (Hershberger *et al.*, 2008; Morales *et al.*, 2010). Afin de confirmer le caractère secondaire de l'apparition de la CMD ou au contraire établir un lien direct entre la

mutation et cette anomalie structurale, il est nécessaire de définir les profils électrocardiographiques de surface et intra-cavitaire chez ces patients.

Limites de l'étude

Au cours de cette étude, une nouvelle arythmie cardiaque a été décrite et un mécanisme moléculaire impliquant la mutation R222Q du canal Na_v1.5 associée à ce phénotype est proposé. Cependant, cette étude montre plusieurs limites qui peuvent être résumées par les points suivants :

(i) **L'utilisation d'un système d'expression hétérologue**, les cellules COS-7. Comme décrit précédemment, ce système n'exprime pas l'ensemble des protéines partenaires du canal Na_v1.5. Donc les effets observés de la mutation R222Q peuvent être différents par rapport au système natif. Cela a été démontré pour d'autres mutations telles que la mutation E1053K de Na_v1.5 associée au SBr. En effet, la présence de cette dernière provoque une modification de la dépendance au potentiel de l'activation et un ralentissement des cinétiques de levée d'inactivation quand elle est exprimée dans les cellules HEK293. En revanche, quand le canal muté est ré-exprimé en infectant des cardiomyocytes adultes de rat, cette mutation provoque la perte de l'adressage du canal Na_v1.5 à la membrane sans changer les paramètres biophysiques de celui-ci (Mohler *et al.*, 2004).

(ii) **L'utilisation de modèles mathématiques de potentiels d'action basés sur deux modèles cinétiques différents**. Les équations mathématiques modélisant les courants ioniques dans le modèle cellulaire de Purkinje sont basées sur le modèle cinétique de Hodgkin-Huxley avec trois transitions : ouvert, fermé et inactivé, alors que celles du modèle ventriculaire sont basées sur un modèle plus complexe, le modèle Markovien. Ce dernier tient compte des différents états ouverts, fermés et inactivés du canal sodique. Une des conséquences directes de cette différence est que le degré de précision de ces deux modèles sera différent. Pour le modèle de Purkinje, pour mimer l'effet fonctionnel de la mutation R222Q, un ajustement des équations des paramètres α_m , β_m et de β_h est effectué pour reproduire respectivement le même décalage relatif de la dépendance au potentiel de l'activation et de l'inactivation (*Cf.* article). Cependant, l'ajustement de ces paramètres ne décale pas seulement la dépendance au potentiel de l'activation et de l'inactivation du canal mais modifie aussi les cinétiques d'activation et d'inactivation de celui-ci. Il se trouve que ces variations vont dans le même sens que celles

observées dans l'étude fonctionnelle du variant R222Q dans les cellules COS-7. Cependant, le fait de ne pas pouvoir contrôler les paramètres des cinétiques d'activation et d'inactivation représente une des limites du modèle mathématique de Purkinje.

(iii) Comme décrit précédemment dans l'article, le phénotype pathologique est plus au moins prononcé en fonction du rythme cardiaque. En effet, les extrasystoles ventriculaires surviennent à basses fréquences cardiaques alors qu'elles disparaissent durant un test d'effort. Lors d'un test d'effort, le rythme cardiaque est accéléré suite à l'activation du système β -adrénergique. Cette activation provoque, entre autre, une augmentation de certains courants ioniques tels que le courant I_{Ks} , produisant ainsi un raccourcissement du potentiel d'action. Or, nos simulations informatiques imposent le rythme cardiaque sans tenir compte des voies de régulations de celui-ci et donc des différentes modifications cellulaires qui se produisent dans ces conditions. Il serait donc intéressant d'évaluer l'effet du rythme cardiaque sur la sévérité du phénotype des patients en utilisant un modèle plus complet tel que le modèle développé par Terrenoire et coll (Terrenoire *et al.*, 2005). En effet, ce modèle tient compte des voies de régulations PKA dépendantes des canaux calciques Cav1.2, des canaux potassiques $K_v7.1$ et de phospholamban lors d'une stimulation beta-adrenergique.

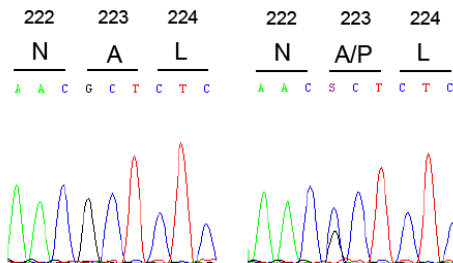
B. Etude de l'implication d'un mutant du canal $Ca_v1.2$ dans le Syndrome du QT court associé à un déficit en carnitine.

1. Introduction

Le canal calcique cardiaque $Ca_v1.2$ est impliqué dans différents troubles du rythme cardiaque comme le SQTl congénital de type 8 (Splawski *et al.*, 2004) mais aussi dans le SBr associé ou non à un intervalle QT court (< 360 ms) (Antzelevitch *et al.*, 2007). Plus récemment cette même équipe a publié une mutation de la sous-unité β responsable uniquement d'un phénotype de SBr (Cordeiro *et al.*, 2009).

Dans notre étude, un séquençage des gènes candidats *KCNJ2*, *KCNQ1*, *KCNH2* et *CACNA1C* chez 15 patients atteints du syndrome du QT court a été réalisé. Il a permis de mettre en évidence la substitution c.667G>C dans le gène *CACNA1C* chez un individu (figure 15A). Elle conduit au niveau protéique à la substitution d'une alanine en position 223 par une proline. Ce résidu est situé sur la boucle extracellulaire S3-S4 du domaine I du canal $Ca_v1.2$ (figure 15B). Ce variant est absent chez 312 sujets contrôles.

A



B

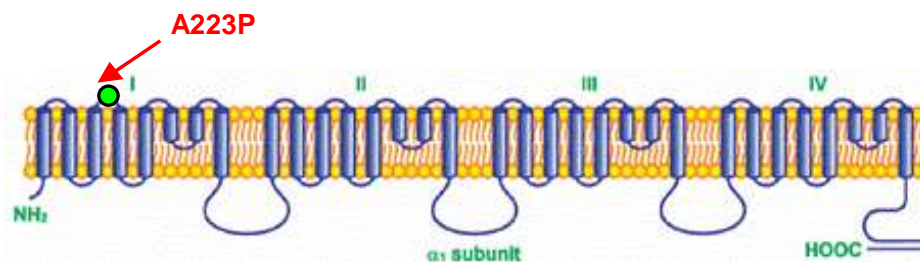


Figure 15 : Le variant A223P du canal calcique $Ca_v1.2$. A, localisation du variant A223P sur la sous unité α_1c du canal $Ca_v1.2$; B, Electrophorégramme de la séquence d'un individu contrôle (gauche) et du *propositus* muté portant le variant A223P (droite).

Le *propositus* est un enfant de 22 mois hospitalisé pour une syncope. Un examen holter a révélé des durées moyennes de QTc à 340 ms pouvant se raccourcir jusqu'à 270 ms. Le recrutement de la famille, réalisé au CHU de Tours, a permis de diagnostiquer un intervalle QT raccourci chez la mère (QTc = 359 ms) qui est aussi symptomatique (fibrillation ventriculaire) et porteuse du variant A223P du canal Ca_v1.2. La grand-mère transmettrice de ce variant présente un intervalle QT normal et aucun antécédent arythmique. Un test à l'ajmaline servant à démasquer un SBr réalisé chez la mère et la grand-mère du *propositus* s'est révélé négatif (figure 16 A et B). Enfin, tous les membres de la famille présentent une échocardiographie normale.

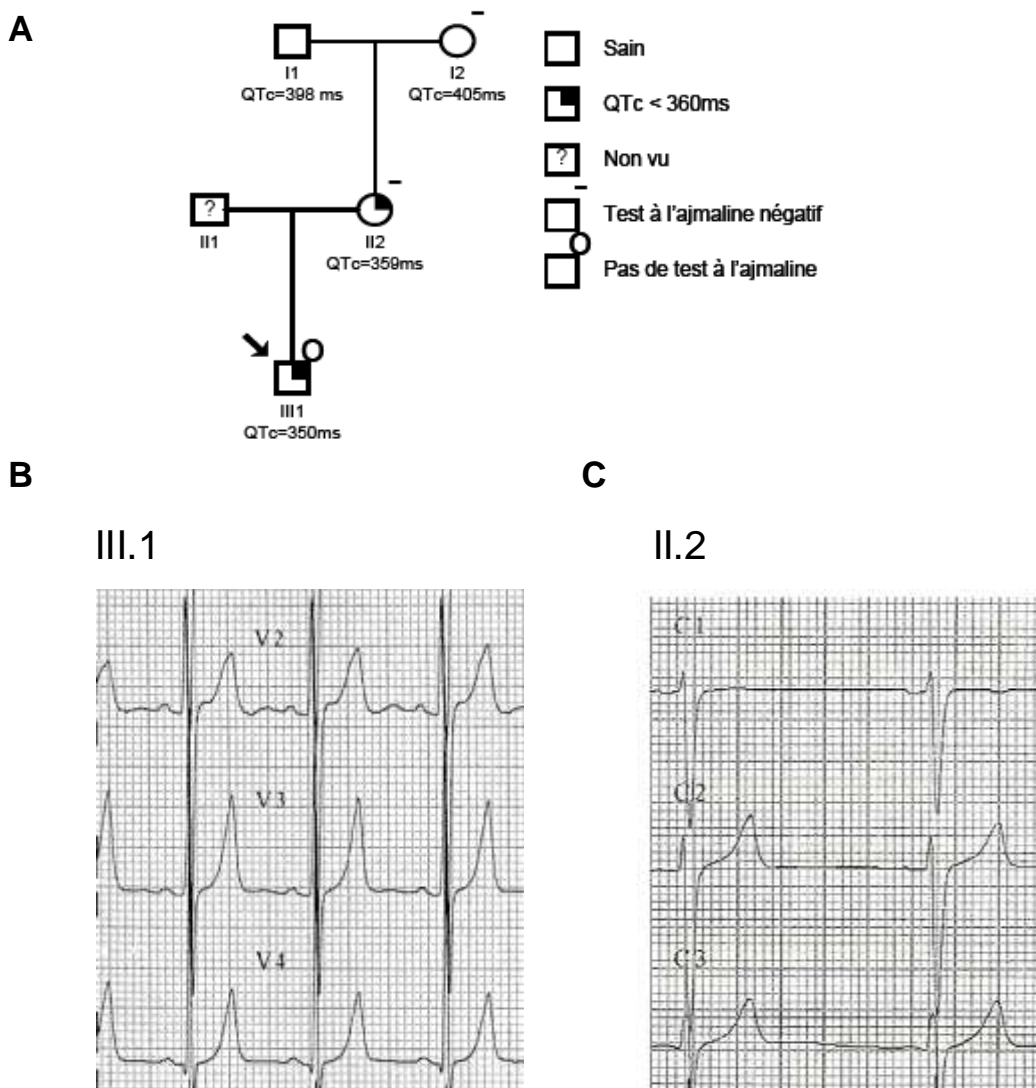


Figure 16 : Famille du *propositus* et ECG représentatifs du SQTC. A, arbre généalogique de la famille porteuse du variant A223P. B et C, respectivement, les ECG du *propositus* et de sa mère portant le variant A223P.

De plus, le *propositus* ainsi que sa mère présentent un déficit primaire en carnitine. Le séquençage du gène codant le transporteur à la carnitine OCTN2 (*SLC22A5*) a permis l'identification de deux variants hétérozygotes (on parle alors de variants hétérozygote composite). La grand-mère du *propositus*, quant à elle, porte le un variant unique sur le gène *SLC22A5*, et ne présente pas de QT court (figure17).

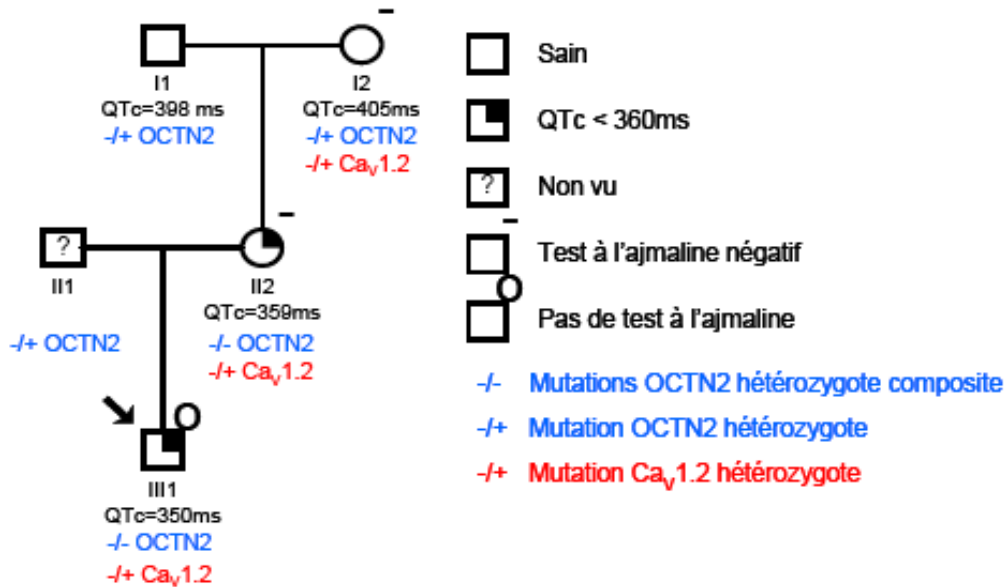


Figure 17 : Arbre généalogique de la famille porteuse du variant A223P et du mutant OCTN2.

La carnitine est un petit amine quaternaire qui sert de cofacteur essentiel pour le transport des acides gras à longue chaîne à travers la membrane mitochondriale interne (Bremer, 1983). Elle est essentielle pour leur métabolisme dans le cœur. La concentration de la carnitine tissulaire est généralement 20 fois à 50 fois plus élevée que dans le plasma (Bremer, 1983;Stanley, 1987). Ce gradient de concentration est maintenu grâce à un système de transport actif (Stanley, 1987).

Seuls les reins, le foie et le cerveau ont l'ensemble des enzymes de synthèse de la carnitine (Bremer, 1983;Rebouche, 1992). La plupart des tissus dépendent donc de la captation de cette amine dans le sang par un système de transport actif. Ce transport est médié par la protéine transmembranaire OCTN2 (Wu *et al.*, 1998;Tamai *et al.*, 1998),.

Une déficience de OCTN2 au niveau des fibroblastes, les muscles, le cœur, et les reins conduit à un déficit primaire en carnitine (Tein *et al.*, 1990;Stanley *et al.*, 1991;Pons *et al.*, 1997). C'est une maladie autosomique récessive caractérisé par une réduction du taux plasmatique de carnitine systémique (Tein, 2003), coma hypoglycémiques récurrentes et elle est associée le plus souvent à une

cardiomyopathie et/ou à la survenue de fibrillation ventriculaire et à la mort subite (Rahbeeni *et al.*, 2002; Tein, 2003; Meleggh *et al.*, 2004; Amat di San *et al.*, 2008). Ces cas de déficience en carnitine sont la conséquence de mutations des deux allèles du gène *SLC22A5* et répondent donc à un modèle de transmission récessif. Un diagnostic précoce et un traitement avec une supplémentation en L-carnitine reverse les signes cliniques de la pathologie et peut prévenir l'apparition de cardiomyopathies (Lamhonwah *et al.*, 2002).

D'autre part, la carnitine a été décrite comme un régulateur potentiel des canaux $Ca_v1.2$. En effet, quand elle est sous forme de palmitoyl-carnitine, elle provoque un effet biphasique sur la probabilité d'ouverture des canaux $Ca_v1.2$ reconstitués dans des bicouches lipidiques. Son implication du côté intra ou extracellulaire provoque une augmentation de la probabilité d'ouverture du canal suivie quelques minutes plus tard par une diminution de celle-ci (Liu & Rosenberg, 1996). De plus, la palmitoyl-carnitine augmente la décharge calcique du réticulum sacroplasmique par une interaction directe avec les récepteurs à la ryanodine (el Hayek *et al.*, 1993).

En se basant sur ces données, nous avons étudié les conséquences fonctionnelles de la présence du variant A223P du canal calcique $Ca_v1.2$ ainsi que sa régulation potentielle par l'acylcarnitine. Des études de patch-clamp ont été entreprises dans un système d'expression hétérologue (HEK-tsA201). Une estimation du niveau d'expression totale de la protéine $Ca_v1.2$ a été réalisée par western blot, ainsi que de son taux d'expression membranaire par les techniques de biotinylation et d'immunomarquage.

2. Matériels et méthodes

a) Ré-expression hétérologue dans des cellules de mammifères

➤ Les cellules HEK tsA-201

Les cellules HEK tsA-201 sont des cellules embryonnaires humaines de rein, immortalisées par transformation avec l'antigène T d'un mutant du virus simien SV40. Cette lignée est utilisée comme système d'expression des canaux calciques $Ca_v1.2$ du fait de l'absence de courant calcique endogène dépendant du potentiel. Ces cellules sont cultivées dans des flasques en plastique de 25 cm² dans un

incubateur humidifié à 37°C, en présence de 5% de CO₂. Le milieu de culture est composé de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), 10% de sérum de veau fœtal et de 2 mM de L-glutamine. Le repiquage se fait tous les 4 jours. Il est réalisé en quatre étapes :

- Le milieu de culture du flasque est remplacé par 2 mL de tampon PBS/EDTA (Phosphate Buffered Saline/ EthyleneDiamine Tetraacetic Acid) contenant du NaCl (137 mM), KCl (2,7 mM), Na₂HPO₄ (8 mM), KH₂PO₄ (1,5 mM), 0,1% d'EDTA.

- Afin de détacher les cellules de leur support, le tampon est remplacé par 1 mL d'une solution à 0,25% de trypsine, solubilisée dans le tampon PBS/EDTA, laissée pendant 2 minutes à l'incubateur. L'action enzymatique est arrêtée par addition de 4 mL de milieu de culture.

- Les cellules sont mécaniquement individualisées grâce au cisaillement créé par l'aspiration et l'éjection à l'aide d'une pipette.

- Après centrifugation à 9000 tr/min pendant 3 minutes, les cellules sont remises en suspension et de nouvelles flasques sont ensemencées.

b) Transfection transitoire des cellules HEK tsA201

➤ Agent de transfection

Les cellules sont transfectées en utilisant le JetPEI (Polyplus Transfection Co, Strasbourg, France). Il s'agit d'un mélange de lipides cationiques qui compacte l'ADN en particules chargées positivement capables d'interagir avec les protéoglycanes anioniques situés à la surface de la cellule puis de pénétrer dans la cellule par endocytose.

➤ Protocole de transfection du canal calcique Ca_v1.2 et ses sous-unités régulatrices

Pour une boîte de Pétri de 35 mm de diamètre contenant des cellules HEK tsA-201 à une confluence de 80%, deux tubes Eppendorf sont préparés séparément, ils contiennent :

- 1) 6.8 µL de JetPEI + 78.2 µL de NaCl (150 mM)

- 2) 3.4 µg de plasmides qsp 85 µL de solution NaCl (150 mM)

Les deux tubes sont mélangés. Le mélange est laissé 20 minutes environ à température ambiante puis déposé sur les cellules dans 2 mL de milieu de culture et laissé pendant 48 heures dans l'incubateur.

Afin d'isoler les cellules, un repiquage est réalisé selon le protocole présenté précédemment. Elles sont ensuite utilisées 3 à 4 jours après la transfection. Afin de détecter les cellules transfectées lors des expériences de *patch-clamp*, le plasmide pIRES-CD8 a été utilisé. La molécule CD8 est un marqueur présent à la surface de certains lymphocytes T. La transfection des cellules avec le plasmide codant pour cette molécule et l'utilisation d'anticorps couplés à des microbilles magnétiques dirigés contre celle-ci vont permettre la visualisation des cellules transfectées. Les proportions plasmidiques utilisées dans cette étude sont les suivantes :

- 1 µg de plasmide pCDNA3-Ca_v1.2-Tag HA WT ou pCDNA3-Ca_v1.2-A253P-Tag HA.

La séquence du peptide codant un tag HA a été insérée au niveau de la séquence de la boucle extracellulaire de Ca_v1.2 entre le domaine S5 et S6 du domaine II : 681-EMQTA**HYPYDVDPDY**AVTFDE-700 [la séquence du tag HA est signalée en gras (donné par Emmanuel Bourinet, CNRS UMR 5203, INSERM U661, université de Montpellier 1 et 2)];

- 1 µg de plasmide pMT2 β2a;
- 1 µg de plasmide pMT2 α2δ1;
- 0,4 µg de plasmide pIRES-CD8.

c) Analyse des courants ioniques, technique de *patch-clamp*

➤ Enregistrement des courants en *patch-clamp*

Toutes les études électrophysiologiques présentées dans les résultats sont réalisées en configuration «cellule entière». Elle permet d'enregistrer l'ensemble des courants de la cellule. Elle consiste à poser la pointe d'une pipette en verre, dont l'extrémité a un diamètre d'environ 1 µm, sur une membrane cellulaire de telle sorte que le contact pipette/membrane soit électriquement très résistant. Ce contact est augmenté par une légère aspiration exercée à l'intérieur de la pipette. Lorsque la résistance du contact atteint le gigaOhm, le contact est alors appelé "giga-seal". Cette très grande résistance permet une isolation électrique parfaite de l'ensemble

pipette-cellule. Pour la configuration «cellule entière», le fragment de membrane isolé sous la pipette est aspiré à l'aide d'une seringue. Après avoir rompu la membrane de la cellule, la résistance entre le milieu intra-pipette et le milieu intracellulaire va diminuer, permettant l'accès électrique au milieu intracellulaire. Le potentiel de membrane est alors imposé et les courants transmembranaires sont enregistrés entre l'électrode placée dans la pipette et celle de référence dans le bain, à l'aide d'un amplificateur de patch-clamp (AxoPatch 200A, Axon Instruments) relié à un ordinateur et en utilisant le logiciel d'acquisition et d'analyse Acquis-1 (Bio-Logic).

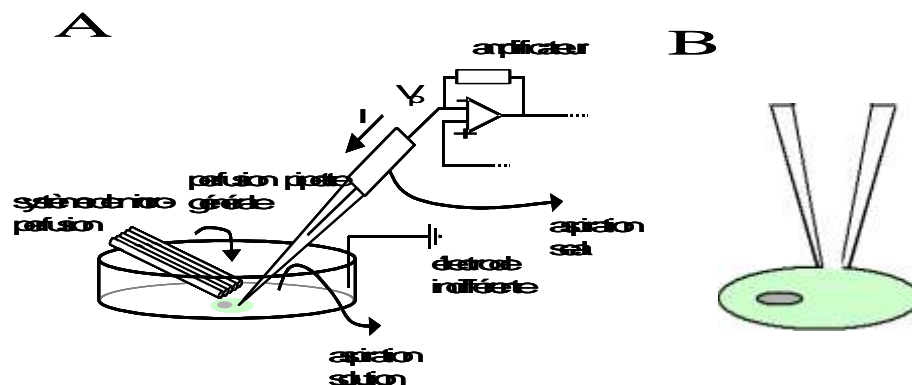


Figure 18: Schéma d'une installation de patch clamp (A) et de la configuration cellule entière (B).

➤ Analyse du courant calcique I_{CaL}

Le courant I_{CaL} s'active rapidement après une dépolarisation de la membrane. La séquence de stimulation comprend une phase de dépolarisation à 0 mV, d'une durée de 200 ms, activant le courant. Sont mesurées l'amplitude du courant à -80 mV, l'amplitude du courant maximum à 0 mV et l'amplitude du courant à 200 ms de dépolarisation à 0 mV (figure 19).

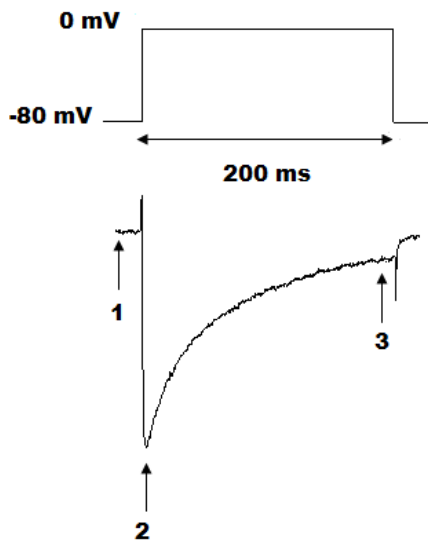


Figure 19 : Séquence de stimulation et courant résultant. (1) amplitude du courant à -80 mV ; (2) amplitude du courant maximum à 0 mV; (3) amplitude du courant à 200 ms de dépolarisation à 0 mV.

➤ La courbe d'activation

La sensibilité au potentiel du courant est évaluée en utilisant le protocole suivant : un pulse variable de -60 mV à +50 mV, d'une durée de 200 ms, avec un incrément de 10 mV ; Fréquence de stimulation : 1/7 Hz est imposée. Entre deux séquences, le potentiel est maintenu à -80 mV (figure 20).

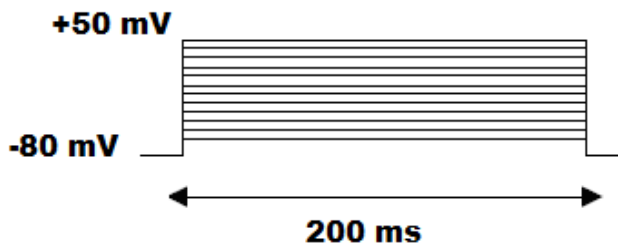


Figure 20 : Protocole de stimulation permettant l'estimation de l'activation

Les paramètres $V_{1/2}$ d'activation et k sont calculés par régression non-linéaire de la courbe d'activation selon la fonction de Boltzman :

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

où G (au potentiel imposé) = $I / E_m - E_{Ca}$

Avec k , constante de Boltzman ; V_p , potentiel du pulse ; G , conductance mesurée au potentiel imposé ; I , courant mesuré ; E_m , potentiel imposé ; E_{Ca} , potentiel d'inversion.

➤ La courbe d'inactivation

La disponibilité des canaux en fonction du potentiel est évaluée en utilisant le protocole suivant : un prépulse à potentiel variable de -60 mV à +20 mV, d'une durée de 500 ms, avec un incrément de 5 mV ; Fréquence de stimulation : 1/7 Hz, est suivie d'un test pulse à 0 mV, d'une durée de 200 ms (figure 21).

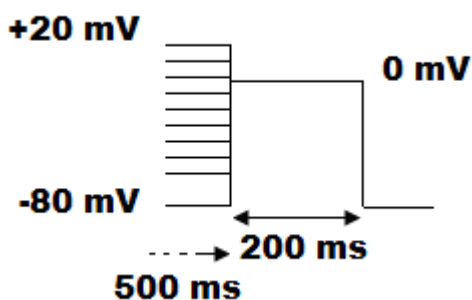


Figure 21: Protocole de stimulation permettant l'estimation de l'inactivation

Les paramètres $V_{1/2}$ d'inactivation et k sont calculés par régression non-linéaire de la courbe de disponibilité selon la fonction de Boltzman :

$$I/I_{\max} = 1 / (1 + \exp(-(V_p - V_{1/2} \text{ d'inactivation})/k))$$

Avec k , constante de Boltzman ; V_p , potentiel du prépulse.

d) Analyse biochimiques du canal calcique $Ca_v1.2$

➤ Western blot

La technique de Western blot est utilisée afin d'estimer le taux d'expression totale de la protéine $Ca_v1.2$ dans les cellules HEK tsA-201. Lorsque les cellules sont à confluence, elles sont lysées dans un tampon contenant du NaCl à 150 mM, du tris pH 7.2 à 20 mM, de l'EDTA à 1 mM, du triton 1X, du PMSF à 1 mM repris dans l'éthanol absolu ainsi qu'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche diagnostics). Les lysats cellulaires sont mis en rotation pendant 20 min à 4°C puis centrifugés à 14 000 G, 20 min à 4°C également. Un dosage protéique est ensuite effectué contre une gamme étalon d'albumine sérique bovine (BSA) afin de charger une quantité de protéines similaire dans chaque puits. Puis les lysats sont dénaturés 30 min à température ambiante dans un tampon LAEMMLI contenant : 2% de SDS, 10% de glycérol, 10 mM de DTT, 65 mM de tris à pH 6.8 et une pointe de bleu de bromophénol. 25 μ g de chaque échantillon sont déposés sur un gel de polyacrilamide 10% et les protéines sont séparées par électrophorèse en présence

de SDS. Après environ 1h30 de migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose pendant 3h30 à 150mA dans un tampon contenant : de la glycine à 192 mM, du tris à 25 mM, du SDS à 0.1% et de l'éthanol à 20%. Afin de vérifier la qualité de la migration et du transfert, les protéines sont colorées avec du rouge ponceau. Après rinçage, la membrane est saturée pendant une heure dans un tampon TBS-T (tris 10 mM, NaCl 0.5 mM et tween 0.1%) contenant 5% de lait lyophilisé. Puis la membrane est incubée en présence de l'anticorps dirigé contre le tag HA (Roche, fait chez le rat, 100 µg/mL) dilué au 1/1000ème pendant toute une nuit à 4°C dans du TBS-T lait. De la même façon que pour Ca_v1.2, l'expression de la protéine β-tubuline a été évaluée en utilisant l'anticorps anti β-tubuline (Santa Cruz, fait chez le lapin) dilué au 1/1000ème. Trois lavages de 5 minutes dans le TBS-T lait sont ensuite effectués puis la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire anti rat couplé à la HRP (Sigma) dilué au 1/2000ème, pendant 2 heures à température ambiante dans le TBS-T lait. Pour révéler la β-tubuline, l'anticorps secondaire utilisé est l'anticorps anti-lapin HRP (Tebu) dilué au 1/5000ème, pendant 1 heure à température ambiante dans le TBS-T lait. Après 3 rinçages au TBS-T de 10 minutes chacun, la révélation est effectuée par un kit de détection de chémiluminescence (Western C, biorad) à l'imageur (GE Healthcare).

