

UNIVERSITÉ DE NANTES

UFR MEDECINE

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE (ED 502)

Année 2014

N° 19

Troubles du rythme et cardiomyopathies associés au canal sodique Nav1.5

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie

Spécialité : Physiologie, Biologie cellulaire et moléculaire

Présentée

et soutenue publiquement par

Jérôme MONTNACH

Le 14 octobre 2014, devant le jury ci-dessous

Président : M. Hervé LE MAREC, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, Nantes

Rapporteurs : M. Stéphane HATEM, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, Paris

M. Jean-Pierre BENITAH, Chargé de recherche INSERM, Châtenay-Malabry

Examineurs : M. Christophe HEYMES, Directeur de recherche INSERM, Toulouse

M. Sylvain RICHARD, Directeur de recherche INSERM, Montpellier

Directeur de thèse : M. Flavien CHARPENTIER, Directeur de recherche INSERM, Nantes

Remerciements

Je remercie le Professeur Hervé Le Marec pour avoir accepté de présider mon jury de thèse ainsi que le Professeur Stéphane Hatem et Monsieur Jean-Pierre Benitah pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail en tant que rapporteurs. Je remercie aussi Messieurs Sylvain Richard et Christophe Heymès pour avoir accepté d'être membres du jury en tant qu'examineurs.

Je tiens à remercier Monsieur Flavien Charpentier pour m'avoir encadré tout au long de cette thèse et même avant au cours de mes stages de licence 3, master 1 et master 2. Merci pour la confiance que vous m'avez apporté au cours des différents projets auxquels j'ai pu participer de près ou de loin. Merci pour votre disponibilité et pour votre culture scientifique. Merci de m'avoir confié un projet aussi dangereux qu'excitant qu'était la caractérisation de ce nouveau modèle de souris. Cette longue collaboration de 6 ans aura été très agréable pour moi, j'ai énormément appris.

Je tiens à remercier le Professeur Hervé Le Marec pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de l'unité de recherche U1087 de l'institut du thorax et au Professeur Pierre Pacaud pour m'avoir donné la possibilité en licence 2 de mettre un premier pied dans ce joli établissement qu'était l'U915.

Je tiens à remercier Messieurs Sylvain Richard et Vincent Sauzeau pour m'avoir suivi au cours de ces 3 années lors de mes comités de thèse. Vos remarques m'ont été très utiles pour mener à bien ces projets.

Un grand merci aussi à Gildas Loussouarn, Isabelle Baro et Nicolas Rodriguez pour m'avoir donné ma chance quand je suis venu taper à la porte en licence 2, il y a 6 ans déjà. Merci pour votre disponibilité, pour votre connaissance et votre patience. Je n'oublierai pas la correction du rapport que nous avons fait dans ton bureau Isabelle, un long moment mais très enrichissant. Cette expérience avec vous m'a beaucoup appris.

Un grand merci à Agnès Carcouet avec qui j'ai eu le plaisir de travailler au cours de ces dernières années. Merci pour ta rigueur à la limite de l'inflexibilité, c'est très agréable de savoir que les choses ne vont pas dériver et que les choses sont carrées. Je ne n'ose même pas imaginer le nombre d'ECG et de génotypages que tu as fait sur l'ensemble de ces 2 projets, c'est colossal !! Merci aussi pour ta bonne humeur et les discussions pas toujours scientifiques que l'on a pu avoir.

Merci à toute l'équipe de l'animalerie avec en tête de file Stéphanie Lemarchand-Mindé pour la gestion des quelques 1000 souris que contient notre élevage. Vous faites un super boulot et sans vous les projets ne pourraient pas avancer. On n'est pas toujours contents mais si on prend du recul vous faites un travail de folie au 5^e étage.

Comment ne pas remercier les souris qui ont été les actrices principales de cette thèse. Entre celles qui ont du survivre jusqu'à 60 semaines alors que leur cœur était fibrosé et celles que nous avons du utiliser

dès 4 semaines avant que leurs troubles du rythme ne les fassent passer l'arme à gauche on a eu pas mal de boulot. Merci pour les jolis résultats que vous nous avez apporté.

Merci à l'ensemble de mes collègues de thèse : Damien, Fabien, Benoit, Julie, Faouzi et Xavier. Ce fut trois années (et même plus pour certains) où l'on a vraiment passé de bons moments. On a parlé science parfois, Mac et iPhone souvent et de tout autre chose très souvent. Merci pour ces bons moments passés en congrès. Et vous je rassure tout ce qui s'est passé au labo restera au labo.

Merci à Benjamin, Sandie, Valentine, Virginie, Amandine, Nathalie, Mr Bertrand Rozec (qui a le plus haut niveau universitaire). On a passé de supers moments à faire de la science en buvant des cafés. Merci pour l'interaction entre les « bêtas » et le reste du monde.

Merci à tous les étudiants que j'ai pu encadrer au cours de ces 3 années. Je ne sais plus exactement combien mais une dizaine je pense. Vous m'avez appris à transmettre le peu de chose que je sais. Savoir et apprendre c'est pas pareil, j'ai beaucoup appris avec vous. J'espère que vous garderez un pas trop mauvais souvenir de moi. A vous de jouer désormais Nadjat et Franck !!

Merci à toutes les personnes du labo que je ne vais pas citer de peur d'en oublier un ou une. Depuis 6 ans ce labo a évolué, grossit mais reste toujours agréable. Merci pour la gaieté qui règne dans les couloirs du labo et pour l'aide que l'on peut toujours trouver à droite ou à gauche.

Merci à ma famille, d'avoir soutenu mes choix, d'avoir toujours été présents à mes côtés, d'avoir accepté de ne pas comprendre ce que je faisais. Sans vous cela aurait été difficile. Merci d'avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Je ne sais pas si cette thèse restera dans les mémoires du labo mais je l'ai faite aussi et surtout pour vous. Merci pour tout ça et pour tout ce que je ne dis pas mais que vous savez.

Merci à mes amis. Sabrina et Florence, vous savez mieux que n'importe qui ce que c'est qu'une thèse. Freddy, Guillaume, Emeline, Alexis et Mathieu merci de m'avoir supporté et compris. Merci les amis Pirates !!

Merci à Pauline pour avoir accepté mes choix, mes horaires, l'absence de vacances sans toujours avoir forcément compris pourquoi. Merci pour ton soutien au cours de ces années durant lesquelles cela n'a pas toujours été facile. Et puis si le post-doc se concrétise merci d'accepter de me suivre de l'autre côté de l'atlantique. Je ne sais pas si je suis un grand homme mais il paraît que derrière chaque grand homme il y a une grande femme...

*« Ne remettez jamais au lendemain ce que vous pouvez faire aujourd'hui. La procrastination est un vol fait à la vie. »
Charles Dickens*

*« Il nous faut savourer le temps qui nous est donné. Parce que tout pourrait s'arrêter du jour au lendemain, et que personne ne sait jamais quand ni comment. »
Jonathan Coe*

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS	IX
TABLE DES ILLUSTRATIONS	XI
INDEX DES TABLEAUX	XIII
AVANT-PROPOS	XIV
PHYSIOPATHOLOGIE DE NAV1.5	1
1 LE CANAL SODIQUE NAV1.5	1
1.1 EXPRESSION CARDIAQUE DE NAV1.5	2
1.1.1 Nav1.5 au cours du développement cardiaque	2
1.1.2 Les variants d'épissage de Nav1.5	3
1.2 LOCALISATION TISSULAIRE ET CELLULAIRE DE NAV1.5 AU NIVEAU CARDIAQUE	4
1.3 EXPRESSION DE NAV1.5 DANS LES AUTRES TYPES CELLULAIRES	6
1.4 LE COURANT SODIQUE I_{Na}	7
1.4.1 Rôle physiologique du courant sodique I_{Na}	7
1.4.2 Le courant sodique : une inactivation en 2 étapes	10
1.4.2.1 L'inactivation rapide	11
1.4.2.2 L'inactivation lente	11
1.4.3 Les courants sodiques retardés	12
1.4.3.1 Courant sodique retardé ou courant sodique persistant ?	12
1.4.3.2 Régulation physiologique et pharmacologique du courant sodique persistant	15
1.4.3.3 Pertinence de la Ranolazine pour l'étude des conséquences pathologiques du courant sodique persistant	16
2 LES PARTENAIRES DE NAV1.5	17
2.1 LES PROTEINES REGULATRICES DE NAV1.5	17
2.1.1 Les sous-unités beta régulatrices	17
2.1.2 Le complexe Calmoduline / CaMKII	19
2.1.3 La protéine 14-3-3	20
2.2 LES PROTEINES D'ANCRAGE	22
2.2.1 Nav1.5 sur les disques intercalaires	22
2.2.2 Nav1.5 sur les membranes latérales	22
2.3 LA CONNEXINE 43 : UN PARTENAIRE PRIVILEGIE DE NAV1.5	24
3 CANALOPATHIES ASSOCIEES A NAV1.5	27
3.1 LE SYNDROME DE BRUGADA	27

3.2	LE « SICK SINUS SYNDROME »	30
3.3	LES CARDIOMYOPATHIES DILATEES	31
4	MODÈLES MURINS ASSOCIÉS À NAV1.5	32
LES TROUBLES PROGRESSIFS DE LA CONDUCTION CARDIAQUE – SOURIS <i>SCN5A</i>^{+/-}		44
1	DEFINITION	44
2	GENETIQUE DES TROUBLES DE LA CONDUCTION CARDIAQUE	45
3	LE COMPLEXE QRS CHEZ LA SOURIS	46
4	LE MODELE DE SOURIS <i>SCN5A</i> ^{+/-}	47
5	ACTEURS DE LA FIBROSE CARDIAQUE	50
5.1	FIBROSE ET TROUBLES DU RYTHME / DE LA CONDUCTION	52
5.2	FIBROBLASTES : REGULATEURS DE LA FIBROSE CARDIAQUE	53
5.2.1	Origine des fibroblastes cardiaques	53
5.2.2	Physiologie des fibroblastes	54
5.2.3	Physiopathologie des fibroblastes/myofibroblastes	56
5.2.4	Interactions cardiomyocytes/myofibroblastes	58
5.2.4.1	Interactions paracrines	58
5.2.4.2	Interactions physiques	59
5.3	REGULATEURS DE LA FIBROSE CARDIAQUE	60
5.3.1	Le Transforming Growth Factor beta	61
5.3.2	Le Connective Tissue Growth Factor	63
5.3.3	Le facteur fibrotique SPARC	64
5.3.4	Les MMPs et TIMPs	66
5.3.5	La signalisation purinergique	68
6	INTER-REGULATION DE NAV1.5 ET DE LA Cx43 DANS LES PROCESSUS FIBROTQUES	69
6.1	LE PERINEXUS : UNE SUPER-STRUCTURE AUSSI FRAGILE QU'ESSENTIELLE	69
6.2	NAV1.5 ET Cx43 : A L'ORIGINE DE LA FIBROSE CARDIAQUE	70
6.3	LA Cx43 : UNE NOUVELLE CIBLE ANTI-FIBROTIQUE ?	71
LE SYNDROME DU QT LONG DE TYPE 3 – SOURIS <i>SCN5A</i>^{+/ΔQKP}		72
1	DEFINITION	72
2	CLINIQUE	72
3	GENETIQUE DU SYNDROME DU QT LONG DE TYPE 3	74
4	L'INTERVALLE QT CHEZ LA SOURIS	76
5	LES MODELES MURINS LQT3	78
5.1	LA SOURIS <i>SCN5A</i> ^{+/ΔKPQ}	79
5.2	LA SOURIS <i>SCN5A</i> N ₁₃₂₅ S	80

5.3	LA SOURIS <i>SCN5A</i> ^{+/1798insD}	81
6	MECANISMES DES TROUBLES DU RYTHME ET QT LONG	82
6.1	LES POST-DEPOLARISATIONS PRECOSES (EADs)	82
6.2	LE CYCLE DU CALCIUM AU CENTRE DES ARYTHMIES CARDIAQUES	85
6.2.1	La Calcium/Calmodulin Kinase II	85
6.2.2	L'échangeur NCX	87
6.2.3	Le couple SERCA/Phospholamban	89
6.2.4	Le récepteur à la Ryanodine	92

OBJECTIFS DE LA THESE

MATERIEL ET METHODES

1	L'ELECTROCARDIOGRAMME	96
2	ISOLEMENT DES CARDIOMYOCYTES VENTRICULAIRES	97
3	LE PATCH-CLAMP	98
4	POTENTIEL D'ACTION CARDIAQUE	100
5	ECHOCARDIOGRAPHIE	101
6	HISTOLOGIE	102
7	IMMUNOHISTOCHEMIE	103
8	WESTERN-BLOT	104
8.1	EXTRACTION PROTEIQUE	104
8.2	LE WESTERN BLOT	105
9	ZYMOGRAPHIE	106
10	TRAITEMENTS PHARMACOLOGIQUES	106
10.1	TRAITEMENT CHRONIQUE A LA FLECAINIDE	106
10.2	TRAITEMENT AIGU DU QT LONG ET DES ARYTHMIES	107
10.3	TRAITEMENT CHRONIQUE ANTI-TGFB	107

PROJET 1 : CARACTERISATION DU ROLE DU CANAL SODIQUE NAV1.5 DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DES TROUBLES DE LA CONDUCTION ET DU REMODELAGE PROTEIQUE ASSOCIE.

1	INTRODUCTION	109
2	ARTICLE	109

PROJET 2 – CARACTERISATION DU MODELE MURIN *SCN5A*^{+/ΔQKP} COMME NOUVEAU MODELE D'ETUDE DU SYNDROME DU QT LONG DE TYPE 3 ET DU REMODELAGE PROTEIQUE ASSOCIE.

1	INTRODUCTION	142
2	ARTICLE	142
3	RESULTATS COMPLEMENTAIRES	184
<u>DISCUSSION GENERALE</u>		<u>189</u>
1	LE MODELE MURIN <i>Scn5A</i>^{+/-}	189
2	LE MODELE MURIN <i>Scn5A</i>^{+/ΔQKP}	192
3	PERTINENCE DES MODELES D'ETUDE DE NAV1.5	195
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>		<u>198</u>
<u>ANNEXE</u>		<u>232</u>

Liste des abréviations

AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique
APD_x : durée du potentiel d'action cardiaque à x% de repolarisation
ARVC/D : *Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy / Dysplasia*
ATPase : adénosine triphosphatase
ATX-II : Anemone Toxin II
CaMKII : Calmoduline kinase II
CHO : *Chinese Hamster Ovary cells*
CTGF : *Connective Tissue Growth Factor*
EADs : *early after-depolarisations*
ECG : électrocardiogramme
EMT : transition épithélio-mésenchymateuse
GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GMPc : Guanosine MonoPhosphate cyclique
HEK293 : *Human Embryonic Kidney cells 293*
HRP : Horse Radish Peroxidase
LQT3 : syndrome du QT long de type 3
MMP : *Matrix MetalloProtéinase*
MRTFs : *Myocardin-Related Transcription Factors*
MTSEA : 2-aminoethyl methanethiosulfonate
NCX : échangeur sodium/calcium
PCCD : *Progressive Cardiac Conduction Defect*
PKA : protéine kinase A, dépendante de l'AMPc
PKC : protéine kinase C, dépendante du calcium
PLB : phospholamban
RALI-DHF : *Ranolazine-Diastolic Heart Failure study*
RT-PCR : *reverse transcription-polymerase chain reaction*
RVOT : *right ventricular outflow tract*, chambre d'éjection du ventricule droit
RyR : récepteur à la Ryanodine
SAP97 : *Synapse-Associated Protein 97*
SDS : *Sodium Dodecyl Sulphate*
SERCA : *Sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase*
SNP : *Single Nucleotide Polymorphism*
SPARC : *Secreted Protein, Acidic, and Rich in Cystein*
SQTL : syndrome du QT long
TBS : *Tris Buffer Saline*
TBS-T : *Tris Buffer Saline + 0,1% Tween20*

TGF β : *Transforming Growth Factor β*

TIMP : *Tissue Inhibitor of matrix Metalloproteinase*

TTX : Tetrodotoxin

Table des illustrations

Figure 1 : Structure du canal sodique dépendant du potentiel.	1
Figure 2 : Profil d'expression de Nav1.5 au cours du développement.	2
Figure 3 : Anomalies cardiaques à E10,5 chez les souris <i>Scn5a</i> ^{-/-} .	3
Figure 4 : Localisation tissulaire de Nav1.5 au stade adulte chez la souris.	5
Figure 5 : Réduction de l'expression de Nav1.5 dans la chambre de chasse du ventricule droit (RVOT).	6
Figure 6 : Potentiel d'action humain (A) et murin (B) et courants ioniques impliqués.	8
Figure 7 : Traduction de l'électrocardiogramme (ECG).	10
Figure 8 : Le courant de fenêtre sodique.	13
Figure 9 : Courant de fenêtre ou courant persistant.	14
Figure 10 : Courbes doses-réponse de la Flécainide (A), de la Ranolazine (B) et du GS-967 (C) sur les courants ioniques sodiques et potassiques.	16
Figure 11 : Régulation du courant sodique par la CaMKII (pointillés).	20
Figure 12 : Colocalisation de Nav1.5 et 14-3-3 dans des cardiomyocytes murins.	21
Figure 13 : Nav1.5 sur les membranes latérales de cardiomyocytes.	23
Figure 14 : Troubles de la conduction chez les souris <i>mdx</i> .	23
Figure 15 : Les partenaires de Nav1.5 varient en fonction de sa localisation.	24
Figure 16 : Les connexines cardiaques.	26
Figure 17 : Colocalisation Cx43 et Nav1.5 au sein du perinexus.	26
Figure 18 : Deux hypothèses à l'origine du Syndrome de Brugada.	30
Figure 19 : Les troubles progressifs de la conduction cardiaque.	44
Figure 20 : Pedigree de la famille porteuse de la mutation IVS22+2 T>C impliquée dans la maladie de Lenègre-Lèv.	45
Figure 21 : Différence de morphologie des complexes QRS entre l'homme (A) et la souris (B).	47
Figure 22 : Génération du modèle murin <i>Scn5a</i> ^{+/-} .	48
Figure 23 : Comparaison de l'évolution des paramètres ECG entre l'homme (A) et les souris <i>Scn5a</i> ^{+/-} (B).	49
Figure 24 : Caractérisation des souris <i>Scn5a</i> ^{+/-} .	50
Figure 25 : Rôle et métabolisme du collagène A.	51
Figure 26: Différents types de fibrose.	52
Figure 27 : Arythmogénicité de la fibrose.	53
Figure 28 : Origine des fibroblastes cardiaques.	54
Figure 29 : Rôle des fibroblastes cardiaques.	56
Figure 30 : Différenciation des fibroblastes en myofibroblastes.	58
Figure 31 : Communication chimique cardiomyocytes/fibroblastes.	59
Figure 32 : Interactions cardiomyocytes/fibroblastes.	61
Figure 33 : Voies de signalisation du TGF- β dépendantes et indépendantes des Smad dans les processus fibrotiques.	62

Figure 34 : Le <i>Connective Tissue growth Factor</i> (CTGF).	64
Figure 35 : Le facteur SPARC.	65
Figure 36 : Mode d'action de SPARC en conditions physiologiques (A) et pathologiques (B).	66
Figure 37: Signalisation purinergique et fibrose.	69
Figure 38: Le perinexus.	70
Figure 39 : Caractéristiques électrocardiographiques des 3 principaux types de syndromes de QT long.	73
Figure 40 : Détermination de la fin de l'onde T sur l'ECG murin.	77
Figure 41 : Effets de l'anesthésie sur la relation QT/RR.	78
Figure 42 : Caractérisation de la souris <i>Scn5a</i> ^{+/ΔKPQ} .	80
Figure 43: Caractérisation de la souris <i>SCN5A</i> N ₁₃₂₅ S.	81
Figure 44: Caractérisation électrophysiologique de la souris <i>Scn5a</i> ^{+/1798insD} .	83
Figure 45: Post-dépolarisations précoces (EADs).	84
Figure 46 : La Calcium/Calmoduline Kinase II (CaMKII).	87
Figure 47 : Structure de l'échangeur NCX Sodium/Calcium.	88
Figure 48 : Structure cristallographique de la pompe SERCA.	90
Figure 49 : Régulation du Phospholamban (PLB) par phosphorylation.	92
Figure 50 : Régulation du RyR par les phosphorylations.	93
Figure 51: Electrocardiogramme murin en DI.	96
Figure 52 : Représentation schématique du dispositif expérimental utilisé pour la technique de patch- clamp.	99
Figure 53 : Propriétés du courant sodique dans des cardiomyocytes issus de souris <i>Scn5a</i> ^{+/ΔQKP} .	167
Figure 54 : Courant sodique persistant dans des cardiomyocytes issus de souris <i>Scn5a</i> ^{+/ΔQKP} .	187

Index des tableaux

Tableau 1. Isoformes du canal sodique Nav1.5	4
Tableau 2. Partenaires protéiques de Nav1.5.	18
Tableau 3. Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés pour le western blot	106

Avant-propos

Les décès d'origine cardiovasculaire représentent la seconde cause de mortalité en France, soit environ un tiers des décès (INSEE). Certaines cardiopathies sont d'origine ischémique, liées à la survenue d'infarctus du myocarde, et conduisant à une insuffisance cardiaque. Cependant, une part importante des décès d'origine cardiovasculaire est liée des épisodes de troubles du rythme cardiaque conduisant à la mort subite. Ces troubles du rythme ont pour certains été reliés avec des altérations génétiques héréditaires. Parmi ces troubles du rythme cardiaque héréditaires, on retrouve entre autres les troubles progressifs de la conduction cardiaque et le syndrome du QT long. Des avancées récentes montrent que ces troubles du rythme se développent majoritairement sur des cœurs sains mais peuvent aussi être associés à des cardiomyopathies hypertrophiques ou dilatées.

Depuis de nombreuses années, un certain nombre de gènes ont été impliqués dans ces troubles du rythme héréditaires. Ces gènes codent entre autre pour des canaux ioniques responsables de l'activité électrique cardiaque. Des avancées considérables ont été réalisées dans la compréhension des propriétés électrophysiologiques des canaux ioniques mais aussi dans la compréhension des interactions moléculaires qui existent entre ces canaux et les autres protéines cellulaires. L'utilisation de modèles animaux possédant le gène porteur de la mutation d'intérêt permet aujourd'hui d'aller encore plus loin dans la compréhension des mécanismes pathologiques *in vivo*.

Parmi ces gènes, le gène *SCN5A* qui code pour le canal sodique Nav1.5 est associé à de nombreuses pathologies cardiaques associant troubles du rythme et cardiomyopathie. Cette thèse est consacrée à l'étude de deux modèles murins. L'un de ces modèles est invalidé à l'état hétérozygote pour le gène *Scn5a* (la souris *Scn5a*^{+/-}) visant à comprendre les mécanismes impliqués dans le développement de fibrose au cours des troubles progressifs de la conduction cardiaque. L'autre modèle porteur de la délétion de trois acides aminés sur le gène *Scn5a* (la souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP}) vise à comprendre les mécanismes reliant le canal sodique à une cardiomyopathie dilatée observée dans les cas de syndrome du QT long chez les patients porteurs de cette mutation.

- Introduction -

Physiopathologie de Nav1.5

1 LE CANAL SODIQUE NAV1.5

Le canal Nav1.5, codé par le gène *SCN5A*, est le canal sodique cardiaque majoritaire (Yu and Catterall, 2003). Il constitue la sous-unité α (260 kDa) d'un complexe protéique qui intègre des sous-unités β régulatrices et de très nombreux partenaires protéiques régulateurs de son expression et de son activité (Rook et al., 2012). La sous-unité α forme ainsi le pore du canal et récapitule ses principales propriétés. Elle s'organise sous forme de 4 domaines (DI-DIV) similaires mais non identiques, composés chacun de 6 hélices α transmembranaires (S1-S6). Le segment S4 de chaque domaine, riche en résidus positivement chargés, est responsable de la sensibilité du canal aux variations de potentiel. La boucle qui relie les segments S5 et S6 de chaque domaine est incluse dans la région transmembranaire du canal et forme le filtre de sélectivité du canal au niveau extracellulaire (Figure 1).

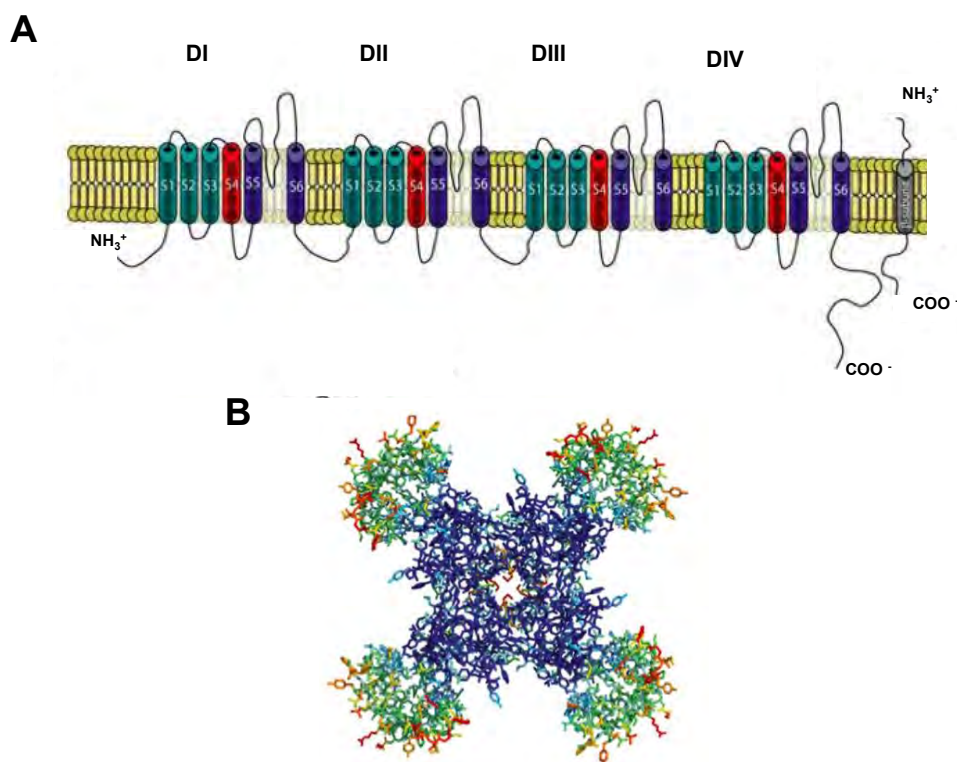


Figure 1 : Structure du canal sodique dépendant du potentiel. A. Schéma du canal sodique Nav1.5 composé de 4 domaines (DI à DIV) composés chacun de 6 segments transmembranaires. En gris une sous-unité β régulatrice. NH_3^+ : extrémité N-terminale ; COO^- : extrémité C-terminale ; DI à DIV : domaines I à IV du canal sodique. D'après Amin et al., 2009. B. Structure cristallographique du canal sodique bactérien NavAb . D'après Payandeh et al., 2011.

L'expression des canaux sodiques a été retrouvée chez différentes espèces au cours de l'évolution (Anderson and Greenberg, 2001). La présence des canaux sodiques au cours de l'évolution remonte

avant la séparation vertébrés / invertébrés. Les propriétés biochimiques, biophysiques et pharmacologiques sont identiques dans les différentes espèces. Neuf isoformes (Nav1.1 à Nav1.9) de canaux sodiques dépendants du potentiel sont codés par 9 gènes situés sur 4 chromosomes différents (Chr2, 3, 15, 11), proches d'un groupe de gènes de la famille HOX qui sont impliqués dans le développement (Plummer and Meisler, 1999). Cette localisation chromosomique, proche de gènes du développement, peut expliquer l'implication du canal sodique dans le développement cardiaque en cas de régulation commune de ces 2 fonctions au cours de l'embryogénèse.

1.1 EXPRESSION CARDIAQUE DE NAV1.5

1.1.1 NAV1.5 AU COURS DU DEVELOPPEMENT CARDIAQUE

Au stade embryonnaire, le cœur a une activité contractile rythmique dès le stade 8-9 somites soit E8 chez la souris malgré l'absence de valves et de système de conduction (Moorman and Lamers, 1994). Au cours du développement embryonnaire, l'expression de *SCN5A* augmente. Elle devient détectable dès E9.5, augmente fortement à E11.5 et davantage encore au stade post-natal et adulte (Dominguez et al., 2008) (Figure 2). Les souris invalidées à l'état homozygote pour Nav1.5 (*Scn5a*^{-/-}) meurent *in utero* à E10.5 de défauts de trabéculations du myocarde (Papadatos et al., 2002) (Figure 3). Il est intéressant de noter que le profil d'expression de *Scn5a* est identique à celui de *Scn1b*, le gène codant pour une sous-unité régulatrice de Nav1.5.

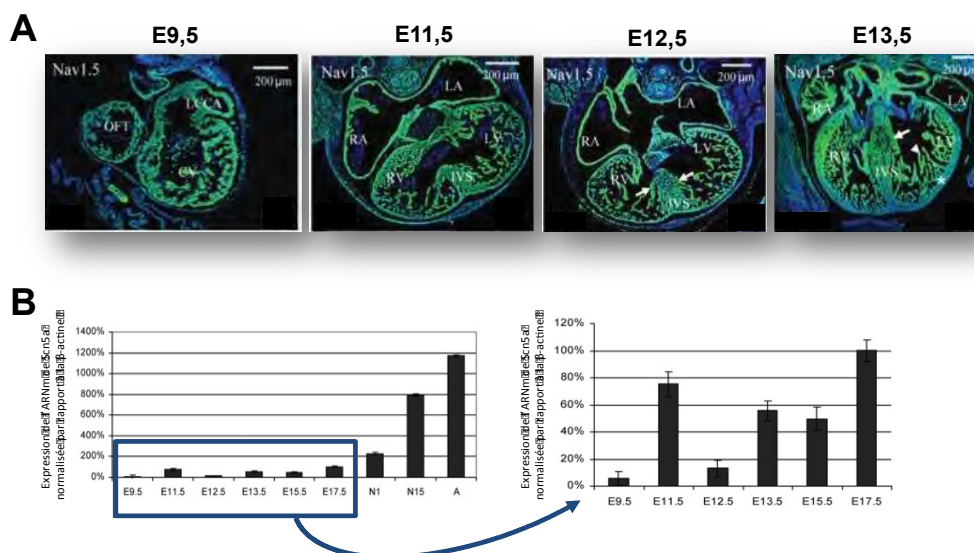


Figure 2 : Profil d'expression de Nav1.5 au cours du développement embryonnaire chez la souris. A. Expression protéique et localisation de Nav1.5 au cours du développement cardiaque chez la souris. OFT : chambre de chasse ; LCCA : partie gauche de l'oreillette commune ; CV : ventricule commun ; RA : oreillette droite ; LA : oreillette gauche ; RV : ventricule droit ; LV ventricule gauche ; IVS : septum interventriculaire. La flèche montre l'expression de Nav1.5 au sein des branches du faisceau de His et la tête de flèche montre la présence de Nav1.5 au sein des trabéculations du myocarde ventriculaire. B. Niveaux d'expression d'ARNm de *Scn5a* au cours du développement rapporté au niveau d'expression de la β -actine. D'après Dominguez et al., 2008.

Dans les premières étapes du développement embryonnaire, Nav1.5 est uniformément exprimé au niveau cardiaque. Cependant, dès E12.5-E13.5, c'est à dire au moment de la polarisation « apex-base », l'expression de Nav1.5 se régionalise entre la paroi ventriculaire compacte et les branches droite et gauche du faisceau de His. Cette cinétique d'expression de Nav1.5 au cours du développement embryonnaire suggère le rôle central de ce canal dans l'activité électrique cardiaque mais aussi dans l'architecture cardiaque. Après la naissance et jusqu'au stade adulte, Nav1.5 est plus exprimé dans les oreillettes que dans les ventricules. Cette surexpression est aussi retrouvée au stade adulte chez la souris et le cochon d'Inde (Li et al., 2002).

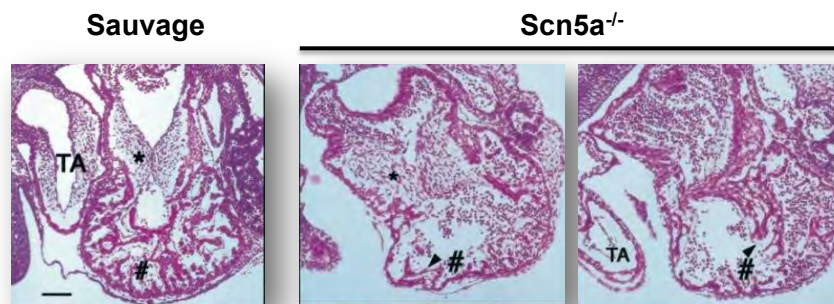


Figure 3 : Anomalies cardiaques à E10,5 chez les souris *Scn5a*^{-/-}. Les souris *Scn5a*^{-/-} présentent un développement normal des bourgeons endocardiques (*) et du tronc artériel (TA) mais un défaut léthal de trabéculatation des ventricules (#) comparé aux souris sauvages. Les flèches indiquent la couche de cellules endothéliales. Barre = 100 μ m. D'après Papadatos et al., 2002.

1.1.2 LES VARIANTS D'ÉPISSAGE DE NAV1.5

L'épissage alternatif du gène SCN5A conduit à des variants du canal sodique Nav1.5. Les 6 variants d'épissage de Nav1.5 sont finement régulés. Cela implique une régulation dépendante des espèces, du tissu mais aussi de facteurs du développement. Certaines isoformes ont des propriétés électrophysiologiques identiques, d'autres ont des changements de sensibilité au potentiel et enfin d'autres ne sont pas fonctionnelles (Tableau 1) (Schroeter et al., 2010).

Parmi l'ensemble des variants, Nav1.5e est le plus fréquent au niveau cardiaque où il correspond à la forme néonatale du canal sodique. Cette isoforme correspond à un changement de 7 acides aminés au niveau des segments S3 et S4 du domaine DI. Ses propriétés électrophysiologiques sont différentes de la forme adulte. Le rôle précis de cette isoforme dans le développement cardiaque est encore inconnu.

En raison de cette régulation d'épissage, l'effet d'une mutation sur le canal sodique Nav1.5 peut être amplifié ou annihilé dans un tissu comparé à un autre ou à un stade précis du développement.

Tableau 1 : Isoformes du canal sodique Nav1.5

Variant d'épissage	Tissus	Espèce	Electrophysiologie	Remarques
Nav1.5a	Cœur Cerveau Ganglions spinaux	Souris, rat, cochon Souris Rat	Décalage négatif de l'inactivation	Absent du cœur humain Présent dans les lignées HiB5, NB-1 et ST14A
Nav1.5b	Coeur	Souris	Non fonctionnel	Absent du cœur humain, de rat, de chien et de cochon
Nav1.5c	Cœur Ganglions trigéminés Ganglions spinaux	Humain, souris Rat Souris, rat	Aucun changement	Cœur sain et pathologique, variant Q1077 Présent dans les lignées NB-1 avec la forme Δ Q1077
Nav1.5d	Cœur	Humain	Diminution du courant au pic Décalage positif de l'activation et de l'inactivation	Absent chez la souris, rat, chien et cochon
Nav1.5e	Cœur Cerveau Cancer du sein	Souris Humain	Diminution du courant au pic Décalage positif de l'activation et négatif de l'inactivation	Présent au stade néonatal Absent au stade adulte Rôle important dans les métastases
Nav1.5f	Cerveau Foie, reins Poumons, muscles Testicules coeur	Humain, rat Rat Rat	Non fonctionnel	Absent du cœur de nouveau-nés

D'après Schroeter et al., 2010. HiB5 : lignée de cellules souches progénitrice de cellules hippocampales de rat ; NB-1 : lignée cellulaire humaine issue de neuroblastome ; ST14A : lignée cellulaire progénitrice des cellules striatales de rat.

1.2 LOCALISATION TISSULAIRE ET CELLULAIRE DE NAV1.5 AU NIVEAU CARDIAQUE

Des études d'immunohistochimie, de RT-PCR et d'hybridation *in situ* ont permis de connaître la localisation de Nav1.5 dans le tissu cardiaque. Nav1.5 est exprimé au niveau de la membrane plasmique des cardiomyocytes avec une concentration plus importante au niveau des disques intercalaires que des membranes latérales du cardiomyocyte (Cohen, 1996; Maier et al., 2004). Un groupe de canaux a aussi été mis en évidence au niveau des tubules transverses dont le rôle est encore mal compris (Shy et al., 2013). La régionalisation de Nav1.5 suggère un rôle primordial de ce canal dans l'initiation et la propagation du potentiel d'action cardiaque. En plus du canal Nav1.5 qui est majoritairement exprimé, d'autres canaux « non cardiaques » tels que Nav1.1, Nav1.3, Nav1.6 et Nav1.8 sont aussi exprimés au sein du myocarde. Principalement localisés au niveau des tubules T, il semble qu'ils aient un rôle de propagation de l'influx électrique vers le centre des cardiomyocytes alors que Nav1.5 a plus un rôle dans la conduction électrique globale (Cusdin et al., 2008). Aucune étude ne démontre le rôle

physiologique du canal sodique squelettique Nav1.4 endogène dans le cœur. Une étude semble montrer la présence d'ARNm de Nav1.4 sans que cela ne soit clairement démontré (Pereon et al., 2003).

L'expression de Nav1.5 au sein du myocarde n'est pas homogène (Figure 4). Un gradient d'expression transmural pour Nav1.5 existe au sein de la paroi ventriculaire et ce autant au niveau du ventricule droit que du ventricule gauche. L'expression de Nav1.5 est très faible au sein du nœud sinusal et du nœud atrio-ventriculaire alors que son expression est plus élevée en périphérie du nœud sinusal et au niveau des faisceaux de His et fibres de Purkinje. Cette expression organisée de Nav1.5 suggère son rôle dans la conduction atriale et ventriculaire (Remme et al., 2009b).

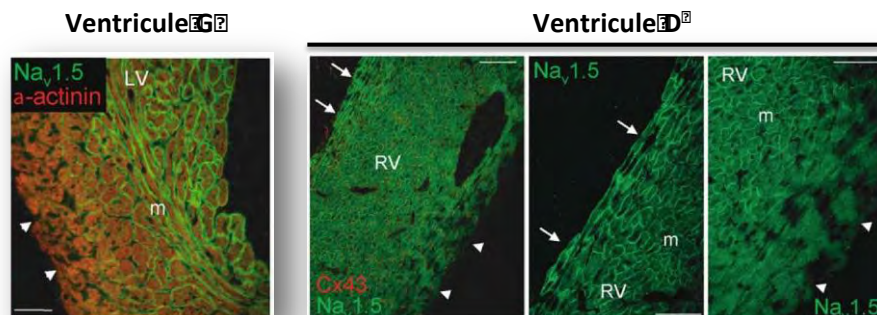


Figure 4 : Localisation tissulaire de Nav1.5 au stade adulte chez la souris. L'expression de Nav1.5 est plus faible au niveau de l'épicaarde (pointes) que de l'endocarde du ventricule gauche. Au sein du ventricule droit, l'expression est plus forte au niveau de l'endocarde (flèches) que de l'épicaarde (pointes). LV : ventricule gauche ; RV : ventricule droit ; m : cellules M. D'après Remme et al., 2009b.

Outre la différence de gradient d'expression de Nav1.5 entre l'épicaarde et l'endocarde, la chambre de chasse du ventricule droit (RVOT pour *Right Ventricular Outflow Tract*), est une région particulière au sein du ventricule droit. Cette région a une conduction myocardique ralentie comparée au reste du ventricule droit en raison d'une expression réduite de Nav1.5 et de la connexine 43, protéines clés du couplage électrique entre les cardiomyocytes (Figure 5). Cette hétérogénéité au sein même du ventricule droit est à l'heure actuelle une des pistes explicatives de l'origine des pathologies cardiaques sodiques débutant dans la partie droite du cœur et dans lesquelles un défaut de conduction est observé (Boukens et al., 2013). Parmi ces pathologies, on retrouve le syndrome de Brugada.

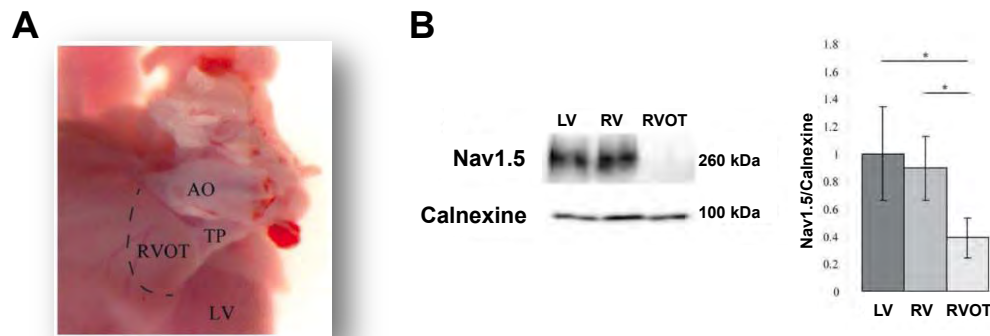


Figure 5 : Réduction de l'expression de Nav1.5 dans la chambre de chasse du ventricule droit (RVOT) chez la souris. A. Localisation anatomique du RVOT. AO : Aorte ; TP : tronc artériel pulmonaire ; LV : ventricule gauche. B. Diminution significative de l'expression de Nav1.5 normalisée par rapport à la Calnexine dans le RVOT. D'après Boukens et al., 2013.

1.3 EXPRESSION DE NAV1.5 DANS LES AUTRES TYPES CELLULAIRES

L'étude du muscle cardiaque est trop souvent limitée à l'étude des cardiomyocytes. Dès les années 1980, Nag a montré que le cœur était composé en majorité (65 à 70%) de cellules non musculaires (fibroblastes, cellules endothéliales, péricytes, cellules musculaires lisses vasculaires et macrophages) (Nag, 1980). Parmi ces 5 types cellulaires, les études de Camelliti ont montré que les fibroblastes étaient très nettement majoritaires (Camelliti et al., 2005). Une étude récente montre la présence du canal sodique Nav1.5 dans des fibroblastes atriaux humains. Je reviendrai par la suite (Partie 2, §5.2) sur le rôle de ces fibroblastes dans les processus fibrotiques, mais il est intéressant de noter que les auteurs ont observé que l'expression et la fonctionnalité de Nav1.5 augmentait lors de la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes (Chatelier et al., 2012). La conductance sodique portée par le canal sodique nav1.5 a aussi été mise en évidence au niveau des myocytes des artères coronaires (Quignard et al., 1997).

En plus de son expression au niveau cardiaque, le canal sodique Nav1.5 est exprimé dans différents types cellulaires tels que les cellules endothéliales vasculaires et musculaires lisses bronchiques (Andrikopoulos et al., 2011; Bocquet et al., 2010; Bradley et al., 2013) mais aussi au niveau des îlots pancréatiques, astrocytes, macrophages, lymphocytes et cellules cancéreuses (Black and Waxman, 2013). Tous ces types cellulaires n'étant pas excitables, et bien que cela n'empêche pas le canal sodique de jouer un rôle important dans le maintien du potentiel de repos comme c'est le cas pour les cellules cancéreuses, on peut imaginer un rôle de Nav1.5 bien plus complexe que celui d'un canal ionique ayant pour seule et unique fonction de faciliter le passage des ions au travers de la membrane plasmique. La place de Nav1.5 au sein d'un macrocomplexe protéique est discutée par la suite en relation avec ses partenaires.

1.4 LE COURANT SODIQUE I_{Na}

1.4.1 RÔLE PHYSIOLOGIQUE DU COURANT SODIQUE I_{Na}

Dans des conditions de repos, la concentration sodique intracellulaire varie entre 4 mM et 8 mM chez les gros animaux tels que le lapin, le cochon d'Inde et le chien (Gao et al., 2005; Despa et al., 2002; Gray et al., 2001) et est légèrement plus importante (9 à 14 mM) chez le rat et la souris (Yao et al., 1998; Despa et al., 2005; Donoso et al., 1992). Dans ces conditions de repos, le flux de sodium au travers de la membrane plasmique n'est pas nul, il représente une entrée de 1 mM/min et est totalement contrebalancé par l'activité de la pompe Na^+/K^+ ATPase du sarcolemme. Seulement 15% de ce flux est assuré par les canaux sodiques dépendants du potentiel et la majorité (30%) est sous la dépendance de l'échangeur Na/Ca (Despa and Bers, 2013). Le rôle physiologique de cet échangeur sera discuté par la suite (Partie 3 §6.2.2).

Les enregistrements électrophysiologiques du flux de sodium au travers de Nav1.5 montrent que le courant généré est caractérisé par une phase d'activation rapide (2-3 millisecondes) et d'inactivation plus lente. Au cours de la dépolarisation membranaire, 50% de l'entrée totale de sodium a lieu au cours de l'activation du canal et les 50% restant se faisant au cours de la phase d'inactivation plus lente qui dure tout ou partie de la durée du potentiel d'action cardiaque (Makielski and Farley, 2006). La conjonction de ces deux phénomènes d'activation et d'inactivation du canal est responsable d'un flux massif de sodium entrant dans la cellule. L'entrée de sodium via le canal Nav1.5 au cours d'un potentiel d'action a été estimée à 8 μ M (Bers et al., 2003). Pour une cellule se dépolarisant à la fréquence de 1 Hz, le flux de sodium est de 3 mM/min, soit 3 fois plus que dans des conditions de repos. Les canaux sodiques dépendants du potentiel ne sont impliqués que dans 0,5 mM/min de cet influx. L'inactivation du canal étant nettement plus lente que son activation, on peut aisément imaginer que tout défaut de l'inactivation du canal sodique va conduire à une augmentation de la concentration de sodium sous-membranaire plus importante et prolongée dans le temps.

Le flux de sodium n'est pas porté exclusivement par les canaux Nav1.5. La proportion de courant imputable aux canaux Nav1.5 varie selon les études et les modèles entre 73% et 92% (Kaufmann et al., 2013; Haufe et al., 2005; Sakakibara et al., 1992; Duclohier and Spach, 2001). Le rôle des autres canaux dits « non cardiaques » n'est donc pas négligeable dans la physiologie cardiaque et surtout dans la physiopathologie. De très nombreuses études génétiques ont aussi démontré l'implication du gène *SCN10A* codant pour Nav1.8 dans la modulation de la conduction cardiaque (Chambers et al., 2010) ainsi que son implication dans la modulation des effets pro-arythmiques des mutations de Nav1.5 (Yang et al., 2012; van den Boogaard et al., 2014) et comme facteur aggravant dans le syndrome de Brugada

(Bezzina et al., 2013). Les travaux de l'équipe de Rosen ont montré que la sur-expression « thérapeutique » de Nav1.4 pourrait être bénéfique dans la prévention des arythmies post-ischémiques (Anyukhovsky et al., 2010).

L'entrée de sodium induit la dépolarisation de la membrane plasmique des cardiomyocytes et initie le potentiel d'action cardiaque, c'est la phase 0 du potentiel d'action cardiaque. Les potentiels d'action auriculaires et ventriculaires sont dits sodiques en raison du rôle majeur des canaux Nav1.5 dans la phase de dépolarisation rapide. A la différence, les potentiels d'action nodaux sont dits calciques en raison de leur phase de dépolarisation plus lente qui est dominée par l'activation des canaux calciques. A la suite de la phase de dépolarisation, une phase 1 de repolarisation transitoire portée par le courant I_{to} et l'inactivation du courant sodique est suivie d'une phase 2 de maintien du potentiel assurée par les canaux calciques ($I_{Ca,L}$) et l'échangeur Na/Ca ($I_{Na/Ca}$). Enfin, la phase 3 correspond à la repolarisation des cardiomyocytes sous la dépendance des canaux potassiques KCNQ1 (I_{Ks}) et hERG (I_{Kr}). Le potentiel de repos ventriculaire et atrial est maintenu par le courant I_{K1} et la pompe Na/K ATPase alors que la pente de dépolarisation diastolique du nœud sinusal et du nœud atrio-ventriculaire est supportée par le courant I_f , c'est la phase 4 du potentiel d'action (Figure 6A). L'expression des canaux ioniques qui régissent les potentiels d'actions ventriculaires humain et murin est différente et explique la différence de morphologie entre les deux types de potentiels d'action (Nerbonne, 2004) (Figure 6B).

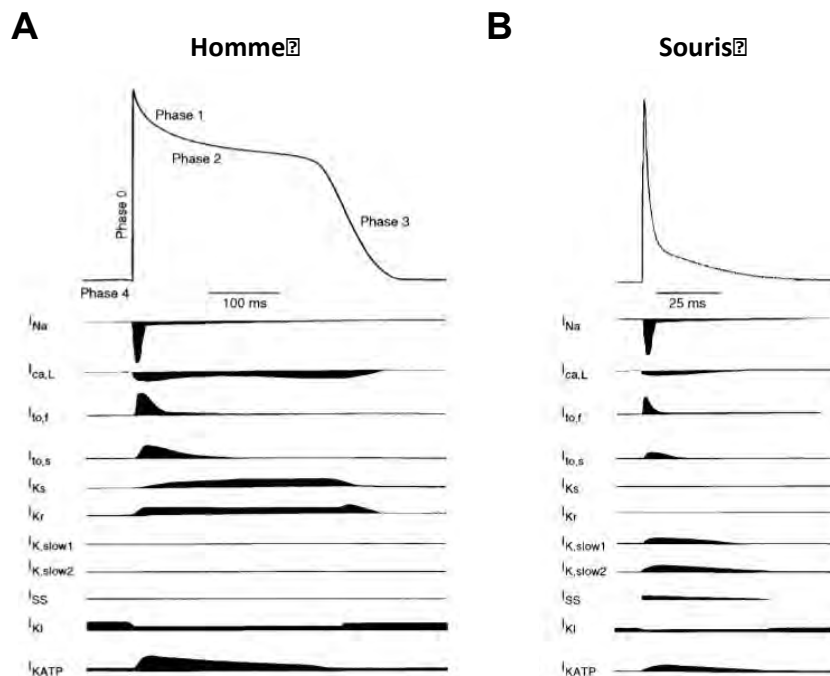


Figure 6 : Potentiel d'action humain (A) et murin (B) et courants ioniques impliqués. La phase 0 correspond à la dépolarisation rapide portée par le courant I_{Na} . La phase 1 de repolarisation précoce est portée par les courants I_{to} ainsi que par l'inactivation du courant sodique I_{Na} . La phase 2 de plateau, absente chez la souris est portée par les courants $I_{Ca,L}$ et $I_{Na/Ca}$. La phase 3 de repolarisation est portée par les courants potassiques I_{Ks} et I_{Kr} . Ces courants sont pratiquement absents chez la souris alors qu'ils ont un rôle important dans la phase de repolarisation humaine. Le maintien du potentiel de repos est assuré par les courants I_{K1} et $I_{Na/K}$. D'après Nerbonne, 2004.

Comme nous avons pu le voir précédemment, l'expression du canal sodique n'est pas homogène au sein du myocarde. De nombreuses études se sont intéressées à la densité relative du courant sodique dans les différentes parties du myocarde ventriculaire sur des modèles animaux. Les résultats expérimentaux restent assez contradictoires. Deux études ont montré que la densité du courant sodique I_{Na} sur des cardiomyocytes sous-épicaux était diminuée en comparaison avec des cardiomyocytes sous-endocardiques (Ashamalla et al., 2001; Szabó et al., 2005). Dans le même temps, Cordeiro et ses collaborateurs montrent que la densité de courant est homogène au sein du myocarde (Cordeiro et al., 2008) et à l'inverse, dans un modèle de rat, Honen et ses collaborateurs montrent qu'elle est augmentée dans la région sous-épicaux (Honen and Saint, 2002). Une réduction de la densité de courant sodique au niveau épicaux aurait pour conséquence une réduction de la vitesse de conduction mais aussi un raccourcissement de la durée du potentiel d'action. Physiologiquement, au vu des enregistrements de potentiels d'action *in situ*, l'hypothèse d'une réduction du courant dans les cardiomyocytes sous-épicaux est privilégiée.

La somme des activités électriques cellulaires peut être enregistrée par l'électrocardiogramme de surface (ECG). Ainsi, sur un ECG humain, la première onde positive sur la dérivation périphérique DI correspond à la dépolarisation des oreillettes, c'est l'onde P. Le complexe QRS reflète la dépolarisation complexe autant dans le temps que dans l'espace des ventricules et la dernière onde positive, l'onde T traduit elle la repolarisation des ventricules (Figure 7). Il est donc possible à la vue d'un ECG de détecter une anomalie de fonctionnement du canal sodique Nav1.5. Par exemple, un élargissement de l'intervalle QRS est le signe de troubles de la conduction ventriculaire liés à une perte de fonction du canal sodique alors qu'un allongement de l'intervalle QT peut être le signe d'un gain de fonction pour Nav1.5 entraînant un syndrome du QT long.

D'un point de vue plus moléculaire et biophysique, l'activation du canal sodique Nav1.5 met en jeu le mouvement des 4 segments S4 en fonction de la différence de potentiel entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule (Catterall, 2012). Les mécanismes complexes de l'activation sont aujourd'hui bien caractérisés et ne seront pas abordés en détail dans cette thèse. Cependant, notons que la notion d'activation du canal sodique remonte aux débuts de l'électrophysiologie cellulaire puisque Hodgkin et Huxley ont postulé en 1952 que l'activation nécessitait le mouvement de charges positives au travers de la membrane plasmique (Hodgkin and Huxley, 1952). Les mécanisme d'activation du canal et sa sélectivité au sodium sont traités de façon détaillée dans la revue récente de Catterall, 2014. Lorsque l'on s'intéresse au canal sodique, on parle par abus de langage et par simplification de 3 états conformationnels, fermé, ouvert et inactivé. Ces 3 états ne sont pas faux puisque c'est ainsi que Hodgkin et Huxley (Hodgkin and Huxley, 1952) ont défini pour la première fois le mécanisme, mais on sait aujourd'hui qu'ils regroupent plusieurs sous-états. A l'heure actuelle, trois modèles basés sur l'existence de 3 états fermés et un état

ouvert et se différencient sur le nombre d'états inactivés (1, 3 ou 4) (Ulbricht, 2005).

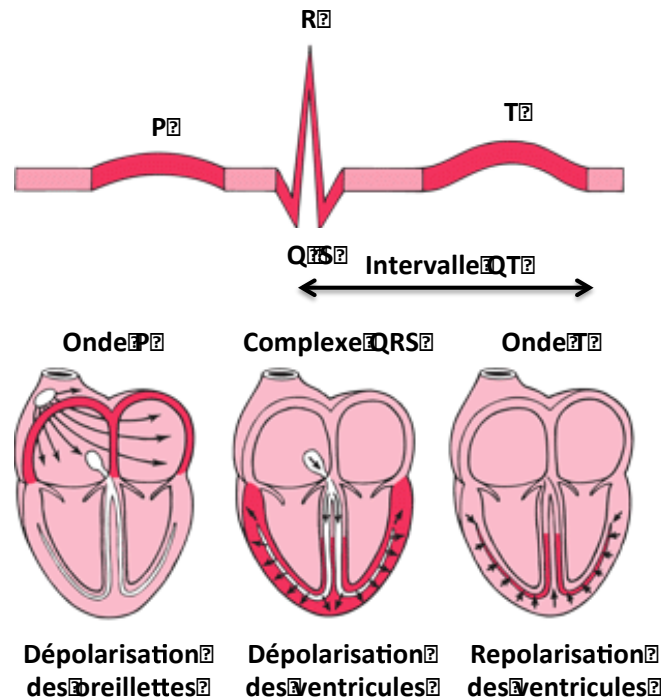


Figure 7 : Représentation schématique de l'électrocardiogramme (ECG) humain. La dépolarisation qui naît au niveau du nœud sinusal se propage dans l'ensemble des oreillettes, c'est l'onde P. La dépolarisation se propage au travers du nœud atrio-ventriculaire pour dépolariser les ventricules (complexe QRS) de l'apex vers la base et de l'endocarde vers l'épicarde. La repolarisation des ventricules se fait ensuite de la base vers l'apex et de l'épicarde vers l'endocarde, c'est l'onde T. La repolarisation des oreillettes est noyée dans le complexe QRS.

Dans cette thèse je ne m'intéresse pas aux régulations du canal sodique par les diverses phosphorylations et glycosylations. Cependant, il faut savoir qu'elles ont un rôle majeur dans la physiologie du canal. La N-glycosylation du canal a été montrée *in vitro* et en conditions pathologiques comme modifiant les dépendances au potentiel de l'activation et de l'inactivation du canal (Zhang et al., 1999; Cohen and Levitt, 1993; Ufret-Vincenty et al., 2001). Les phosphorylations du canal sont plus complexes et plus nombreuses. Ainsi la phosphorylation dépendante de la PKA aurait un rôle dans l'adressage du canal à la membrane et aurait pour effet d'augmenter la densité de courant sodique (Murphy et al., 1996; Zhou et al., 2000; Frohnwieser et al., 1997). Les phosphorylations dépendantes de la PKC sont encore mal comprises, elles peuvent augmenter ou diminuer l'amplitude du courant et modifier les sensibilités au potentiel de l'activation et de l'inactivation (Watson and Gold, 1997; Qu et al., 1994). D'autres kinases telles que la Calcium-Calmoduline Kinase II (CaMKII) et les tyrosines kinases ont aussi des effets modulateurs de la fonction de Nav1.5 (Rook et al., 2012; Sag et al., 2014)

1.4.2 LE COURANT SODIQUE : UNE INACTIVATION EN 2 ETAPES

Au cours d'une dépolarisation, le canal sodique s'inactive lentement, le rendant « non activable » pour un certain temps. L'inactivation du canal sodique débute au même potentiel que son activation, la différence majeure de cinétiques étant responsable de la forme du courant sodique. D'un point de vue physiologique, une fois dans un état inactivé les canaux ne peuvent s'activer de nouveau avant un certain temps, qui correspond au temps de la levée de l'inactivation et détermine la période réfractaire (Balser, 2001).

L'inactivation du canal Nav1.5 se décompose en deux étapes : (1) une inactivation rapide, et (2) une inactivation lente.

1.4.2.1 L'inactivation rapide

Plusieurs régions du canal sont impliquées dans son inactivation rapide (10 ms). Le mouvement du segment S4 du domaine DIV lors de l'activation du canal initie le processus d'inactivation. L'inactivation du canal sodique met aussi en jeu le mouvement de la boucle entre les domaines DIII-DIV (Stühmer et al., 1989). Le troisième partenaire est la boucle qui relie les segments S3 et S4 des domaines DIII et DIV (Vassilev et al., 1988). Par la suite de nombreuses études ont précisé la région de la boucle DIII-DIV impliquée dans ce processus. Le domaine IFM (Isoleucine, Phénylalanine et Méthionine en position 1488-1490) de cette boucle est central dans ce mécanisme (West et al., 1992). Les glycine et proline situées à proximité du domaine IFM servent au repliement du domaine IFM dans le pore du canal (Kellenberger et al., 1996). On parle de mécanisme en « *hinged lid* ». Le domaine IFM est stabilisé par des interactions avec les boucles intracellulaires entre les segments S4 et S5 des domaines DIII et DIV (Catterall, 2014; Balser, 2001). L'utilisation d'anticorps contre la boucle DIII-DIV bloque le mécanisme d'inactivation rapide et inversement, l'utilisation intracellulaire du peptide KIFMK restaure l'inactivation (Tikhonov and Zhorov, 2007). Une fois le processus enclenché, l'interaction avec la partie C-terminale stabilise l'état d'inactivation rapide (Nguyen and Goldin, 2010; Motoike et al., 2004).

1.4.2.2 L'inactivation lente

Après une dépolarisation prolongée, l'inactivation lente des canaux sodiques se fait avec des constantes de temps de l'ordre de la centaine de millisecondes à la seconde. Elle a été montrée pour la première fois sur une préparation d'axone géant de Calmar (Adelman and Palti, 1969). Le mécanisme de l'inactivation lente du canal sodique est moins bien connu que celui de l'inactivation rapide. Ceci rend confuse sa dénomination. On parle indifféremment d'inactivation intermédiaire, lente ou bien ultra-lente, une troisième composante de l'inactivation étant parfois même supposée. Cependant, des études ont montré que cette inactivation n'était pas liée à l'inactivation rapide du canal. En effet, des mutations abolissant l'inactivation rapide n'affectent pas l'inactivation lente (Vedantham and Cannon, 1998; Featherstone et al., 1996). L'utilisation de formes mutées au niveau du filtre de sélectivité du canal (motif DEKA) (Hilber et al., 2005; Todt et al., 1999), des segments S6 et de la partie C-terminale du

canal impliquent ces régions dans ce mécanisme (Chen et al., 2006c; Xiao et al., 2005; Pavlov et al., 2005; Vilin et al., 2001; Balser et al., 1996; Hilber et al., 2005; Todt et al., 1999). Expérimentalement, au cours des protocoles de dépolarisations positives, une phase précoce de cette inactivation lente apparaît avec une constante de temps d'environ 20 ms. Une phase plus tardive ou intermédiaire de cette inactivation lente apparaît lorsque les dépolarisations sont répétées à une fréquence de 0,2 Hz à 1 Hz. Le courant sodique se réduit alors et le retour à l'état initial est très lent (Catterall, 2014). Dans le muscle cardiaque, l'inactivation lente n'est jamais complète contrairement à ce que l'on peut observer dans le muscle strié qui est soumis à des dépolarisations plus longues (Vilin et al., 1999).

Le processus d'inactivation du canal ne suit pas obligatoirement son activation. Les canaux sodiques peuvent être dans cet état indifféremment de leur état initial (fermé, activé, inactivé) (Zhou et al., 2001). Lorsque les canaux sont initialement fermés, on parle alors d'état « inactivé-fermé ». Des mutations qui favorisent cet état d'inactivation réduisent fortement l'effet des molécules anti-arythmiques de classe I (Balser, 2001).

1.4.3 LES COURANTS SODIQUES RETARDES

La notion de courant sodique retardé est assez variable dans la littérature. On retrouve les notions de « *sustained current* I_{sus} » ou de « *persistent current* I_{pst} » ou bien encore de « *late current* $I_{Na,late}$ ». Ces courants, souvent considérés comme un seul et unique courant sodique retardé, sont impliqués dans différentes formes du syndrome du QT long de type 3. Cependant, leurs mécanismes ne sont pas identiques et il est important de bien comprendre les différences qu'ils imposent.

1.4.3.1 Courant sodique retardé ou courant sodique persistant ?

Comme nous l'avons vu précédemment, les canaux sodiques s'activent au cours du potentiel d'action cardiaque et sont inactivés à 99% à la fin de la phase 1 du potentiel d'action cardiaque. Ils ne peuvent alors être réactivés qu'après la levée d'inactivation qui se fait au cours de la phase 4 du potentiel d'action. Cependant, une très faible partie des canaux sodiques peuvent être réactivés au cours de la phase 3 du potentiel d'action. Le courant généré par ces canaux (moins de 1% du courant sodique généré pendant la phase 0) est appelé « le courant de fenêtre ». Ce courant de fenêtre correspond à la gamme de potentiel où se croisent les courbes d'activation et d'inactivation du canal à l'état stable (Figure 8). Dans des conditions purement expérimentales, si le potentiel membranaire est maintenu constant dans cette gamme de potentiels, ce courant de fenêtre peut résulter d'un courant à l'état stable (Moreno and Clancy, 2012).

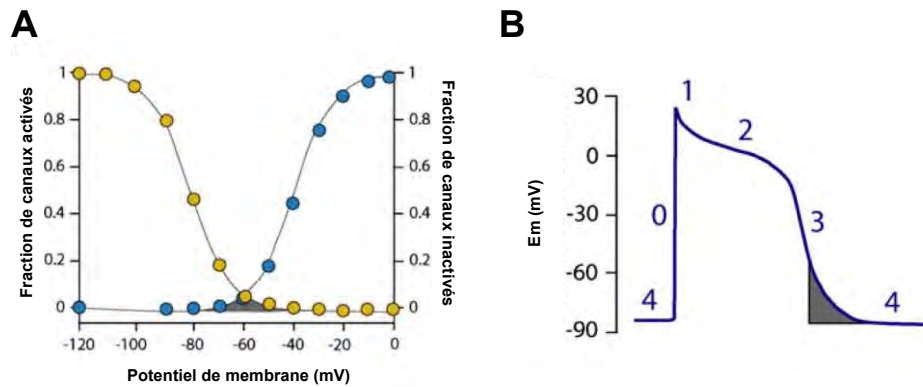


Figure 8 : Le courant de fenêtre sodique. A. Le courant de fenêtre du canal sodique Nav1.5 (gris) correspond à la gamme de potentiel où se croisent les courbes d'activation (bleu) et d'inactivation (jaune). B. Le courant de fenêtre intervient au niveau de la fin de la phase 3 du potentiel d'action cardiaque. D'après Amin et al., 2009.

Trois mécanismes ont été mis en évidence pour expliquer l'augmentation du courant de fenêtre (Figure 9). Le premier est un décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus dépolarisés (Wedekind et al., 2001). Le second est un ralentissement de la cinétique d'inactivation du canal (Wang and Wang, 1996). Le troisième mécanisme a été mis en évidence par Groenewegen et ses collaborateurs lors de l'étude de la mutation I1768V sur le canal sodique (Groenewegen et al., 2003). Au cours de la phase de repolarisation d'un potentiel d'action, l'augmentation du courant de fenêtre peut être la conséquence du mécanisme de « *non equilibrium gating* ». Ce mécanisme est la conséquence d'une réactivation plus rapide des canaux sodiques. (Clancy, 2003).

L'augmentation du courant de fenêtre est corrélée avec le risque d'induire des activités déclenchées arythmogènes (Zeng and Rudy, 1995). La gamme de potentiels de ce courant de fenêtre est très réduite en conditions physiologiques ce qui minimise son rôle dans le décours du potentiel d'action (Makielski and Farley, 2006) mais certaines des mutations sur le canal Nav1.5, impliquées dans le syndrome du QT long de type 3 (L619F, N1325S et R1644H), induisent une augmentation majeure du courant de fenêtre, en amplitude et en gamme de potentiel, pouvant être causale dans le phénotype des patients (Wehrens et al., 2003; Wang et al., 1996).

Dans des conditions physiologiques, l'inactivation sodique n'est jamais totalement complète, le courant sodique résiduel est appelé « courant sodique persistant ($I_{Na,late}$) » (Maier and Sossalla, 2013; Noble and Noble, 2006; Zaza et al., 2008) (Bennett et al., 1995). Ce courant est négligeable, environ 0,1% du courant sodique au pic. Il est la conséquence de la réouverture des canaux sodiques durant la phase de dépolarisation. Cette réouverture se fait selon 2 mécanismes : un premier mécanisme de « *burst openings* » et un second d'ouverture tardive aléatoire (Maltsev and Undrovinas, 2008). Ce courant a été assez bien caractérisé dans chez les patients atteints de syndrome du QT long de type 3 grâce aux inhibiteurs sodiques tels que la Ranolazine ou la Mexiletine qui réduisent de manière importante l'intervalle QTc en bloquant préférentiellement le courant persistant par rapport au courant sodique au

pic (Benhorin et al., 2000; Moss et al., 2008).

La majorité des mutations dites « gain-de-fonction » se manifeste par un ralentissement de l'inactivation rapide du canal, induisant un courant sodique persistant (I_{sus} ou I_{pst} suivant les publications). Il est important de faire la différence entre ces mutations et celles dont l'inactivation ne sera pas totale. Suivant le temps au cours de la dépolarisation où l'on mesure ce courant résiduel, on s'intéressera à l'un ou l'autre des mécanismes. La mesure du courant sodique persistant, pour lequel l'inactivation est incomplète, s'effectue après plus de 300 ms de dépolarisation. Toutes les mesures faites autour de 100 ms de dépolarisation surestiment ce courant en prenant en compte le ralentissement de la cinétique d'inactivation.

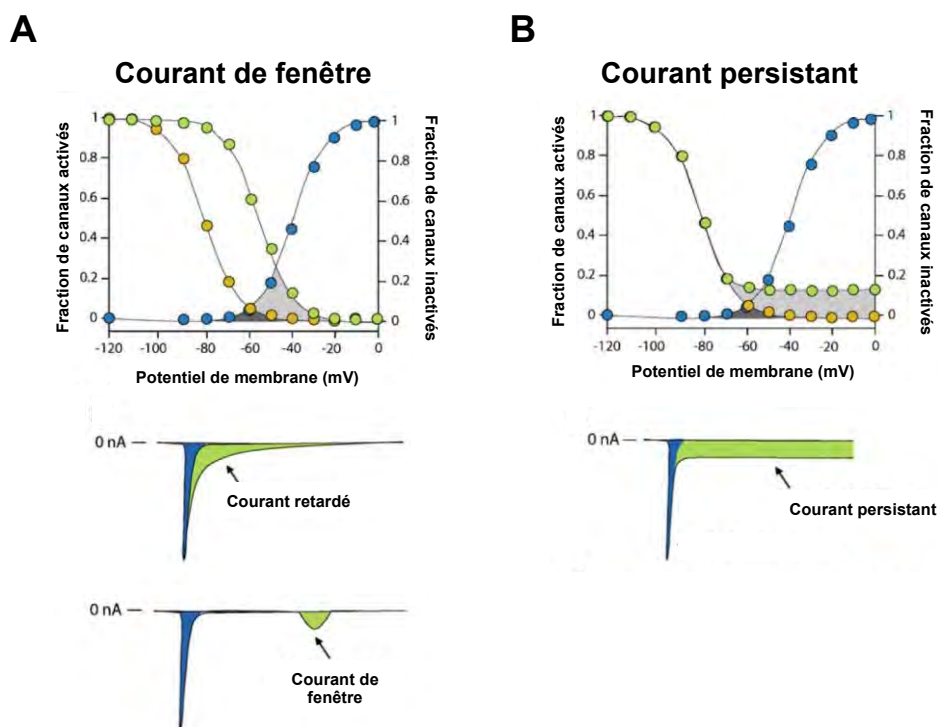


Figure 9 : Courant de fenêtre ou courant persistant. A. L'augmentation du courant de fenêtre peut être la conséquence d'un décalage de la courbe d'inactivation ou d'une inactivation ralentie. On parle alors de courant retardé. B. Le courant persistant implique une inactivation non totale sans décalage obligatoire de la courbe d'inactivation. D'après Amin et al., 2009.

Courant de fenêtre, courant retardé et courant persistant sont très différents d'un point de vue fonctionnel mais ont des conséquences arythmiques communes au cours des phases 2 et 3 du potentiel d'action cardiaque. Ils maintiennent une dépolarisation des cardiomyocytes (en défaveur des courants potassiques repolarisants) ce qui retarde la repolarisation et induit des troubles du rythme tels que les post-dépolarisations précoces (EADs) qui sont connues pour déclencher de troubles du rythme ventriculaire tels que des torsades de pointes (Yan et al., 2001).

1.4.3.2 Régulation physiologique et pharmacologique du courant sodique persistant

De manière physiologique, les sous-unités β régulatrices de Nav1,5 augmentent le courant sodique retardé en ralentissant les cinétiques d'inactivation (Maltsev et al., 2009). De la même manière, tous les régulateurs de Nav1.5 qui vont ralentir ou décaler l'inactivation vers des potentiels plus positifs, vont augmenter ce courant. Le courant persistant, qui est minime en conditions physiologiques, est régulé positivement par la CaMKII et par la PKC (Ma et al., 2012). L'action de la CaMKII sera discutée par la suite, mais il est important de noter qu'elle est activée par le calcium intracellulaire mais aussi par l'oxydation, la forme Ox-CamKII étant capable d'augmenter le courant sodique persistant. Ward et ses collaborateurs ont montré en 1997 que les espèces réactives de l'oxygène et, plus particulièrement le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , ralentissaient l'inactivation sodique et augmentaient le courant sodique persistant (Ward and Giles, 1997; Sag et al., 2013).

D'un point de vue pharmacologique, le courant sodique persistant peut être induit par de nombreuses toxines telle que l'ATX-II (*Sea Anemonia Toxin*) (Mantegazza et al., 1998) ou par les alcaloïdes tels que la Veratridine (Zong et al., 1992). Ces molécules ont pour effet de ralentir et/ou de limiter l'inactivation des canaux sodiques. L'ATX-II, par exemple, augmente le courant sodique persistant sans pour autant augmenter le courant de fenêtre. Le courant I_{Na} persistant est bloqué par l'ensemble des inhibiteurs connus pour le canal sodique (TTX, STX, Cd^{2+} , Flécainide, Lidocaine, Quinidine, Mexiletine, etc....) (Sicouri et al., 1997; Maltsev et al., 2007; Nagatomo et al., 2000; Maltsev et al., 1998). Cependant ces inhibiteurs ne discriminent pas le courant au pic du courant persistant. La Ranolazine est actuellement l'inhibiteur le plus spécifique du courant persistant vis-à-vis du courant au pic (Fredj et al., 2006). La Ranolazine discrimine le courant persistant mais bloque aussi d'autres courants (potassiques et calciques) dans de moindres mesures (Antzelevitch et al., 2004). D'autres inhibiteurs tels que le F15845 (Bocquet et al., 2010) et le GS-(485)967 (Belardinelli et al., 2013) ont été développés avec une spécificité accrue pour le courant persistant. Ils doivent être mieux caractérisés dans les années à venir (Figure 10).

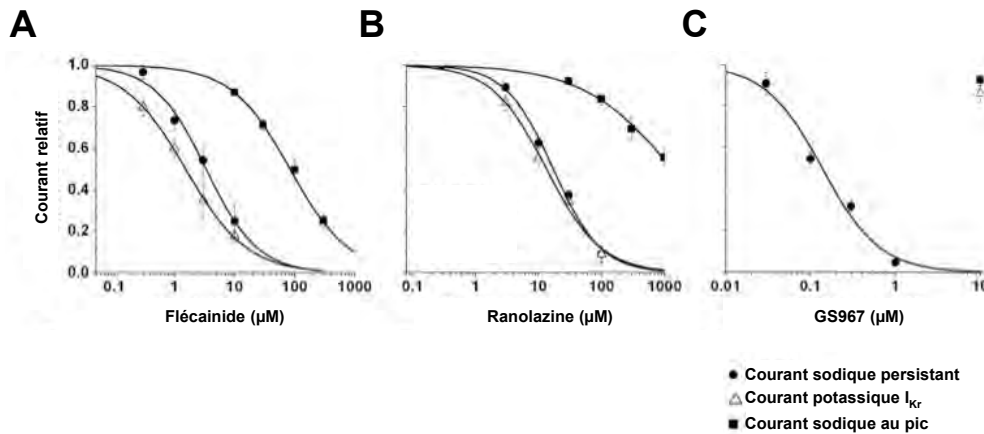


Figure 10 : Courbes doses-réponse de la Flécaïnide (A), de la Ranolazine (B) et du GS-967 (C) sur les courants ioniques sodiques et potassiques. Contrairement à la Flécaïnide et à la Ranolazine qui, aux doses efficaces pour bloquer de manière significative le courant sodique persistant, affectent fortement le courant I_{K_r} et touchent aussi le courant sodique au pic, le GS967 ne semble pas avoir ces effets délétères. D'après Belardinelli et al., 2013.

1.4.3.3 Pertinence de la Ranolazine pour l'étude des conséquences pathologiques du courant sodique persistant

Deux revues récentes (Pourrier et al., 2014; Papp et al., 2014) discutent de la pertinence du courant sodique persistant et de son lien de causalité avec le développement de cardiomyopathies. Il est admis qu'une augmentation du courant sodique persistant induit une élévation du calcium intracellulaire et *in fine* des troubles du rythme associés à une dysfonction ventriculaire (Shryock et al., 2013; Zaza and Rocchetti, 2013). Une perfusion de Ranolazine à des patients LQT3 permet une réduction de l'intervalle QTc ainsi qu'une amélioration des paramètres de relaxation (Moss et al., 2008). L'implication du courant sodique dans d'autres pathologies a été démontrée dans une étude de Sossalla et ses collaborateurs, dans laquelle la Ranolazine augmente la relaxation myocardique sur des prélèvements de cœurs humains en insuffisance cardiaque (Sossalla et al., 2008). Dans un autre contexte pathologique qu'est l'hypertension artérielle, il a été montré que le courant sodique persistant était augmenté et qu'après 3 mois de traitement avec la Ranolazine, l'hypertrophie cardiaque était ralentie et le cycle calcique revenu à un état basal (Aistrup et al., 2013). L'ensemble de ces études montrent un rôle clé du courant sodique persistant et ce, bien au delà de ses conséquences rythmiques.

Cependant, il est vrai que la Ranolazine a d'autres cibles pharmacologiques que le canal sodique cardiaque aux concentrations utilisées (Antzelevitch et al., 2004). Parmi ces cibles, on trouve les canaux calciques de type L qui sont responsables d'une grande partie de l'entrée du calcium dans la cellule. Leur inhibition, à elle seule, peut réverser les processus de dysfonction diastolique. Un effet de la Ranolazine sur la sensibilité des myofilaments au calcium a aussi été démontré (Lovelock et al., 2012). La Ranolazine est aussi un inhibiteur de l'oxydation des acides gras qui limite l'entrée de H^+ dans la cellule. Cette spécificité d'action est à la base de son utilisation comme molécule anti-ischémique. Deux

autres études confirment que l'utilisation de Ranolazine améliore la fonction cardiaque sans pour autant faire de lien direct avec le courant sodique persistant (Sabbah et al., 2002; Rastogi et al., 2008). L'essai clinique RALI-DHF qui a pour but de démontrer l'effet de la Ranolazine dans le traitement de la dysfonction diastolique ne semble pas montrer d'effet majeur sur l'amélioration des paramètres de relaxation myocardique (Maier et al., 2013).