➤ **Biotinylation des canaux Ca_v1.2**

La technique de biotinylation des protéines membranaires est utilisée afin de quantifier l'expression de la protéine Ca_v1.2 à la membrane de cellules HEK tsA-201 (figure 22). Les cellules à confluence sont rincées avec du PBSCM puis incubées avec de la biotine couplée à un groupement ester sulfonique par un pont disulfure (sulfo-NHS-SS-biotine, thermo scientific) diluée dans le PBSCM à 0,5 mg/mL pendant 30 minutes à 4°C sous agitation douce. Les cellules sont ensuite rincées avec du PBS contenant 200 mM de glycine, trois fois dix minutes. Puis, les cellules sont lysées, centrifugées et dosées selon le même protocole que le Western blot. 1.5 mg de lysat protéique est incubé avec 50µL de streptavidine couplée à des billes d'agarose (thermo scientific) pendant une nuit à 4°C et sous agitation. Les protéines biotinylées liées à la streptavidine sont purifiées par centrifugation (1000 rpm, 1 minute) et lavées avec le tampon de lyse utilisé précédemment. Cette étape est répétée 4 fois en alternant les tampons de lyse contenant 150 mM et 500 mM de NaCl. Les protéines biotinylées ainsi précipitées sont dénaturées 30 minutes à

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

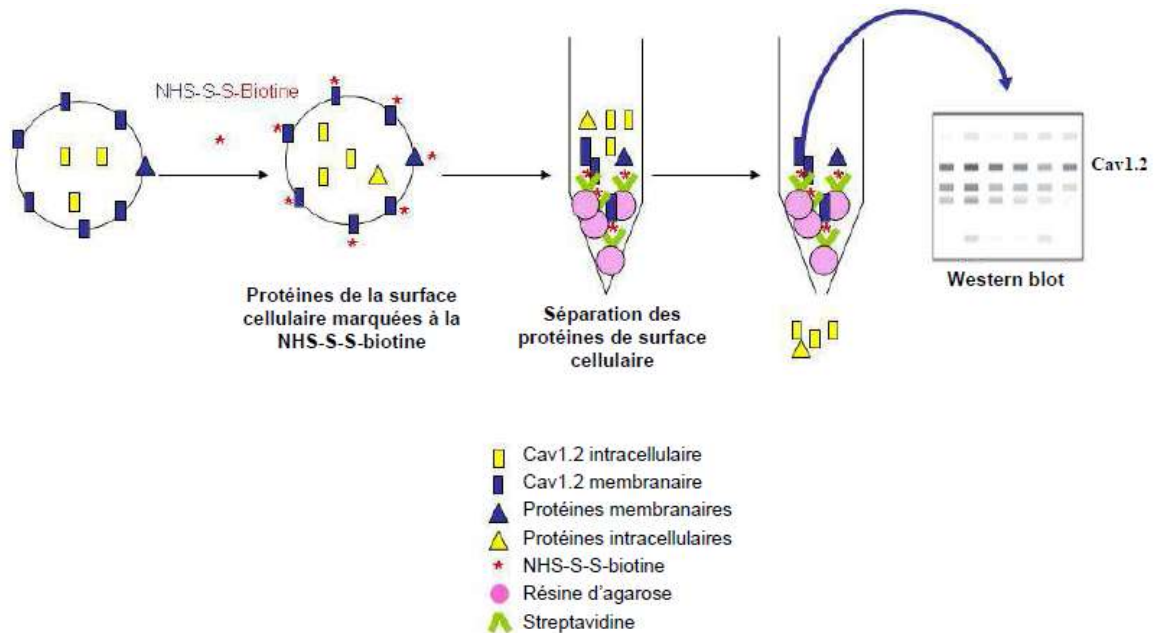


Figure 22 : Technique de marquage des protéines de surface. Les protéines de surface sont marquées à la biotine, puis elles sont purifiées par affinité sur une résine d'agarose-streptavidine. Le canal calcique $Ca_v1.2$ biotinylé est révélé par western blot en utilisant un anticorps spécifique dirigé contre le tag HA.

La suite de l'expérience (migration, transfert liquide, anticorps et révélation) s'effectue suivant le même protocole que le Western blot. De plus, La normalisation des niveaux d'expression membranaire se fait en évaluant l'expression du récepteur à la transferrine. En revanche, l'expression totale est normalisée par rapport à l'expression totale de la β -actine. La membrane a été incubée avec les anticorps anti-récepteur à la transferrine (1/500 ème, zymed , fait chez la souris) et anti β -actine (1/1000 ème, sigma, fait chez la souris) durant une nuit à 4°C. L'anticorps secondaire anti souris couplé à la HRP (Tebu) a ensuite été utilisé dilué au 1/10000 ème pendant 1 heure à température ambiante.

e) Immunomarquages

Afin d'évaluer le niveau d'expression de protéines $Ca_v1.2$, des immunomarquages ont été réalisés. Ces expériences sont effectuées sur des cellules transfectées ensemencées sur des lamelles de verre. Dans le but de

visualiser les canaux localisés dans l'ensemble de la cellule, un marquage de la protéine canal a été réalisé après perméabilisation des membranes.

Pour visualiser les canaux $Ca_v1.2$ localisés dans les compartiments intracellulaires, les cellules sont tout d'abord fixées au paraformaldéhyde PAF 2 %, pendant 15 minutes. Ensuite, les cellules sont perméabilisées avec 0.1% de Triton (Sigma) pendant 15 minutes. Puis, elles sont incubées avec l'anticorps primaire dirigé contre le tag HA extracellulaire pendant 1 heure à 4°C. Ces anticorps sont dilués au 1/200ème dans le PBS-BSA 1%. Après cette incubation, les cellules sont rincées trois fois avec du PBS contenant du calcium et du magnésium à 1 mM (PBSCM). Les cellules sont ensuite incubées avec l'anticorps secondaire anti-rat couplé à un fluorochrome (Alexa fluor 488, fait chez la chèvre, longueur d'onde d'émission 519 nm) dilué au 1/1000 ème pendant 1 heure à température ambiante.

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

f) Statistiques

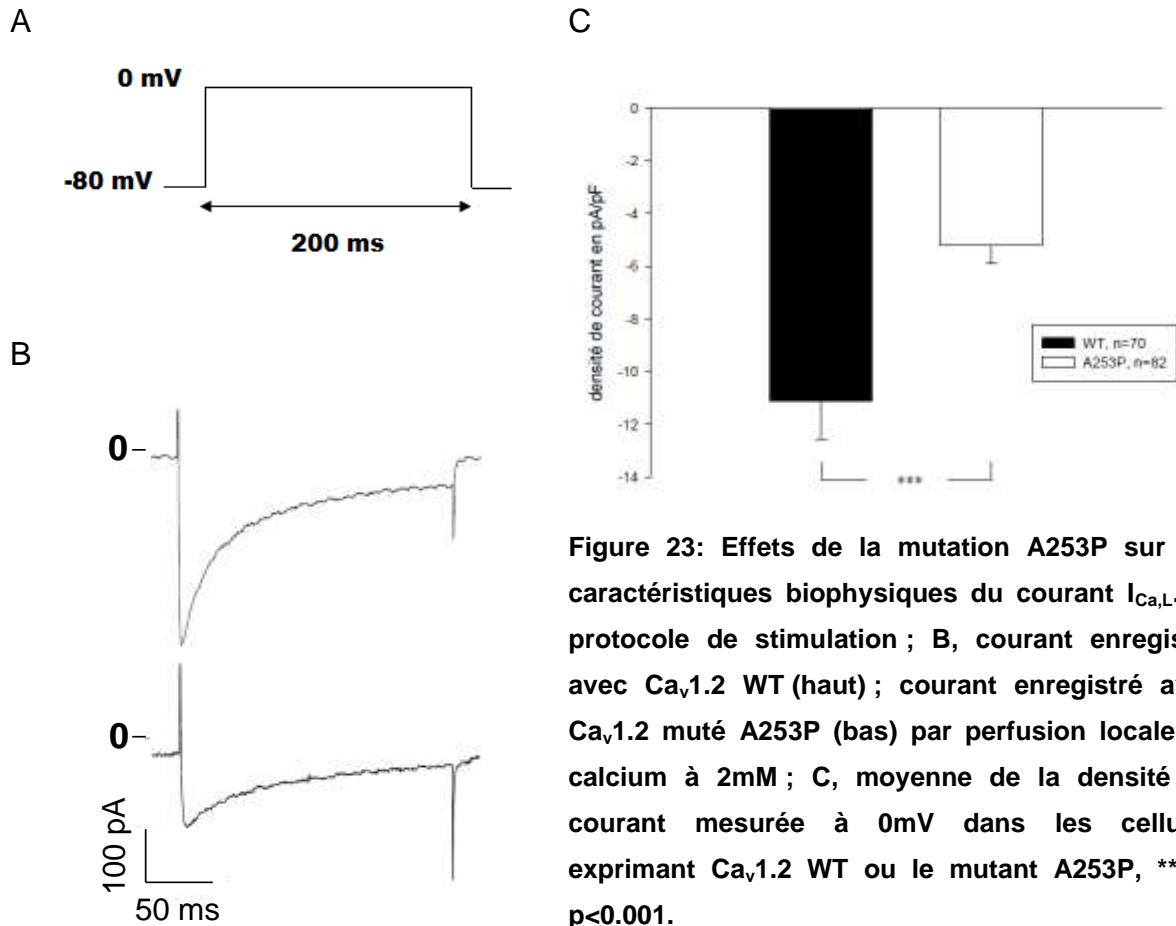
Les résultats sont présentés sous la forme de moyenne \pm écart-type de la moyenne. Les différences sont statistiquement testées en utilisant un test non paramétrique, le test de Mann-Whitney. Une valeur de $P < 0.05$ est considérée comme significative.

3. Résultats

a) Effet du variant $Ca_v1.2$ A253P sur le courant $I_{Ca,L}$

La caractérisation fonctionnelle de l'effet du variant A253P sur l'activité du canal $Ca_v1.2$ a été réalisée dans les cellules HEK tsA-201. Le courant $I_{Ca,L}$ enregistré dans les cellules transfectées avec $Ca_v1.2$ WT et ses sous-unités régulatrices a été comparé avec celui des cellules transfectées avec $Ca_v1.2$ A253P et ses sous unités régulatrices (figure 23). Une des difficultés rencontrée dans cette étude est le faible taux d'expression du canal calcique $Ca_v1.2$ dans ce modèle cellulaire. En effet, seul 75% des cellules exprimant $Ca_v1.2$ WT présentent un courant calcique. Ce dernier est de faible amplitude (en moyenne 11 pA/pF). En condition mutée, le courant calcique $I_{Ca,L}$ n'est enregistré que dans 55% des cas. Le courant obtenu est de plus petite amplitude que dans les cellules exprimant le canal sauvage (figure 23 B). En

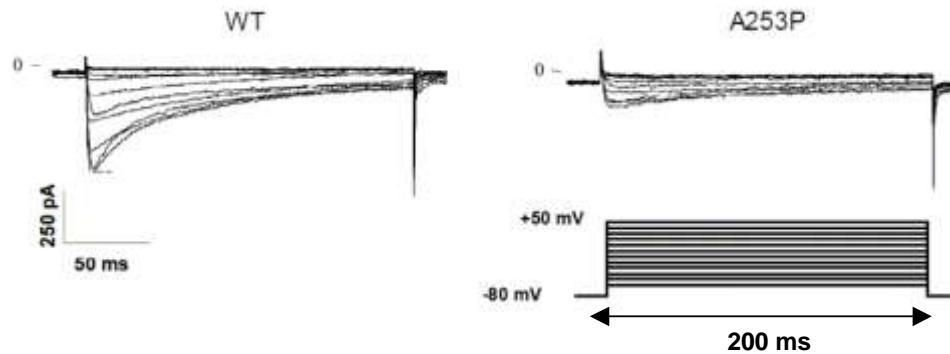
moyenne, la mutation A253P provoque une baisse significative de la densité de courant maximum à 0 mV ($-5,19 \pm 0,71$ pA/pF, $n = 82$; figure 16C ; $P < 0,001$) par rapport à celle mesurée en condition contrôle ($-11,13 \pm 1,42$ pA/pF ; $n = 70$).



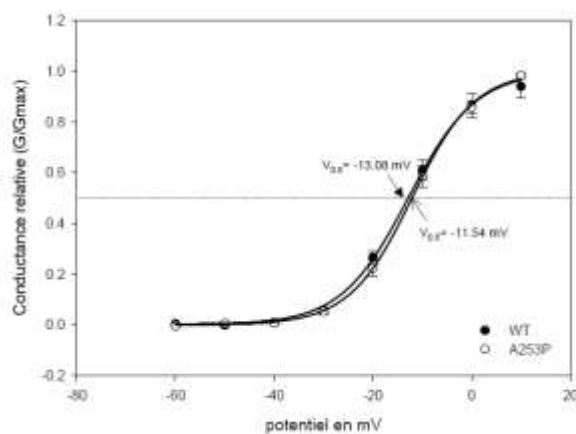
Afin de comprendre l'origine de la baisse du courant observée en présence du variant A253P, différents paramètres biophysiques ont été étudiés. La sensibilité au potentiel des canaux $Ca_v1.2$ WT et muté A253P a été testée en imposant des créneaux de stimulation allant de -60 à +50 mV (figure 24A). La dépendance au potentiel de l'activation du courant $I_{Ca,L}$ est similaire dans les deux conditions ($V_{1/2}$: $-13,08 \pm 0,71$ mV, $n=13$ pour le canal WT, $-11,54 \pm 1,15$ mV, $n=9$ pour le variant A253P ; pente : $6,34 \pm 0,17$ mV et $6,37 \pm 0,28$ mV respectivement ; figure 24B). Le potentiel d'inversion du courant calcique est également similaire dans les deux conditions (62.76 ± 1.13 mV pour le WT et 58.73 ± 2.59 mV pour le mutant A253P) suggérant que le variant A253P n'affecte pas la sélectivité du canal $Ca_v1.2$ aux ions calcium (Figure 24C). Par ailleurs, la présence de ce variant n'affecte pas les

cinétiques d'activation et d'inactivation du canal $Ca_v1.2$ (temps au pic à 0 mV : $4.8 \pm 0,2$ ms, $n=52$ pour le canal WT, 5.3 ± 0.3 ms, $n=47$ pour le variant A253P ; constante de temps d'inactivation à 0 mV: 49.2 ± 2 ms et 53.1 ± 4.5 ms respectivement).

A



B



C

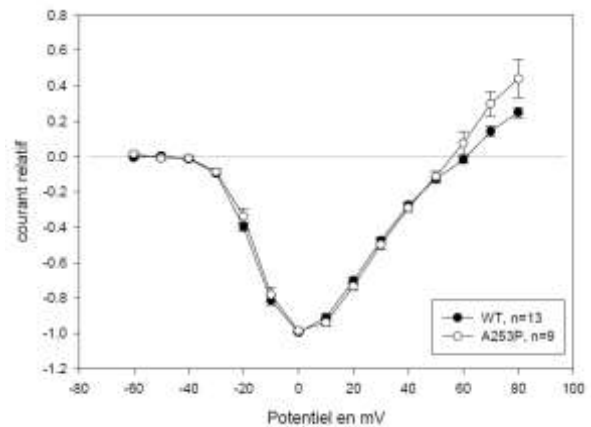


Figure 24: Effet du variant A253P sur la dépendance au potentiel du canal $Ca_v1.2$. A, exemples de courants enregistrés à différents potentiels (de -60 à $+50$ mV, incrément=10 mV) dans une cellule exprimant $Ca_v1.2$ WT (gauche) ou le variant A253P (droite) ; B, courbe d'activation du courant $I_{Ca,L}$ dans les 2 conditions, WT $n=13$, A253P $n=9$; C, courbe courant-potentiel normalisée dans les deux conditions.

D'autre part, la dépendance au potentiel de l'inactivation a été étudiée. L'inactivation du canal $Ca_v1.2$ est contrôlée par le potentiel et le calcium intracellulaire. L'inactivation dépendante du potentiel du courant $I_{Ca,L}$ a été étudiée dans les cellules exprimant $Ca_v1.2$ WT ou le variant A253P (figure 25). Cette dernière est similaire dans les deux conditions ($V_{1/2}$: -15.24 ± 1.2 mV, $n=7$ pour le

canal WT, -14.88 ± 1.39 mV, $n=6$ pour le variant A253P ; pente: -6.4 ± 0.43 mV et -5.04 ± 0.26 mV respectivement).

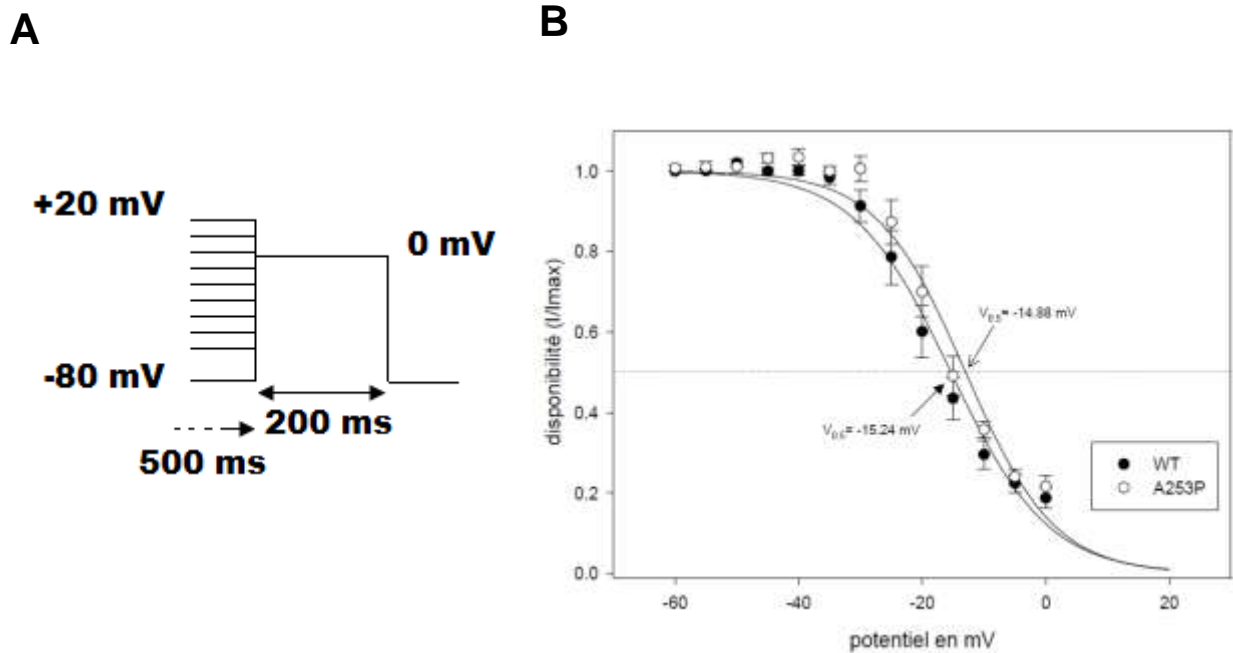


Figure 25: Dépendance au potentiel de l'inactivation du canal $Ca_v1.2$. A, protocole de stimulation. B, courbe de disponibilité des canaux $Ca_v1.2$ dans les 2 conditions, WT $n=7$, A253P $n=6$

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

b) Effet du variant A253P sur l'expression totale de $Ca_v1.2$

La diminution de la densité de courant $I_{Ca,L}$ dans les cellules exprimant le variant A253P peut avoir différentes origines : (i) un défaut d'expression du canal muté, (ii) un défaut de trafic à la membrane ou (iii) un canal dysfonctionnel. L'expression totale de la protéine canal $Ca_v1.2$ WT et mutée A253P a été estimée par la technique de Western blot.

Comme illustré sur la figure 26, un signal à 250 kDa est détectée dans les conditions WT et mutée A253P. Ce signal, absent dans la condition non transfectée, correspond à la protéine $Ca_v1.2$. En présence du variant A253P, l'intensité de ce signal reste inchangée reflétant un niveau d'expression total similaire à celui du

canal sauvage. D'autre part, du fait de son niveau d'expression stable, la β -tubuline, représentée par un signal à 50 kDa, a été utilisée comme protéine de référence.

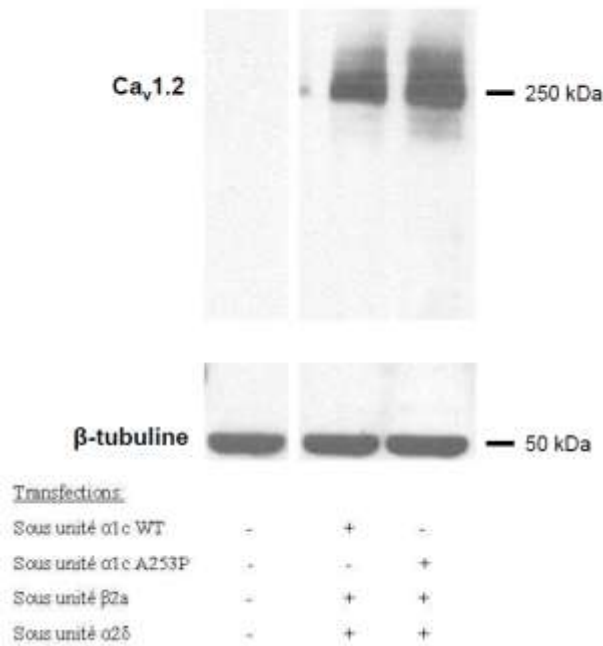


Figure 26 : Estimation de l'expression des protéines $Ca_v1.2$ WT et mutées A253P par la technique de Western blot. La bande à 250 kDa correspond à $Ca_v1.2$, la bande à 50 kDa à la β -tubuline.

Les résultats du Western blot ont été confirmés par immunofluorescence. En effet, le marquage intracellulaire de $Ca_v1.2$ est homogène entre la condition WT et muté A253P (Figure 27).

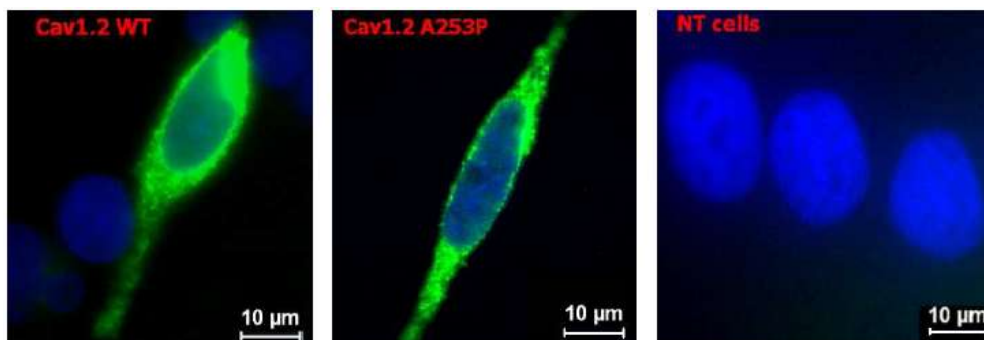


Figure 27: Immunomarquages intracellulaires de la protéine $Ca_v1.2$ WT (gauche), mutée A253P (centre) et contrôle sur cellules non transfectées (droite).

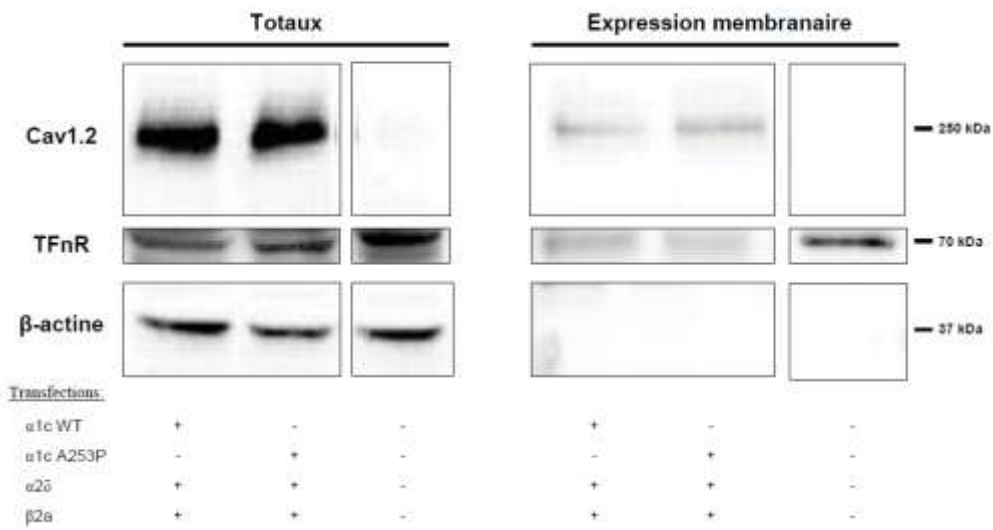
Les résultats du Western blot et de marquage intracellulaire nous permettent de conclure que le variant A253P n'affecte pas l'expression totale du canal $Ca_v1.2$.

c) Effet du variant A253P sur l'expression membranaire de Ca_v1.2

L'expression totale de Ca_v1.2 n'étant pas modifiée, nous nous sommes intéressés à son trafic membranaire en évaluant son expression membranaire grâce à la technique de biotinylation des protéines de surface.

Comme pour le Western blot, la protéine canal Ca_v1.2 est détectée par un signal à 250kDa dans les conditions WT et A253P que ce soit dans les lysats totaux ou biotinylés (figure 28A). L'intensité de ces signaux indique une similarité des niveaux d'expression dans les deux conditions. De plus, la quantification de ces signaux suggère que la présence du variant A253P n'affecte pas l'expression membranaire de la protéine Ca_v1.2 (figure 21B ; expression normalisée, 1 pour le WT, 1.19 ± 0.37 pour A253P et 0.01 ± 0.005 pour les cellules non transfectées). L'homogénéité de la charge en protéines membranaires biotinylées de chaque puits sur le gel a été vérifiée en utilisant le récepteur à la transferrine (TFnR), situé à la surface cellulaire. L'absence de β -actine dans les puits contenant les fractions biotinylées atteste de l'absence de contamination par les protéines intracellulaires.

A



B

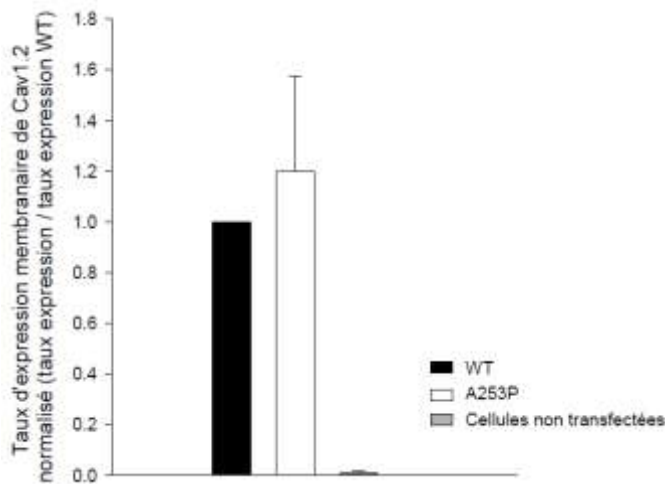


Figure 28: Estimation de l'expression membranaire des protéines $Ca_v1.2$ WT et mutées A253P par la technique de biotinylation des protéines de surface cellulaire. (A) La bande à 250 kDa correspond à $Ca_v1.2$, la bande à 70 kDa au récepteur à la transferrine (TFnR) et la bande à 37kDa à la β -actine ; (B) Taux d'expression membranaire normalisé de $Ca_v1.2$, n=4.

4. Discussion

Dans cette étude, nous avons mis en évidence, chez une famille avec un phénotype QT court associé à un déficit primaire en carnitine, des variants génétiques dans deux gènes : le gène *CACNA1C* codant la sous unité α du canal calcique $Ca_v1.2$ et le gène *SLC22A5* codant le transporteur à la carnitine OCTN2.

Une déficience du transporteur OCTN2 au niveau des fibroblastes, des muscles, du cœur, et des reins conduit au déficit primaire en carnitine (Tein *et al.*, 1990; Stanley *et al.*, 1991; Pons *et al.*, 1997). L'existence des variants OCTN2 chez cette famille serait responsable du déficit primaire en carnitine.

Le déficit en carnitine est généralement associé à une cardiomyopathie hypertrophique ou dilatée et/ou à la survenue de fibrillation ventriculaire et à la mort subite (Rahbeeni *et al.*, 2002; Tein, 2003; Melegh *et al.*, 2004; Amat di San *et al.*, 2008). Les signes de cardiomyopathie apparaissent chez les enfants âgés de 1 à 7 ans avec une médiane à 3 ans (Tein *et al.*, 1990; Stanley *et al.*, 1991; Garavaglia *et al.*, 1991). Les individus atteints ont généralement un phénotype normal à la naissance et peuvent apparaître en bonne santé pendant quelques années jusqu'à l'apparition des premiers signes de cardiomyopathie. Les patients sont fréquemment victimes d'épisodes hypoglycémiques entre l'âge de 1 et 5 ans avec une médiane à 1,5 ans (Stanley *et al.*, 1991).

Cependant, la présentation clinique des patients atteints du déficit en carnitine peut être variable d'un individu à l'autre pour un même génotype. En effet, Garavaglia *et coll* ont décrit une famille dont un membre a fait des épisodes hypoglycémiques, atteint d'une myopathie mais n'ayant aucun signe de cardiomyopathie, alors que l'autopsie de son frère, mort à un âge précoce, a révélé une cardiomyopathie dilatée. Dans les deux cas, un faible taux de carnitine a été détecté (Garavaglia *et al.*, 1991).

Etant donné les variations phénotypiques observées chez les patients ayant les mêmes mutations du gène *SLC22A5*, on peut penser à l'intervention d'autres facteurs externes dans cette variabilité. En effet, un régime alimentaire pauvre en carnitine, l'utilisation de certains médicaments tels que la pivampicilline peut exacerber ce déficit et participer donc aux variations observées (Christensen *et al.*, 2000). Le diagnostic précoce et un traitement avec une supplémentation en L-carnitine améliorent les symptômes chez les patients atteints et peuvent prévenir l'apparition de cardiomyopathie (Lamhonwah *et al.*, 2002). L'âge à partir duquel les patients ont été traités peut aussi participer aux variations phénotypiques observées.

La famille décrite dans notre étude présente un déficit primaire en carnitine, avec un phénotype cardiaque particulier. En effet, le *propositus* et sa mère ne développent pas de cardiomyopathie en dépit de l'âge tardif du diagnostic chez la

mère (29 ans). Cette absence de cardiomyopathie ne semble pas due, chez cette patiente, à un effet préventif de la supplémentation précoce en carnitine.

Par ailleurs, le *propositus* et sa mère présentent un raccourcissement de l'intervalle QT (QTc=350 et 359 ms, respectivement). Dans ce contexte, le but de notre étude a été de comprendre l'origine de ce raccourcissement.

Le séquençage des gènes candidats pour le SQTC chez le *propositus*, sa mère et sa grand-mère a permis d'identifier, en plus des variants du gène *SLC22A5*, la mutation A223P du gène *CACNA1C* codant la sous-unité α du canal calcique $Ca_v1.2$. Du fait du rôle de ce canal dans le maintien de la phase de plateau du PA ventriculaire, une mutation perte de fonction est susceptible de provoquer un SQTC et des arythmies cardiaques.

La caractérisation fonctionnelle de variant $Ca_v1.2$ A223P a mis en évidence une diminution de la densité du courant calcique d'environ 50% sans changement des autres paramètres biophysiques du canal. Cependant, ni les immunomarquages, ni la biotinylation des protéines membranaires n'ont permis d'élucider le mécanisme par lequel se produit cette diminution. Ces résultats sont à prendre avec prudence. En effet, la détection des différences de niveau d'expression, par les techniques de biotinylation et d'immunomarquages, est rendue difficile du fait de la faible expression membranaire du canal calcique $Ca_v1.2$. D'autre part, les très faibles intensités des signaux obtenus en biotinylation rendent la comparaison des ces niveaux encore plus difficile. Ces observations montrent l'importance du choix du modèle cellulaire pour la ré-expression de ce canal. Seule l'utilisation des HEK tsA-201 nous a permis d'enregistrer un courant calcique mesurable. Cependant, bien que l'expression totale du canal $Ca_v1.2$ soit élevée, le niveau d'expression membranaire est très faible. Plusieurs explications semblent possibles, j'en ai retenu trois :

(i) **Le niveau d'expression, d'éventuelles protéines partenaires, encore inconnues**, nécessaires à l'expression membranaire du canal est très faible dans les modèles cellulaires testés.

(ii) **L'influence du cycle cellulaire** : lors du 54ème Biophysical Meeting à San Francisco (USA), une étude présentée par Angelova et coll a mis en évidence l'influence du cycle cellulaire sur l'effet de la sous-unité $\gamma 1$ impliquée dans la dépendance au potentiel de l'inactivation du canal $Ca_v1.2$. En présence de $\gamma 1$, on observe un décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs. Le niveau de ce décalage est variable en fonction du stade du cycle cellulaire (Angelova

et al). Partant de ces observations, on peut suggérer que l'expression des autres sous-unités, en particulier pour $\beta 2a$ qui a un rôle primordial dans l'adressage à la membrane du canal, serait dépendante du cycle cellulaire. Ce mécanisme pourrait expliquer la variabilité du niveau d'expression du canal $Ca_v1.2$ à la membrane.

(iii) **L'influence du potentiel de repos des cellules** sur le niveau d'expression des canaux : les cellules COS-7, HEK293, HEK tsA201 non transfectées présentent un potentiel de repos dépolarisant allant de -40 à -20 mV correspondant à la zone du courant de fenêtre de I_{CaL} . La ré-expression du canal calcique $Ca_v1.2$ dans ces cellules pourrait induire une entrée de calcium due au courant fenêtre. Sachant que le calcium intervient dans de multiples fonctions cellulaires, on peut supposer que cette entrée de calcium induit un remodelage de l'expression membranaire des canaux calciques. Ceci en agissant sur les différentes voies de signalisations calcium dépendantes. Pour tester cette hypothèse, des expériences fonctionnelles dans des cellules stablement transfectées avec des canaux potassiques peuvent être envisagées. En effet, ces cellules présentent un potentiel de repos plus polarisé évitant ainsi de se placer dans la zone fenêtre du courant calcique.

Une alternative aux problèmes de ré-expression du canal $Ca_v1.2$ est d'utiliser des cardiomyocytes pour ré-exprimer le canal taggé sauvage et muté. Nous pourrions alors réaliser une étude complémentaire incluant la biotinylation des protéines membranaires, des immunomarquages ainsi qu'une étude fonctionnelle permettant de se mettre dans des conditions plus physiologiques et une corrélation génotype/phénotype pourrait ainsi être établie.

Si l'absence de défaut d'adressage à la membrane est confirmée. Il restera à comprendre pourquoi la densité de courant I_{CaL} est diminuée lorsque le canal est muté. Les hypothèses sont (i) la conductance unitaire du canal est modifiée, (ii) la probabilité d'ouverture du canal est diminuée, (iii) un partenaire modulateur des propriétés électrophysiologiques du canal ne parvient plus à agir. Pour tester les deux premières hypothèses, des expériences de *patch clamp* en canal unitaire sont à envisager.

Par ailleurs, si on part du principe que la mutation A223P du canal $Ca_v1.2$ est responsable du SQTC chez cette famille, la grand-mère du *propositus* sera considérée comme un cas de non pénétrance de la mutation A223P car cette dernière ne provoque pas un raccourcissement de l'intervalle QT chez cette patiente.

D'autre part, la grand-mère se différencie d'un point de vue génétique de sa descendance par un état hétérozygote de son variant OCTN2. En effet, le *propositus* ainsi que sa mère présentent, en plus du variant A223P, des mutants hétérozygotes composites du gène *SLC22A5*. Il semble alors que le raccourcissement du QT à l'ECG soit corrélé au déficit de transport de la carnitine, d'autant plus que la supplémentation orale en carnitine normalise la durée de l'intervalle QT chez tous les individus.

L'ensemble de ces données suggère donc que la mutation Cav1.2 n'est pas suffisante pour modifier l'intervalle QT et que la durée de l'intervalle QT est corrélée au dysfonctionnement d'OCTN2 indépendamment du mutant A223P. La particularité de cette famille est que les deux membres porteurs de mutations hétérozygotes composites pour le gène *SLC22A5* ne développent pas de cardiomyopathie généralement associée au déficit en carnitine (Amat di San *et al.*, 2008).

Le variant A223P du canal Ca_v1.2 pourrait expliquer la particularité du phénotype de cette famille. En effet, l'un des facteurs essentiels associés à l'apparition d'une cardiomyopathie dilatée par exemple, est un déséquilibre de l'homéostasie calcique (Haghighi *et al.*, 2004; Ahmad *et al.*, 2005). Dans le cas présent, le déficit d'entrée de calcium lors de la dépolarisation ventriculaire pourrait prévenir l'apparition de cardiomyopathies due à l'absence de transporteur de la carnitine chez le *propositus* et sa mère. La diminution de courant calcique entrant I_{Ca,L} pourrait donc avoir un effet protecteur en réduisant la surcharge calcique intracellulaire (Hill, 2003).

C. Etude de l'implication du variant T501M de la protéine DPPX dans le syndrome de Brugada.

1. Introduction

Le syndrome de Brugada est un désordre héréditaire qui se manifeste à l'ECG par un aspect de bloc de branche droit et une anomalie de la repolarisation caractérisée par une surélévation du segment ST dans les dérivations pré-cordiales droites. Ceci peut provoquer une fibrillation ventriculaire et la mort subite (Antzelevitch *et al.*, 2005a). Le mécanisme cellulaire des arythmies ventriculaires observées dans le SBr est encore sujet à débat. Le modèle le plus aboutit est celui proposé par le groupe d'Antzelevitch (Yan & Antzelevitch, 1999) mais est fortement discuté. Ces auteurs suggèrent que les caractéristiques de l'ECG d'un patient atteint par le SBr peuvent être expliquées soit par une augmentation du courant potassique I_{to} , soit par une diminution du courant sodique I_{Na} ou calcique I_{CaL} .

Dans cette étude, le criblage par séquençage direct du gène *DPP6*, gène codant la protéine DPPX (Dipeptidyl-aminopeptidase-like protein 6), chez 47 patients atteints du SBr et non muté pour le gène *SCN5A* a permis d'identifier la substitution c.1502C>T (figure 29A), chez une femme atteinte de ce syndrome (figure 29B). Ce variant conduit, au niveau protéique, à la substitution d'une thréonine par une méthionine en position 501. Ce résidu est situé sur la partie C-terminale de cette protéine. Ce variant est absent chez 187 sujets contrôles.

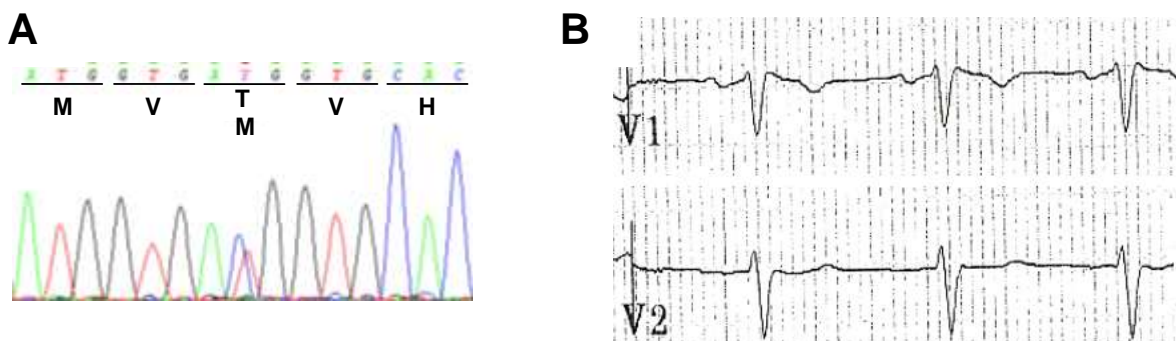


Figure 29 : Phénotype et génotype du *propositus*. A, électrophorégramme de la séquence du *propositus* muté portant le variant T501M. B, ECG du *propositus*.

Au cours de l'enquête familiale, un test à la flécai réalisé chez la fille du *propositus* a révélé un autre cas de SBr. Après génotypage de 6 autres membres de cette famille, il est apparu que cette mutation avait un faible degré de pénétrance. En effet, après un test à la flécaine, sur huit personnes porteuses du variant T501M, seules deux présentaient un profil électrocardiographique compatible avec le SBr (figure 30).

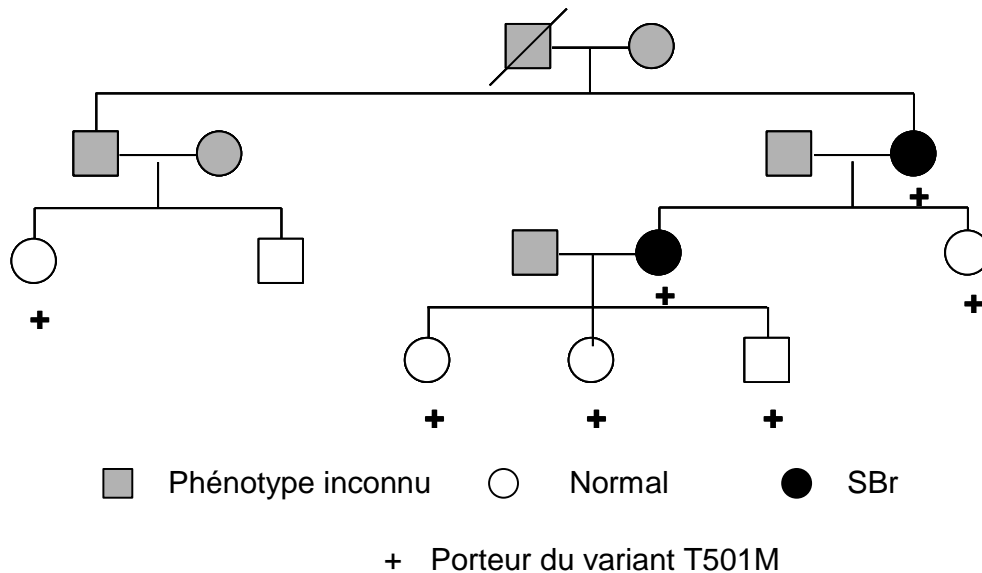


Figure 30 : Arbre généalogique de la famille porteuse du variant T501M

DPPX est une protéine transmembranaire membre de la famille des sérines protéases. Cependant, elle est dépourvue de l'activité protéolytique caractéristique de cette famille de protéines et cela du fait de l'absence du résidu sérine présent dans le domaine catalytique des sérines protéases. Il existe 3 isoformes de DPPX : DPPX-S, DPPX-L, DPPX-E (Nadal *et al.*, 2003). Elles varient seulement sur leur séquence N-terminale intracellulaire. Seule DPPX-S est présente dans le cœur. Des études récentes ont montré que cette protéine serait un régulateur potentiel des canaux potassiques $K_v4.3$ responsables de la génération du courant I_{to} dans le cœur. La co-expression de DPPX en présence de la sous-unité régulatrice de $K_v4.3$, KChiP2, modifie les propriétés biophysiques de ce canal en décalant sa dépendance au potentiel de l'activation et de l'inactivation vers des potentiels plus négatifs et en accélérant les cinétiques d'inactivation et de levée d'inactivation (Radicke *et al.*, 2005). La co-expression de la protéine DPPX avec $K_v4.3$ augmente l'expression membranaire du canal et donc la densité du courant I_{to} (Radicke *et al.*, 2005).

Récemment, une augmentation de l'expression du gène *DPP6* a été décrite comme responsable de fibrillation ventriculaire idiopathique (Alders *et al.*, 2009).

Pour évaluer l'incidence du variant T501M et son éventuelle implication dans le phénotype du SBr, des études d'électrophysiologie cellulaire ont été entreprises sur l'effet de ce variant sur le courant I_{to} dans les cellules COS-7.

2. Matériels et méthodes

a) Ré-expression hétérologue dans des cellules de mammifères

➤ Les cellules COS-7

La lignée cellulaire COS-7 est issue de fibroblastes de rein de singe vert d'Afrique, immortalisés par transformation avec un mutant du virus simien SV40 (ATCC). Du fait de l'absence des canaux potassiques endogènes dépendants du potentiel, cette lignée est utilisée comme système d'expression pour ces canaux. Ces cellules adhèrent spontanément sur une surface en plastique ou en verre. Elles sont cultivées dans des flasques en plastique de 25 cm² dans un incubateur humidifié à 37°C, en présence de 5% de CO₂. Le milieu de culture est composé de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), 10% de sérum de veau fœtal, 2 mM de L-glutamine, 100 UI/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine. Le repiquage se fait tous les 4 jours. Il est réalisé en quatre étapes :

- Le milieu de culture d'une flasque est remplacé par 2 mL de tampon PBS/EDTA contenant du NaCl (137 mM), KCl (2,7 mM), Na₂HPO₄ (8 mM), KH₂PO₄ (1,5 mM), 0,1% d'EDTA.

- Afin de détacher les cellules de leur support, elles sont traitées avec 1 ml d'une solution à 0,25% de trypsine, solubilisée dans le tampon PBS/EDTA, pendant 2 minutes à l'incubateur. L'action enzymatique est arrêtée par addition de 10 mL de milieu de culture.

- Les cellules sont mécaniquement individualisées grâce au cisaillement créé par l'aspiration et l'éjection à l'aide d'une pipette.

- Après centrifugation à 1000 tr/min pendant 5 minutes, les cellules sont diluées et de nouvelles flasques ensemencées.

➤ **Protocoles de transfection du canal K_v4.3 et ses sous-unités régulatrices**

Pour une boîte de Pétri de 35 mm de diamètre contenant des cellules COS-7 à une confluence de 60%, on prépare séparément deux tubes Eppendorf contenant :

1) 4 µL de JetPEI + 46 µL de NaCl (150 mM)

2) 2 µg d'ADN + qsp 50 µL de NaCl (150 mM)

Les deux tubes sont mélangés. Le mélange est laissé 30 minutes environ à température ambiante puis déposé sur les cellules avec 900 µL de milieu de culture et laissé pendant 8 heures dans l'incubateur.

Un repiquage est réalisé et les cellules sont mises en culture dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre après dilution et utilisées 24 ou 48h après le repiquage.

Comme précédemment, le plasmide codant pour la GFP est associé à ceux codant pour la protéine canal, sa sous unité régulatrice KChiP2c en présence ou non de la protéine DPPX sauvage ou mutée T501M. Les proportions plasmidiques sont alors les suivantes :

- 1% de pIRES-EGFP-K_v4.3 codant le canal potassique K_v4.3 humain sauvage.
- 1% de pcDNA3-KChiP2c codant la sous unité régulatrice KChiP2c humaine.
- 50% de pRC/RSV-DPP6-S WT ou muté T501M codant respectivement pour la protéine DPPX sauvage et mutée humaine.
- 98% ou 48% pEGFP codant pour la GFP selon la condition.

b) Analyse du courant potassique I_{to}

➤ Le courant potassique I_{to}

Le courant I_{to} s'active progressivement après une dépolarisation de la membrane. La séquence de stimulation comprend une phase de dépolarisation à +60 mV, d'une durée de 1000 ms. Sont mesurées l'amplitude du courant à -80 mV, l'amplitude du courant maximum à +60 mV et l'amplitude du courant à la fin de la dépolarisation à +60 mV (figure 31).

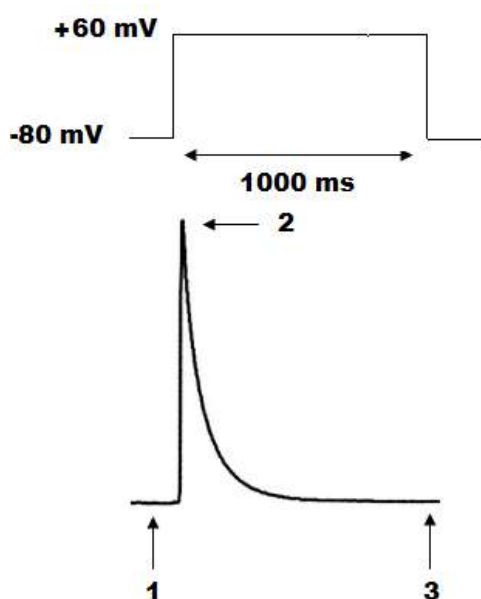


Figure 31: Séquence de stimulation et courant résultant. (1) amplitude du courant à -80 mV ; (2) amplitude du courant maximum à +60 mV; (3) amplitude du courant à 1000 ms de dépolarisation à +60 mV

➤ La courbe d'inactivation

Le protocole utilisé afin d'évaluer la disponibilité des canaux en fonction du potentiel est le suivant : un prépulse allant de -100 mV à +20 mV avec un incrément de 10 mV ; Fréquence de stimulation : 1/4 Hz. Ce dernier est suivie d'une deuxième phase de dépolarisation ou test pulse à +60 mV ou pulse. Entre deux séquences, le potentiel est maintenu à -100 mV. La durée du prépulse est de 1000 ms et celle du pulse de 500 ms (figure 32).

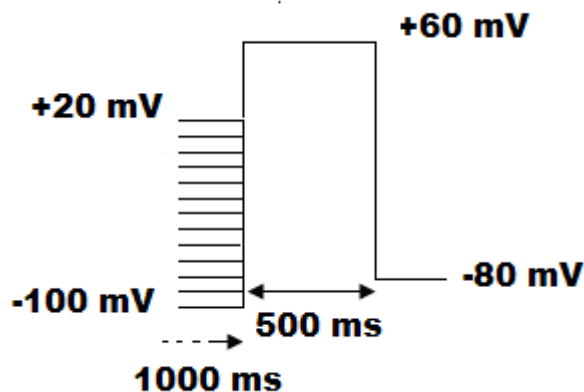


Figure 32: Protocole de stimulation permettant l'estimation de l'inactivation

Les paramètres $V_{1/2}$ d'inactivation et k sont calculés par régression non-linéaire de la courbe de disponibilité selon la fonction de Boltzman.

➤ La levée de l'inactivation ou réactivation

La levée d'inactivation des canaux est évaluée en utilisant une séquence de stimulation comprenant un pré-pulse allant de -100 à +60 mV d'une durée de 1000 ms, suivie d'un test pulse à +60 mV avec une durée d'inter-pulse variable entre les 2 stimulations (figure 33).

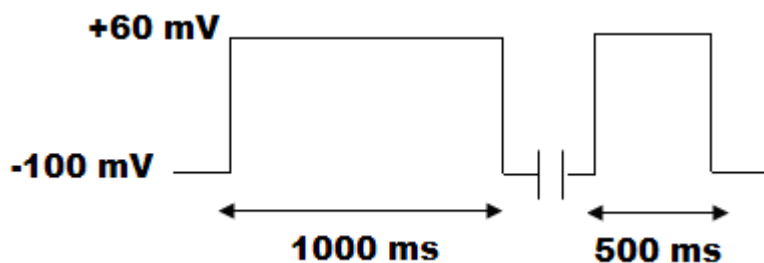


Figure 33: Protocole de stimulation permettant l'estimation de la levée d'inactivation

c) Analyse biochimique du canal $K_v4.3$

➤ Western blot

Le taux d'expression totale de la protéine $K_v4.3$ dans les cellules COS-7. Lorsque les cellules sont à confluence, elles sont lysées dans un tampon contenant du NaCl à 150 mM, du tris pH 7.2 à 20 mM, de l'EDTA à 1 mM, du triton 1X, du PMSF à 1 mM repris dans l'éthanol absolu ainsi qu'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche diagnostics). Les lysats cellulaires sont mis en rotation pendant 20 min à 4°C puis centrifugés à 14 000 G, 20 min à 4°C également. Un dosage

protéique est ensuite effectué contre une gamme étalon de BSA afin de charger une quantité de protéines similaire dans chaque puits. Puis les lysats sont dénaturés 5 min à 50°C dans un tampon LAEMMLI contenant : 2% de SDS, 10% de glycérol, 10 mM de DTT, 65 mM de tris à pH 6.8 et une pointe de bleu de bromophénol. 10 µg de chaque échantillon sont déposés sur un gel de polyacrilamide 8% et les protéines sont séparées par électrophorèse en présence de SDS. Après environ 1h30 de migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose toute la nuit à 40 mA dans un tampon contenant : de la glycine à 192 mM, du tris à 25 mM, du SDS à 0.1% et de l'éthanol à 20%. Afin de vérifier la qualité de la migration et du transfert, les protéines sont colorées avec du rouge ponceau. Après rinçage, la membrane est saturée pendant une heure dans un tampon TBS-T (tris 10mM, NaCl 0.5 mM et tween 0.1%) contenant 5% de lait lyophilisé. Puis la membrane est incubée en présence de l'anticorps anti-K_v4.3 (Alomone, fait chez le lapin) dilué au 1/300^{ème} pendant toute une nuit à 4°C dans du TBS-T lait. Trois lavages de 5 minutes dans le TBS-T lait sont ensuite effectués puis la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire anti-lapin couplé à la HRP (Sigma) dilué au 1/10000^{ème}, pendant 1 heure à température ambiante dans le TBS-T lait. Après 3 rinçages au TBS-T de 10 minutes chacun, la révélation est effectuée par un kit de détection de chémiluminescence (Western C, biorad) à l'imageur (GE Healthcare).

➤ **Biotinylation des canaux K_v4.3**

L'expression membranaire de la protéine K_v4.3 dans des cellules COS-7 est quantifiée grâce à la technique de biotinylation. Le canal potassique K_v4.3 est biotinylé suivant le protocole décrit précédemment pour le canal calcique (*cf* page 64). La normalisation des niveaux d'expression totale et membranaire se fait en évaluant l'expression du récepteur à la transferrine.

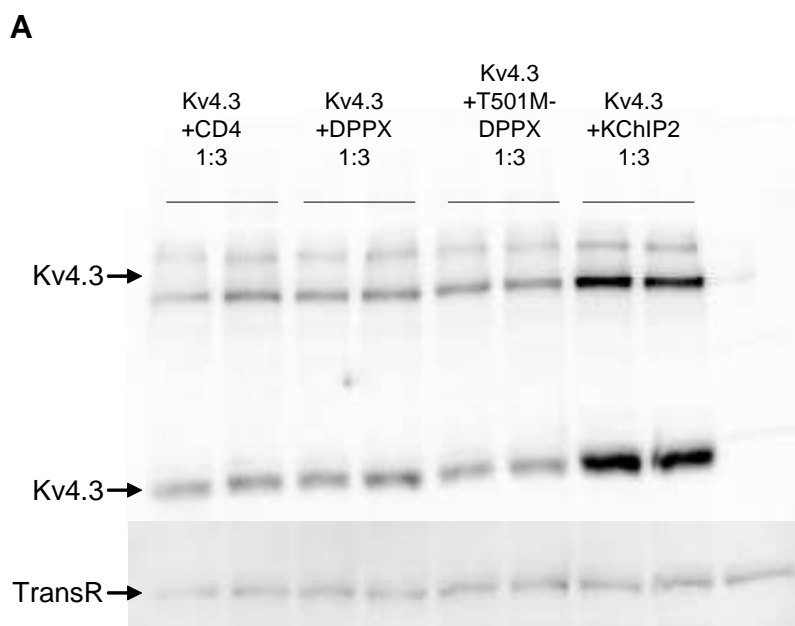
d) Statistiques

Les résultats sont présentés sous la forme de moyenne \pm écart-type de la moyenne. Les différences sont statistiquement testées en utilisant le test de Student (test-t ; comparaison d'un paramètre dans 2 conditions) ou une ANOVA à deux voies (comparaison d'un paramètre dans plusieurs conditions) suivie d'un test de Tukey si nécessaire. Une valeur de $P < 0.05$ est considérée comme significative.