Une étude récente réalisée sur des cardiomyocytes de chien montre que le courant persistant n'est pas uniquement dû aux canaux Nav1.5. En effet, en utilisant du MTSEA (2-aminoethyl methanethiosulfonate) qui bloque de manière irréversible les canaux Nav1.5 de manière spécifique, Biet et ses collaborateurs montrent que les canaux sodiques « non cardiaques » ont un rôle non négligeable dans le courant persistant (Biet et al., 2012).

2 LES PARTENAIRES DE NAV1.5

Nav1.5 a un rôle de canal à part entière mais n'est pas isolé dans la membrane plasmique. Il fait partie d'un complexe macromoléculaire qui comprend des protéines régulatrices de son activité intrinsèque, des protéines régulatrices de sa stabilité membranaire, des protéines d'adhésion et des protéines de communication intercellulaire (Tableau 1). Je ne ferai pas ici de revue exhaustive de ces protéines, je me concentrerai sur les plus pertinentes dans la physiopathologie de nos modèles murins.

2.1 LES PROTEINES REGULATRICES DE NAV1.5

2.1.1 LES SOUS-UNITES BETA REGULATRICES

Les sous-unités β régulatrices sont composées d'un domaine transmembranaire avec une courte séquence C-terminale et un grand domaine N-terminal. Ce domaine N-terminal joue un rôle majeur dans les processus d'adhésion (superfamille des immunoglobulines) (Isom and Catterall, 1996). Ce domaine facilite l'interaction des cellules avec la matrice extracellulaire et régule les processus de migration, d'agrégation cellulaire et d'interaction matrice/cytosquelette (Isom, 2002). Les sous-unités β régulatrices sont aussi impliquées dans la localisation différentielle de Nav1.5 entre les membranes latérales et les disques intercalaires (Amin et al., 2010).

La sous-unité $\beta 1$ est codée par le gène *SCN1B* qui est exprimé dans les tissus cardiaques et neuronaux (Qu et al., 1999; Qin et al., 2003; Watanabe et al., 2009) sous la forme de 2 isoformes (218 aa et 268 aa) (Watanabe et al., 2008). La régulation du canal Nav1.5 via la sous-unité $\beta 1$ se fait selon 2 mécanismes : le premier passe par l'interaction entre Nav1.5 et $\beta 1$ (Dhar Malhotra et al., 2001) et le second via l'interaction entre $\beta 1$ et l'ankyrine B (Malhotra et al., 2000). Les effets de la sous-unité $\beta 1$ sur le courant sodique sont assez discutés mais il apparaît qu'elle a pour effet d'augmenter la densité de courant I_{Na} et de diminuer le courant sodique persistant dans des modèles de réexpression (Nuss et al., 1995; Valdivia

et al., 2002; Maltsev et al., 2009) mais aussi dans un modèle murin invalidé pour le gène *Scn1b* (Lopez-Santiago et al., 2007). Une étude d'ARN interférence sur le gène *Scn1b*, dans un modèle canin d'insuffisance cardiaque, ne montre pas d'effet sur la densité de courant et une diminution du courant sodique retardé (Mishra et al., 2011b). Des mutations sur le gène *SCN1B* ont été associées au syndrome de Brugada, aux troubles de la conduction cardiaque et à la fibrillation atriale corroborant l'effet gain-de-fonction apporté par la sous-unité $\beta 1$ sur Nav1.5 (Watanabe et al., 2009; 2008).

Tableau 2. Partenaires protéiques de Nav1.5.

Protéine	Gene	Interaction avec Nav1.5	Effet de l'interaction
14-3-3 η	<i>YWHAH</i>	Boucle DI-DII	Décalage négatif de l'inactivation, Diminution de la réactivation
α -actinine 2	<i>ACTN2</i>	Boucle DIII-DIV	Augmente le courant au pic
Ankyrine-G	<i>ANK3</i>	Boucle DII-DIII	Augmente la densité et le courant au pic
$\beta 4$ -spectrine	<i>SPTBN4</i>	CaMKII δ	Décalage positif de l'inactivation
Calmoduline	<i>CALM1</i>	Domaine IQ (C-ter), DIII-DIV, EF-hand	Décalage positif de l'inactivation
CaMKII δ iso3	<i>CAMK2D</i>	Boucle DI-DII, $\beta 4$ -spectrine	Décalage négatif de l'inactivation, Augmentation du courant persistant
Connexine 40	<i>GJA5</i>	?	?
Connexine 43	<i>GJA1</i>	?	Augmentation du courant au pic
Desmoglérine 2	<i>DSG2</i>	?	Augmentation du courant au pic
Dystrophine	<i>DMD</i>	Syntrophine	Augmentation du courant au pic
FGF12B,13	<i>FGF12,13</i>	C-terminal, Calmoduline	Décalage positif de l'inactivation, Augmentation de la réactivation
$\lambda 2$ -syntrophine	<i>SNTG2</i>	Domaine PDZ C-terminal	Décalage positif de l'activation
MOG-1	<i>MOG1</i>	Boucle DII-DIII	Augmentation du courant au pic
Nedd4-2	<i>NEDD4l</i>	Domaine PY C-terminal	Augmentation du courant au pic
nNOS	<i>NOS1</i>	$\alpha 1$ -syntrophine	Augmentation du courant persistant
Plakophiline-2	<i>PKP2</i>	Site inconnu	Augmentation du courant au pic, Décalage positif de l'inactivation
PMCA4b	<i>ATP2B4</i>	$\alpha 1$ -syntrophine	Diminution du courant persistant
SAP97	<i>DLG1</i>	Domaine PDZ C-terminal	Augmentation du courant au pic
Telethonine	<i>TCAP</i>	Site inconnu	Décalage négatif de l'activation
PTPH1	<i>PTPN3</i>	Domaine PDZ C-terminal	Décalage négatif de l'inactivation
Utrophine	<i>UTRN</i>	$\alpha 1$ -syntrophine	Diminution du courant au pic
Zasp	<i>LDB3</i>	Telethonine	?

D'après Adsit et al., 2013; Rook et al., 2012.

La sous-unité $\beta 2$ est codée par le gène *SCN2B* qui est exprimée dans les tissus cardiaques adultes, autant au niveau atrial que ventriculaire mais avec une sur-expression au niveau épicaudique (Gaborit et al., 2007). Sa localisation cellulaire est très précise puisqu'elle n'est retrouvée qu'au niveau des disques intercalaires (Maier et al., 2004). La sous-unité $\beta 2$ à globalement les mêmes effets que $\beta 1$ sur le courant sodique en augmentant sa densité à la membrane. Sa sur-expression dans des systèmes hétérologues

semble cependant montrer un décalage vers des potentiels plus négatifs des courbes d'activation et d'inactivation en cas de glycosylation (Johnson, 2006). Comme pour la sous-unité $\beta 1$, une étude d'ARN interférence dans un modèle canin d'insuffisance cardiaque ne montre pas d'effet sur le courant au pic avec cependant une augmentation du courant sodique retardé (Mishra et al., 2011b). Aucune étude n'a encore été faite dans un modèle de souris invalidé pour le gène *Scn2b*.

La sous-unité $\beta 3$, codée par le gène *SCN3B* est exprimée dans les oreillettes et ventricules murins et humains (Valdivia et al., 2009). Elle a été montrée comme interagissant avec Nav1.5 dans des cellules HEK293 et chez la souris mais ceci est très discuté (Fahmi et al., 2001). Il semble que la sous-unité $\beta 3$ interagisse avec la sous-unité $\beta 1$ et que ce soit l'une ou l'autre qui interagisse avec Nav1.5 (Goldin, 2003). La sur-expression de la sous-unité $\beta 3$ dans des oocytes de Xénope affecte positivement la densité de courant sodique en augmentant sa densité, en accélérant la levée d'inactivation et en décalant vers des potentiels plus positifs la courbe d'inactivation (Fahmi et al., 2001). La souris invalidée pour le gène *Scn3b* présente une densité de courant sodique réduite d'environ 30% comparé aux contrôles (Hakim et al., 2008). Des mutations sur le gène *SCN3B* ont été associées au syndrome de Brugada de type 7, et à des cas de fibrillation atriale et ventriculaire (Adsit et al., 2013).

La sous-unité $\beta 4$ est codée par le gène *SCN4B* et est exprimée au niveau neuronal et dans les ventricules de souris (Maier et al., 2004; Cannon and Bean, 2010). Sa sur-expression dans des cellules tsA201 montre qu'elle a un effet gain de fonction sur le courant sodique en décalant vers des potentiels négatifs sa courbe d'activation (Yu et al., 2003). Une mutation sur le gène *SCN4B* a été associée au syndrome du QT long de type 10. Elle a pour conséquence d'induire une augmentation du courant sodique retardé (Medeiros-Domingo et al., 2007).

2.1.2 LE COMPLEXE CALMODULINE / CAMKII

Dans cette partie, je me concentrerai uniquement sur la régulation du courant sodique par la Ca^{2+} -Calmoduline Kinase II. Les implications physiopathologiques de la CaMKII seront abordées par la suite (Partie 3, §6.2.1).

La CaMKII régule le courant sodique I_{Na} de par son activité kinase sur Nav1.5 (Herren et al., 2013). Dans des cardiomyocytes, la CaMKII s'associe avec Nav1.5 avant de le phosphoryler (Wagner et al., 2006). La surexpression de la CaMKII, qu'elle soit chronique via l'utilisation de modèles murins ou transitoire via l'utilisation d'adénovirus, conduit à un gain de fonction puis à une perte de fonction du courant sodique I_{Na} . Yoon et ses collaborateurs ont montré l'effet de la CaMKII endogène sur le courant sodique dans des cardiomyocytes de rat (Yoon et al., 2009). Ils démontrent que la CaMKII décale la courbe d'inactivation du courant sodique vers des potentiels plus négatifs, ralentit l'inactivation rapide des canaux Nav1.5, ralentit la cinétique de levée d'inactivation et augmente le courant sodique persistant (Figure 11). Dans un modèle canin d'insuffisance cardiaque, le ralentissement de la cinétique

d'inactivation au travers de l'activation de la CaMKII est plus marqué sur des cardiomyocytes issus de chiens malades comparé aux chiens sains (Maltsev et al., 2008).

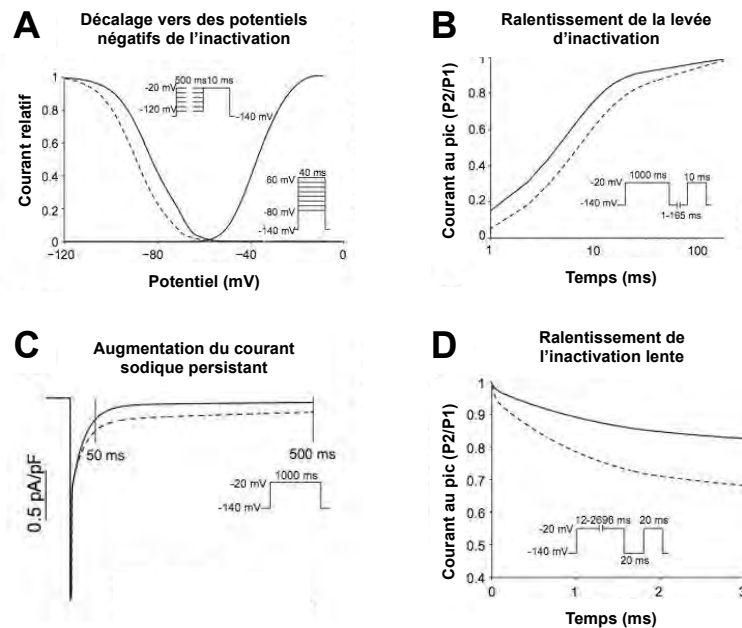


Figure 11 : Régulation du courant sodique par la CaMKII (pointillés). L'interaction entre la canal sodique et la CaMKII a pour effet de décaler vers des potentiels négatifs la courbe d'inactivation (A) et de ralentir la cinétique de levée d'inactivation (B). La CaMKII a aussi pour effet d'augmenter le courant sodique persistant (C) et de ralentir la cinétique de l'inactivation lente du canal sodique. D'après Herren et al., 2013.

Avant d'interagir avec la boucle reliant les domaines I et II de Nav1.5, la CaMKII doit tout d'abord s'autophosphoryler (Ashpole et al., 2012). Parmi les nombreux sites consensus pour la CaMKII sur Nav1.5 (RxxS/T), Hund et ses collaborateurs ont identifié la Ser571 comme étant centrale dans le décalage de la courbe d'inactivation induit par la CaMKII (Hund et al., 2010). Une seule étude infirme ceci (Aiba et al., 2010).

L'inhibition de la CaMKII décale la courbe d'inactivation vers des potentiels plus positifs lors d'une surexpression de la CaMKII dans un modèle de cellules HEK293 (Deschênes et al., 2002) alors que dans un modèle de cellules CHO l'inactivation n'est pas modifiée et l'activation est décalée vers des potentiels plus hyperpolarisés (Young and Caldwell, 2005). Cette différence d'effet en fonction du modèle d'étude montre toute la complexité de la régulation de Nav1.5 par la CaMKII et laisse penser que d'autres protéines différemment exprimées dans ces deux systèmes d'expression interviennent dans cette régulation dépendante de la CaMKII.

2.1.3 LA PROTEINE 14-3-3

La protéine 14-3-3 est une petite protéine d'ancrage qui se présente sous de nombreuses isoformes. Les travaux de Allouis et ses collaborateurs en 2006 ont montré que 14-3-3 η interagissait avec

l'interdomaine I-II de Nav1.5 uniquement sous forme de dimères et ce, principalement au niveau des disques intercalaires (Figure 12). Sur le plan biophysique, 14-3-3 η a pour effet de diminuer légèrement l'amplitude du courant sodique au pic, de décaler vers des potentiels plus négatifs la courbe d'inactivation du canal et de ralentir sa levée d'inactivation. Cela a des conséquences sur le déroulement du potentiel d'action cardiaque en ralentissant la vitesse de dépolarisation maximale (Allouis et al., 2006).

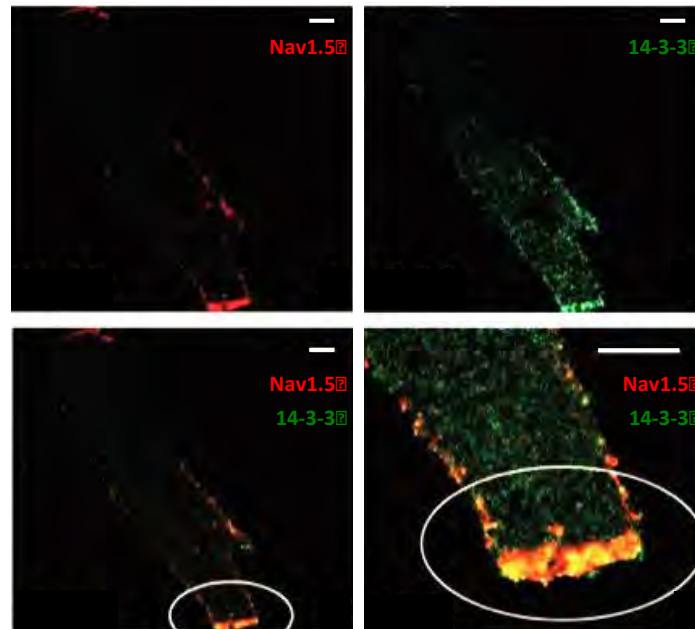


Figure 12 : Colocalisation de Nav1.5 et 14-3-3 dans des cardiomyocytes murins. L'expression de Nav1.5 semble être concentrée au niveau des disques intercalaires (rouge) alors que celle de 14-3-3 (vert) semble plus diffuse dans la cellule. L'interaction entre ces deux protéines semble se faire principalement au niveau des disques intercalaires (jaune). Barre = 10 μ m. D'après Allouis et al., 2006.

En plus de son interaction avec Nav1.5, d'autres protéines telles que la plakophiline-2 et la connexine43 interagissent avec 14-3-3 (Park et al., 2006). Le site d'interaction de ces protéines avec Nav1.5 n'a pas été identifié et l'on peut penser que cette interaction se fait par l'intermédiaire de 14-3-3. Il s'agirait alors d'une protéine clé dans l'interaction entre le canal sodique Nav1.5 et nombre de ses partenaires fonctionnels.

En plus de son rôle de partenaire de Nav1.5, la protéine 14-3-3 est connue pour moduler l'expression de nombreux gènes. Gurusamy et ses collaborateurs ont montré en 2005 qu'une baisse d'expression de la forme active de 14-3-3 était associée à une activation de la voie du TGF β et une augmentation de la synthèse de collagène de type III aboutissant à une fibrose accrue (Gurusamy et al., 2005). Dans un modèle de souris diabétiques, la déplétion de 14-3-3 induit l'expression de CTGF (facteur pro-fibrotique) et exacerbe la fibrose associée (Thandavarayan et al., 2011).

Ces travaux démontrent la complexité d'action de 14-3-3 qui a de très nombreux partenaires et joue un rôle central dans la localisation et la régulation de nombreux canaux et autres protéines régulatrices.

2.2 LES PROTEINES D'ANCORAGE

Le canal sodique Nav1.5 est localisé dans 3 régions des cardiomyocytes : (1) les membranes latérales, (2) les disques intercalaires et (3) les tubules transverses (Shy et al., 2013). La régulation de Nav1.5 et ses interactions protéiques sont très différentes en fonction de sa répartition. Les canaux sodiques étant majoritairement localisés au niveau des disques intercalaires, la conduction cardiaque est anisotrope (Kucera et al., 2002).

La stabilisation de Nav1.5 se fait via son interaction avec des protéines différentes selon qu'il soit localisé au niveau des membranes latérales ou des disques intercalaires. Cependant, l'interaction avec l'ankyrine G a été observée au niveau des deux régions. Lowe et ses collaborateurs ont montré que l'ankyrine G interagissait avec Nav1.5 au niveau de la boucle reliant les domaines II et III et qu'elle adressait le canal Nav1.5 à la membrane des cardiomyocytes autant néonataux qu'adultes. Ils ont aussi pu démontrer que l'interaction avec l'ankyrine G était indispensable à l'adressage du canal au niveau des disques intercalaires et participait à la stabilisation du canal dans la membrane plasmique (Lowe et al., 2008).

2.2.1 NAV1.5 SUR LES DISQUES INTERCALAIRES

Au niveau des disques intercalaires, le canal Nav1.5 est localisé très proche des desmosomes (Cerrone and Delmar, 2014) et la littérature récente fait émerger l'idée d'un regroupement des canaux sodiques avec les desmosomes et les jonctions communicantes. Petitprez et ses collaborateurs ont récemment montré que la stabilisation de Nav1.5 au niveau des disques intercalaires se faisait via son interaction avec la protéine SAP97 et non pas avec le complexe syntrophine/dystrophine (Petitprez et al., 2011).

Les desmosomes sont une structure dense aux électrons formée au niveau de la zone d'interaction entre cellules. Ils sont composés de protéines transmembranaires et de protéines de stabilisation qui permettent l'interaction avec les filaments intermédiaires. Les travaux de Sato et ses collaborateurs ont montré récemment une perte de fonction du canal sodique en lien avec une perte d'expression d'une de ces protéines de stabilisation, la plakophiline2 (Sato et al., 2009). Cette démonstration confirme le rôle de l'interaction directe ou indirecte mais dans tous les cas fonctionnels entre les protéines stabilisatrices et le canal sodique Nav1.5 au niveau des disques intercalaires.

2.2.2 NAV1.5 SUR LES MEMBRANES LATERALES

En utilisant un modèle murin déficient pour la dystrophine, protéine sous membranaire à l'interface entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette, Gavillet et ses collaborateurs ont montré que le canal

sodique interagissait avec le complexe syntrophine/dystrophine (Figure 13) et que le courant sodique était réduit en l'absence de dystrophine (Gavillet et al., 2006). Par la suite il a été montré que cette interaction se faisait uniquement au niveau des membranes latérales où est exprimée le complexe syntrophine/dystrophine. Ces travaux ont confirmé que la baisse du courant sodique observée dans le modèle *mdx*, déficient pour la dystrophine, résultait de la perte des canaux Nav1.5 au niveau des membranes latérales uniquement (Petitprez et al., 2011).

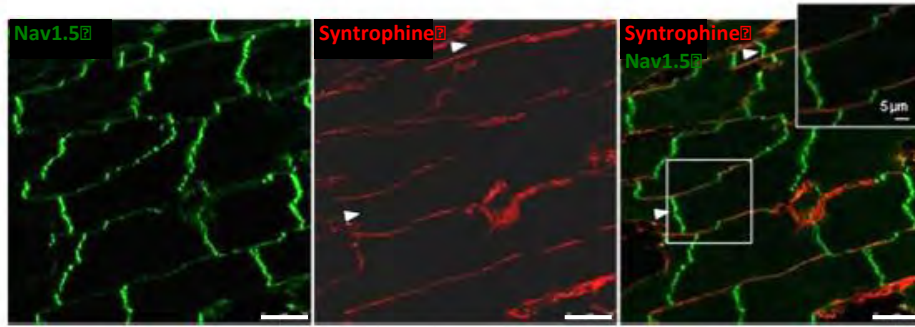


Figure 13 : Nav1.5 sur les membranes latérales de cardiomyocytes. Nav1.5 (vert) est exprimé au niveau des membranes latérales et des disques intercalaires. La syntrophine (rouge) est quant à elle exprimée uniquement au niveau des membranes latérales. La colocalisation de Nav1.5 avec la syntrophine montre que le canal Nav1.5 interagit avec le complexe Syntrophine/Dystrophine uniquement au niveau de la membrane latérale des cardiomyocytes. Les flèches montrent les disques intercalaires dépourvus de syntrophine. Barre = 20 µm Petitprez et al., 2011.

Bien que la conduction soit anisotrope, c'est à dire favorisée dans le sens longitudinal, la population de canaux sodiques présents au niveau des membranes latérales a un rôle important mais pas encore parfaitement compris. La perte d'expression de Nav1.5 au niveau des membranes latérales n'a pas d'effet sur la conduction anisotrope des cardiomyocytes (Figure 14). Cependant au niveau cardiaque, les souris *mdx* présentent un ralentissement de la conduction ventriculaire marqué par un allongement de l'intervalle QRS (Petitprez et al., 2011). Ces données fonctionnelles confirment un rôle physiologique important des canaux Nav1.5 localisé dans les membranes latérales.

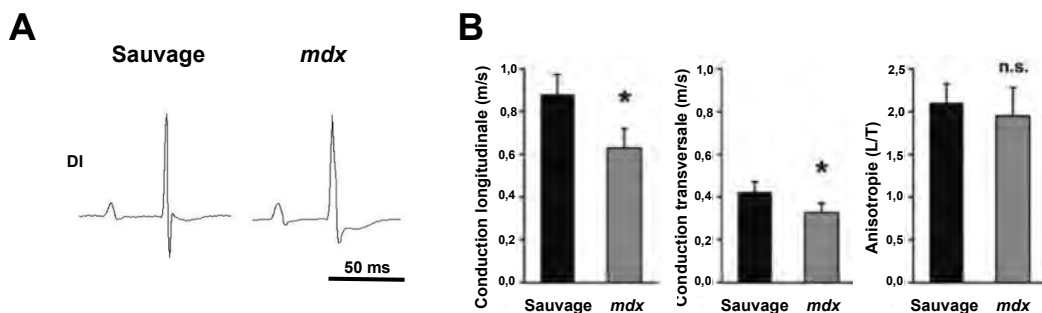


Figure 14 : Troubles de la conduction chez les souris *mdx*. A. ECG caractéristique des souris *mdx* montrant un allongement du complexe QRS. Barre = 50 ms. D'après Gavillet et al., 2006 B. La perte de Nav1.5 sur les membranes latérales réduit les vitesses de conduction mais ne modifie pas l'anisotropie. D'après Petitprez et al., 2011.

Le complexe syntrophine/dystrophine est très important dans l'organisation du cytosquelette de la cellule et on peut aisément imaginer qu'une modification de l'interaction entre Nav1.5 et ce complexe perturbe l'organisation du réseau protéique sous-membranaire et ait des conséquences structurales et non pas tant électriques. Bien que les souris *mdx* présentent un élargissement du QRS, celui-ci n'est pas majeur et pourrait aussi bien être la conséquence d'un remodelage protéique induit par le remodelage du cytosquelette. Le rôle de Nav1.5 comme protéine d'ancrage ou tout du moins comme partie d'un complexe protéique intervenant dans la structure cardiaque est ici clairement avancé.

La répartition des canaux Nav1.5 à trois endroits distincts de la cellule n'est pas toujours retrouvée. Seuls les canaux situés au niveau des disques intercalaires et des membranes latérales ont actuellement été caractérisés (Figure 15). La localisation de Nav1.5 au niveau des disques intercalaires et des membranes latérales semble être admise aussi bien chez le rat (Yarbrough et al., 2002) que chez la souris (Westenbroek et al., 2013) ou encore chez l'homme. Mais certaines études démontrent que Nav1.5 n'est exprimé qu'au niveau des disques intercalaires (Kucera et al., 2002; Maier et al., 2004). Ces différences peuvent être dues à la technique de détection et de préparation des échantillons puisque sur des cardiomyocytes isolés, on a une réorganisation des canaux Nav1.5 à la membrane allant vers une localisation préférentielle au niveau des disques intercalaires.

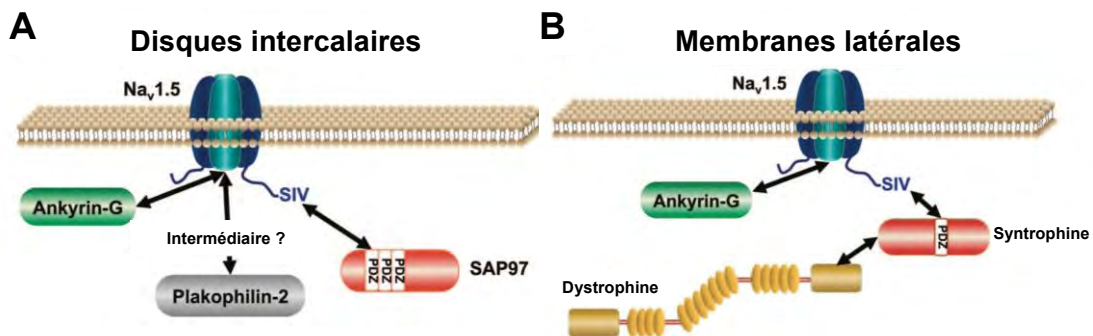


Figure 15 : Les partenaires de Nav1.5 varient en fonction de sa localisation. Au niveau des disques intercalaires (A) Nav1.5 interagit préférentiellement avec la SAP-97 alors que l'interaction avec la syntrophine se fait uniquement au niveau des membranes latérales (B). Ces interactions se font au travers du domaine SIV de Nav1.5 et des domaines PDZ des protéines d'ancrage. SIV : Ser-Ile-Val ; PDZ : domaine de 80-90 acides aminés, acronyme de *Post synaptic density protein (PSD95)*, *Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1)* et *Zonula occludens-1 (ZO-1)*. D'après Petitprez et al., 2011.

2.3 LA CONNEXINE 43 : UN PARTENAIRE PRIVILEGIE DE NAV1.5

Les jonctions communicantes sont essentielles à la propagation de l'influx électrique cardiaque. Parmi les protéines connues pour former des jonctions communicantes ou *gap junctions*, la Connexine 43 (Cx43) est la connexine majoritaire au niveau ventriculaire. Dans cette partie, je me focaliserai

uniquement sur le rôle de la Cx43 dans le cadre de son interaction fonctionnelle et physique avec Nav1.5. D'autres connexines sont exprimées au niveau cardiaque et ont un rôle clé dans la propagation électrique allant du nœud sinusal aux ventricules (pour revue voir (Kurtenbach et al., 2014). L'implication de la Cx43 dans les troubles de la conduction cardiaque sera discutée par la suite.

Les connexines sont composées de 4 segments transmembranaires qui s'assemblent en hexamères homo- ou hétéromériques pour former des connexons. En s'associant aux connexons de la cellule voisine, ils forment des canaux jonctionnels intercellulaires. Les connexons doivent s'assembler en plaques jonctionnelles pour permettre la communication intercellulaire (Figure 16 A). Au travers de ces canaux peuvent passer des petites molécules inférieures à 1 kDa telles que les seconds messagers (AMPc, GMPc), les ions, les miRNA, etc ...

La formation des plaques jonctionnelles a fait l'objet de nombreuses études. Les connexines nouvellement synthétisées sont adressées à la membrane dans de grosses vésicules et s'ajoutent aux plaques existantes par l'extérieur. A l'inverse, les connexines devant être recyclées sortent de la plaque par le centre de celle-ci sous la forme de petites vésicules (Lauf et al., 2002; Gaietta et al., 2002). Les travaux de Johnson sont allés plus loin dans la compréhension des mécanismes d'agrégation. Ils ont pu montrer que les Sérines de la partie C-terminale des connexines étaient essentielles dans la régulation de l'agrégation des plaques (Johnson et al., 2012).

Au niveau cardiaque, la connexine 43 (codée par le gène *Gjal*) est la plus représentée. On la retrouve exprimée dans l'ensemble du myocarde à l'exception du nœud sinusal, du nœud atrio-ventriculaire et du faisceau de His et ses branches proximales (Hervé et al., 2008) (Figure 16 B). Les souris invalidées à l'état homozygote pour le gène *Gjal* meurent quelques heures après leur naissance (Wei et al., 2004). Il semble donc que le rôle de la Cx43 soit essentiel pour le bon fonctionnement du myocarde.

Au niveau des cardiomyocytes, les plaques de Cx43 sont localisées principalement au niveau des disques intercalaires et participent à la propagation de l'influx électrique. Malhotra et ses collaborateurs ont montré que la Cx43 et Nav1.5 interagissent de manière physique (Malhotra, 2004). Une réduction de 50% de l'expression de la Cx43 n'affecte pas la conduction électrique, et seule une diminution drastique de 90% a des répercussions sur la conduction cardiaque, aboutissant à des arythmies ventriculaires (van Rijen, 2004). Ces études ont cependant été réalisées dans des conditions physiologiques et on ne connaît pas l'impact d'une diminution de 50% de l'expression de la Cx43 en cas de trouble de la conduction établi.

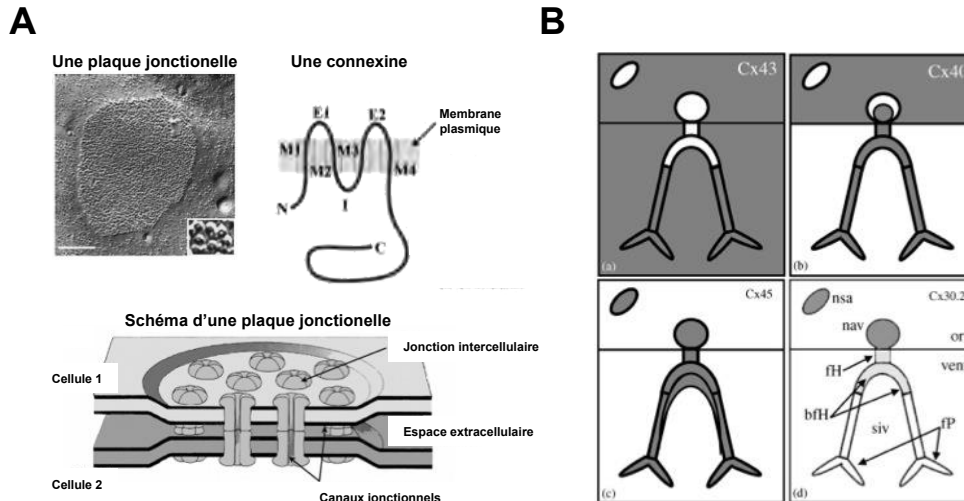


Figure 16 : Les connexines cardiaques. A. Organisation des connexines sous forme de plaques jonctionnelles. En cryofracture (en haut) les plaques apparaissent comme des agrégats. Barre = 2 μm. En insert, on peut voir une dépression au centre des particules formant le pore du canal. B. Expression (en gris) des différentes connexines au sein du myocarde. nsa : noeud sino-atrial ; nav : noeud auriculo-ventriculaire ; or : oreillettes ; vent : ventricule ; fH : faisceau de His ; bfH : branches du faisceau de His ; fP : fibres de Purkinje ; siv : septum interventriculaire. D'après Hervé et al., 2008.

Les travaux de Jansen et ses collaborateurs ont récemment mis en évidence un nouveau rôle de la Cx43 dans la régulation du canal sodique Nav1.5 (Jansen et al., 2012). Ils ont pu montrer que la formation des plaques de Cx43 était nécessaire à la stabilisation du canal sodique au niveau des disques intercalaires. Ainsi, une perte d'expression de la Cx43 aurait non seulement des effets néfastes sur la communication intercellulaire, mais impacterait aussi l'initiation de la dépolarisation cardiaque. Cette étude est corroborée par les travaux de Rhett et ses collaborateurs qui ont montré que les canaux sodiques interagissaient avec la Cx43 située sur les bords des plaques jonctionnelles au niveau du perinexus (Figure 17). Ils démontrent ainsi que le canal Nav1.5 interagit avec la Cx43 non incorporée dans les plaques et donc non fonctionnelle (Rhett et al., 2012).

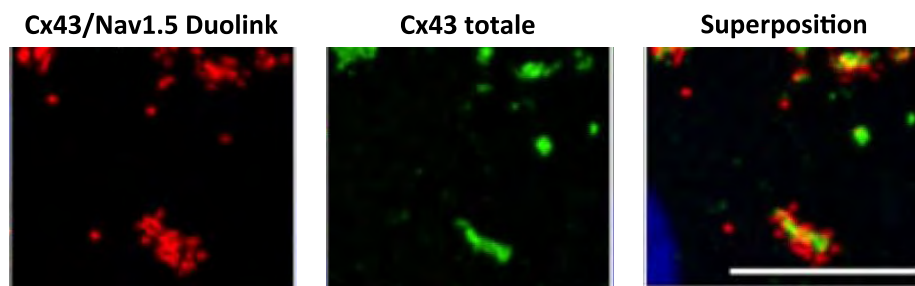


Figure 17 : Colocalisation Cx43 et Nav1.5 au sein du perinexus. Le marquage *duolink* (rouge) reflète l'interaction entre la Cx43 et Nav1.5. Cette interaction ne se fait qu'autour de la plaque dense de Cx43 (vert). Cette zone d'interaction entre Nav1.5 et la Cx43 est appelée le perinexus. Le noyau est marqué en bleu. Barre = 10 μm. D'après Rhett et al., 2012.

Bien que les cardiomyocytes soient majoritaires en volume, les fibroblastes représentent une part importante des cellules cardiaques. Leur rôle dans la physiopathologie cardiaque sera discutée par la suite (Partie 2, §5.2) mais il est important de noter qu'il s'agit de cellules qui expriment la Cx43 bien que son expression soit nettement inférieure à celle observée dans les cardiomyocytes et que le marquage de la Cx43 soit plus ponctiforme, les plaques fonctionnelles ne semblant pas se former (Zhang et al., 2008). L'interaction entre la Cx43 et Nav1.5 n'a pas encore été démontrée dans les fibroblastes cardiaques.

En plus de son implication dans la conduction cardiaque, de nombreuses études montrent d'autres rôles de la Cx43 (Agullo-Pascual and Delmar, 2012). Les travaux de Dai et ses collaborateurs montrent que la Cx43 module positivement la voie de signalisation du TGF β dépendante des Smad. La Cx43 cytosolique rentre en compétition avec les Smad au niveau des microtubules. L'augmentation de la Cx43 libère les Smad ce qui active la voie du TGF β (Dai et al., 2007).

D'un point de vue plus physiopathologique, de très nombreux travaux ont montré un remodelage de l'expression de la Cx43 dans les cardiomyopathies dilatées, hypertrophiques et ischémiques. Le point commun de ces pathologies est la diminution de l'expression de la Cx43 en association avec une hétérogénéité de sa localisation au sein du myocarde, une diminution de la vitesse de conduction cardiaque et le développement de fibrose (Fontes et al., 2012). Les études portant sur la dysplasie arythmogène du ventricule droit (ARVC/D) ont montré que l'expression et l'organisation de la Cx43 étaient remodelées lorsque l'adhésion intercellulaire était perturbée. Dans le cadre de cette pathologie, les plaques de Cx43 sont plus petites et moins nombreuses (Kaplan, 2004) et le couplage intercellulaire est réduit en lien avec une diminution d'expression de la plakophiline-2, protéine clé dans la formation des desmosomes (Oxford et al., 2007).

3 CANALOPATHIES ASSOCIEES A NAV1.5

De nombreuses pathologies cardiaques sont associées à des mutations sur le gène *SCN5A*. On peut classer les pathologies suivant l'effet global des mutations sur le courant sodique. On distingue ainsi des mutations « perte de fonction » qui sont responsables du Syndrome de Brugada et des troubles progressifs de la conduction cardiaque (maladie de Lenègre-Lèv) et des mutations « gain de fonction » responsables du syndrome du QT long de type 3.

Je n'aborderai pas dans cette partie les troubles progressifs de la conduction cardiaque ainsi que le syndrome du QT long de type 3, un chapitre complet leur étant consacré (Partie 2 et 3 respectivement).

3.1 LE SYNDROME DE BRUGADA

Le syndrome de Brugada se caractérise par une élévation de 2 mV du segment ST de manière spontanée

ou induite par l'administration de bloqueurs du courant sodique (l'ajmaline étant classiquement utilisée en clinique) et une inversion de l'onde T sur au moins une dérivation précordiale droite (V1 ou V2) (Priori et al., 2013b). Les patients atteints du syndrome de Brugada ont la particularité d'avoir une forte incidence de mort subite cardiaque tout en ne présentant pas d'anomalie structurale.

Peu de données précises sur la prévalence du syndrome de Brugada ne sont disponibles. Cependant, sa prévalence est plus importante dans la région asiatique. A titre d'exemple, la prévalence atteint 0,5 à 1/1000 au Japon (Priori et al., 2013c). Il est en revanche clairement démontré que le syndrome de Brugada affecte majoritairement (8 à 10 fois plus) les hommes plutôt que les femmes et se manifeste vers l'âge de 40 ans bien que de jeunes enfants aient été diagnostiqués (Antzelevitch et al., 2005).

Martini et ses collaborateurs ont montré en 1989 chez 3 patients atteints de fibrillation ventriculaire idiopathique une sur-élévation du segment ST avec inversion de l'onde T et la présence d'un bloc de branche droit. Ils ont aussi montré des signes d'anomalie structurale au niveau du ventricule droit de ces patients (Martini et al., 1989). La première hypothèse selon laquelle il s'agissait d'une pathologie cardiaque fonctionnelle a été proposée par Brugada et ses collaborateurs. Leur étude décrit dans un groupe de patients atteints de fibrillation ventriculaire idiopathique que 8 de ces patients ont présenté des épisodes de syncope et de mort subite récupérée causés par des arythmies ventriculaires polymorphes (Brugada and Brugada, 1992). Le syndrome de Brugada ainsi décrit représente entre 40% et 60% (200 patients) des fibrillations ventriculaires précédemment considérées comme idiopathiques (Alings and Wilde, 1999).

Seize gènes ont été mis en cause dans le syndrome de Brugada (Brugada et al., 2014). Les mutations sur le gène *SCN5A* représentent environ 20% des cas. Bezzina et ses collaborateurs ont mis en évidence une mutation dans la partie C-terminale de Nav1.5 (1795insD) qui ségrège dans une famille présentant un syndrome de Brugada et un allongement de l'intervalle QT à l'ECG (Bezzina et al., 1999). Ce double phénotype démontre la complexité de la caractérisation des mutations de *SCN5A* et a aussi été retrouvé pour la mutation Y1795H (Rivolta, 2001). Une autre mutation (G1406R) sur le canal sodique conduisant soit au syndrome de Brugada soit à des troubles de la conduction cardiaque dans une même famille a été mise en évidence (Kyndt et al., 2001).

Longtemps considéré comme une maladie monogénique, des facteurs de risque génétique ont été récemment montrés comme pouvant moduler le phénotype (Bezzina et al., 2013). Cette étude ouvre la voie à la compréhension des variations de phénotype observées.

Le mécanisme physiopathologique responsable des arythmies ventriculaires a été très discuté ces dernières années. Au moment de la description de ce syndrome, les frères Brugada ont suggéré que les arythmies étaient causées par une réentrée fonctionnelle induite par une dispersion de la repolarisation ventriculaire (Brugada et al., 1998). Néanmoins, 2 hypothèses s'affrontent, une première dite

« hypothèse de repolarisation » et une seconde dite « hypothèse de dépolarisation ».

La première hypothèse, proposée par Antzelevitch, est basée sur l'existence d'un gradient transmural de repolarisation au sein du ventricule droit (Figure 18 A). La première phase de repolarisation rapide est la résultante de l'inactivation des canaux sodiques et de l'activation des canaux Kv4.2 et Kv4.3 responsables du courant I_{to} . Ce courant potassique est présent dans les cardiomyocytes épicaux mais pratiquement absent dans les cardiomyocytes endocardiques. Le plateau du potentiel d'action résulte de la combinaison de ces courants. Ainsi, la réduction du courant sodique lors d'une mutation perte-de-fonction, peut contribuer à la perte de cette phase de plateau (Antzelevitch et al., 1991; Yan and Antzelevitch, 1998).

La seconde hypothèse proposée par Wilde est basée sur l'hétérogénéité électrique entre la chambre de chasse du ventricule droit (RVOT) et le reste du ventricule droit (Figure 18 B). En effet, le potentiel d'action enregistré dans le RVOT est retardé par rapport à l'ensemble du ventricule droit. Cette différence crée une différence de potentiel membranaire dans le ventricule droit et constitue une source de stimulation pour le RVOT. Sur l'ECG, cela se traduit par une élévation du segment ST en dérivation V2. Lors de la repolarisation, les gradients sont inversés, le potentiel membranaire est plus positif dans le RVOT, la repolarisation a lieu dans le sens inverse. Cette inversion des gradients entre le ventricule droit et le RVOT explique l'aspect biphasique observé dans le syndrome de Brugada, un segment ST positif et une onde T négative. La diminution physiologique de l'expression de Nav1.5 dans la chambre de chasse du ventricule droit en comparaison avec le reste du ventricule droit semble être à l'origine de cette hétérogénéité. En cas de mutation perte de fonction sur le canal sodique, cette hétérogénéité est augmentée et conduit au phénotype pathologique.

Ces deux hypothèses ne sont pas exclusives et sont même assez complémentaires. Elles se rejoignent sur l'origine ventriculaire droite du syndrome de Brugada. Cependant, un des arguments majeurs contre la théorie de la repolarisation est que si l'hétérogénéité de repolarisation était aussi présente, cela conduirait à de très nombreuses arythmies. Les arythmies sont des événements rares pour les patients atteints de syndrome de Brugada. A l'inverse, un des arguments majeurs contre l'hypothèse de la dépolarisation est la normalisation de l'élévation du segment ST à l'ECG lors d'une augmentation du rythme cardiaque. Si les troubles de la conduction étaient majeurs, l'augmentation du rythme aggraverait le phénotype alors que l'on observe sa normalisation (Wilde et al., 2010).

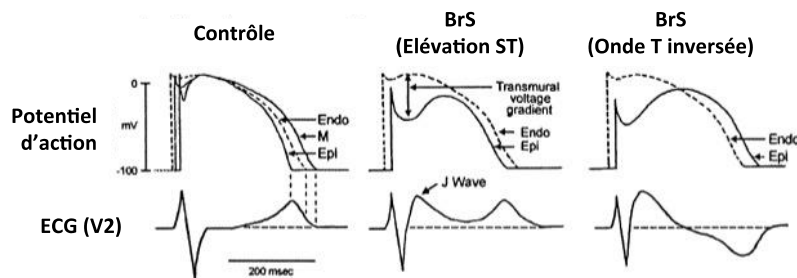
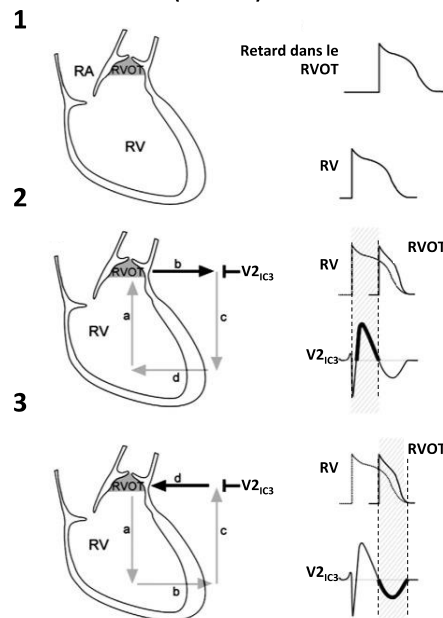
A**Théorie de la repolarisation**
(C.Antzelevitch)**B****Théorie de la dépolarisation**
(A.Wilde)

Figure 18 : Deux hypothèses à l'origine du syndrome de Brugada. A. Hypothèse de la repolarisation. Selon cette hypothèse, le gradient de repolarisation transmural est responsable de l'élévation du segment ST observé sur l'ECG. Endo : endocarde ; M : cellules M ; Epi : épicarde. Naccarelli and Antzelevitch, 2001. B. Hypothèse de la dépolarisation. Selon cette hypothèse, l'hétérogénéité de dépolarisation du RVOT (chambre de chasse du ventricule droit) associée avec la réduction de l'expression de Nav1.5 est à l'origine de l'élévation du segment ST et de l'onde T inversée. RV : ventricule droit. Meregalli et al., 2005.

3.2 LE « SICK SINUS SYNDROME »

La première description de « *sick sinus syndrome* » a été faite en 1967 par Lown et ses collaborateurs (Lown, 1967). Il s'agissait de complications rythmiques suite à une cardioversion. Aujourd'hui, ce terme regroupe l'ensemble des atteintes du nœud sinusal et affecte principalement les personnes âgées qui ont un terrain pro-arythmique (pathologie ou chirurgie cardiaque). Les principales manifestations cliniques sont la syncope, les vertiges et la fatigue. Au niveau électrocardiographique, les patients atteints d'un « *sick sinus syndrome* » présentent une bradycardie associée à des blocs sino-atriaux marqués la présence d'onde P manquantes. Des épisodes de tachycardie atriale peuvent aussi exister lors

des phases de bradycardie, on parle alors de « syndrome de tachycardie-bradycardie ». Des cas de « *sick sinus syndrome* » ont aussi été rapportés chez de très jeunes enfants sans atteinte cardiaque sous-jacente suggérant une pathologie congénitale progressive (Benson et al., 2003).

Les études génétiques ont montré que des mutations perte de fonction sur le gène *SCN5A* étaient impliquées dans la forme autosomique récessive du « *sick sinus syndrome* ». Il s'agit des mutations T220I, P1298L, G1408R, R1623H, delF1617 et R1623X (Benson et al., 2003). Une forme autosomique dominante causée par des mutations sur le gène *HCN4*, qui code pour la protéine HCN4 impliquée dans le courant *pacemaker* I_f , a été mise en évidence dans ce syndrome sinusal (Schulze-Bahr et al., 2003). Enfin, il a été montré que des variations d'expression du gène *MYH6* qui code pour la chaîne lourde de la myosine cardiaque pouvaient induire une susceptibilité accrue pour le syndrome nodal (Holm et al., 2011).

Les premières autopsies sur de jeunes patients ont montré une augmentation du tissu conjonctif fibreux et élastique au niveau de la paroi endocardique des oreillettes et des ventricules (Ward et al., 1984). Ceci laisse à penser à un remodelage myocardique lié aux troubles de la conduction cardiaque. Cependant, vu le jeune âge des patients, l'atteinte structurale paraît être une cause de la pathologie. Dans ce cas, des mutations sur le gène *SCN5A* n'auraient pas comme seule conséquence une perturbation électrique mais aussi structurale.

3.3 LES CARDIOMYOPATHIES DILATÉES

Les cardiomyopathies dilatées sont caractérisées par une dilatation cardiaque associée à une dysfonction systolique. C'est la cause de la majorité des transplantations cardiaques chez des patients de moins de 10 ans. Un aspect héréditaire est présent dans 30% des cas. Pour les formes génétiques, de très nombreux gènes ont été mis en cause dans diverses formes de cardiomyopathies dilatées avec comme point commun une transmission autosomique dominante.

Les premiers cas de cardiomyopathies dilatées associées à des troubles du rythme cardiaque ont été rapportés par Greenlee et ses collaborateurs en 1986. Ils ont pu montrer qu'une cardiomyopathie dilatée était associée à des troubles de la conduction, des arythmies, une dysfonction sinusale pour les plus jeunes patients. Ils ont aussi montré que la dilatation cardiaque se faisait dans un premier temps au niveau atrial puis au niveau du ventricule droit pour conduire *in fine* à une dysfonction cardiaque gauche (Greenlee et al., 1986). Deux autres études récentes (Laurent et al., 2012; Mann et al., 2012) ont confirmé l'existence d'un lien entre cardiomyopathie dilatée et troubles du rythme liés au gène *SCN5A*.

Les études génétiques n'ayant pas pu être réalisées à l'époque des premières observations de Greenlee, McNair et ses collaborateurs ont identifié dans cette même famille la mutation D1275N présente à l'état hétérozygote sur le gène *SCN5A* (McNair, 2004). La mutation D1275N avait été précédemment

retrouvée associée à des polymorphismes de la Connexine40 chez des patients présentant des pauses sinusales sans aucun signe de cardiomyopathie dilatée. Cette controverse sur l'effet structural de la mutation D1275N a posé la question de la causalité de cette mutation mais aussi du lien possible entre le gène *SCN5A* et les cardiomyopathies dilatées. Une des explications possibles à cette différence de phénotype hormis les différences environnementales et autres variations génétiques, est la différence génétique entre les 2 familles étudiées, la première ayant en plus un polymorphisme sur le Connexine40 (Groenewegen and Wilde, 2005). L'étude de Olson et ses collaborateurs en 2005 a mis en évidence 4 nouvelles mutations de *SCN5A* présentes à l'état hétérozygote (T220I, R814W, D1595H et 2550-2551insTG) sur 156 patients atteints de cardiomyopathie dilatée sans être porteurs de mutations sur les principaux gènes connus (Olson et al., 2005).

La quasi totalité des mutations associées à des cardiomyopathies dilatées ont été étudiées dans des systèmes de réexpression hétérologue. Les études biophysiques montrent que certaines ont un effet perte de fonction (R225W, W156X et T220I) alors que d'autres n'ont pas de conséquence sur les paramètres biophysiques du canal. C'est le cas des mutations D1275N, R814W, R814Q, D1595H et A1180V (Ge et al., 2008; Groenewegen, 2002).

La corrélation entre des mutations sur le canal sodique Nav1.5 et les cardiomyopathies dilatées est aujourd'hui établie pour certaines d'entre elles (Bezzina and Remme, 2008). Ces données ont fait émerger l'idée selon laquelle le canal sodique Nav1.5 n'a pas seulement une composante électrique mais aussi structurale. Cela complexifie davantage la relation arythmies/anomalies structurales (dilatation, hypertrophie et fibrose). Ces anomalies ne sont pas obligatoirement la conséquence sur le long terme des mutations à effet purement électrophysiologique. Cependant, les mécanismes impliqués dans cette relation ne sont pas encore bien établis. Un premier modèle de souris hétérozygote pour la mutation D1275N sur le gène *SCN5A* a été développé pour comprendre les mécanismes sous-jacents. La compréhension de ces mécanismes en lien avec les troubles progressifs de la conduction cardiaque a fait l'objet de la première partie de ma thèse.

4 MODÈLES MURINS ASSOCIÉS À NAV1.5

Après avoir assez largement caractérisé les mutations de *SCN5A* *in vitro*, il a été nécessaire de développer des modèles animaux porteurs de ces mutations afin de comprendre les mécanismes de régulation du canal sodique en jeu dans les processus arythmiques. A ce jour, de nombreux modèles murins invalidés ou exprimant une forme mutée de *Scn5a* sont caractérisés. Nous avons publié en 2012 dans *Frontiers in Physiology* une revue qui synthétise ces différents modèles.



Mouse models of *SCN5A*-related cardiac arrhythmias

Mickael Derangeon^{1,2,3}, Jérôme Montnach^{1,2,3}, Isabelle Baró^{1,2,3} and Flavien Charpentier^{1,2,3} *

¹ INSERM, UMR 1087, l'Institut du Thorax, Nantes, France

² CNRS, UMR 6291, l'Institut du Thorax, Nantes, France

³ Université de Nantes, Nantes, France

Edited by:

Carol Ann Remme, University of Amsterdam, Netherlands

Reviewed by:

Toon Van Veen, University Medical Center Utrecht, Netherlands

Ming Lei, University of Manchester, UK

*Correspondence:

Flavien Charpentier, INSERM, UMR1087, CNRS UMR6291, l'Institut du Thorax, IRT-UN, 8 quai Moncousu, BP 70721, 44007 Nantes Cedex 1, France.
e-mail: flavien.charpentier@inserm.fr

Mutations of *SCN5A* gene, which encodes the α -subunit of the voltage-gated Na^+ channel $\text{Na}_V1.5$, underlie hereditary cardiac arrhythmic syndromes such as the type 3 long QT syndrome, cardiac conduction diseases, the Brugada syndrome, the sick sinus syndrome, a trial standstill, and numerous overlap syndromes. Patch-clamp studies in heterologous expression systems have provided important information to understand the genotype-phenotype relationships of these diseases. However, they could not clarify how *SCN5A* mutations can be responsible for such a large spectrum of diseases, for the late age of onset or the progressiveness of some of these diseases and for the overlapping syndromes. Genetically modified mice rapidly appeared as promising tools for understanding the pathophysiological mechanisms of cardiac *SCN5A*-related arrhythmic syndromes and several mouse models have been established. This review presents the results obtained on these models that, for most of them, recapitulate the clinical phenotypes of the patients. This includes two models knocked out for $\text{Nav}1.5 \beta 1$ and $\beta 3$ auxiliary subunits that are also discussed. Despite their own limitations that we point out, the mouse models still appear as powerful tools to elucidate the pathophysiological mechanisms of *SCN5A*-related diseases and offer the opportunity to investigate the secondary cellular consequences of *SCN5A* mutations such as the expression remodeling of other genes. This points out the potential role of these genes in the overall human phenotype. Finally, they constitute useful tools for addressing the role of genetic and environmental modifiers on cardiac electrical activity.

Keywords: *Na_v1.5*, arrhythmia, conduction disease, long QT syndrome, Brugada syndrome, sinus node dysfunction

Mutations in the *SCN5A* gene, which encodes the α -subunit of the cardiac voltage-gated Na^+ channel $\text{Na}_V1.5$, underlie hereditary arrhythmic syndromes (so-called cardiac channelopathies). On one hand, gain-of-function mutations, that increase the late component of the Na^+ current (I_{Na}) and thus prolong the ventricular action potential, are responsible for the type 3 long QT syndrome (LQT3; Moss and Kass, 2005). On the other hand, loss-of-function mutations decrease I_{Na} and are responsible for cardiac conduction diseases (Schott et al., 1999; Tan et al., 2001; Probst et al., 2003), Brugada syndrome (Gussak et al., 1999), sick sinus syndrome (Benson et al., 2003), and atrial standstill (Groenewegen et al., 2003). To complicate matters further, some *SCN5A* mutations can lead to more complex diseases associating different phenotypic traits such as, for instance, bradycardia, conduction disease, LQT3, and Brugada syndrome (so-called overlap syndromes; Bezzina et al., 1999; Kyndt et al., 2001; Grant et al., 2002; Rossenbacker et al., 2004; Smits et al., 2005; for review, see Remme et al., 2008). Finally, there is also an association between *SCN5A* genetic defects and susceptibility to dilated cardiomyopathy (DCM; McNair et al., 2004) and atrial fibrillation (Laitinen-Forsblom et al., 2006; Ellinor et al., 2008).

Although patch-clamp studies in heterologous expression systems have provided a great deal of information to understand the genotype-phenotype relationships of these diseases, these models could not clarify how loss-of-function-mutations can be responsible for such a large spectrum of diseases and the late age of onset

or the progressiveness of some of them. They are even less adapted to overlap syndromes.

Genetically modified mice thus appeared as promising tools for understanding the pathophysiological sequence of cardiac *SCN5A*-related channelopathies and several mouse models have been established (Table 1). Fortunately, whereas some genetically modified mice related to K^+ channel dysfunction did not reach investigators' expectations because of major electrophysiological differences between mice and men (Nerbonne et al., 2001; Charpentier et al., 2004), mouse models of inherited *SCN5A* channelopathies, on the contrary, appeared to be informative.

MODELS FOR THE LQT3 SYNDROME

SCN5A-related long QT syndrome (LQT3; Wang et al., 1995) is less frequent but often more lethal than LQT1 and LQT2 (Priori et al., 2003). Like in other LQT syndromes, the abnormal prolongation of ventricular repolarization is associated with a susceptibility to a specific polymorphic ventricular tachycardia called *torsades de pointes* and ventricular fibrillation, leading to syncope and sudden death. Clinically, LQT3 is characterized by an increased duration of the ST segment with a late appearance of the T-wave (Moss, 2002). Bradycardia and pauses occurring at rest, and more particularly during sleep, are often at the origin of the arrhythmias. However, fatal tachycardia-induced arrhythmias have also been reported for a third of the patients (Schwartz et al., 2001). Two thirds of the *SCN5A* mutations found in LQT3 alter the fast inactivation process

Table 1 | Mouse models of *SCN5A*-related cardiac genetic diseases.

Mouse	Genetic modification	Human disease	ECG phenotype	Arrhythmias	Effect on I_{Na}	Original publication
<i>Scn5a</i> ^{Δ/+}	KI/heterozygote/ 150-5KPQ-1507 del	LQT3	QT prolongation	VT EADs <i>in vitro</i>	Increased late current	Nuyens et al. (2001), Head et al. (2005)
<i>hSCN5A</i> - N1325S	Tg/point mutation	LQT3	QT prolongation	VT EADs <i>in vitro</i>	Delayed inactivation increased late current	Tian et al. (2004)
<i>Scn5a</i> [±]	KO/heterozygote	Brugada, PCCD	P wave, PR and QRS prolongation	Triggered VT (spontaneous in old)	≈50% decrease in peak current	Papadatos et al. (2002)
<i>Scn5a</i> ^{1798insD/+}	KI/heterozygote/ insertion	Overlap syndrome (LQT3 – Brugada – CCD)	PR, QRS and QT prolongation	Sinus pauses EADs <i>in vitro</i>	≈40% decrease in peak current, increased late current	Remme et al. (2006)
<i>SCN5A</i> - D1275N	RMCE/hetero- and homozygote/ point mutation	Arrhythmogenic DCM	Bradycardia, P wave, PR and QRS prolongation	AT/AF, VT and sinus node dysfunction in homozygote	≈50% decrease in peak current (heterozygote)	Watanabe et al. (2011)
<i>Scn1b</i> ^{−/−}	KO/hetero- and homozygote	LQT3	Bradycardia and QT prolongation (homozygote)	Not investigated	≈60% increase in peak and late current (homozygote)	Lopez- Santiago et al. (2007)
<i>Scn3b</i> ^{−/−}	KO/homozygote	Brugada, CCD	Bradycardia, P wave and PR prolongation	Triggered VT spontaneous and triggered AT	≈50% decrease in peak current, negative shift of steady-state inactivation	Hakim et al. (2008)

AT, atrial tachycardia; AF, atrial fibrillation; DCM, dilated cardiomyopathy; del, deletion; EAD, early afterdepolarization; KI, knock-in; KO, knockout; LQT3, type 3 long QT syndrome; PCCD, progressive cardiac conduction defects; RMCE, recombinase mediated cassette exchange; VT, ventricular tachycardia; Tg, transgenic.

of the channel (Zimmer and Surber, 2008). For example, the first identified mutation, which leads to the deletion of three amino acids (1505-KPQ-1507) in the inactivation domain of Nav1.5, results in a persistent inward Na⁺ current (Wang et al., 1996) and prolongation of the action potential plateau phase (Moss and Kass, 2005).

***SCN5A*^{Δ1505-1507KPQ/+} KNOCK-IN MOUSE**

Nuyens et al. (2001) generated a knock-in mouse model lacking the same KPQ residues. Mice heterozygous for this mutation (*Scn5a*^{Δ/+}) showed typical features of the LQT3 syndrome and spontaneously developed ventricular arrhythmias. Compared with wild-type mice, transmembrane action potentials recorded in ventricular preparations were markedly prolonged in *Scn5a*^{Δ/+} mice and showed a steeper “heart rate” versus “action potential duration” relationship (Nuyens et al., 2001). Action potential amplitude and upstroke velocity were not altered. Whole-cell patch-clamp recordings performed on cardiomyocytes confirmed the increase in late inward Na⁺ current previously observed in heterologous expression system, which explains the action potential prolongation (Wang et al., 1996). Surprisingly, there was also a two-fold increase in the peak Na⁺ current density, which could not be explained by an over-expression of Nav1.5 or changes in the steady-state activation and inactivation of the current. However, this finding was not confirmed in a more recent study on the same model (Fredj et al., 2006) and the reason for this discrepancy remains to be clarified. Nuyens et al.’s (2001) study also revealed an acceleration of the recovery from inactivation, a property that might favor re-entrant arrhythmias. Indeed, intracardiac pacing with extra stimuli, short-long-short pacing sequences and abrupt

accelerations of heart rate reproducibly induced polymorphic ventricular arrhythmias in *Scn5a*^{Δ/+} mice but not in wild-type mice. The *Scn5a*^{Δ/+} mice were also characterized by a paradoxical transient action potential prolongation upon abrupt acceleration of pacing rate that favored the occurrence of early after depolarizations. This prolongation was blocked by the Na⁺ channel blocker mexiletine and the adrenergic agonist isoproterenol. It can be explained by the increase of both fast and slow components of the Na⁺ current which causes a sudden increase of Na⁺ load, and secondarily of Ca²⁺ load. As a consequence, during each action potential, the increased Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum activates a larger Na/Ca exchanger current which generates early after depolarizations. The autonomic modulation of cardiac electrical activity and arrhythmias of *Scn5a*^{Δ/+} mice has been recently investigated in more details both *in vivo* in freely moving mice and *ex vivo* (Fabritz et al., 2010). As expected from clinical investigations, cholinergic stimulation was shown to favor arrhythmias by inducing bradycardia. In contrast, β-adrenergic stimulation suppressed arrhythmias by shortening repolarization and increasing cardiac rate, while β-blockers had no effect on their own.

A second *Scn5a*^{Δ/+} mouse line, exhibiting the same phenotype as the previous line, was created (Head et al., 2005) and submitted to an extended pharmacological analysis. Electrophysiological studies performed on Langendorff-perfused whole hearts confirmed the anti-arrhythmic properties of mexiletine (Fabritz et al., 2003; Head et al., 2005) and showed that another Na⁺ channel inhibitor, flecainide, could also prevent arrhythmias by preferentially inhibiting the late Na⁺ current (Fredj et al., 2006), whereas β-blockers were inefficient (Head et al., 2005; Stokoe et al., 2007b;

Sabir et al., 2008). These results have been confirmed in freely moving mice (Fabritz et al., 2010). More recently, it was shown that a specific inhibition of the L-type Ca^{2+} channels with nifedipine was also efficient in preventing arrhythmias through the suppression of early after depolarizations (Thomas et al., 2007). Finally, nicorandil, an activator of the ATP-sensitive K^{+} channel, also reduces arrhythmogenicity in *Scn5a* $^{\Delta/+}$ mice (Hothi et al., 2008), confirming previous results obtained with the canine wedge preparation pharmacological model of LQT3 (Shimizu and Antzelevitch, 2000). In contrast, quinidine was proarrhythmic (Sabir et al., 2008). *Ex vivo* studies also confirmed the key role played by bradycardia and increased dispersion of repolarization on the occurrence of spontaneous ventricular arrhythmias (Fabritz et al., 2003). Sudden rate accelerations initially and transiently increased the dispersion of repolarization due to early after depolarizations and action potential alternans (Fabritz et al., 2003; Hothi et al., 2008), as previously observed *in vivo* (Nuyens et al., 2001), and then secondarily suppressed and prevented ventricular tachycardia by decreasing dispersion of repolarization and suppressing early after depolarizations. Arrhythmogenesis, as assessed by programmed electrical stimulation on Langendorff-perfused hearts, has also been associated with abnormal patterns of myocardial activation and abnormally reduced transmural gradients of repolarization resulting from a larger increase in action potential duration in subepicardium than in subendocardium (Stokoe et al., 2007b). In addition, *Scn5a* $^{\Delta/+}$ mice exhibit larger differences between action potential duration and refractory period, so-called local critical interval (APD-ERP), in subepicardial regions than in wild-type mice. Those anomalies may support re-entrant events following premature excitation. More recently, Sabir et al. (2008) proposed that the increases of the slopes of restitution curves (plotting action potential duration versus the preceding diastolic interval; Gilmour, 2003) to values greater than one, rather than increased dispersion of repolarization, was associated with arrhythmogenicity. All these anomalies, including action potential alternans are corrected by nicorandil (Hothi et al., 2008).

Altogether, *Scn5a* $^{\Delta/+}$ mice recapitulate most of the LQT3 associated clinical symptoms. They confirmed previous studies suggesting that arrhythmias in LQT3 syndrome may result from reentries provoked by early after depolarizations and enabled to unveil the mechanisms of tachycardia-induced arrhythmias. Studies of *Scn5a* $^{\Delta/+}$ mice have also provided a rationale for the use of Na^{+} channel blockers and pacing to prevent cardiac arrhythmias and sudden death in the context of LQT3, for which β -blockers have shown low efficacy. Finally, they suggest that Ca^{2+} channels inhibitors and ATP-sensitive K^{+} channel activators might be interesting pharmacological approaches to prevent arrhythmias in this context.

In addition to early after depolarizations, the occurrence of delayed after depolarizations, resulting from the transient inward current (I_{ti}), was also clearly demonstrated in myocytes of *Scn5a* $^{\Delta/+}$ mice (Fredj et al., 2006). Most recently, Lindegger et al. (2009) showed that I_{ti} induction occurs under conditions of elevated sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content that is most probably related to the mutation-induced increase in late Na^{+} current. Indeed, both I_{ti} and its underlying Ca^{2+} wave were suppressed by ranolazine, an antianginal agent well known to block the late

Na^{+} current (Hale et al., 2008). Whether delayed after depolarizations participate to spontaneous arrhythmic events in *Scn5a* $^{\Delta/+}$ mice, and of course in LQT3 patients, remains to be determined. Investigating the potential anti-arrhythmic effects of ranolazine in this model also remains to be performed.

Patients with LQT syndrome (El Yaman et al., 2008; Johnson et al., 2008; Zellerhoff et al., 2009), including LQT3 (Benito et al., 2008), may be at increased risk for atrial fibrillation. Therefore, the atrial phenotype of *Scn5a* $^{\Delta/+}$ mice was characterized. Using Langendorff-perfused hearts, Blana et al. (2010) showed that atrial action potential duration and effective refractory period were prolonged in *Scn5a* $^{\Delta/+}$ mice. Short runs of rapid pacing-induced a larger increase in post-pacing spontaneous atrial cycle length and action potential duration in *Scn5a* $^{\Delta/+}$ mice than in wild-type mice, leading to the occurrence of atrial tachycardia in *Scn5a* $^{\Delta/+}$ mice but not in wild-type mice. Extra stimuli triggered arrhythmias similarly in wild-type and *Scn5a* $^{\Delta/+}$ mice (in 30–40% of the mice). Contrasting results had been previously observed with the second mouse line suggesting that *Scn5a* $^{\Delta/+}$ mice are protected against pacing-induced atrial tachyarrhythmias when young (3 months; Dautova et al., 2009), whereas they exhibit an increased atrial arrhythmogenicity when old (1 year; Guzadhur et al., 2010). Without excluding the influence of variable experimental conditions, those discrepancies might also rely on the fact that the two lines have different genetic backgrounds, as we will discuss later for the *Scn5a*^{1798insD/+} knock-in mouse. Both mouse lines, however, exhibit decreased heart rate and atrioventricular conduction (prolonged PR interval) versus wild-type mice.

Sinus node dysfunction has been reported in patients with *SCN5A*-related long QT syndrome whether these mutations only lead to an increased late Na^{+} current (Moss et al., 1995; Wei et al., 1999) or lead to more complex biophysical alterations of the channel (Bezzina et al., 1999; van den Berg et al., 2001; Grant et al., 2002). Because QT prolongation is more pronounced at lower heart rates, bradycardia represents an important indirect factor in predisposition to lethal arrhythmias in LQT3 families (Schwartz et al., 1995). The mechanisms for LQT3-related bradycardia were investigated for the 1795insD mutation of $\text{Nav}1.5$ (Veldkamp et al., 2003), a mutation inducing an overlap syndrome with bradycardia, conduction disease, LQT3 and Brugada syndrome (Bezzina et al., 1999). This mutation induces both a decrease in Na^{+} peak current and the occurrence of a late Na^{+} current (see dedicated section below for details). By combining current clamp studies and computational modeling, Veldkamp et al. (2003) suggested that both the decreased availability of Na^{+} channels and the increase of late current accounted for bradycardia. However, the effect of action potential prolongation secondary to the increased late current appeared more prominent. The contribution of the late Na^{+} current to sinus node dysfunction has been further confirmed on *Scn5a* $^{\Delta/+}$ mice (Wu et al., 2012). *Scn5a* $^{\Delta/+}$ mice exhibit sinus node dysfunction with episodes of bradycardia, sinus pauses, and longer sinus node recovery times. Sino-atrial preparations from *Scn5a* $^{\Delta/+}$ mice had lower intrinsic rate from the sinus node to the surrounding atrium than wild-type preparations. Computational studies confirmed that the decrease in sinus rate could be attributed to the increased late current. *Ex vivo* experiments on sino-atrial preparations also showed that conduction through the

sinus node to the surrounding atrium was decreased, a result that computer modeling could only explain by a decrease in Na^+ peak current amplitude, which has not been experimentally confirmed.

hSCN5A-N1325S TRANSGENIC MOUSE MODEL

The N1325S mutation of $\text{Nav}1.5$, located in the intracellular region between segments 4 and 5 of domain III, also causes LQT3 syndrome (Wang et al., 1995). This mutation, like many similar mutations, leads to an increased late inward Na^+ current (Dumaine et al., 1996; Wang et al., 1996). A transgenic mouse with cardiac selective expression of human *SCN5A*-N1325S mutation under the control of the mouse α -myosin heavy chain promoter was established (Tian et al., 2004). Transgenic mice showed some of the typical features of the LQT3 syndrome such as prolonged QT interval, ventricular arrhythmias, and a high rate of sudden deaths due to documented polymorphic ventricular tachycardia and ventricular fibrillation. However, transgenic mice were also characterized by increased heart rate and shorter PR intervals that are not observed in LQT3 patients. Some of these features might result from over-expression of the channel rather than from the mutation itself since short PR interval was also observed in the control mouse over-expressing wild-type hSCN5A gene (Zhang et al., 2007).

Voltage-clamp experiments on cardiomyocytes isolated from wild-type and hSCN5A-N1325S mice confirmed that the N1325S mutation does not modify the peak current but delays the inactivation process and generates a late persistent current (Tian et al., 2004), which decreases with increasing pacing rates (Yong et al., 2007). Action potentials from hSCN5A-N1325S ventricular myocytes were longer than wild-type ones and exhibited early after depolarizations. As in *Scn5a* $^{\Delta/+}$ mice, mexiletine shortened ventricular action potential duration and prevented arrhythmias (Tian et al., 2004). Interestingly, action potential duration of transgenic but not wild-type myocytes paradoxically increased with pacing rate (Tian et al., 2004) and became highly variable with occurrence of repolarization alternans (Yong et al., 2007). Whether this phenomenon was only transient, as in *Scn5a* $^{\Delta/+}$ mice, or persisted during long periods of increased pacing rate is unclear. The Ca^{2+} channel blocker verapamil reduced these alternans, suggesting an involvement of intracellular Ca^{2+} deregulation in this phenomenon. Previous studies had shown that patients with long QT syndrome can exhibit T-wave alternans during sinus tachycardia (Cruz Filho et al., 2000; Viskin et al., 2004).

Like the *Scn5a* $^{\Delta/+}$ mouse model, the hSCN5A-N1325S mouse provided key information to our understanding of arrhythmias in LQT3 syndrome. For instance, it showed that the N1325S mutant dysfunction can explain both bradycardia- and non-bradycardia-related arrhythmias observed in patients carrying this mutation (Yong et al., 2007). However, the model might be taken with caution because of the limitations linked to the over-expression of the channel. Indeed, there is a clear relationship between the level of hSCN5A-N1325S expression and the extent of QT prolongation, i.e., by 23% with 1–2 copies and by 91% with 10 copies. Most recently, this model was shown to exhibit cardiomyocyte apoptosis, cardiac fibrosis, and contractile dysfunction during aging (Zhang et al., 2011). But signs of heart failure were markedly larger in the mouse line with 10 copies. Although heart failure

is probably not related to *SCN5A* over-expression *per se*, because old mice over-expressing 10 times the wild-type channel remained normal, one should better consider the model over-expressing the least the mutant channel to extrapolate the results to the patients. In this second line, left ventricular fractional shortening was less decreased and only 30% of the mice showed features of DCM, a result more consistent with the scarcity of heart failure in LQT3 patients (Nguyen et al., 2008; Shi et al., 2008).

A MODEL FOR THE BRUGADA SYNDROME AND CONDUCTION DISORDERS: THE *Scn5a* KNOCKOUT MOUSE

The Brugada syndrome is a genetic disease which associates ST segment elevation in the right precordial leads V1 to V3 of the ECG, often with signs of conduction slowing, with a high risk of sudden cardiac death secondary to ventricular tachycardia or fibrillation (Gussak et al., 1999; Antzelevitch et al., 2005). In 20–30% of the patients, the disease is related to mutations in *SCN5A* leading to a complete or partial loss-of-function of $\text{Nav}1.5$ (Tan et al., 2003). Loss-of-function mutations are also responsible for inherited Progressive Cardiac Conduction Defects (PCCD), also called Lev-Lenègre disease (Schott et al., 1999), or non-progressive conduction defects (Tan et al., 2001). More recently, PCCD has also been linked to gain-of-function mutations in *TRPM4* gene (Transient Receptor Potential cation channel, subfamily M, member 4), which encodes a Ca^{2+} -activated non-selective channel (Kruse et al., 2009; Liu et al., 2010). PCCD is a slowly evolving disease which progressively affects cardiac conduction leading ultimately to pacemaker implantation to prevent the risk of complete atrioventricular block and Stokes–Adams syncope. Inherited PCCD associates haploinsufficiency of *SCN5A* together with an additional yet unknown mechanism related to aging (Probst et al., 2003). Despite their major clinical differences, Brugada syndrome, and inherited conduction diseases share common features. First, both diseases can be caused by *SCN5A* haploinsufficiency. Second, Brugada patients with *SCN5A* mutations exhibit altered conduction whereas Brugada patients without *SCN5A* mutations do not (Smits et al., 2002). Finally, both Brugada syndrome and PCCD can be found in the same pedigree (Kyndt et al., 2001). In other families, patients carrying loss-of-function mutations can exhibit symptoms of Brugada syndrome, conduction disease, and sick sinus syndrome, either combined or not (Smits et al., 2005). Severe forms of sick sinus syndrome have also been found in patients with double inheritance of *SCN5A* loss-of-function mutations (Benson et al., 2003).

A mouse model with targeted disruption of *Scn5a* gene has been established (Papadatos et al., 2002). Homozygous knockout mouse embryos die during mid-gestation due to severe defects in ventricular morphogenesis whereas heterozygous (*Scn5a* $^{\pm}$) mice show normal survival. However, 8- to 10-week-old *Scn5a* $^{\pm}$ mice have several cardiac electrical defects such as decreased atrial and atrioventricular conduction and increased susceptibility to pacing-induced ventricular arrhythmias (Papadatos et al., 2002). Following this initial report, the model was further analyzed to investigate the potential pathophysiological mechanisms involved in the progressive evolution of *SCN5A*-related PCCD (Royer et al., 2005; van Veen et al., 2005). It was found that in addition to atrial and atrioventricular conduction, ventricular conduction was also

decreased. Moreover, ECG studies performed on mice ranging from 4 to 71 weeks of age showed that the ventricular phenotype of *Scn5a*[±] mice worsened with age. This feature was confirmed by activation mapping studies performed on Langendorff-perfused hearts. In young *Scn5a*[±] mice, conduction velocity was only affected in the right ventricle. In old mice, right ventricular conduction defect worsened and was in addition associated with conduction velocity defect in the left ventricle. This age-dependent deterioration of ventricular conduction was associated with the occurrence of fibrosis in ventricular myocardium. In some aspects, this phenotype resembles PCCD, although in the later fibrosis was found to be limited to the conduction system area (Lenègre and Moreau, 1963; Lev, 1964). However, it is worth noting that fibrosis has also been observed in patients with the Brugada syndrome (Coronel et al., 2005; Frustaci et al., 2005). More recently, it was shown that *Scn5a*[±] mice display variable degrees of conduction defects when young (10 weeks old): some mice have only mild prolongation of the QRS interval while others have more severe QRS prolongation associated with RR' or SS' patterns (Leoni et al., 2010). The extent of fibrotic remodeling was dependent on the severity of the initial conduction disorders: mice with larger QRS prolongation when young have the most severe fibrotic remodeling when they get older, suggesting that the ventricular activation pattern is a key element for triggering remodeling. Whatever their triggering mechanism, fibrosis, and redistribution of connexin 43 expression most likely contribute to the age-dependent degradation of ventricular conduction in the mouse model. Whether *SCN5A*-related inherited PCCD in human also results from a primary decrease in Na⁺ current and a secondary progressive fibrosis with aging remains to be clarified. In this context, *Scn5a*[±] mice could be used for testing preventive therapies as an alternative to pacemaker implantation.