3. Résultats

a) Effet du variant T501M de la protéine DPPX sur l'expression totale et membranaire de K_v4.3

Etant donné le rôle majeur de la protéine DPPX dans l'adressage du canal K_v4.3 à la membrane, une estimation du niveau d'expression totale et membranaire de ce canal a été réalisée. Des cellules COS-7 ont été transfectées par la sous-unité canal en présence ou non de DPPX sauvage ou muté. Les résultats obtenus montrent que la présence de DPPX sauvage ne modifie pas l'expression totale du canal K_v4.3 (figure 34A). Un contrôle positif de l'augmentation de l'expression de K_v4.3 a été réalisé par co-expression de ce canal avec la sous-unité KChIP2c (figure 34A). La présence du variant T501M de la protéine DPPX ne semble pas affecter la régulation du canal K_v4.3. En effet, l'expression totale de K_v4.3 en présence de ce variant est inchangée (figure34).



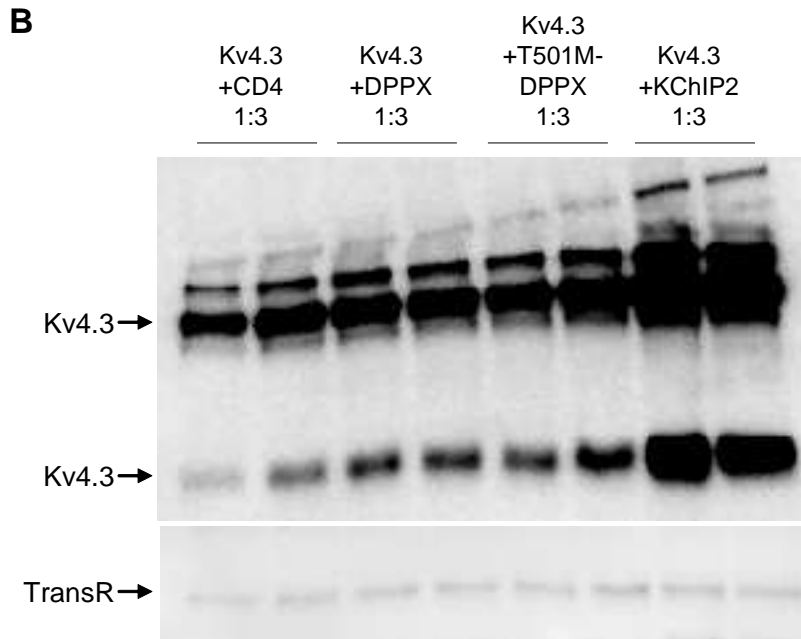


Figure 34 : Estimation de l'expression totale et membranaire de la protéine Kv4.3 par la technique de western blot et de biotinylation des protéines de surface cellulaire. A et B, respectivement, l'expression totale et membranaire du canal Kv4.3 en présence ou non de la protéine DPPX sauvage et mutée.

b) Effet du variant T501M de la protéine DPPX sur le courant I_{t0}

Une étude de l'impact fonctionnel du variant T501M de la protéine DPPX sur la régulation du canal $K_v4.3$ a été réalisée. Les courants I_{t0} enregistrés dans des cellules COS-7 transfectées avec la protéine canal $K_v4.3$, sa sous-unité régulatrice KChIP2c avec ou sans DPPX sauvage ou mutée ont été comparés (Figure 35A). La co-expression de la protéine DPPX sauvage en présence de la sous-unité KChIP2c ne modifie pas la densité du courant I_{t0} . La présence du variant T501M ne semble pas modifier ce paramètre (densité du courant à +60mV : $139,04 \pm 30,90$ pA/pF, $n=19$ sans DPPX; $255,7 \pm 74,81$ pA/pF, $n=12$ en présence de DPPX WT; $220,10 \pm 43,55$ pA/pF, $n=14$ en présence de DPPX T501M ; figure 35B).

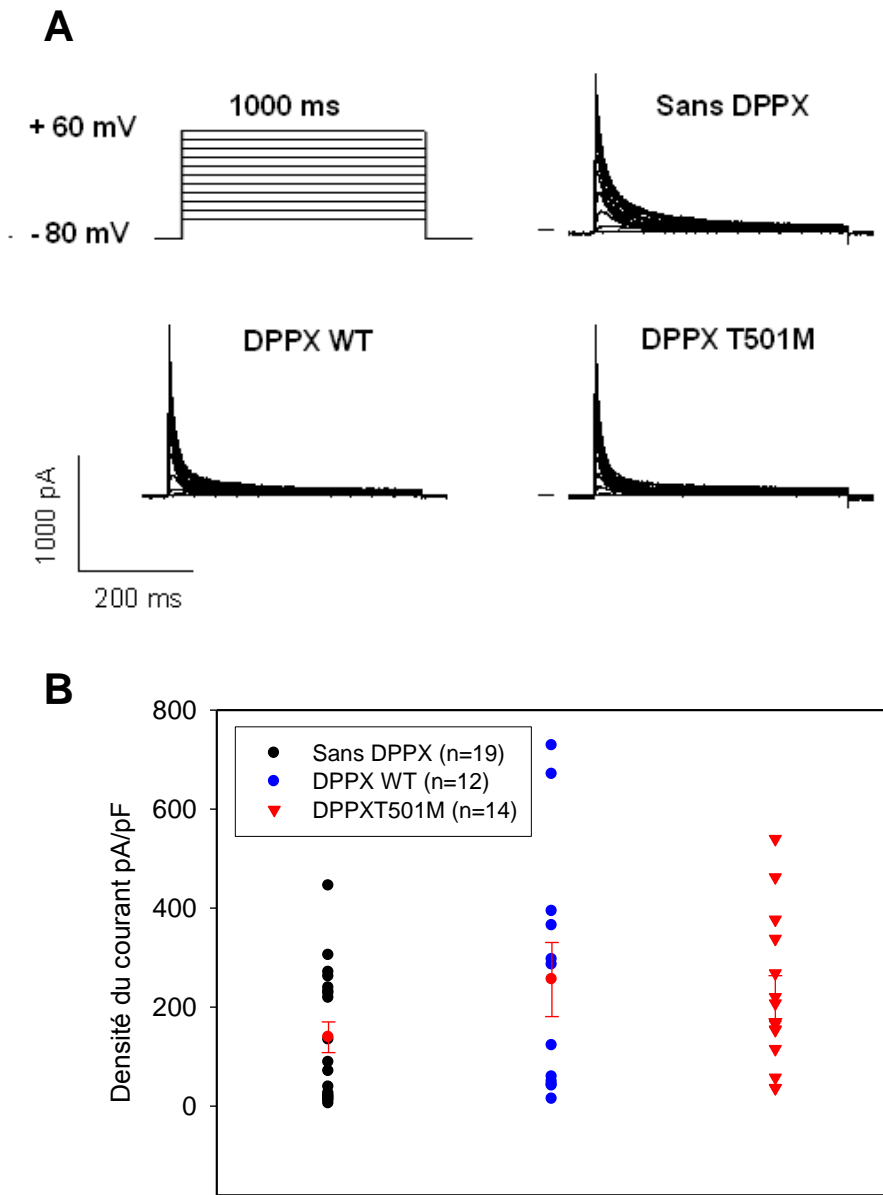
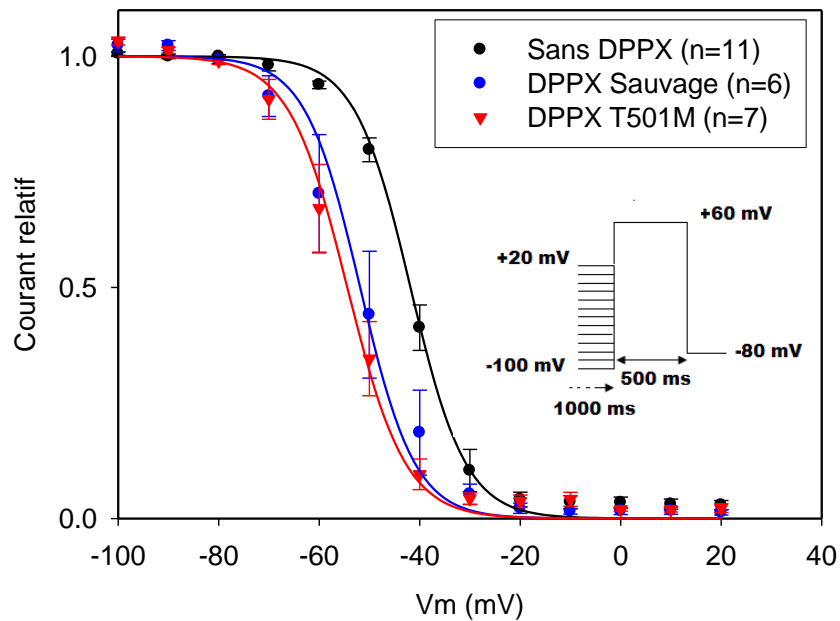


Figure 35 : Effet du variant T501M de la protéine DPPX sur la densité du courant I_{to} . A, exemples de courants enregistrés à différents potentiels (de -40 à $+60$ mV, incrément=10 mV) dans une cellule exprimant $K_v4.3$, $KChIP2c$, en absence de DPPX (haut, droite), en présence de DPPX sauvage (bas, gauche) ou T501M DPPX (bas, droite). B, Densité du courant I_{to} , en présence de $KChIP2c$ et/ou DPPX sauvage ou mutée à $+60$ mV.

En revanche, et comme décrit dans la littérature (Radicke *et al.*, 2005), DPPX sauvage décale la dépendance au potentiel de l'inactivation du courant I_{to} vers des potentiels plus négatifs ($V_{1/2}$ d'inactivation : $-41,82 \pm 1,33$ mV, $n=11$ en absence ; $-51,85 \pm 3,99$ mV, $n=6$ en présence de DPPX sauvage ; $-54,40 \pm 2,44$ mV, $n=7$ en présence de DPPX mutée ; DPPX WT *versus* sans DPPX : $P < 0,001$; DPPX mutée *versus* sans DPPX : $P < 0,001$; figure 36A) et accélère les cinétiques d'inactivation

($p < 0.001$, DPPX WT ou muté *versus* sans DPPX). Néanmoins, aucune différence significative n'apparaît entre DPPX sauvage et DPPX T501M (figure 36B).

A



B

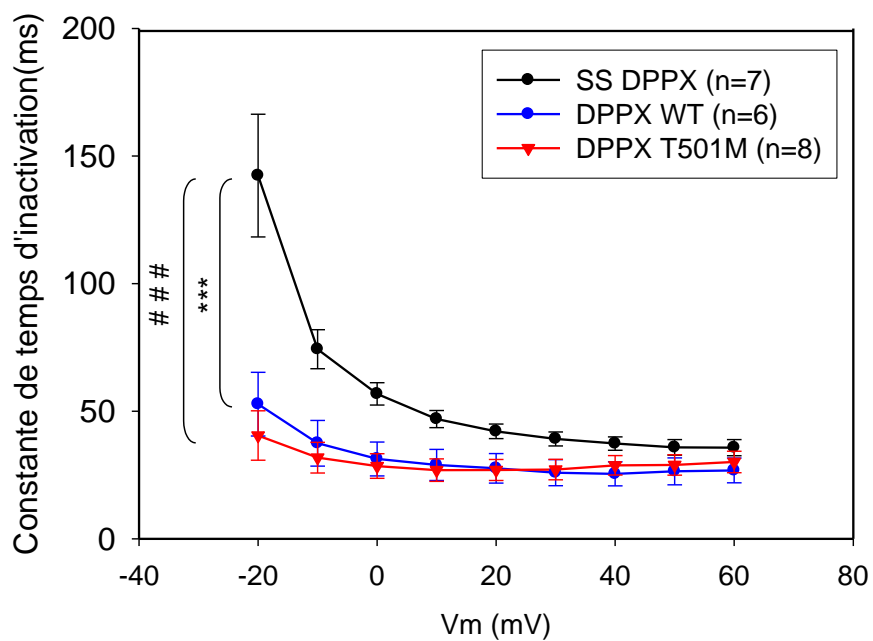


Figure 36 : Effet du variant T501M sur la dépendance au potentiel de l'inactivation du courant I_{to} . A, courbes de disponibilité des canaux $Kv_{4.3}$ dans les 3 conditions, sans DPPX $n=11$, DPPX WT $n=6$, DPPX T501M $n=7$. B, cinétiques d'inactivation des canaux $K_{v4.3}$, sans DPPX $n=7$, DPPX WT $n=6$ (DPPX WT vs sans DPPX, * : $p < 0.001$), DPPX T501M $n=8$ (DPPX T501M vs sans DPPX, ### : $p < 0.001$).**

Enfin, la co-expression de la protéine DPPX sauvage avec le canal $K_v4.3$ et sa sous-unité régulatrice KchiP2c accélère les cinétiques de levée d'inactivation de ce canal ($t_{1/2}$ de réactivation : $91,34 \pm 6,7$ ms, $n=6$ en absence de DPPX ; $68,57 \pm 13,67$ ms, $n=5$ en présence de DPPX sauvage; DPPX WT *versus* sans DPPX : $P<0,01$; figure 37). Cependant, les valeurs obtenues avec DPPX sauvage ne diffèrent pas significativement de celles du variant T501M ($t_{1/2}$: $65,52 \pm 12,45$ ms, $n=4$ en présence du variant T501M; figure 37).

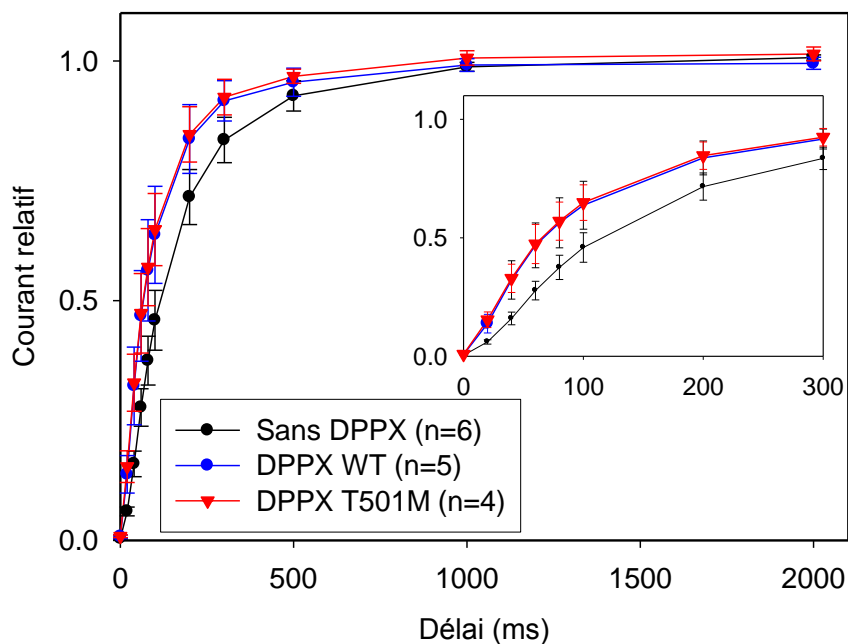


Figure 37 : Effet de la protéine DPPX sauvage et mutée sur les cinétiques de levée d'inactivation du canal $K_v4.3$. Sans DPPX, $n=6$; en présence de DPPX WT, $n=5$; DPPX T501M, $n=4$. Protocole de stimulation de prépulse à $+60$ mV pendant 1000ms suivi d'un test pulse à $+60$ mV pendant 500ms.

L'ensemble de ces résultats suggère que la présence du variant T501M ne modifie pas le mode de régulation du canal $K_v4.3$ par la protéine DPPX dans les cellules COS-7.

4. Discussion

Dans notre étude, le criblage de 47 patients atteints du SBr et non porteurs de variants sur le gène *SCN5A*, a permis d'identifier un nouveau variant de *DPP6*, gène codant pour la protéine DPPX. Ce variant conduit, au niveau protéique, à la substitution d'une thréonine par une méthionine en position 501.

Comme décrit précédemment, le mécanisme des arythmies ventriculaires observées dans le SBr peut être la conséquence soit d'une augmentation du courant potassique I_{to} , soit d'une diminution du courant sodique I_{Na} ou calcique I_{CaL} . La protéine DPPX étant un régulateur du canal $K_v4.3$ responsable du courant I_{to} , l'hypothèse de départ était que la présence du variant T501M, pourrait induire un gain de fonction de la protéine DPPX.

La co-expression de la protéine DPPX avec le canal $K_v4.3$, en présence de KChIP2 dans les cellules COS-7, n'a aucun effet sur l'amplitude du courant I_{to} mais déplace la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs et accélère les cinétiques d'inactivation et de levée d'inactivation, comme précédemment publié (Radicke *et al.*, 2005). En présence du variant T501M, on observe les mêmes modifications que celles observées avec la protéine DPPX sauvage.

Les expériences de western blot et de biotinylation montrent qu'il n'y a pas de modification du taux d'expression à la membrane plasmique de $K_v4.3$ en présence du variant T501M.

L'ensemble de ces données suggère donc que le variant T501M de DPPX ne change ni l'adressage du canal $K_v4.3$ à la membrane ni sa régulation dans les cellules COS-7.

A l'état actuel de ces travaux, une autre hypothèse pourrait expliquer les résultats observés : le variant T501M constitue un simple polymorphisme spécifique à cette famille et n'est pas impliqué dans l'apparition du SBr. En effet, plusieurs observations tendent à corroborer cette hypothèse :

(i) L'absence d'effet fonctionnel de la présence du variant T501M sur le courant I_{to} . Cet argument reste faible, car on ne peut pas exclure que la protéine DPPX puisse réguler d'autres canaux que les canaux $K_v4.3$.

(ii) Cette famille présente un très faible degré de pénétrance du variant T501M. En effet, sur 8 personnes porteuses de ce variant, seules deux personnes sont atteintes dont une avec un profil électrocardiographique de base normal.

L'ensemble de ces données forme un faisceau d'arguments allant dans le sens de l'hypothèse selon laquelle le variant T501M serait juste un polymorphisme sans implication physiopathologique.

Cependant, on ne peut exclure l'absence d'effet du variant T501M de la protéine DPPX sur l'activité électrique cardiaque sans avoir observé *in situ*, dans des cardiomyocytes, les effets d'une sur-expression de ce variant sur le PA. Pour cela,

des expériences de *current-clamp* ont été effectuées dans un modèle de cardiomyocytes néonataux de rat. Ce modèle a été choisi du fait de la présence de la majorité des protéines partenaires des canaux ioniques. De plus, il présente l'avantage de ne pas exprimer la protéine DPPX. Néanmoins, dans ces cardiomyocytes, c'est l'isoforme $K_v4.2$ qui est responsable de la genèse du courant I_{to} . Ceci ne constitue pas un grand inconvénient du fait de la similarité de régulation des canaux $K_v4.2$ et $K_v4.3$ par la protéine DPPX.

L'étude se poursuivra par une comparaison des potentiels d'action obtenus dans les différentes conditions (présence ou absence de DPPX sauvage ou mutée). Ceci nous permettra de localiser l'éventuel effet de ce variant sur le potentiel d'action et donc par quel canal et par quel mécanisme le variant T501M provoquerait l'apparition du SBr.

Discussion générale et conclusion

Le fonctionnement de nombreux tissus excitables (tissu cardiaque, cérébral, nerveux, musculaires lisse et strié) est contrôlé par le flux de courant ionique à travers les membranes cellulaires. Au niveau cardiaque, lorsque l'activité électrique normale est perturbée, le dysfonctionnement de l'activité mécanique du cœur qui en résulte peut aboutir à une syncope, voire à la mort subite. Le mécanisme létal est dans 80% des cas un trouble du rythme ventriculaire causé par des torsades de pointes ou des tachycardies ventriculaires qui peuvent dégénérer en fibrillation. Les mécanismes physiopathologiques de ces troubles du rythme, bien que complexes, voient leurs compréhensions s'améliorer grâce au développement de nouveaux outils cliniques et moléculaires. Pour certains de ces troubles, une origine génétique est clairement établie. La compréhension de ces pathologies rythmiques d'origine génétique a été rendue possible grâce à l'utilisation d'approches de génétiques simples telles l'approche gène candidat. Les gènes *KCNQ1*, *KCNH2*, *CACNA1C*, et *CACNB2* sont un exemple d'identification de gène morbide dans le syndrome du QT court par cette méthode (Brugada *et al.*, 2004;Bellocq *et al.*, 2004;Priori *et al.*, 2005;Antzelevitch *et al.*, 2007). A noter aussi que de grandes avancées dans l'identification des gènes morbides se sont faites par l'approche génome entier. Cette approche a permis d'identifier les 3 trois premiers gènes du SQT (Keating *et al.*, 1991;Jiang *et al.*, 1994) ainsi que de révéler le premier gène ne codant pas une protéine canalaire, responsable de l'allongement de l'intervalle QT : ANK2 (Schott *et al.*, 1995).

Comme décrit précédemment, on peut classer les mutations des gènes codant les canaux ioniques ou leurs partenaires régulateurs selon leurs conséquences fonctionnelles et y associer un phénotype particulier. Dans certains cas, la même mutation peut donner deux phénotypes différents, c'est le cas des syndromes chevauchants. Cependant, la majorité des études électrophysiologiques et biochimiques visant à étudier l'implication de certains variants dans les troubles du rythme cardiaque sont basées sur l'utilisation de modèle de re-expression cellulaires comme les cellules COS, HEK, CHO... Comme discuté tout au long de cette thèse, les résultats obtenus avec ces modèles cellulaires nécessitent une validation dans

des cardiomyocytes et cela du fait de l'absence de tous les composants des complexes canaux. Cela est d'autant plus d'actualité que de nouveaux modèles cellulaires, les cellules iPS, ont vu le jour. Ces cellules ont été re-différenciées en cardiomyocytes adultes conservant le génome des patients et reproduisant les caractéristiques électrophysiologiques pouvant expliquer la pathologie (Moretti *et al.*, 2010).

Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse a été à la fois de comprendre le mode de fonctionnement et de régulation des canaux ioniques mais aussi le rôle des mutations génétiques associées à certains troubles du rythme cardiaque. La première étude présentée ici a permis d'identifier une nouvelle canalopathie sodique appelée tachycardie multifocale automatique du Purkinje. Les troubles du rythme engendrés ont pour origine des foyers ectopiques au niveau des fibres de Purkinje et sont sensiblement réduits par un traitement à la quinidine. Un variant, R222Q, du canal $Na_v1.5$ a été identifié chez les individus atteints. L'étude fonctionnelle de cette mutation montre une augmentation du courant sodique de fenêtre qui provoquerait de fortes modifications de l'activité électrique des cellules de Purkinje à l'origine d'extrasystoles ventriculaires. En perspective de ce travail, il serait intéressant d'étudier spécifiquement l'impact de la mutation R222Q sur le courant sodique de fenêtre afin de confirmer l'augmentation de ce courant. Par ailleurs, pour comprendre le mécanisme moléculaire de l'effet bénéfique du traitement à la quinidine, une évaluation de la sensibilité du canal $Na_v1.5$ muté à cet anti-arythmique est en cours d'étude. L'ensemble de ces expériences complémentaires nous permettra une meilleure compréhension à la fois, du mécanisme moléculaire de l'effet de la mutation R222Q et de l'effet du traitement par la quinidine. Par ailleurs, il serait intéressant de faire une étude complémentaire de l'effet de ce mutant dans un modèle de cardiomyocytes pour confirmer l'effet de la mutation R222Q sur le canal sodique dans un environnement où la majorité des partenaires régulateurs du canal $Na_v1.5$ est présente.

L'importance des partenaires régulateurs des canaux ioniques a déjà été établie par plusieurs études mettant en évidence l'implication des mutations des gènes codant pour des sous-unités régulatrices des canaux ioniques (Schott *et al.*, 1995; Mohler *et al.*, 2003; London *et al.*, 2007; Delpon *et al.*, 2008). Ceci illustre la grande hétérogénéité génétique de certains troubles cardiaques tels que le SBr. Dans la même optique, un des projets de ma thèse a été d'étudier l'éventuelle

implication du variant T501M de la protéine DPPX dans le SBr. L'étude fonctionnelle de ce variant n'a pas permis d'établir un lien entre ce variant et le phénotype des patients. Cependant, l'implication de ce variant dans l'apparition du SBr ne peut être complètement exclue. En effet, une étude présentée par Xiao et coll au congrès de l'AHA (American Heart Association) 2010 montre que la présence du facteur NCS-1 (neuronal calcium sensor) est nécessaire pour avoir un effet visible de DPPX. Il serait donc intéressant d'étudier le rôle de NCS-1 dans l'expressivité du variant T501M. D'autre part, l'apparition du SBr chez la famille porteuse de ce variant peut être le résultat de l'effet de DPPX sur un autre canal ionique. Pour évaluer cette possibilité, l'effet du variant T501M sur le potentiel d'action de cardiomyocytes néonataux de rat est en cours d'étude. Si les résultats s'avèrent négatifs, on peut supposer que le variant T501M soit un polymorphisme rare et spécifique de cette famille. On pourrait également supposer que ce soit une combinaison de polymorphismes rares à effet modéré qui serait à l'origine de ce syndrome.

En effet, les concepts de la génétique ont évolué. Dans les arythmies cardiaques, le simple modèle monogénique est remis en cause. On suppose l'existence de modèles plus complexes où le phénotype pathologique serait associé à une combinaison de plusieurs variants sur un gène voire plusieurs gènes. C'est le modèle suggéré dans l'étude de l'implication d'un mutant du canal $Ca_v1.2$ dans le syndrome du QT court associé à un déficit en carnitine. Dans cette dernière, le variant A223P du canal $Ca_v1.2$ a été identifié chez un propositus et sa mère atteints du syndrome du QT court. Ces individus présentent, en plus du variant A223P, des variants hétérozygotes composites du transporteur de la carnitine OCTN2. La supplémentation en L-carnitine chez ces patients normalise l'intervalle QT. Ceci suggère que le raccourcissement de l'intervalle QT chez ces patients serait dû au déficit en carnitine. Cependant ce déficit n'explique pas l'absence de cardiomyopathies généralement associées aux mutations perte de fonction du transporteur OCTN2. La mutation A223P pourrait expliquer la particularité du phénotype de cette famille. En effet, l'étude fonctionnelle de ce variant a permis de mettre en évidence une perte de fonction du canal $Ca_v1.2$. La diminution du courant calcique entrant $I_{Ca,L}$ pourrait prévenir l'apparition d'une cardiomyopathie en réduisant la surcharge calcique.

Il reste cependant à comprendre le mécanisme responsable de la perte de fonction du canal calcique par le variant A223P. Des études complémentaires sur

l'impact du variant sur la conductance unitaire et la probabilité d'ouverture des canaux calciques est à envisager. D'autre part, l'étude de l'implication de la déficience en carnitine dans ce syndrome reste à approfondir en comparant la sensibilité du canal sauvage et muté à la carnitine.

En conclusion, les résultats de ces recherches présentent une avancée considérable dans la compréhension du mécanisme arythmogène et parfois léthal de la tachycardie multifocale automatique du Purkinje, permettant ainsi aux cliniciens de fournir aux patients une meilleure détection du risque rythmique et une prise en charge adaptée. Pour les deux autres projets, les mécanismes moléculaires impliqués dans l'apparition de la pathologie sont encore à déterminer.

Annexe 1 : L'activité électrique cardiaque et l'ECG

A. Naissance et conduction du PA dans le cœur

La contraction du cœur résulte de la propagation du potentiel d'action dans les cellules contractiles du myocarde. Des zones particulières constituées de cellules automatiques permettent la genèse et la conduction du potentiel d'action (PA). Ces zones sont constituées de cellules spécialisées capables de générer des potentiels d'action de manière spontanée. Le nœud sinusal est à l'origine des PA cardiaques. Le nœud auriculo-ventriculaire (NAV), situé entre l'oreillette droite et le ventricule droit permet la conduction des PA vers les ventricules. La conduction au sein des ventricules se fait par le faisceau de His, composé du tronc commun et des branches droites et gauches, au niveau du septum interventriculaire, et par les fibres de Purkinje au sein de la paroi ventriculaire (Figure 38).