In their initial report on the *Scn5a*[±] mouse model, Papadatos et al. (2002) showed that programmed ventricular electrical pacing of Langendorff-perfused hearts induced ventricular tachyarrhythmias in two thirds of *Scn5a*[±] mice but not in wild-type mice and proposed that the model could be used for elucidating the mechanisms of arrhythmias in the context of *SCN5A*-related Brugada syndrome. Pathophysiological findings have implicated the right ventricular outflow tract as the primary location for electrical disorders in Brugada syndrome. Two hypotheses have been proposed to explain both ST segment elevation and occurrence of arrhythmias (Wilde et al., 2010). The first one, mainly based on experimental data obtained in arterially perfused canine right ventricular wedges, implicates alterations in transmural and regional repolarization gradients leading to localized losses of the subepicardial action potential dome and phase 2 reentries as the arrhythmogenic mechanism. The second one, mainly based on clinical studies, implicates abnormal conduction. To elucidate the arrhythmogenic mechanisms in *Scn5a*[±] mice programmed electrical stimulation, monophasic action potential (MAP) recording, and bipolar electrogram recording was performed on Langendorff-perfused hearts. These experiments showed that *Scn5a*[±] mice were characterized by increased electrogram duration with shortening extrasystoles intervals, especially in the right ventricular outflow tract, and increased transmural and regional heterogeneity of MAP duration and refractory periods in the right ventricle with

the shortest in the right ventricular outflow tract (Stokoe et al., 2007a; Martin et al., 2010, 2011a,b). *Scn5a*[±] mice also exhibited increased incidence of MAP alternans. As a consequence, ventricular tachycardia occurred earlier in the right ventricular outflow tract (Martin et al., 2011b). All these mechanisms were potentiated by flecainide, a Na⁺ channel inhibitor which is well described to favor ST segment elevation and arrhythmias in patients with the Brugada syndrome. Ventricular tachycardia also occurred spontaneously both *in vivo* (Leoni et al., 2010; Martin et al., 2011c) and *ex vivo* (Martin et al., 2011d), but with a much higher incidence under flecainide treatment (Martin et al., 2011c,d). Multielectrode array studies showed that the initiation of spontaneous arrhythmias resulted from a combination of conduction slowing and repolarization heterogeneities leading to lines of conduction blocks and unidirectional conduction (Martin et al., 2011d). Altogether these results seem to contradict the hypothesis that arrhythmias in the Brugada syndrome result from phase 2 re-entrant mechanisms. However, the main limitation of the mouse model is that the ventricular action potential lacks a plateau phase, and for the subepicardial action potential, a spike, and dome morphology, present in larger mammals and prerequisite for phase 2 reentries.

In addition, *Scn5a*[±] mice turned out to be useful for understanding the role of Nav1.5 in sinus node normal function and the pathophysiology of sinus node dysfunction associated to *SCN5A* loss-of-function mutations (Benson et al., 2003; Smits et al., 2005). Indeed, *Scn5a*[±] mice also display moderate bradycardia that can be associated with occasional sino-atrial blocks in older animals (Lei et al., 2005). Lei et al. showed that small central sino-atrial node cells, which do not express Nav1.5, exhibited normal intrinsic pacemaker rate. In contrast, larger peripheral sino-atrial node cells, which normally express Nav1.5, exhibited reduced intrinsic pacemaker rate associated to reduced expression of Nav1.5. These data were consistent with the slower sino-atrial conduction and frequent sino-atrial conduction blocks observed in *Scn5a*[±] sino-atrial node preparations compared to wild-type although they exhibited normal activation patterns. A computer model successfully reproduced these findings and implicated *I*_{Na} in action potential propagation through the sino-atrial node, from sino-atrial node to atria, and in modifying heart rate through a coupling of sino-atrial node and atrial cells. More recently, this same team has shown that both aging and *Scn5a* disruption affect sino-atrial node function through electrical remodeling and TGF-β₁-mediated fibrosis, with the most severe phenotype observed in old *Scn5a*[±] mice (Hao et al., 2011). Interestingly, this *in vivo* sino-atrial node dysfunction appears less severe than expected from *ex vivo* experiments and computer simulations seems to be due to an increase in sympathetic regulation of sino-atrial node with age, partly explained by an over-expression of β₁-adrenoceptors (Hao et al., 2011).

AN OVERLAP SYNDROME MODEL: THE *Scn5a*^{1798INS/D/+} KNOCK-IN MOUSE

In 1999, a *SCN5A* mutation (1795insD) associated with an overlap syndrome of cardiac Na⁺ channelopathies was described in a large Dutch family. The patients' ECG presented features of bradycardia, conduction disease, LQT3, and Brugada syndrome (Bezzina et al., 1999). The analysis of the 1795insD mutation

biophysical properties led to contrasting results depending on the heterologous expression system used. In *Xenopus oocytes*, the mutation reduced the Na^+ current through a negative shift in voltage-dependence of steady-state inactivation but did not produce the persistent current commonly observed in LQT3 (Bezzina et al., 1999). In contrast, in HEK293 cells, 1795insD mutation disrupted fast inactivation leading to sustained inward Na^+ current that could prolong repolarization at slow heart rates and, at the same time, increased slow inactivation, delaying recovery of Na^+ channel availability between stimuli and reducing the Na^+ current under conditions mimicking fast heart rates (Veldkamp et al., 2000). Computer modeling showed that this dual mechanism could indeed explain the overlap syndrome, depending on the heart rate (Clancy and Rudy, 2002). Because of these discrepancies and because the co-inheritance of other genetic variants besides the 1795insD mutation as a cause of the phenotype complexity in the family could not be ruled out, Remme et al. (2006) generated a knock-in mouse carrying the mouse equivalent (1798insD) of the human *SCN5A*-1795insD mutation. Homozygous mice are not viable. Heterozygous *Scn5a*^{1798insD/+} mice recapitulate many of the pathological features of the patients including sinus node dysfunction, conduction slowing, and QT prolongation at slow rates. Patch-clamp experiments performed on ventricular *Scn5a*^{1798insD/+} cardiomyocytes have shown that action potential duration was longer than in wild-type cardiomyocytes and that this prolongation was more pronounced at slow pacing rates. Also, at fast pacing rates, action potential upstroke velocity, which reflects Na^+ channel availability, was reduced in *Scn5a*^{1798insD/+} mice compared to wild-type. However, the potential biophysical mechanisms thought to explain decreased availability of Na^+ channels in heterologous expression systems were not confirmed in *Scn5a*^{1798insD/+} mice. Indeed, rather than changes in the voltage-dependence of activation and inactivation or slow inactivation properties, dysfunctional mutant channels at the membrane or ineffective trafficking of mutant channels to the membrane more likely explained the marked decrease of Na^+ current in *Scn5a*^{1798insD/+} mice. In addition, a small persistent inward Na^+ current was found in *Scn5a*^{1798insD/+} cardiomyocytes, explaining the prolongation of action potential duration and QT interval. These studies constitute another example of the limitations of heterologous expression systems and illustrate the benefits of genetically engineered mouse models. In summary, the phenotypic characterization of this mouse model has demonstrated that a single *SCN5A* mutation is sufficient to cause an overlap syndrome of cardiac Na^+ channel diseases.

This unique model also represented a useful tool to investigate the impact of genetic and environmental modifiers on cardiac conduction and repolarization. Indeed, also genetic background has often been proposed to affect the phenotypic consequences of ion channel mutations, the identification of genetic modifiers of disease severity in genetically inherited arrhythmias is rare (Scicluna et al., 2008). In order to identify genetic modifiers of conduction disease, Remme et al. (2009) studied the effect of the *Scn5a*-1798insD mutation in mice of two distinct inbred genetic backgrounds. They showed that the phenotype severity of mice carrying the *Scn5a*^{1798insD/+} mutation varies depending on the genetic background. This variability is associated with

differential expression of a large number of genes including some encoding ion channels. In particular, ventricular expression levels of $\text{Na}_v1.5$ regulatory $\beta 4$ -subunit (encoded by *Scn4b* gene) were markedly reduced in the mouse strain with the most severe conduction defects, leading to a shift of $\text{Na}_v1.5$ channel activation curve toward more positive voltages and consequently to a further decrease of I_{Na} . Most recently, these authors went a step further and applied linkage analysis to a F2 cross resulting from the two strains carrying the *Scn5a*-1798insD mutation to identify quantitative trait loci (QTL) for heart rate, ECG parameters, and susceptibility to arrhythmias (Scicluna et al., 2011). This first genetic mapping analysis for cardiac electrical traits in mice identified 3 QTL linked with heart rate (chromosome 4), PR interval (chromosome 3), and QRS interval (chromosome 7) at baseline. Additional significant linkage to chromosome 4 locus was observed for post-flecainide heart rate and ventricular arrhythmias. Unexpectedly, numerous sex-specific QTLs were also identified. Finally, QTL for ECG parameters and arrhythmias coincided at five chromosomal locations suggesting pleiotropic effects at these loci. Interestingly, identified QTLs coincided with chromosomal locations of genes found differentially expressed between the two parental strains in the prior study (Remme et al., 2009). This considerably reduces the number of candidate genes responsible for these QTLs. Nevertheless, additional experiments are still needed to reduce linkage intervals and identify the causal genes. In spite of their success, genome-wide association studies (GWAS) performed in large human populations identified only a very small fraction of heritability of ECG traits and often failed to identify the causal genes. In this context, QTL analysis studies performed in mice could provide independent information pointing to the right genes (Dina, 2011).

A MODEL FOR *SCN5A*-RELATED DILATED CARDIOMYOPATHY: THE *Scn5a*-D1275N MOUSE

The D1275N *SCN5A* mutation has been related to different cardiac diseases. It was first reported in a family affected by atrial standstill, mild conduction disease, and atrial enlargement. However, all affected members also carried a variant in the connexin 40 promoter (Groenewegen et al., 2003). Subsequently, D1275N mutation was reported in a family affected by DCM, sinus node dysfunction, atrial and ventricular tachyarrhythmias and conduction disorders (McNair et al., 2004; Olson et al., 2005; Ge et al., 2008). More recently, it was also reported in a family with atrial tachyarrhythmias, conduction disease, and ventricular enlargement, but without impaired contractility, as opposed to the previous family (Laitinen-Forsblom et al., 2006). Finally, this mutation was also identified in a patient with atrial flutter, atrial standstill, conduction disease, and sinus node dysfunction (Watanabe et al., 2011). Despite these phenotypic differences, patch-clamp studies that have compared wild-type and D1275N channels in heterologous expression systems have not shown major differences in the biophysical properties of the mutant channel (Groenewegen et al., 2003; Gui et al., 2010; Watanabe et al., 2011).

To address this discrepancy, Watanabe et al. (2011) used recombinase mediated cassette exchange to engineer a mouse model expressing the human D1275N mutant channel and compare it to the mouse model expressing the human wild-type channel

(Watanabe et al., 2011). The D1275 allele was associated with slow heart rate and prolonged atrial, atrioventricular and ventricular conduction in a gene-dose-dependent manner, i.e., D1275N homozygous mice had a more severe phenotype. Interestingly, conduction disease increased with age. In addition, sinus node dysfunction, second degree atrioventricular block, atrial tachycardia/fibrillation, and polymorphic ventricular tachycardia occurred in homozygous D1275N mice. Patch-clamp studies of isolated cardiomyocytes demonstrated that D1275N mutation causes a severe decrease in peak I_{Na} by 54% in heterozygous mice and 78% in homozygous mice in relation to a decreased sarcolemmal expression of Nav1.5. Moreover, homozygous D1275N mice exhibited an increased late Na^+ current, leading to prolonged action potential duration. Finally, the mutant was also associated with a gene-dose-dependent reduction of contractile function and DCM. These results are in line with the clinical findings described in the mutation carriers.

Scn1b KNOCKOUT MOUSE

The cardiac Na^+ channel is a heterotrimer composed of Nav1.5, the pore-forming α -subunit, and two auxiliary β -subunits (Meadows and Isom, 2005): a non-covalently linked β 1-subunit (Nav β 1 or β 3) and a disulfide-linked subunit (Nav β 2 or β 4). In a genetic screening of 282 probands with Brugada syndrome and 44 with conduction disease, none of whom had mutations in *SCN5A* gene, three mutations in the gene encoding Nav β 1 (*SCN1B*) were identified in three kindred (Watanabe et al., 2008). Two mutations were located in a newly described alternately spliced transcript, Nav β 1B (Qin et al., 2003). Both transcripts are expressed in human heart and to a greater extent in Purkinje fibers than in ventricular myocardium (Watanabe et al., 2008). The E87Q mutation, located in the extracellular immunoglobulin loop of both β 1- and β 1B-subunits, was identified in a family affected by conduction disease. The two other mutations, which resulted in a β 1B-subunit truncated after the amino-acid tryptophan-179, were identified in a family affected with both Brugada syndrome and conduction disease and in a kindred affected with conduction disease. Electrophysiological studies showed that peak I_{Na} amplitude was lower when Nav1.5 was co-expressed with mutant Nav β 1- and Nav β 1B-subunits versus wild-type subunits. This result was consistent with the patients' phenotypes.

The cardiac electrophysiological phenotype of a mouse model invalidated for *Scn1b* markedly differed from the phenotype of the patients presented above (Lopez-Santiago et al., 2007). Compared to wild-type mice, *Scn1b* knockout mice exhibited lower heart rates and prolonged QT intervals, without any signs of conduction disease. Surprisingly, loss of Nav β 1 expression resulted in an increase in both peak and persistent Na^+ current while channel gating and kinetics were unaffected. This increase in current was most likely due to the increased expression of Nav1.5 observed in these mice. Immunostaining studies revealed no alterations in the localization of Na^+ channel α - or β -subunits. Action potentials were prolonged, supporting the increased QT interval. These results are consistent with the observation that the D1790G mutation of *SCN5A*, which affects the interaction of Nav1.5 with Nav β 1, also leads to a long QT phenotype (Benhorin et al., 1998; An et al., 1998). Once again, studies performed in heterologous

expression systems led to contrasting results. Indeed, the D1790G mutation was first found to shift negatively steady-state inactivation of the Na^+ current without increasing its late component (An et al., 1998). The action potential prolongation was attributed to alterations of calcium-sensitive exchange and ion channel currents (Wehrens et al., 2000). By contrast, a second study showed that the mutation-induced a marked prolongation of the late Na^+ current, a result more consistent with the long QT phenotype (Baroudi and Chahine, 2000). Interestingly, the phenotype of *Scn1b* knockout mice resembles that found in a family of patients carrying a mutation on *SCN4B*, the gene encoding the β 4-subunit. These patients exhibit a markedly prolonged QT interval (LQT10; Medeiros-Domingo et al., 2007) due to a large increase of the late Na^+ current amplitude, as in LQT3 patients.

Scn3b KNOCKOUT MOUSE

In order to understand better the role of Nav β 3 subunit on Nav1.5 function, Hakim and co-workers generated a mouse model lacking the *Scn3b* gene (*Scn3b*^{-/-} mouse; Hakim et al., 2008). They showed that the lack of Nav β 3 induced a $\approx$ 30% decrease in cardiac Na^+ peak current amplitude associated with a shift of the steady-state inactivation curve toward negative potentials while other I_{Na} biophysical parameters were not altered, thus confirming previous studies in mammalian heterologous expression system (Ko et al., 2005). As a consequence, *Scn3b*^{+/+} mice exhibited decreased ventricular conduction, shortened ventricular action potential duration, and refractory period and increased incidence of arrhythmias under programmed electrical stimulation in *ex vivo* Langendorff-perfused hearts (Hakim et al., 2008). Arrhythmogenic incidence was reduced by flecainide and quinidine (Hakim et al., 2010b), in contrast to what had been observed previously for flecainide in *Scn5a*[±] mice (Martin et al., 2011c,d). Like *Scn5a*[±] mice, *Scn3b*^{-/-} mice also exhibited sinus node dysfunction and decreased atrial and atrioventricular conduction, sometimes leading to atrioventricular block (Hakim et al., 2010a). Finally, *Scn3b*^{-/-} mice were more prone than wild-type mice to develop atrial tachycardia and fibrillation upon burst pacing in *ex vivo* Langendorff-perfused hearts. Altogether, these studies suggested that *Scn3b* gene could also be involved in cardiac channelopathies in human.

This hypothesis has been confirmed. Indeed, *SCN3B* mutations have been identified in patients with either Brugada syndrome (Hu et al., 2009), idiopathic ventricular fibrillation (Valdivia et al., 2010) or lone atrial fibrillation (Olesen et al., 2011). All the mutations lead to a loss-of-function of Nav β 3 and consequently a decrease in cardiac Na^+ current.

CONCLUSION

Most mouse models of *SCN5A*-related cardiac channelopathies recapitulate most of the diverse clinical phenotypes observed in patients. However mouse models also have their own limitation as a phenotype observed in mice may not be encountered in patients. For example, the *Scn1b* knockout mouse shows prolonged ventricular repolarization, a feature that is not seen in patients with *SCN1B* loss-of-function mutations. These discrepancies relate to either species differences or differences between a heterozygous point mutation and complete invalidation of a gene on one allele.

Mouse models also turned out to be powerful tools to elucidate the pathophysiological mechanisms of *SCN5A*-related diseases. For instance, the *Scn5a*^{1798insD/+} mouse clearly demonstrated that a single *SCN5A* mutation is sufficient to cause an overlap syndrome. This mouse also illustrated the limitations of heterologous expression systems in the elucidation of the biophysical consequences of the mutation on the channel function.

Finally, mouse models of Nav1.5 (or Nav1.5-associated proteins) dysfunction offer the unique opportunity to investigate the secondary cellular consequences of *SCN5A* mutations such as the expression remodeling of other genes, which is hardly accessible in the hearts of patients, but that might participate to the overall phenotype and explain some of the differences among

patients. The most exiting benefit of mouse models is that they raise new working hypotheses such as the putative link between Nav1.5 loss-of-function and occurrence of fibrosis in the context of PCCD, thereby providing new potential therapeutic approaches. One limitation, though, is that remodeling might be partly species dependent. They also constitute useful tools for future studies addressing as yet unanswered questions, such as the role of genetic and environmental modifiers on cardiac conduction and repolarization.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the seventh framework program of the European Union (*EUTrigTreat* collaborative project; grant agreement #241526) for financial support.

REFERENCES

- An, R. H., Wang, X. L., Kerem, B., Benhorin, J., Medina, A., Goldmit, M., and Kass, R. S. (1998). Novel LQT-3 mutation affects Na⁺ channel activity through interactions between alpha- and beta1-subunits. *Circ. Res.* 83, 141–146.
- Antzelevitch, C., Brugada, P., Borggrefe, M., Brugada, J., Brugada, R., Corrado, D., Gussak, I., Le Marec, H., Nademanee, K., Perez Riera, A. R., Shimizu, W., Schulze-Bahr, E., Tan, H., and Wilde, A. (2005). Brugada syndrome: report of the second consensus conference: endorsed by the Heart Rhythm Society and the European Heart Rhythm Association. *Circulation* 111, 659–670.
- Baroudi, G., and Chahine, M. (2000). Biophysical phenotypes of *SCN5A* mutations causing long QT and Brugada syndromes. *FEBS Lett.* 487, 224–228.
- Benhorin, J., Goldmit, M., MacCluer, J. W., Blangero, J., Goffen, R., Leibovitch, A., Rahat, A., Wang, Q., Medina, A., Towbin, J., and Kerem, B. (1998). Identification of a new *SCN5A* mutation associated with the long QT syndrome. *Hum. Mutat.* 12, 72–74.
- Benito, B., Brugada, R., Perich, R. M., Lizotte, E., Cinca, J., Mont, L., Berrueto, A., Tolosana, J. M., Freixa, X., Brugada, P., and Brugada, J. (2008). A mutation in the sodium channel is responsible for the association of long QT syndrome and familial atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 5, 1434–1440.
- Benson, D. W., Wang, D. W., Dymment, M., Knilans, T. K., Fish, F. A., Strieper, M. J., Rhodes, T. H., and 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.
- Bezzina, C., Veldkamp, M. W., van den Berg, M. P., Postma, A. V., Rook, M. B., Viersma, J. W., van Langen, I. M., Tan-Sindhunata, G., Bink-Boelkens, M. T., van Der Hout, A. H., Mannens, M. M., and Wilde, A. A. (1999). A single Na⁺ channel mutation causing both long-QT and Brugada syndromes. *Circ. Res.* 85, 1206–1213.
- Blana, A., Kaese, S., Fortmüller, L., Laakmann, S., Damke, D., van Bragt, K., Eckstein, J., Piccini, I., Kirchhefer, U., Nattel, S., Breithardt, G., Carmeliet, P., Carmeliet, E., Schotten, U., Verheule, S., Kirchhof, P., and Fabritz, L. (2010). Knock-in gain-of-function sodium channel mutation prolongs atrial action potentials and alters atrial vulnerability. *Heart Rhythm* 7, 1862–1869.
- Charpentier, F., Demolombe, S., and Escande, D. (2004). Cardiac channelopathies: from men to mice. *Ann. Med.* 36(Suppl. 1), 28–34.
- Clancy, C. E., and Rudy, Y. (2002). Na⁺ channel mutation that causes both Brugada and long-QT syndrome phenotypes: a simulation study of mechanism. *Circulation* 105, 1208–1213.
- 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., and 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.
- Cruz Filho, F. E., Maia, I. G., Fagundes, M. L., Barbosa, R. C., Alves, P. A., Sá, R. M., Boghossian, S. H., and Ribeiro, J. C. (2000). Electrical behavior of T-wave polarity alternans in patients with congenital long QT syndrome. *J. Am. Coll. Cardiol.* 36, 167–173.
- Dautova, Y., Zhang, Y., Sabir, I., Grace, A. A., and Huang, C. L. (2009). Atrial arrhythmogenesis in wild-type and *Scn5a*+/-delta murine hearts modelling LQT3 syndrome. *Pflugers Arch.* 458, 443–457.
- Dina, C. (2011). Of 508 mice and 40,000 humans. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 50, 377–379.
- Dumaine, R., Wang, Q., Keating, M. T., Hartmann, H. A., Schwartz, P. J., Brown, A. M., and Kirsch, E. (1996). Multiple mechanisms of Na⁺ channel-linked long-QT syndrome. *Circ. Res.* 78, 916–924.
- El Yaman, M., Perry, J., Makielski, J. C., and Ackerman, M. J. (2008). Suppression of atrial fibrillation with mexiletine pharmacotherapy in a young woman with type 1 long QT syndrome. *Heart Rhythm* 5, 472–474.
- Ellinor, P. T., Nam, E. G., Shea, M. A., Milan, D. J., Ruskin, J. N., and MacRae, C. A. (2008). Cardiac sodium channel mutation in atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 5, 99–105.
- Fabritz, L., Damke, D., Emmerich, M., Kaufmann, S. G., Theis, K., Blana, A., Fortmüller, L., Laakmann, S., Hermann, S., Aleynichenko, E., Steinfurt, J., Volkery, D., Riemann, B., Kirchhefer, U., Franz, M. R., Breithardt, G., Carmeliet, E., Schäfers, M., Maier, S. K., Carmeliet, P., and Kirchhof, P. (2010). Autonomic modulation and antiarrhythmic therapy in a model of long QT syndrome type 3. *Cardiovasc. Res.* 87, 60–72.
- Fabritz, L., Kirchhof, P., Franz, M. R., Nuyens, D., Rossenbacker, T., Ottenhof, A., Haverkamp, W., Breithardt, G., Carmeliet, E., and Carmeliet, P. (2003). Effect of pacing and mexiletine on dispersion of repolarisation and arrhythmias in DeltaKPQ *SCN5A* (long QT3) mice. *Cardiovasc. Res.* 57, 1085–1093.
- Fredj, S., Lindegger, N., Sampson, K. J., Carmeliet, P., and Kass, R. S. (2006). Altered Na⁺ channels promote pause-induced spontaneous diastolic activity in long QT syndrome type 3 myocytes. *Circ. Res.* 99, 1225–1232.
- Frustaci, A., Priori, S. G., Pieroni, M., Chimenti, C., Napolitano, C., Rivolta, I., Sanna, T., Bellocci, F., and Russo, M. A. (2005). Cardiac histological substrate in patients with clinical phenotype of Brugada syndrome. *Circulation* 112, 3680–3687.
- Gussak, I., Antzelevitch, C., Bjerregaard, P., Towbin, J. A., and Chaitman, B. R. (1999). The Brugada syndrome: clinical, electrophysiologic and genetic aspects. *J. Am. Coll. Cardiol.* 33, 5–15.
- Ge, J., Sun, A., Paajanen, V., Wang, S., Su, C., Yang, Z., Li, Y., Wang, S., Jia, J., Wang, K., Zou, Y., Gao, L., Wang, K., and Fan, Z. (2008). Molecular and clinical characterization of a novel *SCN5A* mutation associated with atrioventricular block and dilated cardiomyopathy. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 1, 83–92.
- Gilmour, R. F. Jr. (2003). A novel approach to identifying antiarrhythmic drug targets. *Drug Discov. Today* 8, 162–167.
- Grant, A. O., Carboni, M. P., Neplioueva, V., Starmer, C. F., Memmi, M., Napolitano, C., and Priori, S. (2002). Long QT syndrome, Brugada syndrome, and conduction system disease are linked to a single sodium channel mutation. *J. Clin. Invest.* 110, 1201–1209.
- Groenewegen, W. A., Firouzi, M., Bezzina, C. R., Vliex, S., van Langen, I. M., Sandkuijl, L., Smits, J. P., Hulsbeek, M., Rook, M. B., Jongasma, H. J., and Wilde, A. A. (2003). A cardiac sodium channel mutation cosegregates with a rare connexin40 genotype in familial atrial standstill. *Circ. Res.* 92, 14–22.

- Gui, J., Wang, T., Jones, R. P., Trump, D., Zimmer, T., and Lei, M. (2010). Multiple loss-of-function mechanisms contribute to *SCN5A*-related familial sick sinus syndrome. *PLoS ONE* 5, e10985. doi:10.1371/journal.pone.0010985
- Guzadur, L., Pearcey, S. M., Duehmke, R. M., Jeevaratnam, K., Hohmann, A. F., Zhang, Y., Grace, A. A., Lei, M., and Huang, C. L. (2010). Atrial arrhythmogenicity in aged *Scn5a*+/ Δ KPQ mice modeling long QT type 3 syndrome and its relationship to Na⁺ channel expression and cardiac conduction. *Pflugers Arch.* 460, 593–601.
- Hakim, P., Brice, N., Thresher, R., Lawrence, J., Zhang, Y., Jackson, A. P., Grace, A. A., and Huang, C. L. (2010a). *Scn3b* knockout mice exhibit abnormal sino-atrial and cardiac conduction properties. *Acta Physiol. (Oxf.)* 198, 47–59.
- Hakim, P., Thresher, R., Grace, A. A., and Huang, C. L. (2010b). Effects of flecainide and quinidine on action potential and ventricular arrhythmogenic properties in *Scn3b* knockout mice. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 37, 782–789.
- Hakim, P., Gurung, I. S., Pedersen, T. H., Thresher, R., Brice, N., Lawrence, J., Grace, A. A., and Huang, C. L. (2008). *Scn3b* knockout mice exhibit abnormal ventricular electrophysiological properties. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 98, 251–266.
- Hale, S. L., Shryock, J. C., Belardinelli, L., Sweeney, M., and Kloner, R. A. (2008). Late sodium current inhibition as a new cardioprotective approach. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 44, 954–967.
- Hao, X., Zhang, Y., Zhang, X., Nirmalan, M., Davies, L., Konstantinou, D., Yin, F., Dobrzynski, H., Wang, X., Grace, A. A., Zhang, H., Boyett, M., Huang, C. L., and Lei, M. (2011). TGF- β 1-mediated fibrosis and ion channel remodeling are key mechanisms in producing the sinus node dysfunction associated with *SCN5A* deficiency and aging. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 4, 397–406.
- Head, C. E., Balasubramanian, R., Thomas, G., Goddard, C. A., Lei, M., Colledge, W. H., Grace, A. A., and Huang, C. L. (2005). Paced electrogram fractionation analysis of arrhythmogenic tendency in Δ KPQ *Scn5a* mice. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 16, 1329–1340.
- Hothi, S. S., Booth, S. W., Sabir, I. N., Killeen, M. J., Simpson, F., Zhang, Y., Grace, A. A., and Huang, C. L. (2008). Arrhythmogenic substrate and its modification by nicorandil in a murine model of long QT type 3 syndrome. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 98, 267–280.
- Hu, D., Barajas-Martinez, H., Burashnikov, E., Springer, M., Wu, Y., Varro, A., Pfeiffer, R., Koopmann, T. T., Cordeiro, J. M., Guerchicoff, A., Pollevick, G. D., and Antzelevitch, C. (2009). A mutation in the beta 3 subunit of the cardiac sodium channel associated with Brugada ECG phenotype. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2, 270–278.
- Johnson, J. N., Tester, D. J., Perry, J., Salisbury, B. A., Reed, C. R., and Ackerman, M. J. (2008). Prevalence of early-onset atrial fibrillation in congenital long QT syndrome. *Heart Rhythm* 5, 704–709.
- Ko, S. H., Lenkowski, P. W., Lee, H. C., Mounsey, J. P., and 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.
- Kruse, M., Schulze-Bahr, E., Corfield, V., Beckmann, A., Stallmeyer, B., Kurtbay, G., Ohmert, I., Schulze-Bahr, E., Brink, P., and Pongs, O. (2009). Impaired endocytosis of the ion channel TRPM4 is associated with human progressive familial heart block type I. *J. Clin. Invest.* 119, 2737–2744.
- Kyndt, F., Probst, V., Potet, F., Demolombe, S., Chevallier, J. C., Baró, I., Moisan, J. P., Boisseau, P., Schott, J. J., Escande, D., and Le Marec, H. (2001). Novel *SCN5A* mutation leading either to isolated cardiac conduction defect or Brugada syndrome in a large French family. *Circulation* 104, 3081–3086.
- Laitinen-Forsblom, P. J., Mäkinen, P., Mäkinen, H., Yli-Mäyry, S., Virtanen, V., Kontula, K., and Aalto-Setälä, K. (2006). *SCN5A* mutation associated with cardiac conduction defect and atrial arrhythmias. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 17, 480–485.
- Lei, M., Goddard, C., Liu, J., Leoni, A. L., Royer, A., Fung, S. S., Xiao, G., Ma, A., Zhang, H., Charpentier, F., Vandenberg, J. I., Colledge, W. H., Grace, A. A., and Huang, C. L. (2005). Sinus node dysfunction following targeted disruption of the murine cardiac sodium channel gene *Scn5a*. *J. Physiol. (Lond.)* 567, 387–400.
- Lenègre, J., and Moreau, P. (1963). Le bloc auriculo-ventriculaire chronique. Etude anatomique, clinique et histologique. *Arch. Mal. Coeur. Vaiss.* 56, 867–888.
- Leoni, A. L., Gavillet, B., Rougier, J. S., Marionneau, C., Probst, V., Le Scouarnec, S., Schott, J. J., Demolombe, S., Bruneval, P., Huang, C. L., Colledge, W. H., Grace, A. A., Mohler, P. J., Escande, D., Abriel, H., and Charpentier, F. (2010). Variable Na(v)1.5 protein expression from the wild-type allele correlates with the penetrance of cardiac conduction disease in the *Scn5a*($\pm$) mouse model. *PLoS ONE* 5, e9298. doi:10.1371/journal.pone.0009298
- Lev, M. (1964). Anatomic basis for atrioventricular block. *Am. J. Med.* 37, 742–748.
- Lindegger, N., Hagen, B. M., Marks, A. R., Lederer, W. J., and Kass, R. S. (2009). Diastolic transient inward current in long QT syndrome type 3 is caused by Ca²⁺ overload and inhibited by ranolazine. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 47, 326–334.
- Liu, H., El Zein, L., Kruse, M., Guinamard, R., Beckmann, A., Bozio, A., Kurtbay, G., Mégarbané, A., Ohmert, I., Blaysat, G., Villain, E., Pongs, O., and Bouvagnet, P. (2010). Gain-of-function mutations in TRPM4 cause autosomal dominant isolated cardiac conduction disease. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 3, 374–385.
- 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., and Isom, L. L. (2007). Sodium channel *Scn1b* null mice exhibit prolonged QT and RR intervals. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 43, 636–647.
- Martin, C. A., Grace, A. A., and Huang, C. L. (2011a). Refractory dispersion promotes conduction disturbance and arrhythmias in a *Scn5a*($\pm$) mouse model. *Pflugers Arch.* 462, 495–504.
- Martin, C. A., Grace, A. A., and Huang, C. L. (2011b). Spatial and temporal heterogeneities are localized to the right ventricular outflow tract in a heterozygotic *Scn5a* mouse model. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 300, H605–H616.
- Martin, C. A., Zhang, Y., Grace, A. A., and Huang, C. L. (2011c). In vivo studies of *Scn5a* $\pm$ mice modeling Brugada syndrome demonstrate both conduction and repolarization abnormalities. *J. Electrocardiol.* 43, 433–439.
- Martin, C. A., Guzadur, L., Grace, A. A., Lei, M., and Huang, C. L. (2011d). Mapping of re-entrant spontaneous polymorphic ventricular tachycardia in a *Scn5a* $\pm$ mouse model. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 300, H1853–H1862.
- Martin, C. A., Zhang, Y., Grace, A. A., and Huang, C. L. (2010). Increased right ventricular repolarization gradients promote arrhythmogenesis in a murine model of Brugada syndrome. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 21, 1153–1159.
- McNair, W. P., Ku, L., Taylor, M. R., Fain, P. R., Dao, D., Wolfel, E., and Mestroni, L., and Familial Cardiomyopathy Registry Research Group. (2004). *SCN5A* mutation associated with dilated cardiomyopathy, conduction disorder, and arrhythmia. *Circulation* 110, 2163–2167.
- Meadows, L. S., and Isom, L. L. (2005). Sodium channels as macromolecular complexes: implications for inherited arrhythmia syndromes. *Cardiovasc. Res.* 67, 448–458.
- Medeiros-Domingo, A., Kaku, T., Tester, D. J., Iturralde-Torres, P., Itty, A., Ye, B., Valdivia, C., Ueda, K., Canizales-Quinteros, S., Tusié-Luna, M. T., Makielski, J. C., and Ackerman, M. J. (2007). *SCN4B*-encoded sodium channel beta4 subunit in congenital long-QT syndrome. *Circulation* 116, 134–142.
- Moss, A. J. (2002). T-wave patterns associated with the hereditary long QT syndrome. *Card. Electrophysiol. Rev.* 6, 311–315.
- Moss, A. J., and Kass, R. S. (2005). Long QT syndrome: from channels to cardiac arrhythmias. *J. Clin. Invest.* 115, 2018–2024.
- Moss, A. J., Zareba, W., Benhorin, J., Locati, E. H., Hall, W. J., Robinson, J. L., Schwartz, P. J., Towbin, J. A., Vincent, G. M., Lehmann, M. H., Keating, M. T., MacCluer, J. W., and Timothy, K. W. (1995). ECG T-wave patterns in genetically distinct forms of the hereditary long QT syndrome. *Circulation* 92, 2929–2934.
- Nerbonne, J. M., Nichols, C. G., Schwarz, T. L., and Escande, D. (2001). Genetic manipulation of cardiac K⁺ channel function in mice: what have we learned, and where do we go from here? *Circ. Res.* 89, 944–956.
- 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.
- Nuyens, D., Stengl, M., Dugarmaa, S., Rossenbacker, T., Compennolle, V., Rudy, Y., Smits, J. F., Flameng, W., Clancy, C. E., Moons, L., Vos, M. A., Dewater, M., Benndorf, K., Collen, D., Carmeliet, E., and Carmeliet, P. (2001). Abrupt rate accelerations or premature beats cause life-threatening arrhythmias in mice with long-QT3 syndrome. *Nat. Med.* 7, 1021–1027.

- Olesen, M. S., Jespersen, T., Nielsen, J. B., Liang, B., Møller, D. V., Hedley, P., Christiansen, M., Varró, A., Olesen, S. P., Haunsø, S., Schmitt, N., and Svendsen, J. H. (2011). Mutations in sodium channel β -subunit SCN3B are associated with early-onset lone atrial fibrillation. *Cardiovasc. Res.* 89, 786–793.
- Olson, T. M., Michels, V. V., Ballew, J. D., Reyna, S. P., Karst, M. L., Heron, 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.
- Papadatos, G. A., Wallerstein, P. M., Head, C. E., Ratcliff, R., Brady, P. A., Benndorf, K., Saumarez, R. C., Trezise, A. E., Huang, C. L., Vandenberg, J. I., Colledge, W. H., and Grace, A. A. (2002). Slowed conduction and ventricular tachycardia after targeted disruption of the cardiac sodium channel gene *Scn5a*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 6210–6215.
- Priori, S. G., Schwartz, P. J., Napolitano, C., Bloise, R., Ronchetti, E., Grillo, M., Vicentini, A., Spazzolini, C., Nastoli, J., Bottelli, G., Folli, R., and Capelletti, D. (2003). Risk stratification in the long-QT syndrome. *N. Engl. J. Med.* 348, 1866–1874.
- Probst, V., Kyndt, F., Potet, F., Trochu, J. N., Mialet, G., Demolombe, S., Schott, J. J., Baró, 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.
- Qin, N., D'Andrea, M. R., Lubin, M. L., Shafae, N., Codd, E. E., and Correa, A. M. (2003). Molecular cloning and functional expression of the human sodium channel β 1B subunit, a novel splicing variant of the β 1 subunit. *Eur. J. Biochem.* 270, 4762–4770.
- Remme, C. A., Scicluna, B. P., Verkerk, A. O., Amin, A. S., van Brunschot, S., Beekman, L., Deneer, V. H., Chevalier, C., Oyama, F., Miyazaki, H., Nukina, N., Wilders, R., Escande, D., Houlgatte, R., Wilde, A. A., Tan, H. L., Veldkamp, M. W., de Bakker, J. M., and Bezzina, C. R. (2009). Genetically determined differences in sodium current characteristics modulate conduction disease severity in mice with cardiac sodium channelopathy. *Circ. Res.* 104, 1283–1292.
- Remme, C. A., Verkerk, A. O., Nuyens, D., van Ginneken, A. C., van Brunschot, S., Belterman, C. N., Wilders, R., van Roon, M. A., Tan, H. L., Wilde, A. A., Carmeliet, P., de Bakker, J. M., Veldkamp, M. W., and Bezzina, C. R. (2006). Overlap syndrome of cardiac sodium channel disease in mice carrying the equivalent mutation of human SCN5A-1795insD. *Circulation* 114, 2584–2594.
- 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.
- Rossenbacker, T., Carroll, S. J., Liu, H., Kuipéri, C., de Ravel, T. J. L., Devriendt, K., Carmeliet, P., Kass, R. S., and Heidebüchel, H. (2004). Novel pore mutation in SCN5A manifests as a spectrum of phenotypes ranging from atrial flutter, conduction disease, and Brugada syndrome to sudden cardiac death. *Heart Rhythm* 1, 610–615.
- Royer, A., van Veen, T. A., Le Bouter, S., Marionneau, C., Griol-Charhbil, V., Leoni, A. L., Steenman, M., van Rijen, H. V., Demolombe, S., Goddard, C. A., Richer, C., Escoubet, B., Jarry-Guichard, T., Colledge, W. H., Gros, D., de Bakker, J. M., Grace, A. A., Escande, D., and Charpentier, F. (2005). Mouse model of SCN5A-linked hereditary Lenegre's disease: age-related conduction slowing and myocardial fibrosis. *Circulation* 111, 1738–1746.
- Sabir, I. N., Li, L. M., Jones, V. J., Goddard, C. A., Grace, A. A., and Huang, C. L. (2008). Criteria for arrhythmogenicity in genetically-modified Langendorff-perfused murine hearts modelling the congenital long QT syndrome type 3 and the Brugada syndrome. *Pflugers Arch.* 455, 637–651.
- 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.
- Schwartz, P. J., Priori, S. G., Locati, E. H., Napolitano, C., Cantu, F., Towbin, J. A., Keating, M. T., Hammoude, H., Brown, A. M., Chen, L. K., and Colatsky, T. J. (1995). Long-QT syndrome patients with mutations of the SCN5A and HERG genes have differential responses to Na^+ channel blockade and to increases in heart rate: implications for gene-specific therapy. *Circulation* 92, 3381–3386.
- Schwartz, P. J., Priori, S. G., Spazzolini, C., Moss, A. J., Vincent, G. M., Napolitano, C., Denjoy, I., Guicheney, P., Breithardt, G., Keating, M. T., Towbin, J. A., Beggs, A. H., Brink, P., Wilde, A. A., Toivonen, L., Zareba, W., Robinson, J. L., Timothy, K. W., Corfield, V., Watanasirichaigoon, D., Corbett, C., Haverkamp, W., Schulze-Bahr, E., Lehmann, M. H., Schwartz, K., Coumel, P., and Bloise, R. (2001). Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation* 103, 89–95.
- Scicluna, B. P., Tanck, M. W., Remme, C. A., Beekman, L., Coronel, R., Wilde, A. A., and Bezzina, C. R. (2011). Quantitative trait loci for electrocardiographic parameters and arrhythmia in the mouse. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 50, 380–389.
- Scicluna, B. P., Wilde, A. A., and Bezzina, C. R. (2008). The primary arrhythmia syndromes: same mutation, different manifestations. Are we starting to understand why? *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 19, 445–452.
- Shi, R., Zhang, Y., Yang, C., Huang, C., Zhou, X., Qiang, H., Grace, A. A., Huang, C. L., and Ma, A. (2008). The cardiac sodium channel mutation delQKP 1507-1509 is associated with the expanding phenotypic spectrum of LQT3, conduction disorder, dilated cardiomyopathy, and high incidence of youth sudden death. *Europace* 10, 1329–1335.
- Shimizu, W., and Antzelevitch, C. (2000). Effects of a $\text{K}(+)$ channel opener to reduce transmural dispersion of repolarization and prevent torsade de pointes in LQT1, LQT2, and LQT3 models of the long-QT syndrome. *Circulation* 102, 706–712.
- 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., and 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.
- Smits, J. P., Koopmann, T. T., Wilders, R., Veldkamp, M. W., Opthof, T., Bhuiyan, Z. A., Mannens, M. M., Balser, J. R., Tan, H. L., Bezzina, C. R., and Wilde, A. A. (2005). A mutation in the human cardiac sodium channel (E161K) contributes to sick sinus syndrome, conduction disease and Brugada syndrome in two families. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 38, 969–981.
- Stokoe, K. S., Balasubramaniam, R., Goddard, C. A., Colledge, W. H., Grace, A. A., and Huang, C. L. (2007a). Effects of flecainide and quinidine on arrhythmogenic properties of *Scn5a* $\pm$ murine hearts modelling the Brugada syndrome. *J. Physiol. (Lond.)* 581, 255–275.
- Stokoe, K. S., Thomas, G., Goddard, C. A., Colledge, W. H., Grace, A. A., and Huang, C. L. (2007b). Effects of flecainide and quinidine on arrhythmogenic properties of *Scn5a* $+/Delta$ murine hearts modelling long QT syndrome 3. *J. Physiol. (Lond.)* 578, 69–84.
- Tan, H. L., Bezzina, C. R., Smits, J. P., Verkerk, A. O., and Wilde, A. A. (2003). Genetic control of sodium channel function. *Cardiovasc. Res.* 57, 961–973.
- Tan, H. L., Bink-Boelkens, M. T., Bezzina, C. R., Viswanathan, P. C., Beaufort-Krol, G. C., van Tintelen, P. J., van den Berg, M. P., Wilde, A. A., and Balser, J. R. (2001). A sodium-channel mutation causes isolated cardiac conduction disease. *Nature* 409, 1043–1047.
- Thomas, G., Gurung, I. S., Killeen, M. J., Hakim, P., Goddard, C. A., Mahaut-Smith, M. P., Colledge, W. H., Grace, A. A., and Huang, C. L. (2007). Effects of L-type Ca^{2+} channel antagonism on ventricular arrhythmogenesis in murine hearts containing a modification in the *Scn5a* gene modelling human long QT syndrome 3. *J. Physiol. (Lond.)* 578, 85–97.
- Tian, X. L., Yong, S. L., Wan, X., Wu, L., Chung, M. K., Tchou, P. J., Rosenbaum, D. S., Van Wagoner, D. R., Kirsch, G. E., and Wang, Q. (2004). Mechanisms by which SCN5A mutation N1325S causes cardiac arrhythmias and sudden death in vivo. *Cardiovasc. Res.* 61, 256–267.
- Valdivia, C. R., Medeiros-Domingo, A., Ye, B., Shen, W. K., Algiers, T. J., Ackerman, M. J., and Makielski, J. C. (2010). Loss-of-function mutation of the SCN3B-encoded sodium channel β 3 subunit associated with a case of idiopathic ventricular fibrillation. *Cardiovasc. Res.* 86, 392–400.
- van den Berg, M. P., Wilde, A. A. M., Viersma, J. W., Brouwer, J., Haaksma, J., van der Hout, A. H., Stolte-Dijkstra, I., Bezzina, C. R., van Langen, I. M., Beaufort-Krol, G. C. M., Cornel, J. H., and Crijns, H. J. G. M. (2001). Possible bradycardic mode of death and successful pacemaker treatment in a large family with features of long QT syndrome type 3 and Brugada syndrome. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 12, 630–636.

- van Veen, T. A., Stein, M., Royer, A., Le Quang, K., Charpentier, F., Colledge, W. H., Huang, C. L., Wilders, R., Grace, A. A., Escande, D., de Bakker, J. M., and van Rijen, H. V. (2005). Impaired impulse propagation in *Scn5a*-knockout mice: combined contribution of excitability, connexin expression, and tissue architecture in relation to aging. *Circulation* 112, 1297–1235.
- Veldkamp, M. W., Viswanathan, P. C., Bezzina, C., Baartscheer, A., Wilde, A. A., and Balse, J. R. (2000). Two distinct congenital arrhythmias evoked by a multidysfunctional Na^+ channel. *Circ. Res.* 86, E91–E97.
- Veldkamp, M. W., Wilders, R., Baartscheer, A., Zegers, J. G., Bezzina, C. R., and Wilde, A. A. (2003). Contribution of sodium channel mutations to bradycardia and sinus node dysfunction in LQT3 families. *Circ. Res.* 92, 976–983.
- Viskin, S., Rosso, R., Rogowski, O., Belhassen, B., Levitas, A., Wagshal, A., Katz, A., Fourey, D., Zeltser, D., Oliva, A., Pollevick, G. D., Antzelevitch, C., and Rozovski, U. (2004). Provocation of sudden heart rate oscillation with adenosine exposes abnormal QT responses in patients with long QT syndrome: a bedside test for diagnosing long QT syndrome. *Eur. Heart J.* 27, 469–475.
- Wang, D. W., Yazawa, K., George, A. L. Jr., and Bennett, P. B. (1996). Characterization of human cardiac Na^+ channel mutations in the congenital long QT syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 13200–13205.
- Wang, Q., Shen, J., Li, Z., Timothy, K., Vincent, G. M., Priori, S. G., Schwartz, P. J., and Keating, M. T. (1995). Cardiac sodium channel mutations in patients with long QT syndrome, an inherited cardiac arrhythmia. *Hum. Mol. Genet.* 4, 1603–1607.
- Watanabe, H., Koopmann, T. T., Le Scouarnec, S., Yang, T., Ingram, C. R., Schott, J. J., Demolombe, S., Probst, V., Anselme, F., Escande, D., Wiesel, A. C., Pfeufer, A., Käb, S., Wichmann, H. E., Hasdemir, C., Aizawa, Y., Wilde, A. A., Roden, D. M., and Bezzina, C. R. (2008). Sodium channel β 1 subunit mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans. *J. Clin. Invest.* 118, 2260–2268.
- Watanabe, H., Yang, T., Stroud, D. M., Lowe, J. S., Harris, L., Atack, T. C., Wang, D. W., Hipkens, S. B., Leake, B., Hall, L., Kupersmidt, S., Chopra, N., Magnuson, M. A., Tanabe, N., Knollmann, B. C., George, A. L. Jr., and Roden, D. M. (2011). Striking In vivo phenotype of a disease-associated human *SCN5A* mutation producing minimal changes in vitro. *Circulation* 124, 1001–1011.
- Wehrens, X. H., Abriel, H., Cabo, C., Benhorin, J., and Kass, R. S. (2000). Arrhythmogenic mechanism of an LQT-3 mutation of the human heart Na^+ channel α -subunit: a computational analysis. *Circulation* 102, 584–590.
- Wei, J., Wang, D. W., Alings, M., Fish, F., Wathen, M., Roden, D. M., and George, A. L. (1999). Congenital long-QT syndrome caused by a novel mutation in a conserved acidic domain of the cardiac Na^+ channel. *Circulation* 99, 3165–3171.
- Wilde, A. A., Postema, P. G., Di Diego, J. M., Viskin, S., Morita, H., Fish, J. M., and Antzelevitch, C. (2010). The pathophysiological mechanism underlying Brugada syndrome: depolarization versus repolarization. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 49, 543–553.
- Wu, J., Zhang, Y., Zhang, X., Cheng, L., Lammers, W. J., Grace, A. A., Fraser, J. A., Zhang, H., Huang, C. L., and Lei, M. (2012). Altered sino atrial node function and intra-atrial conduction in murine gain-of-function *Scn5a*+/ Δ KPQ hearts suggest an overlap syndrome. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 302, H1510–H1523.
- Yong, S. L., Ni, Y., Zhang, T., Tester, D. J., Ackerman, M. J., and Wang, Q. K. (2007). Characterization of the cardiac sodium channel *SCN5A* mutation, N1325S, in single murine ventricular myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352, 378–383.
- Zellerhoff, S., Pistulli, R., Mönnig, G., Hinterseer, M., Beckmann, B. M., Köbe, J., Steinbeck, G., Käb, S., Haverkamp, W., Fabritz, L., Gradaus, R., Breithardt, G., Schulze-Bahr, E., Böcker, D., and Kirchhof, P. (2009). Atrial Arrhythmias in long-QT syndrome under daily life conditions: a nested case control study. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 20, 401–407.
- Zhang, T., Yong, S. L., Drinko, J. K., Popovic, Z. B., Shryock, J. C., Belardinelli, L., and Wang, Q. K. (2011). LQTS mutation N1325S in cardiac sodium channel gene *SCN5A* causes cardiomyocyte apoptosis, cardiac fibrosis and contractile dysfunction in mice. *Int. J. Cardiol.* 147, 239–245.
- Zhang, T., Yong, S. L., Tian, X. L., and Wang, Q. K. (2007). Cardiac-specific overexpression of *SCN5A* gene leads to shorter P wave duration and PR interval in transgenic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355, 444–450.
- Zimmer, T., and Surber, R. (2008). *SCN5A* channelopathies – an update on mutations and mechanisms. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 98, 120–136.

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 12 March 2012; paper pending published: 05 April 2012; accepted: 29 May 2012; published online: 22 June 2012.

Citation: Derangeon M, Montnach J, Baró I and Charpentier F (2012) Mouse models of *SCN5A*-related cardiac arrhythmias. *Front. Physiol.* 3:210. doi: 10.3389/fphys.2012.00210

This article was submitted to *Frontiers in Cardiac Electrophysiology, a specialty of Frontiers in Physiology*.

Copyright © 2012 Derangeon, Montnach, Baró and Charpentier. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License, which permits non-commercial use, distribution, and reproduction in other forums, provided the original authors and source are credited.

Les troubles progressifs de la conduction cardiaque – Souris

Scn5a^{+/-}

1 DEFINITION

Les troubles progressifs de la conduction cardiaque (PCCD) font partie de la grande famille des blocs de la conduction cardiaque qui correspondent à des atteintes autosomiques dominantes qui débutent par un bloc de branche et se poursuivent par un bloc de conduction complet (Brink and Torrington, 1977; van der Merwe et al., 1988; 1986). Sur l'électrocardiogramme, ils se définissent par un élargissement de l'intervalle QRS, signe d'un bloc de branche droit et gauche.

Les troubles progressifs de la conduction cardiaque ou maladie de Lenègre-Lèv (Lenègre and Moreau, 1963; Lèv et al., 1970) sont les troubles de la conduction les plus fréquents. L'altération de la conduction cardiaque est progressive et débute dans le réseau de His-Purkinje avec l'apparition d'un bloc de branche droit ou gauche marqué par un allongement caractéristique de l'intervalle QRS (Figure 19). Chez les patients les plus atteints, cela peut conduire à des épisodes de syncope et de mort subite. Les PCCD sont à l'heure actuelle la principale cause d'implantation de stimulateur cardiaque dans le monde (0,15/1000 habitants / an dans les pays développés). A l'heure actuelle, la pose d'un stimulateur cardiaque constitue le seul traitement. En plus de cette atteinte électrique, les analyses histologiques *post-mortem* réalisées par Lenègre montrent que les cœurs des patients sont très fibrosés et ce, majoritairement au niveau des faisceaux de conduction (Lenègre and Moreau, 1963).

L'étude des mécanismes impliqués dans cette pathologie constitue la première partie de ma thèse. Une des principales questions que posent les PCCD est de savoir quel est le lien entre pathologie « électrique » et pathologie « structurale ».

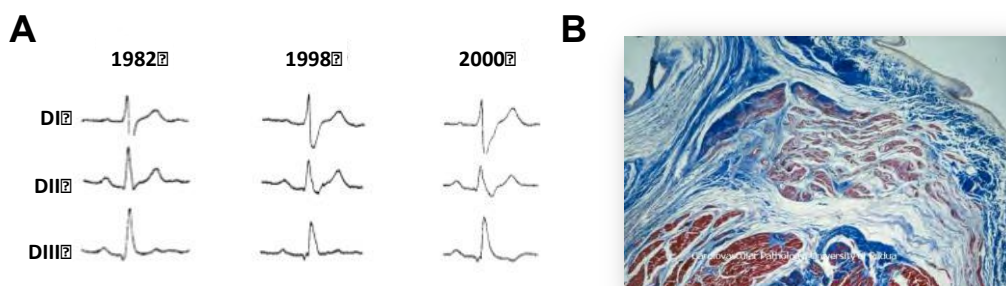


Figure 19 : Les troubles progressifs de la conduction cardiaque. A. Elargissement progressif du complexe du QRS chez un patient atteint de PCCD. Probst, 2003. B. Coupe histologie post-mortem montrant la fibrose cardiaque en bleu (Trichrome de Heidenhein). D'après Cristina Basso, Université de Padova.

2 GENETIQUE DES TROUBLES DE LA CONDUCTION CARDIAQUE

La première mutation génétique reliée aux troubles progressifs de la conduction cardiaque a été mise en évidence par Schott et ses collaborateurs en 1999. Ils ont identifié, par analyse de liaison dans une famille française, que le gène *SCN5A* était porteur d'une mutation sur un site d'épissage (IVS22+2 T>C) chez les membres de la famille atteints de PCCD (Schott et al., 1999) (Figure 20). Dans cette même étude, les auteurs ont mis en évidence, dans une famille néerlandaise, la délétion d'un nucléotide en position 5280 induisant un décalage du cadre de lecture et un codon stop prématuré. Cette mutation est associée avec une perte de l'adressage à la membrane du canal et donc à une réduction totale du courant sodique dans les cellules COS-7 (Probst, 2003). Par la suite, deux autres mutations, G298S et D1595N, sur le gène *SCN5A* chez 2 enfants atteints de bloc de conduction ont été mises en évidence. Ces mutations induisent toutes deux une perte de fonction du canal sodique (Wang, 2002).

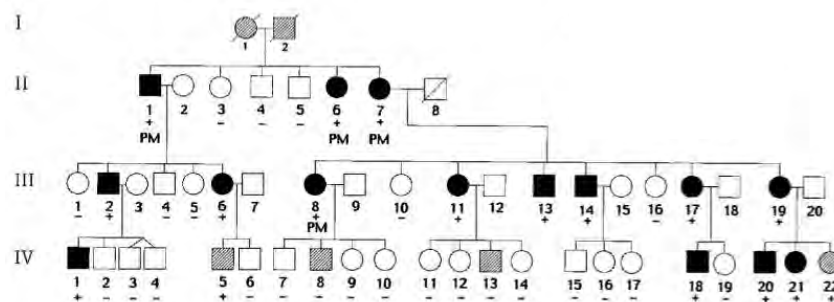


Figure 20 : Pedigree de la famille porteuse de la mutation IVS22+2 T>C impliquée dans la maladie de Lenègre-Lèv. Les porteurs de la mutation sont indiqués avec un « + », les patients atteints de troubles de la conduction sont en noir et ceux suspectés en gris. « PM » pacemaker. D'après Schott et al., 1999.

D'autres mutations sur le gène *SCN5A* ont été reliées à des troubles de la conduction cardiaque mais aussi associés à un syndrome de Brugada. Seules les 4 mutations présentées ici sont associées uniquement à des troubles de la conduction.

Des mutations sur la sous-unité $\beta 1$ régulatrice de Nav1.5 ont aussi été impliquées dans les troubles progressifs de la conduction cardiaque. Ces mutations ont pour conséquence de diminuer le courant sodique (Watanabe et al., 2008).

Un autre gène a été identifié dans une famille atteinte de PCCD par Makita et ses collaborateurs. Ils ont pu montrer que le variant Q58L empêchait la formation des plaques de Cx40 au niveau de la jonction cellule-cellule (Makita et al., 2012). C'est à ce jour la seule mutation connue dans un gène codant pour une connexine associée à des troubles du rythme ventriculaire. Des études plus fondamentales ont confirmé l'implication de la Cx40 dans cette pathologie (Simon et al., 1998).

Enfin, les troubles progressifs de la conduction cardiaque ont été reliés à des mutations sur le gène codant pour le canal cationique TRPM4 activé par le calcium intracellulaire et impliqué dans de nombreux phénomènes arythmiques. Une étude de Liu et ses collaborateurs a mis en évidence 3 mutations distinctes (Arg164Trp, Ala432Thr et Gly844Asp) associées à un gain-de-fonction de TRPM4 dans 3 familles distinctes (Liu et al., 2010). Le phénotype observé chez les patients porteurs de ces mutations est très proche de celui observé chez les patients porteurs d'une mutation perte de fonction sur le canal sodique. Ceci suggère que les canaux TRPM4 et Nav1.5 s'influencent l'un sur l'autre ou font partie d'un même complexe de signalisation à l'origine de l'excitabilité cellulaire.

3 LE COMPLEXE QRS CHEZ LA SOURIS

L'électrocardiogramme murin est très différent de celui enregistré chez l'homme. Le premier ECG de souris a été publié par Goldbarg et ses collaborateurs en 1968 (Goldbarg et al., 1968). Comme nous avons pu le voir précédemment, les potentiels d'action humains et murins ont des morphologies tout à fait différentes. Cela a des répercussions sur la phase de dépolarisation des ventricules, le complexe QRS, et de repolarisation, l'onde T sur l'ECG. Dans ce paragraphe, je me concentrerai sur la différence de morphologie du complexe du QRS et sa difficulté de mesure. Dans la partie traitant du syndrome du QT long, je reviendrai sur l'onde T et sa mesure (Partie 3 §4).

Les études électrocardiographiques faites chez la souris se font en 6 dérivations et la dérivation DI est la plus utilisée pour réaliser les mesures. C'est en effet sur cette dérivation que la fin de l'onde T est la plus discernable. Ainsi, en DI (mais aussi en aVR et aVL), le complexe QRS débute avec une première onde négative, parfois difficilement détectable (l'onde Q), suivie d'une onde très positive (l'onde R) et enfin une seconde onde négative (l'onde S). Dans l'ensemble des dérivations, à l'exception de aVR, l'onde S est suivie d'une onde positive qui précède l'onde T. Cette déflexion est appelée point J ou R'' (Figure 21) (Boukens et al., 2012). La mesure du complexe QRS a souvent fait débat. Comme rapporté par Salama et London en 2007, la fin du complexe QRS a souvent été placée à la fin de l'onde J (Salama and London, 2007). Cependant, très tôt, l'onde J a été décrite comme faisant partie de la phase de repolarisation et donc exclue du complexe QRS (Goldbarg et al., 1968). Ainsi, en prenant à tort en compte l'onde J dans le complexe QRS, celui-ci peut durer jusqu'à 30 ms alors qu'une mesure correcte jusqu'au point d'intersection entre l'onde S et la ligne isoélectrique donne une durée de 9 à 17 ms selon les dérivations (Danik et al., 2002). L'absence de segment ST isoélectrique chez la souris est la conséquence d'une phase 1 de repolarisation rapide et de l'absence de plateau sur le potentiel d'action. Le complexe QRS murin correspond donc à la dépolarisation des ventricules mais aussi à une phase précoce de repolarisation (Boukens et al., 2012).

En conditions pathologiques, l'élargissement du QRS chez l'homme reflète un trouble de la conduction ventriculaire. Ceci n'est pas toujours le cas. Wiegerink et ses collaborateurs ont montré que

l'élargissement pouvait aussi résulter d'une augmentation de la masse du cœur indépendamment d'une variation positive ou négative de la vitesse de conduction (Wiegerinck et al., 2006). A l'inverse, les travaux de Boukens et ses collaborateurs ont récemment montré, chez la souris, que la mesure du QRS pouvait sous-estimer le ralentissement de la conduction cardiaque. En cas de conduction ralentie par l'injection d'ajmaline par exemple, ils montrent que la fin du complexe QRS arrive bien avant la fin de l'activation ventriculaire (Boukens et al., 2012).

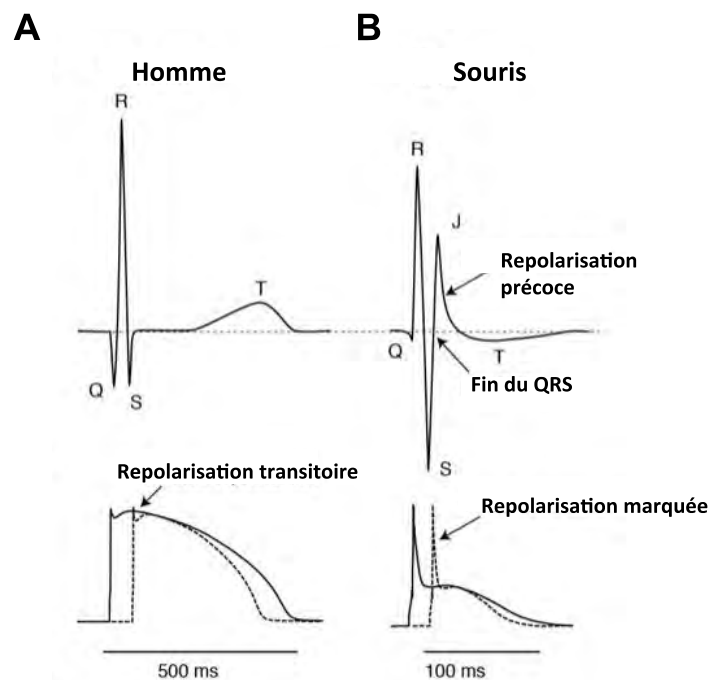


Figure 21 : Différence de morphologie des complexes QRS entre l'homme (A) et la souris (B). Le segment ST n'est pas isoélectrique chez la souris, la repolarisation précoce observée se manifeste par une onde J positive qui est parfois comprise à tort dans le complexe QRS. Le potentiel d'action murin a ainsi une phase de repolarisation précoce plus importante que chez l'Homme et une phase de plateau nettement moins marquée. Ligne pleine : potentiel d'action endocardique ; ligne pointillée : potentiel d'action épicaudique. D'après Boukens et al., 2014 *in pressa*.

4 LE MODELE DE SOURIS $SCN5A^{+/-}$

Afin de comprendre les mécanismes reliant la perte de fonction de canal Nav1.5 observée dans les systèmes de réexpression et le mécanisme fibrotique décrit chez les patients, le modèle murin invalidé à l'état hétérozygote pour le gène *Scn5a* a été utilisé comme modèle d'étude des troubles progressifs de la conduction cardiaque. Initialement développé par Papadatos et ses collaborateurs en 2002, ce modèle murin présente une réduction de 50% de l'intensité du courant sodique au pic associé à un allongement de la conduction atriale et atrio-ventriculaire à 10 semaines (Papadatos et al., 2002) (Figure 22). Sous stimulation électrique, les cœurs issus de ces souris sont plus susceptibles de faire des tachycardies ventriculaires polymorphes que ceux des souris contrôles (Martin et al., 2011).

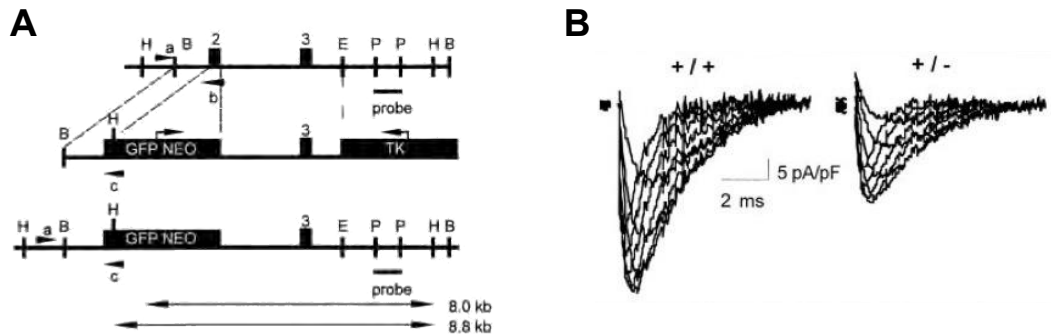


Figure 22 : Génération du modèle murin *Scn5a*^{+/-}. A. Schéma de l'insertion de la forme délétée. L'insertion de la cassette NEO dans l'exon 2 empêche la transcription d'un canal fonctionnel B. Diminution du courant sodique chez les souris *Scn5a*^{+/-}. D'après Papadatos et al., 2002.

Les travaux de Royer et ses collaborateurs de 2005 montrent une atteinte de la conduction ventriculaire marquée par un allongement de l'intervalle QRS en plus des troubles de conduction atriaux observés précédemment (Royer, 2005). Ces troubles de la conduction sont progressifs, s'aggravent avec le vieillissement des souris et sont en adéquation avec ce qui avait été observé précédemment chez l'Homme (Probst, 2003) (Figure 23). Cette première étude démontre aussi que la fibrose ventriculaire apparaît uniquement chez les souris âgées invalidées pour le gène *Scn5a*. Les défauts de conduction et la présence de fibrose valide ce modèle murin comme modèle d'étude des troubles progressifs de la conduction cardiaque.

En plus de ces atteintes typiques de la maladie de Lenègre, des signes d'hypertrophie ont été observés avec l'augmentation de l'expression de la β -MHC, de l' α -actine et des facteurs de transcription associés *Egr-1* et *Atf3* (Okamoto et al., 2001) sans que cela n'ait de conséquences fonctionnelles clairement établies par échocardiographie. Dans le même temps, les travaux de van Veen et ses collaborateurs montrent que l'altération de la conduction cardiaque uniquement chez les souris *Scn5a*^{+/-} âgées est associée à une redistribution spatiale du profil d'expression de la Cx43 dans les zones fibrosées (van Veen, 2005). Ces travaux posent les bases des acteurs fondamentaux de cette pathologie : (1) le canal sodique Nav1.5 pour l'excitabilité cardiaque, (2) la fibrose pour l'anomalie structurale et (3) la connexine 43 pour le couplage intercellulaire.

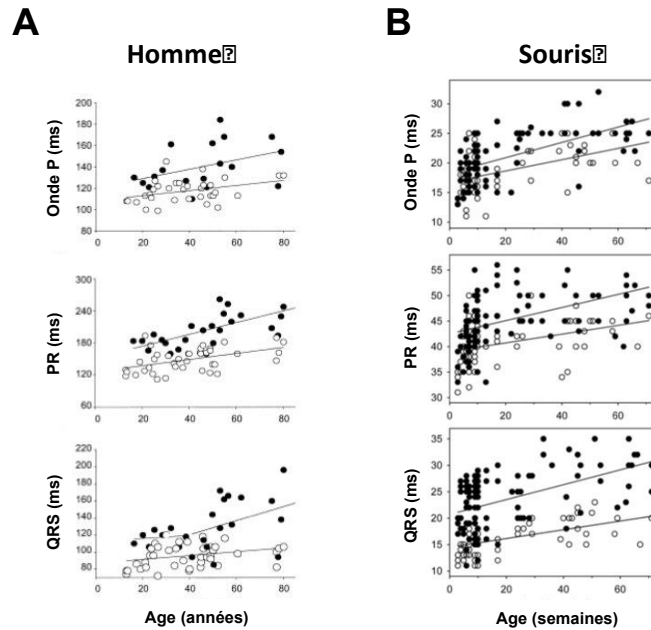


Figure 23 : Comparaison de l'évolution des paramètres ECG entre l'homme (A) et les souris *Scn5a*^{+/-} (B). Les ronds blancs correspondent aux membres sains de la famille ou souris sauvages. Les ronds noirs correspondent aux membres porteurs de la mutation IVS22+2 T>C ou souris *Scn5a*^{+/-}. D'après Royer, 2005 et Probst, 2003.

Leoni et ses collaborateurs ont voulu aller encore plus loin dans les mécanismes de compréhension du remodelage fibrotique associé aux troubles de la conduction. Après une analyse électrocardiographique et biochimique plus précise, ils ont pu mettre en évidence 2 phénotypes de souris *Scn5a*^{+/-}. Le premier phénotype présente un élargissement modéré de l'intervalle QRS associé à une diminution de seulement 25% de l'expression de Nav1.5. Le second phénotype est quant à lui plus marqué au niveau de l'élargissement du QRS avec une réduction de 50% de l'expression de Nav1.5. Les analyses histologiques ont montré la présence de fibrose chez les 2 phénotypes (Figure 24). L'augmentation de l'expression des facteurs *Egr1* et *Atf3* précédemment observée n'a cependant été retrouvée que chez les souris au phénotype le plus marqué (Leoni et al., 2010).

C'est dans cette suite que s'inscrit la première partie de mes travaux de thèse. En se basant sur ces faits, nous avons voulu identifier les mécanismes moléculaires à l'origine de la fibrose. Nous avons aussi voulu comprendre comment la réduction du courant sodique pouvait induire un tel remodelage structural.

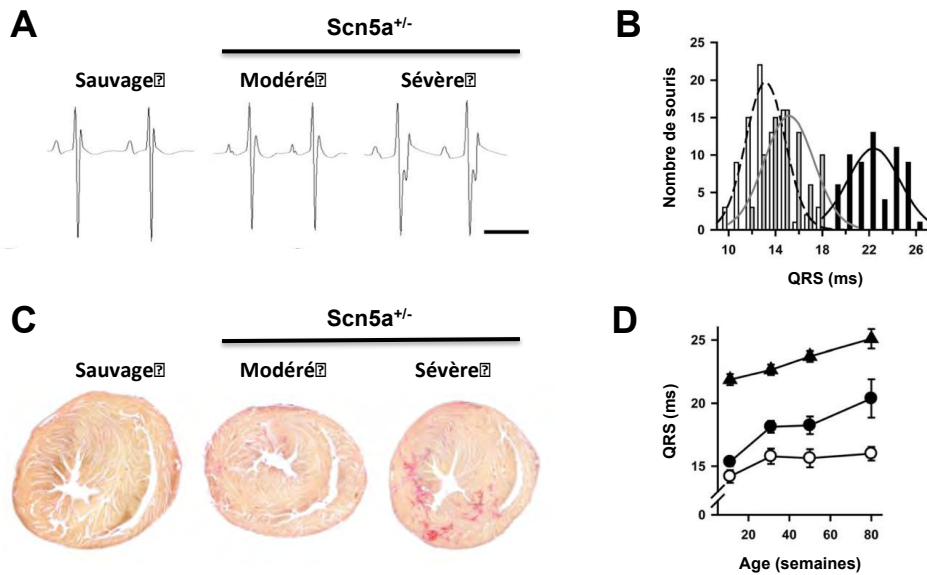


Figure 24 : Caractérisation des souris *Scn5a*^{+/-}. A. ECGs caractéristiques à 10 semaines montrant l’allongement du complexe QRS. Barre = 100 ms. B. Distribution des QRS en fonction du phénotype à 10 semaines chez les souris sauvages (blanc, ligne pointillée), *Scn5a*^{+/-} avec un phénotype léger (gris, ligne grise) et *Scn5a*^{+/-} avec un phénotype sévère (noir, ligne noire). C. Développement de fibrose chez les souris *Scn5a*^{+/-} de plus de 80 semaines. Coloration au rouge picosirius. D. Evolution du QRS avec l’âge chez les souris sauvages (ronds blanc), *Scn5a*^{+/-} avec un phénotype léger (ronds noir) et *Scn5a*^{+/-} avec un phénotype sévère (triangles noir). D’après Leoni et al., 2010.

Ce modèle murin est aussi utilisé par l’équipe de Huang et Grace à Cambridge comme modèle d’étude pour le syndrome de Brugada en raison de la perte-de-fonction observée sur le courant sodique. Selon ce groupe, ce modèle réunit de nombreuses caractéristiques cliniques observées chez les patients atteints de syndrome de Brugada telles que l’augmentation de l’hétérogénéité de repolarisation (Martin et al., 2010) et la propension à développer des arythmies sous Flécainide (Matthews et al., 2012; Stokoe et al., 2007). Rappelons que le syndrome de Brugada se caractérise par une élévation du segment ST sur l’électrocardiogramme et que l’ECG de souris ne présente pas de segment ST isoélectrique. Cette différence constitue à mes yeux une limite majeure dans le développement de modèles murins pour le syndrome de Brugada.

5 ACTEURS DE LA FIBROSE CARDIAQUE

Dans des conditions physiologiques, les fibres musculaires cardiaques sont entourées d’un réseau de fibres de collagène. Plus de vingt types de collagène composent ce réseau. Parmi eux les collagène I et III sont très nettement majoritaires (respectivement 80% et 11%) et jouent un rôle fondamental de soutien mais aussi dans la fonction myocardique (Weber, 1989; Borg and Caulfield, 1981). Le collagène I apporte davantage de rigidité et de solidité alors que le collagène III apporte plus de souplesse dans la structure (Pauschinger et al., 1999).

La fibrose correspond à une accumulation de matrice extracellulaire riche en collagène. Une certaine quantité de matrice est physiologique mais tout excès est pathologique. Par abus de langage on parle souvent de présence de fibrose mais en réalité ceci est faux, il faudrait parler de présence d'accumulation de collagène (Figure 25).

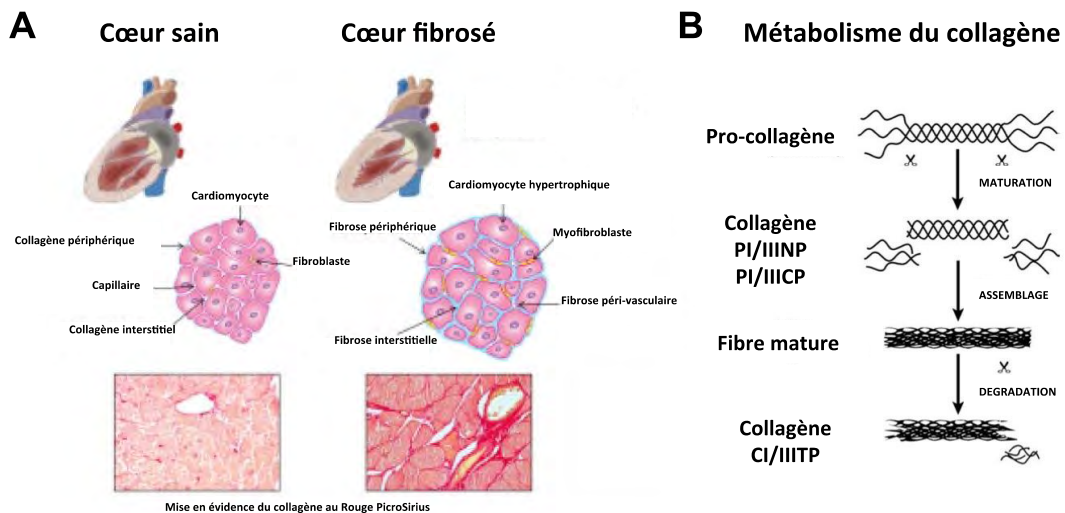


Figure 25 : Rôle et métabolisme du collagène A. Les fibres de collagène enveloppent le muscle cardiaque. En condition pathologique, l'accumulation de collagène aboutit à une fibrose marquée. B. Synthèse et dégradation du collagène. PI/IIINP : pro-peptides N-terminaux des collagènes I et III ; PI/IIICP : pro-peptides C-terminaux des collagènes I et III ; CI/IIITP : télopeptides C-terminaux des collagènes I et III D'après Biernacka and Frangogiannis, 2011 et Brown et al., 2005.