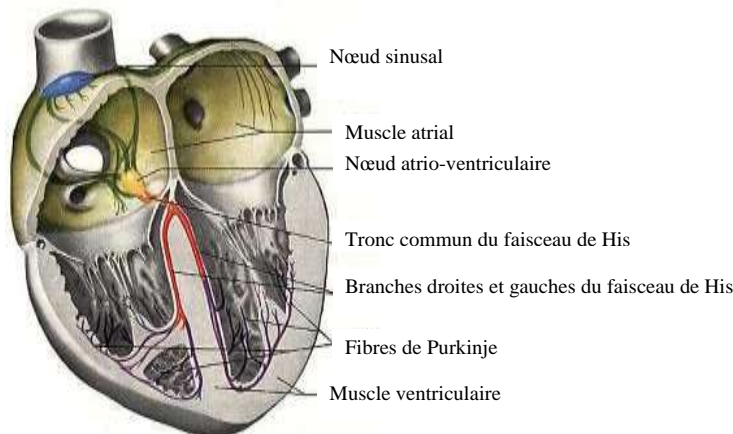


Figure 38 : Distribution du tissu nodal permettant la propagation du potentiel d'action cardiaque. (à partir du site : <http://www.besancon-cardio.net/student/multimedia/ch01-conduction2.jpg>)

La dépolarisation créée lors du PA des cellules du nœud sinusal est diffusée au sein des oreillettes jusqu'au NAV où la vitesse de conduction est alors ralentie. Cette particularité du NAV permet aux oreillettes de se contracter avant les ventricules et d'éjecter le sang qu'elles contiennent dans les ventricules pendant la dilatation de ceux-ci. La propagation rapide du PA au sein des ventricules permet alors leur contraction aboutissant à l'éjection du sang vers l'ensemble de l'organisme.

Physiologiquement, la fréquence à laquelle se succèdent les PA (fréquence cardiaque) est imposée par la fréquence de dépolarisation des cellules du nœud sinusal et est régulée par le système nerveux autonome. Sans régulation, la fréquence intrinsèque de dépolarisation est de 100/min mais physiologiquement, le système parasympathique intervenant, la fréquence est de 60 à 90/min chez l'homme. Si les cellules du nœud sinusal sont déficientes, ce sont celles du NAV qui imposeront leur rythme aux cellules ventriculaires. Les cellules du NAV se dépolarisant à une fréquence inférieure (environ 50/min) à celle des cellules du nœud sinusal, la fréquence cardiaque au niveau des ventricules sera alors diminuée (bradycardie). Enfin, lors d'un bloc de conduction auriculo-ventriculaire complet (découplage entre les oreillettes et les ventricules), la fréquence au niveau des oreillettes sera celle imposée par le nœud sinusal et la fréquence au niveau des ventricules sera celle imposée par les cellules conductrices ventriculaires (environ 30/min).

B. L'électrocardiogramme (ECG)

L'électrocardiogramme ou ECG reflète l'activité électrique générée par la propagation des potentiels d'action cellulaires dans les différents compartiments cardiaques. Son caractère non invasif en fait un outil diagnostique très couramment utilisé pour détecter des anomalies cardiaques.

L'ECG est enregistré en disposant des électrodes à différents endroits du corps : 3 au niveau des membres permettant une visualisation de l'activité électrique dans un plan frontal et 6 précordiales permettant une visualisation dans un plan horizontal. Cette disposition permet d'enregistrer l'activité électrique du cœur selon ses trois axes principaux : apico-basal, gauche-droite et ventral-dorsal. Douze dérivations sont alors enregistrées entre les différentes électrodes : les dérivations I, II, III (bipolaires) et aVR, aVL et aVF (unipolaires) sont enregistrées par les trois électrodes des membres et les dérivations V1 à V6 sont enregistrées par les électrodes précordiales (Figure 39).

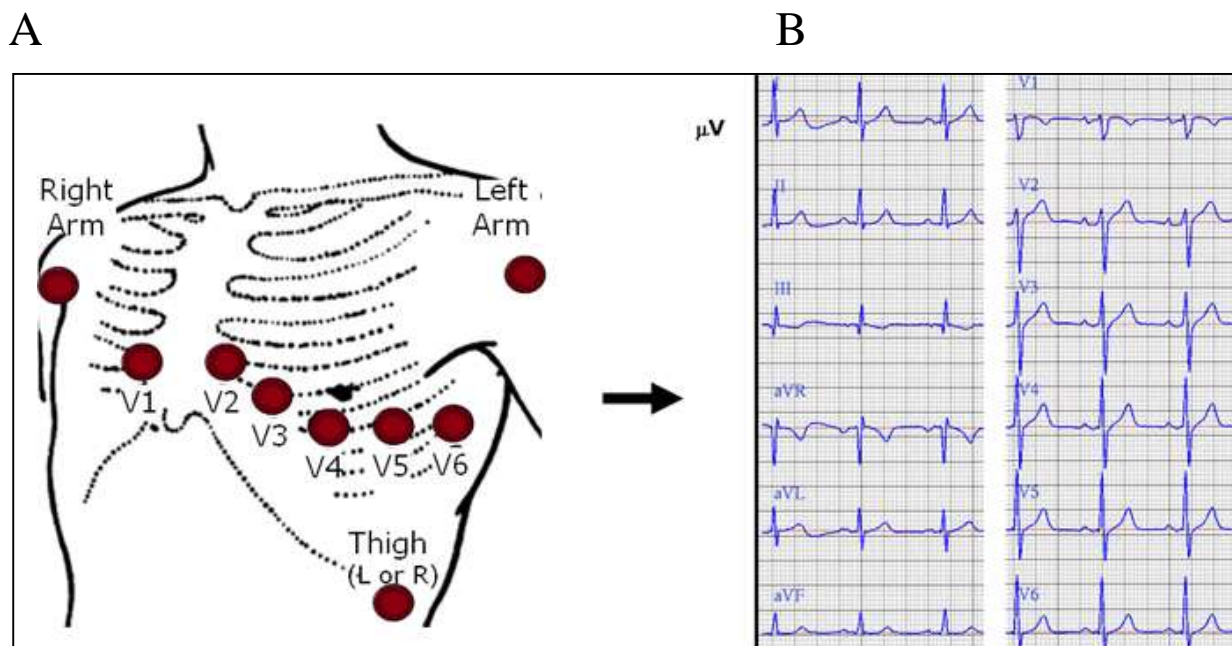


Figure 39: Electrocardiogram, A, représentation schématique de l'emplacement des différentes dérivations de l'ECG. B, Exemple d'un ECG normal.

Au niveau de l'ECG, le cycle cardiaque se traduit par l'apparition successive des ondes P, Q, R, S, T, et U, positives ou négatives selon les dérivations observées :

- L'onde P : correspond à la dépolarisation des oreillettes.
- Le complexe QRS : reflète la dépolarisation des ventricules associée à la repolarisation des oreillettes.
- L'onde T : repolarisation des ventricules.
- L'onde U : parfois observée après l'onde T et de faible amplitude. Sa signification est discutée mais l'hypothèse la plus probable lorsqu'elle est physiologique est une repolarisation tardive du réseau de Purkinje.

Chez l'homme sain, la fréquence cardiaque (FC) est comprise entre 60 et 90 battements par minute (bpm) au repos. Le rythme est sinusal, c'est à dire que chaque complexe QRS est précédé d'une onde P positive sur les dérivations I et II, caractérisant le bon fonctionnement du nœud sinusal.

L'intervalle PR est compris entre 0.12 et 0.2 seconde et la durée de l'onde P doit être inférieure à 0.12 seconde.

Le complexe QRS est normalement compris entre 0.06 et 0.1 seconde.

L'intervalle QTc donne des indications intéressantes sur la repolarisation ventriculaire. La valeur normale de cet intervalle dépend de la fréquence cardiaque, il est donc nécessaire de corriger cet intervalle en fonction de la fréquence. On parle

alors de QT corrigé ($QTc = QT/\sqrt{RR}$, en secondes, d'après la formule de Bazett). Celui ci est normalement inférieur à 0.44 seconde. Il faut toutefois tenir compte de l'âge et du sexe du patient. L'intervalle QT est, en effet, plus long chez les individus de plus de 15 ans et chez les femmes.

Un allongement anormal de cet intervalle (supérieur à 0.44s) traduit un trouble de la repolarisation ventriculaire favorisant la survenue d'arythmies potentiellement mortelles, comme des torsades de pointes (tachycardie ventriculaire polymorphe avec modification de la morphologie et l'amplitude du QRS, figure 30) ou des fibrillations ventriculaires (figure 40).

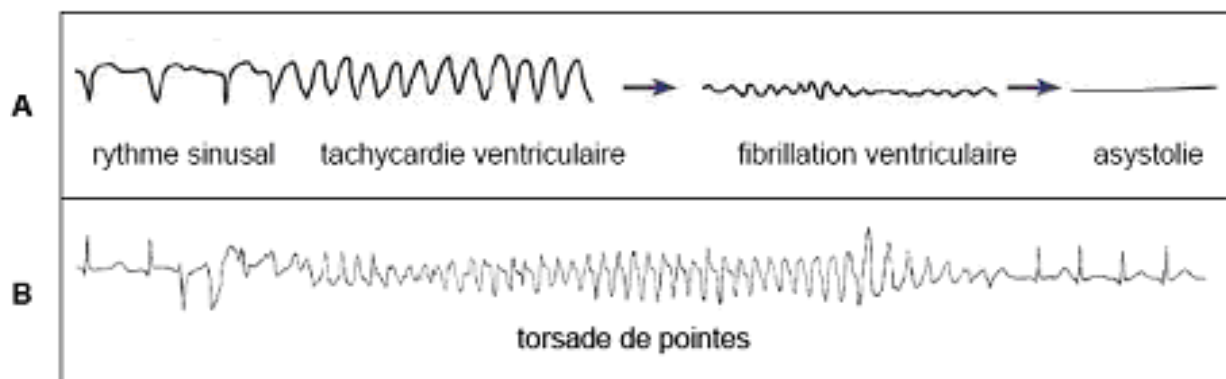


Figure 40: Mécanismes de la mort subite cardiaque par arythmie ventriculaire. A, tachycardie Ventriculaire qui dégénère en fibrillation ventriculaire et cause la mort par asystolie. Modifié d'après (Huikuri *et al.*, 2001).B, torsades de pointes. Modifié d'après (Napolitano & Priori, 2002).

Annexe 2 : Protéines régulatrices du canal sodique Na_v1.5

Protéines régulatrices du canal Na _v 1.5	Zone d'interaction	Modèle cellulaire	Effets fonctionnels	Référence
Na _v β1	- Entre la partie N-terminale de β1 et la boucle S5-S6 des domaines I et IV de Na _v 1.5	<ul style="list-style-type: none"> - HEK tsA201 - HEK 293 	<ul style="list-style-type: none"> - Augmentation de l'amplitude du courant sodique et/ou modification de la dépendance au potentiel de l'inactivation. - Modification du courant sodique persistant. 	(Qu <i>et al.</i> , 1995;Dhar <i>et al.</i> , 2001;Valdivia <i>et al.</i> , 2002;Zimmer <i>et al.</i> , 2002;Maltsev <i>et al.</i> , 2009)
		- Ovocyte de Xénope	- Aucun effet.	(Makita <i>et al.</i> , 1994)

Nav β2	- Entre la partie N-terminale de β et la boucle S5-S6 des domaines I et IV de Na _{v1.5}	- Cellules Pro5 et Lec2	- Décalage de la courbe d'activation vers des potentiels plus négatifs, cet effet est proportionnel au degré de la sialylation de la sous-unité β2.	(Johnson & Bennett, 2006)
		-HEK tsA201	Aucun effet.	(Dhar <i>et al.</i> , 2001)
Nav β3	- Entre la partie N-terminale de β et la boucle S5-S6 des domaines I et IV de Na _{v1.5}	- CHO - HEK tsA201 -Cardiomyocytes SCN3b -/-	- Diminution du courant sodique persistant - Décalage des courbes d'activation et d'inactivation vers des potentiels plus négatifs.	(Ko <i>et al.</i> , 2005;Hakim <i>et al.</i> , 2008;Hu <i>et al.</i> , 2009)
		- Ovocyte de Xénope	- Augmentation du courant sodique et décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus positifs.	(Fahmi <i>et al.</i> , 2001)
Nav β4	- Entre la partie N-terminale de β	- HEK tsA 201	- Aucun effet.	(Yu <i>et al.</i> , 2003)

	et la boucle S5-S6 des domaines I et IV de Nav _{v1.5}	- HEK 293	- Décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs.	(Medeiros-Domingo <i>et al.</i> , 2007)
FHF1B	- Interaction avec la partie C-terminale de Nav1.5	- HEK 293	- Décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs.	(Liu <i>et al.</i> , 2001;Liu <i>et al.</i> , 2003)
Calmoduline	- Interaction avec les motifs Motif IQ et EF-hand de la partie C-terminale - Interaction avec la boucle III-IV	- HEK tsa201 - Cardiomyocytes de Cobaye - Cardiomyocytes de rat	- Augmentation du courant de pic - Stabilisation de l'inactivation. - Changement de la dépendance au potentiel de l'inactivation.	(Tan <i>et al.</i> , 2002;Kim <i>et al.</i> , 2004;Wingo <i>et al.</i> , 2004;Yoon <i>et al.</i> , 2009;Aiba <i>et al.</i> , 2010)
		- CHO	- Décalage de la courbe d'activation vers des potentiels plus négatifs.	(Young & Caldwell, 2005)
		- HEK 293	- Aucun effet	(Deschenes <i>et al.</i> , 2002)

Ca²⁺/ Calmoduline kinase II	?	- Cardiomyocytes de rat. - Cardiomyocytes de cobaye	- Décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus positifs et accélération de la levée d'inactivation. - Augmentation du courant au pic et du courant persistant sodiques.	(Yoon <i>et al.</i> , 2009; Aiba <i>et al.</i> , 2010) ;
		- Cardiomyocytes de lapin	- Un décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs. - Augmentation du courant persistant sodique et du courant de pic.	(Wagner <i>et al.</i> , 2006)
14.3.3 η	- Interaction au niveau de la boucle I-II de Nav1.5	- COS-7	- Décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs et un ralentissement des cinétiques de levée d'inactivation.	(Allouis <i>et al.</i> , 2006)
Tyrosine phosphatases PTPH1	- Liaison avec le motif PDZ de Nav1.5	- HEK293	- Décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatif.	(Jespersen <i>et al.</i> , 2006)

Telethonine	?	- HEK293	- siRNA anti-telethonine provoque le décalage de la courbe d'activation vers des potentiels plus positifs.	(Mazzone <i>et al.</i> , 2008)
Plakophiline 2	?	- Cardiomyocytes de rat adulte	- L'extinction de l'expression de la plakophiline-2 provoque une diminution du courant I_{Na} , un décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs et le ralentissement de la levée d'inactivation.	(Sato <i>et al.</i> , 2009)
Ankyrine G	- Interaction avec la boucle II-III de Nav1.5	- Cardiomyocytes de rat adulte	- Facilitation de l'adressage de $Na_v1.5$ à la membrane.	(Mohler <i>et al.</i> , 2004)

<p>Syntrophine</p>	<p>- Interaction du domaine PDZ de la syntrophine avec la partie C-terminale du canal Nav1.5</p>	<p>- HEK293 -Cardiomyocytes néonataux - Cardiomyocytes de souris déficientes en dystrophine 5 (mdx)</p>	<p>- Rôle de protéine adaptatrice permettant la formation de complexes protéiques tels que les complexes Nav1.5-syntrophine-dystrophine et nNOS-Pompe ATPase calcique PMCA-Nav_v1.5. - Déplacement de la courbe d'activation vers des potentiels plus positifs et ralentissement des cinétiques d'activation et d'inactivation.</p>	<p>(Ou <i>et al.</i>, 2003;Gavillet <i>et al.</i>, 2006;Ueda <i>et al.</i>, 2008)</p>
<p>Cavéoline3</p>	<p>?</p>	<p>- HEK293</p>	<p>- Aucun effet de la sur-expression de la cavéoline 3 WT sur le courant I_{Na}. - Les mutations S141R, F97C, V14L, T78M et L79R du gène codant pour la cavéoline3 provoque une augmentation du courant sodique persistant.</p>	<p>(Vatta <i>et al.</i>, 2006;Cronk <i>et al.</i>, 2007)</p>

GPD1L	?	<ul style="list-style-type: none"> - HEK293 - Cardiomyocytes néonataux de souris 	<ul style="list-style-type: none"> - Les mutations A280V et E83K de GPD1L identifiées respectivement dans des cas de SBr et de mort subite du nourissant provoquent une altération de l'activité enzymatique de GPD1L et qui a pour conséquence une diminution du courant sodique suite à sa phosphorylation par une PKC. 	(London <i>et al.</i> , 2007; Van Norstrand <i>et al.</i> , 2007)
MOG1	<ul style="list-style-type: none"> - Interaction avec la boucle II-III de Na_v1.5 	<ul style="list-style-type: none"> - HEK293 	<ul style="list-style-type: none"> - Augmentation de la densité du courant sodique en favorisant l'adressage du canal à la membrane 	(Wu <i>et al.</i> , 2008)
α-Actinine 2	<ul style="list-style-type: none"> - Interaction avec la boucle III-IV de Na_v1.5 	<ul style="list-style-type: none"> - HEK tsA201 	<ul style="list-style-type: none"> - Augmentation de l'amplitude du courant sodique due à un meilleur trafic de ce canal à la membrane 	(Ziane <i>et al.</i> , 2010)

Nedd4.2	Interaction des domaines WW de Nedd4.2 avec le motif PY de la partie C-terminale de Na _v 1.5	- Ovocyte de Xénope. - HEK 293	Augmentation de l'internalisation du canal Na _v 1.5 provoquant une diminution de l'expression de celui ci à la membrane.	(Abriel <i>et al.</i> , 2000;van Bemmelen <i>et al.</i> , 2004;Rougier <i>et al.</i> , 2005)
----------------	---	-----------------------------------	---	--

Annexe 3 : Protéines régulatrices du canal Calcique Ca_v1.2

Protéines régulatrices du canal Ca _v 1.2	Zone d'interaction	Modèle cellulaire	Effets fonctionnels	Référence
Ca_vβ1-4	<ul style="list-style-type: none"> - Interaction entre les domaines ABP et SH3 des sous-unités β et le domaine AID de la boucle I-II de Ca_v1.2. - Interaction de la partie N-terminale des β avec le domaine AID 	<ul style="list-style-type: none"> - Ovocytes de Xénopes - COS-7 	<ul style="list-style-type: none"> - Adressage du canal Ca_v1.2 à la membrane - Un décalage de la courbe activation vers des potentiels plus négatifs. - Un décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs et l'accélération des cinétiques d'inactivation sont observés en présence de β1, β3, β4. - En présence de β2 un décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus positifs et un ralentissement des cinétiques d'inactivation sont observés. 	(Bichet <i>et al.</i> , 2000;Stephens <i>et al.</i> , 2000a;Stephens <i>et al.</i> , 2000b;Richards <i>et al.</i> , 2007)

<p>Cavα2δ1-4</p>	<p>- Interaction avec la partie extracellulaire du domaine III</p>	<p>- HEK tsA 201 -HEK 293 - Ovocyte de Xénope</p>	<p>- Cavα2δ1 : Augmentation de l'adressage à la membrane du canal Ca_v1.2, accélération des cinétiques d'activation et d'inactivation, décalage des courbes d'activation et d'inactivation vers des potentiels plus négatifs. - Cavα2δ2 : Augmentation de la densité du courant. - Cavα2δ3 : en présence de β2a, α2δ3 augmente l'amplitude du courant, accélère les cinétiques d'activation et d'inactivation et décale les courbes d'activation et d'inactivation vers des potentiels plus négatifs. - Cavα2δ4 : Augmentation de l'amplitude du courant</p>	<p>(Gurnett <i>et al.</i>, 1997;Felix <i>et al.</i>, 1997;Klugbauer <i>et al.</i>, 1999;Gao <i>et al.</i>, 2000)</p>
<p>KChIP2</p>	<p>- Interaction avec la partie N-terminale de Ca_v1.2</p>	<p>-HEK tsA201 - Cardiomyocytes de souris adultes -/- pour KChip2</p>	<p>- Augmentation de la densité du courant I_{CaL} en se liant au domaine inhibiteur situé sur la partie C-terminale du canal Ca_v1.2. - Les souris KO pour KChIP2 montre une augmentation des transcrits de la sous-unité β2. Cette augmentation n'affecte pas l'expression du canal Ca_v1.2.</p>	<p>(Thomsen <i>et al.</i>, 2009a;Thomson <i>et al.</i>, 2009b)</p>

eif3e	- Interaction avec la boucle II-III du canal Ca _v 1.2	- Cellules neuronales. - HEK293.	- L'interaction eIF3e et Ca _v 1.2 est indispensable pour l'internalisation calcium dépendante et le trafic endosomal de ce canal.	(Green <i>et al.</i> , 2007)
Calmoduline	- Interaction avec les motifs CB, IQ de la partie C-terminale, avec la boucle I-II et la partie N-terminale et de Ca _v 1.2	- COS-1 - HEK293 - Ovocyte de Xénopes - Cardiomyocytes de cobaye	- En présence d'ATP, la calmoduline prévient l'apparition de la diminution spontanée « rundown » du courant calcique. - Implication dans les processus d'inactivation et de facilitation calcium dépendante. - Favorise l'adressage à la membrane du canal Ca _v 1.2 à la membrane en absence de la sous-unité β.	(Zuhlke & Reuter, 1998; Peterson <i>et al.</i> , 1999; Qin <i>et al.</i> , 1999; Xu <i>et al.</i> , 2004; Halling <i>et al.</i> , 2005; Ravindran <i>et al.</i> , 2008)
CaBP1	- Interaction avec la boucle III-IV, la partie N-terminale, et le motif IQ de la partie C-terminale de Ca _v 1.2	- HEK293	- Prévient l'inactivation calcium dépendante via son interaction avec la partie N-terminale du canal Ca _v 1.2 et favorise le phénomène de facilitation de l'entrée de calcium.	(Zhou <i>et al.</i> , 2004; Zhou <i>et al.</i> , 2005)

<p>Calmoduline kinase II</p>	<p>- En présence de Calcium et d'ATP, la CaMKII interagit avec la partie N-terminale, les boucles I-II, II-III, III-IV et la partie C-terminale de Ca_v1.2.</p>	<p>- Cardiomyocytes de souris -Cardiomyocytes de rat - HEK 293</p>	<p>- Augmentation de la probabilité d'ouverture des canaux Ca_v1.2 - La phosphorylation des Sérines S1512 et S1570 de la partie C-terminale de Ca_v1.2 par CaMKII est essentiel pour les phénomènes de la facilitation dépendante du calcium et du potentiel. - La phosphorylation de la sous-unité β2 par la CaM kinase II</p>	<p>(Dzhura <i>et al.</i>, 2000; Grueter <i>et al.</i>, 2006; Lee <i>et al.</i>, 2006; Blaich <i>et al.</i>, 2010)</p>
<p>AKAP15/18</p>	<p>- Interaction avec la partie C-terminale de Ca_v1.2 via un motif leucine zipper-like.</p>	<p>- HEK293 - Cardiomyocytes adultes de rat.</p>	<p>- Rôle d'ancrage des phosphatases et des protéines kinases tels que la PKA nécessaire pour la régulation du canal Ca_v1.2 lors d'une stimulation β-adrénergique.</p>	<p>(Fraser <i>et al.</i>, 1998; Hulme <i>et al.</i>, 2003)</p>
<p>PP1/PP2A</p>	<p>- Interaction avec la partie C-terminale de Ca_v1.2.</p>	<p>-Cardiomyocytes de souris adultes</p>	<p>- L'inhibition des protéines phosphatases 1 et 2 par la calyculine A provoque une augmentation de l'amplitude du courant calcique I_{CaL} et le décalage des courbes d'activation et d'inactivation vers des potentiels plus négatifs.</p>	<p>(duBell <i>et al.</i>, 1996; duBell & Rogers, 2004)</p>

Cavéoline3	?	-Cardiomyocytes néonataux et adultes de souris	- L'interaction de la caveoline avec canal Ca _v 1.2 est nécessaire à la réponse de ce canal aux stimulations β2 adrénergique. En effet, la destruction des cavéoles ou l'utilisation des siRNA dirigées contre la cavéoline 3 supprime la réponse du canal Ca _v 1.2 aux stimulations β2 adrénergique.	(Tang <i>et al.</i> , 1996;Balijepalli <i>et al.</i> , 2006)
Sorcine	- Interaction avec la partie C-terminale de Ca _v 1.2.	- Ovocyte de Xénope - Cardiomyocytes de souris adultes sur-exprimant la sorcine	- Pas d'effet sur l'amplitude du courant I _{CaL} - Accélération des cinétiques d'inactivation du courant I _{CaL}	(Meyers <i>et al.</i> , 1998;Meyers <i>et al.</i> , 2003)
		- HEK293 - Cardiomyocytes de lapin adultes	- Augmentation de l'amplitude du courant I _{CaL} -Ralentissement des cinétiques d'inactivation.	(Fowler <i>et al.</i> , 2008;Fowler <i>et al.</i> , 2009)

CSN5/Jab1	- Interaction avec la boucle II-III du canal $Ca_v1.2$.	COS-7	L'extinction de l'expression de CSN5 par des siRNA induit une augmentation de l'amplitude du courant calcique I_{CaL} .	(Kameda <i>et al.</i> , 2006)
------------------	--	-------	---	-------------------------------

Annexe 4 : Protéines régulatrices du canal potassique K_v4.3

Protéines régulatrices du canal K _v 4.3	Zone d'interaction	Modèle cellulaire	Effets fonctionnels	Référence
KChiP2	-Interaction avec la partie N-terminale des K _v 4	<ul style="list-style-type: none"> - CHO - Ovocyte de Xénope - HEK293 - COS-1 	<ul style="list-style-type: none"> - Augmentation de l'adressage à la membrane des canaux Kv4. - Augmentation de l'expression totale et membranaire des Canaux Kv4 - Stabilisation des canaux à la membrane en inhibant le processus d'endocytose. - Ralentissement des cinétiques d'inactivation et accélérations des cinétiques de levée d'inactivation. - Décalage des courbes d'activation et d'inactivation vers des potentiels plus positifs. 	(An <i>et al.</i> , 2000; Bahring <i>et al.</i> , 2001; Holmqvist <i>et al.</i> , 2002; Shibata <i>et al.</i> , 2003; Foeger <i>et al.</i> , 2010)
Na_vβ1	?	<ul style="list-style-type: none"> -Cardiomyocytes néonataux de rat. - HEK 293 	<ul style="list-style-type: none"> - Augmentation de la densité du courant. - Accélération des cinétiques d'activation et d'inactivation. 	(Deschenes & Tomaselli, 2002; Deschenes

			<ul style="list-style-type: none"> - Ralentissement des cinétiques de levée d'inactivation. - Décalage de la courbe d'activation vers des potentiels plus négatifs. - L'extinction de l'expression de $\beta 1$ dans des cardiomyocytes néonataux de rat induit une diminution de l'amplitude du courant I_{to} 	<i>et al.</i> , 2008)
DPPX	?	<ul style="list-style-type: none"> - CHO -Ovocyte de Xénope 	<ul style="list-style-type: none"> - Augmentation de l'expression membranaire du canaux Kv4. - Décalage des courbes d'activations et d'inactivations vers des potentiels plus négatifs. - Accélération des cinétiques d'inactivations et de levée d'inactivation. - Modification des paramètres biophysiques d'ouvertures des canaux Kv4. 	(Nadal <i>et al.</i> , 2003;Radicke <i>et al.</i> , 2005)
DPPY	?	<ul style="list-style-type: none"> - Ovocyte de Xénope - COS-7 - CHO 	<ul style="list-style-type: none"> - Augmentation de l'expression membranaire des canaux Kv4. - Décalage des courbes d'activations et d'inactivations vers des potentiels plus négatifs. - Accélération des cinétiques d'inactivations et de levée d'inactivation. 	(Jerng <i>et al.</i> , 2004;Jerng <i>et al.</i> , 2005;Zagha <i>et al.</i> , 2005)

KchaP	?	<ul style="list-style-type: none"> - Ovocyte de Xénope - Cellules L de souris 	<ul style="list-style-type: none"> - Augmentation de la densité du courant I_{to} sans modifier les paramètres biophysiques du canal Kv4.3 	(Kuryshv <i>et al.</i> , 2000)
SAP-97	- Interaction avec la partie C-terminale des Kv4	<ul style="list-style-type: none"> - CHO - Cardiomyocytes auriculaires de rat 	<ul style="list-style-type: none"> - Augmentation de la clustérisation du canal Kv4.3 - Augmentation de la densité du courant. - Ralentissement des cinétiques d'inactivation - Rôle de protéine adaptatrice permettant la régulation de Kv4.3 par la CaMKII. 	(El Haou <i>et al.</i> , 2009)
K_vβ	- Interaction avec la partie C-terminale des Kv4	HEK 293	<ul style="list-style-type: none"> - K_vβ1 et K_vβ2 : augmentent l'expression protéique et la densité du courant sans modifier les paramètres biophysiques du canal. - K_vβ3 : en absence de KchiP, on observe une augmentation de la densité du courant, ralentissement des cinétiques d'inactivation, décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs. - K_vβ3 : en présence de KchiP, augmentation de la densité du courant, ralentissement des cinétiques d'inactivation et accélération des cinétiques de levée d'inactivation. 	(Yang <i>et al.</i> , 2001; Deschenes & Tomaselli, 2002)

Calmoduline kinase II	- Interaction avec la partie C-terminale des Kv4	- Cardiomyocytes auriculaires humaines - HEK 293 - Cardiomyocytes ventriculaires de rat	- Décalage des courbes d'activation et d'inactivation vers des potentiels plus positifs. - Ralentissement des cinétiques d'inactivation. - Accélération des cinétiques de levée d'inactivation.	(Tessier <i>et al.</i> , 1999; Sergeant <i>et al.</i> , 2005; Colinas <i>et al.</i> , 2006)
KCNE1-5	?	CHO	<p style="text-align: center;">Les effets de KCNEs sont variables :</p> <p>En présence de KChIP2 :</p> - Tous les KCNEs accélèrent les cinétiques d'activation - Accélération des cinétiques d'inactivations par KCN3,4 et 5 - La co-expression de KCNE4 et 5 accélère les cinétiques d'inactivation - Tous les KCNEs décalent la courbe d'inactivations vers des potentiels plus négatifs - KCN1,2 et 3 ralentissent les cinétiques de levée d'inactivation - KCNE4 seule accélère les cinétiques de levée d'inactivation, en revanche quand elle est co-exprimée avec KCNE2, on observe un ralentissement des ces cinétiques.	(Radicke <i>et al.</i> , 2006)

		<p>- Ovocyte de Xénope</p>	<p>En Absence de KChiP, KCNE2 a été décrite pour avoir les effets suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Décalage des courbes d'activations et d'inactivations vers des potentiels plus positifs. - Ralentissement des cinétiques d'activation et d'inactivation. 	<p>(Zhang <i>et al.</i>, 2001)</p>
		<p>- Ovocytes de Xénopes -HEK293 - CHO</p>	<p>En absence de KChiP2, KCNE3 a été décrite pour avoir les effets suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Diminution du courant I_{to} régi par le canal Kv4.3 - Décale des courbes d'activation et d'inactivation vers des potentiels plus négatifs - Ralentissement des cinétiques d'activation, d'inactivation et de levée d'inactivation. <p>En présence de KChiP2</p> <p>On observe les mêmes effets que sans KchiP à l'exception de l'effet sur la courbe d'inactivation qui est aboli</p>	<p>(Lundby & Olesen, 2006; Delpon <i>et al.</i>, 2008)</p>

		- HEK293	<p>En absence de KchiP2</p> <ul style="list-style-type: none"> - KCNE1 : augmente la densité du courant, ralentie les cinétiques d'activation, d'inactivation et de levée d'inactivation. - KCNE2 : augmente la densité du courant et ralentie les cinétiques d'inactivation 	(Yang <i>et al.</i> , 2001; Deschenes & Tomaselli, 2002)
--	--	----------	---	--

Bibliographie

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

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

Ahmad, F., Seidman, J. G., & Seidman, C. E. (2005). The genetic basis for cardiac remodeling. *Annu.Rev.Genomics Hum.Genet.* **6**, 185-216.