Selon que l'on s'intéresse à la fibrose qui s'installe en post-infarctus, à une fibrose réactive après un phénomène inflammatoire ou bien à une fibrose liée au vieillissement, les aspects morphologiques sont différents. Quatre types de structures fibrotiques sont admises dans la littérature (de Jong et al., 2010) (Figure 26) :

- une fibrose diffuse dans l'ensemble du myocarde sans localisation préférentielle,
- une fibrose interstitielle qui est la conséquence de l'expansion de matrice extracellulaire entre les fibres musculaires,
- une fibrose dite « *patchy* » ou focale, assez localisée, dont les fibres apparaissent assez larges. Cette fibrose est souvent une expansion de la fibrose interstitielle,
- une fibrose compacte qui est observée dans les cas d'infarctus du myocarde, très localisée et sans fibres musculaires en son sein.

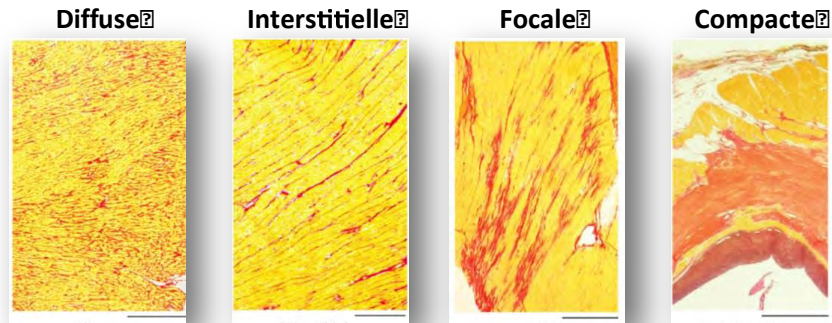


Figure 26: Différents types de fibrose. La fibrose, marquée au rouge picrosirius, apparaît en rouge. Barre = 1 mm. D'après de Jong et al., 2010.

De manière physiologique, la matrice extracellulaire de collagène n'est pas une structure figée, elle est en perpétuel réarrangement, entre synthèse et dégradation. Le remplacement du collagène se fait entre 80 et 120 jours (de Jong et al., 2010) ce qui met en évidence la stabilité de la matrice et la difficulté d'interagir sur cette balance en conditions pathologiques. En conditions pathologiques telles que les troubles progressifs de la conduction cardiaque, cette vitesse est très nettement augmentée et est en faveur d'une accumulation de collagène (Bozkaya et al., 2008).

Nous avons vu précédemment que le modèle de souris *Scn5a*^{+/-} développait de la fibrose au cours de l'évolution de la pathologie. Dans cette partie, je vais poser les bases des mécanismes fibrotiques que nous avons mis en évidence dans ce modèle murin.

5.1 FIBROSE ET TROUBLES DU RYTHME / DE LA CONDUCTION

L'accumulation de collagène a été observée au cours de différentes pathologies cardiaques affectant aussi bien les valves que le myocarde lui même. En lien avec cette augmentation, des études ont montré que les cardiomyopathies dilatées (CMD) étaient associées à une augmentation du collagène I et du ratio Collagène I / Collagène III (Marijianowski et al., 1995; Bishop et al., 1990). Des travaux plus récents de Pauschinger et ses collaborateurs montrent que les collagènes I et III augmentent chez des patients atteints de CMD et que l'augmentation de collagène I est en lien avec une réduction de la fonction myocardique (Pauschinger et al., 1999).

La fibrose constitue une véritable barrière au sein du myocarde au travers de laquelle la conduction ne peut se faire mais qui permet aussi la survenue de réentrées. Dans les cas de légère fibrose interstitielle, cette barrière est principalement longitudinale par rapport aux fibres cardiaques et ne perturbe *peu ou prou* la conduction cardiaque qui est majoritairement longitudinale (Spach et al., 1988). Cependant, lorsque celle-ci augmente, une désynchronisation apparaît entre la conduction transversale (affectée par la fibrose) et la conduction longitudinale. De manière schématisée, le chemin pour aller d'un point à un autre est plus sinueux, la conduction cardiaque est ralentie (Tusscher and Panfilov, 2007; de Bakker et

al., 1993) (Figure 27). L'irrégularité de la fibrose au sein du myocarde est à l'origine de zones de conduction hétérogènes très arythmogènes (Lammers et al., 1990). Dans une cohorte de patients atteints de CMD, Anderson et ses collaborateurs ont démontré que plus la fibrose était importante, plus la conduction était ralentie (Anderson et al., 1993). La présence de fibrose créant des zones de conduction lente et d'autres plus rapides, la dépolarisation du myocarde n'est pas uniforme. Cela se manifeste par une alternance dans la durée des potentiels d'action et l'apparition de tachycardie ventriculaire polymorphe (Nguyen et al., 2014; Qu et al., 2004).

En plus du ralentissement de la conduction cardiaque, de grosses zones de fibrose favorisent l'apparition de blocs de conduction unidirectionnels. Dans le cas d'un infarctus du myocarde, ce n'est pas la fibrose compacte qui est arythmogène mais la fibrose présente au niveau de la zone bordante. Cette région contient des cardiomyocytes viables emprisonnés qui sont eux d'excellents substrats pour induire des circuits de réentrée. Les réentrées se manifestent cliniquement par des épisodes de tachycardie ventriculaire monomorphe (Nguyen et al., 2014).

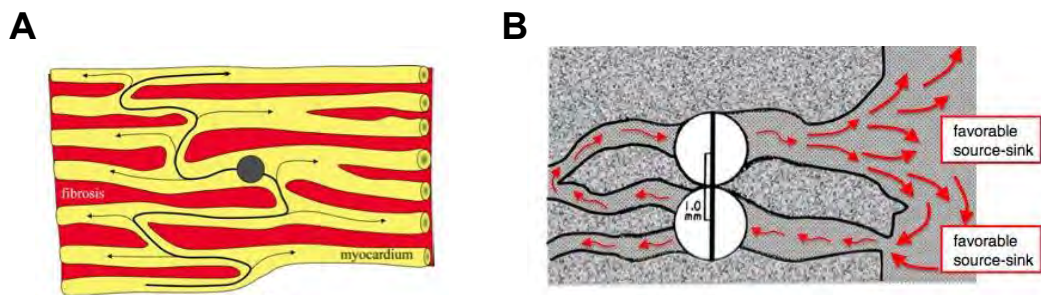


Figure 27 : Arythmogénicité de la fibrose. A. La fibrose (en rouge) ralentit la conduction cardiaque en favorisant une conduction en « zig-zag ». B. Les zones de fibrose induisent des circuits de réentrées (« source-sink »). D'après Nguyen et al., 2014.

5.2 FIBROBLASTES : REGULATEURS DE LA FIBROSE CARDIAQUE

5.2.1 ORIGINE DES FIBROBLASTES CARDIAQUES

Comme j'ai déjà pu le mentionner préalablement, les fibroblastes représentent une part cellulaire non négligeable de la masse cardiaque. Ainsi, dans un cœur de souris adulte, les cardiomyocytes représentent 56% des cellules contre 27% pour les fibroblastes (Banerjee et al., 2007). Ces résultats récents diffèrent de l'étude princeps de Nag datant de 1980 et réalisée chez le rat qui montrait que 67% des cellules étaient des fibroblastes pour seulement 30% de cardiomyocytes (Nag, 1980). Cette différence de pourcentage peut s'expliquer par l'avancée des techniques, par la découverte de marqueurs de plus en plus spécifiques des fibroblastes, mais aussi par la différence inter-espèce. L'origine des fibroblastes cardiaques n'est pas clairement établie. Trois origines sont présentées à l'heure actuelle comme possibles. De manière physiologique et principalement au cours du développement, la transition

épithélio-mésenchymateuse (EMT) depuis le pro-épicaarde est la principale source de fibroblastes cardiaques (Carmona et al., 2010; Norris et al., 2008; Snider et al., 2009). Après avoir migré au sein du myocarde, ces cellules se différencient en fibroblastes interstitiels, périvasculaires ou encore en cellules musculaires lisses des coronaires (Takeda and Manabe, 2011).

En plus de cette origine majoritaire, de nombreuses équipes ont mis en évidence diverses origines observées en conditions physiologiques ou pathologiques. En condition physiologique, les péricytes vasculaires peuvent se différencier en fibroblastes par EMT, tout comme les cellules endothéliales par un mécanisme similaire, la transition endothélio-mésenchymateuse (Zeisberg et al., 2007; Snider et al., 2009). En condition ischémique, les cellules dérivées de la moelle osseuse ainsi que les fibrocytes circulants et les cellules immunitaires de type macrophage et monocyte, peuvent acquérir un phénotype très proche de celui des fibroblastes en exprimant les marqueurs *ad hoc* tels que l' α -actine des muscles lisses (α -SMA) (Haudek et al., 2006; Hong et al., 2007; Möllmann et al., 2006; van Amerongen et al., 2008) (Figure 28).

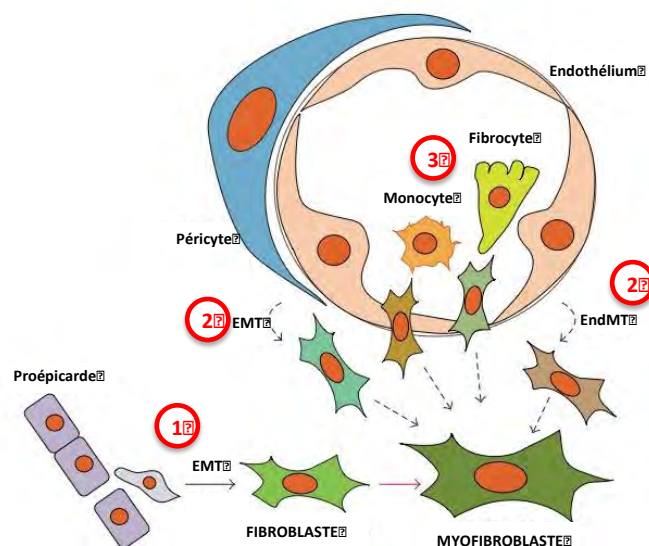


Figure 28 : Origine des fibroblastes cardiaques. En condition physiologique, les fibroblastes proviennent de l'épicaarde (1), de l'endothélium ou des péricytes (2). En conditions pathologiques, ils peuvent aussi dériver des monocytes et fibrocytes (3). D'après Takeda and Manabe, 2011.

5.2.2 PHYSIOLOGIE DES FIBROBLASTES

Morphologiquement les fibroblastes sont des cellules très plates, très étalées, avec de nombreux prolongement cytoplasmiques sans membrane basale (Baudino, 2006). Au cours des différentes études, de très nombreux marqueurs ont été utilisés pour les identifier sans grande réussite en raison de leur origine mésenchymateuse. Cependant, il semble que le récepteur DDR2 (*Discoidin Domain Receptor 2*) soit un bon marqueur spécifique des fibroblastes (Camelliti et al., 2005; Goldsmith et al., 2004). Les travaux de Ieda et ses collaborateurs ont affiné cette détection en montrant que les fibroblastes étaient

des cellules positives pour le CD90 (Cluster de Différenciation 90 spécifique des thymocytes et retrouvé dans les cellules souches), DDR2 (Discoidin Disc Receptor 2, dont le ligand est le collagène) et négatives pour le CD31 (Cluster de Différenciation 31 spécifique des cellules endothéliales) (Ieda et al., 2009).

Electrophysiologiquement, les fibroblastes sont des cellules non excitables, plus dépolarisées que les cardiomyocytes. L'expression des canaux ioniques dans ces cellules est très variable suivant les études. D'un côté, Vasquez et ses collaborateurs ont montré que les fibroblastes n'expriment pas de canaux activés par le potentiel (Vasquez et al., 2011). D'un autre côté, Li et ses collaborateurs indiquent que les fibroblastes expriment des canaux ioniques dont le canal sodique Nav1.5 et dans le même temps, Benamer et ses collaborateurs ont mis en évidence la présence du canal Kir6.1 dans ces cellules (Li et al., 2009; Benamer et al., 2009). Ces différences d'expression peuvent s'expliquer par les artéfacts de culture cellulaire et la propension des fibroblastes à se différencier en myofibroblastes.

Les fibroblastes ont de très nombreux rôles (Figure 29), encore mal connus pour certains, dans la physiologie cardiaque et ce bien au delà de la synthèse de collagène (Baudino, 2006; Manabe, 2002; Takeda et al., 2010).

Une des principales fonctions des fibroblastes est le maintien de l'équilibre et du renouvellement de la matrice extracellulaire (MEC). Celle-ci est composée de collagènes mais aussi de protéoglycanes, glycoprotéines, cytokines, facteurs de croissances et protéases (Bowers et al., 2010). La MEC forme un réseau organisé de connexion et de soutien entre les différentes cellules, répartit les forces mécaniques sur l'ensemble et adresse des signaux spécifiques. Enfin, elle joue le rôle de barrière entre les oreillettes et les ventricules ce qui assure leur propre contraction. Les stimuli chimiques tels que le TGF β , l'interleukine-6, l'interleukine-1 β ou le TNF α (*Tissue Necrosis Factor α*) activent de manière physiologique les fibroblastes ce qui active la synthèse de collagène. La dégradation de la MEC est effectuée par les MMP (*Matrix Metalloproteinase*) et leurs inhibiteurs les TIMP (*Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase*) qui sont eux aussi produits par les fibroblastes cardiaques (Nagase et al., 2006; Lovelock et al., 2005). Les fibroblastes sécrètent de nombreux facteurs autocrines ou paracrines qui activent ou inhibent ces processus.

Les travaux de Inoki et ses collaborateurs montrent que les fibroblastes modulent l'angiogenèse au travers de la sécrétion de CTGF (*Connective Tissue Growth Factor*) et de PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) qui ont des effets antagonistes (Zhao and Eghbali-Webb, 2001; Inoki et al., 2002). La mécanique d'action précise des fibroblastes reste cependant mal comprise.

Bien qu'il s'agisse de cellules non excitables, les fibroblastes jouent un rôle clé dans l'activité électrique cardiaque en séparant les myocytes les uns des autres. L'anneau fibrotique qui sépare les oreillettes des ventricules est essentiel à leur contraction séquentielle (Zhou et al., 2010). Les fibroblastes expriment à

leur surface membranaire des canaux ioniques activés par l'étirement, les « *stretch-activated channels* » (Hu and Sachs, 1997). Cette propriété fait des fibroblastes d'excellents mécanotransducteurs mais leur rôle physiologique est encore mal compris (Kamkin et al., 2003).

L'étude *in situ* des fibroblastes est très difficile. L'étude de Camelliti et ses collaborateurs en 2004 démontre, au niveau du nœud sinusal de lapin, une connexion des fibroblastes avec les cardiomyocytes (Camelliti et al., 2004b). Ce groupe a aussi mis en évidence une interaction *in situ* au niveau ventriculaire mais sans que cela ne soit bien caractérisé (Camelliti et al., 2004a).

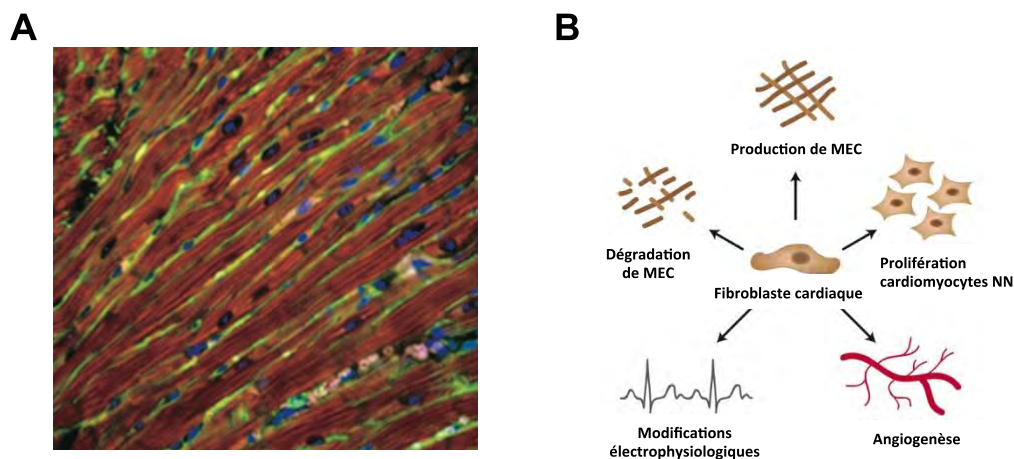


Figure 29 : Rôle des fibroblastes cardiaques. A. Organisation des fibroblastes cardiaques (vert) *in situ* entourant les fibres musculaires (rouge). Les fibroblastes sont des cellules de soutien qui orientent la propagation de l'influx électrique au sein des cardiomyocytes B. Rôles des fibroblastes cardiaques. NN : néonataux. D'après Souders et al., 2009.

5.2.3 PHYSIOPATHOLOGIE DES FIBROBLASTES/MYOFIBROBLASTES

Dans des situations pathologiques, les fibroblastes se différencient en myofibroblastes. Ils peuvent être considérés comme des « super » fibroblastes ayant des fonctions similaires mais exacerbées en faveur d'une accumulation de collagène comme cela peut être le cas dans les lésions post-infarctus (Sun, 2000). L'origine des myofibroblastes est elle aussi discutée. Traditionnellement, les études montrent qu'ils sont issus des fibroblastes déjà implantés au sein du myocarde mais d'anciens travaux de 1973 montrent que dans des cas de cardiomyopathies hypertrophiques, les fibroblastes et myofibroblastes dérivent d'autres sources cellulaires (endothélial, circulant, ...) (Mandache et al., 1973). Les travaux de Zeisberg et ses collaborateurs montrent que 30% des myofibroblastes proviennent des cellules endothéliales dans un modèle expérimental de fibrose (Zeisberg et al., 2007; Deb and Ubil, 2014). Une part non négligeable des myofibroblastes (de 3% à 24%) provient des cellules issues de la moelle osseuse (Haudek et al., 2006; van Amerongen et al., 2008).

La différenciation des fibroblastes en myofibroblastes (Figure 30) est sous la dépendance de 2 facteurs : le TGF- β 1 produit par les cellules inflammatoires au moment de l'initiation de la pathologie (Dobaczewski et al., 2010) et les contraintes mécaniques (Hinz et al., 2001; MacKenna et al., 2000). La différenciation en myofibroblastes nécessite une première étape de différenciation en proto-myofibroblastes dans lesquels l'actine G se polymérise en actine F pour former des fibres de stress puis une seconde étape au cours de laquelle l'expression de l' α -SMA (*α smooth muscle actin*) augmente (Tomasek et al., 2002). L'expression de l' α -SMA est conditionnée par la translocation nucléaire des facteurs MRTFs (*Myocardin-Related Transcription Factors*) retenus dans le cytoplasme lorsque l'actine est glomérulaire (Small et al., 2010). Dans de très nombreuses études réalisées *in vitro*, les auteurs ajoutent du sérum, riche en TGF- β 1 dans le milieu de culture. De plus les cultures sur des supports en plastique, recouverts ou non de collagène, augmentent la rigidité de la matrice. Ces deux conditions de culture favorisent la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes. Ceci doit permettre de relativiser les différences d'expression géniques observées dans les études réalisées sur des fibroblastes en culture dont on ne maîtrise pas l'état d'activation.

Un processus de dédifférenciation des myofibroblastes est bien décrit pour les cellules non cardiaques mais est relativement mal connu pour les cellules cardiaques (Artaud-Macari et al., 2013; Hecker et al., 2011) (Figure 30). En cas de réduction des contraintes mécaniques ou de l'inhibition de la phosphorylation du récepteur au TGF- β 1, une réversion des myofibroblastes peut être observée mais uniquement pour ceux qui sont en cours de prolifération (Driesen et al., 2014). Ces travaux apportent des pistes dans le traitement des processus fibrotiques. La cinétique d'action semble montrer qu'il faut agir dans les premiers temps de prolifération avant que la différenciation ne soit irréversible. Des travaux antérieurs de Rosker et ses collaborateurs ont montré que la suppression de l'expression de l' α -SMA supprimait les troubles du rythme cardiaque (Rosker et al., 2011).

Les myofibroblastes atriaux humains ont été montrés comme exprimant un canal sodique Nav1.5 fonctionnel alors que son expression était négligeable lorsqu'il ne s'agissait que de fibroblastes (Chatelier et al., 2012). Cette étude ouvre la voie à la compréhension du rôle de ces canaux dans des circonstances pathologiques.

L'inhibition de la formation des myofibroblastes semble être une cible importante dans la prévention des processus arythmiques. Il a été montré que la sur-activation de l'adénylate cyclase limitait la formation des myofibroblastes et diminuait l'accumulation de collagène par voie de conséquence (Swaney et al., 2005). Les travaux d'Askar ont confirmé par la suite que l'inhibition de la prolifération des myofibroblastes était centrale dans la prévention des arythmies (Askar et al., 2011).

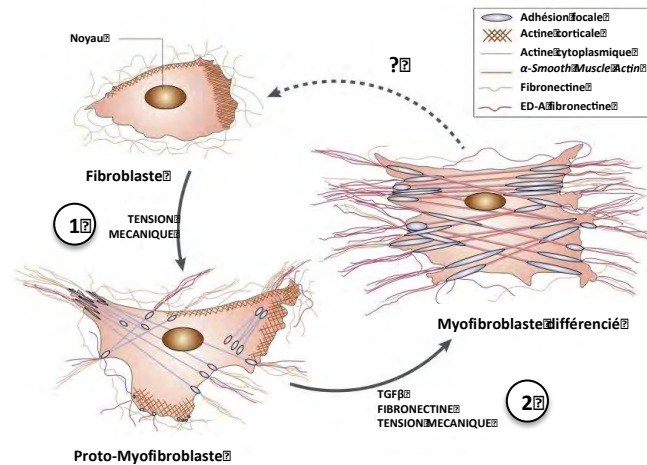


Figure 30 : Différenciation des fibroblastes en myofibroblastes. La première étape de différenciation nécessite des forces de tension (1), la seconde est quant à elle dépendante de facteurs sécrétés tels que le TGF- β 1 (2). D'après Tomasek et al., 2002.

5.2.4 INTERACTIONS CARDIOMYOCYTES/MYOFIBROBLASTES

Que ce soit au cours du développement cardiaque, dans des conditions physiologiques ou pathologiques, les fibroblastes dialoguent en permanence avec leur environnement, cardiomyocytes et vaisseaux.

5.2.4.1 Interactions paracrines

Les fibroblastes sont connus pour sécréter des facteurs paracrines de manière physiologique mais leur rôle dans le développement des arythmies est aujourd'hui clairement admis (Tian and Morrissey, 2012; Vasquez and Morley, 2012).

Au cours du développement embryonnaire, la communication entre les fibroblastes et les cardiomyocytes est indispensable à leur prolifération. Une diminution de la synthèse de collagène par les fibroblastes réduit la prolifération des cardiomyocytes néonataux *in vitro* (Ieda et al., 2009). Les études *in vitro* de co-cultures de cardiomyocytes et myofibroblastes ont permis de déchiffrer la communication qui existait entre ces deux types cellulaires et les effets réciproques. Ainsi, les travaux de Fredj et ses collaborateurs ont montré que les co-cultures permettaient aux cardiomyocytes de moins se différencier comme cela est couramment observé lorsque l'on met des cardiomyocytes adultes en culture sans myofibroblastes. Ils ont pu observer que les fibroblastes produisaient de l'interleukine-6 à l'origine d'une hypertrophie des cardiomyocytes et d'une augmentation de l'adhésion et de la prolifération des fibroblastes (Fredj et al., 2005).

Une étude *in vitro* a montré que la communication entre cardiomyocytes et fibroblastes était paracrine *via* la sécrétion de facteurs affectant la physiologie des deux types cellulaires (Figure 31). Ils ont pu montrer que le milieu de culture des fibroblastes ralentissait la conduction et réduisait l'expression des

canaux Nav1.5 et Kir2.1. Ils ont aussi pu montrer que la communication entre les cardiomyocytes n'était pas affectée bien que l'expression de la connexine 43 non phosphorylée (et schématiquement non fonctionnelle) soit augmentée (Pedrotty et al., 2009). Les fibroblastes semblent donc produire des facteurs solubles qui ont pour effet de réduire la conduction cardiaque. Vasquez et ses collaborateurs ont pu mettre en évidence que ces effets paracrines étaient mis en jeu dans le cas d'un infarctus du myocarde (Vasquez et al., 2010).

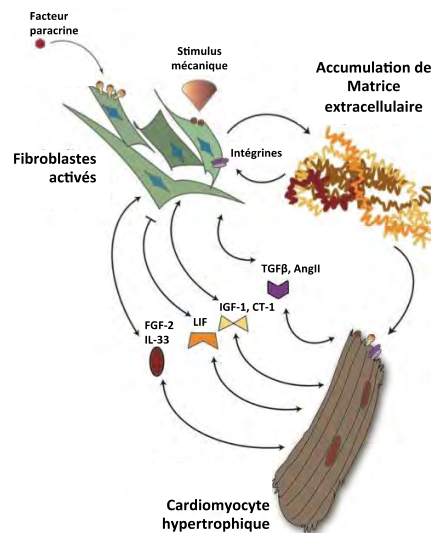


Figure 31 : Communication chimique cardiomyocytes/fibroblastes. D'après Kakkar and Lee, 2010; Takeda and Manabe, 2011.

5.2.4.2 Interactions physiques

Contrairement aux fibroblastes pour lesquels cela est moins clairement établi, les myofibroblastes interagissent de manière physique avec les cardiomyocytes. Deux théories existent dans la littérature.

La première hypothèse est fondée sur une interaction dépendante des connexines. Les travaux de Miragoli postulent que l'interaction entre les cardiomyocytes et les myofibroblastes dépend des jonctions homocellulaires et hétérocellulaires faisant intervenir les Cx43 et Cx45 (Miragoli, 2006). Cette communication a pour conséquence de dépolariser les cardiomyocytes d'environ 20 mV en fonction de la densité de myofibroblastes (Figure 32). Les travaux de Jacquemet confirment l'effet du couplage sur la variation du potentiel membranaire en précisant que la conduction est accélérée de 5% en cas de faible couplage alors qu'elle est largement réduite lors d'un couplage plus important (Jacquemet and Henriquez, 2008). Les travaux de Camelliti et ses collaborateurs ont montré que la Cx45 permettait une interaction transitoire entre les cardiomyocytes et les myofibroblastes alors que la Cx43 intervient dans une interaction plus durable (Camelliti et al., 2004a).

Dans le but de comprendre l'implication du couplage entre les cardiomyocytes et les fibroblastes, les travaux d'Askar et ses collaborateurs confirment l'importance de la Cx43 dans ce couplage. Ils ont pu montrer que l'inhibition de l'expression de la Cx43 dans les fibroblastes prévenait le ralentissement de la conduction au travers de l'augmentation de l'excitabilité des cardiomyocytes (Askar et al., 2012). L'étude du couplage des fibroblastes et des cardiomyocytes a été principalement réalisée au niveau atrial (Maleckar et al., 2009; Kamkin et al., 2005; 1999; Kohl et al., 2005; Thompson et al., 2011; Tian and Morrissey, 2012). Les implications physiopathologiques n'ont pas été clairement montrées au niveau des ventricules.

La seconde hypothèse est fondée sur une interaction dépendante des jonctions mécaniques. Les travaux de Follonier et ses collaborateurs ont montré que la synchronisation des oscillations calciques dans les myofibroblastes passait par un couplage intercellulaire mécanique (Follonier et al., 2008). Par la suite, la nature des protéines de couplage a été précisée dans un modèle de co-culture cardiomyocyte/fibroblaste, il s'agit des N-cadhérines, glycoprotéines transmembranaires dépendantes du calcium qui sont à la base des interactions cellulaires *via* les desmosomes (Thompson et al., 2011). Dans ce modèle, les auteurs montrent que la vitesse de conduction est dramatiquement réduite lorsque les cardiomyocytes sont couplés avec les myofibroblastes malgré l'augmentation de l'expression de la Cx43. Une étude précédente d'Azazuma-Nakamura a montré que l'augmentation de l'expression de la Cx43 participait à la différenciation des myofibroblastes (Azazuma-Nakamura et al., 2009). L'hétérogénéité de localisation des myofibroblastes au sein du tissu cardiaque crée des zones de conduction hétérogène au fort pouvoir arythmogène. Dans une seconde étude, les auteurs affinent la voie de transduction du signal et montrent que l'interaction et le ralentissement de la conduction dépendent de l'activité de la protéine G monomérique RhoA (Thompson et al., 2014).

5.3 REGULATEURS DE LA FIBROSE CARDIAQUE

De très nombreux facteurs influent sur le développement de la fibrose cardiaque. Cette partie ne traite pas de l'ensemble de ces facteurs mais uniquement de ceux impliqués dans notre modèle murin (pour revue sur les autres facteurs voir (Leask, 2010)).

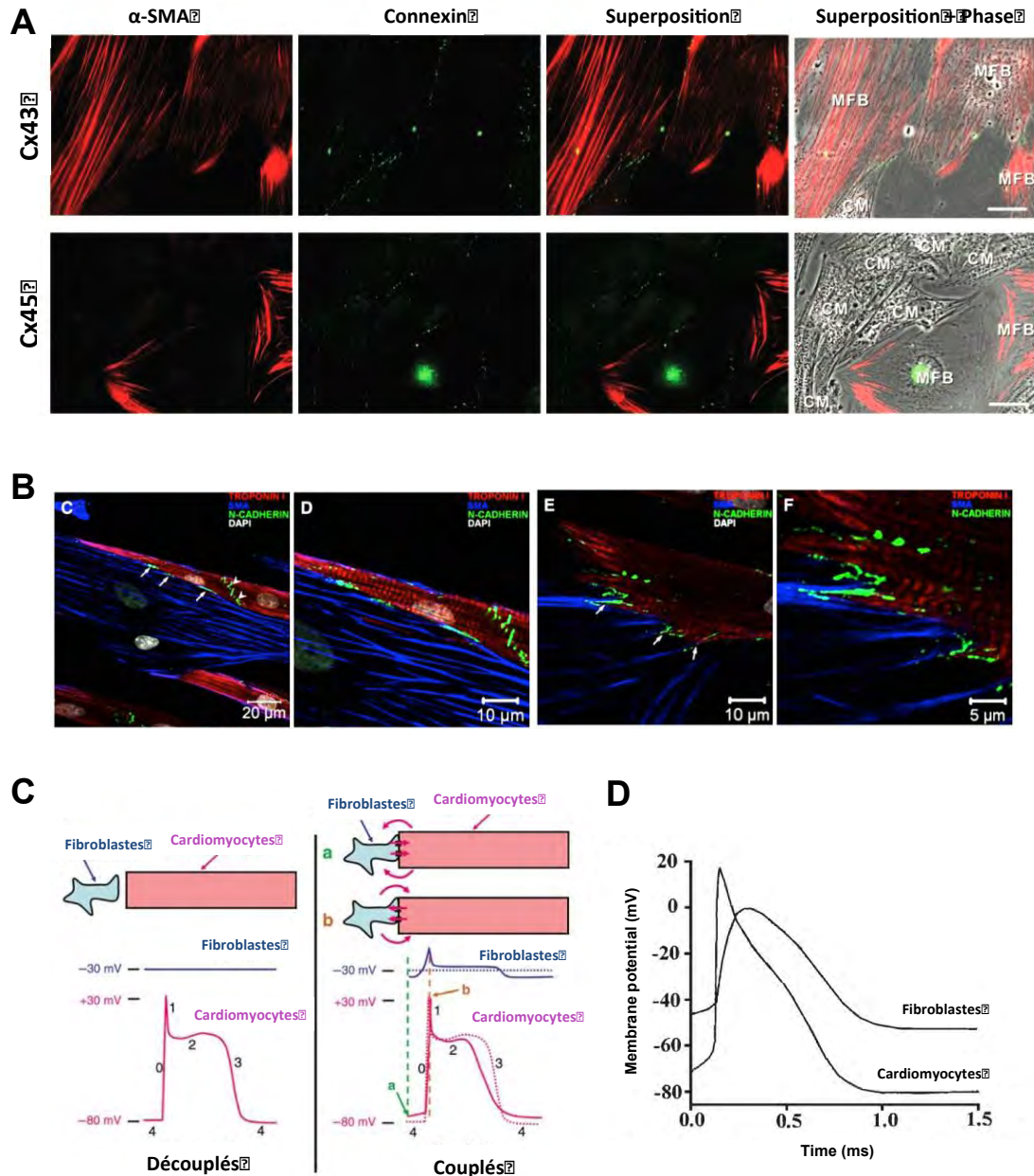


Figure 32 : Interactions cardiomyocytes/fibroblastes. A. Expression de la Cx43 et de la Cx45 par les myofibroblastes (MFB, exprimant l' α -actine des muscles lisses α -SMA) en co-culture avec des cardiomyocytes (CM). Les Cx43 et Cx45 permettent une interaction cardiomyocytes/myofibroblastes mais aussi myofibroblastes/myofibroblastes. Barre = 5 μ m. B. Jonctions hétérocellulaires dépendantes des cadhérines (vert) entre les cardiomyocytes (rouge) et les fibroblastes (bleu). Les cadhérines ne sont présentes qu'au niveau des sites d'interaction hétérocellulaires (flèches) ou entre les cardiomyocytes eux-mêmes (pointes) C. Lorsque cardiomyocytes et fibroblastes sont couplés, la dépolarisation du cardiomyocyte dépolarise le fibroblaste qui module à son tour le potentiel de membrane du cardiomyocyte. D. Enregistrement des variations de potentiel sur un cardiomyocyte et un fibroblaste couplés. D'après Miragoli, 2006 ; Thompson et al., 2014 et Yue et al., 2011.

5.3.1 LE TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA

Comme cela a été décrit précédemment, le TGF- β est un des principaux acteurs de la différenciation des fibroblastes et donc sa régulation est potentiellement centrale dans les pathologies fibrotiques (Vaughan

et al., 2000). La première étape dans la voie de signalisation du TGF- β consiste en son activation intrinsèque. En effet, une fois sécrété, le TGF- β est sous forme inactive, la partie N-terminale comprenant un pro-domaine LAP (*Latency-associated peptide*) et la partie C-terminale formant la forme active du TGF- β (Koli et al., 2001). Le clivage du pro-domaine LAP est indispensable à son action et nécessite l'intervention de protéases telles que la plasmine, les MMP-2 et MMP-9 (Annes et al., 2003). D'autres voies d'activation du TGF- β ont été décrites mais sont encore mal caractérisées (Barcellos-Hoff et al., 1994; Schellings et al., 2009; Munger et al., 1999).

Le TGF- β a de très nombreux rôles dans la cellule (Massagué, 2000) mais son mode d'action peut se résumer en une voie majoritaire faisant intervenir les protéines Smad et des voies accessoires (Moustakas and Heldin, 2005) (Figure 33).

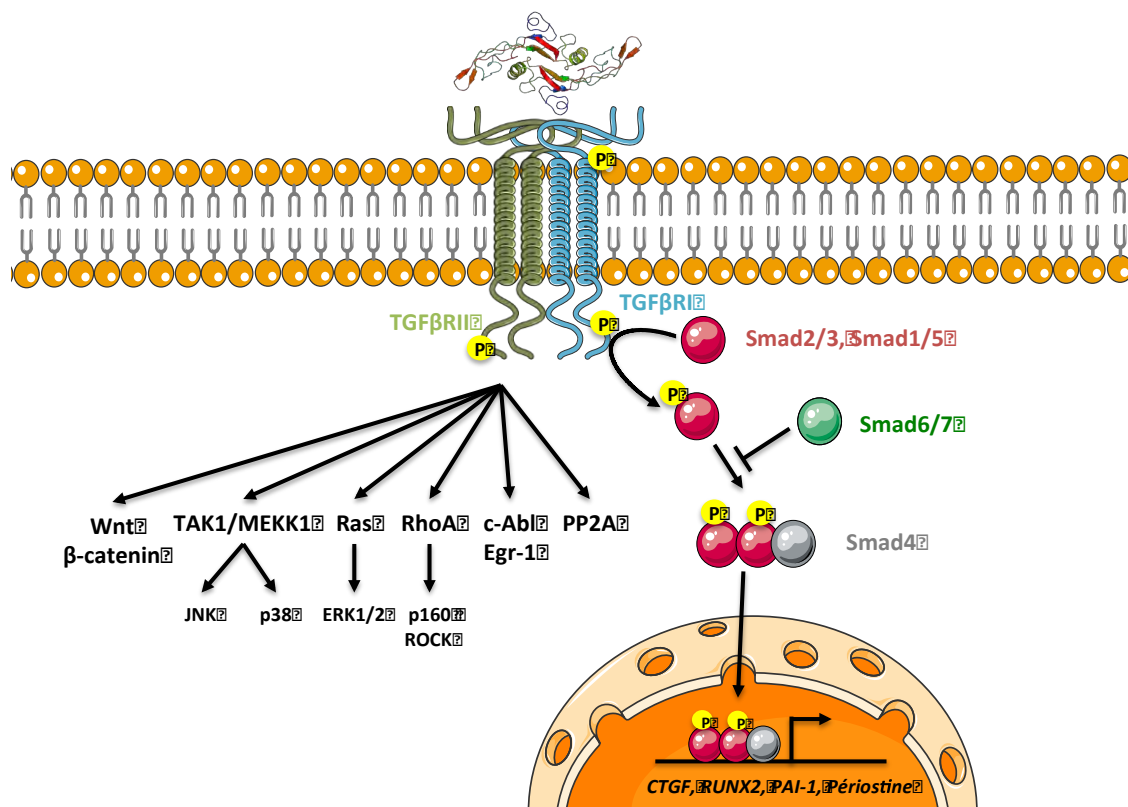


Figure 33 : Voies de signalisation du TGF- β dépendantes et indépendantes des Smad dans les processus fibrotiques. La fixation du TGF- β sur son récepteur provoque le regroupement hétéromérique des récepteurs de type 1 (TGF β RI) et de type 2 (TGF β RII) ainsi que la phosphorylation du TGF β RI par le TGF β RII. Le récepteur TGF β RI peut alors phosphoryler les Smad2/3 qui peuvent alors s'assembler en hétéromères avec Smad4. On parle de voie canonique pour le TGF- β dépendante des Smads. Les Smad6/7 sont des inhibiteurs de cette association. Le complexe hétéromérique peut alors s'accumuler dans le noyau et agir en tant que facteur de transcription pour de multiples gènes parmi lesquels CTGF, RUNX-2, la Périostine, ... Les voies non canoniques du TGF- β , indépendantes des Smads, passent par l'activation de second messagers tels que Wnt/ β -caténine, TAK1/MEKK1, Ras, RhoA, c-Abl, PP2A, ...

L'effet du TGF- β sur la différenciation des fibroblastes se fait au travers de la voie dépendante des Smads et son interaction avec la voie Wnt3/ β -caténine (Carthy et al., 2011).

D'autres voies de signalisation dépendantes du TGF- β peuvent intervenir dans ce processus. Ainsi, l'activation des facteurs de transcription Egr-1 et c-Abl par le TGF- β a été montrée comme pouvant activer les fibroblastes et augmenter la synthèse de collagène (Bhattacharyya et al., 2009; Chen et al., 2006a). Cette voie fibrotique est en accord avec l'augmentation de l'expression d'Egr-1 observée dans le modèle murin *Scn5a*^{+/-} qui développe de la fibrose (Leoni et al., 2010) ainsi que dans de nombreux autres modèles (Bhattacharyya et al., 2011).

Concernant le modèle murin *Scn5a*^{+/-}, Hao et ses collaborateurs ont récemment montré l'implication du TGF- β dans le processus fibrotique au niveau du nœud sinusal (Hao et al., 2011). Ils ont pu observer que lors du vieillissement, le pourcentage de fibroblastes chez les souris mutées était supérieur à celui observé chez les contrôles du même âge. Ils ont pu associer cela avec une augmentation de la fibrose et une augmentation de la forme active du TGF- β sans clairement en déterminer l'origine. Cette étude se focalise en grande partie sur le processus fibrotique au niveau du nœud sinusal. La question de l'implication du TGF- β dans la fibrose atriale et ventriculaire reste posée.

5.3.2 LE CONNECTIVE TISSUE GROWTH FACTOR

Le *Connective Tissue Growth Factor* (CTGF ou CCN2) est un polypeptide de 36-38 kDa de la famille des protéines CCN (CTGF/Cyr6/Nov) (Leask and Abraham, 2006). Il a de très nombreux rôles dans les cellules (Perbal, 2004) et son activation passe par de nombreuses voies de signalisations (HIF, AngII, Endotheline-1, ...) mais la principale est la voie du TGF- β dépendante des Smads (Chen et al., 2000; Wang et al., 2011b). Aucun récepteur spécifique du CTGF n'a pu être identifié à ce jour. Il est connu pour interagir avec de très nombreuses molécules et récepteurs tels que IGF, BMP-2, BMP-4, BMP-7 et VEGF (Dendooven et al., 2011) (Figure 34).

Les deux principaux effecteurs du CTGF sont les voies Smad et Erk1/2 (Phanish et al., 2010). Une troisième voie de signalisation dépendante de Rac-1 semble être importante en physiopathologie. Son activation conduit à une augmentation au sein des cardiomyocytes et des fibroblastes, de l'expression de la Cx43 et des N-cadhérines connues pour interférer sur l'interaction cardiomyocytes-(myo)fibroblastes (Adam et al., 2010).

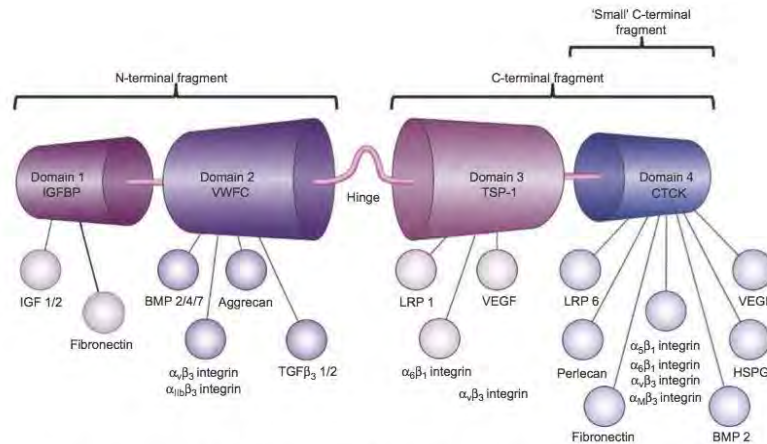


Figure 34 : Le *Connective Tissue growth Factor* (CTGF). Le CTGF est composé de 4 domaines et d'une région charnière clivable. Le CTGF est clivable par les protéases en une partie N-terminale et C-terminale. Le domaine 4 est aussi clivable. Chaque domaine interagit avec des protéines différentes impliquées dans la communication entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette. IGFBP : domaine de fixation de l'Insuline-like Growth Factor ; VWFC : facteur de von Willebrand de type C ; TSP-1 : thrombospondine de type 1 ; CTCK : C-terminal cysteine knot-like domain ; VEGF : facteur de croissance des cellules endothéliales vasculaires ; TGF- β : Transforming growth factor β ; LRP : protéine associée aux lipoprotéines ; HSPG : protéoglycane héparane sulphate ; BMP : Bone Morphogenetic Protein. D'après Dendooven et al., 2011.

Les travaux de Yoon et ses collaborateurs ont montré, dans un modèle de constriction aortique connu pour développer de la fibrose réactive, que l'expression du CTGF était augmentée et qu'une autre molécule de cette famille, CCN5, avait des rôles opposés au CTGF (Yoon et al., 2010). L'implication du CTGF a été confirmée par l'utilisation de siRNA sur des fibroblastes (Wang et al., 2011a). Dans un modèle de souris myopathes (souris *mdx*) une augmentation de la fibrose cardiaque est aussi associée à une augmentation drastique de l'expression du CTGF (Au et al., 2011).

Une première étude réalisée chez l'homme par Koitabashi et ses collaborateurs montre que l'augmentation de CTGF est en corrélation avec le degré de fibrose interstitielle. Cette étude montre qu'une altération de la balance CTGF/BNP en faveur d'une accumulation de CTGF est profibrotique et à l'origine d'une insuffisance diastolique (Koitabashi et al., 2007). Une autre étude démontre dans le même temps une corrélation entre le taux de CTGF et la dysfonction ventriculaire droite (Bergestuen et al., 2010). Ces travaux réalisés chez l'homme corroborent l'implication forte du CTGF dans les processus fibrotiques cardiaques et dans l'insuffisance cardiaque associée.

5.3.3 LE FACTEUR FIBROTIQUE SPARC

La protéine SPARC (*Secreted Acidic and Rich in Cysteine*) ou autrement appelé osteonectine est une glycoprotéine de 32 kDa qui fait partie de la famille des facteurs associés à la matrice extracellulaire en permettant une interaction cellule-matrice. Elle a un rôle clé dans l'incorporation du collagène dans la MEC (Figure 35).

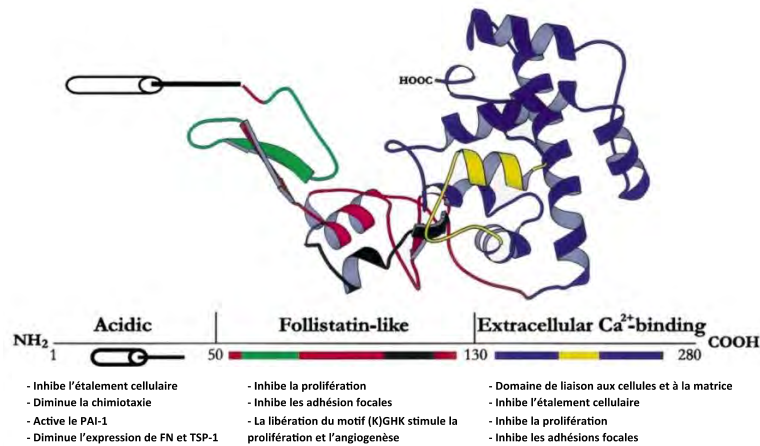


Figure 35 : Le facteur SPARC. Le domaine C-terminal permet la liaison avec le collagène et la matrice extracellulaire. D'après Brekken and Sage, 2001.

Lors de la synthèse de collagène au niveau cardiaque, 90% du pro-collagène synthétisé est dégradé avant d'être incorporé dans la MEC (Mays et al., 1991). C'est dans ce processus d'intégration du collagène qu'intervient SPARC. L'interaction entre SPARC et le collagène empêche ce dernier d'interagir avec les récepteurs membranaires (intégrines et MT1-MMP) qui le dégradent. Ainsi lors d'une augmentation de l'expression de SPARC, la balance est en faveur de l'interaction SPARC-collagène et en défaveur de sa dégradation (Figure 36). Le collagène s'incorpore davantage dans la matrice, le processus de fibrose est enclenché (Harris et al., 2011; Rentz et al., 2007). L'interaction entre SPARC et le collagène se fait au travers des motifs GVMGFO localisés au centre et à la queue C-terminale de la triple hélice de collagène (Hohenester et al., 2008).

De nombreux travaux ont montré ce rôle de stabilisation du collagène pour SPARC. Dans un modèle de rat soumis à une stimulation β -adrénergique, l'expression de SPARC est corrélée avec l'augmentation de TGF β , de la synthèse et des dépôts de collagène (Masson et al., 1998). Ridinger et ses collaborateurs ont montré en 2009 que l'expression de SPARC était augmentée dans des coupes de ventricules de patients présentant une hypertrophie cardiaque associés à de la fibrose (Ridinger et al., 2009).

L'injection de shRNA visant SPARC dans un modèle de rat développant une fibrose hépatique réduit nettement la production de collagène (Camino et al., 2008). Ces résultats ont été confirmés par Wang et ses collaborateurs qui ont montré une diminution des marqueurs fibrotiques pulmonaires en utilisant des siRNA dirigés contre SPARC dans un modèle de souris (Wang et al., 2010). Des résultats similaires ont été obtenus dans un modèle de fibrose hépatique induite par le TGF β (Atorrasagasti and Aquino, 2011).

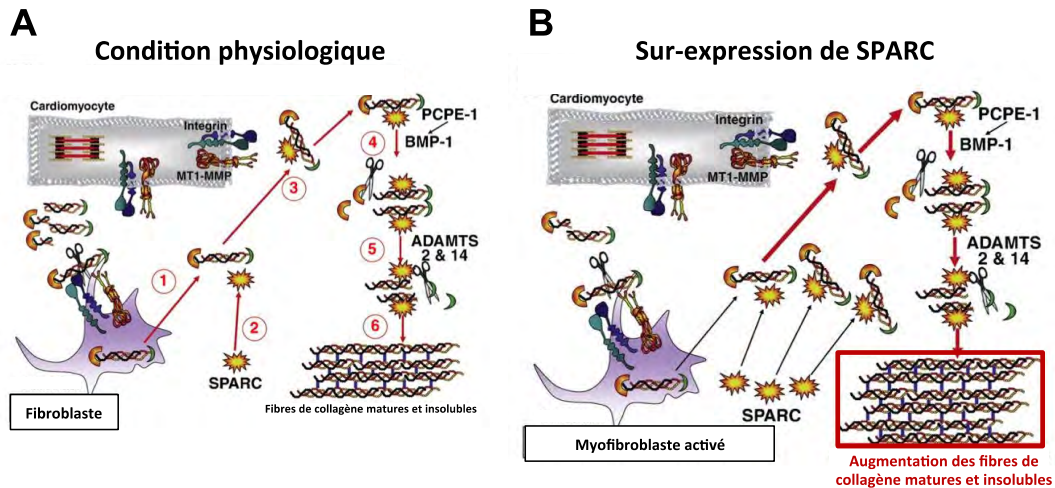


Figure 36 : Mode d'action de SPARC en conditions physiologiques (A) et pathologiques (B). En conditions physiologiques, les fibroblastes sécrètent du collagène sous forme de pro-collagène (1). Le facteur SPARC vient se fixer au pro-collagène (2) en empêchant ainsi l'association du pro-collagène avec ses récepteurs cellulaires. L'extrémité C-terminale du pro-collagène est alors clivée par le BPM-1 (4) puis la partie N-terminale est clivée par les ADAMTS2/14 (5). Le collagène mature s'assemble ainsi sous forme de fibres de collagènes en perdant son interaction avec SPARC (6). Une part importante du pro-collagène synthétisé par les fibroblastes ne fixe pas de facteur SPARC, interagit avec les récepteurs cellulaires de type intégrines et est dégradé par les MT1-MMP. En conditions pathologiques où le facteur SPARC est surexprimé, l'ensemble du procollagène synthétisé est pris en charge par le facteur SPARC, le processus de maturation est favorisé et les fibres de collagènes matures et insolubles sont augmentées. SPARC : *Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein* ; BMP : *Bone Morphogenetic Protein* ; PCPE : *Procollagen C-Proteinase Enhancer* ; ADAMTS : *A Disintegrin like and Metalloproteinase Domain with Thrombospondin Type Motif* ; MT1-MMP : *Membrane Type 1 Matrix Mettaloproteinase*. D'après McCurdy et al., 2010.

Il est intéressant de noter que les souris invalidées pour SPARC, bien qu'elles présentent une augmentation de la prolifération et de la différenciation des myofibroblastes en réponse à un infarctus, ne développent pas de fibrose en raison de la dégradation accrue du pro-collagène (Basu et al., 2001). Dans un modèle d'infarctus, la sur-expression de SPARC est transitoire et permet la prolifération des fibroblastes (Wu et al., 2006).

5.3.4 LES MMPs ET TIMPS

Les *Matrix Metalloproteinases* (MMPs) sont les protéinases les plus importantes dans la dégradation de la matrice extracellulaire. Vingt-trois MMPs, codées par 23 gènes différents, sont connues chez l'homme, chacune avec des spécificités de substrat. Leur activité est très basse dans des conditions physiologiques mais elles sont très sensibles aux stimuli externes tels que l'inflammation, les facteurs de croissance et les interactions cellule-cellule ou cellule-matrice. L'étude des MMPs ne peut se faire sans l'étude de leurs inhibiteurs endogènes, les TIMPs (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*). Au niveau cardiaque, les MMP-2 et MMP-9 qui sont des gélatinases, sont les plus actives (Nagase et al., 2006). Bien que les MMP-2 et MMP-9 soient toutes deux des gélatinases, leurs substrats sont quelques peu

différents. Parmi leurs substrats, la MMP-2 semble être plutôt spécifique des collagènes de type I, III, IV, V, VII et X alors que la MMP-9 est plutôt spécifique des collagènes de type IV, V, XI et XIV. Les collagènes de type I et III étant les principaux au sein du myocarde, l'activité de la MMP-2 semble prépondérante dans les processus fibrotiques.

De manière physiologique, l'expression de la MMP-9 ainsi que le pourcentage de fibrose augmentent avec l'âge des souris. Au cours du vieillissement, les souris invalidées pour la MMP-9 présentent une fonction cardiaque améliorée et une fibrose moins marquée que les souris contrôles (Chiao et al., 2012). Les auteurs démontrent aussi que la perte d'expression de la MMP-9 affecte peu l'expression du CTGF. L'expression et/ou de l'activation des MMP-2 et MMP-9 a aussi été montrée comme étant en relation avec l'expression du facteur fibrotique SPARC dans un modèle de gliome humain (Rich et al., 2003). Le rôle de la MMP-9 concerne donc l'intégration du collagène dans la matrice.

Dans une étude réalisée chez 45 jeunes patients souffrant de cardiomyopathie hypertrophique, Zachariah et ses collaborateurs ont montré une augmentation de l'expression de la MMP-3 circulante, sans modification de l'expression des MMP-2 et MMP-9 (Zachariah et al., 2012). Au stade d'insuffisance cardiaque terminale initiée par une cardiomyopathie dilatée ou ischémique, une augmentation de l'expression et de l'activité des MMP-2 et MMP-9 est en lien avec le processus fibrotique (Polyakova et al., 2010).

Dans le cadre des troubles progressifs de la conduction cardiaque, Bozkaya et ses collaborateurs ont montré une augmentation des taux sériques de MMP-9 en association avec un renouvellement accru de la matrice de collagène (Bozkaya et al., 2008). Ils observent dans le même temps une diminution de l'expression sérique de la MMP-2 et supposent, au vu de la nature fibrotique de la pathologie, que ceci est en faveur d'une accumulation de collagène.

Dans un modèle de souris en insuffisance cardiaque, l'augmentation de la MMP-2, retrouvée chez de vieilles souris saines, n'est pas à elle seule la cause de l'augmentation de fibrose. Le point central est le ratio MMP/TIMP et dans ce modèle, la diminution de l'expression de TIMP-3 et TIMP-4 est spécifique de l'insuffisance cardiaque. La balance MMP/TIMP est donc davantage en faveur d'une sur-activation des MMP en cas d'insuffisance cardiaque (Horn et al., 2012). Les travaux de Kandalam ont confirmé le rôle clé des TIMP dans ce processus fibrotique (Kandalam et al., 2011).

En plus de leur rôle d'inhibiteurs des MMP, les TIMPs ont des modes d'action propres. Les TIMP-3 ont été montrées comme inhibant la prolifération des cardiomyocytes néonataux et l'hypertrophie des cardiomyocytes adultes (Vanhoutte and Heymans, 2010). Les TIMP-1 à 4 ont été impliquées dans la prolifération et la différenciation des fibroblastes alors que TIMP-2 est plus en lien avec la synthèse de collagène par les myofibroblastes (Lovelock et al., 2005). Pour revue sur le rôle des TIMP dans les

processus fibrotiques voir Moore et al., 2011.

5.3.5 LA SIGNALISATION PURINERGIQUE

L'ATP est la source d'énergie ubiquitaire de toutes les cellules. En plus de ce rôle, l'ATP est libérée dans le milieu extracellulaire (Su et al., 1971). Aujourd'hui, les rôles de cet ATP sécrétée ne sont pas encore bien connus mais on sait qu'elle est impliquée dans de nombreux processus (Vaughn et al., 2012; Burnstock et al., 2012). De très nombreux mécanismes de libération d'ATP ont été proposés (Lazarowski, 2012; Corriden and Insel, 2010).

Concernant le mécanisme fibrotique, le premier mécanisme de libération de l'ATP provient de l'apoptose/nécrose des cellules. L'ATP ainsi libérée a un rôle de chémoattractant pour les molécules de l'inflammation (Elliott et al., 2009; Chen et al., 2006b). Un autre mécanisme impliqué dans la libération d'ATP fait intervenir les pannexines (Pnx), des hémicanaux analogues des connexines. Parmi les 3 isoformes connues de la Pnx, la Pnx-1 est la mieux décrite et la plus impliquée dans la libération d'ATP (Penuela et al., 2013). Les travaux de Nishida et ses collaborateurs ont montré dans un modèle murin de fibrose cardiaque que la libération d'ATP au travers de la Pnx-1 était centrale dans ce processus (Nishida et al., 2008).

L'ATP possède 2 types de récepteurs, les P2X (canaux à ATP) et les P2Y (récepteurs à 7 domaines transmembranaires). L'activation des récepteurs P2X conduit à une augmentation du calcium intracellulaire (Kaczmarek-Hájek et al., 2012). La majorité des récepteurs P2Y (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ et P2Y₁₁) sont couplés à la protéine G_q et activent la voie de signalisation dépendante de la PKC. Nishida et ses collaborateurs ont montré dans leur modèle de fibrose secondaire à une surcharge myocardique, que l'ATP libéré par la Pnx-1 des cardiomyocytes active de manière autocrine le récepteur P2Y₆ des cardiomyocytes couplé à la protéine G trimérique G $\alpha_{12/13}$. Les cardiomyocytes sécrètent alors des facteurs fibrotiques tels que le TGF β et le CTGF qui vont induire la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes et d'enclencher le processus fibrotique (Figure 37) (Nishida et al., 2008). Au niveau des fibroblastes cardiaques, l'ATP active les récepteurs P2Y₂, P2X₄ et P2X₇ ce qui stimule leur prolifération suivant une voie dépendante de Akt et de Erk1/2 (Chen et al., 2012).

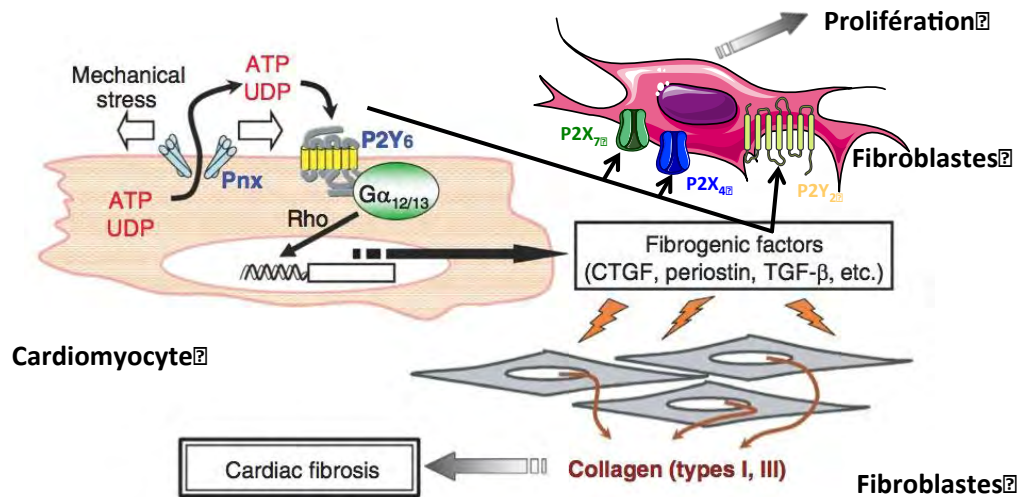


Figure 37: Signalisation purinergique et fibrose. La libération d'ATP au travers de la Pn1x-1 des cardiomyocytes active de manière autocrine les récepteurs P2Y₆ des cardiomyocytes couplés à la protéine G trimérique Gα_{12/13}. Les cardiomyocytes sécrètent alors des facteurs fibrotiques (CTGF, TGFβ, periostine) activateurs des fibroblastes cardiaques. La libération d'ATP est aussi capable d'activer directement les fibroblastes en se fixant sur les récepteurs P2Y₂, P2X₄ et P2X₇. D'après Nishida et al., 2008.

6 INTER-REGULATION DE NAV1.5 ET DE LA CX43 DANS LES PROCESSUS FIBROTIQUES

6.1 LE PERINEXUS : UNE SUPER-STRUCTURE AUSSI FRAGILE QU'ESSENTIELLE

Les disques intercalaires constituent une unité fonctionnelle dans laquelle les desmosomes (au travers de la Plakophiline-2), les jonctions communicantes (au travers de la Cx43) et les protéines d'ancrage sous membranaire (au travers de l'Ankyrine G) sont très proches (Sato et al., 2011). Suite à une extinction de l'expression de la plakophiline-2 par shRNA, l'expression de la Cx43 est diminuée (Oxford et al., 2007). Dans un modèle murin invalidé à l'état hétérozygote pour le Plakophiline-2, une des protéines essentielles à la formation des desmosomes, une réduction du courant sodique est observée en association avec une diminution de la vitesse de conduction (Cerrone et al., 2012; Sato et al., 2009). La perte d'une protéine desmosomale semble donc avoir de grandes conséquences sur la formation l'organisation de la Cx43 et de Nav1.5.

Les travaux de Rhett et ses collaborateurs (Rhett et al., 2012) ainsi que les derniers travaux de l'équipe de Delmar montrent un lien très étroit entre les desmosomes, le canal sodique Nav1.5 et la Cx43 (Cerrone et al., 2013). Les travaux sur le modèle déficient pour la plakophiline-2 indiquent une régulation très étroite entre Nav1.5 et la Cx43. Ces deux protéines font partie d'une super structure fragile dont chaque pièce est indispensable à son fonctionnement, le perinexus. Seule une étude ne montre pas de diminution du courant sodique dans des cardiomyocytes invalidés pour la Cx43 (Johnson et al., 1999).

Selon le modèle proposé par Rhett (Rhett et al., 2013), les plaques de Cx43 et les desmosomes ne formeraient qu'une seule unité avec au centre le perinexus qui ferait le lien entre les deux structures. Les canaux Nav1.5 qui ont été montrés pour interagir aussi bien avec l'une ou l'autre de ces structures sont présents au sein de ce perinexus. Comme l'ont montré les études sur les souris invalidées pour la Cx43 ou les études sur la dysplasie arythmogène du ventricule droit, ce complexe est fragile. La perte d'un des composants modifie la structure de ce complexe et affecte la conduction cardiaque. Les avancées de la microscopie permettront de mieux comprendre les interactions au sein du perinexus et entre ces structures, qui ne sont pas encore clairement établies (Figure 38).

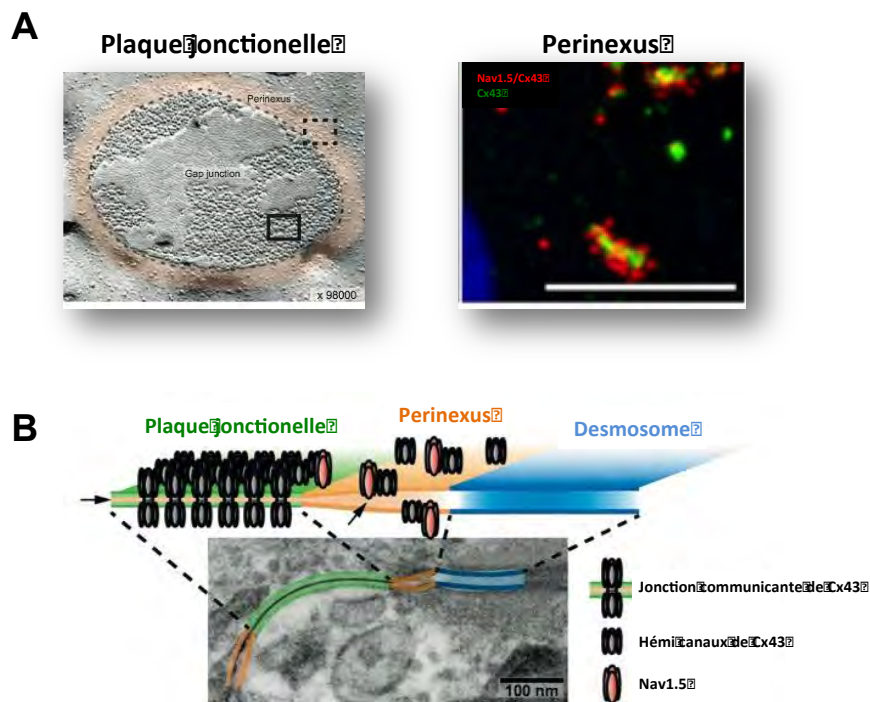


Figure 38: Le perinexus. A. Gauche : Cryofracture d'une plaque jonctionnelle de Cx43 vue en microscopie électronique montrant le perinexus est situé autour de la plaque dense de Cx43. Droite : Le marquage *duolink* (rouge) reflète l'interaction entre la Cx43 et Nav1.5. Cette interaction ne se fait qu'autour de la plaque dense de Cx43 (vert). Cette zone d'interaction entre Nav1.5 et la Cx43 est appelée le perinexus. Le noyau est marqué en bleu. Barre = 10 µm. B. Le perinexus fait le lien entre les plaques de Cx43 et les desmosomes pour que l'ensemble forme une unité. D'après Rhett et al., 2013.

6.2 NAV1.5 ET CX43 : A L'ORIGINE DE LA FIBROSE CARDIAQUE

En plus de leur interaction dans les cardiomyocytes, Nav1.5 et la Cx43 pourraient interagir dans d'autres types cellulaires tels que les fibroblastes impliqués dans la fibrose. L'expression de Nav1.5 et de la Cx43 est augmentée dans les myofibroblastes atriaux en association avec la fibrose cardiaque (Askar et al., 2012; Chatelier et al., 2012). Dans un tout autre modèle murin d'hypertrophie induite par la calcineurine, une réduction drastique de l'expression de Nav1.5 et de la Cx43 sur cœur entier est observée avant la mise en place du processus fibrotique. Il est à noter que malgré une diminution de son

expression totale, la forme non-phosphorylée de la Cx43 est augmentée (Fontes et al., 2014). Cette forme non phosphorylée est associée à des défauts de conduction cardiaque (Akar et al., 2004). Ces travaux vont dans le sens d'une relation étroite entre le complexe Nav1.5/Cx43 et les processus fibrotiques.

6.3 LA Cx43 : UNE NOUVELLE CIBLE ANTI-FIBROTIQUE ?

La Cx43 semble être un acteur majeur dans les troubles progressifs de la conduction cardiaque, autant à cause de son rôle direct sur la conduction au sein des cardiomyocytes qu'à cause de son rôle de « complexe d'ancrage » au sein des disques intercalaires et de ses modes d'action sur la différenciation des fibroblastes et sur l'activation de la voie du TGF β . Le maintien d'une expression et d'une fonctionnalité élevée de la Cx43 semble être central dans la prévention des mécanismes de fibrose. Dans ce sens, l'utilisation du Rotigaptide (ZP123), un peptide anti-arythmique qui prévient le découplage de la Cx43, semble être une voie thérapeutique intéressante. Le Rotigaptide est connu pour augmenter l'expression de la Cx43 à la membrane de cardiomyocytes de rats et ainsi empêcher le ralentissement de la conduction et la dispersion de repolarisation observés en post-ischémie (Kjølbye et al., 2008; Lin et al., 2008).

Au cours de la première partie de ma thèse je me suis intéressé au remodelage myocardique chez les souris Scn5a^{+/-} à l'origine de la fibrose cardiaque. Ces souris souffrant de troubles de la conduction cardiaque, nous nous sommes intéressés au remodelage de la Cx43 et aux mécanismes reliant Nav1.5 au processus fibrotique.

Le syndrome du QT long de type 3 – Souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP}

1 DEFINITION

Le syndrome du QT Long (SQTL) est une maladie familiale caractérisée par un allongement de la durée de repolarisation ventriculaire et une forte incidence de tachycardies ventriculaires de type torsades de pointes. Ces épisodes arythmiques interviennent généralement au cours d'une activité physique (principalement la natation) ou d'un stress, d'une émotion. Cependant, pour certains types de syndromes du QT long comme le type 3, ils interviennent au repos. La première description de ce syndrome a été faite par Jervell et Lange-Nielsen (1957), Romano (Romano et al., 1963) et Ward (Ward, 1964). Une des caractéristiques de ce syndrome est que les arythmies se font sur un cœur sain, sans anomalie structurale associée. La prévalence du syndrome du QT long est variable suivant les régions du monde et se situe autour de 1:2500 dans la population caucasienne (Schwartz et al., 2009). Dans une étude portant sur 647 patients non traités de plus de 28 ans, 13% avaient fait une mort subite récupérée avant l'âge de 40 ans (Priori et al., 2003). Cette étude a aussi pu montrer, sur un petit groupe de patients, que les hommes étaient symptomatiques bien avant les femmes.

2 CLINIQUE

Sur le plan clinique, les deux critères de diagnostic d'un syndrome du QT long sont l'allongement de la durée de repolarisation et les épisodes arythmiques. Les épisodes arythmiques peuvent conduire à la survenue de torsades de pointes pouvant aboutir à des syncopes ou à la mort subite cardiaque. Ils constituent une part très importante du diagnostic des patients. L'allongement de l'intervalle QT est la caractéristique principale du syndrome du QT long bien qu'elle ne soit pas toujours retrouvée. Les femmes ayant naturellement un intervalle QT plus long que les hommes, en partie imputable aux hormones, les critères ne sont pas les mêmes (Priori et al., 2001). Un intervalle QTc (corrigé selon la formule de Bazett), supérieur à 460 ms est considéré comme allongé pour les femmes alors qu'il l'est dès 440 ms pour les hommes. Entre 20% et 25% des patients atteints d'un syndrome du QT long confirmé par les analyses génétiques ne présentent pas d'allongement pathologique de l'intervalle QT (Priori et al., 2013b). Bien qu'un QTc supérieur à 600 ms favorise nettement l'apparition de troubles du rythme, il n'y a pas de relation directe entre la sévérité des troubles du rythme et la durée du QT (Priori et al., 2001).

En plus de l'allongement du QT, la morphologie des ondes T associées à un syndrome du QT long est modifiée. Classiquement, les ondes T sont biphasique et/ou crochétées sur les dérivations précordiales ce qui marque une hétérogénéité de repolarisation. Sur l'ECG, on peut différencier 3 types de syndromes du QT long. Le type 1 est caractérisé par une onde T très positive, le type 2 par une onde T

empâtée et le type 3 correspond à une onde T décalée dans le temps (Figure 39). La présence d'ondes T alternées est caractéristique du syndrome du QT long et précède souvent les torsades de pointes. Il s'agit d'une alternance à chaque battement cardiaque de la polarité ou de l'amplitude des ondes T (Priori et al., 2001).

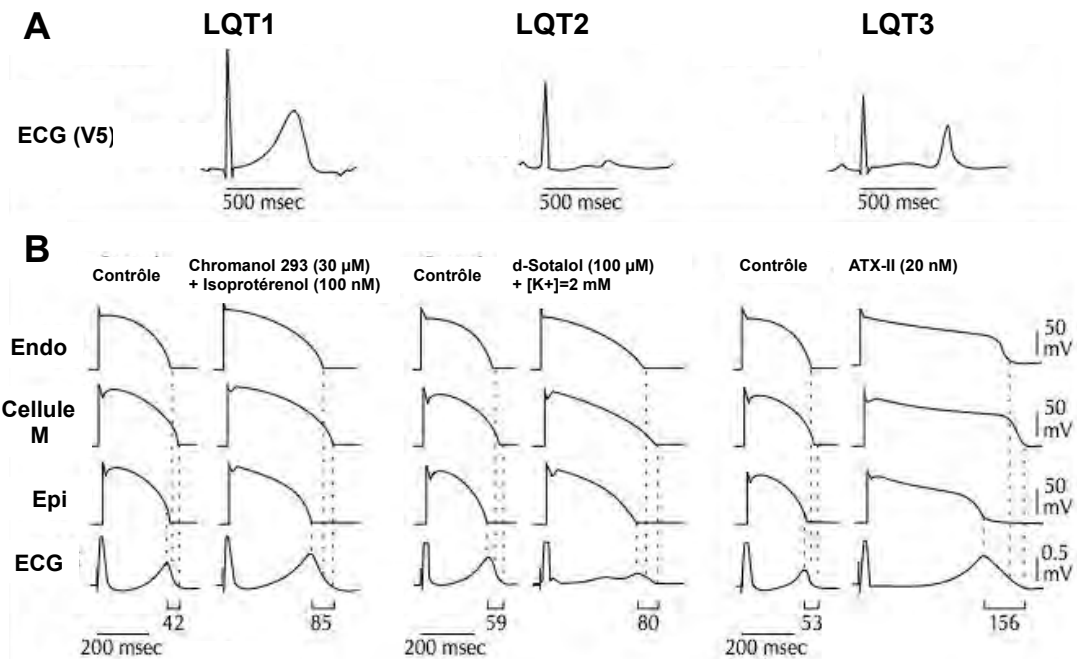


Figure 39 : Caractéristiques électrocardiographiques des 3 principaux types de syndromes de QT long. A. ECGs humains représentatifs des 3 principaux syndromes du QT long associés à des mutations sur le gène *KvLQT1* (LQT1), *HERG* (LQT2) et *SCN5A* (LQT3). B. Potentiels d'action ventriculaires canins caractéristiques des 3 types de syndromes du QT long. La perfusion artérielle de la paroi ventriculaire gauche d'un cœur de chien avec des inhibiteurs spécifiques des canaux ioniques impliqués dans les syndromes du QT long permet de reproduire l'allongement du potentiel d'action observé. La perfusion de 100 nM d'isoprotérenol (agoniste adrénergique) et de 30 µM de chromanol 293B (inhibiteur du courant I_{Ks}) produit un allongement de la durée du potentiel d'action au niveau des cellules M ce qui a pour effet d'augmenter l'hétérogénéité de repolarisation transmurale comme observé dans les cas de syndrome du QT long de type 1. La perfusion de 100 µM de d-sotalol (antagoniste β -adrénergique) et d'une concentration basse de potassium (2 mM) ralentit nettement la repolarisation ce qui a pour conséquence de produire une onde T aplatie caractéristique du syndrome du QT long de type 2. La perfusion de 20 nM d'ATX-II (activateur du courant sodique persistant) produit un allongement des potentiels d'action endocardiques et épicaudiques à l'origine de l'onde T tardive observée chez les patients atteints de syndrome du QT long de type 3. D'après Antzelevitch and Shimizu, 2002.

Au cours de la conférence de l'*Heart Rhythm Society* de 2013, de nouvelles recommandations ont été posées quant à la prise en charge de ces patients (Priori et al., 2013c). Un patient avec un intervalle QTc>500 ms est considéré à haut risque et devient à très haut risque au delà de 600 ms. Une alternance des ondes T est le signe d'une instabilité électrique et nécessite la mise en place de mesures préventives. Un sujet qui présente des épisodes de syncopes ou d'arrêt cardiaque avant l'âge de 7 ans est considéré comme ayant un fort risque arythmique en dépit du traitement bêta-bloquant et les patients qui ont fait une syncope ou un arrêt cardiaque dans leur première année de vie sont à très haut risque pour la mort subite et répondent très peu aux thérapies utilisées. Sur le plan thérapeutique, les défibrillateurs

implantables ne sont recommandés que pour les patients présentant un historique de fibrillation ventriculaire récupérée ou pour les patients à très haut risque d'arythmies. Le traitement par les β -bloquants reste le traitement premier du syndrome du QT long. La dénervation sympathique est aussi recommandée pour les patients à haut risque pour qui le traitement par les β -bloquants n'est pas efficace.

En raison de la forte augmentation de l'activité sympathique à l'origine des arythmies retrouvées chez les patients (Schwartz, 1985), les β -bloquants constituent la principale voie thérapeutique utilisée. Leur efficacité a été montrée dès les années 1985 dans une étude réalisée sur 233 patients symptomatiques. Dans le groupe traité avec des β -bloquants, la mortalité était de 9% à 15 ans contre 53% dans le contrôle (Schwartz and Locati, 1985). A l'heure actuelle, les principaux β -bloqueurs utilisés sont le propranolol (2-3 mg/kg/j) et le nadolol (1-1,5 mg/kg/j). Dans le cas du syndrome du QT long de type 3, associé au canal sodique Nav1.5, l'utilisation conjointe de β -bloquants tel que le propranolol et d'inhibiteur sodique tel que la Ranolazine ont montré une efficacité (van den Berg et al., 2014). La seule contre-indication est pour les patients asthmatiques ou diabétiques. Pour les patients ne répondant pas ou intolérants aux β -bloquants, une bi-thérapie associant la dénervation sympathique ou la pose d'un défibrillateur implantable est recommandée. La dénervation sympathique consiste à enlever les quatre ou cinq premiers ganglions thoraciques. Cette intervention peu lourde, assez rapide donne d'excellents résultats pour les patients souffrants de nombreux épisodes arythmiques. La diminution de l'intervalle QTc est d'environ 30% (Schwartz, 2014). L'utilisation de défibrillateurs implantables est de plus en plus fréquente chez les patients atteints de SQTl alors que cela devrait être réservé aux patients à très haut risque arythmique (QTc > 550 ms) et en combinaison avec une autre thérapie. Cette option doit rester la dernière à mettre en place.