Aiba, T., Hesketh, G. G., Liu, T., Carlisle, R., Villa-Abrille, M. C., O'Rourke, B., Akar, F. G., & Tomaselli, G. F. (2010). Na⁺ channel regulation by Ca²⁺/calmodulin and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in guinea-pig ventricular myocytes. *Cardiovasc.Res.* **85**, 454-463.

Akai, J., Makita, N., Sakurada, H., Shirai, N., Ueda, K., Kitabatake, A., Nakazawa, K., Kimura, A., & Hiraoka, M. (2000). A novel SCN5A mutation associated with idiopathic ventricular fibrillation without typical ECG findings of Brugada syndrome. *FEBS Lett.* **479**, 29-34.

Alders, M., Koopmann, T. T., Christiaans, I., Postema, P. G., Beekman, L., Tanck, M. W., Zeppenfeld, K., Loh, P., Koch, K. T., Demolombe, S., Mannens, M. M., Bezzina, C. R., & Wilde, A. A. (2009). Haplotype-sharing analysis implicates chromosome 7q36 harboring DPP6 in familial idiopathic ventricular fibrillation. *Am.J.Hum.Genet.* **84**, 468-476.

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.

Allouis, M., Le Bouffant, F., Wilders, R., Peroz, D., Schott, J. J., Noireaud, J., Le Marec, H., Merot, J., Escande, D., & Baro, I. (2006). 14-3-3 is a regulator of the cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5. *Circ.Res.* **98**, 1538-1546.

Amat di San, F. C., Taylor, M. R., Mestroni, L., Botto, L. D., & Longo, N. (2008). Cardiomyopathy and carnitine deficiency. *Mol.Genet.Metab* **94**, 162-166.

Amin, A. S., de Groot, E. A., Ruijter, J. M., Wilde, A. A., & Tan, H. L. (2009). Exercise-induced ECG changes in Brugada syndrome. *Circ.Arrhythm.Electrophysiol.* **2**, 531-539.

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.

Anttonen, O., Junttila, M. J., Rissanen, H., Reunanen, A., Viitasalo, M., & Huikuri, H. V. (2007). Prevalence and prognostic significance of short QT interval in a middle-aged Finnish population. *Circulation* **116**, 714-720.

Anttonen, O., Vaananen, H., Junttila, J., Huikuri, H. V., & Viitasalo, M. (2008). Electrocardiographic transmural dispersion of repolarization in patients with inherited short QT syndrome. *Ann.Noninvasive.Electrocardiol.* **13**, 295-300.

Antzelevitch, C., Brugada, P., Borggrefe, M., Brugada, J., Brugada, R., Corrado, D., Gussak, I., LeMarec, H., Nademanee, K., Perez Riera, A. R., Shimizu, W., Schulze-Bahr, E., Tan, H., & Wilde, A. (2005a). Brugada syndrome: report of the second consensus conference: endorsed by the Heart Rhythm Society and the European Heart Rhythm Association. *Circulation* **111**, 659-670.

Antzelevitch, C., Brugada, P., Brugada, J., & Brugada, R. (2005b). Brugada syndrome: from cell to bedside. *Curr.Probl.Cardiol.* **30**, 9-54.

Antzelevitch, C., Pollevick, G. D., Cordeiro, J. M., Casis, O., Sanguinetti, M. C., Aizawa, Y., Guerchicoff, A., Pfeiffer, R., Oliva, A., Wollnik, B., Gelber, P., Bonaros, E. P., Jr., Burashnikov, E., Wu, Y., Sargent, J. D., Schickel, S., Oberheiden, R., Bhatia, A., Hsu, L. F., Haissaguerre, M., Schimpf, R., Borggrefe, M., & Wolpert, C. (2007). Loss-of-function mutations in the cardiac calcium channel underlie a new clinical entity characterized by ST-segment elevation, short QT intervals, and sudden cardiac death. *Circulation* **115**, 442-449.

Antzelevitch, C., 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.

Ayerza, M. R., de Zutter, M., Goethals, M., Wellens, F., Geelen, P., & Brugada, P. (2002). Heart transplantation as last resort against Brugada syndrome. *J.Cardiovasc.Electrophysiol.* **13**, 943-944.

Bahring, R., Dannenberg, J., Peters, H. C., Leicher, T., Pongs, O., & Isbrandt, D. (2001). Conserved Kv4 N-terminal domain critical for effects of Kv channel-

interacting protein 2.2 on channel expression and gating. *J.Biol.Chem.* **276**, 23888-23894.

Balijepalli, R. C., Foell, J. D., Hall, D. D., Hell, J. W., & Kamp, T. J. (2006). Localization of cardiac L-type Ca(2+) channels to a caveolar macromolecular signaling complex is required for beta(2)-adrenergic regulation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **103**, 7500-7505.

Barrett, C. F. & Tsien, R. W. (2008). The Timothy syndrome mutation differentially affects voltage- and calcium-dependent inactivation of CaV1.2 L-type calcium channels. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **105**, 2157-2162.

Bean, B. P. (1989). Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage dependence. *Nature* **340**, 153-156.

Belloq, 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.

Benito, B., Brugada, J., Brugada, R., & Brugada, P. (2009). Brugada syndrome. *Rev.Esp.Cardiol.* **62**, 1297-1315.

Benito, B., Sarkozy, A., Mont, L., Henkens, S., Berruezo, A., Tamborero, D., Arzamendi, D., Berne, P., Brugada, R., Brugada, P., & Brugada, J. (2008). Gender differences in clinical manifestations of Brugada syndrome. *J.Am.Coll.Cardiol.* **52**, 1567-1573.

Bennett, P. B., Yazawa, K., Makita, N., & George, A. L., Jr. (1995). Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia. *Nature* **376**, 683-685.

Benson, D. W., Wang, D. W., Dymont, M., Knilans, T. K., Fish, F. A., Strieper, M. J., Rhodes, T. H., & George, A. L., Jr. (2003). Congenital sick sinus syndrome caused by recessive mutations in the cardiac sodium channel gene (SCN5A). *J.Clin.Invest* **112**, 1019-1028.

Bernatchez, G., Berrou, L., Benakezouh, Z., Ducay, J., & Parent, L. (2001). Role of Repeat I in the fast inactivation kinetics of the Ca(V)2.3 channel. *Biochim.Biophys.Acta* **1514**, 217-229.

Berrou, L., Bernatchez, G., & Parent, L. (2001). Molecular determinants of inactivation within the I-II linker of alpha1E (CaV2.3) calcium channels. *Biophys.J.* **80**, 215-228.

Bezzina, C., Veldkamp, M. W., van Den Berg, M. P., Postma, A. V., Rook, M. B., Viersma, J. W., van Langen, I. M., Tan-Sindhunata, G., Bink-Boelkens, M. T., Der Hout, A. H., Mannens, M. M., & Wilde, A. A. (1999). A single Na(+) channel mutation causing both long-QT and Brugada syndromes. *Circ.Res.* **85**, 1206-1213.

Bichet, D., Cornet, V., Geib, S., Carlier, E., Volsen, S., Hoshi, T., Mori, Y., & De Waard, M. (2000). The I-II loop of the Ca²⁺ channel alpha1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron* **25**, 177-190.

Biliczki, P., Girmatsion, Z., Brandes, R. P., Harenkamp, S., Pitard, B., Charpentier, F., Hebert, T. E., Hohnloser, S. H., Baro, I., Nattel, S., & Ehrlich, J. R. (2009). Trafficking-deficient long QT syndrome mutation KCNQ1-T587M confers severe clinical phenotype by impairment of KCNH2 membrane localization: evidence for clinically significant IKr-IKs alpha-subunit interaction. *Heart Rhythm.* **6**, 1792-1801.

Blaich, A., Welling, A., Fischer, S., Wegener, J. W., Kostner, K., Hofmann, F., & Moosmang, S. (2010). Facilitation of murine cardiac L-type Ca(v)1.2 channel is modulated by calmodulin kinase II-dependent phosphorylation of S1512 and S1570. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **107**, 10285-10289.

Bremer, J. (1983). Carnitine--metabolism and functions. *Physiol Rev.* **63**, 1420-1480.

Brette, F., Leroy, J., Le Guennec, J. Y., & Salle, L. (2006). Ca²⁺ currents in cardiac myocytes: Old story, new insights. *Prog.Biophys.Mol.Biol.* **91**, 1-82.

Brette, F. & Orchard, C. H. (2006). Density and sub-cellular distribution of cardiac and neuronal sodium channel isoforms in rat ventricular myocytes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **348**, 1163-1166.

Brugada, P. & Brugada, J. (1992). Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report. *J.Am.Coll.Cardiol.* **20**, 1391-1396.

Brugada, R., Brugada, J., Antzelevitch, C., Kirsch, G. E., Potenza, D., Towbin, J. A., & Brugada, P. (2000). Sodium channel blockers identify risk for sudden death in patients with ST-segment elevation and right bundle branch block but structurally normal hearts. *Circulation* **101**, 510-515.

Brugada, R., Hong, K., 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.

Burashnikov, E., Pfeiffer, R., Barajas-Martinez, H., Delpon, E., Hu, D., Desai, M., Borggrefe, M., Haissaguerre, M., Kanter, R., Pollevick, G. D., Guerchicoff, A., Laino, R., Marieb, M., Nademanee, K., Nam, G. B., Robles, R., Schimpf, R., Stapleton, D. H., Viskin, S., Winters, S., Wolpert, C., Zimmern, S., Veltmann, C., & Antzelevitch, C. (2010). Mutations in the Cardiac L-Type Calcium Channel Associated with Inherited J Wave Syndromes and Sudden Cardiac Death. *Heart Rhythm*.

Butler, A., Wei, A. G., Baker, K., & Salkoff, L. (1989). A family of putative potassium channel genes in *Drosophila*. *Science* **243**, 943-947.

Carl, S. L., Felix, K., Caswell, A. H., Brandt, N. R., Ball, W. J., Jr., Vaghy, P. L., Meissner, G., & Ferguson, D. G. (1995). Immunolocalization of sarcolemmal dihydropyridine receptor and sarcoplasmic reticular triadin and ryanodine receptor in rabbit ventricle and atrium. *J.Cell Biol.* **129**, 673-682.

Catterall, W. A. (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **16**, 521-555.

Chanda, B., Asamoah, O. K., & Bezanilla, F. (2004). Coupling interactions between voltage sensors of the sodium channel as revealed by site-specific measurements. *J.Gen.Physiol* **123**, 217-230.

Chandy, K. G. & Gutman, G. A. (1993). Nomenclature for mammalian potassium channel genes. *Trends Pharmacol.Sci.* **14**, 434.

Chen, Q., Kirsch, G. E., Zhang, D., Brugada, R., Brugada, J., Brugada, P., Potenza, D., Moya, A., Borggrefe, M., Breithardt, G., Ortiz-Lopez, R., Wang, Z., Antzelevitch, C., O'Brien, R. E., Schulze-Bahr, E., Keating, M. T., Towbin, J. A., & Wang, Q. (1998). Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature* **392**, 293-296.

Chiamvimonvat, N., Perez-Garcia, M. T., Ranjan, R., Marban, E., & Tomaselli, G. F. (1996). Depth asymmetries of the pore-lining segments of the Na⁺ channel revealed by cysteine mutagenesis. *Neuron* **16**, 1037-1047.

Christie, M. J., North, R. A., Osborne, P. B., Douglass, J., & Adelman, J. P. (1990). Heteropolymeric potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes from cloned subunits. *Neuron* **4**, 405-411.

Clancy, C. E. & Rudy, Y. (2002). Na(+) channel mutation that causes both Brugada and long-QT syndrome phenotypes: a simulation study of mechanism. *Circulation* **105**, 1208-1213.

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.

Colinas, O., Gallego, M., Setien, R., Lopez-Lopez, J. R., Perez-Garcia, M. T., & Casis, O. (2006). Differential modulation of Kv4.2 and Kv4.3 channels by calmodulin-dependent protein kinase II in rat cardiac myocytes. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **291**, H1978-H1987.

Cordeiro, J. M., Marieb, M., Pfeiffer, R., Calloe, K., Burashnikov, E., & Antzelevitch, C. (2009). Accelerated inactivation of the L-type calcium current due to a mutation in CACNB2b underlies Brugada syndrome. *J.Mol.Cell Cardiol.* **46**, 695-703.

Cormier, J. W., Rivolta, I., Tateyama, M., Yang, A. S., & Kass, R. S. (2002). Secondary structure of the human cardiac Na⁺ channel C terminus: evidence for a role of helical structures in modulation of channel inactivation. *J.Biol.Chem.* **277**, 9233-9241.

Coronel, R., Casini, S., Koopmann, T. T., Wilms-Schopman, F. J., Verkerk, A. O., de Groot, J. R., Bhuiyan, Z., Bezzina, C. R., Veldkamp, M. W., Linnenbank, A. C., van der Wal, A. C., Tan, H. L., Brugada, P., Wilde, A. A., & de Bakker, J. M. (2005). Right ventricular fibrosis and conduction delay in a patient with clinical signs of Brugada syndrome: a combined electrophysiological, genetic, histopathologic, and computational study. *Circulation* **112**, 2769-2777.

Corrado, D., Basso, C., Buja, G., Nava, A., Rossi, L., & Thiene, G. (2001). Right bundle branch block, right precordial ST-segment elevation, and sudden death in young people. *Circulation* **103**, 710-717.

Corrado, D., Nava, A., Buja, G., Martini, B., Fasoli, G., Oselladore, L., Turrini, P., & Thiene, G. (1996). Familial cardiomyopathy underlies syndrome of right bundle branch block, ST segment elevation and sudden death. *J.Am.Coll.Cardiol.* **27**, 443-448.

Covarrubias, M., Wei, A. A., & Salkoff, L. (1991). Shaker, Shal, Shab, and Shaw express independent K⁺ current systems. *Neuron* **7**, 763-773.

Cronk, L. B., Ye, B., Kaku, T., Tester, D. J., Vatta, M., Makielski, J. C., & Ackerman, M. J. (2007). Novel mechanism for sudden infant death syndrome: persistent late sodium current secondary to mutations in caveolin-3. *Heart Rhythm.* **4**, 161-166.

Cushman, S. J., Nanao, M. H., Jahng, A. W., DeRubeis, D., Choe, S., & Pfaffinger, P. J. (2000). Voltage dependent activation of potassium channels is coupled to T1 domain structure. *Nat.Struct.Biol.* **7**, 403-407.

Delpon, E., Cordeiro, J. M., Nunez, L., Thomsen, P. E., Guerchicoff, A., Pollevick, G. D., Wu, Y., Kanters, J. K., Larsen, C. T., Hofman-Bang, J., Burashnikov, E., Christiansen, M., & Antzelevitch, C. (2008). Functional effects of KCNE3 mutation and its role in the development of Brugada syndrome. *Circ.Arrhythm.Electrophysiol.* **1**, 209-218.

Deschenes, I., Arroudas, A. A., Jones, S. P., & Tomaselli, G. F. (2008). Post-transcriptional gene silencing of KChIP2 and Navbeta1 in neonatal rat cardiac myocytes reveals a functional association between Na and Ito currents. *J.Mol.Cell Cardiol.* **45**, 336-346.

Deschenes, I., Neyroud, N., DiSilvestre, D., Marban, E., Yue, D. T., & Tomaselli, G. F. (2002). Isoform-specific modulation of voltage-gated Na(+) channels by calmodulin. *Circ.Res.* **90**, E49-E57.

Deschenes, I. & Tomaselli, G. F. (2002). Modulation of Kv4.3 current by accessory subunits. *FEBS Lett.* **528**, 183-188.

Deschenes, I., Trottier, E., & Chahine, M. (2001). Implication of the C-terminal region of the alpha-subunit of voltage-gated sodium channels in fast inactivation. *J.Membr.Biol.* **183**, 103-114.

Dhar, M. J., Chen, C., Rivolta, I., Abriel, H., Malhotra, R., Mattei, L. N., Brosius, F. C., Kass, R. S., & Isom, L. L. (2001). Characterization of sodium channel alpha- and beta-subunits in rat and mouse cardiac myocytes. *Circulation* **103**, 1303-1310.

Di Diego, J. M., Cordeiro, J. M., Goodrow, R. J., Fish, J. M., Zygmunt, A. C., Perez, G. J., Scornik, F. S., & Antzelevitch, C. (2002). Ionic and cellular basis for the predominance of the Brugada syndrome phenotype in males. *Circulation* **106**, 2004-2011.

DiFrancesco, D. & Noble, D. (1985). A model of cardiac electrical activity incorporating ionic pumps and concentration changes. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* **307**, 353-398.

Dixon, J. E., Shi, W., Wang, H. S., McDonald, C., Yu, H., Wymore, R. S., Cohen, I. S., & McKinnon, D. (1996). Role of the Kv4.3 K⁺ channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current. *Circ.Res.* **79**, 659-668.

Donahue, L. M., Coates, P. W., Lee, V. H., Ippensen, D. C., Arze, S. E., & Poduslo, S. E. (2000). The cardiac sodium channel mRNA is expressed in the developing and adult rat and human brain. *Brain Res.* **887**, 335-343.

Doris, P. A. (2002). Hypertension genetics, single nucleotide polymorphisms, and the common disease:common variant hypothesis. *Hypertension* **39**, 323-331.

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⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**, 69-77.

duBell, W. H., Lederer, W. J., & Rogers, T. B. (1996). Dynamic modulation of excitation-contraction coupling by protein phosphatases in rat ventricular myocytes. *J.Physiol* **493 (Pt 3)**, 793-800.

duBell, W. H. & Rogers, T. B. (2004). Protein phosphatase 1 and an opposing protein kinase regulate steady-state L-type Ca²⁺ current in mouse cardiac myocytes. *J.Physiol* **556**, 79-93.

Dzhura, I., Wu, Y., Colbran, R. J., Balsler, J. R., & Anderson, M. E. (2000). Calmodulin kinase determines calcium-dependent facilitation of L-type calcium channels. *Nat.Cell Biol.* **2**, 173-177.

Eaholtz, G., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1994). Restoration of inactivation and block of open sodium channels by an inactivation gate peptide. *Neuron* **12**, 1041-1048.

Eckardt, L. (2007). Gender differences in Brugada syndrome. *J.Cardiovasc.Electrophysiol.* **18**, 422-424.

El Haou, S., Balse, E., Neyroud, N., Dilanian, G., Gavillet, B., Abriel, H., Coulombe, A., Jeromin, A., & Hatem, S. N. (2009). Kv4 potassium channels form a tripartite complex with the anchoring protein SAP97 and CaMKII in cardiac myocytes. *Circ.Res.* **104**, 758-769.

el Hayek, R., Valdivia, C., Valdivia, H. H., Hogan, K., & Coronado, R. (1993). Activation of the Ca²⁺ release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by palmitoyl carnitine. *Biophys.J.* **65**, 779-789.

Esperer, H. D., Hoos, O., & Hottenrott, K. (2007). Syncope due to Brugada syndrome in a young athlete. *Br.J.Sports Med.* **41**, 180-181.

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.

Felix, R., Gurnett, C. A., De Waard, M., & Campbell, K. P. (1997). Dissection of functional domains of the voltage-dependent Ca²⁺ channel alpha2delta subunit. *J.Neurosci.* **17**, 6884-6891.

Filatov, G. N. & Rich, M. M. (2004). Hyperpolarized shifts in the voltage dependence of fast inactivation of Nav1.4 and Nav1.5 in a rat model of critical illness myopathy. *J.Physiol* **559**, 813-820.

Fish, J. M. & Antzelevitch, C. (2004). Role of sodium and calcium channel block in unmasking the Brugada syndrome. *Heart Rhythm.* **1**, 210-217.

Flockerzi, V., Oeken, H. J., Hofmann, F., Pelzer, D., Cavalie, A., & Trautwein, W. (1986). Purified dihydropyridine-binding site from skeletal muscle t-tubules is a functional calcium channel. *Nature* **323**, 66-68.

Foeger, N. C., Marionneau, C., & Nerbonne, J. M. (2010). Co-Assembly of Kv4 {alpha} Subunits with K⁺ Channel Interacting Protein 2 Stabilizes Protein Expression and Promotes Surface Retention of Channel Complexes. *J.Biol.Chem.*

Fowler, M. R., Colotti, G., Chiancone, E., Higuchi, Y., Seidler, T., & Smith, G. L. (2009). Complex modulation of L-type Ca(2+) current inactivation by sorcin in isolated rabbit cardiomyocytes. *Pflugers Arch.* **457**, 1049-1060.

Fowler, M. R., Colotti, G., Chiancone, E., Smith, G. L., & Fearon, I. M. (2008). Sorcin modulates cardiac L-type Ca²⁺ current by functional interaction with the alpha1C subunit in rabbits. *Exp.Physiol* **93**, 1233-1238.

Fox, A. P., Nowycky, M. C., & Tsien, R. W. (1987). Single-channel recordings of three types of calcium channels in chick sensory neurones. *J.Physiol* **394**, 173-200.

Fraser, I. D., Tavalin, S. J., Lester, L. B., Langeberg, L. K., Westphal, A. M., Dean, R. A., Marrion, N. V., & Scott, J. D. (1998). A novel lipid-anchored A-kinase Anchoring Protein facilitates cAMP-responsive membrane events. *EMBO J.* **17**, 2261-2272.

Frigo, G., Rampazzo, A., Bauce, B., Pilichou, K., Beffagna, G., Danieli, G. A., Nava, A., & Martini, B. (2007). Homozygous SCN5A mutation in Brugada syndrome with monomorphic ventricular tachycardia and structural heart abnormalities. *Europace.* **9**, 391-397.

Frustaci, A., Priori, S. G., Pieroni, M., Chimenti, C., Napolitano, C., Rivolta, I., Sanna, T., Bellocci, F., & Russo, M. A. (2005). Cardiac histological substrate in patients with clinical phenotype of Brugada syndrome. *Circulation* **112**, 3680-3687.

Gaborit, N., Le Bouter, S., Szuts, V., Varro, A., Escande, D., Nattel, S., & Demolombe, S. (2007). Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart. *J.Physiol* **582**, 675-693.

Gabriel, S. B., Salomon, R., Pelet, A., Angrist, M., Amiel, J., Fornage, M., Attie-Bitach, T., Olson, J. M., Hofstra, R., Buys, C., Steffann, J., Munnich, A., Lyonnet, S., & Chakravarti, A. (2002). Segregation at three loci explains familial and population risk in Hirschsprung disease. *Nat.Genet.* **31**, 89-93.

Gallagher, M. M., Forleo, G. B., Behr, E. R., Magliano, G., De Luca, L., Morgia, V., De Liberato, F., & Romeo, F. (2008). Prevalence and significance of Brugada-type ECG in 12,012 apparently healthy European subjects. *Int.J.Cardiol.* **130**, 44-48.

Gao, B., Sekido, Y., Maximov, A., Saad, M., Forgacs, E., Latif, F., Wei, M. H., Lerman, M., Lee, J. H., Perez-Reyes, E., Bezprozvanny, I., & Minna, J. D. (2000). Functional properties of a new voltage-dependent calcium channel alpha(2)delta auxiliary subunit gene (CACNA2D2). *J.Biol.Chem.* **275**, 12237-12242.

Gao, T., Cuadra, A. E., Ma, H., Bunemann, M., Gerhardstein, B. L., Cheng, T., Eick, R. T., & Hosey, M. M. (2001). C-terminal fragments of the alpha 1C (CaV1.2) subunit associate with and regulate L-type calcium channels containing C-terminal-truncated alpha 1C subunits. *J.Biol.Chem.* **276**, 21089-21097.

Garavaglia, B., Uziel, G., Dworzak, F., Carrara, F., & DiDonato, S. (1991). Primary carnitine deficiency: heterozygote and intrafamilial phenotypic variation. *Neurology* **41**, 1691-1693.

Gavillet, B., Rougier, J. S., Domenighetti, A. A., Behar, R., Boixel, C., Ruchat, P., Lehr, H. A., Pedrazzini, T., & Abriel, H. (2006). Cardiac sodium channel Nav1.5 is regulated by a multiprotein complex composed of syntrophins and dystrophin. *Circ.Res.* **99**, 407-414.

Gebauer, M., Isbrandt, D., Sauter, K., Callsen, B., Nolting, A., Pongs, O., & Bähring, R. (2004). N-type inactivation features of Kv4.2 channel gating. *Biophys.J.* **86**, 210-223.

Geib, S., Sandoz, G., Cornet, V., Mabrouk, K., Fund-Saunier, O., Bichet, D., Villaz, M., Hoshi, T., Sabatier, J. M., & De Waard, M. (2002). The interaction between the I-II loop and the III-IV loop of Cav2.1 contributes to voltage-dependent inactivation in a beta -dependent manner. *J.Biol.Chem.* **277**, 10003-10013.

Gellens, M. E., George, A. L., Jr., Chen, L. Q., Chahine, M., Horn, R., Barchi, R. L., & Kallen, R. G. (1992). Primary structure and functional expression of the human

cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**, 554-558.

George, A. L., Jr., Varkony, T. A., Drabkin, H. A., Han, J., Knops, J. F., Finley, W. H., Brown, G. B., Ward, D. C., & Haas, M. (1995). Assignment of the human heart tetrodotoxin-resistant voltage-gated Na⁺ channel alpha-subunit gene (SCN5A) to band 3p21. *Cytogenet.Cell Genet.* **68**, 67-70.

Gomez-Ospina, N., Tsuruta, F., Barreto-Chang, O., Hu, L., & Dolmetsch, R. (2006). The C terminus of the L-type voltage-gated calcium channel Ca(V)1.2 encodes a transcription factor. *Cell* **127**, 591-606.

Green, E. M., Barrett, C. F., Bultynck, G., Shamah, S. M., & Dolmetsch, R. E. (2007). The tumor suppressor eIF3e mediates calcium-dependent internalization of the L-type calcium channel CaV1.2. *Neuron* **55**, 615-632.

Grueter, C. E., Abiria, S. A., Dzhura, I., Wu, Y., Ham, A. J., Mohler, P. J., Anderson, M. E., & Colbran, R. J. (2006). L-type Ca²⁺ channel facilitation mediated by phosphorylation of the beta subunit by CaMKII. *Mol.Cell* **23**, 641-650.

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.

Gurnett, C. A., Felix, R., & Campbell, K. P. (1997). Extracellular interaction of the voltage-dependent Ca²⁺ channel alpha2delta and alpha1 subunits. *J.Biol.Chem.* **272**, 18508-18512.

Gussak, I., Brugada, P., Brugada, J., Wright, R. S., Kopecky, S. L., Chaitman, B. R., & Bjerregaard, P. (2000). Idiopathic short QT interval: a new clinical syndrome? *Cardiology* **94**, 99-102.

Haghighi, K., Gregory, K. N., & Kranias, E. G. (2004). Sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase-phospholamban interactions and dilated cardiomyopathy. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **322**, 1214-1222.

Haissaguerre, M., Derval, N., Sacher, F., Jesel, L., Deisenhofer, I., de Roy, L., Pasquie, J. L., Nogami, A., Babuty, D., Yli-Mayry, S., De Chillou, C., Scanu, P., Mabo, P., Matsuo, S., Probst, V., Le Scouarnec, S., Defaye, P., Schlaepfer, J., Rostock, T., Lacroix, D., Lamaison, D., Lavergne, T., Aizawa, Y., Englund, A., Anselme, F., O'Neill, M., Hocini, M., Lim, K. T., Knecht, S., Veenhuyzen, G. D., Bordachar, P., Chauvin, M., Jais, P., Coureau, G., Chene, G., Klein, G. J., &

Clementy, J. (2008). Sudden cardiac arrest associated with early repolarization. *N.Engl.J.Med.* **358**, 2016-2023.

Hakim, P., Gurung, I. S., Pedersen, T. H., Thresher, R., Brice, N., Lawrence, J., Grace, A. A., & Huang, C. L. (2008). Scn3b knockout mice exhibit abnormal ventricular electrophysiological properties. *Prog.Biophys.Mol.Biol.* **98**, 251-266.

Halling, D. B., Aracena-Parks, P., & Hamilton, S. L. (2005). Regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels by calmodulin. *Sci.STKE.* **2005**, re15.

Hartmann, H. A., Colom, L. V., Sutherland, M. L., & Noebels, J. L. (1999). Selective localization of cardiac SCN5A sodium channels in limbic regions of rat brain. *Nat.Neurosci.* **2**, 593-595.

Haufe, V., Camacho, J. A., Dumaine, R., Gunther, B., Bollensdorff, C., von Banchet, G. S., Benndorf, K., & Zimmer, T. (2005). Expression pattern of neuronal and skeletal muscle voltage-gated Na⁺ channels in the developing mouse heart. *J.Physiol* **564**, 683-696.

He, B. & Soderlund, D. M. (2010). Human embryonic kidney (HEK293) cells express endogenous voltage-gated sodium currents and Na^v 1.7 sodium channels. *Neurosci.Lett.* **469**, 268-272.

Hermida, J. S., Lemoine, J. L., Aoun, F. B., Jarry, G., Rey, J. L., & Quiret, J. C. (2000). Prevalence of the brugada syndrome in an apparently healthy population. *Am.J.Cardiol.* **86**, 91-94.

Hershberger, R. E., Parks, S. B., Kushner, J. D., Li, D., Ludwigsen, S., Jakobs, P., Nauman, D., Burgess, D., Partain, J., & Litt, M. (2008). Coding sequence mutations identified in MYH7, TNNT2, SCN5A, CSRFP3, LBD3, and TCAP from 313 patients with familial or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Clin.Transl.Sci.* **1**, 21-26.

Hilber, K., Sandtner, W., Zarrabi, T., Zebedin, E., Kudlacek, O., Fozzard, H. A., & Todt, H. (2005). Selectivity filter residues contribute unequally to pore stabilization in voltage-gated sodium channels. *Biochemistry* **44**, 13874-13882.

Hill, J. A. (2003). Electrical remodeling in cardiac hypertrophy. *Trends Cardiovasc.Med.* **13**, 316-322.

Holmqvist, M. H., Cao, J., Hernandez-Pineda, R., Jacobson, M. D., Carroll, K. I., Sung, M. A., Betty, M., Ge, P., Gilbride, K. J., Brown, M. E., Jurman, M. E., Lawson, D., Silos-Santiago, I., Xie, Y., Covarrubias, M., Rhodes, K. J., DiStefano, P. S., & An,

W. F. (2002). Elimination of fast inactivation in Kv4 A-type potassium channels by an auxiliary subunit domain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**, 1035-1040.

Hong, K., Brugada, J., Oliva, A., Berruezo-Sanchez, A., Potenza, D., Pollevick, G. D., Guerchicoff, A., Matsuo, K., Burashnikov, E., Dumaine, R., Towbin, J. A., Nesterenko, V., Brugada, P., Antzelevitch, C., & Brugada, R. (2004). Value of electrocardiographic parameters and ajmaline test in the diagnosis of Brugada syndrome caused by SCN5A mutations. *Circulation* **110**, 3023-3027.

Hong, K., Piper, D. R., Diaz-Valdecantos, A., Brugada, J., Oliva, A., Burashnikov, E., Santos-de-Soto, J., Grueso-Montero, J., Diaz-Enfante, E., Brugada, P., Sachse, F., Sanguinetti, M. C., & Brugada, R. (2005). De novo KCNQ1 mutation responsible for atrial fibrillation and short QT syndrome in utero. *Cardiovasc.Res.* **68**, 433-440.

Hu, D., Barajas-Martinez, H., Burashnikov, E., Springer, M., Wu, Y., Varro, A., Pfeiffer, R., Koopmann, T. T., Cordeiro, J. M., Guerchicoff, A., Pollevick, G. D., & Antzelevitch, C. (2009). A mutation in the beta 3 subunit of the cardiac sodium channel associated with Brugada ECG phenotype. *Circ.Cardiovasc.Genet.* **2**, 270-278.

Hu, D., Viskin, S., Oliva, A., Carrier, T., Cordeiro, J. M., Barajas-Martinez, H., Wu, Y., Burashnikov, E., Sicouri, S., Brugada, R., Rosso, R., Guerchicoff, A., Pollevick, G. D., & Antzelevitch, C. (2007). Novel mutation in the SCN5A gene associated with arrhythmic storm development during acute myocardial infarction. *Heart Rhythm.* **4**, 1072-1080.

Hudmon, A. & Schulman, H. (2002). Neuronal CA2+/calmodulin-dependent protein kinase II: the role of structure and autoregulation in cellular function. *Annu.Rev.Biochem.* **71**, 473-510.

Hugnot, J. P., Salinas, M., Lesage, F., Guillemare, E., de Weille, J., Heurteaux, C., Mattei, M. G., & Lazdunski, M. (1996). Kv8.1, a new neuronal potassium channel subunit with specific inhibitory properties towards Shab and Shaw channels. *EMBO J.* **15**, 3322-3331.

Huikuri, H. V., Castellanos, A., & Myerburg, R. J. (2001). Sudden death due to cardiac arrhythmias. *N.Engl.J.Med.* **345**, 1473-1482.

Hulme, J. T., Lin, T. W., Westenbroek, R. E., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (2003). Beta-adrenergic regulation requires direct anchoring of PKA to cardiac CaV1.2 channels via a leucine zipper interaction with A kinase-anchoring protein 15. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**, 13093-13098.

Hulme, J. T., Yarov-Yarovoy, V., Lin, T. W., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (2006). Autoinhibitory control of the CaV1.2 channel by its proteolytically processed distal C-terminal domain. *J.Physiol* **576**, 87-102.

Ieda, M., Fu, J. D., Delgado-Olguin, P., Vedantham, V., Hayashi, Y., Bruneau, B. G., & Srivastava, D. (2010). Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* **142**, 375-386.

Isacoff, E. Y., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (1990). Evidence for the formation of heteromultimeric potassium channels in *Xenopus* oocytes. *Nature* **345**, 530-534.

Isom, L. L., De Jongh, K. S., Patton, D. E., Reber, B. F., Offord, J., Charbonneau, H., Walsh, K., Goldin, A. L., & Catterall, W. A. (1992). Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel. *Science* **256**, 839-842.

Isom, L. L., Ragsdale, D. S., De Jongh, K. S., Westenbroek, R. E., Reber, B. F., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1995). Structure and function of the beta 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. *Cell* **83**, 433-442.

Iyer, V., Mazhari, R., & Winslow, R. L. (2004). A computational model of the human left-ventricular epicardial myocyte. *Biophys.J.* **87**, 1507-1525.

Jerng, H. H., Kunjilwar, K., & Pfaffinger, P. J. (2005). Multiprotein assembly of Kv4.2, KChIP3 and DPP10 produces ternary channel complexes with ISA-like properties. *J.Physiol* **568**, 767-788.

Jerng, H. H., Qian, Y., & Pfaffinger, P. J. (2004). Modulation of Kv4.2 channel expression and gating by dipeptidyl peptidase 10 (DPP10). *Biophys.J.* **87**, 2380-2396.

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

Jiang, C., Atkinson, D., Towbin, J. A., Splawski, I., Lehmann, M. H., Li, H., Timothy, K., Taggart, R. T., Schwartz, P. J., Vincent, G. M., & . (1994). Two long QT syndrome loci map to chromosomes 3 and 7 with evidence for further heterogeneity. *Nat.Genet.* **8**, 141-147.

Johnson, D. & Bennett, E. S. (2006). Isoform-specific effects of the beta2 subunit on voltage-gated sodium channel gating. *J.Biol.Chem.* **281**, 25875-25881.

Jouven, X. & Escande, D. (2006). [Sudden cardiac death: toward the identification of susceptibility genes]. *Arch.Mal Coeur Vaiss.* **99**, 806-812.

Jurevicius, J. & Fischmeister, R. (1997). Longitudinal distribution of Na⁺ and Ca²⁺ channels and beta-adrenoceptors on the sarcolemmal membrane of frog cardiomyocytes. *J.Physiol* **503 (Pt 3)**, 471-477.

Kaab, S. & Schulze-Bahr, E. (2005). Susceptibility genes and modifiers for cardiac arrhythmias. *Cardiovasc.Res.* **67**, 397-413.

Kallen, R. G., Sheng, Z. H., Yang, J., Chen, L. Q., Rogart, R. B., & Barchi, R. L. (1990). Primary structure and expression of a sodium channel characteristic of denervated and immature rat skeletal muscle. *Neuron* **4**, 233-242.

Kamb, A., Iverson, L. E., & Tanouye, M. A. (1987). Molecular characterization of Shaker, a Drosophila gene that encodes a potassium channel. *Cell* **50**, 405-413.

Kambouris, N. G., Nuss, H. B., Johns, D. C., Tomaselli, G. F., Marban, E., & Balsler, J. R. (1998). Phenotypic characterization of a novel long-QT syndrome mutation (R1623Q) in the cardiac sodium channel. *Circulation* **97**, 640-644.

Kameda, K., Fukao, M., Kobayashi, T., Tsutsuura, M., Nagashima, M., Yamada, Y., Yamashita, T., & Tohse, N. (2006). CSN5/Jab1 inhibits cardiac L-type Ca²⁺ channel activity through protein-protein interactions. *J.Mol.Cell Cardiol.* **40**, 562-569.

Kazen-Gillespie, K. A., Ragsdale, D. S., D'Andrea, M. R., Mattei, L. N., Rogers, K. E., & Isom, L. L. (2000). Cloning, localization, and functional expression of sodium channel beta1A subunits. *J.Biol.Chem.* **275**, 1079-1088.

Keating, M., Atkinson, D., Dunn, C., Timothy, K., Vincent, G. M., & Leppert, M. (1991). Linkage of a cardiac arrhythmia, the long QT syndrome, and the Harvey ras-1 gene. *Science* **252**, 704-706.

Kim, J., Ghosh, S., Liu, H., Tateyama, M., Kass, R. S., & Pitt, G. S. (2004). Calmodulin mediates Ca²⁺ sensitivity of sodium channels. *J.Biol.Chem.* **279**, 45004-45012.

Klugbauer, N., Lacinova, L., Marais, E., Hobom, M., & Hofmann, F. (1999). Molecular diversity of the calcium channel alpha2delta subunit. *J.Neurosci.* **19**, 684-691.

Ko, S. H., Lenkowski, P. W., Lee, H. C., Mounsey, J. P., & Patel, M. K. (2005). Modulation of Na(v)1.5 by beta1-- and beta3-subunit co-expression in mammalian cells. *Pflugers Arch.* **449**, 403-412.

Kong, W., Po, S., Yamagishi, T., Ashen, M. D., Stetten, G., & Tomaselli, G. F. (1998). Isolation and characterization of the human gene encoding Ito: further diversity by alternative mRNA splicing. *Am.J.Physiol* **275**, H1963-H1970.

Kontis, K. J., Rounaghi, A., & Goldin, A. L. (1997). Sodium channel activation gating is affected by substitutions of voltage sensor positive charges in all four domains. *J.Gen.Physiol* **110**, 391-401.

Krafte, D. S. & Volberg, W. A. (1992). Properties of endogenous voltage-dependent sodium currents in *Xenopus laevis* oocytes. *J.Neurosci.Methods* **43**, 189-193.

Kucera, J. P., Rohr, S., & Rudy, Y. (2002). Localization of sodium channels in intercalated disks modulates cardiac conduction. *Circ.Res.* **91**, 1176-1182.

Kuryshv, Y. A., Gudz, T. I., Brown, A. M., & Wible, B. A. (2000). KChAP as a chaperone for specific K(+) channels. *Am.J.Physiol Cell Physiol* **278**, C931-C941.

Kyndt, F., Probst, V., Potet, F., Demolombe, S., Chevallier, J. C., Baro, I., Moisan, J. P., Boisseau, P., Schott, J. J., Escande, D., & Le Marec, H. (2001). Novel SCN5A mutation leading either to isolated cardiac conduction defect or Brugada syndrome in a large French family. *Circulation* **104**, 3081-3086.

Lamhonwah, A. M., Olpin, S. E., Pollitt, R. J., Vianey-Saban, C., Divry, P., Guffon, N., Besley, G. T., Onizuka, R., De Meirleir, L. J., Cvitanovic-Sojat, L., Baric, I., Dionisi-Vici, C., Fumic, K., Maradin, M., & Tein, I. (2002). Novel OCTN2 mutations: no genotype-phenotype correlations: early carnitine therapy prevents cardiomyopathy. *Am.J.Med.Genet.* **111**, 271-284.

Lee, T. S., Karl, R., Moosmang, S., Lenhardt, P., Klugbauer, N., Hofmann, F., Kleppisch, T., & Welling, A. (2006). Calmodulin kinase II is involved in voltage-dependent facilitation of the L-type Cav1.2 calcium channel: Identification of the phosphorylation sites. *J.Biol.Chem.* **281**, 25560-25567.

Leyva, F. & Foley, P. W. (2008). Is cardiac resynchronisation therapy proarrhythmic? *Indian Pacing Electrophysiol.J.* **8**, 268-280.

Li, G. R., Feng, J., Yue, L., & Carrier, M. (1998). Transmural heterogeneity of action potentials and Ito1 in myocytes isolated from the human right ventricle. *Am.J.Physiol* **275**, H369-H377.

- Liao, P., Yong, T. F., Liang, M. C., Yue, D. T., & Soong, T. W. (2005). Splicing for alternative structures of Cav1.2 Ca²⁺ channels in cardiac and smooth muscles. *Cardiovasc.Res.* **68**, 197-203.
- Liu, C. J., Dib-Hajj, S. D., Renganathan, M., Cummins, T. R., & Waxman, S. G. (2003). Modulation of the cardiac sodium channel Nav1.5 by fibroblast growth factor homologous factor 1B. *J.Biol.Chem.* **278**, 1029-1036.
- Liu, C., Dib-Hajj, S. D., & Waxman, S. G. (2001). Fibroblast growth factor homologous factor 1B binds to the C terminus of the tetrodotoxin-resistant sodium channel rNav1.9a (NaN). *J.Biol.Chem.* **276**, 18925-18933.
- Liu, Q. Y. & Rosenberg, R. L. (1996). Activation and inhibition of reconstituted cardiac L-type calcium channels by palmitoyl-L-carnitine. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **228**, 252-258.
- London, B., Michalec, M., Mehdi, H., Zhu, X., Kerchner, L., Sanyal, S., Viswanathan, P. C., Pfahnl, A. E., Shang, L. L., Madhusudanan, M., Baty, C. J., Lagana, S., Aleong, R., Gutmann, R., Ackerman, M. J., McNamara, D. M., Weiss, R., & Dudley, S. C., Jr. (2007). Mutation in glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like gene (GPD1-L) decreases cardiac Na⁺ current and causes inherited arrhythmias. *Circulation* **116**, 2260-2268.
- Lopez-Santiago, L. F., Meadows, L. S., Ernst, S. J., Chen, C., Malhotra, J. D., McEwen, D. P., Speelman, A., Noebels, J. L., Maier, S. K., Lopatin, A. N., & Isom, L. L. (2007). Sodium channel Scn1b null mice exhibit prolonged QT and RR intervals. *J.Mol.Cell Cardiol.* **43**, 636-647.
- Lukas, A. & Antzelevitch, C. (1993). Differences in the electrophysiological response of canine ventricular epicardium and endocardium to ischemia. Role of the transient outward current. *Circulation* **88**, 2903-2915.
- Lundby, A. & Olesen, S. P. (2006). KCNE3 is an inhibitory subunit of the Kv4.3 potassium channel. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **346**, 958-967.
- MacKinnon, R. (1991). Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* **350**, 232-235.
- 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.

Makita, N., Bennett, P. B., Jr., & George, A. L., Jr. (1994). Voltage-gated Na⁺ channel beta 1 subunit mRNA expressed in adult human skeletal muscle, heart, and brain is encoded by a single gene. *J.Biol.Chem.* **269**, 7571-7578.

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

Mantegazza, M., Yu, F. H., Catterall, W. A., & Scheuer, T. (2001). Role of the C-terminal domain in inactivation of brain and cardiac sodium channels. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 15348-15353.

Martini, B., Nava, A., Thiene, G., Buja, G. F., Canciani, B., Scognamiglio, R., Daliento, L., & Dalla, V. S. (1989). Ventricular fibrillation without apparent heart disease: description of six cases. *Am.Heart J.* **118**, 1203-1209.

Matsuo, K., Akahoshi, M., Seto, S., & Yano, K. (2003). Disappearance of the Brugada-type electrocardiogram after surgical castration: a role for testosterone and an explanation for the male preponderance. *Pacing Clin.Electrophysiol.* **26**, 1551-1553.

Mazzone, A., Strege, P. R., Tester, D. J., Bernard, C. E., Faulkner, G., De Giorgio, R., Makielski, J. C., Stanghellini, V., Gibbons, S. J., Ackerman, M. J., & Farrugia, G. (2008). A mutation in telethonin alters Nav1.5 function. *J.Biol.Chem.* **283**, 16537-16544.

Medeiros-Domingo, A., Kaku, T., Tester, D. J., Iturralde-Torres, P., Itty, A., Ye, B., Valdivia, C., Ueda, K., Canizales-Quinteros, S., Tusie-Luna, M. T., Makielski, J. C., & Ackerman, M. J. (2007). SCN4B-encoded sodium channel beta4 subunit in congenital long-QT syndrome. *Circulation* **116**, 134-142.

Meleggh, B., Bene, J., Mogyorosy, G., Havasi, V., Komlosi, K., Pajor, L., Olah, E., Kispal, G., Sumegi, B., & Mehes, K. (2004). Phenotypic manifestations of the OCTN2 V295X mutation: sudden infant death and carnitine-responsive cardiomyopathy in Roma families. *Am.J.Med.Genet.A* **131**, 121-126.

Meregalli, P. G., Wilde, A. A., & Tan, H. L. (2005). Pathophysiological mechanisms of Brugada syndrome: depolarization disorder, repolarization disorder, or more? *Cardiovasc.Res.* **67**, 367-378.

Messner, D. J. & Catterall, W. A. (1985). The sodium channel from rat brain. Separation and characterization of subunits. *J.Biol.Chem.* **260**, 10597-10604.

Meyers, M. B., Fischer, A., Sun, Y. J., Lopes, C. M., Rohacs, T., Nakamura, T. Y., Zhou, Y. Y., Lee, P. C., Altschuld, R. A., McCune, S. A., Coetzee, W. A., & Fishman, G. I. (2003). Sorcin regulates excitation-contraction coupling in the heart. *J.Biol.Chem.* **278**, 28865-28871.

Meyers, M. B., Puri, T. S., Chien, A. J., Gao, T., Hsu, P. H., Hosey, M. M., & Fishman, G. I. (1998). Sorcin associates with the pore-forming subunit of voltage-dependent L-type Ca²⁺ channels. *J.Biol.Chem.* **273**, 18930-18935.

Mikami, A., Imoto, K., Tanabe, T., Niidome, T., Mori, Y., Takeshima, H., Narumiya, S., & Numa, S. (1989). Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature* **340**, 230-233.

Milani, D., Malgaroli, A., Guidolin, D., Fasolato, C., Skaper, S. D., Meldolesi, J., & Pozzan, T. (1990). Ca²⁺ channels and intracellular Ca²⁺ stores in neuronal and neuroendocrine cells. *Cell Calcium* **11**, 191-199.

Miyazaki, T., Mitamura, H., Miyoshi, S., Soejima, K., Aizawa, Y., & Ogawa, S. (1996). Autonomic and antiarrhythmic drug modulation of ST segment elevation in patients with Brugada syndrome. *J.Am.Coll.Cardiol.* **27**, 1061-1070.

Mohler, P. J., Rivolta, I., Napolitano, C., Lemaillet, G., Lambert, S., Priori, S. G., & Bennett, V. (2004). Nav1.5 E1053K mutation causing Brugada syndrome blocks binding to ankyrin-G and expression of Nav1.5 on the surface of cardiomyocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**, 17533-17538.

Mohler, P. J., Schott, J. J., Gramolini, A. O., Dilly, K. W., Guatimosim, S., duBell, W. H., Song, L. S., Haurogne, K., Kyndt, F., Ali, M. E., Rogers, T. B., Lederer, W. J., Escande, D., Le Marec, H., & Bennett, V. (2003). Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature* **421**, 634-639.

Morales, A., Painter, T., Li, R., Siegfried, J. D., Li, D., Norton, N., & Hershberger, R. E. (2010). Rare variant mutations in pregnancy-associated or peripartum cardiomyopathy. *Circulation* **121**, 2176-2182.

Moran, O., Nizzari, M., & Conti, F. (2000). Endogenous expression of the beta1A sodium channel subunit in HEK-293 cells. *FEBS Lett.* **473**, 132-134.

Moretti, A., Bellin, M., Welling, A., Jung, C. B., Lam, J. T., Bott-Flugel, L., Dorn, T., Goedel, A., Hohnke, C., Hofmann, F., Seyfarth, M., Sinnecker, D., Schomig, A., & Laugwitz, K. L. (2010). Patient-Specific Induced Pluripotent Stem-Cell Models for Long-QT Syndrome. *N.Engl.J.Med.*

Morgan, K., Stevens, E. B., Shah, B., Cox, P. J., Dixon, A. K., Lee, K., Pinnock, R. D., Hughes, J., Richardson, P. J., Mizuguchi, K., & Jackson, A. P. (2000). beta 3: an additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 2308-2313.

Morgans, C. W., Gaughwin, P., & Maleszka, R. (2001). Expression of the alpha1F calcium channel subunit by photoreceptors in the rat retina. *Mol.Vis.* **7**, 202-209.

Moriya, M., Seto, S., Yano, K., & Akahoshi, M. (2007). Two cases of short QT interval. *Pacing Clin.Electrophysiol.* **30**, 1522-1526.

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

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.

Naccarelli, G. V. & Antzelevitch, C. (2001). The Brugada syndrome: clinical, genetic, cellular, and molecular abnormalities. *Am.J.Med.* **110**, 573-581.

Nadal, M. S., Ozaita, A., Amarillo, Y., Vega-Saenz, d. M., Ma, Y., Mo, W., Goldberg, E. M., Misumi, Y., Ikehara, Y., Neubert, T. A., & Rudy, B. (2003). The CD26-related dipeptidyl aminopeptidase-like protein DPPX is a critical component of neuronal A-type K⁺ channels. *Neuron* **37**, 449-461.

Napolitano, C. & Priori, S. G. (2002). Genetics of ventricular tachycardia. *Curr.Opin.Cardiol.* **17**, 222-228.

Nowycky, M. C., Fox, A. P., & Tsien, R. W. (1985). Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* **316**, 440-443.

Olson, T. M., Michels, V. V., Ballew, J. D., Reyna, S. P., Karst, M. L., Herron, K. J., Horton, S. C., Rodeheffer, R. J., & Anderson, J. L. (2005). Sodium channel mutations and susceptibility to heart failure and atrial fibrillation. *JAMA* **293**, 447-454.

OSHER, H. L. & WOLFF, L. (1953). Electrocardiographic pattern simulating acute myocardial injury. *Am.J.Med.Sci.* **226**, 541-545.

Ou, Y., Strege, P., Miller, S. M., Makielski, J., Ackerman, M., Gibbons, S. J., & Farrugia, G. (2003). Syntrophin gamma 2 regulates SCN5A gating by a PDZ domain-mediated interaction. *J.Biol.Chem.* **278**, 1915-1923.

Papazian, D. M., Schwarz, T. L., Tempel, B. L., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (1987). Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science* **237**, 749-753.

Parent, L. & Gopalakrishnan, M. (1995). Glutamate substitution in repeat IV alters divalent and monovalent cation permeation in the heart Ca²⁺ channel. *Biophys.J.* **69**, 1801-1813.

Passman, R. & Kadish, A. (2007). Sudden death prevention with implantable devices. *Circulation* **116**, 561-571.

Peterson, B. Z., DeMaria, C. D., Adelman, J. P., & Yue, D. T. (1999). Calmodulin is the Ca²⁺ sensor for Ca²⁺-dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron* **22**, 549-558.

Pitt, G. S., Zuhlke, R. D., Hudmon, A., Schulman, H., Reuter, H., & Tsien, R. W. (2001). Molecular basis of calmodulin tethering and Ca²⁺-dependent inactivation of L-type Ca²⁺ channels. *J.Biol.Chem.* **276**, 30794-30802.

Pons, R., Carrozzo, R., Tein, I., Walker, W. F., Addonizio, L. J., Rhead, W., Miranda, A. F., Dimauro, S., & De Vivo, D. C. (1997). Deficient muscle carnitine transport in primary carnitine deficiency. *Pediatr.Res.* **42**, 583-587.

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., Napolitano, C., Schwartz, P. J., Bloise, R., Crotti, L., & Ronchetti, E. (2000). The elusive link between LQT3 and Brugada syndrome: the role of flecainide challenge. *Circulation* **102**, 945-947.