3 GENETIQUE DU SYNDROME DU QT LONG DE TYPE 3

Les premières études génétiques mettant en évidence des gènes causaux pour ce syndrome ont été faites 30 ans après la découverte de ce syndrome (Curran et al., 1995; Wang et al., 1995). Les études génétiques de liaison ont montré que le syndrome du QT long se transmettait de manière autosomique dominante dans la majorité des cas. On parle alors de syndrome de Romano-Ward. La forme autosomique récessive ou syndrome de Jervell et Lange-Nielsen est caractérisée par la présence d'une surdité en plus de l'atteinte cardiaque (Yanmei et al., 2008). Aujourd'hui, plus de 100 mutations sur 14 gènes de susceptibilité ont été mises en évidence. Ces 14 gènes correspondent à autant de types de syndromes du QT long différents (Amin et al., 2013).

Dans cette partie, je me focaliserai uniquement sur le syndrome du QT long de type 3 (LQT3) lié aux mutations sur le gène *SCN5A* codant le canal Nav1.5. Néanmoins, les syndromes du QT long les plus fréquents sont le syndrome du QT long de type 1 (LQT1) qui regroupe l'ensemble des mutations sur le

gène *KCNQ1* (canal KvLQT1) et le syndrome du QT long de type 2 (LQT2) qui regroupe l'ensemble des mutations sur le gène *KCNH2* (canal hERG). L'ensemble de ces 3 types de syndromes de QT long correspond à 90% des cas de mutations associées à ce phénotype. Pour revue sur l'ensemble des types de syndrome du QT long (Amin et al., 2013; Priori et al., 2001).

Les trois premières mutations sur le gène *SCN5A* associées à un syndrome du QT long ont été retrouvées dans trois familles distinctes. Il s'agit des mutations Δ KPQ1505-1507 (Wang et al., 1995), R1644H et N1325S (Dumaine et al., 1996). De par leur localisation dans la boucle reliant les domaines DIII et DIV du canal sodique et l'implication de cette boucle dans les processus d'inactivation, ces mutations ont été suspectées comme altérant les paramètres d'inactivation des canaux sodiques. Parmi les mutations associées uniquement au syndrome du QT long, on retrouve les mutations suivantes : D1840G (Benhorin et al., 1998), D1790G (An et al., 1998), A1330P (Wedekind et al., 2001), E1295K (Abriel et al., 2001), I1768V (Rivolta et al., 2002), R1623Q (Miller, 2004), delF1617 (Chen et al., 2005), A1330T (SMITS et al., 2005), G1631D (Wang et al., 2008), A1180V (Zhang et al., 2014a). Parmi ces mutations, les mutations A1330P et A1330T sont atypiques puisqu'elles ne présentent pas de courant sodique persistant.

Au cours de cette thèse je me suis intéressé à la mutation deltaKQP1507-1509 qui a été associée par deux équipes différentes dans deux familles distinctes à un syndrome du QT long de type 3 chez de jeunes enfants (Keller et al., 2003; Shi et al., 2008). En plus de l'allongement du QTc, la mutation a été associée à des arythmies ventriculaires et à une cardiomyopathie dilatée.

D'autres mutations sur le gène *SCN5A* ont été associées au syndrome du QT long de type 3 mais aussi au syndrome de Brugada. La première mutation à combiner les deux phénotypes est la mutation 1795insD. Elle a été associée au LQT3 dans une grande famille néerlandaise présentant une forte proportion de mort subite et un ECG typique d'un syndrome du QT long de type 3 mais pour certains des membres de la famille, l'ECG est caractéristique d'un syndrome de Brugada (Bezzina et al., 1999). Ce lien entre syndrome du QT long de type 3 et syndrome de Brugada a aussi été renforcé par de nombreuses autres mutations. Parmi celles-ci, la mutation delK1500 a été mise en évidence dans une famille présentant un allongement de l'intervalle QTc mais aussi une élévation spontanée du segment ST et trois cas de mort subite (Grant et al., 2002). Par la suite, la mutation E1784K a été associée à un syndrome du QT long de type 3 mais aussi à un syndrome de Brugada et une dysfonction nodale (Makita et al., 2008). Très récemment, la mutation L1786Q a été associée avec ce double phénotype dans une famille danoise présentant un syndrome du QT long et un aspect de syndrome de Brugada après injection de Flécaïnide (Kanters et al., 2014). Cette mixité de phénotype peut aussi provenir de la mutation d'un même acide aminé en deux acides aminés différents. Ainsi, la mutation de l'acide aminé Y1795 en cystéine (Y1795C) est liée à un LQT3 alors que la mutation en histidine (Y1795H) est reliée au syndrome de Brugada (Rivolta, 2001).

Parmi les patients diagnostiqués génétiquement comme atteints d'un syndrome du QT long et porteurs de la même mutation, certains ne présentent pas d'allongement de l'intervalle QT, d'autres ne présentent pas de troubles du rythme et enfin d'autres présentent un allongement de l'intervalle QT et des troubles du rythme. D'autres facteurs aggravants ou de prédisposition modulent le phénotype des patients. On sait que l'âge, le sexe, l'activité sportive, la fièvre, la prise de médicaments peuvent moduler la pénétrance de ces mutations (Amin et al., 2013). Les études *in vitro* sur la mutation L1825P montrent qu'elle peut être associée au double phénotype QT long et syndrome de Brugada. Il ne s'agit pas à proprement parler d'une mutation causale mais d'une mutation qui prédispose au syndrome du QT long en cas de prise médicamenteuse (le cisapride dans ce cas) (Makita, 2002). L'induction du QT long par la prise médicamenteuse est parfaitement décrite, on parle de QT long induit. Pour revue, (Rao and Kowey, 2014). La Jackson Heart Study a récemment pu mettre en évidence que la mutation Y1103S potentialisait l'effet de l'hypokaliémie sur l'allongement de l'intervalle QTc (Akyzbekova et al., 2014).

4 L'INTERVALLE QT CHEZ LA SOURIS

Comme nous avons pu le voir précédemment, et bien que le modèle murin soit indispensable à la compréhension de la physiopathologie humaine, le cœur de souris a des propriétés électriques différentes de l'Homme. Ces différences rendent difficiles la comparaison entre l'ECG humain et murin, en particulier concernant l'étude de l'onde T de repolarisation ventriculaire.

La mesure de l'onde T sur l'ECG murin est très délicate et de nombreuses études tentent de la normaliser (Figure 41). Chez la souris, l'onde T a un décours biphasique avec une première phase rapide et positive en DI (Tr) et une seconde phase plus lente et négative en DI (Ts). De plus, l'onde T reflète l'hétérogénéité de repolarisation au travers du myocarde et chez la souris cette hétérogénéité est davantage marquée entre le ventricule droit et le ventricule gauche. L'onde T négative en DI est le reflet d'un vecteur de repolarisation allant de la gauche vers la droite du cœur (Boukens et al., 2012). L'amplitude de l'onde T est relativement petite chez une souris sauvage en raison de l'absence de phase de plateau sur le potentiel d'action ventriculaire. Une augmentation de l'amplitude de l'onde T est donc le résultat d'un allongement du potentiel d'action avec l'apparition d'une phase de maintien du potentiel aux environs de -30mV.

Il a récemment été montré que la durée du potentiel d'action à 90% de la repolarisation (APD90) coïncide avec la fin de l'onde J, c'est à dire la fin de la phase rapide de repolarisation (Zhang et al., 2014b). D'autres travaux basés sur des expériences de mapping optique ont montré que la fin de la repolarisation ventriculaire se fait au niveau de la fin de l'onde T sur l'ECG (Speerschnieder and Thomsen, 2013) (Figure 40).

Un ensemble de travaux ont considéré la fin de l'onde T au niveau de la fin de la première phase de

repolarisation alors que d'autres considèrent que la fin de la repolarisation correspond au retour de l'onde T à la ligne isoléctrique (Danik et al., 2002). Cette différence de normalisation dans la mesure de l'intervalle QT a conduit à l'obtention de valeurs allant de 27 ms à 109 ms (Danik et al., 2002). Selon la morphologie de l'onde T, la détection de la ligne isoélectrique n'est pas forcément aisée. Une grande majorité des enregistrements présentent une onde T très aplatie, d'autres ont au contraire une onde T très négative et il est alors aisé de déterminer le point de croisement de la ligne isoélectrique. En cas de tachycardie, l'onde T peut se finir dans le début de l'onde P suivante ce qui rend là aussi difficile la détection du point isoléctrique (Figure 40).

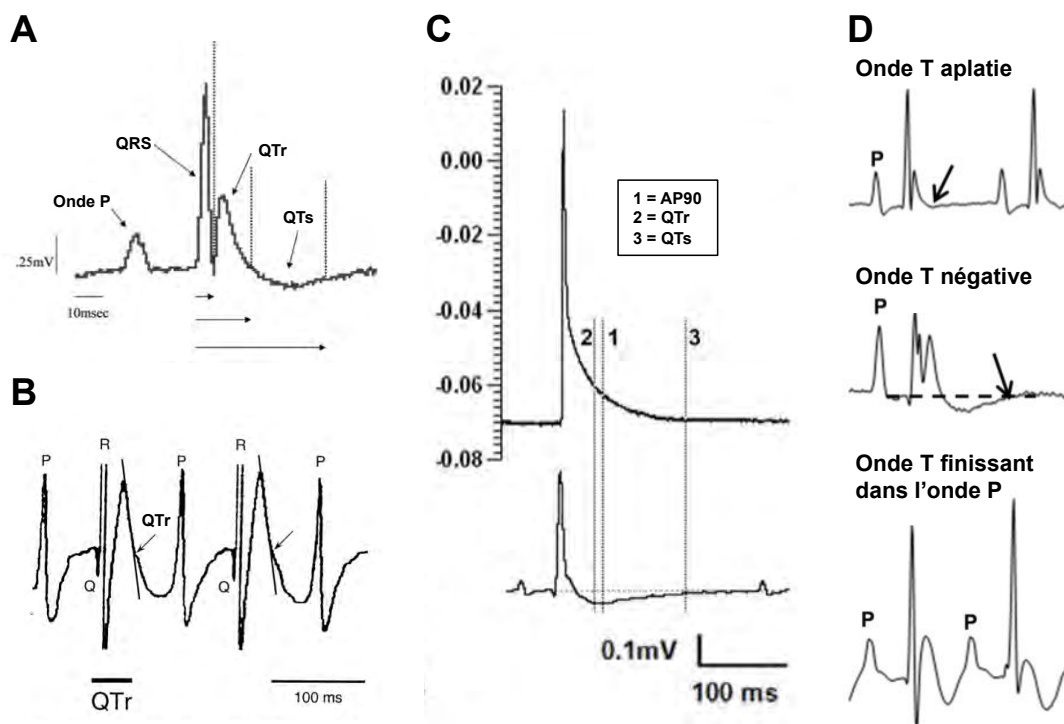


Figure 40 : Détermination de la fin de l'onde T sur l'ECG murin. A. Définition du QTr et QTs. La QTr correspond à l'intersection entre l'onde T descendante et la ligne isoléctrique. Le QTs correspond au retour à la ligne isoléctrique de l'onde T. C'est cette mesure qui est la plus couramment utilisée. D'après Speerschneider and Thomsen, 2013. B. Exemple de placement du QTr par la méthode de la tangente. D'après Lande et al., 2001. C. Correspondance entre la durée du potentiel d'action à 90% de la repolarisation ou APD90 (1), le QTr (2) et le QTs (3). On voit dans cet exemple que la mesure du QTs est celle qui est la plus en adéquation avec une repolarisation totale des cardiomyocytes. La mesure du QTr minimise la durée de la repolarisation. D'après Zhang et al., 2014b. D. Exemples de tracés typiques pouvant poser des soucis de placement de la fin de l'onde T. En cas d'onde T aplatie, la détermination du QTs nécessite de faire appel aux autres dérivations de l'ECG. Lorsque l'onde T se finit dans l'onde P suivante, le retour à la ligne isoléctrique n'est pas visible et peut induire une sous-estimation de la durée de l'onde T. Seule une onde T négative ne pose pas de soucis pour la détermination du QTr et QTs D'après Zhang et al., 2014b.

Que ce soit chez l'Homme ou la souris, la durée de l'intervalle QT est positivement corrélée avec la fréquence cardiaque (Mitchell et al., 1998). Afin de comparer des intervalles QT chez des animaux n'ayant pas la même fréquence, la formule de Bazett est utilisée, on parle alors de QT corrigé ou QTc. Pour la souris, la formule est ajustée à partir d'enregistrements de télémétrie sur des souris vigiles

(Mitchell et al., 1998). La formule devient :

$$QT_c = \frac{QT \text{ (ms)}}{\sqrt{\frac{RR \text{ (ms)}}{100}}}$$

En se basant sur la détection de la fin de l'onde T au niveau du retour à la ligne isoélectrique, Speerschneder et ses collaborateurs ont montré que l'utilisation de cette formule sous-estimait la mesure de l'intervalle QTc chez des souris anesthésiées. Sur des souris vigiles, le QTc est constant lorsque le RR varie alors que chez des souris anesthésiées, le QTc diminue lorsque le RR augmente (Figure 41) (Speerschneder and Thomsen, 2013). L'erreur ne vient pas forcément de la correction mais peut aussi venir des effets des anesthésiques sur la repolarisation (Appleton et al., 2004; Constantinides et al., 2011).

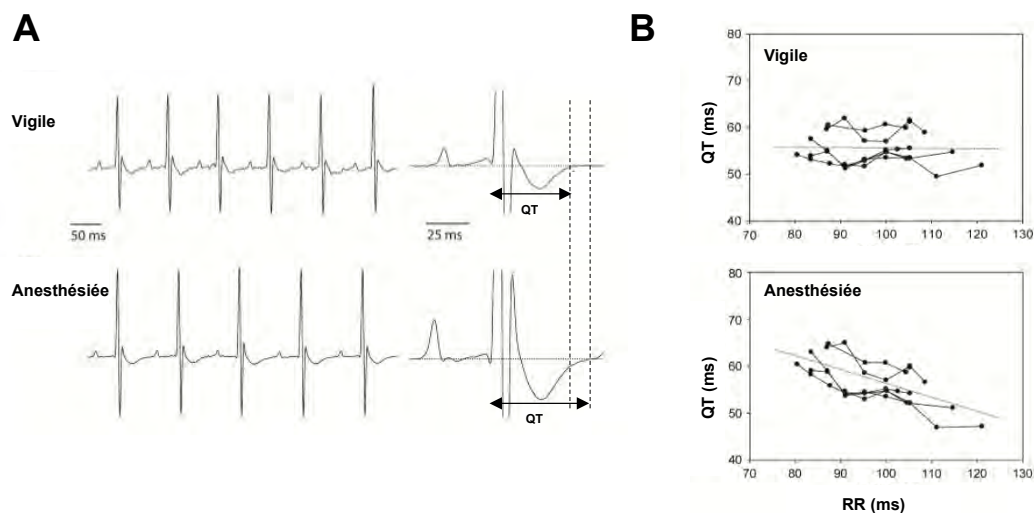


Figure 41 : Effets de l'anesthésie sur la relation QT/RR. A. Allongement du QT sous anesthésie. B. Variation du QT en fonction du RR chez la souris. L'anesthésie induit une variation du QT en fonction du RR alors que cela n'est pas observé chez des souris vigiles. D'après Speerschneder and Thomsen, 2013.

Selon moi, la mesure de l'intervalle QT reste difficile chez la souris et soumise à controverse. Il est important de vérifier la méthode utilisée avant de comparer des données de la littérature. Le calcul du QTc semble être sous-estimé dans la gamme de fréquence physiologique pour une souris. Chez des souris ayant une fréquence homogène, la correction n'est donc pas forcément obligatoire.

5 LES MODELES MURINS LQT3

Depuis de nombreuses années, des modèles murins sont développés pour comprendre la physiopathologie des différents syndromes du QT long en dépit de la complexité de l'onde T précédemment discutée. Les premiers modèles ont visé l'implication des canaux potassiques. Je ne les

aborderai pas ici. Pour revue sur ces modèles, Salama et al., 2009 et Salama and London, 2007. Dans cette partie je vais me concentrer sur les 3 modèles murins actuellement publiés sur le syndrome du QT long de type 3.

5.1 LA SOURIS *Scn5a*^{+/ Δ KPQ}

Le première modèle murin à avoir été mis au point est la souris *Scn5a*^{+/ Δ KPQ} en utilisant un système de recombinaison-excision dépendant de la Cre recombinase sur un fond génétique non précisé. La forme homozygote de cette souris est létale à E10.5 et la première étude montre un allongement de l'intervalle QT de plus de 50% chez les souris mutées comparées aux contrôles sans atteinte cardiaque structurale et sans mortalité accrue (6/275 souris *Scn5a*^{+/ Δ KPQ}). Les auteurs décrivent cependant une augmentation des événements de tachycardie ventriculaire polymorphe chez ces souris. Au niveau de l'étude des potentiels d'action ventriculaires, ils notent un allongement de ces derniers ainsi que la présence de post-dépolarisations précoces caractéristiques d'un défaut de repolarisation. Les études de patch-clamp montrent une augmentation du courant sodique au pic ainsi que du courant sodique persistant (Figure 42) (Nuyens et al., 2001). Par la suite d'autres études ont caractérisé ces souris. Par une approche de potentiel d'action monophasique sur cœur isolé, Fabritz et ses collaborateurs ont confirmé l'élargissement de la durée des potentiels d'action ventriculaires (droite et gauche) ainsi que la présence de post-dépolarisations précoces uniquement dans le ventricule droit. Ils ont aussi pu montrer que l'efficacité de la Mexiletine dans le traitement des arythmies chez ces souris était faible à un rythme normal comparé à la stimulation électrique (Fabritz et al., 2003). Sur des souris âgées d'une vingtaine de semaines, le groupe de Fabritz a montré que les souris *Scn5a*^{+/ Δ KPQ} faisaient des pauses sinusales et des blocs de conduction auriculo-ventriculaire. De plus, ils ont montré que seule la stimulation cholinergique provoquait des arythmies et que la stimulation sympathique supprimait les arythmies chez ces souris (Fabritz et al., 2010). Récemment, l'étude de la fonction atriale de ces souris, sur un fond génétique 129Sv, a montré une altération du nœud sinusal et de la conduction intra-atriale (Wu et al., 2012). Le courant sodique persistant est à l'origine de nombreux troubles parmi lesquels l'altération de l'homéostasie calcique. Ces souris présentent une augmentation de la charge calcique du réticulum sarcoplasmique très arythmogène pouvant être inhibée par la Ranolazine (Lindegger et al., 2009). Il est intéressant de voir que l'élargissement de l'intervalle QT chez les souris *Scn5a*^{+/ Δ KPQ} sur fond 129Sv disparaît lorsqu'elles sont plus âgées (12 mois) alors que les troubles atriaux persistent (Guzadhur et al., 2010). Les auteurs corrélaient cette perte de phénotype ventriculaire avec la perte de la sur-expression de Nav1.5 qu'ils observent chez de jeunes souris alors que dans la première étude Nuyens et ses collaborateurs n'avaient pas observé de variation d'ARNm chez de jeunes souris.

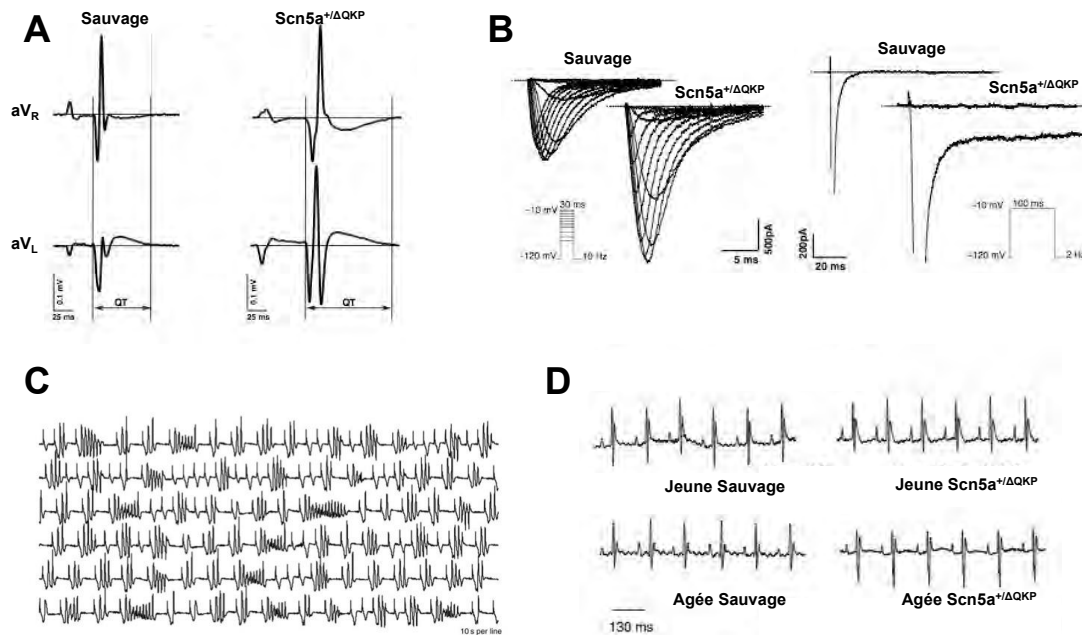


Figure 42 : Caractérisation de la souris $Scn5a^{+/ΔKPQ}$. Cette souris présente un allongement de l'intervalle QT (A), une réduction du courant sodique au pic et un courant sodique persistant (B). La stimulation cholinergique induit des torsades de pointes (C) et au cours du vieillissement, le QT se normalise chez les $Scn5a^{+/ΔKPQ}$ (D). D'après Nuyens et al., 2001 et Guzadhur et al., 2010.

5.2 LA SOURIS $SCN5A$ N₁₃₂₅S

Après avoir montré *in vitro* que cette mutation était responsable d'un courant sodique persistant bloqué par la Mexilétine, Tian et ses collaborateurs ont mis au point le modèle murin exprimant $SCN5A$ N₁₃₂₅S sous la dépendance du promoteur de l' α -MHC sur un fond génétique CBA/B6 (Tian et al., 2004). A l'âge adulte, cette souris est caractérisée par une bradycardie, un QT long et une accélération de la conduction atrio-ventriculaire en association avec le développement d'arythmies ventriculaires spontanées (Figure 43 A). L'étude du courant sodique issu des cardiomyocytes est en adéquation avec ce qui avait été rapporté précédemment, c'est à dire une augmentation du courant au pic et du courant persistant (Yong et al., 2007). Les enregistrements de potentiels d'action sur cardiomyocytes ventriculaires isolés confirment l'allongement de la repolarisation sans que cela n'ait de conséquences sur l'amplitude du potentiel d'action (Figure 43 B). Dans ce modèle, la Mexilétine réduit la durée du potentiel d'action mais aussi les épisodes arythmiques sur des souris vigiles. Par la suite une autre étude a voulu comprendre le lien entre cette mutation et la cardiomyopathie dilatée observée chez les patients. Chez des souris entre 6 et 10 mois, les auteurs ont pu montrer la présence de fibrose et une dilatation des cavités ventriculaires. Cette dilatation semble apparaître avec l'âge puisqu'elle n'est pas retrouvée à 2-3 mois. Ils ont pu caractériser l'insuffisance cardiaque développée chez ces souris par l'augmentation du poids des poumons malgré l'absence de variation de poids du cœur. Au niveau du remodelage protéique, ces souris présentent une augmentation de l'expression des protéines de la machinerie calcique (l'échangeur NCX, du RyR et les canaux Cav1.2) conduisant à l'apoptose des cardiomyocytes

(Zhang et al., 2011) (Figure 43 C). Par la suite, Yao et ses collaborateurs ont montré que l'augmentation du sodium intracellulaire induisait l'activation de la CaMKII dans ce modèle murin, laquelle était responsable de l'apoptose et était bloquée par la Ranolazine (Yao et al., 2011) (Figure 43 D).

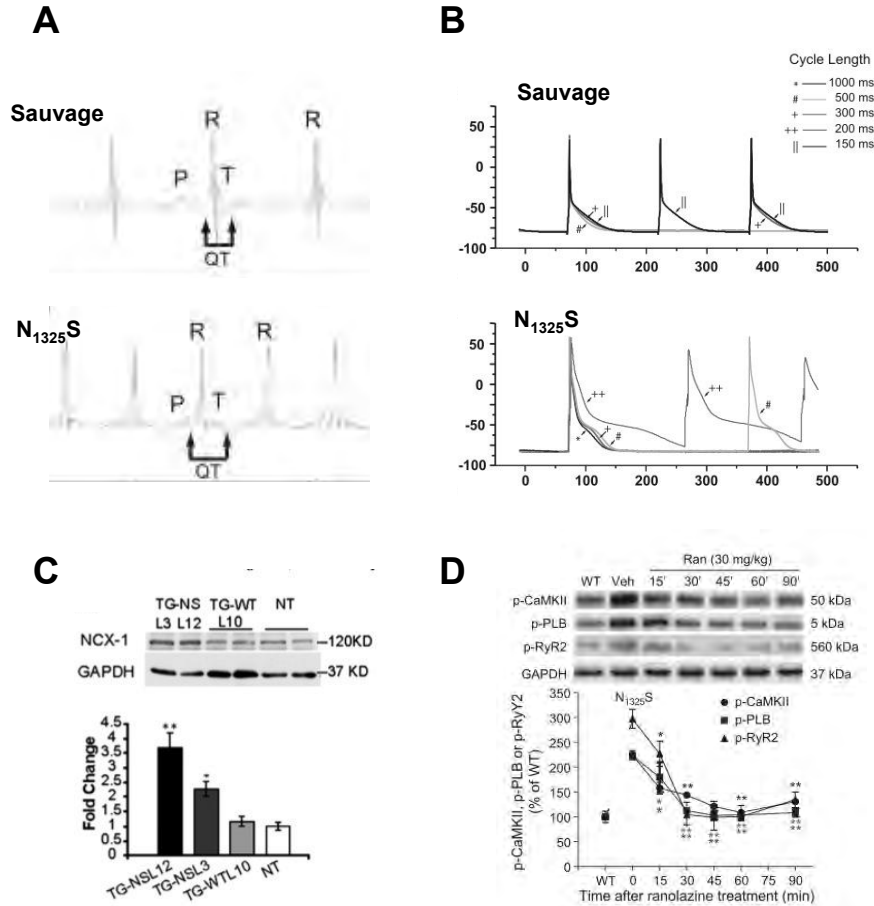


Figure 43: Caractérisation de la souris *SCN5A* $N_{1325}S$. A. La souris $N_{1325}S$ présente un allongement de l'intervalle QT. B. Allongement de la phase de repolarisation du potentiel d'action cardiaque. D'après Tian et al., 2004. C. Sur-expression de l'échangeur NCX chez la souris $N_{1325}S$ (TG-NS L3 et TG-NS L12) en comparaison avec les conditions contrôles (TG-WTL10 et NT). D'après Zhang et al., 2011. D. L'injection intrapéritonéale de Ranolazine (30 mg/kg) diminue l'activation de la CaMKII (p-CaMKII), du phospholamban (p-PLB) et du récepteur à la Ryanodine (p-RyR) observée dans ce modèle. D'après Yao et al., 2011.

5.3 LA SOURIS *SCN5A*^{+/-1798INS_D}

Après avoir caractérisé cliniquement le double phénotype associé à la mutation 1798insD sur le gène *SCN5A*, Remme et ses collaborateurs ont développé un modèle murin hétérozygote permettant d'étudier cette dualité en utilisant un système de recombinaison-excision dépendant de la Cre sur un fond génétique FVB/N (Remme et al., 2006). Chez des souris adultes entre 3 et 5 mois, l'expression de Nav1.5 n'est pas altérée par la mutation. Les souris sont bradycardes, présentent de nombreuses pauses sinusales ainsi qu'un allongement significatif mais modéré du PQ, QRS et du QTc. Ces données électrophysiologiques confirment les troubles de conduction et de la repolarisation observés chez les

patients. Les enregistrements de potentiels d'action sur cardiomyocytes ventriculaires isolés montrent une diminution de la vitesse de dépolarisation associée avec un allongement de la phase de repolarisation et la présence de post-dépolarisations précoces. Sur le plan du courant sodique, les auteurs montrent une diminution de l'amplitude du courant en accord avec le ralentissement de la dépolarisation, un ralentissement de la cinétique d'inactivation et la présence d'un courant sodique persistant (Figure 44). Ces caractéristiques sont en adéquation avec le phénotype de QT long (allongement de la repolarisation) et de syndrome de Brugada (réduction du courant sodique).

Par la suite, ces souris ont été dérivées sur le fond génétique 129Sv (Remme et al., 2009a). Une fois dérivées, ces souris présentent toujours un allongement de l'intervalle PQ, QRS et QTc. Hormis pour le QTc, il est intéressant de noter que la souche sauvage 129Sv présente un allongement des paramètres de conduction cardiaque par rapport à la souche FVB/N. L'expression de Nav1.5 semble diminuer uniquement dans le ventricule gauche de ces souris sur fond 129Sv. Cette différence de paramètres de conduction à l'état sauvage est corrélée avec une diminution de Nav1.5 (uniquement dans le ventricule gauche) et des sous-unités β régulatrices à l'exception de la sous-unité β_3 qui augmente dans le ventricule droit. Ces différences sont associées à un allongement de la durée du potentiel d'action ventriculaire. Cette étude a montré que suivant le fond génétique utilisé, la sévérité du phénotype observé était différente. Le phénotype associé à la mutation peut ainsi être modulé dans le sens d'un syndrome du QT long ou d'un syndrome de Brugada en fonction de l'hétérogénéité du fond génétique. Seule deux études de transcriptomique et de génétique ont été réalisées pour comprendre la différence entre les deux souches de souris (Remme et al., 2009a; Scicluna et al., 2011). Ces études ont montré que 76 gènes étaient différemment exprimés entre les souches FVB/N et 129Sv et quatre SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) ont été montrés comme impliqués dans la variation de rythme cardiaque, de conduction atrio-ventriculaire (intervalle PR), de conduction ventriculaire (complexe QRS) et dans la survenue de fibrillation ventriculaire.

6 MECANISMES DES TROUBLES DU RYTHME ET QT LONG

Les principales arythmies associées au syndrome du QT long sont les torsades de pointes (TdP). Il s'agit de tachycardies ventriculaires polymorphes associées aux post-dépolarisations précoces. Dans cette partie, je me focaliserai sur les mécanismes associés aux torsades de pointes dans le cadre du syndrome du QT long de type 3.

6.1 LES POST-DEPOLARISATIONS PRECOCES (EADs)

Les post-dépolarisations (EADs pour *early after-depolarisations*) sont des oscillations du potentiel de membrane non spontanées, induites par un potentiel d'action et favorisées par une bradycardie. Elles interviennent au cours de la phase 2 ou de la phase 3 du potentiel d'action cardiaque. Les post-

dépolarisations précoces de phase 2 sont majoritairement dues à l'entrée de calcium au travers des canaux calciques Cav1.2. Contrairement aux EADs de phase 2, les EADs qui se développent au cours de la phase 3 du potentiel d'action ne semblent pas être dépendantes du calcium intracellulaire. Elles peuvent être dues à la réactivation des canaux sodiques dans des zones de durée de potentiel d'action hétérogènes et/ou à une réduction du courant potassique I_{K1} (Maruyama et al., 2011).

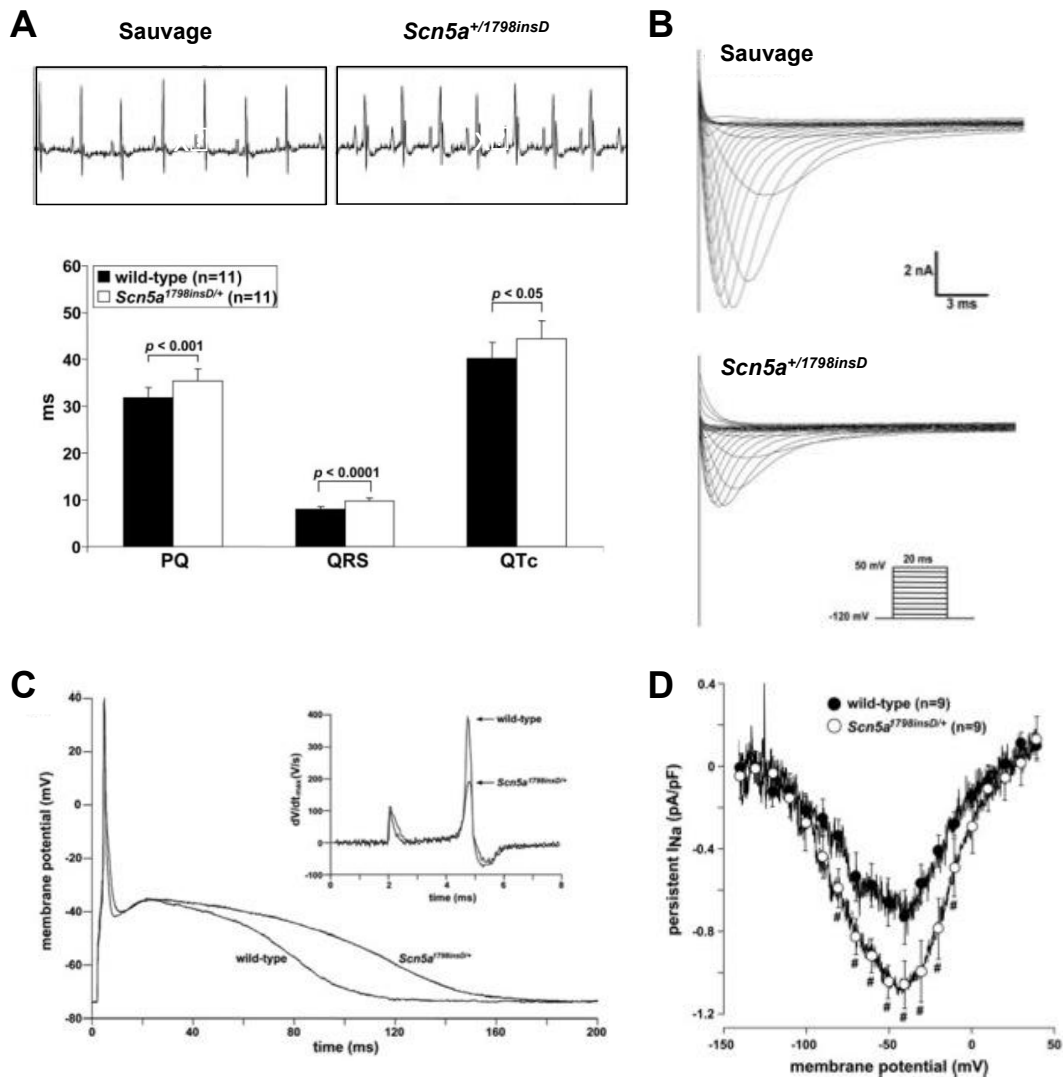


Figure 44: Caractérisation électrophysiologique de la souris *Scn5a*^{+/1798insD}. A. La souris *Scn5a*^{+/1798insD} présente un QT long et des troubles de la conduction marqués par un allongement de l'intervalle PQ et du complexe QRS. B. La souris *Scn5a*^{+/1798insD} présente une réduction de 50% de la densité du courant sodique. C. Allongement de la phase de repolarisation du potentiel d'action cardiaque sur des cardiomyocytes isolés à partir de souris *Scn5a*^{+/1798insD}. Insert : Diminution de la vitesse de dépolarisation (dV/dt_{max}) chez les souris *Scn5a*^{+/1798insD}. D. Dépendance au potentiel du courant sodique persistant. Le courant sodique persistant est augmenté dans les gammes de potentiel physiologiques chez la souris *Scn5a*^{+/1798insD}. D'après Remme et al., 2006.

Sur l'ECG, les EADs sont responsables de l'aspect croché des ondes T observé dans les cas de syndrome du QT long (Priori et al., 2001). Elles sont le déclencheur des torsades de pointes en induisant

le premier battement prématuré. Le maintien dans le temps de la tachycardie ventriculaire est elle dépendante de la présence d'un circuit de réentrée (El-Sherif et al., 1997). Les travaux de Yan et ses collaborateurs ont montré que les EADs pouvaient naître dans les 3 feuillets du myocarde et que leur propagation était sous la dépendance de l'hétérogénéité de repolarisation transmurale. Plus celle-ci est grande et plus les EADs se propagent pour induire des torsades de pointes (Yan et al., 2001) (Figure 45 A). La stimulation adrénergique favorise l'apparition d'EADs (Shimizu et al., 1991) mais dans le cas d'un syndrome du QT de type 3, les EADs se développent uniquement en l'absence d'isoproténolol (Antzelevitch and Shimizu, 2002). Cela constitue une différence majeure vis-à-vis des autres types de QT long. En fonction du type de QT long, les EADs sont différentes. Ainsi, Studenik et ses collaborateurs ont pu montrer que le syndrome du QT long de type 3 était caractérisé par des EADs plus longues et de plus petite amplitude que le syndrome du QT long de type 2 par exemple. De plus, la fréquence des EADs associées à un syndrome du QT long de type 3 est plus faible que celles associées à un QT long de type 2. Cette étude remet en cause l'importance de la surcharge calcique dans la genèse des EADs au profit des canaux sodiques. Le cocktail Thapsigargine / Ryanodine ne supprime pas les EADs induites par l'ATX-II alors que la TTX les abolit totalement (Studenik et al., 2001). Le rôle des canaux sodiques dans la genèse des EADs a été confirmé par l'utilisation de Ranolazine qui bloque le courant sodique persistant et empêche l'apparition de post-dépolarisations précoces (Song et al., 2008) (Figure 45 B). L'hypothèse selon laquelle le calcium joue un rôle central dans la formation d'EADs n'est pas pour autant fausse. L'activation du système Calcium/Calmoduline/CaMKII dans un modèle de syndrome du QT long a récemment été montré comme étant activateur des post-dépolarisations (Qi et al., 2009).

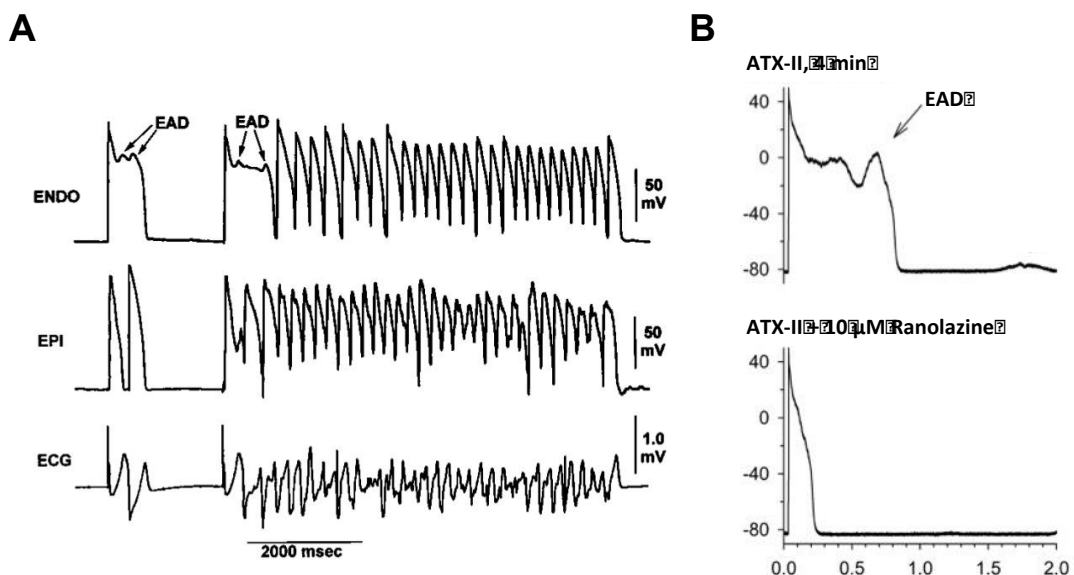


Figure 45: Post-dépolarisations précoces (EADs). A. Les EADs se propagent au travers du myocarde et induisent des torsades de pointe. L'EAD de phase 2 enregistrée sur l'endocarde (ENDO) se propage dans l'épicarde (EPI) ce qui induit une extrasystole à l'origine des torsades de pointes. D'après Yan et al., 2001 B. La Ranolazine (10 μM) supprime les EADs de phase 2 induites par l'ATX-II. D'après Song et al., 2008.

6.2 LE CYCLE DU CALCIUM AU CENTRE DES ARYTHMIES CARDIAQUES

L'entrée continue de sodium générée par le courant sodique persistant augmente localement la concentration sodique intracellulaire. Cette augmentation diminue le gradient sodique entre l'intérieur et l'extérieur des cardiomyocytes ce qui a pour conséquence de diminuer la force électromotrice nécessaire à l'échangeur NCX pour extraire les ions Ca^{2+} . La concentration calcique intracellulaire augmente donc dans les cardiomyocytes (Pourrier et al., 2014). D'un point de vue mécanique, cette augmentation de calcium favorise l'interaction actine-myosine qui a pour conséquence d'augmenter la tension myocardique en diastole et de créer une dysfonction diastolique. Ce mécanisme a été montré dans de très nombreux modèles animaux (Coppini et al., 2013; Makielski and Farley, 2006; Maltsev and Undrovinas, 2008). L'augmentation du calcium intracellulaire est connue pour activer de nombreuses cibles impliquées dans le bon fonctionnement de l'activité électrique mais aussi de la mécanique cardiaque.

Ainsi, dans cette partie je me focaliserai sur les cibles de la régulation du calcium intracellulaire mises en jeu dans les phénomènes arythmiques observés dans les cas de syndrome du QT long de type 3.

6.2.1 LA CALCIUM/CALMODULIN KINASE II

L'activation de la CaMKII passe par une augmentation du calcium intracellulaire qui se fixe à la Calmoduline. Le complexe Calcium/Calmoduline va alors activer la CaMKII qui s'autophosphoryle sur le Thr287 (Figure 46 A) (Braun and Schulman, 1995). Récemment, les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS pour *Reactive Oxygen Species*), connus pour être impliqués dans les phénomènes arythmogènes (Wagner et al., 2013), ont été montrés comme pouvant être régulés par l'activation de la CaMKII (Nishio et al., 2012). Inversement, de nombreux travaux montrent que la CaMKII peut aussi être activée par l'oxydation en l'absence même de la formation du complexe calcium/calmoduline. Les travaux de Wagner et ses collaborateurs ont pu montrer que le traitement de cardiomyocytes avec du H_2O_2 activait la CaMKII et induisait le développement d'arythmies (Wagner et al., 2011). Pour revue sur ce sujet, voir (Luczak and Anderson, 2014).

Parmi les cibles cytoplasmiques de la CaMKII, le récepteur à la Ryanodine (RyR) est le premier à avoir été identifié (Witcher et al., 1991) (Figure 46 B). Cependant, les effets de l'activation du RyR par la CaMKII sont controversés. La phosphorylation peut l'activer (Hain et al., 1995) ou bien réduire sa probabilité d'ouverture (Lokuta et al., 1997). Comme nous avons pu le voir précédemment, la CaMKII est un régulateur du canal sodique Nav1.5. Elle a aussi un rôle majeur dans le développement des arythmies. L'expression de la CaMKII est augmentée dans différents modèles d'insuffisance cardiaque dans lesquels on retrouve des épisodes arythmiques associés (Hoch et al., 1999; Kirchhefer et al., 1999).

La souris transgénique sur-exprimant la CaMKII développe des épisodes de fibrillation ventriculaire en association avec un élargissement du complexe QRS et une perturbation de la repolarisation. En plus de

ces aspects électriques, elles développent rapidement une dysfonction cardiaque (Zhang, 2003). La sur-expression de la CaMKII est associée à deux effets antagonistes que sont la diminution de la recapture du calcium dans le réticulum sarcoplasmique au travers de la pompe SERCA et la libération accrue du calcium au travers du RyR retrouvée dans les cas d'insuffisance cardiaque (Maier, 2003). L'augmentation du calcium intracellulaire qui en résulte, dans les deux cas, a été montrée comme étant très arythmogénique dans d'autres modèles mais aussi dans le modèle de sur-expression de la CaMKII (Wagner et al., 2006).

En plus de son rôle de modulateur du calcium intracellulaire et du canal sodique, la CaMKII a des effets nucléaires (Figure 46 C). La CaMKII a été montrée comme pouvant aussi être localisée au niveau nucléaire (Li et al., 2006; Mishra et al., 2011a). Parmi les cibles de la CaMKII, l'Histone Déacetylase 4 (HDAC4) est phosphorylable par la CaMKII conduit à l'activation du facteur de transcription MEF2. Les facteurs NFATs sont aussi connus pour être régulés par la CaMKII (Gray and Heller Brown, 2014). Pour revue sur les mécanismes de régulation épigénétique de la CaMKII, voir Kreusser and Backs, 2014.

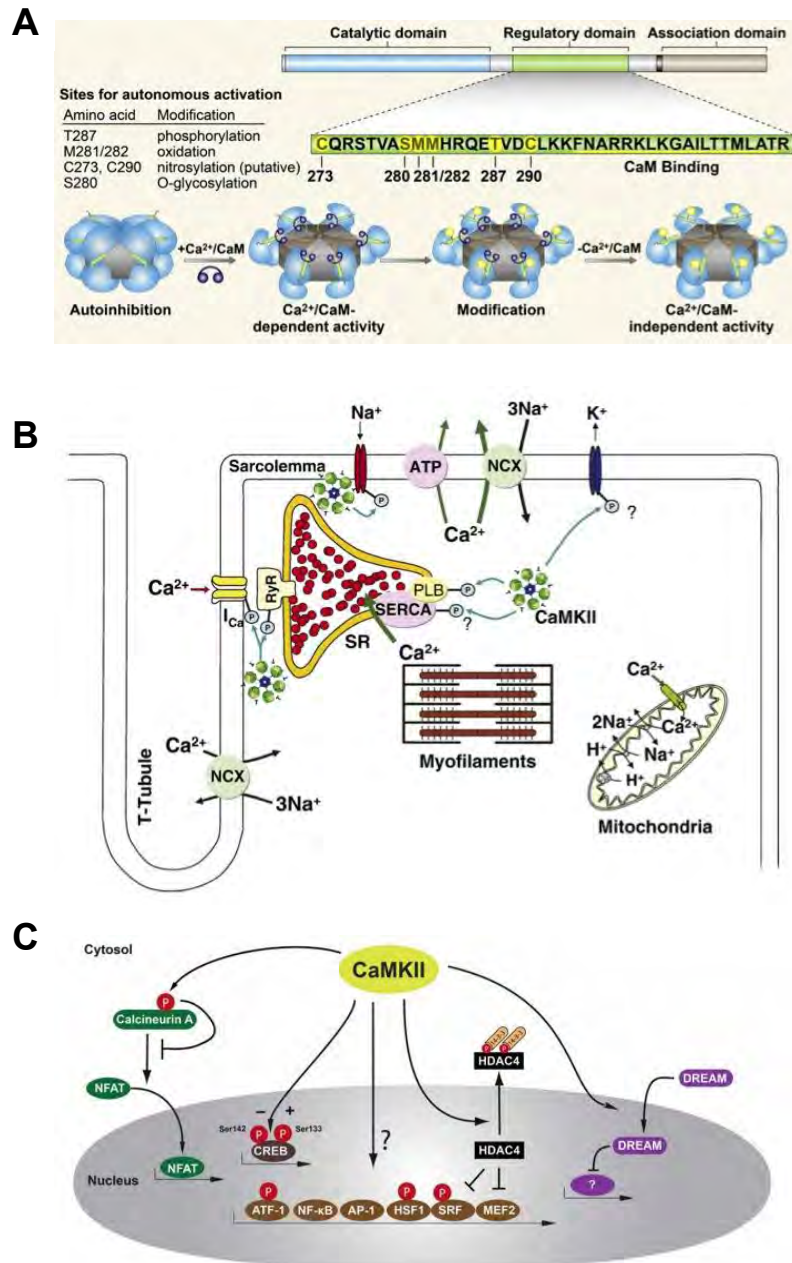


Figure 46 : La Calcium/Calmoduline Kinase II (CaMKII). A. Mécanisme d'activation de la CaMKII par le complexe calcium/calmoduline. B. Cibles cytoplasmiques de la CaMKII. La CaMKII est connue pour phosphoryler le récepteur à la Ryanodine (RyR), le phospholamban (PLB) et le canal sodique Nav1.5. C. Cibles nucléaires de la CaMKII. La CaMKII est connue pour phosphoryler la calcineurine A ce qui à pour conséquence d'inhiber la voie hypertrophique NFAT. Elle active aussi les voie CREB, HDAC et DREAM. D'après Kreusser and Backs, 2014.

6.2.2 L'ÉCHANGEUR NCX

L'échangeur NCX est un échangeur actif formé de 9 segments transmembranaires qui permet d'extruder 1 ion Ca^{2+} contre 3 ions Na^{+} grâce au gradient électrochimique de sodium. Cet échangeur est électrogénique et constitue la principale voie d'extrusion du calcium dans les cardiomyocytes avec chaque contraction (Ren and Philipson, 2013). Une large boucle intracellulaire entre les segments S5 et

S6 contient 2 domaines de régulation par le calcium (Figure 47). En plus de faciliter le passage du calcium, NCX est lui même régulé par le calcium intracellulaire (Ottolia et al., 2009). Une seule isoforme de NCX est exprimée au niveau cardiaque, il s'agit de NCX1. Il est localisé au niveau des membranes latérales, des disques intercalaires mais aussi des tubules transverses et longitudinaux des cardiomyocytes ventriculaires adultes où il est très proche du récepteur à la Ryanodine (Scriven and Moore, 2013). Il semble que l'échangeur NCX se dimérise mais aucune étude n'a permis de comprendre le rôle de cette dimérisation (Ottolia et al., 2013).

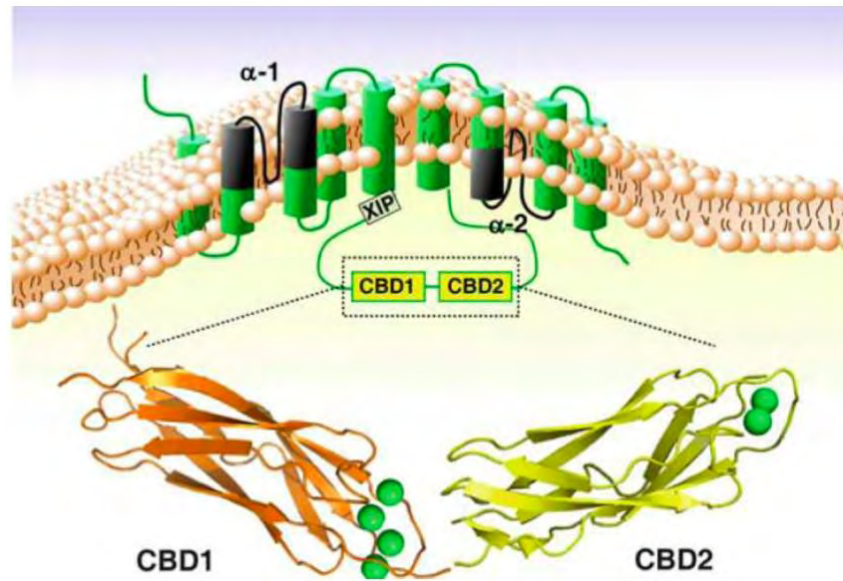


Figure 47 : Structure de l'échangeur NCX Sodium/Calcium. L'échangeur NCX-1 est composé de 9 segments transmembranaires et les régions répétées $\alpha 1$ et $\alpha 2$ (en noir) sont essentielles au passage des ions. Les domaines CBD1 et CBD2 fixent le calcium (ronds vert) et régulent l'activité de l'échangeur. CBD : *Calcium Binding Domain* ; XIP : domaine de fixation du PIP_2 . D'après Nicoll et al., 2013.

Dans les conditions de repos, l'échangeur NCX fonctionne en mode *forward* en permettant l'extrusion de calcium de la cellule contre l'entrée de sodium (Bridge et al., 1990). Cette voie d'extrusion du calcium est nettement majoritaire comparée au rôle de la Ca^{2+} -ATPase de la membrane plasmique (PMCA) ou des mitochondries. Le mode de fonctionnement de NCX dépend donc des gradients électrochimiques de sodium et de calcium et du potentiel de membrane. Ainsi le potentiel d'équilibre de NCX est déterminé à l'aide de l'équation :

$$E_{\text{Na/Ca}} = 3E_{\text{Na}^+} - 2E_{\text{Ca}^{2+}}$$

Lors d'un potentiel d'action le courant sodique entrant augmente rapidement la concentration sodique sous-membranaire ce qui inverse le mode de fonctionnement de l'échangeur NCX (mode *reverse*) (Leblanc and Hume, 1990). Ceci induit une augmentation locale du calcium intracellulaire qui va activer le récepteur à la Ryanodine et induire le couplage excitation-contraction (Ottolia et al., 2013). Cette

hypothèse a été confirmée dans un contexte pathologique par Weisser-Thomas et ses collaborateurs en 2003. Ils ont pu observer une entrée de calcium *via* l'échangeur NCX au cours d'un potentiel d'action cardiaque sur des cardiomyocytes ventriculaires humains issus de patients en insuffisance cardiaque (Weisser-Thomas, 2003). Cette hypothèse ne fait pas consensus puisque des travaux montrent que le rôle de cette entrée de calcium est très négligeable (Sipido et al., 1997) et que l'entrée de calcium au travers des canaux $Ca_v1.2$ prévenait le changement de mode de NCX (Weber et al., 2003). L'inactivation du courant sodique réduit l'amplitude du transitoire calcique chez des souris sauvages et n'a aucun effet sur le transitoire calcique chez des souris *knock-out* pour NCX. L'entrée de calcium via NCX n'est donc sûrement pas essentielle mais participe au couplage excitation contraction (Larbig et al., 2010).

Sur le plan physiopathologique, il est clairement établi que l'échangeur NCX joue un rôle clé dans les processus de post-dépolarisations précoces (Milberg et al., 2008). Il est intéressant de rappeler que l'une des hypothèses de déclenchement des EADs est la sortie de calcium depuis le réticulum sarcoplasmique ce qui active un courant entrant dépolarisant au travers de NCX et peut induire un potentiel d'action prématuré (Sipido et al., 2006). Suivant les espèces considérées, la capacité des cellules à charger/décharger le réticulum sarcoplasmique en calcium varie en fonction de l'activité de la pompe SERCA, du RyR et du phospholamban, mais aussi en fonction de la concentration intracellulaire en sodium. Ainsi, chez les espèces pour lesquelles la concentration sodique intracellulaire est élevée (c'est le cas des souris par exemple), le réticulum sarcoplasmique a tendance à se charger en calcium au repos. Au contraire, chez des espèces avec une concentration sodique intracellulaire plus faible, le réticulum sarcoplasmique a tendance à se décharger du calcium au repos. Cette régulation par le sodium a des conséquences pathologiques puisqu'une augmentation de la concentration sodique intracellulaire réduit l'efflux de calcium par l'échangeur NCX et favorise l'entrée de calcium dans le RS par la pompe SERCA au cours de la diastole cardiaque (Ottolia et al., 2013). Les inhibiteurs de NCX tels que le SEA0400 ont été montrés comme étant de possibles molécules anti-arythmiques (Tanaka et al., 2002).

6.2.3 LE COUPLE SERCA/PHOSPHOLAMBAN

La principale voie de recapture du calcium se fait dans le réticulum sarcoplasmique. Le couple SERCA/Phospholamban est responsable, avec l'échangeur NCX, du maintien d'un niveau de calcium diastolique bas. La pompe SERCA2 est une protéine composée de 10 segments transmembranaires (100 kDa) présente au niveau du réticulum endoplasmique et sarcoplasmique (Figure 48). Elle permet le passage du calcium contre son gradient électrochimique grâce à l'hydrolyse de l'ATP. Trois isoformes de la pompe SERCA2 existent, l'isoforme SERCA2a étant majoritairement exprimée au niveau cardiaque. Dans le couple SERCA/Phospholamban, la pompe ATPase SERCA est responsable du passage des ions au travers de la membrane du réticulum sarcoplasmique et le phospholamban (PLB) est son régulateur. Il a pour rôle d'inhiber la pompe lorsqu'il n'est pas phosphorylé. Plus que l'expression

de l'un ou de l'autre des partenaires, c'est le ratio PLB/SERCA qui est central dans la recapture du calcium (Kranias and Hajjar, 2012). L'activité intrinsèque de la pompe SERCA est contrôlée par le calcium intracellulaire mais aussi par des modifications post-traductionnelles telles que la glycosylation, l'oxydation et la phosphorylation. Elle a été montrée comme pouvant être phosphorylée par la CaMKII mais cela ne représenterait que moins de 20% des protéines totales. La pertinence physiologique de l'effet direct de la CaMKII sur SERCA est donc discutée (Brini and Carafoli, 2009).

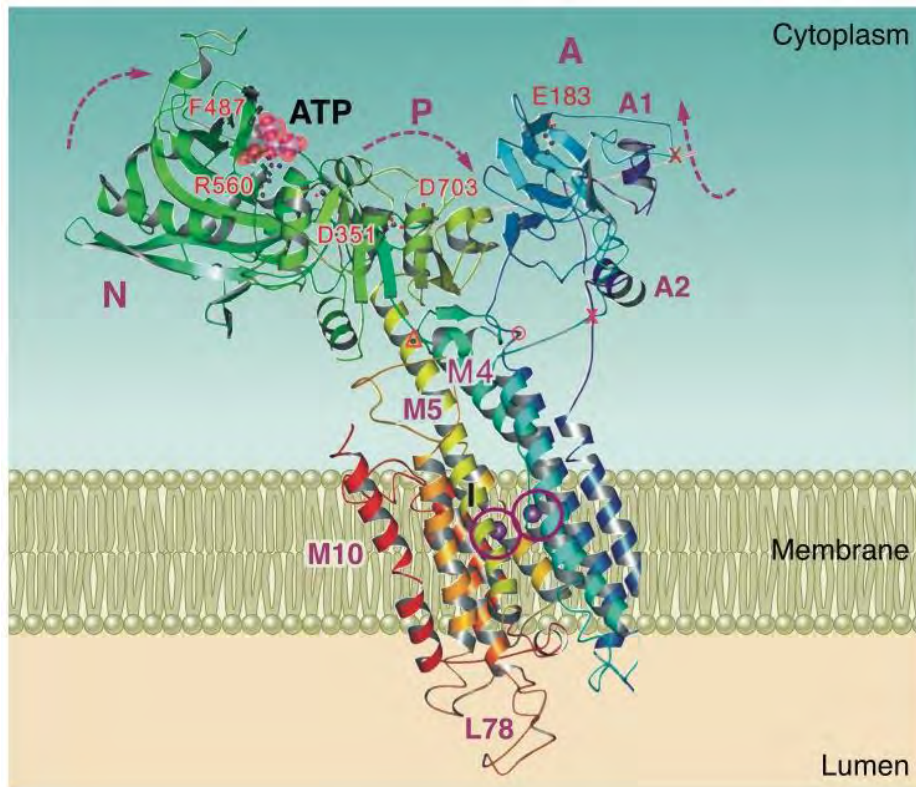


Figure 48 : Structure cristallographique de la pompe SERCA. La pompe SERCA fixe l'ATP en partie N-terminale. D'après Brini and Carafoli, 2009.

Les modèles murins sous-exprimant la pompe SERCA2 ont développé des pathologies cardiaques associant des défauts de contraction et de relaxation cardiaque en dépit de la mise en place de mécanismes compensateurs (Brini and Carafoli, 2009). Dans les cas d'insuffisance cardiaque, l'expression de SERCA est réduite (Park and Oh, 2013). Le ratio PLB/SERCA augmente alors, ce qui a pour conséquence de diminuer l'affinité de SERCA pour le calcium et favorise *in fine* l'augmentation du calcium intracellulaire (Gwathmey et al., 2011). Des études de transfert de gène visant à sur-exprimer SERCA dans des cœurs de patients souffrant d'insuffisance cardiaque ont montré des résultats positifs en améliorant leur fonction cardiaque (Zsebo et al., 2014).

Le phospholamban (PLB) est une protéine transmembranaire monomérique de 52 acides aminés qui interagit avec la pompe SERCA et provoque son inhibition. Le PLB possède 3 sites de phosphorylation par 3 kinases différentes. La Ser10 est phosphorylée par la PKC alors que la Ser16 est phosphorylée par les PKA et PKG. Enfin, la Thr17 est la cible de la CaMKII (Huggins et al., 1989; Wegener et al., 1989; Movsesian et al., 1984). Une fois phosphorylé, le PLB n'interagit plus avec la pompe SERCA ce qui favorise la recapture du calcium dans le RS.

La régulation des différentes phosphorylations du PLB est complexe. Certaines études montrent que la phosphorylation de la Thr17 par la CaMKII est dépendante de la phosphorylation préalable de la Ser16 par la PKA alors que d'autres affirment que ces phosphorylations sont indépendantes (Davis et al., 1990). En plus des kinases, le PLB est soumis à une régulation par des phosphatases bien décrites. Son état d'activation résulte d'une balance entre phosphorylation et déphosphorylation. Ainsi, en plus de la phosphorylation du PLB, l'activation de la PKA phosphoryle l'inhibiteur-1 (I-1) qui peut alors inhiber la phosphatase PP1. Une fois inhibée, la PP1 ne peut plus déphosphoryler le PLB, l'effet de la PKA est amplifié. La CaMKII est aussi capable d'activer en la phosphorylant la phosphatase PP2B ou Calcineurine. Une fois active, la PP2B inhibe l'inhibiteur-1 qui ne peut plus inhiber la PP1. La PP1 peut alors déphosphoryler le PLB et permettre à nouveau son interaction avec SERCA (Figure 49).

Dans un modèle d'insuffisance cardiaque, de manière a priori surprenante, Munch et ses collaborateurs ont observé que la phosphorylation de la Thr17 était diminuée malgré une augmentation de l'activité de la CaMKII. Cette étude a permis de montrer le rôle clé de la Calcineurine (PP2B) dans la déphosphorylation du PLB (Münch et al., 2002). Une augmentation du ratio PLB/SERCA ainsi qu'une diminution de la phosphorylation du PLB sont caractéristiques d'une augmentation du calcium intracellulaire aboutissant à une insuffisance cardiaque (Mattiuzzi and Kranias, 2014). La délétion du gène codant le PLB dans un modèle de cardiomyopathie dilatée a permis de réduire l'insuffisance cardiaque associée (Minamisawa et al., 1999). En revanche dans une autre forme de CMD liée à une surexpression de la CaMKII, une autre étude a montré que la délétion du PLB augmentait la charge calcique du RS et des mitochondries pour conduire à une mort prématurée des souris (Zhang et al., 2010).

En plus de son activité inhibitrice de la pompe SERCA sous forme monomérique, une forme pentamérique du PLB a été identifiée. Sous forme pentamérique le PLB s'organise pour former une structure de type canalaire (Maffeo and Aksimentiev, 2009; Oxenoid and Chou, 2005). Sur le plan de la contraction cardiaque, l'association du PLB sous forme pentamérique semble être nécessaire à la régulation de l'activité contractile cardiaque (Chu, 1998). Cependant, une étude récente semble montrer que le pore du canal ainsi formé n'est pas compatible avec le passage d'ions et en particulier du calcium. Cette organisation pentamérique servirait de réserve pour les monomères actifs de PLB (Vostrikov et al., 2013).

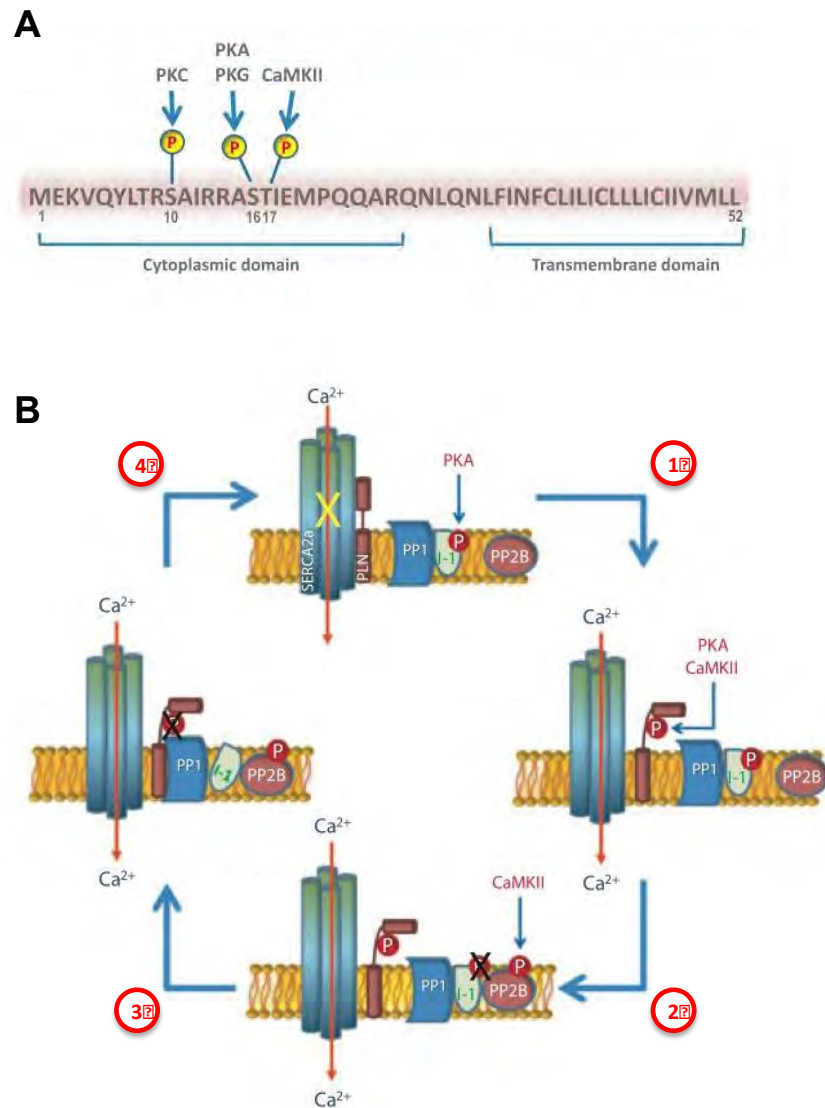


Figure 49 : Régulation du Phospholamban (PLB) par phosphorylation. A. Sites de phosphorylation du PLB dépendants de la PKC, PKA, PKG et CaMKII. B. Mécanisme d'inhibition de SERCA par la balance phosphorylation/déphosphorylation du PLB. (1) La phosphorylation de I-1 par la PKA permet au phospholamban d'interagir avec SERCA et de l'inhiber. (2) Lors de la phosphorylation du phospholamban par la PKA et/ou la CaMKII, le phospholamban n'interagit plus avec SERCA qui assure la recapture du calcium. (3) La phosphorylation de PP2B par la CaMKII active la PP2B qui déphosphoryle I-1 ce qui (4) active PP1 et déphosphoryle le phospholamban empêchant la recapture du calcium par SERCA. D'après Cerra and Imbrogno, 2012.

6.2.4 LE RECEPTEUR A LA RYANODINE

Le récepteur à la Ryanodine est un des canaux ioniques les plus imposants et joue un rôle central dans le couplage-excitation contraction en permettant la libération de calcium du réticulum sarcoplasmique vers le cytoplasme. Comme la majorité des canaux ioniques, il ne fonctionne pas de manière isolée mais fait partie d'un complexe protéique dans lequel on retrouve entre autres la protéine FKBP12.6, la Calsequestrine et la Calmoduline (Lanner et al., 2010). Une étude récente montre que le récepteur à la Ryanodine lui même, est un senseur de la concentration calcique à l'intérieur du réticulum

sarcoplasmique (Chen et al., 2014). De nombreuses mutations sur RyR2 ont été associées à des tachycardies ventriculaires catécholaminergique (CPVT) léthales qui se développent en cas de stress ou de forte émotion mais aussi à des cas de dysplasie arythmogène du ventricule droit (Lanner et al., 2010).

Parmi les régulations intrinsèques du RyR2, la phosphorylation est la plus importante. De nombreux travaux ont montré que la RyR2 était la cible des PKA et CaMKII au travers de la stimulation β -adrénergique (Camors and Valdivia, 2014) (Figure 50). Parmi les sites de phosphorylation, la Ser2808 a été identifiée comme étant dans un premier temps spécifique de la CaMKII puis uniquement spécifique de la PKA (Wehrens et al., 2006). Une étude de Marx et ses collaborateurs a pu montrer que des patients souffrant d'insuffisance cardiaque voyaient leur RyR2 hyperphosphorylé sur la Ser2808 (Marx et al., 2000). Une étude récente démontre que la phosphorylation de la Ser2808 par la PKA n'est pas ou peu impliquée dans la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque (Houser, 2014). La Ser2814 a aussi été montrée comme étant spécifique de la CaMKII (Wehrens et al., 2004). Bien que les rôles précis des kinases dans la régulation physiopathologique du RyR ne soient pas encore clairement établis, une hyperphosphorylation de celui-ci active la libération de calcium et entraîne le développement de phénomènes arythmiques. L'inhibition de cette hyperphosphorylation peut constituer une voie thérapeutique majeure dans la prévention des fuites calciques et des vagues calciques observées dans les cardiomyopathies dilatées associées à des arythmies (Camors and Valdivia, 2014).

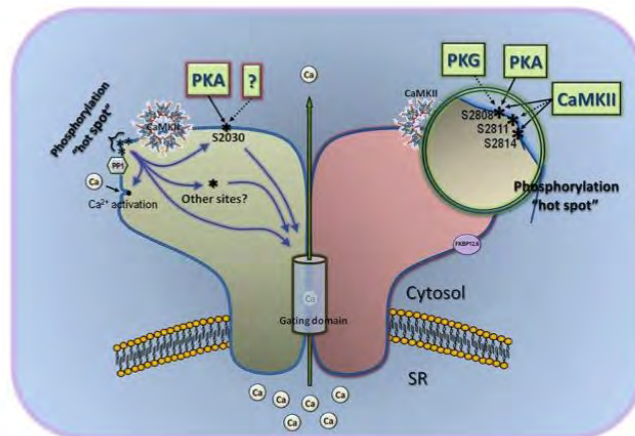


Figure 50 : Régulation du RyR par les phosphorylations. Le RyR est régulé par des phosphorylation dépendantes de la PKA, PKG et CaMKII. Ces phosphorylations facilitent la sortie du calcium du réticulum sarcoplasmique. D'après Camors and Valdivia, 2014.

Au cours de la seconde partie de ma thèse, je me suis intéressé à la caractérisation complète de la souris $Scn5a^{+/ΔQKP}$ comme nouveau modèle de syndrome du QT long de type 3. J'ai aussi voulu mettre en évidence les mécanismes à l'origine des troubles du rythme associés au syndrome du QT long. Enfin, j'ai voulu traiter les épisodes arythmiques dans le but de comprendre la relation entre arythmie et cardiomyopathie.

Objectifs de la thèse

Dans le cadre de ma thèse, je me suis intéressé aux mécanismes physiopathologiques qui relient le canal sodique cardiaque Nav1.5 aux troubles du rythme cardiaque en lien avec des modifications de la structure cardiaque. Le canal sodique cardiaque n'est plus considéré comme un canal isolé dans la membrane plasmique impliqué uniquement dans des pathologies électriques. L'interaction avec de nombreuses protéines partenaires a ouvert la voie à la définition d'un complexe macromoléculaire. L'atteinte du canal Nav1.5 a ainsi des répercussions bien plus grandes. Au travers de deux pathologies que sont la maladie de Lenègre et syndrome du QT long, j'ai pu montrer un lien entre une perte ou un gain de fonction sur le canal et un remodelage myocardique conduisant soit à de la fibrose soit à une cardiomyopathie dilatée.

Dans un premier temps, je me suis focalisé sur l'étude du remodelage myocardique dans un modèle murin invalidé à l'état hétérozygote pour *Scn5a*, la souris *Scn5a*^{+/-}. Dans ce travail, nous avons pu caractériser les mécanismes de développement de la fibrose ventriculaire au cours du vieillissement des souris. Nous avons aussi pu montrer que seule la diminution d'expression du canal à la membrane impactait sur la pathologie et que la simple réduction du courant n'avait pas de conséquences fibrotiques. Nous avons aussi pu confirmer une régulation conjointe de Nav1.5 et de la Cx43 dans ce modèle. Cette étude, bien qu'incomplète dans la compréhension exacte de cette relation, ouvre la voie à une meilleure compréhension de ce couple.

Dans un second temps, j'ai pu développer et caractériser un nouveau modèle murin du syndrome du QT long de type 3, la souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP}. Nous avons pu montrer que ce modèle murin regroupait l'ensemble des caractéristiques cliniques retrouvées chez les patients porteurs de la mutation que ce soit l'allongement de l'intervalle QT, les arythmies ventriculaires ou la dilatation cardiaque. Nous avons pu confirmer que cette mutation induisait un courant sodique persistant et que le remodelage des protéines associées au cycle du calcium était différent entre le ventricule droit et le ventricule gauche. Ces résultats sont à mettre en corrélation avec l'insuffisance cardiaque droite que nous avons mise en évidence dans ce modèle. A la vue de la littérature, le ventricule droit semble être une zone de sensibilité pour toutes les mutations affectant le canal sodique. Enfin, nous avons pu montrer que le traitement en aigu des souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP} avec la Ranolazine supprimait les arythmies ventriculaires. Ceci ouvre la voie à l'utilisation de la Ranolazine en chronique chez ces souris et offre un nouveau modèle pour la compréhension des cardiomyopathies associées au canal sodique.

- Matériel et méthodes -

Matériel et méthodes

1 L'ELECTROCARDIOGRAMME

Pour le projet n°1 traitant des souris *Scn5a*^{+/-} sur fond génétique 129Sv âgées de 10 à 60 semaines, nous avons réalisé un suivi ECG tout au long de la durée de l'étude. L'ECG de 10 semaines nous permet de déterminer le phénotype des souris en fonction de la durée du complexe QRS. Pour cela, les souris sont anesthésiées avec une injection intrapéritonéale d'éthomidate (25 mg/kg). Pour le projet n°2 traitant des souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP}, la caractérisation phénotypique est faite à 3 semaines au moment du sevrage. En raison de leur jeune âge, les souris sont anesthésiées par inhalation d'isoflurane dans une boîte d'induction (2-2,5%) pendant 2-3 minutes puis l'anesthésie est maintenue au masque (0,8-1%) tout au long de l'enregistrement. Une fois la souris anesthésiée, sa température est maintenue grâce à une sonde de température rectale et un tapis chauffant à 37°C (Harvard Apparatus ; USA). Quatre électrodes de 25-gauge sous-cutanées, placées à chacun des 4 membres, ont été utilisées pour enregistrer un électrocardiogramme 6 dérivation. Les enregistrements sont filtrés entre 0,5 et 250 Hz et enregistrés à l'aide d'un convertisseur analogique numérique IOX 1.585 (EMKA Technologies, Paris, France). Pour chacun des 2 projets, la caractérisation phénotypique se fait grâce à un enregistrement de 2 minutes.

La durée des ondes P, du complexe QRS et des intervalles PR et QT sont mesurées sur trois complexes PQRST successifs en dérivation périphérique DI et moyennés à l'aide du logiciel ECGAuto 2.7 (EMKA Technologies, Paris, France). Le complexe QRS est mesuré du début de l'onde Q jusqu'au point d'intersection entre la ligne isoélectrique et la pente ascendante allant du sommet de l'onde S, avant la partie positive de l'onde T. L'intervalle QT est mesuré du début du complexe QRS jusqu'à la fin de l'onde T, au moment où elle rejoint la ligne isoélectrique. Cette dernière mesure étant parfois difficile, les dérivationes DII et DIII sont parfois utilisées pour confirmer la fin de l'onde T. L'intervalle PR ou PQ est mesuré du début de l'onde P jusqu'au début de l'onde Q (Figure 51).

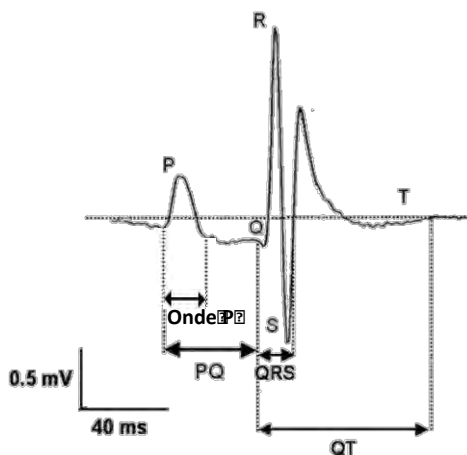


Figure 51: Electrocardiogramme murin en DI

2 ISOLEMENT DES CARDIOMYOCYTES VENTRICULAIRES

Les cardiomyocytes de souris âgés de 4 semaines sont isolés par digestion enzymatique pour être ensuite utilisés pour les analyses de patch-clamp.

Dix minutes avant le sacrifice, les souris sont héparinées par injection intrapéritonéale d'héparine sodique (600 IU/kg soit environ 100 μ l pour une souris de 15 g ; Dakota Pharm) afin qu'un caillot ne se forme pas ni dans le cœur ni dans les coronaires lors de l'anesthésie. Les souris sont ensuite euthanasiées par dislocation cervicale et les cœurs sont rapidement excisés et plongés dans une solution de Tyrode à 4°C contenant (en mM) NaCl, 135; KCl, 4; NaH₂PO₄, 1,2; CaCl₂, 1,8; MgCl₂, 1,2; glucose, 11; HEPES, 10 (pH 7,4 avec NaOH). Le cœur est ensuite rapidement canulé par l'aorte et les coronaires sont perfusées à l'aide cette même solution froide. Le cœur ainsi canulé est ensuite monté sur le système de perfusion à débit constant (3 ml/min). Il est alors perfusé pendant 2 minutes à l'aide de la même solution à 37°C. Cette étape a pour but de s'assurer de la bonne perfusion du cœur et de sa viabilité. Un temps de moins de 3 minutes entre l'incision du diaphragme et le montage du cœur sur le système de perfusion est considéré comme satisfaisant pour avoir un rendement de digestion suffisant pour le patch-clamp. Ensuite le cœur est perfusé pendant 2 minutes avec la même solution à 37°C sans calcium afin d'arrêter l'activité contractile et de débiter la fragilisation des interactions cellulaires dépendantes du calcium. Suite à cela, 0,15 mg/ml de collagénase de type II (350 U/mg ; Worthington) et 0,03 mg/ml de protéase de type XIV (4,7 U/mg ; Sigma) sont perfusées pendant 7 à 11 minutes dans une solution contenant (en mM) NaCl, 135; KCl, 4; NaH₂PO₄, 1,2; CaCl₂, 0,1; MgCl₂, 1,2; glucose, 11; HEPES, 10 (pH 7,4 avec NaOH). Au cours des premières minutes de digestion, le cœur prend une couleur rosée et le perfusât devient rapidement visqueux. Une fois que le cœur est digéré, une solution ayant pour rôle d'arrêter l'action des enzymes est perfusée à 37°C pendant 2 minutes. Cette solution contient (en mM) NaCl, 135; KCl, 4; NaH₂PO₄, 1,2; CaCl₂, 0,15; MgCl₂, 1,2; glucose, 11; HEPES, 10 (pH 7,4 avec NaOH). Le cœur est ensuite découpé en petits cubes dans une boîte de Pétri de 54 mm de diamètre (Nucleon Surface) contenant 10 ml de solution précédente. Les cardiomyocytes sont ensuite dissociés par agitation douce à l'aide d'une pipette. La préparation est ensuite filtrée au travers d'une membrane de Nylon (diamètre 200 μ m) puis est laissée à sédimenter pendant 10 minutes. La couleur rosée du culot est un signe de bonne qualité de l'isolement cellulaire. Le surnageant est ensuite éliminé et remplacé par 10 ml de la même solution. La remontée calcique se fait ensuite de manière progressive toutes les 10 minutes à 0,3 mM, 0,5 mM et enfin 1 mM de calcium. La présence d'un faible pourcentage de cellules contracturées est un bon indice traduisant la qualité de la digestion. Les cellules présentant une striation bien visible et une surface cellulaire lisse sont sélectionnées pour les mesures de patch-clamp.

3 LE PATCH-CLAMP

Le patch clamp est une technique d'électrophysiologie ayant pour but de mesurer les courants traversant la membrane ou un fragment de membrane d'une cellule et générés par le passage d'ions au travers de canaux ioniques spécifiques des ions présents de part et d'autre de la membrane (Hamill et al., 1981). Cette technique consiste donc à isoler électriquement une portion de la membrane plasmique en y apposant à sa surface une pipette de verre. L'application d'une pression négative au sein de cette pipette permet d'obtenir une zone contact électriquement étanche dont la résistance atteint plusieurs giga-ohms. On parle alors de *giga-seal*. Dans cette configuration dite de « cellule attachée » ou de « *cell attached* », le scellement permet d'enregistrer des conductances ioniques de l'ordre du picosiemens générés par les canaux ioniques présents au sein du fragment de membrane considéré.

En partant de cette configuration, il est possible d'enregistrer le courant traversant l'ensemble de la surface membranaire. Pour cela, la partie de membrane contenue sous la pipette est rompue en exerçant une aspiration supplémentaire qui permet à la pipette d'être en contact avec le milieu intracellulaire. On parle alors de configuration « cellule entière » ou « *whole-cell* ». Cette configuration est celle utilisée pour les enregistrements des courants sodiques au cours de cette thèse. Elle a l'avantage de permettre un bon accès au milieu intracellulaire et donc de parfaitement contrôler sa composition ionique. En revanche, cette configuration induit une dialyse du milieu intracellulaire par le milieu intrapipette.

Après isolement, les cardiomyocytes sont placés dans des boîtes de Pétri d'un diamètre de 25 mm sur la platine d'un microscope inversé qui repose lui même sur une table antivibratoire. Les cellules sont perfusées en continu avec une solution contenant (en mM) NaCl, 135; KCl, 4; NaH₂PO₄, 1,2; CaCl₂, 1,8; MgCl₂, 1,2; glucose, 11; HEPES, 10 (pH 7,4 avec NaOH). Un système de microperfusion multivoies constitué de tubes en TYGON accolés les uns aux autres (diamètre interne de 0,25 mm), rattaché à un micromanipulateur à commande hydraulique, permet d'irriguer localement la cellule avec un milieu extracellulaire précis et de changer rapidement ce milieu au cours de l'expérimentation. Les expériences de patch-clamp sont réalisées à température ambiante (20-22°C).

Les pipettes sont réalisées à partir de capillaires de verre en borosilicate (Sutter Instrument) de 1,5 mm de diamètre externe et de 0,86 mm de diamètre interne. Le capillaire est chauffé à l'aide d'une étireuse horizontale (P-97 ; Sutter Instrument). Une série de 5 températures combinées à la traction du capillaire permettra sa scission, formant deux pipettes quasi identiques. L'extrémité des pipettes est ensuite cirée afin d'augmenter leur résistance et de diminuer le courant capacitif. Cette cire est ensuite légèrement fondue et remontée le long de la paroi des pipettes à l'aide d'une microforge (MF 830 Narishige, Japon). Les résistances finales de pipettes seront comprises entre 1,8 et 2,5 MΩ.

Chaque pipette est remplie d'une solution intrapipette contenant (en mM) CsCl, 50; CaCl₂, 1; Na₂-pyruvate, 5; MgCl₂, 3; Na₂ATP, 2,5; CoCl₂, 2,5; acide gluconique, 45; EGTA, 10; HEPES, 10; (pH 7,2

avec CsOH). La pipette est fixée sur un porte électrode relié à un micromanipulateur électrique tridimensionnel (MS314 ; MW) permettant de la placer précisément sur la cellule. Cette partie mobile est connectée à un amplificateur de patch-clamp (VE-2 ; Alembic) qui permettra d'imposer un potentiel à la cellule et d'enregistrer le courant généré par l'activation des canaux sodiques à ce potentiel (Figure 52). L'acquisition et l'analyse des données sont réalisées respectivement à l'aide des logiciels Clampex et Clampfit version 10.4 (pCLAMP ; Molecular Devices).

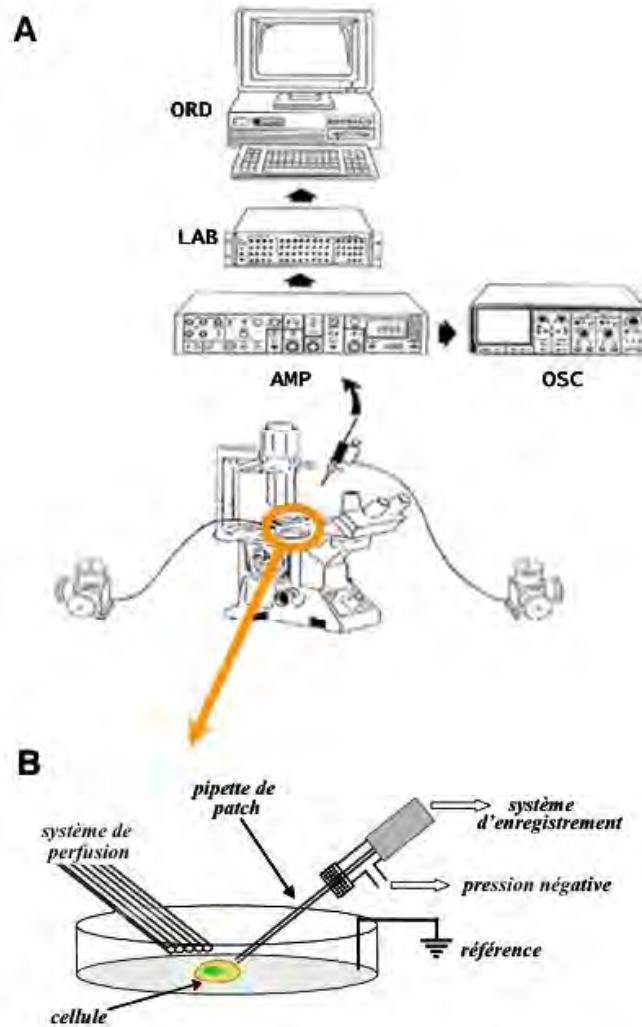


Figure 52 : Représentation schématique du dispositif expérimental utilisé pour la technique de patch-clamp. (A) Vue d'ensemble du dispositif expérimental. AMP: amplificateur, OSC: oscilloscope, LAB: interface d'acquisition et ORD: ordinateur. (B) Représentation du dispositif expérimental au voisinage de la cellule.

Les courants capacitifs, dus à la charge des capacités de la pipette et de la membrane plasmique, peuvent empêcher l'observation des signaux rapides comme c'est le cas pour l'activation du courant sodique. Ainsi les résistances séries sont compensées dans une gamme de 0 à 20 ms à l'aide de l'amplificateur. Les solutions intrapipette et extracellulaire étant différentes, le fait de mettre en contact

les deux solutions crée un potentiel de jonction pouvant atteindre plusieurs millivolts. Ceci peut induire des erreurs dans les mesures. En cas de potentiel de jonction supérieur à 2 mV, l'enregistrement n'est pas pris en compte pour l'analyse.

Le courant sodique persistant est mesuré comme étant le courant TTX- sensible (30 μ M TTX Tocris) au cours d'une rampe de potentiel décroissante formée par une première phase de maintien à +40 mV pendant 200 ms puis par une rampe descendante de 1000 ms jusqu'à -120 mV

Les propriétés biophysiques ont été caractérisées à l'aide d'un protocole de stimulation comprenant une série de sauts de potentiels de 500 ms variant de -120 mV à +40 mV par incréments de 5 mV, permettant d'analyser les paramètres d'activation, chaque saut de potentiel étant suivi d'un second de 20 ms à une valeur fixe de -20 mV, afin de mesurer les paramètres d'inactivation du canal sodique. Le potentiel de maintien de la cellule au repos était de -120 mV. La densité de courant a été calculée en divisant le courant enregistré par la capacitance membranaire de la cellule (C_m). Les courbes d'activation et d'inactivation ont été ajustées et analysées avec une équation de Boltzmann :

$$y = \left(1 + \exp \frac{(V - V_{1/2})}{k} \right)^{-1}$$

où $V_{1/2}$ est le potentiel de demi-activation (ou de demi-inactivation) et k le facteur de pente. Les cinétiques d'inactivation ont été analysées suivant une équation bi-exponentielle :

$$y = y_0 + A_1(1 - \exp(-t/\tau_1)) + A_2(1 - \exp(-t/\tau_2))$$

où A_1 et A_2 sont les fractions rapide et lente de la cinétique d'inactivation et τ_1 et τ_2 les constantes de temps des cinétiques rapide et lente d'inactivation.

4 POTENTIEL D'ACTION CARDIAQUE

L'enregistrement du potentiel d'action sur des préparations tissulaires permet d'observer au niveau tissulaire les manifestations des mutations sur un canal ionique. Ainsi, dans le cadre du projet portant sur les souris *Scn5a*^{+/-ΔQKP}, cela permet d'observer les changements de décours du potentiel d'action pouvant expliquer les phénomènes observés au niveau électrocardiographique.

Pour cela, les souris ont été euthanasiées à 4 semaines par dislocation cervicale et le cœur a été rapidement placé dans une solution de Tyrode froide contenant (en mM) NaCl, 108; NaH₂PO₄, 1,8; NaHCO₃ 25; KCl, 2,7; MgCl₂, 1; CaCl₂, 0,6; glucose, 5,5 (pH 7,4 avec 5% CO₂). Après avoir disséqué la paroi libre du ventricule droit ainsi que l'oreillette gauche avec précaution, les prélèvements sont placés dans une chambre de perfusion, la face endocardique étant accessible pour l'électrode de mesure. Les

préparations sont ensuite perfusées (12ml/min) avec une solution de Tyrode à 37°C oxygénée avec 95% O₂-5%CO₂ contenant (en mM) NaCl, 120; NaHCO₃, 27; NaH₂PO₄, 1,2; KCl, 5,4; MgCl₂, 1,2; CaCl₂, 1,8; glucose, 10 (pH 7.4 avec 5% CO₂). Les prélèvements sont alors stimulés avec des stimulations carrées de 2 ms dont l'amplitude est de deux fois le seuil diastolique à l'aide d'électrodes bipolaires recouvertes de Teflon.

Les électrodes de mesure sont réalisées à partir de capillaires de verre en borosilicate (Sutter Instrument). Le capillaire est chauffé à l'aide d'une étireuse horizontale (P-97 ; Sutter Instrument) et une série de 2 températures combinées à la traction du capillaire permettra sa scission, formant deux pipettes quasi identiques. La résistance finale des pipettes est de 15 à 25 MΩ. Les pipettes sont remplies avec une solution de KCl 3M. L'électrode de mesure est reliée à un amplificateur VF102 (BioLogic ; France) et le signal analogique est converti en signal numérique à l'aide du convertisseur EMKA. Le signal est filtré à 10 kHz et enregistré à l'aide du logiciel iOX 1.8.0.18 (EMKA Technologies ; France). Après 20 minutes de stimulation avec une durée de cycle de 200 ms, les enregistrements de potentiels d'action ont pu débuter. En raison de la durée des potentiels d'action observés chez les souris *Scn5a*^{+/-ΔQKP}, un seul intervalle de stimulation a pu être utilisé. Les enregistrements se font donc avec une durée de cycle de 200 ms. Les paramètres de potentiel de repos, d'amplitude, de vitesse de dépolarisation, et de durée de repolarisation ont été recueillis à l'état stable.

Afin de vérifier l'implication du canal sodique dans les phénomènes observés, nous avons perfusé, dans les mêmes conditions de stimulation, les préparations avec 10 μM de Ranolazine qui est connue pour inhiber de manière relativement spécifique le courant sodique persistant. Cette concentration est la même que celle préalablement utilisée pour la caractérisation de la souris *Scn5a*^{+/-ΔKPQ} (Fredj et al., 2006).

5 ECHOCARDIOGRAPHIE

L'échocardiographie 2-D a été réalisée au sein de l'équipe par Monsieur Gilles Toumaniantz à l'aide de l'appareil Vivid 7 Dimension (GE Healthcare) avec une sonde de 14 MHz. Afin d'éviter tout biais possible, les acquisitions et les mesures ont été réalisées sans connaissance du génotype de l'animal. Pour cela, les souris ont été anesthésiées par inhalation d'isoflurane dans une boîte d'induction (5 %) pendant 2-3 minutes puis l'anesthésie a été maintenue au masque (2,5%) tout au long de l'acquisition. Afin de mesurer les paramètres du remodelage myocardique, le diamètre du ventricule gauche en fin de systole ainsi que l'épaisseur de sa paroi libre ont été mesurées en grand axe (coupe 4 cavités) mais aussi en petit axe (coupe 2 cavités) en mode temps-mouvement (*M mode*). La fonction systolique a été analysée à partir des données de fraction d'éjection et de raccourcissement. La fonction diastolique a été évaluée en mode Doppler par la mesure du flux mitral. Ainsi, les paramètres de remplissage passif (onde E) et actif (onde A), ainsi que le temps de décélération de l'onde T, représentant la capacité de

relaxation du ventricule gauche, ont été mesurés.

6 HISTOLOGIE

Les études histologiques permettent de mettre en évidence d'une part des anomalies structurales (dilatation, non compaction,) mais aussi la présence d'un remodelage fibrotique au sein du myocarde.

Quel que soit l'organe considéré (cœur, foie, poumons) le protocole histologique est le même sauf si cela est clairement précisé. Après avoir prélevé les organes d'intérêt et les avoir rincés dans une solution saline afin d'éliminer le sang restant, ceux-ci sont fixés par immersion dans une solution de formol 4% à 4°C pendant au moins 48 heures. Pour les poumons, on réalise préalablement une perfusion de la bronche par la solution de formol 4% afin de remplir le poumon de fixateur et ainsi garder une bonne organisation du parenchyme pulmonaire. Suite à cela, les échantillons sont placés dans un automate (STP 120 Myr Microm Microtech) afin d'être déshydratés dans des bains d'alcool croissants (alcool 80° 1h ; alcool 95° 1h ; alcool 95° 1h30 ; alcool 95° 1h30 ; alcool 100° 1h15 ; alcool 100° 1h30 ; alcool 100° 2h ; butanol 2h ; butanol 2h30 ; butanol 2h30) puis dans 2 bains de paraffine chaude (2h30 et 2h minimum) jusqu'à récupération des échantillons. Les échantillons sont ensuite placés dans des moules, orientés suivant le plan de coupe souhaité et inclus dans de la paraffine. Dans le cas du projet portant sur les souris *Scn5a*^{+/-}, des coupes transversales de cœur montrant les deux ventricules ont été réalisées afin de se situer dans les mêmes conditions que celles préalablement publiées (Leoni et al., 2010). Dans le cas du projet sur les souris *Scn5a*^{+/-Δ^{OKP}}, des coupes de cœur dans le plan longitudinal ont été réalisées afin de détecter toute anomalie aussi bien au niveau ventriculaire qu'atrial. Dans ce cas, seules les coupes se situant à proximité du plan des valves aortiques et mitrales ont été comparées. Afin d'accélérer la prise de la paraffine et d'uniformiser celle-ci, les blocs sont déposés sur une plaque refroidissante -15°C (EC 350-2 ; Myr) pendant 1 heure. Les blocs sont alors placés pendant au moins 24 heures à 4°C jusqu'à leur utilisation. Des coupes de 5 μm sont réalisées à l'aide d'un microtome (HM 355S Microm Microtech ; France) et placées sur des lames (Starfrost Knittel Glass).

Les colorants utilisés pour mettre en évidence les structures d'intérêt étant en solution aqueuse, les coupes doivent être hydratées avant d'être colorées. Pour cela, les lames sont placées 5 minutes dans deux bains de Tissue-Clear® (Sakura Finetek ; USA) afin d'éliminer la paraffine, puis 1 minute dans des bains d'alcool décroissant (100°, 95°, 80° et 70°) et enfin 1 minute dans de l'eau dé-ionisée.

Afin de mettre en évidence la présence de fibrose au sein du myocarde, nous avons utilisé une coloration au rouge picrosirius spécifique des fibres de collagène. En effet, l'acide picrique se fixe de manière privilégiée sur le collagène qui est une structure acidophile. Contrairement au trichrome de Masson qui est difficilement quantifiable, cette coloration est admise pour quantifier la présence de fibrose au sein du myocarde. Pour ce faire, les lames ont été colorées selon le protocole obtenu par

l'équipe de Harold van Rijen (NL) (van Veen et al., 2005). Les lames sont placées 1 heure dans un bain de rouge picrosirius (pour 1 litre, 20 g d'acide picrique et 1 g de rouge sirius, pH 2,0) puis décolorées pendant exactement 2 minutes dans un bain de HCl 0,01N. Les lames sont ensuite plongées dans un bain d'eau dé-ionisée pendant 1 minute avant d'être déshydratées.

Afin de mettre en évidence les anomalies structurales aussi bien au niveau cardiaque que pulmonaire ou hépatique, la coloration Hématoxyline-Eosine a été utilisée. Cette coloration marque en violet les noyaux (structures basophiles) et en rose le cytoplasme (structure acidophile). Pour cela, les lames sont placées pendant 20 secondes dans l'Hématoxyline de Harris (DiaPath), rincées dans l'eau dé-ionisée puis placées 30 secondes dans un bain d'éosine (DiaPath) pour enfin être rincée dans l'eau dé-ionisée avant d'être déshydratées.

La déshydratation des coupes permet d'une part d'éliminer l'eau qui est un obstacle à l'observation des tissus mais aussi à garantir une meilleure préservation des coupes dans le temps. Pour cela, les lames sont placées 1 minute dans des bains d'alcool croissant (70°, 80°, 95° et 100°) puis 5 minutes dans deux bains de Tissue-Clear® (Sakura Finetek ; USA). Les lames sont enfin montées avec une lamelle à l'aide d'un liquide de montage spécifique (DPX-Mountant) qui a pour effet de protéger la coupe et de permettre une bonne observation microscopique.

Les coupes sont observées avec un microscope droit classique (Eclipse E-600 Nikon ; Japon) et les images sont acquises à l'aide du logiciel NIS-Elements (v4.10 Nikon ; Japon). Pour les analyses de fibrose, 3 régions ont été analysées par coupe (l'apex, le milieu et la base du cœur) et au moins 20 photos ont été prises par région. Les analyses de quantification relative ont été réalisées à l'aide du logiciel ImageJ 1.45b (NIH Software).

7 IMMUNOHISTOCHIMIE

Les études immunohistochimiques permettent de mettre en évidence la localisation et l'organisation des protéines d'intérêt au sein de la cellule ou du tissu étudié. Dans le cas du projet n°1 traitant des souris *Scn5a*^{+/-}, nous nous sommes intéressés à la localisation de la Cx43 au sein du tissu ventriculaire.

Pour cela, des cœurs de souris de 4 semaines ont été prélevés et rincés dans une solution saline avant d'être plongés quelques secondes dans de l'isopentane préalablement refroidi au contact de l'azote liquide. Le cœur est ensuite conservé à -80°C. Au moment de la coupe avec le cryostat (Microm Microtech ; France), le cœur est recouvert de Tissue-Tek® OCT™ (Sakura Finetek ; USA) et des coupes de 6 µm d'épaisseur sont réalisées. Les coupes sont placées sur des lames SuperFrost Plus Gold (ThermoScientific). Les coupes sont ensuite fixées pendant 10 minutes dans un bain d'acétone froide conservée à -20°C puis perméabilisées et saturées avec une solution de PBS contenant 10% de *Normal Goat Serum*, 1% de BSA, et 0,5% de TritonX-100 pendant 30 minutes à température ambiante. Les

coupes sont ensuite rincées dans un bain de PBS avant d'être incubées pendant 2 heures avec l'anticorps anti-Cx43 (BD Transduction Laboratories ; 1:200) à température ambiante. Suite à cela, les coupes sont rincées dans du PBS et incubées pendant 45 minutes avec l'anticorps secondaire AlexaFluor® 568 (Life technologies ; 1 :200). Les anticorps primaires et secondaires sont dilués dans une solution de PBS contenant 3% de *Normal Goat Serum*, 1% de BSA, et 0,5% de TritonX-100. Après l'incubation avec l'anticorps secondaire, les coupes sont de nouveau rincées dans du PBS et les lames sont montées avec du FluorSave™ Reagent (Calbiochem, Merck). Les lames sont conservées à -80°C jusqu'à leur analyse en microscopie confocale.

Les analyses confocales sont réalisées sur la plate forme MicroPiCell à l'aide d'un microscope confocal Nikon A1 RSi équipé d'un objectif à immersion d'huile x60 (NA 1,4) permettant d'obtenir des images d'une résolution de 1024x1024 pixels (0,21 µm/pixel). Pour chaque cœur étudié, 3 régions ont été analysées : l'apex, la milieu et la base du cœur. Au moins 10 images en grand champ ont été réalisées par région et par cœur. Une image en grand champ correspond à 3x3 images de 1024x1024 pixels soit une image finale de 615,7x615,7 µm. Les quantifications ont été réalisées grâce au logiciel Volocity® 6.1.1 (PerkinElmer Inc ; USA) et une plaque jonctionnelle est définie comme un cluster de pixels continus et positifs d'au moins 1 µm² (Chkourko et al., 2012). L'orientation des plaques de Cx43 a été déterminée comme étant parallèle (0 à 20 degrés) ou perpendiculaire (21 à 90 degrés) à l'orientation des fibres.

8 WESTERN-BLOT

8.1 EXTRACTION PROTEIQUE

Les tissus ventriculaires sont rapidement prélevés et congelés dans de l'azote liquide afin de limiter la déphosphorylation et la dégradation de protéines. Les tissus sont ensuite broyés de façon mécanique à 4°C dans un volume de tampon de lyse adéquat. Le choix du tampon de lyse est déterminé en fonction du type d'expérimentation. Ainsi, un tampon favorisant l'extraction de la Cx43 a été utilisé pour les études biochimiques associées avec les souris *Scn5a*^{+/-} contenant (en mM) NaCl, 100; Tris-HCl, 50; EGTA, 1; 1% TritonX-100, Na₃VO₄, 1; NaF, 50; phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 (Roche Applied Science), et un cocktail d'inhibiteur de protéases (1:100 dilution; Sigma P8640) (pH 7.4). Pour les études biochimiques associées avec les souris *Scn5a*^{+/-Δ^{OKP}}, un tampon limitant le plus possible la déphosphorylation et favorisant l'extraction des protéines présentes au sein des organites intracellulaires a été utilisé. Ce tampon de lyse contient (en mM) NaCl, 100, Tris-HCl, 50, EGTA, 2, 1% NP40 et d'inhibiteurs de protéases (pH 7.5 avec NaOH). La lyse se poursuit par une agitation à 4°C pendant 5 min afin d'augmenter son efficacité. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 5 min, à 10000xg et à 4°C pour séparer les débris cellulaires et les noyaux du surnageant. La concentration protéique de chaque échantillon est déterminée par la méthode de coloration protéique basée sur l'acide

bicinchonique (BCA, Pierce-Thermoscientific) en la comparant à une gamme étalon de BSA (0 à 2 mg/ml). Ceci permet d'effectuer les expériences sur des quantités normalisées de protéines (40 µg). Le dosage est effectué sur 10 µl d'échantillon dilué au 1/10e en duplicata auquel on ajoute du réactif BCA. Après une incubation de 30 min à 37°C, la densité optique est lue à 560 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Victor X3). Tous les lysats cellulaires sont homogénéisés et aliquotés avant d'être congelés à -80°C.

8.2 LE WESTERN BLOT

La technique de western blot permet de révéler le niveau d'expression d'une ou de plusieurs protéines dans des lysats à l'aide d'anticorps spécifiques.

Le lysat protéique dénaturé est déposé sur un gel d'acrylamide (Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Precast Gels, Bio-rad, France) dont le pourcentage varie en fonction du poids moléculaire des protéines d'intérêts (4-15% ou 10%). Le gel est alors soumis à un courant électrique d'ampérage constant (20 mA par gel). Les protéines chargées négativement par le SDS migrent d'autant plus rapidement qu'elles sont de faible poids moléculaire. Les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Trans-Blot® Turbo™ Nitrocellulose Transfer Packs, Bio-rad, France) qui est ensuite incubée dans une solution de rouge ponceau pendant 30 secondes. Cette étape permet de vérifier l'efficacité du transfert et, à titre indicatif, l'homogénéité des dépôts. Les membranes sont incubées dans une solution de tampon TBS (Tris-HCl Buffered Saline) à 0,1% de Tween 20 (TBS-T) auquel on ajoute 5% de lait pendant 30 min afin de saturer les sites non spécifiques. Elles sont ensuite incubées toute la nuit avec l'anticorps spécifique de la protéine recherchée dilué dans une solution de TBS-T à 5% de lait (Tableau 3). Les membranes sont lavées 3 fois pendant 10 min puis incubées dans une solution de TBS-T 5% de lait contenant un anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps primaire (Tableau 3). À nouveau, 3 lavages de 10 min sont nécessaires pour éliminer l'excédant d'anticorps secondaire. Cet anticorps secondaire est couplé à la HRP (Horse Raddish Peroxidase) qui émet une luminescence en présence d'un réactif de révélation ECL (Enhanced ChemiLuminescence) ou Clarity™ (Western ECL Substrate, Biorad). Cette luminescence peut être visualisée à l'aide d'une caméra (système Imager de GE Healthcare ou ChemiDoc™ MP System Bio-rad). Les images obtenues sont analysées à l'aide du logiciel ImageJ (NIH Software) ou Lab™ Software (Bio-rad).

Tableau 3. Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés pour le western blot

Anticorps	Référence	Fournisseur	Dilution WB
Anti-Nav1.5	ASC-005	Alomone Labs	1 :500 ou 1 :1000
Anti-SERCA2	PA5-29380	Thermo Scientific	1 :2000
Anti-NCX1	Sc-30304	Santa Cruz	1 :1000
Anti-CaMKII	PA5-22168	Thermo Scientific	1 :1000
Anti-phosphoCaMKII	MA1-047	Thermo Scientific	1 :2000
Anti-phospholamban	Sc-20511	Santa Cruz	1 :1000
Anti-phosphoPLB	Sc-17024	Santa Cruz	1 :5000
Anti-calcineurine	610259	BD Transduction	1 :1000
Anti-Ryanodine2	MA3-925	Thermo Scientific	1 :2000
Anti-TGFβ	Sc-7892	Santa Cruz	1 :500
Anti-CTGF	Sc-14939	Santa Cruz	1 :500
Anti-SPARC	Sc-25574	Santa Cruz	1 :500
Anti-Cx43	C610061	BD Transduction	1 :1000
Anti-Smad2/3	07408	Merck Millipore	1 :500
Anti-phosphoSmad2/3	AB3849	Merck Millipore	1 :500
Anti-GAPDH	Sc-32233	Santa Cruz	1 :10000
Anti-lapin HRP	Sc-2054	Santa Cruz	1 :10000
Anti-souris HRP	Sc-2055	Santa Cruz	1 :10000
Anti-chèvre HRP	Sc-2922	Santa Cruz	1 :10000

9 ZYMOGRAPHIE

Les expériences de zymographie permettent de déterminer l'activité des MMPs en mesurant la dégradation de leur substrat sur un gel de gélatine selon le même principe que celui du western blot. Les échantillons qui ont activité de dégradation du substrat sont visualisés comme des bandes claires sur un gel coloré en bleu. Pour cela, 40 µg de protéines sont dilués dans une solution dénaturante et non réductrice contenant 1 M Tris pH 6,8, 10% SDS et 50% de glycérol et sont déposés sur des gels 10% de gélatine (Ready Gel® Zymogram Precast Gels Bio-Rad). Les gels sont ensuite rincés quatre fois dans une solution de Triton 2,5% puis 4 fois dans de l'eau dé-ionisée. Le gel est ensuite incubé 48 heures à 37°C dans un tampon *Zymogram Development Buffer* (Bio-Rad) suivi d'une coloration au bleu de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Bio-Rad). Le gel est ensuite décoloré pendant 2 heures dans une solution contenant 20% d'isopropanol et 10% d'acide acétique. Le signal est ensuite détecté avec la caméra ChemiDoc™ MP System et analysé avec le logiciel Image Lab™ (Bio-Rad).

10 TRAITEMENTS PHARMACOLOGIQUES

10.1 TRAITEMENT CHRONIQUE A LA FLECAINIDE

Afin de discriminer le rôle du courant sodique de celui de la présence du canal au sein des cardiomyocytes dans le développement de la fibrose dans le modèle murin *Scn5a*^{+/-}, nous avons traité des souris sauvages sur fond génétique 129Sv avec un inhibiteur du courant sodique, la Flécainide, de 6

semaines à 60 semaines. Pour cela, une dose de Flécainide (Tocris) de 50 mg/kg/j est donnée aux souris dans de l'eau de boisson. Les quantités d'eau bues sont mesurées tous les 2 jours et ajustées en conséquence pour que les souris aient toujours la même dose de Flécainide.

10.2 TRAITEMENT AIGU DU QT LONG ET DES ARYTHMIES

Afin de confirmer l'implication du canal sodique dans le phénotype observé chez les souris *Scn5a*^{+/-ΔQKP} mais aussi de proposer une éventuelle piste thérapeutique, nous avons traité ces souris en aigu avec des inhibiteurs du canal sodique. Pour cela, nous avons réalisé chez des souris de 3 semaines, au cours de l'ECG de phénotype, des injections intrapéritonéales de Flécainide (20 mg/kg ; Tocris), d'ajmaline (30 mg/kg ; Tocris) et de Ranolazine (30 mg/kg ; Tocris). Le suivi ECG est poursuivi pendant 10 minutes après l'injection pour observer les effets des molécules. La mesure des intervalles P, PR, QRS et QT se fait sur trois complexes PQRS successifs en dérivation périphérique DI comme précédemment décrit.

10.3 TRAITEMENT CHRONIQUE ANTI-TGFβ

Afin de confirmer l'implication de la voie de signalisation du TGFβ dans le processus fibrotique chez les souris *Scn5a*^{+/-}, nous avons traité des souris *Scn5a*^{+/-} pendant 15 semaines (de 45 semaines à 60 semaines) avec un inhibiteur des récepteurs de type I et II au TGFβ, le GW788388 (5 mg/kg/j), par voie orale dans l'eau de boisson

- Résultats -

Projet 1 : Caractérisation du rôle du canal sodique Nav1.5 dans la physiopathologie des troubles de la conduction et du remodelage protéique associé.

1 INTRODUCTION

Les mutations dites « perte de fonction » sur le gène SCN5A, codant pour le canal sodique Nav1.5, ont été liées aux troubles de la conduction cardiaque et au syndrome de Brugada. Ces deux pathologies sont caractérisées entre autre par une forte variabilité phénotypique. Ces mutations sont connues pour être associées au développement de fibrose mais aussi à des cardiomyopathies dilatées. Le modèle de souris *Scn5a*^{+/-} est utilisée depuis de nombreuses années et a fait l'objet de nombreuses publications. Il est caractérisé par un allongement de la durée du complexe QRS et le développement de fibrose. Au cours de cette étude, nous avons voulu, dans un premier temps, comprendre la chronologie du développement fibrotique, puis déterminer par quelle(s) voie(s) de signalisation la perte d'expression du canal sodique était reliée avec le développement de fibrose ventriculaire.

Les souris *Scn5a*^{+/-} ont été séparées en 2 groupes à 10 semaines sur la base des données ECG, celles ayant phénotype marquée avec un intervalle QRS > 18 ms et celles ayant un phénotype plus léger avec un intervalle QRS < 18 ms. Pour comparaison, les souris sauvages ont un intervalle QRS entre 10 et 18 ms. Ces souris ont été suivies sur une période allant de 10 semaines à 60 semaines.

Notre étude démontre que le processus fibrotique n'est pas progressif mais apparait à partir de 45-60 semaines chez les souris *Scn5a*^{+/-} et implique d'une part l'activation de la voie canonique du TGF- β mais aussi un remodelage de l'expression de la Cx43. L'utilisation d'un inhibiteur du récepteur au TGF- β a permis de bloquer le processus fibrotique et de confirmer le rôle central de cette voie dans la pathologie. D'autre part, afin de discriminer le rôle du courant sodique de l'expression membranaire du canal dans ce processus, nous avons traité des souris sauvages avec de la Flécainide (50 mg/kg/jour). Notre étude montre que la réduction du courant sodique seule n'induit ni l'activation de la voie du TGF- β ni le processus fibrotique observe chez les souris *Scn5a*^{+/-}.

Notre étude montre que le processus fibrotique associé aux troubles progressifs de la conduction cardiaque implique l'activation de la voie du TGF- β et le remodelage de la Cx43. Cette étude conforte la forte interaction structurelle et fonctionnelle entre Nav1.5 et la Cx43.

2 ARTICLE

Age-dependent development of ventricular fibrosis in the *Scn5a*^{+/-} mouse model is triggered by activation of TGF- β pathways

Mickael Derangeon,^{1-3*} Jérôme Montnach,^{1-3*} Cynthia Ore Cerpa,¹⁻³ Gilles Toumaniantz,¹⁻³ Benoit Jagu,¹⁻³ Christopher LH Huang,⁴ William H. Colledge,⁴ Andrew A Grace,⁴ Isabelle Baró,¹⁻³ Flavien Charpentier^{1-3§}

¹ INSERM, UMR1087, l'institut du thorax, Nantes, F-44000 France

² CNRS, UMR6291, Nantes, F-44000 France

³ Université de Nantes, Nantes, F-44000 France

⁴ the Section of Cardiovascular Biology, Departments of Biochemistry and Physiology, University of Cambridge, Cambridge, CB2 3EG, United Kingdom

§ Address for correspondence:

Flavien CHARPENTIER

l'institut du thorax

Inserm UMR1087, CNRS UMR6291

IRS-UN, 8 quai Moncousu

44007 Nantes cedex 1, France

E-mail: flavien.charpentier@inserm.fr

Tel. +33 228 08 01 10, Fax. +33 228 08 01 30

* These authors contributed equally to this work

En préparation pour soumission à Circulation Research

Abstract

Rationale. Loss-of-function mutations in *SCN5A*, the gene encoding Nav1.5 Na⁺ channel, have been associated with inherited progressive cardiac conduction disease (PCCD). We have previously shown that *Scn5a* heterozygous knock-out (*Scn5a*^{+/-}) mice represent a good model for PCCD. These mice are characterized by ventricular fibrotic remodeling with ageing which exacerbate conduction defects.

Objective. Our objectives were to identify the mechanisms linking Nav1.5 decreased expression and ventricular fibrotic remodeling. **Methods and results.** Wild-type and *Scn5a*^{+/-} mice were followed from the age of 10 weeks to 60 weeks. Our study shows that myocardial interstitial fibrosis occurred in *Scn5a*^{+/-} mice only after the age of 45 weeks. Fibrosis was triggered by the activation of TGF- β pathway. Chronic pharmacological inhibition of TGF- β receptors with GW 788388 in *Scn5a*^{+/-} mice from the age of 45 weeks to the age of 60 weeks prevented the occurrence of fibrosis. Activation of TGF- β signaling occurred in parallel with Cx43 remodeling. In order to discriminate the role of decreased Na⁺ current from decreased sarcolemmal cell membrane expression of Nav1.5, WT mice were chronically treated with flecainide (50 mg/kg/day) from the age of 6 weeks to the age of 60 weeks. Flecainide treatment did not lead to TGF- β pathway activation and fibrosis. **Conclusion.** Our results indicate that myocardial fibrosis secondary to a loss of Nav1.5 is triggered by TGF- β signaling pathway and down-regulation of Cx43 expression. Those events are more likely secondary to the decrease in Nav1.5 sarcolemmal expression rather than the decreased Na⁺ current *per se*.

Key words: Nav1.5, connexin 43, progressive cardiac conduction defects, fibrosis, TGF- β

Introduction

Progressive Cardiac Conduction Disease (PCCD) is one the major causes of pacemaker implantation in developed countries.¹ It is a slowly evolving lifespan disease that progressively affects cardiac conduction, leading ultimately to pacemaker implantation to prevent the risk of complete atrioventricular block and Stokes-Adams syncope. The disease was initially attributed to an age-related fibrotic degeneration of atrio-ventricular and/or ventricular conduction system.² There is no available pharmacological treatment to prevent the progression of the disease. There is thus a need to understand perfectly the pathophysiological mechanisms of the disease and to identify molecular targets involved in its early phases.

SCN5A was the first gene associated to PCCD.³ Two other genes have also been related to the disease: *SCN1B*, which encodes one of the regulatory β -subunits of Nav1.5,⁴ and *TRPM4*, which encodes a Ca^{2+} -permeable non selective cation channel.^{5,6} Mutations of *SCN5A* gene lead to a loss of function and/or expression of its product, the cardiac sodium channel Nav1.5.⁷ Since the haploinsufficiency is present early during development, the disease was thought to result from combined Na^+ channel dysfunction and aging-related unknown process.⁷ To understand the pathophysiology of PCCD, we studied a *Scn5a* heterozygous knockout (*Scn5a*^{+/-}) mouse model⁸ and showed that this model exhibits an age-related deterioration in conduction partly due to occurrence of ventricular fibrosis and remodeling of connexin 43 expression.⁹⁻¹¹ *Scn5a*^{+/-} mice thus appeared as a unique model to elucidate PCCD pathophysiological mechanisms and identify molecular targets for developing preventive treatments. Our previous studies have shown that *Scn5a*^{+/-} mice exhibited fibrotic remodeling around coronary vessels as early as 14-16 weeks of age and increased myocardial interstitial fibrosis, together with focal fibrosis, over 50 weeks.⁹⁻¹¹ The extent of fibrosis in old *Scn5a*^{+/-} mice seemed to be linked to the severity of primary conduction defects: mice exhibiting the more severe QRS complex prolongation when young had more myocardial fibrosis when old. Moreover, 50% of old *Scn5a*^{+/-} mice with a severe phenotype exhibited spontaneous ventricular arrhythmias.⁹ However, the kinetics of occurrence of myocardial interstitial and focal fibrosis were not clearly determined. This represents

81" crucial information to identify the molecular mechanisms linking Nav1.5 decreased expression to
82" fibrosis.

83" In this context, the objectives of the present study were (1) to determine more precisely the kinetics of
84" myocardial fibrotic remodeling, and (2) to identify its triggering molecular pathway(s). For this
85" purpose, we combined electrocardiographic, echocardiographic, biochemical and
86" immunohistological studies on wild-type and *Scn5a*^{+/-} mice at the ages of 10, 20, 30, 45 and 60 weeks.
87" Our study shows that myocardial fibrosis does not increase progressively with ageing but rather quite
88" rapidly only after the age of 45 weeks, triggered by the activation of TGF- β pathway. Our results also
89" suggest that this process involves a combined decrease of Nav1.5 and connexin 43 expressions, rather
90" than a decrease in Na⁺ current *per se*.

91"

92"

93"

Methods

94"

Ethics Statement

96" All the animal experiments were performed in the animal facility of Nantes University Health
97" Research Institute (*Unité de Thérapeutique Expérimentale*) and the *institut du thorax* which have been
98" accredited by the French Ministry of Agriculture. Experimental procedures were approved by the
99" regional ethic committee (CEEA – Pays de la Loire).

100"

Electrocardiography

102" All mice (129/Sv genetic background) were genotyped by polymerase chain reaction (PCR) as
103" previously described.¹⁰ Mice were anaesthetized for ECG recording with etomidate (25 mg/kg i.p.).
104" Body temperature was maintained at 37°C with a heating pad (Harvard Apparatus, USA). Six-lead
105" ECG was recorded with 25-gauge subcutaneous electrodes on a computer through an analog-digital
106" converter (IOX 1.585, EMKA Technologies, France) for monitoring and later analysis (ECG Auto
107" v3.2.0.2, EMKA Technologies). ECGs were analyzed as previously described.¹⁰

108"

Assessment of cardiac function by echocardiography

Two-dimensional (2-D) echocardiography was performed on mice using a Vivid 7 Dimension ultrasonography (GE Healthcare) with a 14-MHz transducer. Mice were anaesthetized with isoflurane (Abbott Laboratories, USA). Anesthetic induction was achieved at 5% isoflurane for 2.5 to 3 min, and anesthesia was maintained at 2.5%. In order to observe a possible structural remodeling, the left ventricular end-systolic diameter and the free wall end-systolic thickness were measured during systole from long- and short-axis images obtained by M-mode echocardiography. Systolic function was further assessed by calculation of the ejection and shortening fractions. Transmitral flow measurements of ventricular filling velocity were obtained using pulsed Doppler, with an apical four-chamber orientation. Doppler-derived mitral deceleration time, the early diastolic (E), the late diastolic (A) and the ratio E/A were obtained to assess diastolic dysfunction. To avoid bias in the analysis, experiments were done and analyzed by members of our research team blinded to the genotype.

Cardiac fibrosis remodeling investigations

After excision from WT and *Scn5a*^{+/-} mice (n=5 in each group), hearts were rinsed in saline solution, fixed by immersion in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, and transverse sectioned at 5-μm intervals. Hearts from placebo- (n=4) and flecainide-treated-mice (n=5) were snap-frozen in liquid nitrogen and sectioned at 6-μm intervals (HM530, Microm Microtech France, France). Slices were hydrated in Tissue-Clear® (Sakura Finetek USA, Inc., CA), decreased alcohol bath and deionized water. Then, they were stained during 1 hour in 0.1% picosirius red solution (20 g of picric acid + 1 g of Sirius Red in 1 liter of deionized water, pH 2.0). Then slices were decolorized for precisely 2 minutes in 0.01 N HCl and dehydrated in increased alcohol bath and Tissue-Clear®. Sections were mounted in QPath Coverquick 3000 (Labonord SAS, France) and examined with a classic light microscope (Nikon Eclipse E-600 microscope with NIS-Elements BR v4.10 Software, Nikon, Japan). Semi quantitative assessment of fibrosis was determined based upon the extent of interstitial fibrosis. For each heart, 3 regions (apex, middle and base) have been observed and at least 20 pictures of each

region have been taken. Automatic analysis was performed using ImageJ software 1.45b (NIH Software).

Cx43 Immunostaining

For cryo-sections, hearts (n=4 in each group) were embedded in Tissue-Tek® OCT™ (Sakura Finetek USA, Inc.) and serially sectioned transversally to generate 6-µm thick sections (Microm Microtech France). Sections were fixed in cold acetone for 10 minutes and permeabilized and blocked with blocking buffer containing 10% normal goat serum (NGS), 1% bovine serum albumin (BSA), 0.5% TritonX-100 in phosphate-buffered saline (PBS) for 30 minutes at room temperature. Then sections were washed with PBS, incubated for 2 hours with monoclonal mouse anti-Cx43 purchased from BD Transduction Laboratories at room temperature, washed again and incubated for 45 minutes with AlexaFluor® 568 (Life Technologies; 1:200) at room temperature. Both primary and secondary antibodies were diluted in Incubation Buffer containing 3% NGS, 1% BSA, 0.5% TritonX-100 in PBS. Sections were washed in PBS and mounted in Calbiochem® FluorSave™ Reagent (Merck KGaA, Germany). Immunostained preparations were analyzed by confocal microscopy (Nikon A1 RSi with x60 NA 1.4 objective) to determine protein localization. Images resolution was 1024x1024 pixels (0.21 µm/pixel). For each heart, 3 regions (apex, middle, base) have been observed and at least 10 large images have been taken per region. A large image corresponds to 3x3 images and results in a 615.7x615.7 µm field. Automated quantifications were performed using Volocity® 6.1.1 software (PerkinElmer Inc., USA). A gap junctional plaque was defined as a cluster of 1 µm² or more of contiguous pixels showing an immunoreactive signal.¹² Plaques were defined with a long axis oriented parallel (0 to 20 degrees) or perpendicular (21 to 90 degrees) to the orientation fiber. Plaques of a given direction were counted to establish the prevalence of Cx43 lateralization in *Scn5a*^{+/-} mice *versus* WT.

Western blot analysis

Protein samples were prepared from the left ventricular free walls. Tissues were snap frozen in liquid nitrogen, homogenized in ice-cold lysis buffer containing (in mmol/L): NaCl, 100; Tris-HCl, 50;

EGTA, 1; 1% TritonX-100, Na₃VO₄, 1; NaF, 50; phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 (Roche Applied Science); and protease inhibitor mixture (1:100 dilution; Sigma P8640) (pH 7.4). Samples were sonicated, and centrifuged at 14,000 × g for 15 min at 4 °C. Total homogenate protein was determined using the Pierce™BCA Protein Assay Kit. Samples were prepared with 40 µg of total protein, 2 µl of NuPAGE Sample Reducing Agent (Invitrogen), 5 µl of NuPAGE LDS Sample Buffer (Invitrogen) and boiled during 3 min. Samples were run on 10% or 4-15% Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Precast Gels (Bio-rad) and transferred on Trans-Blot® Turbo™ Nitrocellulose Transfer Packs (Bio-rad). Membranes were blocked and incubated with primary antibodies targeted against Nav1.5 (ASC-005, Alomone Labs; 1:1000), TGF-β, CTGF and SPARC (respectively Sc-7892, Sc-14939 and Sc-25574, Santa Cruz Biotechnology; 1:500), Connexin 43 (C610061, BD Transduction Lab.; 1:1000), SMAD2/3 and P-SMAD2/3 (07408 and AB3849 Merck Millipore; 1:500). In addition, anti-GAPDH antibody (Santa-Cruz Biotechnologies; 1:5000) was used as external/internal control. Next, membranes were incubated with the *ad hoc* secondary horseradish peroxidase (HRP) antibody (sc-2055, sc-2054 and sc-2922 Santa Cruz; 1:5000). Incubation was followed by detection using chemiluminescence (Clarity™ Western ECL Substrate, ChemiDoc™ MP System Bio-rad). Western-blot quantification was performed with Image Lab™ Software (Bio-rad) and normalized to GAPDH and stain-free.¹³

In vivo treatments with flecainide and GW 788388

For flecainide, wild-type mice with 129/Sv genetic background were used at the age of 6 weeks. Mice were chronically treated orally (drinking water) with the Na⁺ channel inhibitor flecainide at 50 mg/kg/day from the age of 6 weeks to the age of 20, 30 and 60 weeks.

For GW 788388, *Scn5a*^{+/-} mice were used at the age of 45 weeks and were treated orally chronically until the age of 60 weeks at a dose of 5 mg/kg/day.

Determination of myocardial Matrix Metalloproteinase activity by zymography

For these experiments 40 µg of total protein samples for western were diluted in loading buffer containing: 1 M Tris pH 6.8, 10% SDS and 50% Glycerol. Samples were run on 10% Ready Gel®

Zymogram Precast Gels (Bio-Rad). Gels were washed four times in Triton 2.5% and then four times in milliQ water. Then the gel was incubated 48 hours at 37°C in Zymogram Development Buffer (Bio-Rad) follow by a gel staining in Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining solution kit (Bio-Rad). The gel was bleached for two hours in a buffer containing 20% isopropanol and 10% acetic acid. Bleaching was followed by detection and quantification using respectively ChemiDoc™ MP System and Image Lab™ Software (Bio-Rad).

Statistics

Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. Statistically significant differences between mean values were determined with either Mann-Whitney U test for comparison of two groups. Statistical analysis was made with Prism5 (GraphPad Software, Inc). For more than two groups, 1-way ANOVA or Kruskal-Wallis test was performed with Bonferroni or Dunns post-test when appropriate. A P value of 0.05 was considered to indicate significance.

Results

As in our previous study,⁹ *Scn5a*^{+/-} mice were separated in two groups based on the QRS complex duration measured at the age of 9-11 weeks: one group with a mild QRS prolongation (QRS ≤ 18 ms; "mild") and one group with a severe phenotype (QRS > 18 ms; Suppl. fig. 1; "severe").

Kinetics of cardiac structural remodeling in *Scn5a*^{+/-} mice

As shown in figure 1, ventricular interstitial fibrosis in *Scn5a*^{+/-} mice appeared rapidly between the age of 45 weeks and 60 weeks. Up to 45 weeks, there was no significant difference between wild-type and *Scn5a*^{+/-} mice. The amount of fibrosis in 60-week-old *Scn5a*^{+/-} mice with severe conduction defects was slightly, albeit not significantly, higher than in *Scn5a*^{+/-} mice with mild QRS complex prolongation. Development of fibrosis at the age of 60 weeks was associated with a mild left ventricular dilation in *Scn5a*^{+/-} mice with severe QRS complex prolongation resulting in a moderate decrease in contractile function as assessed with echocardiography (Fig. 2). In contrast, at 16 weeks old, *Scn5a*^{+/-} mice with severe QRS prolongation exhibited a mild ventricular hypertrophy, leading to a slight but significant increase in contractility. Diastolic function was not altered.

Fibrosis development in *Scn5a*^{+/-} mice parallels connexin 43 remodeling

As shown in figure 3A, ageing was associated with changes in ventricular expression of connexin 43 (Cx43). Indeed, up to 45 weeks, Cx43 expression remained relatively stable. But in older mice, Cx43 expression was markedly reduced (by 57% at 60 weeks *versus* 30 weeks). *Scn5a*^{+/-} mice showed an increased expression of Cx43 compared to wild-type mice (Fig. 3B). As in wild-type mice, expression was stable up to 45 weeks (data not shown) and decreased between 45 and 60 weeks. This decrease in expression was larger than in wild-type mice, so that there was no more difference at 60 weeks between the two phenotypes (Fig. 3B). Immunohistological studies confirmed these results (Fig. 3C and 3D, left panel). However, the size and sarcolemmal distribution of Cx43 plaques in young *Scn5a*^{+/-} mice were different than in age-matched wild-type mice. Indeed, in 30-week-old wild-type mice, Cx43 plaques located at the intercalated discs were bigger than those located at the lateral membranes (Fig.

3D, middle left panel). In 30-week-old *Scn5a*^{+/-} mice, Cx43 plaques located at the intercalated discs failed to aggregate and were smaller than in wild-type mice. The size of Cx43 plaques located at the lateral membranes was also decreased but to a lesser extent, so that there was no difference between intercalated disks and lateral membranes. At the age of 60 weeks, the size of Cx43 plaques located at both intercalated disks and lateral membranes in wild-type mice decreased markedly to values similar to those observed for *Scn5a*^{+/-} mice (Fig. 3D, middle right panel). As shown in the right panel of figure 3D, the distribution of Cx43 between intercalated disks and lateral membranes was similar in all groups.

Fibrotic remodeling is triggered by the activation of TGF- β pathway

In order to decipher the pathophysiological pathway(s) involved in fibrosis remodeling, we investigated the left ventricular expression of proteins previously shown to be involved in fibrotic remodeling in other pathological models: MMP2 (Matrix Metalloproteinase), CTGF (Connective Tissue Growth Factor), TGF- β (Transforming Growth Factor β) and SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine). We had previously shown that the severity of QRS prolongation in 10-week-old *Scn5a*^{+/-} mice was related to the level of expression of Nav1.5: mice with a severe QRS prolongation had a lower expression of Nav1.5 than mice with a mild QRS prolongation.⁹ The present study confirms this result and shows that the difference in Nav1.5 between the two phenotypes persisted over time, although differences did not reach statistical significance (Fig. 4). At the ages of 10 and 20 weeks, these proteins were expressed at similar levels in wild-type and *Scn5a*^{+/-} mice (data not shown). At 30 weeks, there was an increase in CTGF and SPARC expression in *Scn5a*^{+/-} mice, which was larger in *Scn5a*^{+/-} mice with a severe phenotype than in those with mild QRS prolongation (Fig. 4). CTGF and SPARC expression was further increased but the differences between the mild and severe phenotypes disappeared. At 30 weeks, there was also an increased activation of gelatinolytic matrix metalloproteinases of 72 kDa in *Scn5a*^{+/-} mice of both phenotypes, demonstrating an increase in MMP2 activity. This over-activity disappeared over time (Suppl. Fig.2). At the age of 45 weeks, there was an increased expression of TGF- β in *Scn5a*^{+/-} mice, which did not differ between the two

phenotypes. As expected, there was a concomitant increased expression of the phosphorylated form of Smad2/3, a well known downstream effector of the TGF- β pathway, without any variation of total Smad2/3 expression (Fig. 4). These results suggest that fibrotic remodeling depends on the activation of TGF- β pathway. In order to confirm this hypothesis, we treated *Scn5a*^{+/-} mice chronically from the age of 45 weeks to the age of 60 weeks with an antagonist of the TGF- β receptor, the GW 788388. As shown in figure 5A, *Scn5a*^{+/-} treated with GW 788388 did not show any sign of fibrotic remodeling at the age of 60 weeks, thus confirming our hypothesis. Interestingly, the treatment with GW 788388 induced a decrease in TGF- β expression. This however is quite anecdotic in the present context since normal levels of TGF- β , as seen in WT mice did not induce abnormal fibrosis. Altogether, the experiments performed with GW 788388 support our hypothesis that fibrotic remodeling in *Scn5a*^{+/-} mice involved activation of TGF- β pathway.

Chronic inhibition of Nav1.5 does not induce fibrotic remodeling

Scn5a^{+/-} mice are characterized by both a decreased expression of Nav1.5 at the membrane⁹ and, as a consequence, a decreased Na⁺ current.⁹ In order to investigate whether decreasing the Na⁺ current without alteration of Nav1.5 expression could induce a structural remodeling, we treated wild-type mice with flecainide chronically from the age of 6 weeks to the age of 60 weeks. As shown in figure 6, flecainide induced a marked prolongation of QRS complex to values close to those observed in *Scn5a*^{+/-} mice with a mild phenotype (Fig. 6A). As observed in this latter group, no ventricular dilatation was observed in 60-week-old mice treated with flecainide (Fig. 6B). But in contrast to this group of *Scn5a*^{+/-} mice, there was no more fibrosis in mice treated chronically with flecainide than in mice treated with the placebo (Fig. 6C). This result is consistent with the observation that chronic flecainide did not induce an increase in TGF- β or CTGF expression (Fig. 6D). There was also no change in Nav1.5 and Cx43 expression. Altogether, these results suggest that a decrease in Na⁺ current is not enough *per se* to induce fibrotic remodeling.

Discussion

This study shows (1) that myocardial interstitial and focal fibrosis in *Scn5a*^{+/-} mice increases only after the age of 45 weeks, (2) that this fibrotic remodeling is triggered by TGF- β signaling; (3) that this process is associated with Cx43 remodeling; (4) that the decrease in Na⁺ current *per se* is not sufficient to induce fibrosis, and (5) that pharmacological inhibition of TGF- β type I and type II receptors prevent the occurrence of fibrosis in *Scn5a*^{+/-} mice, offering new therapeutic opportunities.

Myocardial fibrotic remodeling in *Scn5a*^{+/-} mice is triggered by TGF- β . The current study adds to previous studies on *Scn5a*^{+/-} mice. *Scn5a*^{+/-} mice have been shown to present conduction defects at atrial, atrioventricular and ventricular levels.⁸⁻¹⁰ They also exhibit sinus node dysfunction.¹⁴ One interesting feature of this model is the progressiveness of ventricular conduction defects with aging as observed on surface ECG^{9,10} and activation mapping on Langendorff-perfused hearts,¹¹ reflecting in some aspects the clinical phenotype of patients with inherited *SCN5A*-related PCCD.¹⁵ This age-dependent deterioration of ventricular conduction was associated with the occurrence of fibrosis in ventricular myocardium. This was the first demonstration that cardiac fibrosis could be the final outcome of an ionic channel defect.^{10,11} In the present study, one of our objectives was to determine more precisely the timeline of fibrosis occurrence with a focus on interstitial myocardial fibrosis, which seems to be the most important for reducing global ventricular conduction.^{16,17} We had previously shown that increased perivascular fibrosis could be detected in *Scn5a*^{+/-} mice as early as 14-16 weeks of age,¹⁰ but that myocardial fibrosis could be detected only in old (50-80 weeks) mice.^{9,10} The present study shows that myocardial fibrosis does not increase progressively with age but appears only after the age of 45 weeks, an age characterized by two other phenomena, as discussed below: the activation of TGF- β signaling pathway and a down-regulation of Cx43 expression.

Our second objective was to determine the pathophysiological pathway(s) involved in fibrosis development. The increase in cardiac fibrosis can result from an increase in collagen gene expression or from a decrease in the breakdown of collagen fibers, which is regulated by different

315" metalloproteinases (MMPs).^{18,19} Our study shows that ventricular expression of fibrotic factors in
316" *Scn5a*^{+/-} mice is altered as early as 30 weeks. Indeed, there was an increase in CTGF and SPARC
317" expression. Both proteins have been shown to play a key role in fibrosis development.^{20,21} Surprisingly
318" though, no increase in myocardial fibrosis was detected at this age. Because fibrosis results from a
319" balance between collagen synthesis and degradation, we looked for MMP2 activity, known to be
320" involved in collagen degradation. Interestingly, at 30 weeks, we observed an increase in MMP2
321" activity. This increase of MMP2 activity, which has been linked to CTGF,²² could lead to an increased
322" collagen turnover, as reported in patients with cardiac conduction defects,²³ and limit fibrosis
323" development. At 45 weeks, MMP2 activity decreased to levels similar than in wild-type mice. At the
324" age, the main event was a large increase in TGF- β expression in *Scn5a*^{+/-} mice, leading to an
325" activation of its canonical pathway as shown by the increase in phospho-smad2/3 expression. There
326" was also a further increase in CTGF and SPARC expression. CTGF is known to be regulated by TGF-
327" β pathway.²⁴⁻²⁶ SPARC is an upstream regulator of CTGF activated through TGF- β pathway and might
328" further limit collagen association with cell surfaces enhancing collagen deposition and formation of
329" mature, insoluble collagen fibers.²⁷ Altogether, these events are expected to trigger fibrosis
330" development. Although minor fibrotic factors are increased before observation of fibrosis, TGF- β
331" signaling appears as the major fibrotic factor involved in *Scn5a*^{+/-} mice. Hao *et al.* showed that fibrosis
332" associated with sodium channel deficiency in the sinoatrial node of *Scn5a*^{+/-} mice also involved TGF- β
333" signaling.²⁸ A link between a Na⁺ channel and TGF- β has also been observed in rat primary myotubes.
334" In this model, an increase in TGF- β transcription pathway has been described after a 50% reduction of
335" the sodium current, and inversely the expression of the TGF- β receptor is decreased when the Na⁺
336" channel expression is up-regulated.²⁹ Our study with flecainide chronic treatment suggests that a
337" decrease in Na⁺ current is not sufficient to explain by itself the activation of TGF- β pathway and
338" fibrosis development as observed in *Scn5a*^{+/-} mice. One could argue that the treatment with flecainide
339" was started in 6-week-old mice whereas the loss in Nav1.5 expression in *Scn5a*^{+/-} mice plays a key
340" role as early as day 10.5 in the embryo.⁸ However, abnormal prenatal and/or postnatal cardiac
341" development does not seem to be involved in the activation of TGF- β pathway and fibrosis since those

occur only in mice older than 45 weeks. *In vitro* Nav1.5-E3 antibody has been shown to increase TGF- β production by both cardiomyocytes and fibroblasts. This effect was not only associated with a 50% decrease in Na⁺ current, but also with a 20% decrease in Nav1.5 expression.²⁸ Therefore, one explanation to connect Nav1.5 haploinsufficiency and increased TGF- β signaling could be through Nav1.5 interacting proteins. This is consistent with formation of multiprotein complexes through which Nav1.5 may exert a regulatory role in cellular biological processes in addition to its electrophysiological function.³⁰ Although the detailed mechanistic link between disruption of Nav1.5 and TGF- β secretion needs further investigation, our findings have important implication for possible mechanisms underlying correlation between Nav1.5 membrane expression and cardiac remodeling.

Fibrotic process in *Scn5a*^{+/-} mice involves Cx43 remodeling.

Our study also shows that Cx43 expression is altered in *Scn5a*^{+/-} mice in association with fibrotic remodeling. In *Scn5a*^{+/-} mice younger than 45 weeks, prior to activation of TGF- β pathway, Cx43 expression is increased compared to wild-type mice. After 45 weeks, when TGF- β expression is increased and triggers fibrotic remodeling, Cx43 expression decreases. This down-regulation does not result from TGF- β pathway activation since it also occurs in wild-type mice. It is more likely the result of a physiological process linked to ageing. However, there seems to be a close relationship between Cx43 and fibrosis. In a previous study, we had reported that expression of Cx43 was decreased in *Scn5a*^{+/-} mice more particularly in regions with marked fibrosis.¹¹ In human also, fibrotic hearts are commonly hallmarked by a decrease in Cx43 expression.³¹⁻³³ It has been recently proposed that a reduction of Cx43 expression triggers fibrosis development in aging or pressure overloaded mouse hearts.³⁴ Inversely, the activity of TGF- β has been shown to be positively regulated by Cx43.³⁵ This effect seems to involve microtubules. Indeed, Dai *et al.*, showed that TGF- β -induced transcriptional activity was abolished by knockdown of the endogenous Cx43 activity in HL-1 cardiomyocytes and suggested that the translocation of Smad2/3 and Smad4 from the cytoplasm to the nucleus is mediated by Cx43 competition with Smad2/3 for binding to microtubules.³⁶ In a recent study of a mouse model of cardiac hypertrophy due to overexpression of a constitutively active form of calcineurin A, the

authors observed a decreased expression of Cx43 and Nav1.5 before the development of hypertrophy and fibrosis. However, despite the decrease in total Cx43 expression, the expression of the non-phosphorylated form of Cx43 was increased.³⁷ Non-phosphorylated Cx43 have been linked to loss of Cx43 aggregation in functional connexons.³⁸⁻⁴⁰ Interestingly, our study indicates that Cx43 organization is altered in *Scn5a*^{+/-} mice, Cx43 plaques appear to be smaller than in wild-type mice. We could hypothesize that Cx43 phosphorylation is decreased in *Scn5a*^{+/-} mice leading to a loss of aggregation into gap junctions and consequently to an increase in free Cx43 able to activate TGF- β pathway through microtubule interaction. One other hypothesis might implicate cardiac fibroblasts, which are known to play a key role in TGF- β -induced fibrotic process.⁴¹ Zhang *et al.*, showed that cardiac fibroblasts express Cx43 and that a reduction of Cx43 expression lead to an increase in fibroblast proliferation.⁴² Interestingly, Nav1.5 has been shown to interact with Cx43⁴³ particularly around the perinexus⁴⁴ and Cx43 knock-out mice show a decreased expression of Nav1.5.⁴⁵ Our results confirm the close relation between Nav1.5 and Cx43 expression and organization. Further studies are needed to understand the cooperative relationship between these two major actors of cardiac conduction in the context of cardiac fibrosis.

TGF- β receptor inhibition: a new therapeutic perspective for PCCD?

In order to demonstrate TGF- β implication into fibrotic process, we used GW 788388, a specific inhibitor of both type I and type II TGF- β receptors.^{46,47} Tan et al. showed that GW 788388 significantly reduced TGF- β activity and led to a reduction of ventricular remodeling and systolic dysfunction in a rat model of myocardial infarction.⁴⁸ It was also shown to prevent cardiac fibrosis in a mouse model of Chagas disease.⁴⁹ Interestingly, in this study, GW 788388 also prevented the down-regulation of Cx43 expression.⁴⁹ In our study, we observed that a 15-week treatment with GW 788388 prevented fibrotic development in *Scn5a*^{+/-} mice. This result not only confirms TGF- β pathway implication in fibrotic process in *Scn5a*^{+/-} mice but also paves the way to new therapeutic approaches for treating PCCD.

In conclusion, the present data show that ageing-related ventricular fibrotic process in *Scn5a*^{+/-} mice is linked to TGF- β signaling and activation of this pathway occur if and only if Nav1.5 membrane expression is reduced. This study provides experimental grounds to support that Nav1.5 forms multiproteins complexes with Nav1.5-interacting proteins. Through these complexes, which might implicate Cx43, Nav1.5 may exert a regulatory role in cellular biological processes additional to beyond its electrical function.

Acknowledgements

The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme FP7/2007-2013 under grant agreement No HEALTH-F2-2009-241526, EUTrigTreat. It was also supported by grants from the *Agence Nationale de la Recherche* (grant No ANR-12-BSV1-0013-01) and the *Genavie* foundation. The authors wish to thank Agnès Carcouet, Aurore Girardeau and Stéphanie Lemarchand for their expert technical assistance.

402"

403" **References**

- 404" 1. Mond HG, Proclemer A. The 11th world survey of cardiac pacing and implantable
405" cardioverter-defibrillators: calendar year 2009--a World Society of Arrhythmia's project.
406" *Pacing Clin Electrophysiol.* 2011;34:1013–1027.
- 407" 2. Lenègre J, Moreau P. [CHRONIC AURICULO-VENTRICULAR BLOCK. ANATOMICAL,
408" CLINICAL AND HISTOLOGICAL STUDY]. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 1963;56:867–888.
- 409" 3. Schott JJ, Alshinawi C, Kyndt F, Probst V, Hoorntje TM, Hulsbeek M, Wilde AAM, Escande
410" D, Mannens MM, Le Marec H. Cardiac conduction defects associate with mutations in
411" SCN5A. *Nat Genet.* 1999;23:20–21.
- 412" 4. Watanabe H, Koopmann TT, Le Scouarnec S, Yang T, Ingram CR, Schott J-J, Demolombe S,
413" Probst V, Anselme F, Escande D, Wiesfeld ACP, Pfeufer A, Käb S, Wichmann HE, Hasdemir
414" C, Aizawa Y, Wilde AAM, Roden DM, Bezzina CR. Sodium channel β 1 subunit mutations
415" associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans. *Journal of*
416" *Clinical Investigation.* 2008;118:2260–2268.
- 417" 5. Kruse M, Schulze-Bahr E, Corfield V, Beckmann A, Stallmeyer B, Kurtbay G, Ohmert I,
418" Schulze-Bahr E, Brink P, Pongs O. Impaired endocytosis of the ion channel TRPM4 is
419" associated with human progressive familial heart block type I. *Journal of Clinical*
420" *Investigation.* 2009;119:2737–2744.
- 421" 6. Liu H, Zein El L, Kruse M, Guinamard R, Beckmann A, Bozio A, Kurtbay G, Mégarbané A,
422" Ohmert I, Blaysat G, Villain E, Pongs O, Bouvagnet P. Gain-of-function mutations in TRPM4
423" cause autosomal dominant isolated cardiac conduction disease. *Circulation: Cardiovascular*
424" *Genetics.* 2010;3:374–385.
- 425" 7. Probst V. Haploinsufficiency in combination with aging causes SCN5A-linked hereditary
426" Lenègre disease. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41:643–652.
- 427" 8. Papadatos GA, Wallerstein PMR, Head CEG, Ratcliff R, Brady PA, Benndorf K, Saumarez
428" RC, Trezise AEO, Huang CLH, Vandenberg JI, Colledge WH, Grace AA. Slowed conduction
429" and ventricular tachycardia after targeted disruption of the cardiac sodium channel gene *Scn5a*.
430" *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:6210–6215.
- 431" 9. Leoni A-L, Gavillet B, Rougier J-S, Marionneau C, Probst V, Le Scouarnec S, Schott J-J,
432" Demolombe S, Bruneval P, Huang CLH, Colledge WH, Grace AA, Le Marec H, Wilde AAM,
433" Mohler PJ, Escande D, Abriel H, Charpentier F. Variable Nav1.5 Protein Expression from the
434" Wild-Type Allele Correlates with the Penetrance of Cardiac Conduction Disease in the
435" *Scn5a*^{+/-} Mouse Model. *PLoS ONE.* 2010;5:e9298.
- 436" 10. Royer A, van Veen TAB, Le Bouter S, Marionneau C, Griol-Charhbili V, Leoni A-L,
437" Steenman M, van Rijen HVM, Demolombe S, Goddard CA, Richer C, Escoubet B, Jarry-
438" Guichard T, Colledge WH, Gros D, de Bakker JMT, Grace AA, Escande D, Charpentier F.
439" Mouse model of SCN5A-linked hereditary Lenègre's disease: age-related conduction slowing
440" and myocardial fibrosis. *Circulation.* 2005;111:1738–1746.
- 441" 11. van Veen TAB, Stein M, Royer A, Le Quang K, Charpentier F, Colledge WH, Huang CLH,
442" Wilders R, Grace AA, Escande D, de Bakker JMT, van Rijen HVM. Impaired impulse
443" propagation in *Scn5a*-knockout mice: combined contribution of excitability, connexin
444" expression, and tissue architecture in relation to aging. *Circulation.* 2005;112:1927–1935.

- 445" 12. Chkourko HS, Guerrero-Serna G, Lin X, Darwish N, Pohlmann JR, Cook KE, Martens JR, 446" Rothenberg E, Musa H, Delmar M. Remodeling of mechanical junctions and of microtubule- 447" associated proteins accompany cardiac connexin43 lateralization. *Heart Rhythm*. 2012;9:1133– 448" 1140.e6.
- 449" 13. Gilda JE, Gomes AV. Stain-Free total protein staining is a superior loading control to β -actin 450" for Western blots. *Anal Biochem*. 2013;440:186–188.
- 451" 14. Lei M, Goddard C, Liu J, Leoni A-L, Royer A, Fung SS-M, Xiao G, Ma A, Zhang H, 452" Charpentier F, Vandenberg JJ, Colledge WH, Grace AA, Huang CLH. Sinus node dysfunction 453" following targeted disruption of the murine cardiac sodium channel gene *Scn5a*. *J Physiol* 454" (*Lond*). 2005;567:387–400.
- 455" 15. Kyndt F, Probst V, Potet F, Demolombe S, Chevallier JC, Baró I, Moisan JP, Boisseau P, 456" Schott JJ, Escande D, Le Marec H. Novel SCN5A mutation leading either to isolated cardiac 457" conduction defect or Brugada syndrome in a large French family. *Circulation*. 2001;104:3081– 458" 3086.
- 459" 16. de Bakker JM, van Capelle FJ, Janse MJ, Tasseron S, Vermeulen JT, de Jonge N, Lahpor JR. 460" Slow conduction in the infarcted human heart. "Zigzag" course of activation. *Circulation*. 461" 1993;88:915–926.
- 462" 17. Tusscher Ten KHWJ, Panfilov AV. Influence of diffuse fibrosis on wave propagation in human 463" ventricular tissue. *Europace*. 2007;9 Suppl 6:vi38–45.
- 464" 18. Pauschinger M, Doerner A, Remppis A, Tannhäuser R, Kühl U, Schultheiss HP. Differential 465" myocardial abundance of collagen type I and type III mRNA in dilated cardiomyopathy: effects 466" of myocardial inflammation. *Cardiovasc Res*. 1998;37:123–129.
- 467" 19. Lombardi R, Betocchi S, Losi MA, Tocchetti CG, Aversa M, Miranda M, D'Alessandro G, 468" Cacace A, Ciampi Q, Chiariello M. Myocardial collagen turnover in hypertrophic 469" cardiomyopathy. *Circulation*. 2003;108:1455–1460.
- 470" 20. Atorrasagasti C, Aquino JB, Hofman L, Alaniz L, Malvicini M, Garcia M, Benedetti L, 471" Friedman SL, Podhajcer O, Mazzolini G. SPARC downregulation attenuates the profibrogenic 472" response of hepatic stellate cells induced by TGF- β 1 and PDGF. *Am J Physiol Gastrointest* 473" *Liver Physiol*. 2011;300:G739–48.
- 474" 21. Au CG, Butler TL, Sherwood MC, Egan JR, North KN, Winlaw DS. Increased connective 475" tissue growth factor associated with cardiac fibrosis in the mdx mouse model of dystrophic 476" cardiomyopathy. *Int J Exp Pathol*. 2011;92:57–65.
- 477" 22. Yang M, Huang H, Li J, Huang W, Wang H. Connective tissue growth factor increases matrix 478" metalloproteinase-2 and suppresses tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 production 479" by cultured renal interstitial fibroblasts. *Wound Repair Regen*. 2007;15:817–824.
- 480" 23. Bozkaya YT, Aydin HH, Celik HA, Kayikcioglu M, Payzin S, Kultursay H, Aydin M, Yesil 481" M, Can LH, Hasdemir C. Increased myocardial collagen turnover in patients with progressive 482" cardiac conduction disease. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2008;31:1284–1290.
- 483" 24. Chen MM, Lam A, Abraham JA, Schreiner GF, Joly AH. CTGF expression is induced by 484" TGF- β in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis. *J Mol* 485" *Cell Cardiol*. 2000;32:1805–1819.
- 486" 25. Dendooven A, Gerritsen KG, Nguyen TQ, Kok RJ, Goldschmeding R. Connective tissue 487" growth factor (CTGF/CCN2) ELISA: a novel tool for monitoring fibrosis. *Biomarkers*.