Priori, S. G., Pandit, S. V., Rivolta, I., Berenfeld, O., Ronchetti, E., Dhamoon, A., Napolitano, C., Anumonwo, J., di Barletta, M. R., Gudapakkam, S., Bosi, G., Stramba-Badiale, M., & Jalife, J. (2005). A novel form of short QT syndrome (SQT3) is caused by a mutation in the KCNJ2 gene. *Circ.Res.* **96**, 800-807.

Probst, V., Allouis, M., Sacher, F., Pattier, S., Babuty, D., Mabo, P., Mansourati, J., Victor, J., Nguyen, J. M., Schott, J. J., Boisseau, P., Escande, D., & Le Marec, H.

(2006). Progressive cardiac conduction defect is the prevailing phenotype in carriers of a Brugada syndrome SCN5A mutation. *J.Cardiovasc.Electrophysiol.* **17**, 270-275.

Probst, V., Wilde, A. A., Barc, J., Sacher, F., Babuty, D., Mabo, P., Mansourati, J., Le Scouarnec, S., Kyndt, F., Le Caignec, C., Guicheney, P., Gouas, L., Albuissou, J., Meregalli, P. G., Le Marec, H., Tan, H. L., & Schott, J. J. (2009). SCN5A mutations and the role of genetic background in the pathophysiology of Brugada syndrome. *Circ.Cardiovasc.Genet.* **2**, 552-557.

Purcell, S. M., Wray, N. R., Stone, J. L., Visscher, P. M., O'Donovan, M. C., Sullivan, P. F., & Sklar, P. (2009). Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder. *Nature* **460**, 748-752.

Qin, N., D'Andrea, M. R., Lubin, M. L., Shafae, N., Codd, E. E., & Correa, A. M. (2003). Molecular cloning and functional expression of the human sodium channel beta1B subunit, a novel splicing variant of the beta1 subunit. *Eur.J.Biochem.* **270**, 4762-4770.

Qin, N., Olcese, R., Bransby, M., Lin, T., & Birnbaumer, L. (1999). Ca²⁺-induced inhibition of the cardiac Ca²⁺ channel depends on calmodulin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 2435-2438.

Qu, Y., Isom, L. L., Westenbroek, R. E., Rogers, J. C., Tanada, T. N., McCormick, K. A., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1995). Modulation of cardiac Na⁺ channel expression in *Xenopus* oocytes by beta 1 subunits. *J.Biol.Chem.* **270**, 25696-25701.

Radicke, S., Cotella, D., Graf, E. M., Banse, U., Jost, N., Varro, A., Tseng, G. N., Ravens, U., & Wettwer, E. (2006). Functional modulation of the transient outward current I_{to} by KCNE beta-subunits and regional distribution in human non-failing and failing hearts. *Cardiovasc.Res.* **71**, 695-703.

Radicke, S., Cotella, D., Graf, E. M., Ravens, U., & Wettwer, E. (2005). Expression and function of dipeptidyl-aminopeptidase-like protein 6 as a putative beta-subunit of human cardiac transient outward current encoded by Kv4.3. *J.Physiol* **565**, 751-756.

Rahbeeni, Z., Vaz, F. M., Al Hussein, K., Bucknall, M. P., Ruitter, J., Wanders, R. J., & Rashed, M. S. (2002). Identification of two novel mutations in OCTN2 from two Saudi patients with systemic carnitine deficiency. *J.Inherit.Metab Dis.* **25**, 363-369.

Ravindran, A., Lao, Q. Z., Harry, J. B., Abrahimi, P., Kobrinsky, E., & Soldatov, N. M. (2008). Calmodulin-dependent gating of Ca_v1.2 calcium channels in the absence of Ca_vbeta subunits. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **105**, 8154-8159.

Rebouche, C. J. (1992). Carnitine function and requirements during the life cycle. *FASEB J.* **6**, 3379-3386.

Remme, C. A., Verkerk, A. O., Nuyens, D., van Ginneken, A. C., van Brunschot, S., Belterman, C. N., Wilders, R., van Roon, M. A., Tan, H. L., Wilde, A. A., Carmeliet, P., de Bakker, J. M., Veldkamp, M. W., & Bezzina, C. R. (2006). Overlap syndrome of cardiac sodium channel disease in mice carrying the equivalent mutation of human SCN5A-1795insD. *Circulation* **114**, 2584-2594.

Richards, M. W., Leroy, J., Pratt, W. S., & Dolphin, A. C. (2007). The HOOK-domain between the SH3 and the GK domains of Cavbeta subunits contains key determinants controlling calcium channel inactivation. *Channels (Austin.)* **1**, 92-101.

Richter, S., Sarkozy, A., Paparella, G., Henkens, S., Boussy, T., Chierchia, G. B., Brugada, R., Brugada, J., & Brugada, P. (2010). Number of electrocardiogram leads displaying the diagnostic coved-type pattern in Brugada syndrome: a diagnostic consensus criterion to be revised. *Eur.Heart J.*

Rougier, J. S., van Bemmelen, M. X., Bruce, M. C., Jespersen, T., Gavillet, B., Apotheloz, F., Cordonier, S., Staub, O., Rotin, D., & Abriel, H. (2005). Molecular determinants of voltage-gated sodium channel regulation by the Nedd4/Nedd4-like proteins. *Am.J.Physiol Cell Physiol* **288**, C692-C701.

Ruan, Y., Liu, N., & Priori, S. G. (2009). Sodium channel mutations and arrhythmias. *Nat.Rev.Cardiol.* **6**, 337-348.

Ruppersberg, J. P., Schroter, K. H., Sakmann, B., Stocker, M., Sewing, S., & Pongs, O. (1990). Heteromultimeric channels formed by rat brain potassium-channel proteins. *Nature* **345**, 535-537.

Salinas, M., Duprat, F., Heurteaux, C., Hugnot, J. P., & Lazdunski, M. (1997). New modulatory alpha subunits for mammalian Shab K⁺ channels. *J.Biol.Chem.* **272**, 24371-24379.

Sato, P. Y., Musa, H., Coombs, W., Guerrero-Serna, G., Patino, G. A., Taffet, S. M., Isom, L. L., & Delmar, M. (2009). Loss of plakophilin-2 expression leads to decreased sodium current and slower conduction velocity in cultured cardiac myocytes. *Circ.Res.* **105**, 523-526.

Saud, Z. A., Minobe, E., Wang, W. Y., Han, D. Y., Horiuchi, M., Hao, L. Y., & Kameyama, M. (2007). Calpastatin binds to a calmodulin-binding site of cardiac Cav1.2 Ca²⁺ channels. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **364**, 372-377.

Schimpf, R., Borggrefe, M., & Wolpert, C. (2008). Clinical and molecular genetics of the short QT syndrome. *Curr.Opin.Cardiol.* **23**, 192-198.

Schott, J. J., Alshinawi, C., Kyndt, F., Probst, V., Hoorntje, T. M., Hulsbeek, M., Wilde, A. A., Escande, D., Mannens, M. M., & Le Marec, H. (1999). Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A. *Nat.Genet.* **23**, 20-21.

Schott, J. J., Charpentier, F., Peltier, S., Foley, P., Drouin, E., Bouhour, J. B., Donnelly, P., Vergnaud, G., Bachner, L., Moisan, J. P., & . (1995). Mapping of a gene for long QT syndrome to chromosome 4q25-27. *Am.J.Hum.Genet.* **57**, 1114-1122.

Schultz, D., Mikala, G., Yatani, A., Engle, D. B., Iles, D. E., Segers, B., Sinke, R. J., Weghuis, D. O., Klockner, U., Wakamori, M., & . (1993). Cloning, chromosomal localization, and functional expression of the alpha 1 subunit of the L-type voltage-dependent calcium channel from normal human heart. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**, 6228-6232.

Scriven, D. R., Dan, P., & Moore, E. D. (2000). Distribution of proteins implicated in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Biophys.J.* **79**, 2682-2691.

Sergeant, G. P., Ohya, S., Reihill, J. A., Perrino, B. A., Amberg, G. C., Imaizumi, Y., Horowitz, B., Sanders, K. M., & Koh, S. D. (2005). Regulation of Kv4.3 currents by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Am.J.Physiol Cell Physiol* **288**, C304-C313.

Shen, N. V. & Pfaffinger, P. J. (1995). Molecular recognition and assembly sequences involved in the subfamily-specific assembly of voltage-gated K⁺ channel subunit proteins. *Neuron* **14**, 625-633.

Shibata, R., Misonou, H., Campomanes, C. R., Anderson, A. E., Schrader, L. A., Doliveira, L. C., Carroll, K. I., Sweatt, J. D., Rhodes, K. J., & Trimmer, J. S. (2003). A fundamental role for KChIPs in determining the molecular properties and trafficking of Kv4.2 potassium channels. *J.Biol.Chem.* **278**, 36445-36454.

Smits, J. P., Eckardt, L., Probst, V., Bezzina, C. R., Schott, J. J., Remme, C. A., Haverkamp, W., Breithardt, G., Escande, D., Schulze-Bahr, E., LeMarec, H., & Wilde, A. A. (2002). Genotype-phenotype relationship in Brugada syndrome: electrocardiographic features differentiate SCN5A-related patients from non-SCN5A-related patients. *J.Am.Coll.Cardiol.* **40**, 350-356.

Snutch, T. P., Leonard, J. P., Gilbert, M. M., Lester, H. A., & Davidson, N. (1990). Rat brain expresses a heterogeneous family of calcium channels. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **87**, 3391-3395.

Snyders, D. J. (1999). Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc.Res.* **42**, 377-390.

Soldatov, N. M. (1994). Genomic structure of human L-type Ca²⁺ channel. *Genomics* **22**, 77-87.

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.

Stanley, C. A. (1987). New genetic defects in mitochondrial fatty acid oxidation and carnitine deficiency. *Adv.Pediatr.* **34**, 59-88.

Stanley, C. A., DeLeeuw, S., Coates, P. M., Vianey-Liaud, C., Divry, P., Bonnefont, J. P., Saudubray, J. M., Haymond, M., Trefz, F. K., Breningstall, G. N., & . (1991). Chronic cardiomyopathy and weakness or acute coma in children with a defect in carnitine uptake. *Ann.Neurol.* **30**, 709-716.

Stephens, G. J., Page, K. M., Bogdanov, Y., & Dolphin, A. C. (2000b). The alpha1B Ca²⁺ channel amino terminus contributes determinants for beta subunit-mediated voltage-dependent inactivation properties. *J.Physiol* **525 Pt 2**, 377-390.

Stephens, G. J., Page, K. M., Bogdanov, Y., & Dolphin, A. C. (2000a). The alpha1B Ca²⁺ channel amino terminus contributes determinants for beta subunit-mediated voltage-dependent inactivation properties. *J.Physiol* **525 Pt 2**, 377-390.

Stix, G., Bella, P. D., Carbucicchio, C., & Schmidinger, H. (2000). Spatial and temporal heterogeneity of depolarization and repolarization may complicate implantable cardioverter defibrillator therapy in Brugada syndrome. *J.Cardiovasc.Electrophysiol.* **11**, 516-521.

Stuhmer, W., Conti, F., Suzuki, H., Wang, X. D., Noda, M., Yahagi, N., Kubo, H., & Numa, S. (1989). Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* **339**, 597-603.

Takahashi, K. & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676.

Takahashi, M., Seagar, M. J., Jones, J. F., Reber, B. F., & Catterall, W. A. (1987). Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **84**, 5478-5482.

Takehara, N., Makita, N., Kawabe, J., Sato, N., Kawamura, Y., Kitabatake, A., & Kikuchi, K. (2004). A cardiac sodium channel mutation identified in Brugada syndrome associated with atrial standstill. *J.Intern.Med.* **255**, 137-142.

Tamai, I., Ohashi, R., Nezu, J., Yabuuchi, H., Oku, A., Shimane, M., Sai, Y., & Tsuji, A. (1998). Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2. *J.Biol.Chem.* **273**, 20378-20382.

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

Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K., Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T., & Numa, S. (1987). Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* **328**, 313-318.

Tang, Z., Scherer, P. E., Okamoto, T., Song, K., Chu, C., Kohtz, D. S., Nishimoto, I., Lodish, H. F., & Lisanti, M. P. (1996). Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J.Biol.Chem.* **271**, 2255-2261.

Tein, I. (2003). Carnitine transport: pathophysiology and metabolism of known molecular defects. *J.Inherit.Metab Dis.* **26**, 147-169.

Tein, I., De Vivo, D. C., Bierman, F., Pulver, P., De Meirleir, L. J., Cvitanovic-Sojat, L., Pagon, R. A., Bertini, E., Dionisi-Vici, C., Servidei, S., & . (1990). Impaired skin fibroblast carnitine uptake in primary systemic carnitine deficiency manifested by childhood carnitine-responsive cardiomyopathy. *Pediatr.Res.* **28**, 247-255.

Terrenoire, C., Clancy, C. E., Cormier, J. W., Sampson, K. J., & Kass, R. S. (2005). Autonomic control of cardiac action potentials: role of potassium channel kinetics in response to sympathetic stimulation. *Circ.Res.* **96**, e25-e34.

Tessier, S., Karczewski, P., Krause, E. G., Pansard, Y., Acar, C., Lang-Lazdunski, M., Mercadier, J. J., & Hatem, S. N. (1999). Regulation of the transient outward K(+) current by Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinases II in human atrial myocytes. *Circ.Res.* **85**, 810-819.

Thomsen, M. B., Foster, E., Nguyen, K. H., & Sosunov, E. A. (2009a). Transcriptional and electrophysiological consequences of KChIP2-mediated regulation of CaV1.2. *Channels (Austin.)* **3**, 308-310.

Thomsen, M. B., Wang, C., Ozgen, N., Wang, H. G., Rosen, M. R., & Pitt, G. S. (2009b). Accessory subunit KChIP2 modulates the cardiac L-type calcium current. *Circ.Res.* **104**, 1382-1389.

Ueda, K., Valdivia, C., Medeiros-Domingo, A., Tester, D. J., Vatta, M., Farrugia, G., Ackerman, M. J., & Makielski, J. C. (2008). Syntrophin mutation associated with long QT syndrome through activation of the nNOS-SCN5A macromolecular complex. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **105**, 9355-9360.

Valdivia, C. R., Nagatomo, T., & Makielski, J. C. (2002). Late Na currents affected by alpha subunit isoform and beta1 subunit co-expression in HEK293 cells. *J.Mol.Cell Cardiol.* **34**, 1029-1039.

Valdivia, C. R., Ueda, K., Ackerman, M. J., & Makielski, J. C. (2009). GPD1L links redox state to cardiac excitability by PKC-dependent phosphorylation of the sodium channel SCN5A. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **297**, H1446-H1452.

van Bemmelen, M. X., Rougier, J. S., Gavillet, B., Apotheloz, F., Daidie, D., Tateyama, M., Rivolta, I., Thomas, M. A., Kass, R. S., Staub, O., & Abriel, H. (2004). Cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5 is regulated by Nedd4-2 mediated ubiquitination. *Circ.Res.* **95**, 284-291.

Van Norstrand, D. W., Valdivia, C. R., Tester, D. J., Ueda, K., London, B., Makielski, J. C., & Ackerman, M. J. (2007). Molecular and functional characterization of novel glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like gene (GPD1-L) mutations in sudden infant death syndrome. *Circulation* **116**, 2253-2259.

Van Petegem, F., Duderstadt, K. E., Clark, K. A., Wang, M., & Minor, D. L., Jr. (2008). Alanine-scanning mutagenesis defines a conserved energetic hotspot in the CaValpha1 AID-CaVbeta interaction site that is critical for channel modulation. *Structure.* **16**, 280-294.

Vanscoy, L. L., Blackman, S. M., Collaco, J. M., Bowers, A., Lai, T., Naughton, K., Algire, M., McWilliams, R., Beck, S., Hoover-Fong, J., Hamosh, A., Cutler, D., & Cutting, G. R. (2007). Heritability of lung disease severity in cystic fibrosis. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **175**, 1036-1043.

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

Vatta, M., Ackerman, M. J., Ye, B., Makielski, J. C., Ughanze, E. E., Taylor, E. W., Tester, D. J., Balijepalli, R. C., Foell, J. D., Li, Z., Kamp, T. J., & Towbin, J. A. (2006).

Mutant caveolin-3 induces persistent late sodium current and is associated with long-QT syndrome. *Circulation* **114**, 2104-2112.

Viskin, S. (2009). The QT interval: too long, too short or just right. *Heart Rhythm*. **6**, 711-715.

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

Wang, D. W., Desai, R. R., Crotti, L., Arnestad, M., Insolia, R., Pedrazzini, M., Ferrandi, C., Vege, A., Rognum, T., Schwartz, P. J., & George, A. L., Jr. (2007a). Cardiac sodium channel dysfunction in sudden infant death syndrome. *Circulation* **115**, 368-376.

Wang, H., Yan, Y., Liu, Q., Huang, Y., Shen, Y., Chen, L., Chen, Y., Yang, Q., Hao, Q., Wang, K., & Chai, J. (2007b). Structural basis for modulation of Kv4 K⁺ channels by auxiliary KChIP subunits. *Nat.Neurosci.* **10**, 32-39.

Wang, J., Ou, S. W., Wang, Y. J., Zong, Z. H., Lin, L., Kameyama, M., & Kameyama, A. (2008). New variants of Nav1.5/SCN5A encode Na⁺ channels in the brain. *J.Neurogenet.* **22**, 57-75.

Wang, Q., Li, Z., Shen, J., & Keating, M. T. (1996). Genomic organization of the human SCN5A gene encoding the cardiac sodium channel. *Genomics* **34**, 9-16.

Watanabe, H., Darbar, D., Kaiser, D. W., Jiramongkolchai, K., Chopra, S., Donahue, B. S., Kannankeril, P. J., & Roden, D. M. (2009). Mutations in sodium channel beta1- and beta2-subunits associated with atrial fibrillation. *Circ.Arrhythm.Electrophysiol.* **2**, 268-275.

Watanabe, H., Koopmann, T. T., Le Scouarnec, S., Yang, T., Ingram, C. R., Schott, J. J., Demolombe, S., Probst, V., Anselme, F., Escande, D., Wiesfeld, A. C., Pfeufer, A., Kaab, S., Wichmann, H. E., Hasdemir, C., Aizawa, Y., Wilde, A. A., Roden, D. M., & Bezzina, C. R. (2008). Sodium channel beta1 subunit mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans. *J.Clin.Invest* **118**, 2260-2268.

Weiss, R., Barmada, M. M., Nguyen, T., Seibel, J. S., Cavlovich, D., Kornblit, C. A., Angelilli, A., Villanueva, F., McNamara, D. M., & London, B. (2002). Clinical and molecular heterogeneity in the Brugada syndrome: a novel gene locus on chromosome 3. *Circulation* **105**, 707-713.

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.

Wever, E. F. & Robles de Medina, E. O. (2004). Sudden death in patients without structural heart disease. *J.Am.Coll.Cardiol.* **43**, 1137-1144.

Wibo, M., Bravo, G., & Godfraind, T. (1991). Postnatal maturation of excitation-contraction coupling in rat ventricle in relation to the subcellular localization and surface density of 1,4-dihydropyridine and ryanodine receptors. *Circ.Res.* **68**, 662-673.

Williams, S. R., Toth, T. I., Turner, J. P., Hughes, S. W., & Crunelli, V. (1997). The 'window' component of the low threshold Ca²⁺ current produces input signal amplification and bistability in cat and rat thalamocortical neurones. *J.Physiol* **505 (Pt 3)**, 689-705.

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

Wolpert, C., Echternach, C., Veltmann, C., Antzelevitch, C., Thomas, G. P., Spehl, S., Streitner, F., Kuschyk, J., Schimpf, R., Haase, K. K., & Borggrefe, M. (2005a). Intravenous drug challenge using flecainide and ajmaline in patients with Brugada syndrome. *Heart Rhythm.* **2**, 254-260.

Wolpert, C., Schimpf, R., Giustetto, C., Antzelevitch, C., Cordeiro, J., Dumaine, R., Brugada, R., Hong, K., Bauersfeld, U., Gaita, F., & Borggrefe, M. (2005b). Further insights into the effect of quinidine in short QT syndrome caused by a mutation in HERG. *J.Cardiovasc.Electrophysiol.* **16**, 54-58.

Wu, L., Yong, S. L., Fan, C., Ni, Y., Yoo, S., Zhang, T., Zhang, X., Obejero-Paz, C. A., Rho, H. J., Ke, T., Szafranski, P., Jones, S. W., Chen, Q., & Wang, Q. K. (2008). Identification of a new co-factor, MOG1, required for the full function of cardiac sodium channel Nav 1.5. *J.Biol.Chem.* **283**, 6968-6978.

Wu, X., Prasad, P. D., Leibach, F. H., & Ganapathy, V. (1998). cDNA sequence, transport function, and genomic organization of human OCTN2, a new member of the organic cation transporter family. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **246**, 589-595.

Xu, J. J., Hao, L. Y., Kameyama, A., & Kameyama, M. (2004). Calmodulin reverses rundown of L-type Ca(2+) channels in guinea pig ventricular myocytes. *Am.J.Physiol Cell Physiol* **287**, C1717-C1724.

Yamagishi, T., Janecki, M., Marban, E., & Tomaselli, G. F. (1997). Topology of the P segments in the sodium channel pore revealed by cysteine mutagenesis. *Biophys.J.* **73**, 195-204.

Yan, G. X. & Antzelevitch, C. (1999). Cellular basis for the Brugada syndrome and other mechanisms of arrhythmogenesis associated with ST-segment elevation. *Circulation* **100**, 1660-1666.

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.

Yokokawa, M., Noda, T., Okamura, H., Satomi, K., Suyama, K., Kurita, T., Aihara, N., Kamakura, S., & Shimizu, W. (2007). Comparison of long-term follow-up of electrocardiographic features in Brugada syndrome between the SCN5A-positive probands and the SCN5A-negative probands. *Am.J.Cardiol.* **100**, 649-655.

Yoon, J. Y., Ho, W. K., Kim, S. T., & Cho, H. (2009). Constitutive CaMKII activity regulates Na⁺ channel in rat ventricular myocytes. *J.Mol.Cell Cardiol.* **47**, 475-484.

Young, K. A. & Caldwell, J. H. (2005). Modulation of skeletal and cardiac voltage-gated sodium channels by calmodulin. *J.Physiol* **565**, 349-370.

Yu, F. H., Westenbroek, R. E., Silos-Santiago, I., McCormick, K. A., Lawson, D., Ge, P., Ferreira, H., Lilly, J., DiStefano, P. S., Catterall, W. A., Scheuer, T., & Curtis, R. (2003). Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2. *J.Neurosci.* **23**, 7577-7585.

Zagha, E., Ozaita, A., Chang, S. Y., Nadal, M. S., Lin, U., Saganich, M. J., McCormack, T., Akinsanya, K. O., Qi, S. Y., & Rudy, B. (2005). DPP10 modulates Kv4-mediated A-type potassium channels. *J.Biol.Chem.* **280**, 18853-18861.

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.

Zhao, B., Rassendren, F., Kaang, B. K., Furukawa, Y., Kubo, T., & Kandel, E. R. (1994). A new class of noninactivating K⁺ channels from aplysia capable of contributing to the resting potential and firing patterns of neurons. *Neuron* **13**, 1205-1213.

Zhou, H., Kim, S. A., Kirk, E. A., Tippens, A. L., Sun, H., Haeseleer, F., & Lee, A. (2004). Ca²⁺-binding protein-1 facilitates and forms a postsynaptic complex with Cav1.2 (L-type) Ca²⁺ channels. *J.Neurosci.* **24**, 4698-4708.

Zhou, H., Yu, K., McCoy, K. L., & Lee, A. (2005). Molecular mechanism for divergent regulation of Cav1.2 Ca²⁺ channels by calmodulin and Ca²⁺-binding protein-1. *J.Biol.Chem.* **280**, 29612-29619.

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

Zhu, X. R., Wulf, A., Schwarz, M., Isbrandt, D., & Pongs, O. (1999). Characterization of human Kv4.2 mediating a rapidly-inactivating transient voltage-sensitive K⁺ current. *Receptors.Channels* **6**, 387-400.

Ziane, R., Huang, H., Moghadaszadeh, B., Beggs, A. H., Levesque, G., & Chahine, M. (2010). Cell membrane expression of cardiac sodium channel Na(v)1.5 is modulated by alpha-actinin-2 interaction. *Biochemistry* **49**, 166-178.

Zimmer, T., Biskup, C., Bollensdorff, C., & Benndorf, K. (2002). The beta1 subunit but not the beta2 subunit colocalizes with the human heart Na⁺ channel (hH1) already within the endoplasmic reticulum. *J.Membr.Biol.* **186**, 13-21.

Zimmer, T. & Surber, R. (2008). SCN5A channelopathies--an update on mutations and mechanisms. *Prog.Biophys.Mol.Biol.* **98**, 120-136.

Zuhlke, R. D. & Reuter, H. (1998). Ca²⁺-sensitive inactivation of L-type Ca²⁺ channels depends on multiple cytoplasmic amino acid sequences of the alpha1C subunit. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 3287-3294.

MORT SUBITE ET COMPLEXES MOLECULAIRES DES CANAUX IONIQUES CARDIAQUES

L'activité électrique cardiaque est le résultat du fonctionnement de multiples canaux ioniques responsables des différents courants. L'altération d'origine génétique de certains de ces canaux, ou de leurs partenaires régulateurs est responsable de troubles du rythme conduisant à la mort subite.

I. Le canal $Na_v1.5$: par une approche gène candidat, le variant R222Q de $Na_v1.5$ a été identifié chez les individus atteints d'une arythmie cardiaque nouvellement décrite, la tachycardie multifocale automatique du Purkinje. L'étude fonctionnelle de ce variant montre un gain de fonction du canal $Na_v1.5$ qui, introduite dans un modèle multicellulaire informatique, provoque de fortes modifications de l'activité électrique des cellules de Purkinje à l'origine d'extrasystoles ventriculaires.

II. Le canal $Ca_v1.2$: le criblage d'une cohorte de patients atteints du syndrome du QT court a permis d'identifier le variant A223P du canal $Ca_v1.2$ chez un patient. Le *propositus* présente, en plus du variant A223P, des variants hétérozygotes composites du transporteur de la carnitine OCTN2. L'étude fonctionnelle du variant A223P a permis de mettre en évidence une perte de fonction du canal $Ca_v1.2$. Il reste cependant à comprendre le mécanisme mis en jeu et l'implication de la déficience en carnitine dans ce syndrome.

III. La protéine DPPX : le séquençage du génome d'un *propositus* atteint du syndrome de Brugada a permis d'identifier le variant T501M de la protéine DPPX. Cette protéine est une des sous-unités régulatrices du canal $K_v4.3$. A ce stade de l'étude, la caractérisation fonctionnelle de ce variant n'a pas permis de mettre en évidence son éventuelle implication physiopathologique.

Mots-Clés : canaux ioniques, $Na_v1.5$, $Ca_v1.2$, DPPX, syndrome du QT court, syndrome de Brugada, Tachycardie multifocale automatique du Purkinje.

SUDDEN DEATH AND MOLECULAR COMPLEXES OF CARDIAC ION CHANNELS

The cardiac electrical activity depends on the activity of numerous ion channels responsible for various currents. Genetic alterations of these channels or of their auxiliary proteins are responsible for cardiac arrhythmias leading to sudden death.

I, The $\text{Na}_v1.5$ channel: using a candidate-gene approach, the R222Q variant of $\text{Na}_v1.5$ was detected in all patients affected with a newly decrypted cardiac arrhythmia called multifocal ectopic Purkinje tachycardia. Functional analysis and computer modeling revealed a gain of function of R222Q- $\text{Na}_v1.5$ leading to the electrical hyperexcitability of Purkinje fibers responsible for premature ventricular contractions.

II, The $\text{Ca}_v1.2$ channel: the screening of a cohort of patients affected by the short QT syndrome has allowed identifying the A223P variant in $\text{Ca}_v1.2$ channel in one patient. In addition, compound heterozygous variants of the membrane carnitine transporter OCTN2 were also detected. The functional analysis of the A223P variant has highlighted a loss of function of the $\text{Ca}_v1.2$ channel. However, the mechanism behind this loss of function and the carnitine deficiency implication in the observed phenotype remains to be determined.

III, The DPPX protein: The genome screening of a proband affected by the Brugada syndrome has allowed to identify the T501M variant in DPPX protein. This protein is a regulatory subunit of the $\text{K}_v4.3$ channel. At this stage of the study, the functional characterization of T501M variant failed to highlight its possible pathophysiological implication in the Brugada syndrome.

Keywords : ion channels, *SCN5A*, *CACNA1C*, *DPP6*, short QT syndrome, Multifocal ectopic Purkinje tachycardia, The Brugada syndrome.