- 488" 2011;16:289–301.
- 489" 26. Wang Q, Usinger W, Nichols B, Gray J, Xu L, Seeley TW, Brenner M, Guo G, Zhang W,
490" Oliver N, Lin A, Yeowell D. Cooperative interaction of CTGF and TGF- β in animal models of
491" fibrotic disease. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2011;4:4.
- 492" 27. McCurdy S, Baicu CF, Heymans S, Bradshaw AD. Cardiac extracellular matrix remodeling:
493" Fibrillar collagens and Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC). *J Mol Cell*
494" *Cardiol*. 2010;48:544–549.
- 495" 28. Hao X, Zhang Y, Zhang X, Nirmalan M, Davies L, Konstantinou D, Yin F, Dobrzynski H,
496" Wang X, Grace A, Zhang H, Boyett M, Huang CLH, Lei M. TGF- β 1-mediated fibrosis and ion
497" channel remodeling are key mechanisms in producing the sinus node dysfunction associated
498" with SCN5A deficiency and aging. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*.
499" 2011;4:397–406.
- 500" 29. Ugarte G, Brandan E. Transforming growth factor beta (TGF-beta) signaling is regulated by
501" electrical activity in skeletal muscle cells. TGF-beta type I receptor is transcriptionally
502" regulated by myotube excitability. *J Biol Chem*. 2006;281:18473–18481.
- 503" 30. Abriel H. Cardiac sodium channel Nav1.5 and interacting proteins: Physiology and
504" pathophysiology. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;48:2–11.
- 505" 31. Kaprielian RR, Gunning M, Dupont E, Sheppard MN, Rothery SM, Underwood R, Pennell DJ,
506" Fox K, Pepper J, Poole-Wilson PA, Severs NJ. Downregulation of immunodetectable
507" connexin43 and decreased gap junction size in the pathogenesis of chronic hibernation in the
508" human left ventricle. *Circulation*. 1998;97:651–660.
- 509" 32. La Vecchia L, Ometto R, Bedogni F, Finocchi G, Mosele GM, Bozzola L, Bevilacqua P,
510" Vincenzi M. Ventricular late potentials, interstitial fibrosis, and right ventricular function in
511" patients with ventricular tachycardia and normal left ventricular function. *Am J Cardiol*.
512" 1998;81:790–792.
- 513" 33. Kostin S, Rieger M, Dammer S, Hein S, Richter M, Klövekorn W-P, Bauer EP, Schaper J. Gap
514" junction remodeling and altered connexin43 expression in the failing human heart. *Mol Cell*
515" *Biochem*. 2003;242:135–144.
- 516" 34. Jansen JA, van Veen TAB, de Jong S, van der Nagel R, van Stuijvenberg L, Driessen H,
517" Labzowski R, Oefner CM, Bosch AA, Nguyen TQ, Goldschmeding R, Vos MA, de Bakker
518" JMT, van Rijen HVM. Reduced Cx43 Expression Triggers Increased Fibrosis Due to Enhanced
519" Fibroblast Activity. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*. 2012;5:380–390.
- 520" 35. Hirschi KK, Burt JM, Hirschi KD, Dai C. Gap junction communication mediates transforming
521" growth factor-beta activation and endothelial-induced mural cell differentiation. *Circ Res*.
522" 2003;93:429–437.
- 523" 36. Dai P, Nakagami T, Tanaka H, Hitomi T, Takamatsu T. Cx43 mediates TGF-beta signaling
524" through competitive Smads binding to microtubules. *Mol Biol Cell*. 2007;18:2264–2273.
- 525" 37. Fontes MSC, Raaijmakers AJA, van Doorn T, Kok B, Nieuwenhuis S, van der Nagel R, Vos
526" MA, de Boer TP, van Rijen HVM, Bierhuizen MFA. Changes in Cx43 and NaV1.5 expression
527" precede the occurrence of substantial fibrosis in calcineurin-induced murine cardiac
528" hypertrophy. *PLoS ONE*. 2014;9:e87226.
- 529" 38. Laird DW, Puranam KL, Revel JP. Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap
530" junction protein in cultured cardiac myocytes. *Biochem J*. 1991;273(Pt 1):67–72.

- 531" 39. Johnson KE, Mitra S, Katoch P, Kelsey LS, Johnson KR, Mehta PP. Phosphorylation on Ser-
532" 279 and Ser-282 of connexin43 regulates endocytosis and gap junction assembly in pancreatic
533" cancer cells. *Mol Biol Cell*. 2013;24:715–733.
- 534" 40. Solan JL, Lampe PD. Specific Cx43 phosphorylation events regulate gap junction turnover in
535" vivo. *FEBS Lett*. 2014;588:1423–1429.
- 536" 41. Leask A. TGFβ; cardiac fibroblasts, and the fibrotic response. *Cardiovasc Res*.
537" 2007;74:207–212.
- 538" 42. Zhang Y, Kanter EM, Laing JG, Aprhys C, Johns DC, Kardami E, Yamada KA. Connexin43
539" Expression Levels Influence Intercellular Coupling and Cell Proliferation of Native Murine
540" Cardiac Fibroblasts. *Cell Commun Adhes*. 2008;15:289–303.
- 541" 43. Malhotra JD. Tyrosine-phosphorylated and Nonphosphorylated Sodium Channel 1 Subunits
542" Are Differentially Localized in Cardiac Myocytes. *Journal of Biological Chemistry*.
543" 2004;279:40748–40754.
- 544" 44. Rhett JM, Ongstad EL, Jourdan J, Gourdie RG. Cx43 Associates with Na(v)1.5 in the
545" Cardiomyocyte Perinexus. *J Membr Biol*. 2012;245:411–22.
- 546" 45. Jansen JA, Noorman M, Musa H, Stein M, de Jong S, van der Nagel R, Hund TJ, Mohler PJ,
547" Vos MA, van Veen TA, de Bakker JM, Delmar M, van Rijen HV. Reduced heterogeneous
548" expression of Cx43 results in decreased Nav1.5 expression and reduced sodium current that
549" accounts for arrhythmia vulnerability in conditional Cx43 knockout mice. *Heart Rhythm*.
550" 2012;9:600–607.
- 551" 46. Gellibert F, de Gouville A-C, Woolven J, Mathews N, Nguyen V-L, Bertho-Ruault C, Patikis
552" A, Grygielko ET, Laping NJ, Huet S. Discovery of 4-{4-[3-(Pyridin-2-yl)-1 H-pyrazol-4-
553" yl]pyridin-2-yl}- N-(tetrahydro-2 H- pyran-4-yl)benzamide (GW788388): A Potent, Selective,
554" and Orally Active Transforming Growth Factor-β Type I Receptor Inhibitor. *J Med Chem*.
555" 2006;49:2210–2221.
- 556" 47. Petersen M, Thorikay M, Deckers M, van Dinther M, Grygielko ET, Gellibert F, de Gouville
557" AC, Huet S, Dijke ten P, Laping NJ. Oral administration of GW788388, an inhibitor of TGF-β
558" type I and II receptor kinases, decreases renal fibrosis. *Kidney Int*. 2007;73:705–715.
- 559" 48. Tan SM, Zhang Y, Connelly KA, Gilbert RE, Kelly DJ. Targeted inhibition of activin receptor-
560" like kinase 5 signaling attenuates cardiac dysfunction following myocardial infarction. *Am J*
561" *Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;298:H1415–H1425.
- 562" 49. de Oliveira FL, Araújo-Jorge TC, de Souza EM, de Oliveira GM, Degraive WM, Feige J-J,
563" Bailly S, Waghbi MC. Oral Administration of GW788388, an Inhibitor of Transforming
564" Growth Factor Beta Signaling, Prevents Heart Fibrosis in Chagas Disease. *PLoS Negl Trop*
565" *Dis*. 2012;6:e1696.

566"

Figure legends

Figure 1. Fibrosis development with age in *Scn5a*^{+/-} mice. A. Representative left ventricular sections stained with picrosirius red from 10-60 week-old wild-type mice (WT) and *Scn5a*^{+/-} mice with mild and severe phenotype. Scale bar: 50 μ m. **B.** Quantification of fibrosis (% of collagen per histological section) as a function of age. Means $\pm$ sem of 5 mice per group. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ *versus* WT.

Figure 2. Assessment of cardiac function by echocardiography performed on 16-week-old and 60-week-old wild-type (WT) and *Scn5a*^{+/-} mice. The structural remodeling and the systolic and diastolic functions were assessed respectively by Two-dimensional (2-D) echocardiography and pulsed Doppler (For 16 weeks-old mice: WT $n=23$, *Scn5a*^{+/-} mild $n=10$ and *Scn5a*^{+/-} severe $n=12$; For 60 weeks old: WT $n=6$, n for *Scn5a*^{+/-} mild $n=7$ and *Scn5a*^{+/-} severe $n=6$; * $p < 0.05$, data are expressed as mean $\pm$ SEM).

Figure 3. Connexin43 (Cx43) remodeling in *Scn5a*^{+/-} mice. A. Cx43 ventricular expression as a function of age in wild-type (WT) mice. **B.** Cx43 ventricular expression in 30- and 60-week-old *Scn5a*^{+/-} mice. Top, representative western blots; bottom, corresponding quantification of Cx43 expression was performed on Western blots from 6 mice per group by normalizing the intensities of the Cx43 bands to the GAPDH bands. ** $p < 0.01$ *versus* 20, 30 and 45 weeks; *** $p < 0.001$ *versus* WT. **C.** Cx43 ventricular expression and localization in 30- and 60-week-old WT and *Scn5a*^{+/-} mice. The square image is a representative confocal image of Cx43 in left ventricular sections from WT and 30- and 60-week-old *Scn5a*^{+/-} mice. The rectangular image is a magnification of an intercalated disc. Scale bars: 50 μ m. **D.** Quantification (in arbitrary units) of overall Cx43 left ventricular expression in left bar graph, Cx43 subcellular distribution in the two middle bar graphs. Bars represent average sizes of Cx43 clusters expressed as area/length ratio (see methods section) in intercalated discs and lateral membranes, respectively. The bar graph on the right shows the average percentage of Cx43 expressed in intercalated discs. Means $\pm$ sem of 4 mice per group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *versus* WT; §§§ $p < 0.001$ *versus* 30 weeks.

Figure 4. Signaling pathways involved in fibrosis development in *Scn5a*^{+/-} mice. Nav1.5, TGF- β (Transforming growth factor β), SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine), CTGF (Connective Tissue Growth Factor), P-Smad2/3 (phospho-Smad2/3) and Smad2/3 ventricular expression in 30- and 45-week-old wild-type (WT) and *Scn5a*^{+/-} mice with mild and severe QRS prolongation. Right: representative western blots; left: corresponding quantification performed on Western blots by normalizing the intensities to the GAPDH bands. Means $\pm$ sem of 6 mice per group.* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ *versus* WT.

Figure 5. Inhibition of transforming growth factor- β type I receptor by GW 788388 prevents fibrosis remodeling in *Scn5a*^{+/-} mice. A. Representative left ventricular sections stained with picrosirius red from 60 week-old wild-type mice (WT) and *Scn5a*^{+/-} mice treated with GW 788388 (5 mg/kg/day) during 15 weeks. Scale bar: 50 μ m. The bar graph on the right shows quantification of fibrosis (% of collagen per histological section). Means $\pm$ sem of 4 WT mice and 5 *Scn5a*^{+/-} mice treated with GW 788388. **B.** TGF- β expression in 60-week-old wild-type (WT) and *Scn5a*^{+/-} mice treated with GW 788388. The bar graph on the right shows quantification of TGF- β expression obtained by normalizing the intensities to the GAPDH bands. Mean $\pm$ sem of 3 WT mice and 6 *Scn5a*^{+/-} treated mice. * $p < 0.05$ *versus* WT.

Figure 6: Effects of chronic inhibition of Nav1.5 on ventricular conduction, contractile function and fibrosis. A. Upper panel: representative lead I ECGs from wild-type (WT) mice treated with placebo or flecainide (50 mg/kg/day) at the ages of 20 and 60 weeks. Scale bar: 100 ms. Lower panel: average QRS interval duration as a function of age. QRS values in *Scn5a*^{+/-} mice with a mild phenotype are given for comparison. Means $\pm$ sem of 13 20-week-old, 14 30-week-old and 13 60-week-old placebo-treated mice, in flecainide 50 20-week-old, 29 30-week-old and 11 60-week-old flecainide-treated mice and 175 20-week-old, 130 30-week-old and 43 60-week-old *Scn5a*^{+/-} mice with mild QRS complex prolongation. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ *versus* placebo. **B.** Echocardiographic parameters in 60-week-old mice treated with placebo (n = 11) or flecainide (n = 10). **C.** Left panel: representative left ventricular sections from 60-week-old mice treated with placebo or flecainide

623" stained with picrosirius red. Scale bar: 50 μ m. Right panel: quantification of fibrosis (% of collagen
 624" per histological section) as a function of age. Means $\pm$ sem of 4 placebo- and 5 flecainide-treated mice.
 625" **D.** Cx43, Nav1.5, TGF- β and CTGF expression in 60-week-old mice treated with placebo or
 626" flecainide. Both representative Western blots and bar graphs for quantification are shown.
 627" Quantification was obtained by normalizing the intensities of Cx43, Nav1.5, TGF- β and CTGF bands
 628" to the GAPDH bands. Means $\pm$ sem of 5 mice per group.

629"

630"

631"

632"

633"

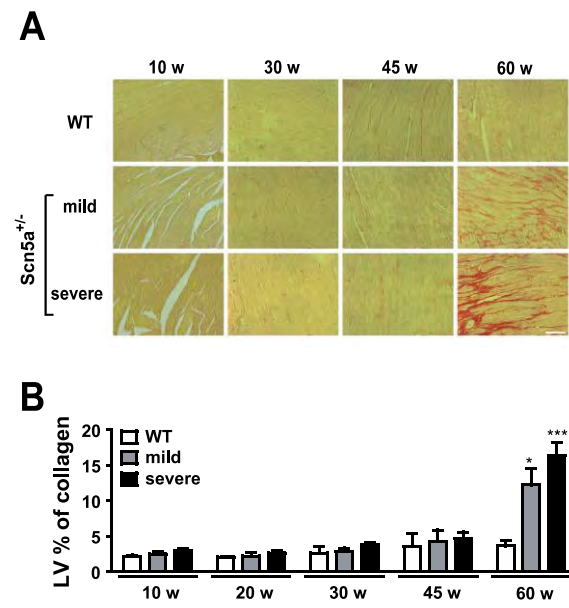


Fig. 1

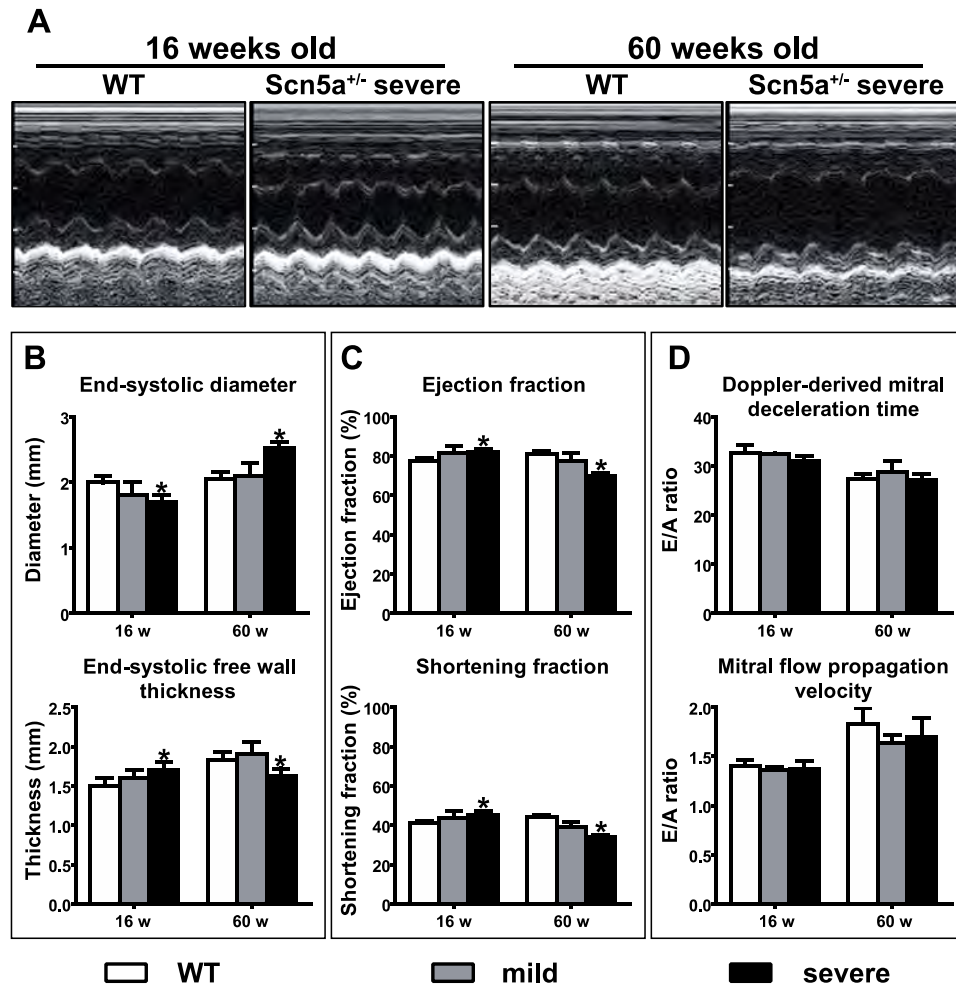


Fig. 2

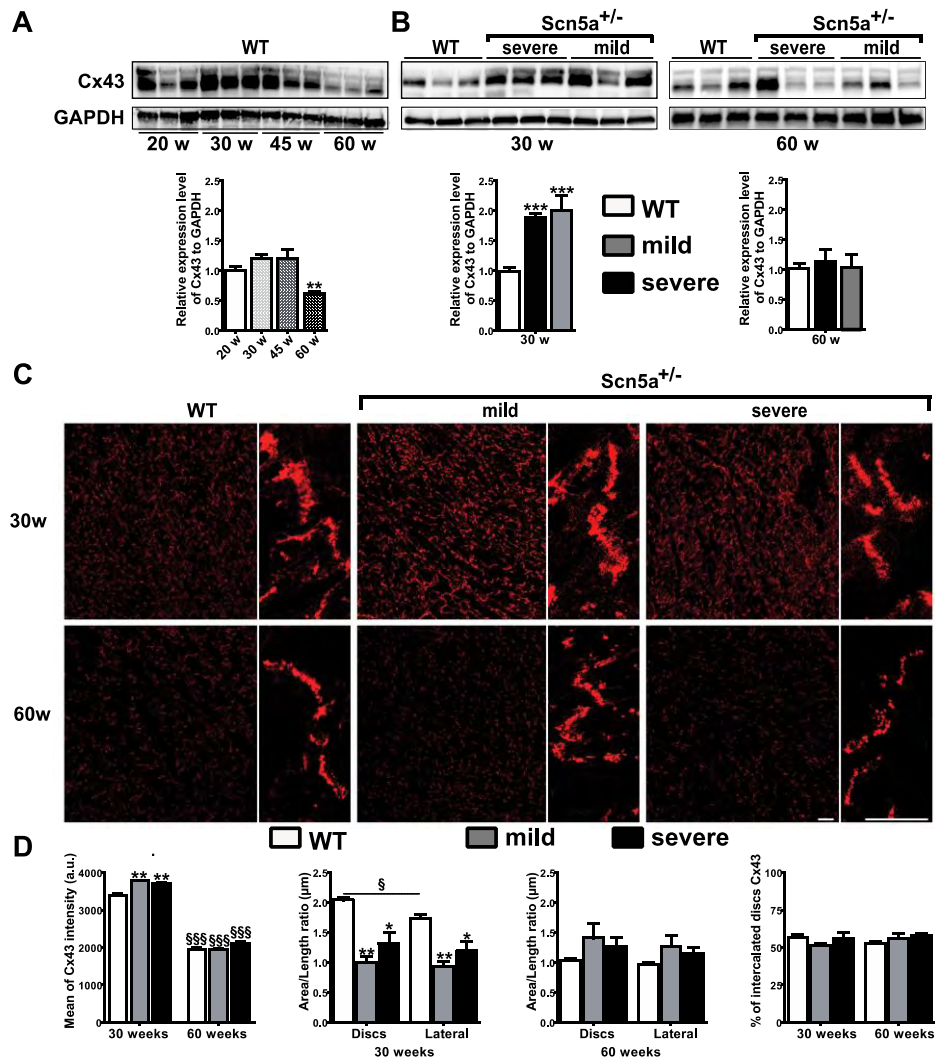


Fig. 3

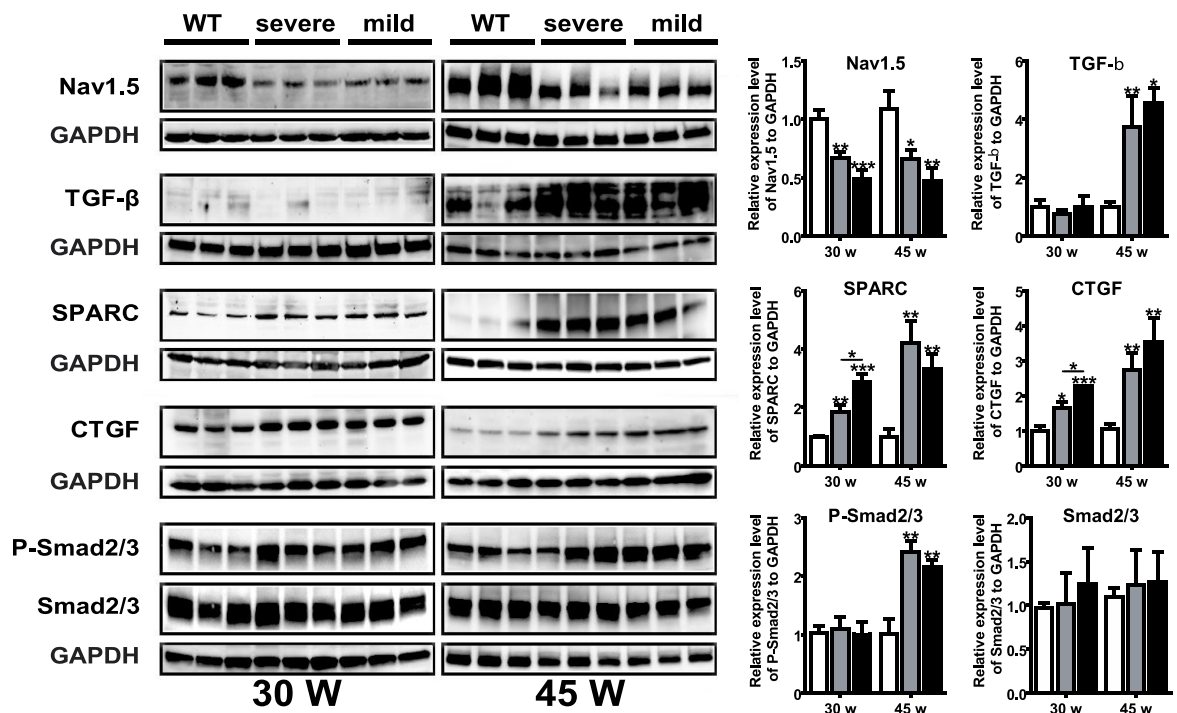


Fig. 4

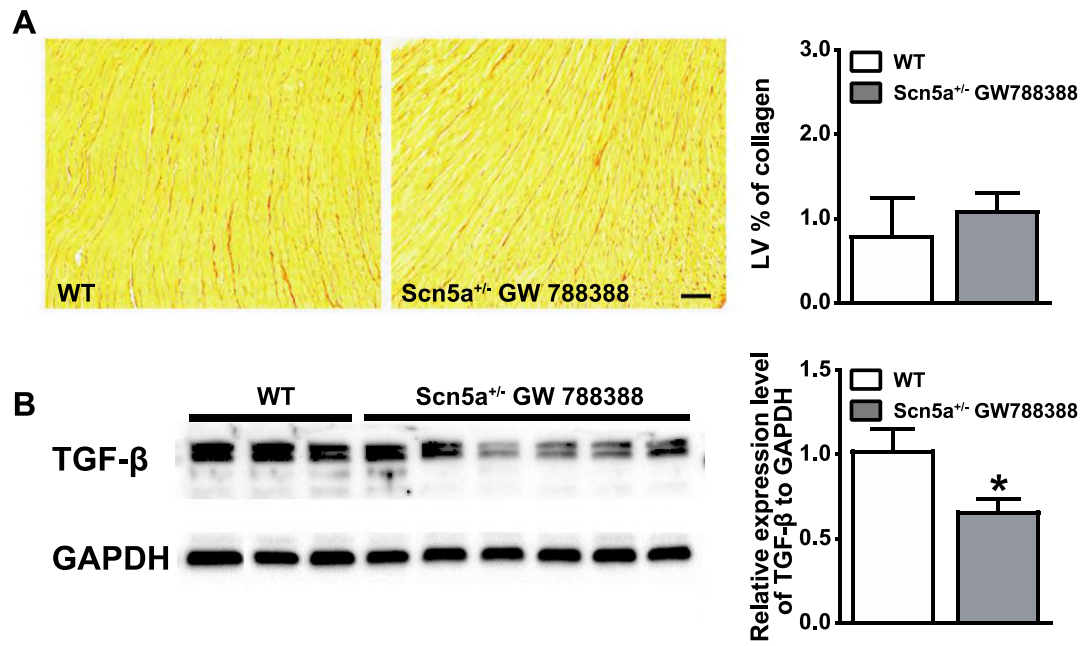


Fig. 5

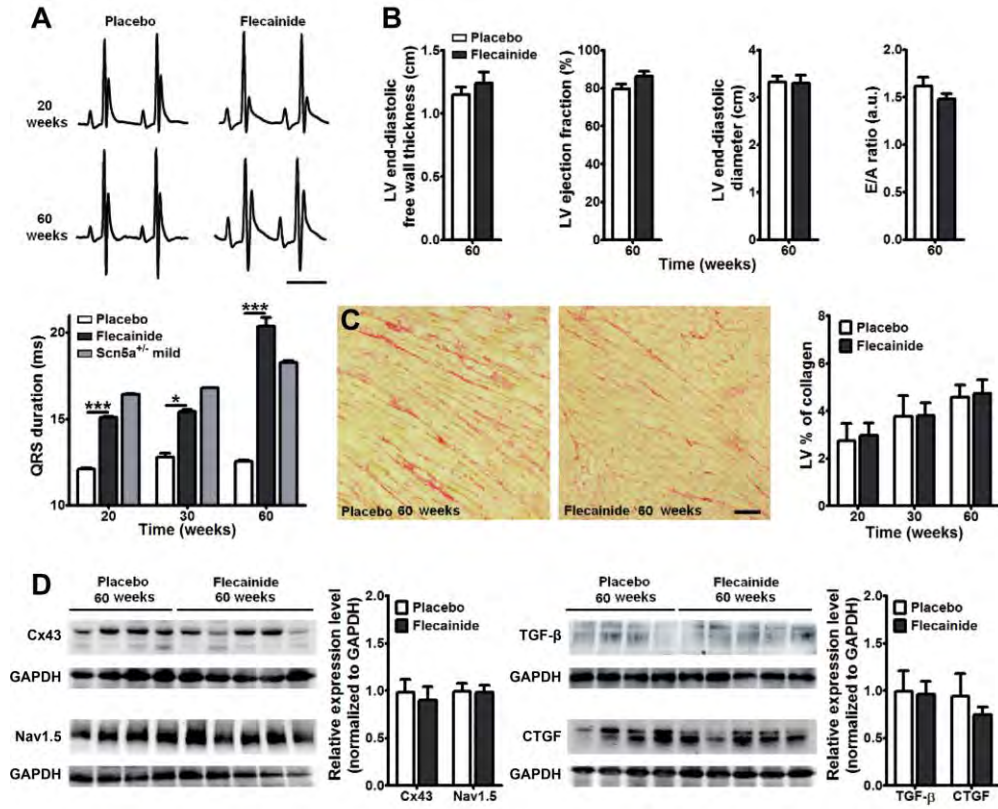


Fig. 6

Age-dependent development of ventricular fibrosis in the *Scn5a*^{+/-} mouse model is triggered by activation of TGF- β pathway

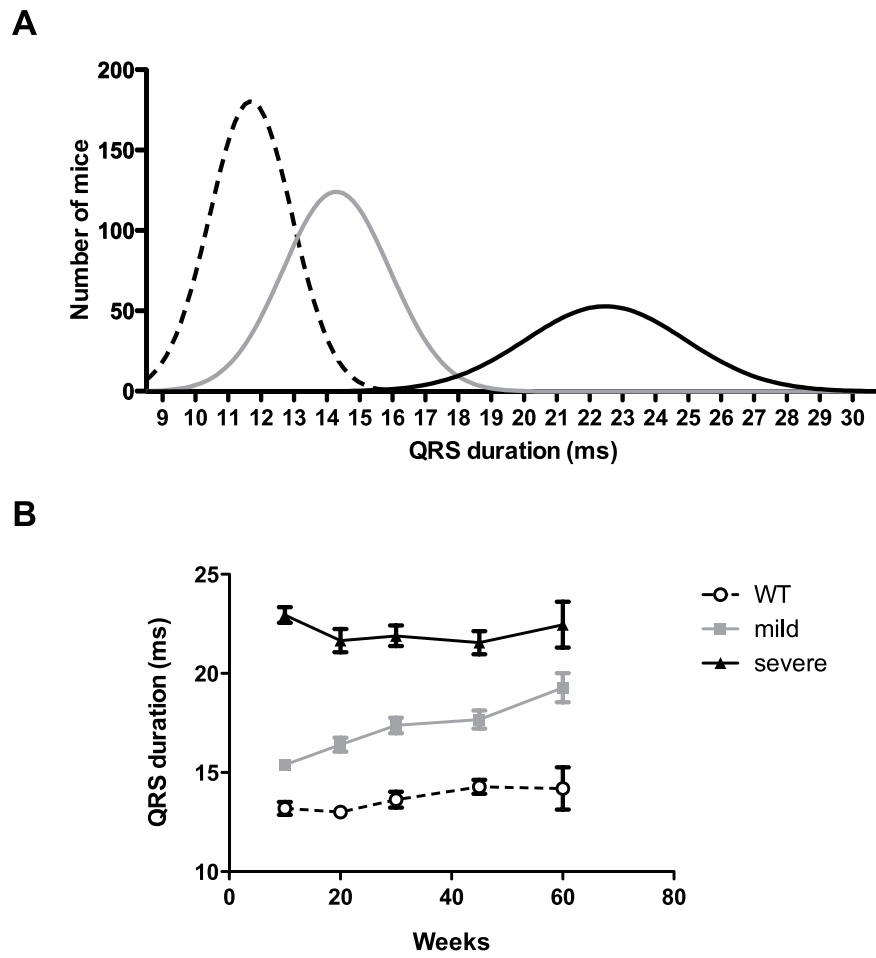
Mickael Derangeon,^{1-3*} Jérôme Montnach,^{1-3*} Cynthia Ore Cerpa,¹⁻³ Gilles Toumaniantz,¹⁻³ Benoit Jagu,¹⁻³ Christopher LH Huang,⁴ William H. Colledge,⁴ Andrew A Grace,⁴ Isabelle Baró,¹⁻³ Flavien Charpentier^{1-3§}

Online data supplement

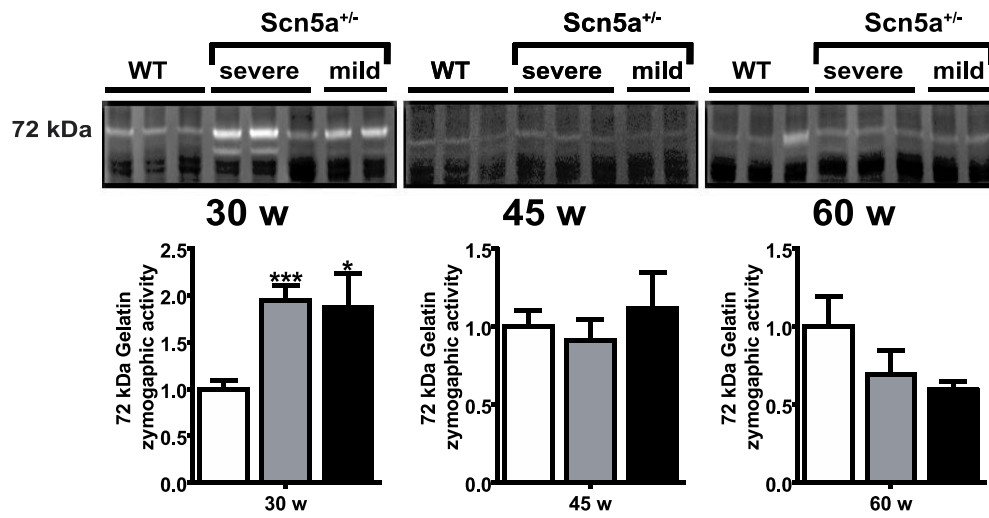
Supplemental figure legends

Supplemental figure 1: Variable degrees of ventricular conduction defects in *Scn5a*^{+/-} mice. **A.** Distribution of QRS interval duration with corresponding Gaussian fits in 10 week-old wild-type (WT; white bars) and *Scn5a*^{+/-} mice with mild (grey bars) and severe (black bars) QRS complex prolongation. **B.** Effects of age (X-axis) on QRS interval duration (Y-axis) in WT mice (open circles) and *Scn5a*^{+/-} mice with mild (filled squares) and severe (filled triangles) phenotype.

Supplemental figure 2: Activation of 72 kDa Gelatin Matrix Metalloproteinase. Top, representative zymographie gels; bottom, corresponding quantification. Means $\pm$ sem of 6 mice per group. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ vs. WT.



Suppl. Fig. 1



Suppl. Fig. 2

Projet 2 – Caractérisation du modèle murin *Scn5a*^{+/ Δ QKP} comme nouveau modèle d'étude du syndrome du QT long de type 3 et du remodelage protéique associé.

1 INTRODUCTION

La mutation Δ QKP sur le canal Nav1.5, codé par le gène *SCN5A* a été associée à un allongement de l'intervalle QT, le syndrome du QT de type 3, mais aussi à des troubles de la conduction cardiaque, une cardiomyopathie dilatée et des épisodes de mort subite prématurée. Cette mutation a été montrée comme n'affectant pas la densité de courant sodique au pic mais induit une augmentation du courant sodique persistant dans un modèle de réexpression hétérologue.

Afin de comprendre les mécanismes reliant la mutation Δ QKP et la cardiomyopathie dilatée observée chez les patients, nous avons développé un modèle murin hétérozygote pour la mutation en association avec la société PolygenAG au sein du réseau EuTrigTreat (souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP}). Cette étude est basée sur 4 groupes de souris : les souris homozygotes sauvages (*Scn5a*^{+/+}), homozygotes avec la présence du gène codant pour la Flippase (*Scn5a*^{+/+ Flp}), hétérozygotes avec la cassette de sélection Néomycine dans l'intron précédant la délétion (*Scn5a*^{+/ Δ Neo}) et les souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP}.

Les souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP} sont un nouveau modèle d'étude pour le syndrome du QT long de type 3 en associant un allongement de l'intervalle QT, des épisodes arythmiques marqués et une mortalité prématurée. En plus de ces caractéristiques électrophysiologiques, nous avons montré que ces souris développaient une insuffisance cardiaque droite et gauche en association avec un remodelage de l'expression des protéines impliquées dans le cycle du calcium. Nous avons aussi montré que la Ranolazine pouvait être utilisé pour traiter les arythmies et l'allongement de l'intervalle QT dans ce modèle murin en aigu.

2 ARTICLE

***Scn5a*^{+/ Δ QKP1510-1512} mice: a new model for long QT syndrome type 3 associated with cardiac dysfunction and early mortality**

Jérôme Montnach,¹⁻³ Franck Chizelle,¹⁻³ Nadjat Belbachir,¹⁻³ Agnès Carcouet,¹⁻³ Isabelle Baró,¹⁻³ Flavien Charpentier^{1-3§}

¹ INSERM, UMR1087, l'institut du thorax, Nantes, F-44000 France

² CNRS, UMR6291, Nantes, F-44000 France

³ Université de Nantes, Nantes, F-44000 France

§ Address for correspondence:

Flavien CHARPENTIER

l'institut du thorax

Inserm UMR1087, CNRS UMR6291

IRS-UN, 8 quai Moncousu

44007 Nantes cedex 1, France

E-mail: flavien.charpentier@inserm.fr

Tel. +33 228 08 01 10, Fax. +33 228 08 01 30

Manuscrit en préparation

Abstract

Background. Deletion of QKP1507-1509 amino-acids in *SCN5A* gene product, the Nav1.5 voltage-gated Na⁺ channel, has been associated with a large phenotypic spectrum of type 3 long QT syndrome (LQT3), conduction disorder, dilated cardiomyopathy (DCM) and high incidence of youth sudden death. This mutation was shown to increase the late Na⁺ current. In order to identify the mechanism of DCM in these patients, we generated a knock-in mouse model presenting the delQKP1510-1512 mutation (*Scn5a*^{+/ Δ QKP}), equivalent to human QKP1507-1509 mutation. **Methods and results.** Four groups of mice were studied: homozygous wild-type (*Scn5a*^{+/+}), heterozygous *flp deleter* (*Scn5a*^{+/+}-Flp), heterozygous neomycin- Δ QKP (*Scn5a*^{+/ Δ QKP}/Neo) and *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice. *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice showed long QT syndrome (QTc = 73.8 $\pm$ 2.7 *versus* 47.7 $\pm$ 0.4; *P*<0.001) and conduction defects associated with ventricular arrhythmias (48/102 mice) and premature mortality (median survival: 5.4 weeks). Atrial and ventricular action potentials from *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice were prolonged compared to *Scn5a*^{+/+} mice. *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice presented right and left ventricular dysfunction. They also exhibited molecular remodeling of Ca²⁺ handling proteins. CaMKII expression and phosphorylation were decreased, leading to a decreased expression of the p(Thr17) phosphorylated form of phospholamban. In contrast, expression of the Na/Ca exchanger was increased.. Ranolazine injection (30 mg/kg IP) normalized the QT interval in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice and suppressed arrhythmias. **Conclusions.** *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice recapitulate a large part of the diverse clinical phenotype of patients carrying the equivalent mutation, including QT prolongation, ventricular arrhythmias and DCM. The phenotype results not only from the late Na⁺ current but also from secondary remodeling of Ca²⁺ handling proteins.

Key words: Scn5a, long QT syndrome, dilated cardiomyopathy, arrhythmias

Introduction

Long-QT syndrome (LQTS) is a severe disorder of cardiac electrical activity. It is caused by delayed repolarization in cardiomyocytes, which results in a prolonged QT interval on the ECG and an increased susceptibility to polymorphic ventricular tachycardia and ventricular fibrillation. Mutations in genes encoding ion channels or their accessory subunits are linked to different types of LQTS.¹ Approximately 90% of LQTS mutations are in *KCNQ1* (LQT1), *KCNH2* (LQT2) and *SCN5A* (LQT3) genes. Mutations in *SCN5A*-encoded Nav1.5 cardiac Na⁺ channel commonly alter the fast inactivation process of the channel. Normally, Nav1.5 channels activate to initiate the action potential of highly polarized cardiomyocytes and inactivate rapidly so that they do not conduct any current during the repolarization phase of the action potentials. LQT3 mutations result in a marked slowing of Nav1.5 inactivation and/or the occurrence of a persistent inward Na⁺ current that prolongs the action potentials.^{2,3}

Deletion of the QKP amino acid residues at positions 1507–1509, close to the "historical" Δ KPQ1505-1507 deletion,⁴ has been identified in two families^{5,6} and found to be associated not only to LQT3 syndrome but also to a larger phenotypic spectrum including conduction disorder, dilated cardiomyopathy (DCM) and a high incidence of youth sudden death.⁶ *In vitro* experiments revealed that Δ QKP1507-1509 mutation induces a late Na⁺ current.⁵ To characterize the effects of this mutation in a physiological environment, we have generated a knock-in mouse model carrying the mouse equivalent (Δ QKP1510-1512) of the human *SCN5A*- Δ QKP1507-1509 mutation. Heterozygous *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice share common features with patients, including long QT interval, ventricular arrhythmias, heart failure and increased risk of sudden death at a young age. We found that the mutation induces secondary altered expression of key Ca²⁺ handling proteins, which could be implicated in the observed ventricular dysfunction. Acute treatment with the late Na⁺ current inhibitor ranolazine shortens the QT interval and suppresses arrhythmias with no effects on ventricular conduction, suggesting that it could be appropriate to be used in patients carrying the Δ QKP1507-1509 mutation.

Methods

Generation of *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice

All animal experiments were performed in the animal facility of Nantes University Health Research Institute (*UTE – IRS-UN*) and the *institut du thorax* which have been accredited by the French Ministry of Agriculture. Experimental procedures were approved by the regional ethic committee (*CEEA – Pays de la Loire*).

We used Flp/FRT-mediated targeting to delete residues 1510–1512 (KPQ) in the *Scn5a* gene (Suppl. Fig. 1A). For selecting transfected cells, a neomycin resistance cassette was present on the targeting vector, and was cointroduced in *cis*. The selection cassette was later eliminated by Flp recombination upon breeding with germ line Flp expressing mice (“Flp deletors”). This is possible because the neomycin cassette is flanked by appropriate recombination sites (FRT sites). Four chimeric male were born from the injection of blastocysts with *SCN5A* ^{Δ QKP} targeted ES-cell clones. They were set up with Flp deletors and agouti offspring were derived from all four matings. All mice were bred in the animal facility and genotyped by polymerase chain reaction (PCR, Suppl. Fig. 1B).

Western blot analysis

Protein samples were prepared from right and left ventricular free walls. Tissues were snap-frozen in liquid nitrogen, homogenized in ice-cold lysis buffer containing (in mMol/L): NaCl, 100, Tris-HCl, 50, EGTA, 2, 1% NP40 and protease inhibitors (pH 7.5 with NaOH) and centrifuged at 1000 x g for 15 minutes. Forty micrograms of proteins separated on SDS-PAGE gels (4-15% Mini-PROTEAN[®] TGX Stain-Free[™] Precast Gels, Bio-rad, France) and transferred on Nitrocellulose membranes (Trans-Blot[®] Turbo[™] Nitrocellulose Transfer Packs, Bio-rad, France). Membranes were blocked and incubated with primary antibodies targeted against Nav1.5 (ASC-005, Alomone Labs; 1:500), SERCA2 (PA5-29380 Thermo Scientific; 1:2000), Na⁺/Ca²⁺ exchanger NCX1 (Santa Cruz Biotechnology; 1:1000), CaMKII

(PA5-22168 ThermoScientific; 1:1000), p-CamKII (MA1-047 Thermo Scientific; 1:2000), phospholamban (PLB; Santa Cruz Biotechnology; 1:1000), p(Thr17)-PLB (Santa Cruz Biotechnology; 1:5000), p(Ser16)-PLB (Santa Cruz Biotechnology; 1:5000), calcineurin (CaN; 610259 BD Transduction Lab.; 1:1000), type 2 ryanodine receptor (RyR2; MA3-925 Thermo Scientific; 1:2000). In addition, an anti-GAPDH antibody (Santa-Cruz Biotechnologies; 1:10000 dilution) was used as an external/internal control. Next, membranes were incubated with the *ad hoc* secondary horseradish peroxidase (HRP) antibody (Santa Cruz; 1:10000). Incubation was followed by detection using chemiluminescence (ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare AmershamTM, UK). Western-blot quantification was performed with ImageJ 1.45b software (NIH Software).

Electrocardiography

Mice were anaesthetized with isoflurane (Abbott Laboratories, USA) for ECG recording. Anesthetic induction was achieved at 2% to 2.5% isoflurane for 2.5 to 3 min, and anesthesia was maintained at 0.8% to 1.0%. Body temperature was maintained at 37°C with a heating pad (Harvard Apparatus, USA). Six-lead ECG was recorded with 25-gauge subcutaneous electrodes on a computer through an analog-digital converter (IOX 1.585, EMKA Technologies, France) for monitoring and later analysis (ECG Auto v3.2.0.2, EMKA Technologies). ECGs were analyzed as previously described.⁷ QT intervals were corrected for heart rate using a modified Bazett formula, $QT_c = QT/(RR/100)^{1/2}$, with QT and RR measured in ms.

Morphological and histological analysis

Mice were euthanized by cervical dislocation and lungs, liver and heart were isolated. Lung weight/tibia length and heart weight/tibia length ratios were determined. Then, the heart, lungs and liver were washed with PBS, fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Serial sections of 5 μ m were cut and stained with haematoxylin/eosin as previously described.⁸ Sections were examined with a classic light microscope (Nikon Eclipse E-600) and acquired with NIS-Elements software (v4.10, Nikon, Japan).

Action potential recordings

For these experiments, 10 *Scn5a*^{+/+} and 17 *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice of either sex were used at the age of 4 weeks. After euthanasia by cervical dislocation, the heart was quickly removed and immersed in a cold modified Tyrode solution containing (in mMol/L): NaCl, 108; NaH₂PO₄, 1.8; NaHCO₃, 25; KCl, 27; MgCl₂, 1; CaCl₂, 0.6; glucose, 55 (pH 7.4 with 5% CO₂). After careful dissection, left atrial or right ventricular free wall was mounted in a tissue bath chamber, the endocardial surface facing up, and superfused with a Tyrode solution, bubbled with 95% O₂-5% CO₂ gas mixture, warmed to 37 ± 0.5°C and containing (in mMol/L): NaCl, 120; NaHCO₃, 27; NaH₂PO₄, 1.2; KCl, 5.4; MgCl₂, 1.2; CaCl₂, 1.8; glucose, 10 (pH 7.4 with 5% CO₂). The flow rate in the tissue chamber was 12 ml/min. Preparations were paced with 2-ms square wave pulses with amplitude of twice diastolic threshold through bipolar Teflon-coated silver electrodes. Action potentials (AP) were recorded with borosilicate glass microelectrodes (resistances 15–25 MΩ when filled with 3 mol/L KCl) coupled to a VF102 amplifier (BioLogic, France), digitized with an EMKA-converter, and displayed with iox 1.8.0.18 software (10 kHz sampling, EMKA Technologies). APs were recorded at a pacing cycle length of 200 ms. AP characteristics were measured at steady state. We measured the resting potential (RP), the AP amplitude (APA), the maximum upstroke velocity of phase 0 of the AP (dV/dt_{max}) and the AP duration at 30% (APD₃₀), 50% (APD₅₀), 70% (APD₇₀) and 90% (APD₉₀) of full repolarization. This protocol was performed under baseline conditions and after 10 min of superfusion with ranolazine (Tocris Bioscience, UK) at a concentration of 10 μmol/L. This concentration was chosen on the basis of comparative pharmacological data published in mammalian heterologous expression system⁹ and on *Scn5a*^{+/ Δ KPQ} mice.¹⁰

Patch-clamp experiments

Isolation of cardiomyocytes. Four-week-old mice were heparinized (600 IU/kg i.p.) and killed by cervical dislocation. The hearts were quickly excised and the aorta were cannulated in cold Tyrode solution containing (in mMol/L): NaCl, 135; KCl, 4; NaH₂PO₄, 1.2; CaCl₂, 1.8; MgCl₂, 1.2; glucose, 11; HEPES,

10 (pH 7.4 with NaOH), and perfused for 2 minutes in a Langendorff system (37°C) with the same solution. Next, the heart was perfused for 2 minutes with a similar solution without calcium. After this, 0,15 mg/mL collagenase II (350 U/mg, Worthington) and 0,03 mg/mL protease XIV (4.7 U/mg, Sigma) were added to the low-calcium solution (0.1 mMol/L) for 7-11 minutes. Stop solution (Tyrode solution with 0.15 mMol/L CaCl₂) was perfused for 2 minutes and digested heart was gently triturated in the same solution. Isolated cells were washed in this solution and calcium concentration was progressively increased to 1 mMol/L. Quiescent, rod-shaped cells with clear cross-striations and smooth surface were selected for current measurements.

Electrophysiological recording. Whole-cell voltage-clamp technique was used for recording membrane currents. Persistent sodium current was measured at room temperature as the 30 μ mol/L tetrodotoxin-sensitive current during a descending voltage-clamp ramp protocol consisting of a 200-ms prepulse to +40 mV followed by a 1000-ms descending voltage ramp to -120 mV. The bath solution contained (in mmol/L) NaCl, 140; CsCl, 5; CoCl₂, 2.5; MgCl₂, 2; glucose, 5; HEPES, 10 and mannitol, 20; (pH 7.4 with CsOH). The pipette solution was filled with (in mmol/L): CsCl, 50; CaCl₂, 1; Na₂-pyruvate, 5; MgCl₂, 3; Na₂ATP, 2.5; CoCl₂, 2.5; gluconic acid, 45; EGTA, 10; HEPES, 10; (pH 7.2 with CsOH).

***In vivo* ranolazine treatment**

For these experiments, 14 *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice were used at the age of 3 weeks. Baseline ECG was recorded for 2 min before intraperitoneal (IP) injection of ranolazine (30 mg/kg)¹¹ and measurements were acquired for 10 min post-drug administration. Maximum effect on ECG parameters was measured and compared to ECG parameters before drug administration.

Statistics

Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. Statistically significant differences between mean values were determined with either Mann-Whitney U test for comparison of two groups. Statistical analysis was made with Prism5 (GraphPad Software, Inc). For more than two groups, 1-way ANOVA or Kruskal-Wallis test

173 was performed with Bonferroni or Dunns post-test when appropriate. For percentage comparison, Fisher
 174 exact test was used. Wilcoxon test was used to compare paired values. A *P* value of 0.05 was considered
 175 to indicate significance.

176

Results

***Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice characteristics**

Heterozygous *Scn5a*^{+/ Δ QKP} offspring were born at a Mendelian frequency. At weaning (at the age of 3 weeks), they presented a small but significant decrease in body weight (10.83 ± 0.17 g; n = 72) compared to *Scn5a*^{+/+} mice (11.87 ± 0.18 g; n = 113; $P < 0.01$; Suppl. Fig. 1C). *Scn5a*^{+/+}-*Flp* and *Scn5a*^{+/*Neo*} mice developed normally. Western blot analysis showed no appreciable difference in ventricular expression of Nav1.5 protein between *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice and *Scn5a*^{+/+} mice (Suppl. Fig. 2). However, *Scn5a*^{+/*Neo*} mice presented a »50% decrease in Nav1.5 expression in both right and left ventricles compared to *Scn5a*^{+/+} mice (Suppl. Fig. 2).

Electrocardiographic phenotype

Figure 1A depicts representative examples of ECG recordings in 3-week-old anesthetized mice. Only about 20% (22/102) of *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice were in sinus rhythm. In these mice, RR interval did not differ from RR interval in the other groups (Table 1). However, a marked prolongation of QT and QTc intervals was observed in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice in sinus rhythm compared to *Scn5a*^{+/+} mice (Fig. 1B and Table 1). Spontaneous episodes of monomorphic and polymorphic ventricular premature beats and/or tachycardia (PVB) were observed in 48 of 102 *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice during 2-minute ECG recording periods, whereas this was observed in one out of 142 *Scn5a*^{+/+} and one out of 114 *Scn5a*^{+/*Neo*} mice, only (Fig. 1D). Ventricular repolarization was prolonged in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice compared to *Scn5a*^{+/+} mice. It was also moderately, though significantly, prolonged in *Scn5a*^{+/*Neo*} mice. In addition, atrio-ventricular conduction was significantly slowed in these mice (Fig. 1B and Table 1). However, no change in atrial conduction was observed in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} and *Scn5a*^{+/*Neo*} mice (Table 1). As mentioned above, most *Scn5a*^{+/ Δ QKP} exhibited rhythm disorders. Indeed, second-degree atrio-ventricular block (AVB) occurred in 32 of 102 *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice (Fig. 1C) and one event of lethal ventricular fibrillation was recorded at 4 weeks of age in a

Scn5a^{+/ Δ QKP} mouse (Fig. 1E). Thus, ventricular repolarisation is altered in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice with markedly prolonged QT interval leading to AVB and potentially lethal ventricular arrhythmias.

Histological evidence of abnormal cardiac dysfunction and premature mortality in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice

Scn5a^{+/ Δ QKP} mice present signs of right and left cardiac dysfunction. Heart weight/tibia length ratio was significantly increased in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice (12.32 ± 1.24 , n = 13) compared to *Scn5a*^{+/+} mice at 4 weeks old (*Scn5a*^{+/+}: 7.14 ± 0.13 n = 11; $P < 0.001$, Kruskal-Wallis test; Fig. 2A). Morphological examinations of whole hearts and longitudinal sections from *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice indicated increased chamber dimensions compared to all other three groups at 4 weeks of age. *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice displayed typical symptoms of congestive heart failure. Indeed, the atria of *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice frequently contained organized thrombi (Fig. 2A). Lung weight/tibia length ratio was increased in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice (10.54 ± 0.68 , n = 13) compared to *Scn5a*^{+/+} mice (7.73 ± 0.27 , n = 14; $P < 0.001$, Kruskal-Wallis test). However, there was no pulmonary congestion or oedema in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice. Regarding the right ventricular dysfunction, no significant alteration of the liver weight / tibia length was detected between all four groups of mice (data not shown). However, histological analysis showed chronic congestive liver with blood stasis in the capillary vessels between centroglobular and periglobular veins in 5 of 5 *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice but not in 5 *Scn5a*^{+/+} littermates (Fig. 2C). In accordance with the pathology observed in patients, *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice displayed shortened life expectancy compared to all other groups of mice (median survival: 5.4 weeks, Kaplan–Meier analysis, $P < 0.001$ log-rank test) (Fig. 2D).

****Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice exhibit prolonged action potentials***

Ventricular AP duration was dramatically prolonged in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice as illustrated in Figure 3A. Capture of the preparations could be achieved in less than half of the preparations because of the occurrence of early afterdepolarizations (see below). Figure 3B-C summarizes AP characteristics. On average, *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mouse ventricular preparations displayed a depolarized resting membrane potential and decreased AP amplitude compared to wild-type (Fig. 3B). They also showed a small albeit non

significant decrease in $dV/dt_{\max}$ (142.7 ± 3.5 V/s, $n = 6$, *versus* 158.8 ± 8.5 V/s, $n = 8$). *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice exhibited longer APD₃₀, APD₅₀, APD₇₀ and APD₉₀ compared to *Scn5a*^{+/+} mice (Fig. 3C). As shown in panels D-F, similar results were obtained in left atrial preparations, although the decrease in AP amplitude did not reach significance. AP prolongation was associated with the occurrence of early afterdepolarizations in 9 of 17 *Scn5a*^{+/ Δ QKP} ventricular preparations but never in control preparations (Fig. 3G).

Figure 4A shows representative current traces recorded in ventricular cardiomyocytes isolated from *Scn5a*^{+/ Δ QKP} and *Scn5a*^{+/+} mice in response to a descending voltage ramp protocol in the absence and presence of 30 μ Mol/L tetrodotoxin. *Scn5a*^{+/ Δ QKP} cardiomyocytes exhibited an increase in persistent sodium current measured as the tetrodotoxin-sensitive current (Figure 4B).

Altered expression of Ca²⁺ handling proteins in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice

Remodeling of expression of key Ca²⁺ handling proteins was evaluated in right and left ventricular free walls. A significant increased expression of the Na/Ca exchanger (NCX1) was detected only in the right ventricle of *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice compared to control mice (*Scn5a*^{+/+} and *Scn5a*^{+/+}-Flp, grouped together because they did not differ significantly – see Suppl. Fig. 5; Fig. 5A). No difference was observed in the left ventricle. Similar changes were observed for calmodulin-kinase II (CaMKII) (Fig. 5B). Using an antibody against phosphoThr286-CaMKII (the active form of CaMKII), we found that CaMKII autophosphorylation was decreased compared to controls in both right and left ventricles (Fig. 5B). Because an intracellular Ca²⁺ increase activates both CaMKII and calcineurin pathways, we investigated whether calcineurin pathway could be activated in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice. Surprisingly, calcineurin expression was significantly decreased in the left ventricle of *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice compared to control mice. There was also a moderate decrease in calcineurin expression in the right ventricle, albeit not significant (0.6 ± 0.1 , $n = 4$, *vs.* 0.9 ± 0.1 , $n = 8$; $P = 0.08$) (Fig. 5C).

Regarding sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ handling proteins, the expression of SERCA2 was not significantly altered in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice (Fig. 6A). Since SERCA2 activity is under control of phospholamban expression and phosphorylation, we investigated whether this protein expression and phosphorylation could be affected. Phospholamban expression was significantly increased in both ventricles and its CaMKII-dependent phosphoThr17 form was significantly decreased in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice compared to control mice (Fig. 6B). These results suggest that SERCA2 activity could be increased in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice compared to control mice. Regarding RyR2 which is responsible for Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum, its expression was not significantly altered in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice (Fig. 6C).

Ranolazine treatment of *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice

Acute injection of ranolazine (IP, 30mg/kg) in *Scn5a*^{+/+} mice had no effects on ECG parameters (Suppl. Fig. 3). In *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice, acute treatment with ranolazine suppressed arrhythmias and significantly decreased QTc interval (Figure 7). In contrast to other Na⁺ current inhibitors such as flecainide or ajmaline (Suppl. Fig.4), ranolazine had no effect on QRS complex duration (Fig. 7C). No other ECG parameters were affected by ranolazine (data not shown). *Ex vivo*, ranolazine (10 μ Mol/L) shortened both atrial and ventricular APs in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice (Fig. 7) and suppressed ventricular early afterdepolarizations (data not shown).

Discussion

We have generated a knock-in mouse model carrying the delQKP1510-1512 mutation on *Scn5a* gene, a mutation equivalent to the *SCN5A*-delQKP1507-1509 mutation identified in LQT3 patients. Phenotypic characterization of this model shows that it recapitulates the clinical traits of the patients, *i.e.* prolonged ventricular repolarization, conduction disorders, ventricular arrhythmias, DCM and a high incidence of premature death. In addition, our study shows that the mutation-induced impairment of Nav1.5 function, *i.e.* the persistence of a late Na⁺ current during the action potential, is associated with a secondary remodeling of Ca²⁺ handling proteins. Finally, we show that ranolazine, an inhibitor of the late Na⁺ current, normalizes QT interval of *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice and suppresses arrhythmias.

The *SCN5A*-delQKP1507–1509 mutation has been identified in two families. In the first one⁵, the variant induced a QT prolongation associated with bradycardia and a prolongation of the PR interval to borderline values but no arrhythmias. In this family, structural heart disease was also excluded by echocardiography. In the second family⁶, the phenotype was much more severe with marked QT prolongation, conduction disorders, *torsades de pointes*, ventricular fibrillation and a high incidence of youth sudden cardiac death. In addition, 2/4 mutation carriers were diagnosed with DCM. Our study shows that the mouse model carrying the equivalent mutation exhibits a phenotype resembling closely to the phenotype of this second family. Indeed, *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice show very early a marked prolongation of ventricular repolarization which is associated with either 2:1 atrio-ventricular block or numerous ventricular premature beats and/or episodes of ventricular polymorphic tachycardia in a large majority of mice. In addition, this model is characterized by DCM and high youth mortality. The incidence of tachyarrhythmias in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice could be the reason for the high incidence of premature death. Recording of one event of ventricular fibrillation leading to the death of a mouse during ECG acquisition supports this hypothesis. Alternatively, cardiac failure cannot be excluded as the mechanism of death.

Several LQT3 mouse models have already been developed. A high incidence of cardiac arrhythmias and death has also been observed in a transgenic mouse model with cardiac selective expression of the N1325S mutant form of human *SCN5A*.¹² In this model, polymorphic ventricular tachycardia and ventricular fibrillation were clearly shown to induce sudden cardiac death. However, arrhythmias occurred in much older mice than in our model. Knock-in mice carrying the *Scn5a*-delKPQ1507-1509 mutation (equivalent to the human "historical" delKPQ1505-1507 mutation) also showed spontaneous episodes of ventricular tachycardia, mainly when conscious, but only a very small fraction (6/275) of these mice died suddenly, and at the age of 3 to 6 months.¹³ Death was attributed to fatal arrhythmias but this was not documented. Thus, in contrast to previous LQT3 mouse models, *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice exhibit a severe phenotype characterized by a high incidence of arrhythmias and premature death before adulthood in correlation with what has been reported in patients.

The electrophysiological study of cardiomyocytes confirms that the mutation induces a persistent Na⁺ as previously described for the delQKP1507–1509 mutation on human *SCN5A* gene. Indeed, in a heterologous expression system, Keller *et al.* showed that this mutation induced a persistent residual Na⁺ current that was about 2% of the maximum current magnitude measured at -30 mV and nearly completely blocked by the Na⁺ channel blockers, tetrodotoxin and lidocaine.⁵ These findings were additionally associated with a 12-mV shift of steady-state activation curve towards positive voltages and a faster recovery from inactivation.⁵ As also observed in other LQT3 mouse models, the persistent current is responsible for AP, which could potentially increase the risk of arrhythmias in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice. Evidence for this increased vulnerability was shown in ventricular preparations with the development of EADs, a likely trigger of arrhythmias. This is consistent with other *SCN5A* mutations involved in LQT3.^{3,14-16}

Scn5a^{+/ Δ QKP} mice exhibit signs of DCM, as previously observed in N₁₃₂₅S mice,⁸ but not in Δ KPQ mice.¹³ Indeed, right ventricular dilation is obvious on cardiac histological sections and the presence of right ventricular failure is further supported by histological signs of congestive liver.¹⁷ Moreover, *Scn5a*^{+/ Δ QKP}

also display symptoms indicative of congestive heart failure: their atria frequently contained organized thrombi¹⁸ and they showed increased lung weight, which has been reported as a sign of heart failure in N1325S mice.⁸ But the two models also exhibit differences. For instance, N1325S mice are characterized by a marked cardiac fibrosis, which was not observed in our model. Moreover, the age of development of the structural disease is much higher in N1325S mice. These differences suggest that the structural disease in the two models might involve different pathophysiological mechanisms.

Indeed, *SCN5A* mutations associated with the development of cardiac structural anomalies such as fibrosis or DCM in humans do not show a common profile of Nav1.5 biophysical properties alterations and DCM is weakly correlated with electrical disorders. Some *SCN5A* mutations associated with DCM lead to a reduction of Nav1.5 membrane expression and severe reduction in Na⁺ peak current¹⁹ while others lead to mild reduction of the current, such as the D1275N mutation^{20,21} for which a mouse model was established and confirmed the association of the mutation and DCM, although its pathophysiological mechanism was not established.²² Among those, the R219H mutation does not modify the Na⁺ peak current but induces the occurrence of a leak proton current.²³ Finally, a third group of mutations lead to an increased Na⁺ late current, such as the delQKP1507-1509, which is the subject of the present paper.

In a context of prolonged ventricular repolarization, structural remodeling might be secondary to altered Ca²⁺ homeostasis. Increased late Na⁺ current, by reducing the forward mode of Na⁺/Ca²⁺-exchanger (NCX1), may result in an elevation of intracellular Ca²⁺ concentration.²⁴ In *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice, Ca²⁺ homeostasis might be further altered because of a reduced capacity of Ca²⁺ pumping into the sarcoplasmic reticulum. Indeed, our results suggest that SERCA2 activity could be reduced because phospholamban global expression is increased while the level of CaMKII-dependent Thr17 phosphorylation of phospholamban is decreased.²⁵ This latter result is consistent with the decreased expression of CaMKII phosphorylated form, which represents the active form of CaMKII. Another consequence of a reduced SERCA2 activity could be an increase in inward NCX1 current during post-contraction relaxation, favoring membrane depolarization and arrhythmias. This could be further enhanced in a context of increased NCX1 expression, as observed in the right ventricle of *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice. Taken together, these

results suggest that intracellular Ca^{2+} homeostasis could be altered in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice but this needs to be confirmed functionally.

In addition to CaMKII, calcineurin, another protein involved in Ca^{2+} -regulated signalization pathways exhibits a decreased ventricular expression in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice. This was unexpected since calcineurin should be increased when CaMKII activation is decreased²⁶ and because activation of calcineurin-NFAT pathway has been shown to favor cardiac hypertrophy and failure.²⁷ The common activator of CaMKII and calcineurin is the Ca^{2+} -calmodulin complex.²⁸ Calmodulin is known to be linked to Nav1.5 by interacting with its DIII–DIV intracellular loop.²⁹ A recent study indicated that QKP amino acids are located in the interaction domain of calmodulin with Nav1.5.³⁰ Therefore, the QKP deletion could alter calmodulin binding to Nav1.5 resulting in defective Ca^{2+} signaling pathways. Investigating if the link between calmodulin and Nav1.5 DIII-DIV linker is affected, and whether this contributes to DCM development represents an interesting follow-up of the present study.

Alternatively, structural remodeling could result from cytoskeletal perturbation secondary to anomalies of interactions between Nav1.5 and cytoskeletal proteins. Indeed, 1507-1509 QKP amino acids are located near α -actinin-2 interaction site of Nav1.5.³¹ Mutations in α -actinin-2 have been previously shown to induce both hypertrophic cardiomyopathy and ventricular arrhythmias.³² It seems therefore interesting to investigate whether interactions between α -actinin-2 and Nav1.5 are affected, and if so, how this can affect cardiomyocyte cytoskeletal ultrastructure.

Finally, although this does not preclude previous hypotheses, we cannot exclude the potential contribution of incessant tachyarrhythmias to the development of contractile dysfunction in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice, as shown recently shown for the *SCN5A*-R222Q mutation by our group.³³ One way to verify this hypothesis would be to chronically suppress arrhythmias without affecting QT interval prolongation. This could be achieved with ajmaline or flecainide.

In addition to its antianginal action, ranolazine is a late Na^{+} current inhibitor known to reduce QTc interval, suppress EADs and *torsades de pointes*.³⁴ Our study shows that acute ranolazine shortens QTc

and normalizes heart rhythm of *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice. In contrast to other Nav1.5 blockers, ranolazine does not affect QRS duration in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice. Similarly, Moss *et al.* showed that ranolazine shortens QTc interval and improves diastolic dysfunction in LQT3 patients, without affecting ventricular conduction.³⁵ One other target of ranolazine is myocardial function. Ranolazine was shown to improve diastolic function through a modulation of myofilament activity³⁶. Whether chronic treatment with ranolazine in our model could prevent remodeling of calcium-handling proteins and cardiac insufficiency, directly or indirectly through a normalization of repolarization, remains to be investigated. Such study could also confirm or refute our hypothesis of altered Nav1.5-cytoskeletal proteins interaction as the mechanism of DCM. The main advantages of our model are the severity and the rapid onset of the disease which should facilitate pharmacological investigations not only for deciphering the pathophysiological mechanisms of *SCN5A*-related DCM, but also for screening preclinically new antiarrhythmic drugs or late Na⁺ current inhibitors.

To conclude, *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice recapitulate a large part of the diverse clinical phenotype of patients carrying the human equivalent mutation, including QT prolongation, ventricular arrhythmias and DCM. This mouse model constitutes a useful tool for future studies addressing as yet unanswered questions, such as the link between Nav1.5 and DCM, or for preclinical screening of late Na⁺ current inhibitors.

Acknowledgements

The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme FP7/2007-2013 under grant agreement No HEALTH-F2-2009-241526, EUTrigTreat. The mouse model was generated by PolyGene AG, Rümlang, Switzerland. The authors wish to thank Stéphanie Lemarchand for her expert technical assistance.

Disclosures

None

397

References

- 398 1. Amin AS, Pinto YM, Wilde AAM. Long QT syndrome: beyond the causal mutation. *J Physiol*
399 (*Lond*). 2013;591:4125–4139.
- 400 2. Sicouri S, Antzelevitch D, Heilmann C, Antzelevitch C. Effects of sodium channel block with
401 mexiletine to reverse action potential prolongation in in vitro models of the long term QT
402 syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 1997;8:1280–1290.
- 403 3. Wang DW, Yazawa K, George AL, Bennett PB. Characterization of human cardiac Na⁺ channel
404 mutations in the congenital long QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:13200–13205.
- 405 4. Bennett PB, Yazawa K, Makita N, George AL. Molecular mechanism for an inherited cardiac
406 arrhythmia. *Nature*. 1995;376:683–685.
- 407 5. Keller DI, Acharfi S, Delacrétaz E, Benammar N, Rotter M, Pfammatter JP, Fressart V, Guicheney
408 P, Chahine M. A novel mutation in SCN5A, delQKP 1507-1509, causing long QT syndrome: role
409 of Q1507 residue in sodium channel inactivation. *J Mol Cell Cardiol*. 2003;35:1513–21.
- 410 6. Shi R, Zhang Y-W, Yang C, Huang C, Zhou X, Qiang H, Grace AA, Huang CLH, Ma A. The
411 cardiac sodium channel mutation delQKP 1507-1509 is associated with the expanding phenotypic
412 spectrum of LQT3, conduction disorder, dilated cardiomyopathy, and high incidence of youth
413 sudden death. *Europace*. 2008;10:1329–1335.
- 414 7. Royer A, van Veen TAB, Le Bouter S, Marionneau C, Griol-Charhbil V, Leoni A-L, Steenman M,
415 van Rijen HVM, Demolombe S, Goddard CA, Richer C, Escoubet B, Jarry-Guichard T, Colledge
416 WH, Gros D, de Bakker JMT, Grace AA, Escande D, Charpentier F. Mouse model of SCN5A-
417 linked hereditary Lenègre's disease: age-related conduction slowing and myocardial fibrosis.
418 *Circulation*. 2005;111:1738–1746.
- 419 8. Zhang T, S, Yong RL, Drinko JK, Popović ZB, Shryock JC, Belardinelli L, Wang QK, Yong SL.
420 LQTS mutation N1325S in cardiac sodium channel gene SCN5A causes cardiomyocyte apoptosis,
421 cardiac fibrosis and contractile dysfunction in mice. *Int J Cardiol*. 2011;147:239–245.
- 422 9. Rajamani S, El-Bizri N, Shryock JC, Makielski JC, Belardinelli L. Use-dependent block of cardiac
423 late Na⁺ current by ranolazine. *Heart Rhythm*. 2009;6:1625–1631.
- 424 10. Fredj S, Sampson K, Liu H, Kass R. Molecular basis of ranolazine block of LQT-3 mutant sodium
425 channels: evidence for site of action. *Br J Pharmacol*. 2006;148:16–24.
- 426 11. Williams SJ, Pourrier M, McAfee D, Lin S, Fedida D. Ranolazine Improves Diastolic Function in
427 Spontaneously Hypertensive Rats. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*. 2014;
- 428 12. Tian X-L, Yong SL, Wan X, Wu L, Chung MK, Tchou PJ, Rosenbaum DS, Van Wagoner DR,
429 Kirsch GE, Wang Q. Mechanisms by which SCN5A mutation N1325S causes cardiac arrhythmias
430 and sudden death in vivo. *Cardiovasc Res*. 2004;61:256–267.
- 431 13. Nuyens D, Stengl M, Dugarmaa S, Rossenbacker T, Compennolle V, Rudy Y, Smits JF, Flameng
432 W, Clancy CE, Moons L, Vos MA, Dewerchin M, Benndorf K, Collen D, Carmeliet E, Carmeliet
433 P. Abrupt rate accelerations or premature beats cause life-threatening arrhythmias in mice with
434 long-QT3 syndrome. *Nat Med*. 2001;7:1021–7.

- 435 14. Dumaine R, Wang Q, Keating MT, Hartmann HA, Schwartz PJ, Brown AM, Kirsch GE. Multiple
436 mechanisms of Na⁺ channel--linked long-QT syndrome. *Circ Res*. 1996;78:916–924.
- 437 15. Wang Q, Shen J, Splawski I, Atkinson D, Li Z, Robinson JL, Moss AJ, Towbin JA, Keating MT.
438 SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell*.
439 1995;80:805–811.
- 440 16. Wehrens XHT, Rossenbacker T, Jongbloed RJ, Gewillig M, Heidebüchel H, Doevendans PA, Vos
441 MA, Wellens HJJ, Kass RS. A novel mutation L619F in the cardiac Na⁺ channel SCN5A
442 associated with long-QT syndrome (LQT3): a role for the I-II linker in inactivation gating. *Hum*
443 *Mutat*. 2003;21:552–552.
- 444 17. Moller S, Bernardi M. Interactions of the heart and the liver. *Eur Heart J*. 2013;34:2804–2811.
- 445 18. Antos CL, Frey N, Marx SO, Reiken S, Gaburjakova M, Richardson JA, Marks AR, Olson EN.
446 Dilated Cardiomyopathy and Sudden Death Resulting From Constitutive Activation of Protein
447 Kinase A. *Circ Res*. 2001;89:997–1004.
- 448 19. Bezzina CR, Rook MB, Groenewegen WA, Herfst LJ, van der Wal AC, Lam J, Jongsma HJ, Wilde
449 AAM, Mannens MMAM. Compound heterozygosity for mutations (W156X and R225W) in
450 SCN5A associated with severe cardiac conduction disturbances and degenerative changes in the
451 conduction system. *Circ Res*. 2003;92:159–168.
- 452 20. McNair WP. SCN5A Mutation Associated With Dilated Cardiomyopathy, Conduction Disorder,
453 and Arrhythmia. *Circulation*. 2004;110:2163–2167.
- 454 21. Olson TM, Michels VV, Ballew JD, Reyna SP, Karst ML, Herron KJ, Horton SC, Rodeheffer RJ,
455 Anderson JL. Sodium channel mutations and susceptibility to heart failure and atrial fibrillation.
456 *JAMA*. 2005;293:447–454.
- 457 22. Watanabe H, Yang T, Stroud DM, Lowe JS, Harris L, Atack TC, Wang DW, Hipkens SB, Leake
458 B, Hall L, Kupersmidt S, Chopra N, Magnuson MA, Tanabe N, Knollmann BC, George AL,
459 Roden DM. Striking In Vivo Phenotype of a Disease-Associated Human SCN5A Mutation
460 Producing Minimal Changes in Vitro. *Circulation*. 2011;124:1001–1011.
- 461 23. Gosselin-Badaroudine P, Keller DI, Huang H, Pouliot V, Chatelier A, Osswald S, Brink M,
462 Chahine M. A Proton Leak Current through the Cardiac Sodium Channel Is Linked to Mixed
463 Arrhythmia and the Dilated Cardiomyopathy Phenotype. *PLoS ONE*. 2012;7:e38331.
- 464 24. Lindegger N, Hagen BM, Marks AR, Lederer WJ, Kass RS. Diastolic transient inward current in
465 long QT syndrome type 3 is caused by Ca²⁺ overload and inhibited by ranolazine. *J Mol Cell*
466 *Cardiol*. 2009;47:326–334.
- 467 25. Mattiazzi A, Mundina-Weilmann C, Guoxiang C, Vittone L, Kranias E. Role of phospholamban
468 phosphorylation on Thr17 in cardiac physiological and pathological conditions. *Cardiovasc Res*.
469 2005;68:366–375.
- 470 26. MacDonnell SM, Weisser-Thomas J, Kubo H, Hanscome M, Liu Q, Jaleel N, Berretta R, Chen X,
471 Brown JH, Sabri A-K, Molkentin JD, Houser SR. CaMKII negatively regulates calcineurin-NFAT
472 signaling in cardiac myocytes. *Circ Res*. 2009;105:316–325.
- 473 27. Rohini A, Agrawal N, Koyani CN, Singh R. Molecular targets and regulators of cardiac

- 474 hypertrophy. *Pharmacol Res*. 2010;61:269–280.
- 475 28. Saucerman JJ, Bers DM. Calmodulin mediates differential sensitivity of CaMKII and calcineurin
476 to local Ca²⁺ in cardiac myocytes. *Biophys J*. 2008;95:4597–4612.
- 477 29. Mori M, Konno T, Ozawa T, Murata M, Imoto K, Nagayama K. Novel Interaction of the Voltage-
478 Dependent Sodium Channel (VDSC) with Calmodulin: Does VDSC Acquire Calmodulin-
479 Mediated Ca²⁺-Sensitivity? †. *Biochemistry*. 2000;39:1316–1323.
- 480 30. Mruk K, Farley BM, Ritacco AW, Kobertz WR. Calmodulation meta-analysis: Predicting
481 calmodulin binding via canonical motif clustering. *J Gen Physiol*. 2014;144:105–114.
- 482 31. Ziane R, Huang H, Moghadaszadeh B, Beggs AH, Levesque G, Chahine M. Cell membrane
483 expression of cardiac sodium channel Na(v)1.5 is modulated by alpha-actinin-2 interaction.
484 *Biochemistry*. 2010;49:166–78.
- 485 32. Chiu C, Bagnall RD, Ingles J, Yeates L, Kennerson M, Donald JA, Jormakka M, Lind JM,
486 Semsarian C. Mutations in alpha-actinin-2 cause hypertrophic cardiomyopathy: a genome-wide
487 analysis. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55:1127–1135.
- 488 33. Laurent G, Saal S, Amarouch MY, Béziau DM, Marsman RFJ, Faivre L, Barc J, Dina C, Bertaux
489 G, Barthez O, Thauvin-Robinet C, Charron P, Fressart V, Maltret A, Villain E, Baron E, Mérot J,
490 Turpault R, Coudière Y, Charpentier F, Schott J-J, Loussouarn G, Wilde AAM, Wolf J-E, Baró I,
491 Kyndt F, Probst V. Multifocal ectopic Purkinje-related premature contractions: a new SCN5A-
492 related cardiac channelopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60:144–156.
- 493 34. Antzelevitch C, Belardinelli L, Zygmunt AC, Burashnikov A, Di Diego JM, Fish JM, Cordeiro JM,
494 Thomas G. Electrophysiological effects of ranolazine, a novel antianginal agent with
495 antiarrhythmic properties. *Circulation*. 2004;110:904–10.
- 496 35. Moss AJ, Zareba W, Schwarz KQ, Rosero S, McNitt S, Robinson JL. Ranolazine shortens
497 repolarization in patients with sustained inward sodium current due to type-3 long-QT syndrome. *J*
498 *Cardiovasc Electrophysiol*. 2008;19:1289–93.
- 499 36. Lovelock JD, Monasky MM, Jeong E-M, Lardin HA, Liu H, Patel BG, Taglieri DM, Gu L, Kumar
500 P, Pokhrel N, Zeng D, Belardinelli L, Sorescu D, Solaro RJ, Dudley SC Jr. Ranolazine improves
501 cardiac diastolic dysfunction through modulation of myofilament calcium sensitivity. *Circ Res*.
502 2012;110:841–50.

503

504

Figure legends

Figure 1: Ventricular arrhythmias and long QT interval in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice. **A.** Representative lead I ECGs from 3-week-old *Scn5a*^{+/+} (+/+), *Scn5a*^{+/+ Flp} (+/+ Flp), *Scn5a*^{+/Neo} (+/Neo) and *Scn5a*^{+/ Δ QKP} (+/ Δ QKP) mice. Scale bar, 100 ms. **B.** Mean values for QTc (***P* < 0.001 *versus* *Scn5a*^{+/+}) and QRS (**P* < 0.05, ****P* < 0.001 *versus* +/+; Bonferroni post-test) intervals measured from surface ECGs recorded in 142 +/+, 120 +/+ Flp, 114 +/Neo and 22 +/ Δ QKP mice. **C.** Top. Representative 2:1 atrio-ventricular block (AVB) recorded in a *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mouse. Bottom. Incidence of AVB in +/ Δ QKP mice compared to other mice (*P* < 0.001 *versus* all other groups, Fisher's exact test). Scale bar, 100 ms. **D.** Top. Representative episodes of ventricular tachycardia recorded in a *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mouse. Bottom. Incidence of premature ventricular beats and/or tachycardia (PVB) in +/ Δ QKP mice compared to other mice (*P* < 0.001 *versus* all other groups). Scale bar, 100 ms. **E.** Episode of ventricular fibrillation recorded in a 4-week-old *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mouse. Scale bar, 500 ms.

Figure 2: Congestive heart failure and premature mortality in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice. **A.** Top. Heart weight (mg) / tibia length (mm) ratio (HW / TL) in *Scn5a*^{+/+} (+/+; n = 11), *Scn5a*^{+/+ Flp} (+/+ Flp; n = 8), *Scn5a*^{+/Neo} (+/Neo; n = 6) and *Scn5a*^{+/ Δ QKP} (+/ Δ QKP; n = 13) mice. ****P* < 0.001 *versus* all other groups (Kruskal-Wallis test). Bottom. Representative histological sections of *Scn5a*^{+/+} and *Scn5a*^{+/ Δ QKP} hearts show increased right ventricular cavity and organized thrombi in the left atrium of the *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mouse. The arrow indicates an organized thrombus. Scale bar, 1 mm. **B.** Top. Lung weight (mg) / tibia length (mm) ratio (LW / TL) in +/+ (n = 11), +/+ Flp (n = 8), +/Neo (n = 6) and +/ Δ QKP (n = 13) mice. **P* < 0.05, ****P* < 0.001 (Kruskal-Wallis test). Bottom. Representative histological sections of *Scn5a*^{+/+} and *Scn5a*^{+/ Δ QKP} lungs do not show any differences. Scale bar, 100 μ m. **C.** Representative histological sections of *Scn5a*^{+/+} and *Scn5a*^{+/ Δ QKP} livers show chronic congestion in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice with blood stasis in capillary vessels. Scale bar, 100 μ m. **D.** Survival curves show a significant increase in premature mortality in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice (n = 17) compared to all other groups (*Scn5a*^{+/+}, n = 16; *Scn5a*^{+/+ Flp}, n = 12; *Scn5a*^{+/Neo}, n = 18; ****P* < 0.001; Log-rank test).

Figure 3: *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice exhibit prolonged action potentials. **A.** Representative ventricular action potentials (AP) from 4-week-old *Scn5a*^{+/+} and *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice recorded at a pacing cycle length of 200 ms. **B.** Mean values of resting membrane potential (RMP) and AP amplitude (APA) in *Scn5a*^{+/+} (white bars; n = 8) and *Scn5a*^{+/ Δ QKP} (black bars; n = 6) ventricular preparations. **C.** Mean values of ventricular AP duration at 30% (APD₃₀), 50%(APD₃₀), 70%(APD₃₀) and 90% (APD₃₀) of full repolarization in *Scn5a*^{+/+} and *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice. **D.** Representative atrial APs from 4-week-old *Scn5a*^{+/+} and *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice recorded at a pacing cycle length of 200 ms. **E.** Mean values of RMP and APA in *Scn5a*^{+/+} (n = 9) and *Scn5a*^{+/ Δ QKP} (n = 6) atrial preparations. **F.** Mean values of APD₃₀, APD₅₀, APD₇₀ and APD₉₀. **G.** Left. Example of early afterdepolarizations (EAD) observed in ventricular preparations from *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice. Right. Number of *Scn5a*^{+/+} (0/10) and *Scn5a*^{+/ Δ QKP} (9/17) mice exhibiting EADS (in black) . * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus *Scn5a*^{+/+} (Mann-Whitney test for panels B-F and Fisher's exact test for panel G).

Figure 4: Persistent sodium current in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} cardiomyocytes. **A.** Examples of persistent inward current measurements in *Scn5a*^{+/+} (+/+) and *Scn5a*^{+/ Δ QKP} (+/ Δ QKP), cardiomyocytes using a descending voltage ramp protocol. **B.** Persistent inward current traces obtained by subtraction of the current before and after application of 30 μ Mol/L tetrodotoxin (TTX).

Figure 5: *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice exhibit protein expression remodeling. Relative expression of **(A)** sarcolemmal Na/Ca exchanger 1 (NCX1), **(B)** calcium-calmodulin kinase II (CaMKII) in its unphosphorylated and phosphorylated form and **(C)** calcineurin (CaN) versus glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in right and left ventricles from *Scn5a*^{+/+} (+/+), *Scn5a*^{+/+}-Flp (+/+ Flp), *Scn5a*^{+/ Δ QKP} (+/ Δ QKP) mice. Top panels show representative western blots. Bottom panels show mean values in control (CTL, i.e. *Scn5a*^{+/+} and *Scn5a*^{+/+}-Flp, which did not differ) and +/ Δ QKP mice. Respective numbers of experiments are given within parentheses. ** $P < 0.01$ versus CTL (Mann-Whitney test).

Figure 6: *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice exhibit expression remodeling of sarcoplasmic calcium handling proteins.
 Relative expression of (A) sarcoplasmic endoplasmic reticular calcium ATPase 2 (SERCA2), (B) phospholamban (PLB) in its unphosphorylated and p(Thr17) phosphorylated forms and (C) ryanodine receptor 2 (RyR2) *versus* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in right and left ventricle from *Scn5a*^{+/+} (+/+), *Scn5a*^{+/+}-Flp (+/+ Flp), *Scn5a*^{+/Neo} (+/Neo) and *Scn5a*^{+/ Δ QKP} (+/ Δ QKP) mice. Top panels show representative western blots. Bottom panels show mean values in control (CTL, *i.e.* *Scn5a*^{+/+} and *Scn5a*^{+/+}-Flp, which did not differ) and +/ Δ QKP mice. Respective numbers of experiments are given within parentheses. * P < 0.05, ** P < 0.01 *versus* CTL (Mann-Whitney test).

Figure 7: Ranolazine treatment shorten action potentials and normalizes ECG of *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice.
 Representative examples of right ventricular (A) and left atrial (B) action potentials in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice at a pacing cycle length of 200 ms before (baseline) and after 10 min superfusion of Ranolazine (10 μ Mol/L). C. Representative lead I ECG at baseline and during ranolazine treatment (IP, 30 mg/kg). Scale bar, 1 s. D. Mean values of QTc interval and QRS complex duration in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice (n = 14) at baseline and during ranolazine treatment. *** P < 0.001 *versus* baseline (Wilcoxon test).

569 **Table 1: ECG parameters of *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice**

	<i>Scn5a</i> ^{+/+} (n = 142)	<i>Scn5a</i> ^{+/+} -Flp (n = 120)	<i>Scn5a</i> ^{+/^{Neo}} (n = 114)	<i>Scn5a</i> ^{+/ΔQKP} (n = 22)
RR (ms)	130.5 ± 1.4	125.2 ± 1.0	134.6 ± 1.2	134.2 ± 3.2
P wave (ms)	12.1 ± 0.1	11.6 ± 0.2	12.5 ± 0.3	12.8 ± 0.4
PR (ms)	33.4 ± 0.3	34.1 ± 0.3	36.8 ± 0.3 ***	35.3 ± 0.7
QRS (ms)	11.5 ± 0.1	11.1 ± 0.2	13.7 ± 0.7 ***	14.3 ± 0.6 *
QT (ms)	47.7 ± 0.4	46.0 ± 0.7	52.8 ± 0.9 ***	73.8 ± 2.7 ***
QTc (ms)	41.8 ± 0.3	41.1 ± 0.6	45.6 ± 0.7 ***	63.6 ± 1.9 ***

* $P < 0.05$ vs. *Scn5a*^{+/+}; *** $P < 0.001$ vs. *Scn5a*^{+/+}; Kruskal-Wallis test, Dunns post-test.

570

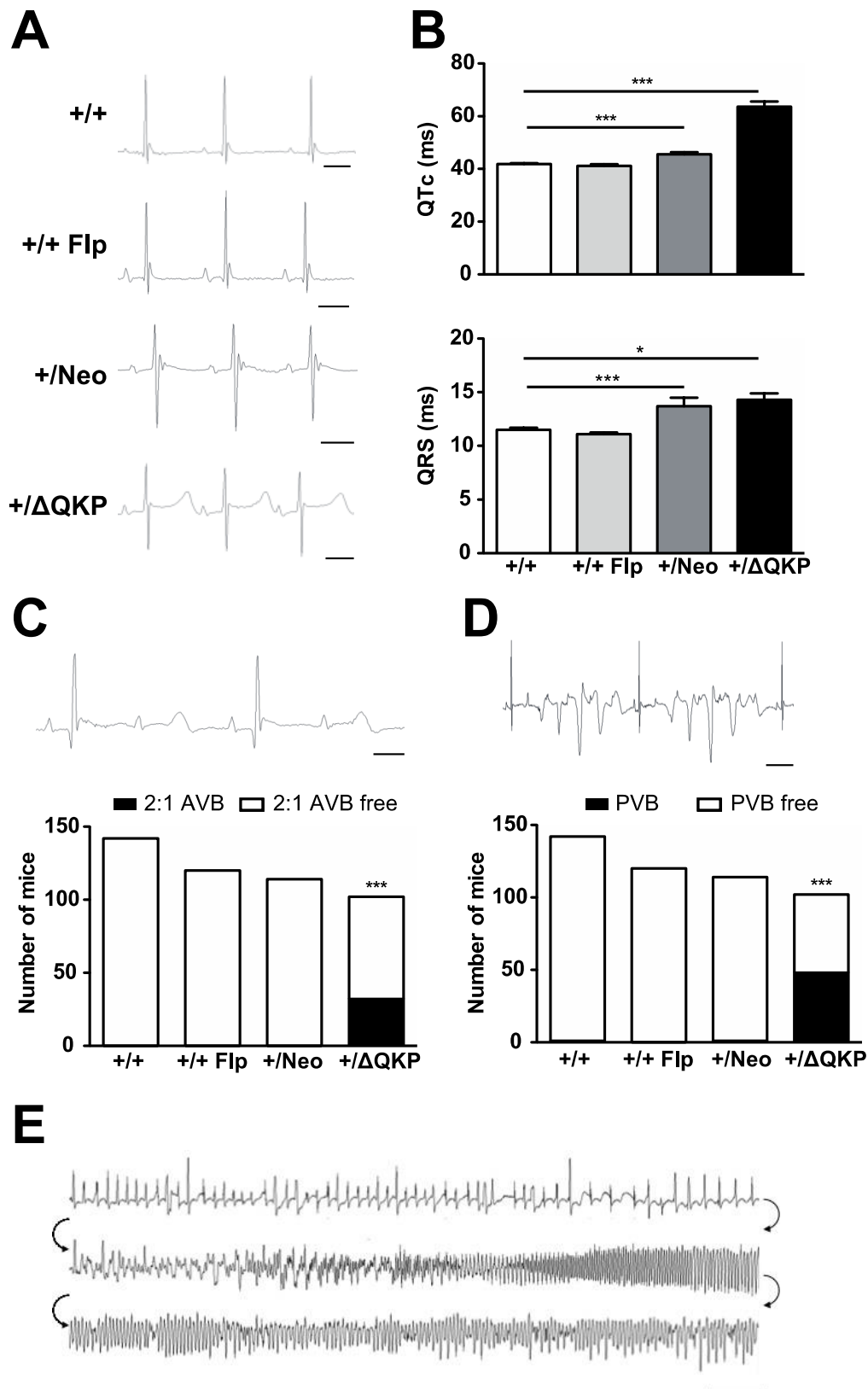


Fig.1

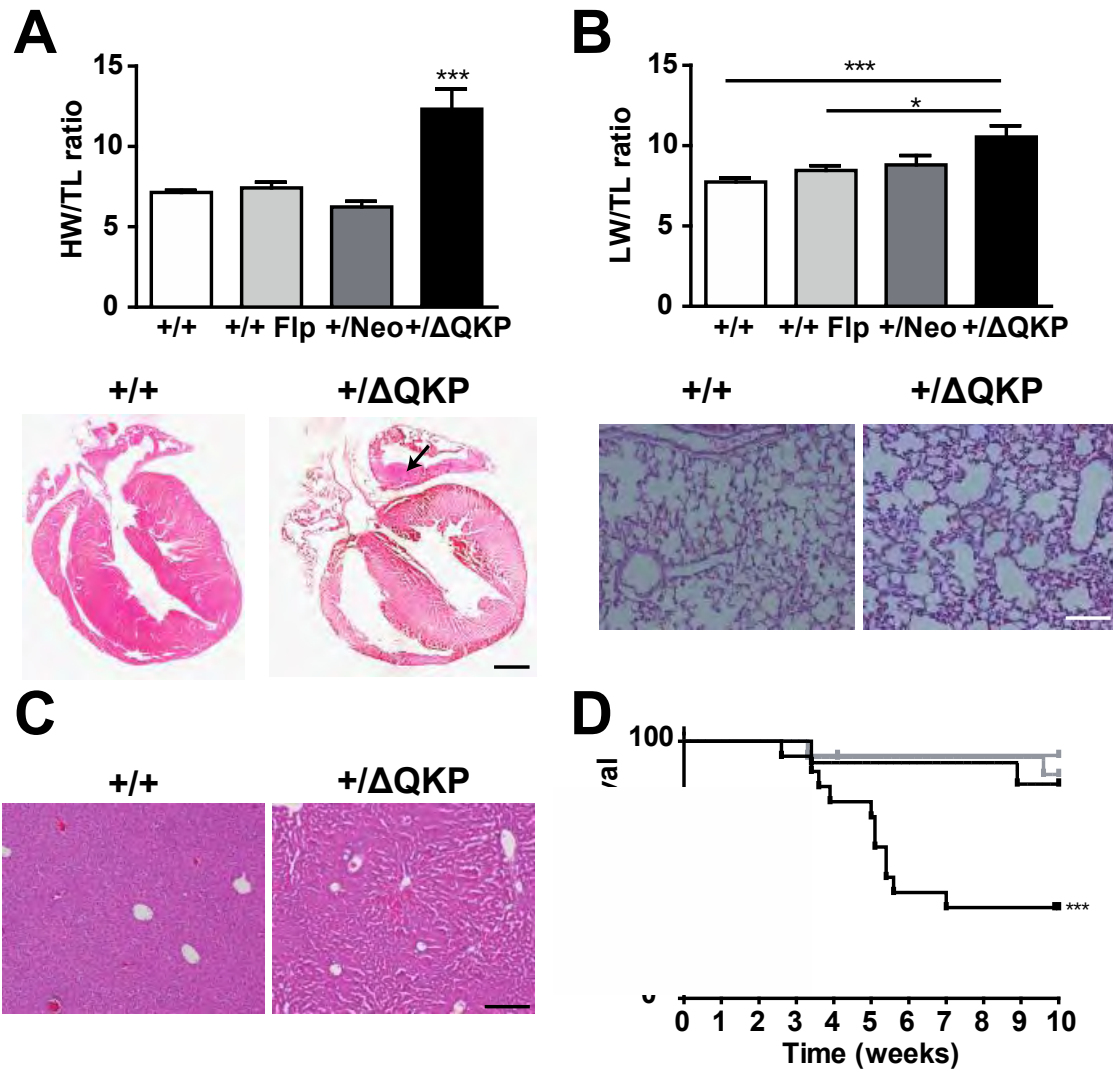


Fig.2

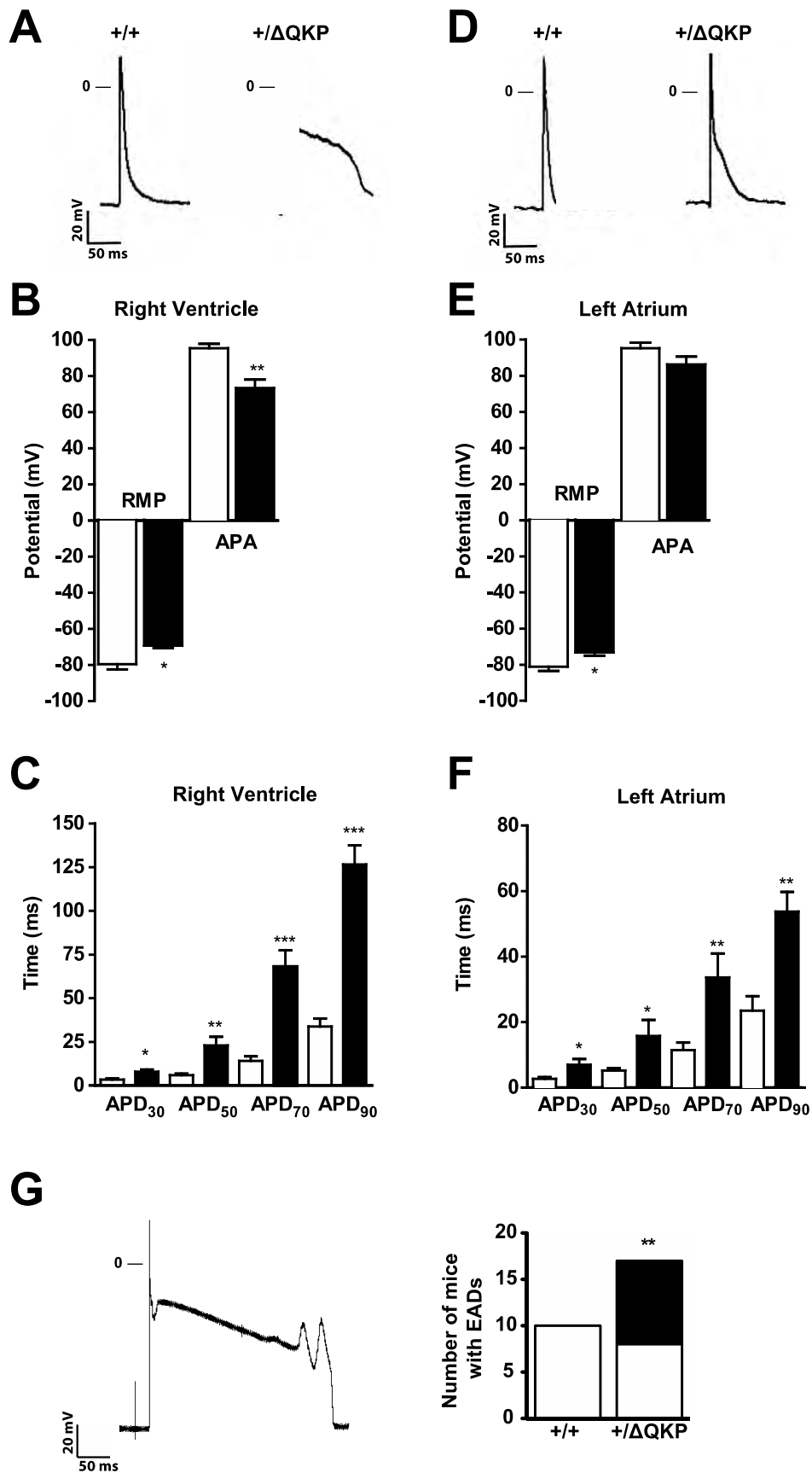


Fig.3

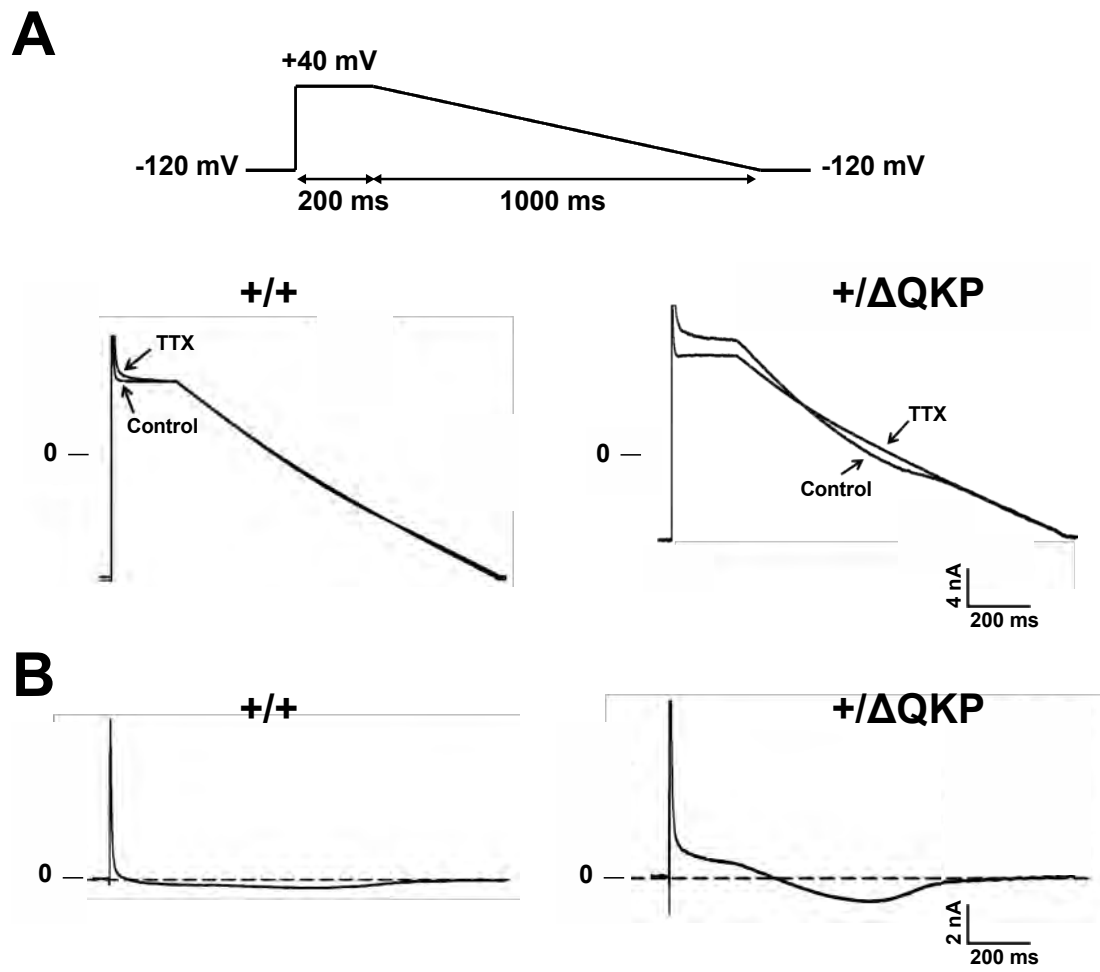


Fig. 4

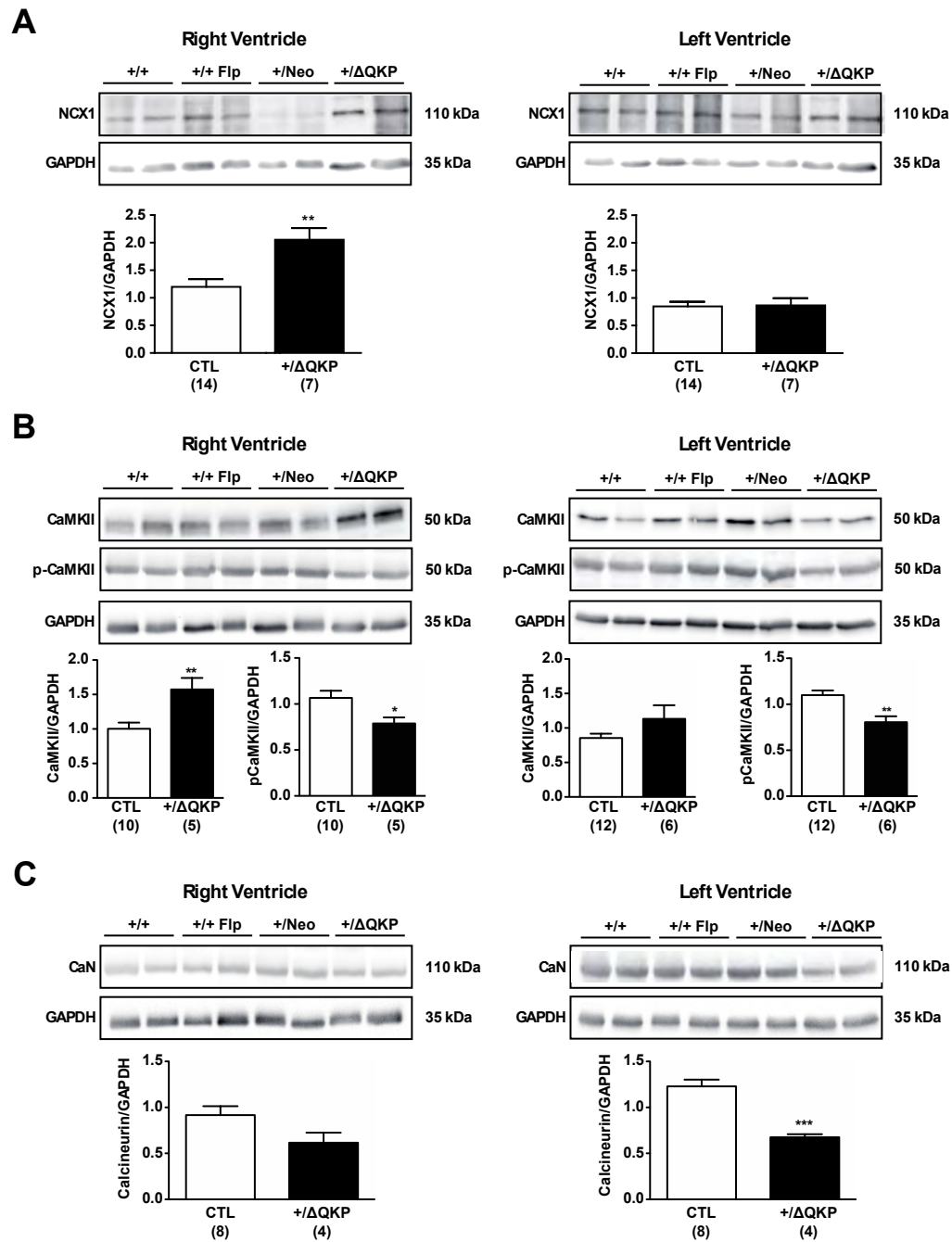


Fig. 5

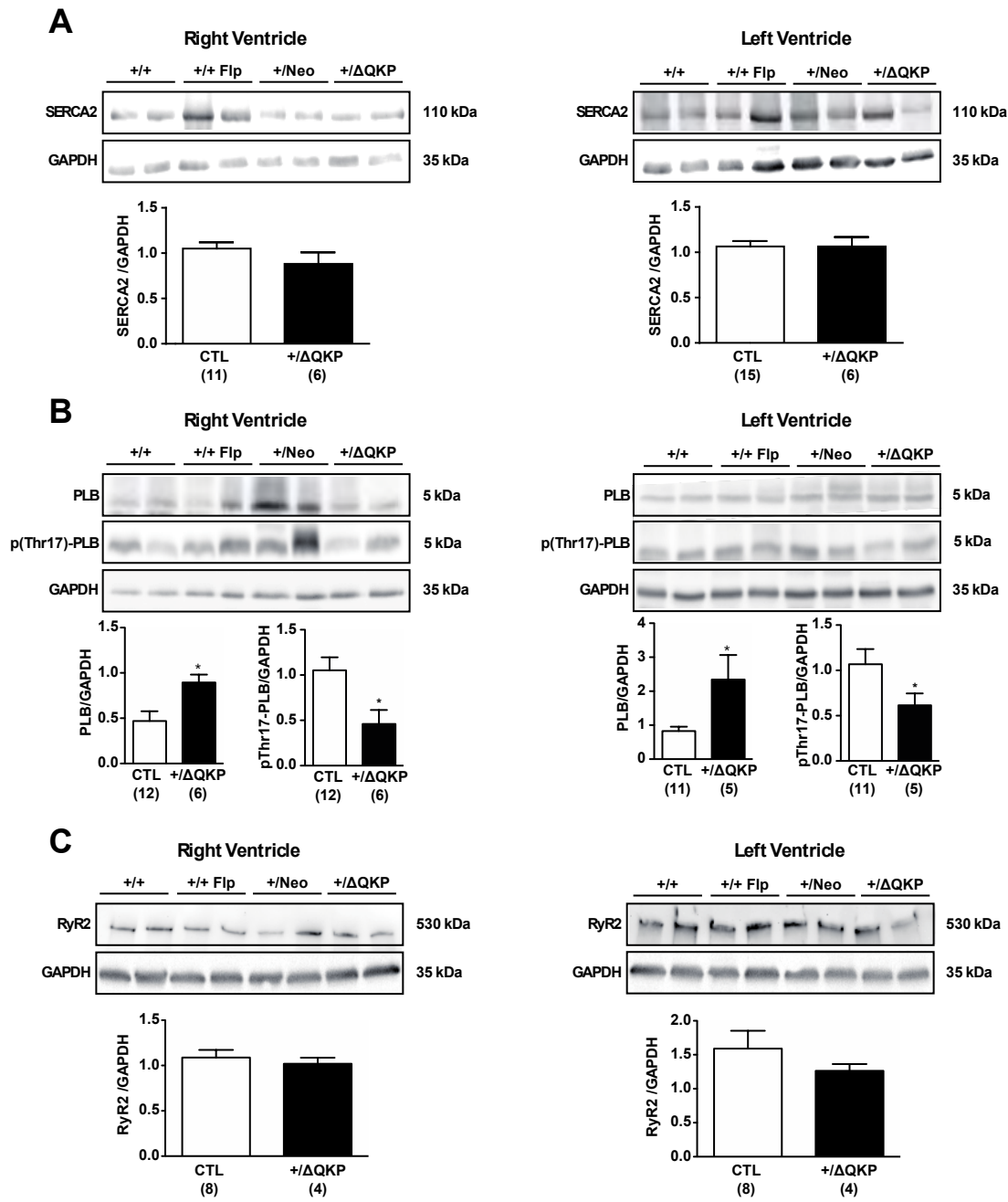


Fig. 6

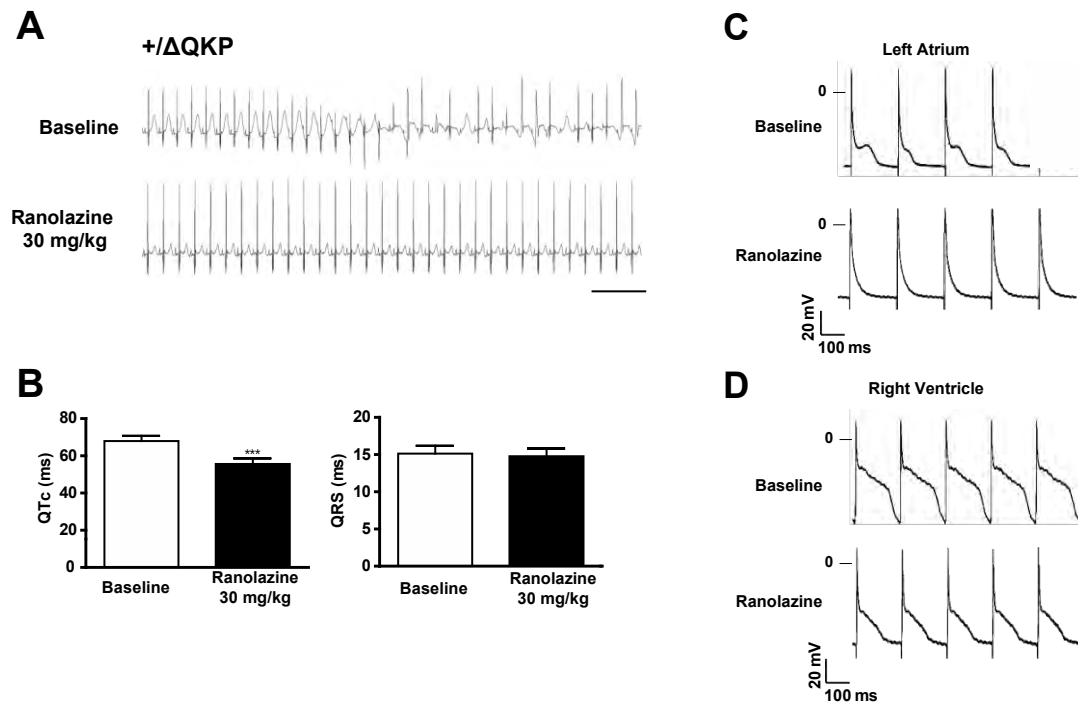


Fig. 7

***Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice: new model for long QT syndrome type 3 associated with cardiac dysfunction and early mortality**

Jérôme Montnach, Franck Chizelle, Nadjet Belbachir, Agnès Carcouet, Isabelle Baró, Flavien Charpentier

Online data supplement

Supplemental figure legends

Supplemental figure 1: A. Scheme of the different alleles of the *Scn5a* locus. For selection of homologously recombined ES cells, an FRT-flanked neomycin resistance cassette (green) was used. After Flp mediated recombination (delNeo, lower panel), the neomycin resistance cassette was excised, leaving a single FRT site upstream of exon 26. The primer binding sites used for genotyping are indicated in black, and the resulting PCR products in light blue bars. **B. PCR screening of *Scn5a*^{+/+}, *Scn5a*^{+/Neo} and *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice.** **C. Mean values of body weight of 3-week-old *Scn5a*^{+/+} (n=113), *Scn5a*^{+/+}-Flp (n=92), *Scn5a*^{+/Neo} (n=85) and *Scn5a*^{+/ Δ QKP} (n=72) mice.** ** $P < 0.01$ versus *Scn5a*^{+/+} mice, 1-way ANOVA.

Supplemental figure 2: Expression of Nav1.5. Relative expression of Nav1.5 versus glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in right and left ventricle from *Scn5a*^{+/+} (+/+; n=5), *Scn5a*^{+/+} Flp (+/+ Flp; n=5), *Scn5a*^{+/Neo} (+/Neo; n=4) and *Scn5a*^{+/ Δ QKP} (+/ Δ QKP; n=4) mice. ** $P < 0.01$ versus *Scn5a*^{+/+} mice, Kruskal-Wallis test.

Supplemental figure 3: Ranolazine effects in *Scn5a*^{+/+} mice. Mean values of ECG parameters in *Scn5a*^{+/+} mice at baseline and 10 min after Ranolazine injection (IP, 30 mg/kg, n=11).

Supplemental figure 4: Flecainide (A) and Ajmaline (B) effects in *Scn5a*^{+/+} mice. Mean values of ECG parameters in *Scn5a*^{+/+} mice at baseline and during Flecainide (IP, 20 mg/kg, n=5) or Ajmaline treatment

24 (IP, 30 mg/kg, n=5). * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ *versus* baseline (Wilcoxon test).

25 **Supplemental figure 5: Comparison of protein remodeling in the right (A) and left (B) ventricle in**
 26 **controls groups mice.**

27 **Supplemental figure 6: Echographic follow of *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice from 3 weeks to 10 weeks old in**
 28 **number (A) and proportion (B).**

29

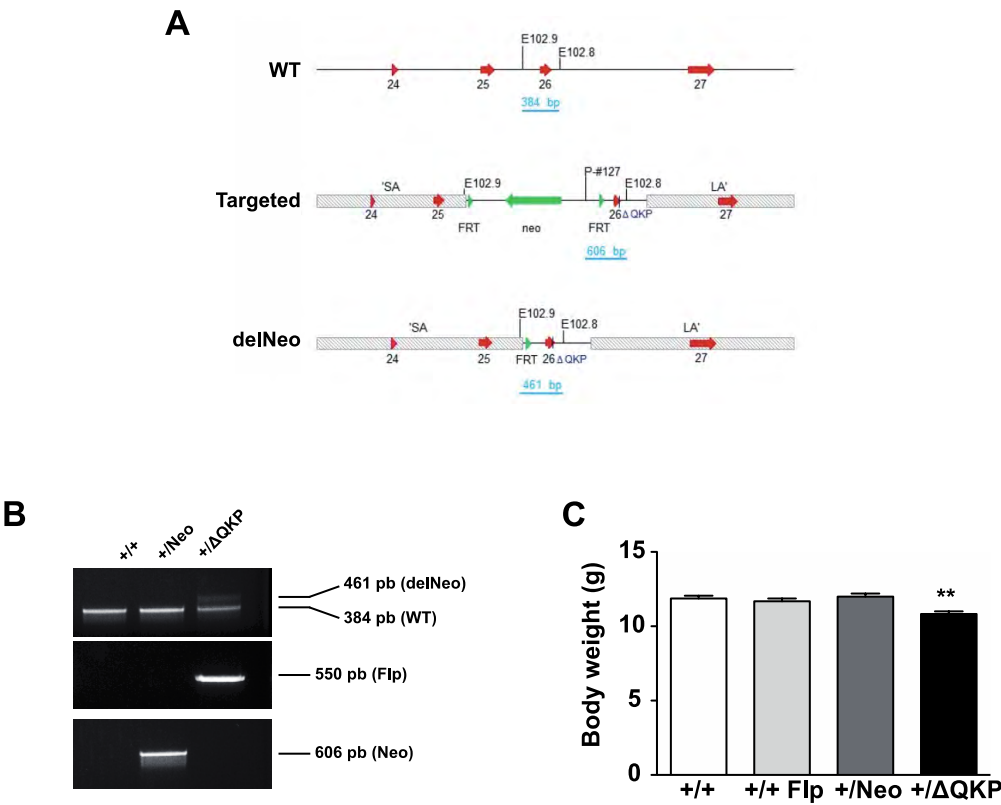
30

31 **Supplemental table 1: Action potential parameters of *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice**

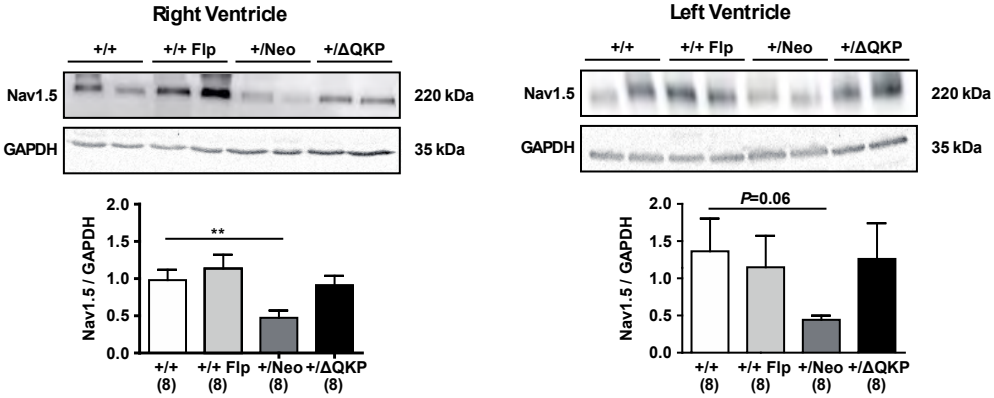
	Right ventricle		Left atrium	
	<i>Scn5a</i> ^{+/ΔQKP} (n=8)	<i>Scn5a</i> ^{+/ΔQKP} (n=6)	<i>Scn5a</i> ^{+/ΔQKP} (n=9)	<i>Scn5a</i> ^{+/ΔQKP} (n=6)
RMP (mV)	-73.2 $\pm$ 2.9	-64.3 $\pm$ 1.4 *	-76.1 $\pm$ 2.3	-68.2 $\pm$ 1.8 *
AMP (mV)	95.4 $\pm$ 2.5	73.4 $\pm$ 4.6 **	90.3 $\pm$ 3.1	81.2 $\pm$ 4.5
dV/dt_{max} (V/s)	158.8 $\pm$ 8.5	142.7 $\pm$ 3.5	190.9 $\pm$ 16.4	183.2 $\pm$ 16.5
APD₃₀ (ms)	3.4 $\pm$ 0.6	7.9 $\pm$ 1.3 *	2.7 $\pm$ 0.5	7.0 $\pm$ 1.8 *
APD₅₀ (ms)	6.0 $\pm$ 0.9	23.0 $\pm$ 4.9 **	5.2 $\pm$ 0.7	15.8 $\pm$ 4.9 *
APD₇₀ (ms)	14.1 $\pm$ 2.6	68.0 $\pm$ 9.4 ***	11.5 $\pm$ 2.3	33.6 $\pm$ 7.3 **
APD₉₀ (ms)	33.7 $\pm$ 4.6	126.5 $\pm$ 11.0 ***	23.5 $\pm$ 4.4	53.7 $\pm$ 6.0 **

32 * $P < 0.05$ vs. *Scn5a*^{+/ Δ QKP}; ** $P < 0.01$ vs. *Scn5a*^{+/ Δ QKP}; *** $P < 0.001$ vs. *Scn5a*^{+/ Δ QKP}; Mann Whitney test.

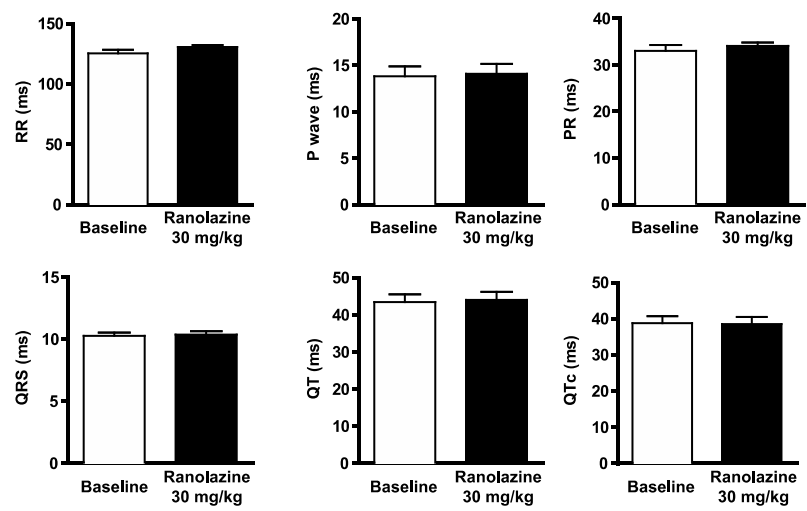
33



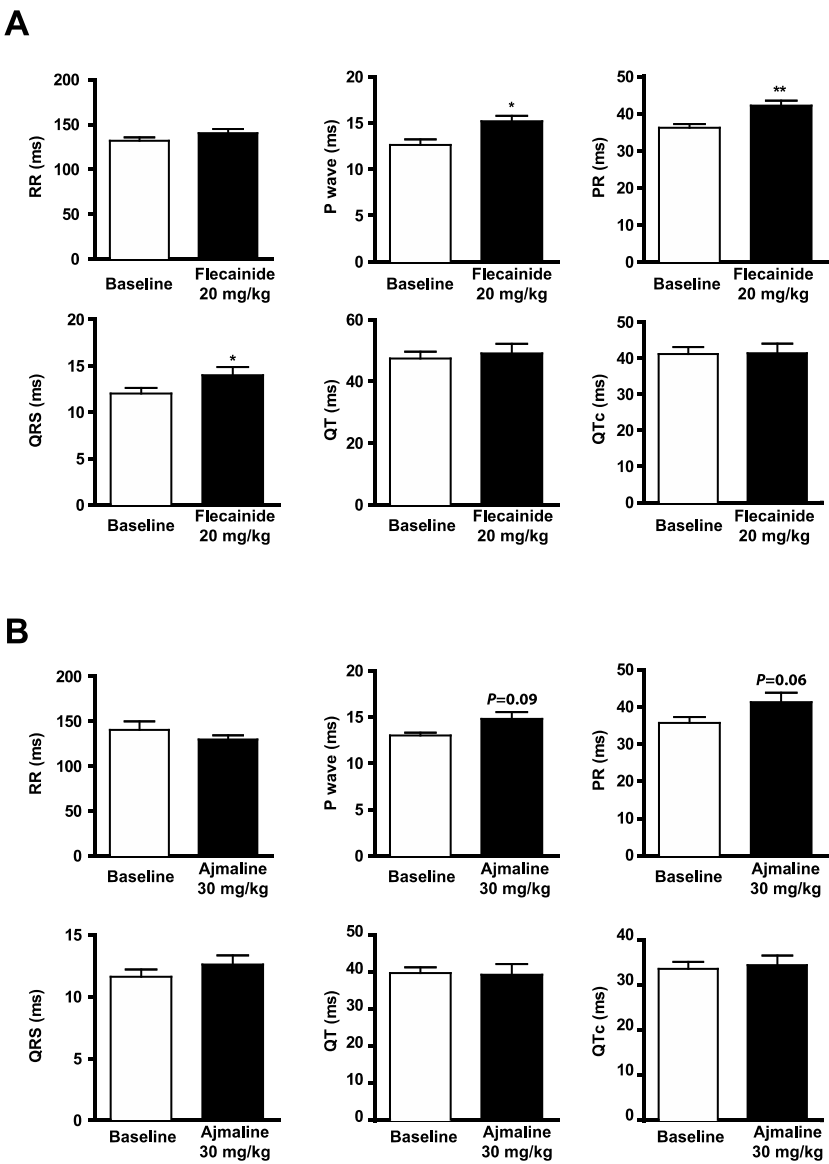
Suppl. Fig. 1



Suppl. Fig. 2

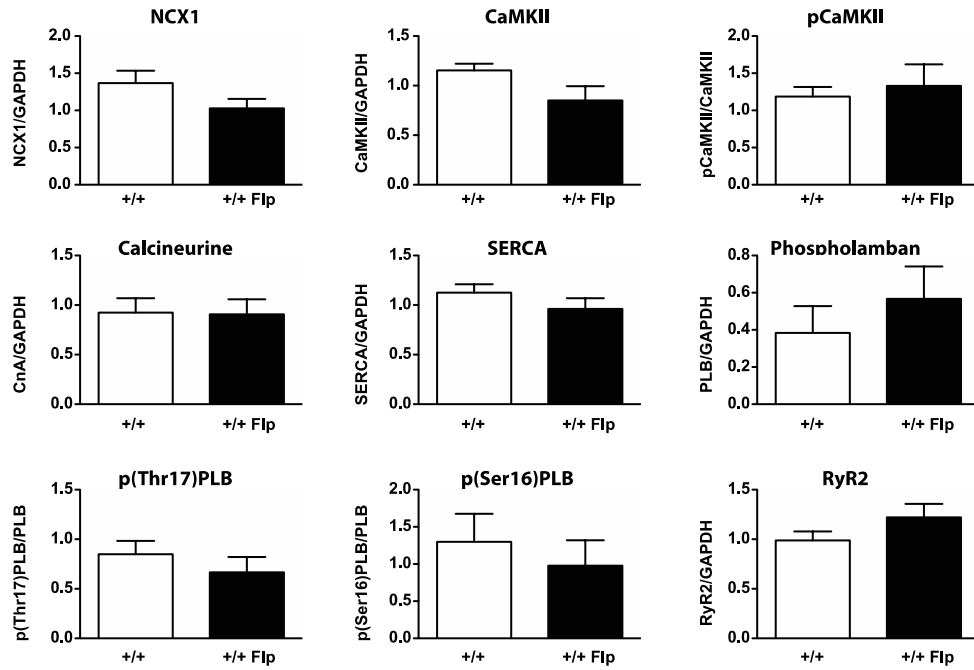


Suppl. Fig. 3

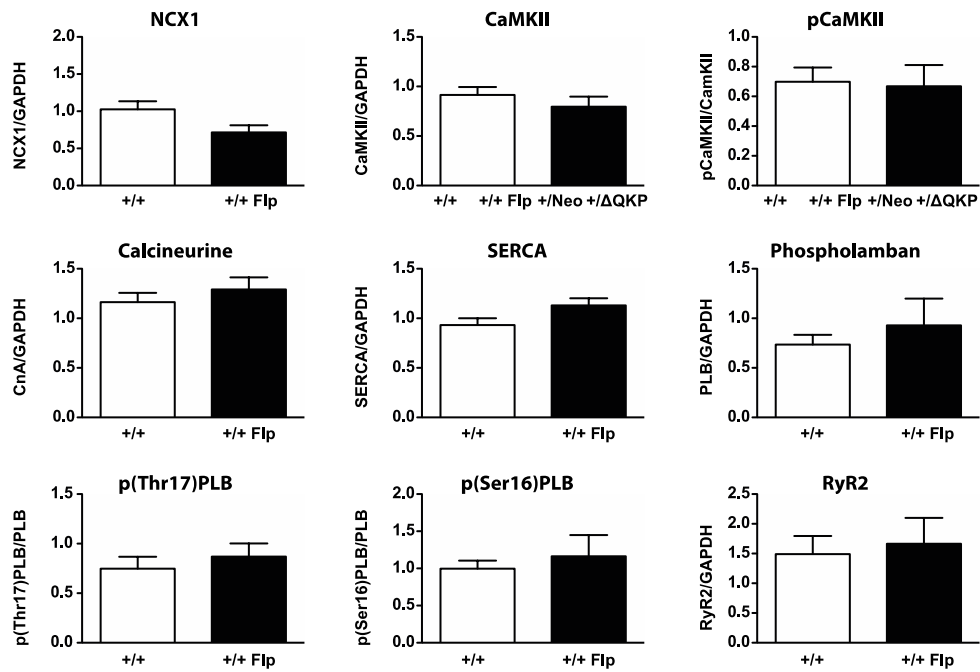


Suppl. Fig. 4

A

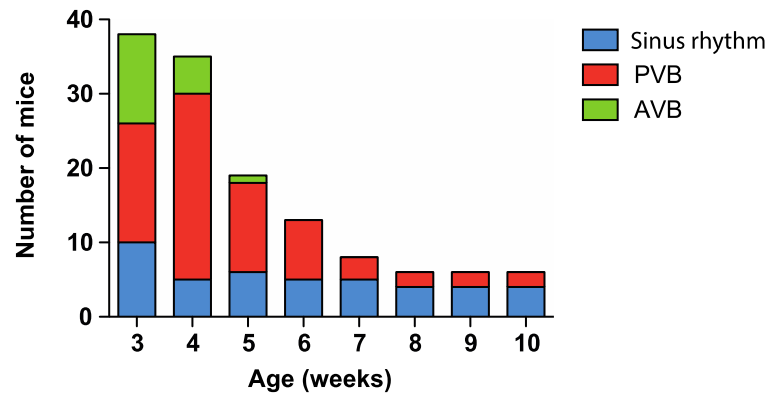


B

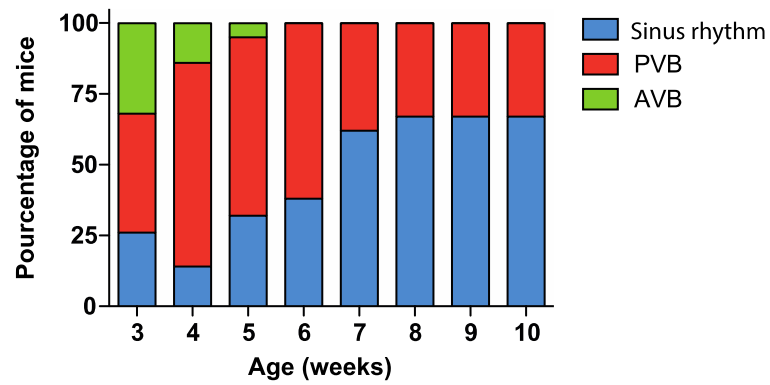


Suppl. Fig. 5

A



B



Suppl. Fig. 6

3 RESULTATS COMPLEMENTAIRES

Au vu de la présence du courant sodique persistant dans les cardiomyocytes isolés à partir des cœur de souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP}, nous avons entrepris de vérifier dans ce modèle murin si nous retrouvions les mêmes différences biophysiques que celles montrées dans les cellules HEK293 (Keller et al., 2003).

Méthodes.

Des expériences de patch-clamp en configuration cellule entière ont été menées sur des cardiomyocytes ventriculaires issus de souris *Scn5a*^{+/+} et *Scn5a*^{+/ Δ QKP}. Pour l'analyse de la densité de courant sodique et des paramètre d'activation, les cardiomyocytes ont été perfusés par une solution contenant (en mMol/L) 10 NaCl, 139 CsCl, 2,5 CoCl₂, 2 MgCl₂, 5 glucose, 10 HEPES, et 20 mannitol; pH 7.4 (CsOH). Pour l'analyse des paramètre d'inactivation, les cardiomyocytes ont été perfusés par une solution contenant (en mMol/L) 140 NaCl, 5 CsCl, 2,5 CoCl₂, 2 MgCl₂, 5 glucose, 10 HEPES, and 20 mannitol; pH 7.4 (CsOH). Les pipettes utilisées étaient des pipettes de verre borosilicate (Sutter Instrument) d'une résistance comprise entre 1,8 et 2,5 M Ω , remplies avec une solution contenant (en mMol/L) 50 CsCl, 1 CaCl₂, 5 Na₂-pyruvate, 3.0 MgCl₂, 2.5 Na₂ATP, 2.5 CoCl₂, 45 acide gluconique, 10 EGTA, 10 HEPES; pH 7.2 (CsOH).

Les propriétés biophysiques ont été caractérisées à l'aide d'un protocole de stimulation comprenant une série de sauts de potentiels de 500 ms variant de -120 mV à +40 mV par incréments de 5 mV, permettant d'analyser les paramètres d'activation, chaque saut de potentiel étant suivi d'un second de 20 ms à une valeur fixe de -20 mV, afin de mesurer les paramètres d'inactivation du canal sodique. Le potentiel de maintien de la cellule au repos était de -120 mV. La densité de courant a été calculée en divisant le courant enregistré par la capacitance membranaire de la cellule (Cm). Les courbes d'activation et d'inactivation ont été ajustées et analysées avec une équation de Boltzmann :

$$y = \left(1 + \exp \frac{(V - V_{1/2})}{k} \right)^{-1}$$

où $V_{1/2}$ est le potentiel de demi-activation (ou de demi-inactivation) et k le facteur de pente. Les cinétiques d'inactivation ont été analysées suivant une équation bi-exponentielle :

$$y = y_0 + A_1(1 - \exp(-t/\tau_1)) + A_2(1 - \exp(-t/\tau_2))$$

où A_1 et A_2 sont les fractions rapide et lente de la cinétique d'inactivation et τ_1 et τ_2 les constantes de temps des cinétiques rapide et lente d'inactivation.

Résultats.

Les résultats préliminaires ne montrent pas de réduction majeure de la densité du courant sodique au pic dans les cardiomyocytes issus de souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP} par rapport à celle des cardiomyocytes issus de souris *Scn5a*^{+/+} ($-43,2 \pm 2,4$ pA/pF, n=3, *versus* $-54,7 \pm 6,2$ pA/pF, n=5) (Figure 53 A-B). Les cardiomyocytes des souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP} présentent un décalage vers des potentiels négatifs de la courbe d'activation par rapport à celle des souris *Scn5a*^{+/+} ($V_{1/2} = -59,8 \pm 3,7$ mV, n=5, *versus* $-49,8 \pm 2,2$ mV, n=5, $P=0,03$ Mann-Whitney). Le facteur de pente k, qui reflète la sensibilité de l'activation aux variations de potentiel, n'est pas affecté. Concernant les paramètres d'inactivation du canal sodique, les cardiomyocytes des souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP} présentent un décalage significatif vers des potentiels positifs de la courbe d'inactivation par rapport à celle des cardiomyocytes de souris *Scn5a*^{+/+} ($V_{1/2} = -61,4 \pm 1,7$ mV n=6 *versus* $-70,2 \pm 1,5$ mV n=6, $P<0,01$ Mann-Whitney) (Figure 53 C). Le facteur de pente d'inactivation k est significativement diminué dans les cardiomyocytes des souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP} ($5,7 \pm 0,7$ n=6 *versus* $8,8 \pm 0,7$ n=6, $P<0,05$ Mann-Whitney) (Figure 53 D). Les constantes d'inactivation rapide τ_1 et lente τ_2 ne semblent pas être altérées par la mutation Δ QKP sur le canal Nav1.5 (Figure 53E). Aucune différence n'a été observée lors des protocoles de levée d'inactivation entre les cardiomyocytes contrôles et porteurs de la mutation Δ QKP. La mesure du courant persistant lors d'un saut unique de potentiel comme étant le courant TTX-S montre une augmentation significative du courant persistant dans les cardiomyocytes issus des souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP} comparés à ceux issus des souris sauvages (Figure 54).

Bien que ces résultats ne soient que préliminaires, ils suggèrent que la mutation Δ QKP du canal Nav1.5 induise un décalage vers des potentiels plus positifs de la courbe d'inactivation et un décalage vers des potentiels plus négatifs de la courbe d'activation. Ces résultats sont en contradiction avec ceux obtenus par Keller et ses collaborateurs (Keller et al., 2003) lors de l'étude de cette mutation dans des cellules tsA201. Ils avaient certes montré un décalage vers des potentiels négatifs de la courbe d'activation, mais n'avaient pas observé d'effet de la mutation sur la dépendance au potentiel de l'inactivation du canal. Cette différence de modification des propriétés biophysiques du canal sodique doit être confirmée mais l'obtention de résultats contradictoires entre les modèles de réexpression et les cardiomyocytes a déjà été retrouvée lors de l'étude d'autres mutations. Parmi celles-ci, la mutation D1275N ne présentait aucun effet dans les modèles de réexpression alors que des effets nets sur la densité du courant sodique et son inactivation ont été vus dans des cardiomyocytes (Watanabe et al., 2011). De la même manière, l'étude de la mutation 1795insD a nécessité l'utilisation de trois modèles pour comprendre l'explication du phénotype associé (Remme et al., 2006). Au vu des résultats obtenus sur le modèle murin et au vu de la position de la mutation Δ QKP dans la boucle reliant les domaines DIII et DIV de Nav1.5, l'effet sur la dépendance au potentiel du canal semble cohérent et en faveur du phénotype arythmogène observé.

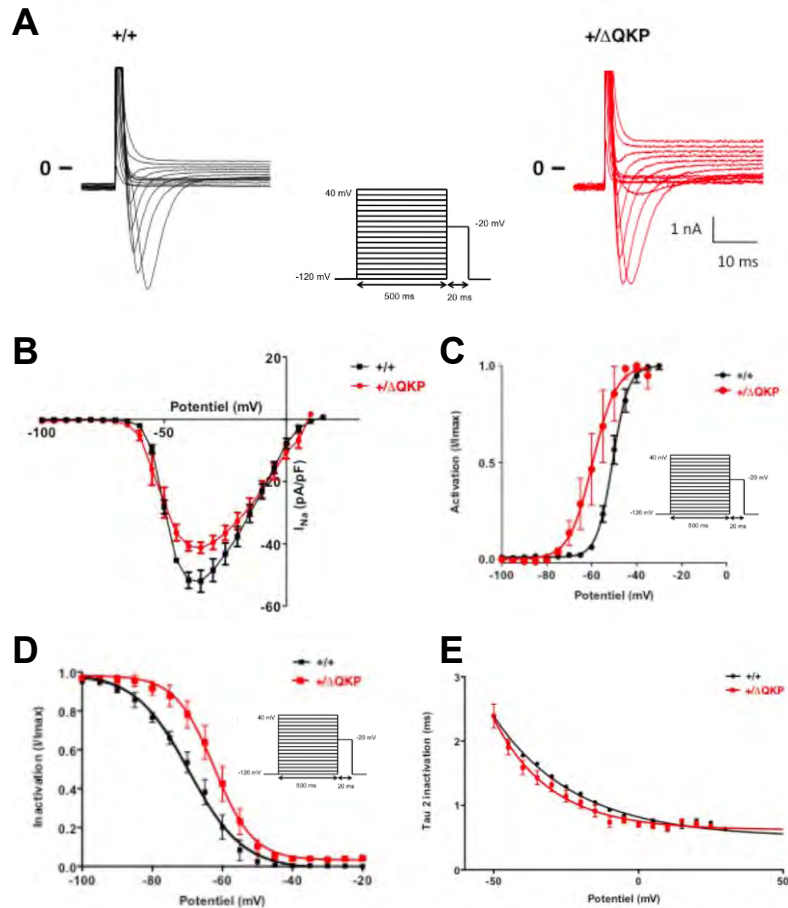


Figure 53 : Propriétés du courant sodique dans des cardiomyocytes issus de souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP}. A. Exemples de courants sodiques enregistrés dans des cardiomyocytes contrôles *Scn5a*^{+/+} (gauche) et *Scn5a*^{+/ Δ QKP} (droite). B. Densité du courant sodique en fonction du potentiel dans les cardiomyocytes de souris *Scn5a*^{+/+} (noir, n=5) et *Scn5a*^{+/ Δ QKP} (rouge, n=5). C. Dépendance au potentiel de l'activation du courant sodique dans les cardiomyocytes de souris *Scn5a*^{+/+} (noir, n=5) et *Scn5a*^{+/ Δ QKP} (rouge, n=5). D. Dépendance au potentiel de l'inactivation du courant sodique dans les cardiomyocytes de souris *Scn5a*^{+/+} (noir, n=6) et *Scn5a*^{+/ Δ QKP} (rouge, n=6). E. Dépendance au potentiel de la constante d'inactivation lente du courant sodique dans les cardiomyocytes de souris *Scn5a*^{+/+} (noir, n=10) et *Scn5a*^{+/ Δ QKP} (rouge, n=5).

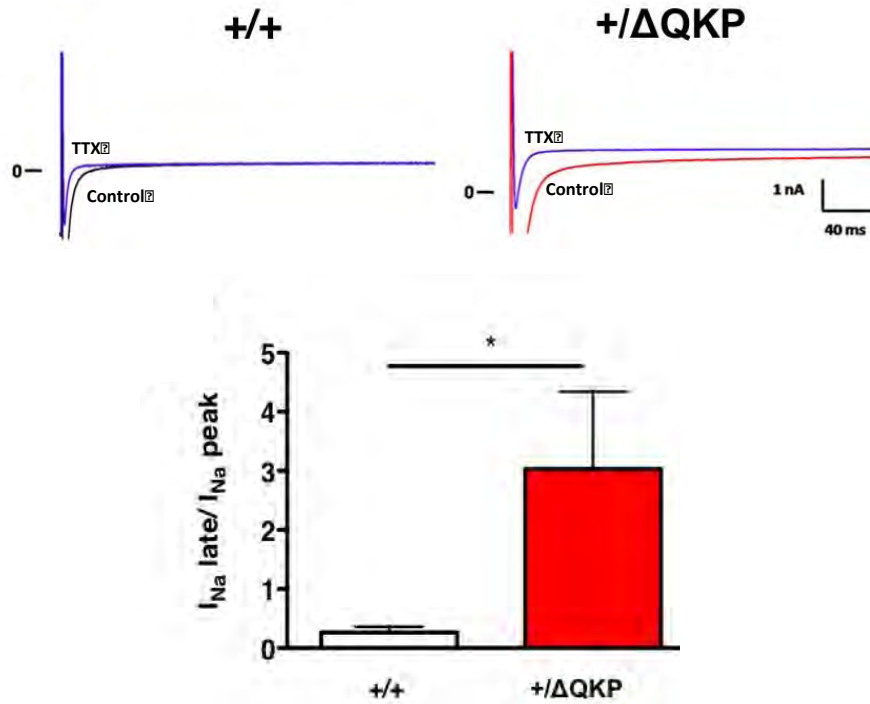


Figure 54 : Courant sodique persistant dans des cardiomyocytes issus de souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP}. Haut : Exemples de courants sodiques enregistrés dans des cardiomyocytes contrôles *Scn5a*^{+/+} (gauche) et *Scn5a*^{+/ Δ QKP} (droite) avec et sans TTX (30 μ M). Bas : Courant sodique persistant normalisé par rapport au courant au pic dans les cardiomyocytes de souris *Scn5a*^{+/+} (blanc, n=4) et *Scn5a*^{+/ Δ QKP} (rouge, n=4), * $P < 0,05$.

- Discussion générale -

Discussion générale

L'activité électrique des tissus excitables est contrôlée par le passage d'ions de part et d'autre de la membrane plasmique au travers de canaux ioniques. Parmi les canaux ioniques essentiels à l'activité électrique cardiaque, le canal sodique Nav1.5, codé par le gène *SCN5A*, est responsable de la genèse et de la propagation de l'influx électrique cardiaque. Au cours de ces dernières années, de nombreuses mutations sur le gène *SCN5A* ont été associées à diverses pathologies cardiaques. Fonctionnellement, ces mutations peuvent être regroupées en deux groupes, celles qui induisent une perte de fonction du canal et celles qui induisent un gain de fonction. Ainsi, les mutations dites « perte de fonction » ont été reliées au syndrome de Brugada et aux troubles progressifs de la conduction cardiaque alors que celles dites « gain de fonction » ont été reliées au syndrome du QT long de type 3. Le canal sodique Nav1.5 a fait l'objet de nombreuses études autant *in vitro* que *in vivo* qui ont conduit à une meilleure compréhension du fonctionnement et surtout des dysfonctionnements de ce canal. Ces études ont aussi fait émerger l'idée selon laquelle Nav1.5 n'est pas un canal isolé dans la membrane plasmique. La notion de complexe macromoléculaire prend ici tout son sens, avec ses sous-unités et protéines régulatrices mais aussi avec d'autres protéines interagissant avec le canal sodique.

Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse a été de comprendre les mécanismes physiopathologiques qui relient le canal sodique Nav1.5 aux troubles du rythme cardiaque en lien avec des modifications de la structure cardiaque. Dans une première partie je me suis intéressé au remodelage myocardique chez les souris *Scn5a*^{+/-} à l'origine de la fibrose cardiaque. Dans un second temps, je me suis intéressé à la caractérisation de la souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP} comme nouveau modèle de syndrome du QT long de type 3.

1 LE MODELE MURIN *SCN5A*^{+/-}

Notre première étude basée sur la compréhension des mécanismes fibrotiques liés à la perte de fonction du canal sodique montre le rôle central de la présence du canal à la membrane plasmique plutôt que du courant sodique dans la genèse des processus fibrotiques. Les premières études visant à caractériser le modèle *Scn5a*^{+/-} ont permis de montrer que les souris invalidées à l'état hétérozygote pour *Scn5a* développaient une fibrose focale à un âge avancé (plus de 80 semaines) alors que les troubles de la conduction étaient visibles dès dix semaines (Royer, 2005; van Veen, 2005). Au cours de notre étude, nous avons pu montrer que le processus fibrotique débutait dès 45 semaines et qu'il était associé avec l'activation de la voie du TGF- β . La voie du TGF- β est connue pour être pro-fibrotique au travers de l'activation des fibroblastes et de la synthèse de collagène (Bhattacharyya et al., 2009; Carthy et al., 2011). Le TGF- β a été récemment montré comme un régulateur du courant sodique en augmentant sa densité (Kaur et al., 2013). L'activation de cette voie de signalisation pourrait alors palier à la réduction de densité de courant observée dans le modèle *Scn5a*^{+/-} (Leoni et al., 2010) et ainsi réduire les troubles de la conduction associés. Cependant les troubles de la conduction s'aggravent avec l'âge et il semble

que cette régulation du courant sodique par le TGF- β soit minime vis-à-vis de son effet sur le processus fibrotique.

La voie du TGF- β a précédemment été mise en évidence dans le modèle *Scn5a*^{+/-} au niveau du nœud sinusal. La proportion de fibroblastes chez les souris mutées était supérieure à celle observée chez les souris contrôles (Hao et al., 2011). Cette étude pointe le rôle du canal sodique Nav1.5 dans la prolifération directe ou indirecte des fibroblastes. La première preuve de la présence du canal sodique Nav1.5 dans des fibroblastes issus d'une lignée auriculaire a été apportée par Li et ses collaborateurs (Li et al., 2009). De manière contradictoire, une étude plus récente montre au niveau de fibroblastes atriaux humains que l'expression de Nav1.5 est négligeable. Elle semble augmenter au cours de leur différenciation en myofibroblastes (Chatelier et al., 2012). Au sein de l'équipe, nous avons montré (données non publiées) que l'expression de Nav1.5 diminuait au cours de la prolifération et de la différenciation des fibroblastes ventriculaires dans le modèle murin *Scn5a*^{+/-}. En parallèle, nous avons aussi pu montrer que certains marqueurs fibrotiques tels que les facteurs SPARC et CTGF étaient augmentés chez les souris *Scn5a*^{+/-} comparées aux sauvages. Bien que l'expression de Nav1.5 au sein des fibroblastes soit encore discutée, cela ouvre la voie à un rôle des canaux sodiques dans les fibroblastes cardiaques, qu'ils soient quiescents ou actifs. Une différence majeure entre ces deux hypothèses réside dans l'origine des fibroblastes cardiaques. En raison des contraintes mécaniques, le profil transcriptomique des fibroblastes atriaux pourrait être différent de celui des fibroblastes ventriculaires. En raison du potentiel de repos très dépolarisé des fibroblastes, le canal sodique n'aurait pas ici un rôle de canal ionique au sens strict du terme. Cependant, il semble que le courant de fenêtre sodique soit plus important dans les fibroblastes que dans les cardiomyocytes (Chatelier et al., 2012) et que la fenêtre de potentiel de ce courant corresponde au potentiel de repos de fibroblastes. Au sein du myocarde, les fibroblastes sont des mechanosenseurs (Kamkin et al., 2005) et le canal sodique au travers de l'interaction de ses segments S4 avec les lipides membranaires pourrait participer à ce processus (Beyder et al., 2010) et ainsi augmenter sa fenêtre de sensibilité au potentiel. Une très faible augmentation du courant de fenêtre ayant été montrée comme pouvant avoir des conséquences arythmiques importantes au sein des cardiomyocytes (Huang et al., 2011). Ainsi, une entrée massive de sodium associée avec un étirement des fibroblastes pourrait générer foyers arythmiques et induire des circuits de réentrées si ces fibroblastes sont couplés avec les cardiomyocytes. En tant que mechanosenseur, le canal sodique pourrait être aussi un acteur important du couplage étirement-transcription au sein du myocarde en participant possiblement à la transcription de facteurs pro-fibrotiques (Chiquet et al., 2009).

Nous avons aussi montré une augmentation de l'expression de la Cx43 chez les souris *Scn5a*^{+/-} jusqu'à l'âge de 30 semaines soit avant que le processus fibrotique ne se mette en place. Chez les souris *Scn5a*^{+/-} de plus de 45 semaines, lorsque le processus fibrotique est enclenché, cette augmentation de la Cx43 n'est plus présente. De plus, nous avons montré que, de manière physiologique, l'expression de la Cx43

diminue drastiquement chez les souris sauvages à cet âge. Cette réduction de l'expression de la Cx43 a été retrouvée dans un autre modèle murin d'hypertrophie induite par la calcineurine (Fontes et al., 2014). Les études immunohistochimiques nous ont permis de montrer qu'en dépit de l'augmentation de l'expression de la Cx43 chez les souris *Scn5a*^{+/-}, celle-ci ne pouvait pas s'organiser en plaques fonctionnelles. Nous avons montré que les plaques de connexine 43 étaient plus petites et donc plus nombreuses. Ces observations conduisent à penser que le canal sodique organise et/ou stabilise l'assemblage de la Cx43. Des travaux récents montrent en effet que Nav1.5 interagit avec la Cx43 située au niveau du perinexus (Rhett et al., 2012). Le canal Nav1.5 pourrait alors avoir un rôle facilitateur dans l'accumulation de la Cx43 dans les plaques fonctionnelles. Comme le suggèrent les résultats de notre étude, une perte du canal sodique empêcherait la formation de ces plaques de Cx43 malgré une augmentation de son expression. La Cx43 libre étant augmentée, celle-ci pourrait permettre une communication entre les cardiomyocytes et les myo/fibroblastes adjacents. En effet, l'expression de la Cx43 augmente au sein des myofibroblastes atriaux au cours des processus fibrotiques. En perspective de ce travail, l'étude de l'interaction entre les cardiomyocytes et les fibroblastes ou les myofibroblastes pourrait apporter des informations quant au rôle pathologique de la Cx43 dans la physiopathologie des troubles progressifs de la conduction. Le Rotigaptide est un peptide anti-arythmique qui a pour effets d'augmenter l'expression de la Cx43 à la membrane des cardiomyocytes et de prévenir le découplage de la Cx43 (Kjølbye et al., 2008; Lin et al., 2008). Si l'hypothèse de la corrélation entre la chute d'expression de la Cx43 et la mise en place du processus fibrotique s'avère exacte, le traitement des souris *Scn5a*^{+/-} avec cette molécule de manière chronique pourrait être une voie thérapeutique intéressante.

L'influence du fond génétique est aujourd'hui reconnue comme étant un acteur majeur de la diversité phénotypique observée au sein d'une même étude et entre différentes études. L'étude des souris *Scn5a*^{+/-} décrite ici a été faite sur un fond génétique stable 129Sv/P2. Cette souche de souris n'est pas la principale souche utilisée pour les modèles murins en cardiologie (Barnabei et al., 2010) mais possède un avantage majeur pour l'étude des troubles progressifs de la conduction cardiaque en comparaison avec les souris C57Bl6/J couramment utilisées. En effet, de manière physiologique et comme cela est retrouvé chez l'Homme, la durée du complexe QRS de ces souris est assez variable d'après les données du Jackson Lab (<http://phenome.jax.org/>). A l'inverse, les souris qui sont sur un fond génétique C57Bl6/J ont de manière physiologique une durée de complexe QRS plus court et moins variable entre les animaux. Des résultats préliminaires de l'équipe confirment ces données de la littérature. Dès le premier croisement entre le fond 129Sv/P2 et un fond C57Bl6, l'hétérogénéité de durée du complexe QRS est perdue et un seul phénotype de souris *Scn5a*^{+/-} est observé. Ce phénotype correspond à celui des souris présentant l'élargissement du QRS le moins marqué sur le fond 129Sv/P2. Le décours de la pathologie est très différent, ces souris ne présentant pas les signes de remodelages observés sur le fond 129Sv/P2. Cette différence de phénotype entre deux souches a été observée dans la littérature pour la mutation 1798insD du gène *Scn5a*. Bien que possédant la même mutation 1798insD, les souris sur fond 129P2 et

FVB/N ne présentent pas la même sévérité de leurs troubles de la conduction cardiaque (Remme et al., 2009a). Des études de transcriptomique et de génétique ont montré que ces différences étaient liées à des différences de gènes tels que la sous-unité régulatrice $\beta 4$ (Remme et al., 2009a) ainsi que de nombreux polymorphismes associés avec des gènes modulateurs de la conduction cardiaque (Scicluna et al., 2011). Dans le cadre des souris *Scn5a*^{+/-}, une étude comparative de cet ordre serait intéressante à mettre en œuvre afin de mettre en avant des gènes ou des polymorphismes modulateurs de la conduction cardiaque.

2 LE MODELE MURIN *SCN5A*^{+/ Δ QKP}

Dans la seconde partie de ma thèse je me suis concentré sur la caractérisation d'un nouveau modèle murin du syndrome du QT long de type 3, la souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP}, mais aussi sur la compréhension des mécanismes pouvant être mis en cause dans le développement d'une cardiomyopathie dilatée. Nous avons montré que ces souris présentaient le tableau clinique retrouvé chez les patients avec l'allongement de l'intervalle QTc mais aussi des épisodes d'arythmies ventriculaires. Nous avons montré que ces souris souffraient d'une insuffisance cardiaque avec une dilatation du ventricule droit et une forte mortalité prématurée observée dès l'âge de 3 semaines. Cette mortalité est retrouvée de manière moins marquée dans d'autres modèles du QT long de type 3 tels que la souris N₁₃₂₅S (Tian et al., 2004). Le premier cas index pour cette mutation rapporté dans la littérature en 2003 ne présente pas un tableau clinique très marqué et n'a été diagnostiqué que tardivement (vers 40 ans) dans un tout autre contexte (Keller et al., 2003). A l'inverse, le cas index rapporté en 2008 présente un tableau clinique bien plus marqué et ce dès la naissance (Shi et al., 2008). Ces deux travaux montrent donc une hétérogénéité de phénotype lié à la mutation Δ QKP sur le gène *SCN5A* allant d'un allongement de l'intervalle QT asymptomatique à des épisodes de fibrillation ventriculaire répétés. Cette même diversité a pu être observée au cours de la caractérisation des souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP}.

Les β -bloquants constituent le principal traitement du syndrome du QT long de manière générale et du syndrome de type 3 en particulier selon les recommandations de la Haute Autorité de Santé et les dernières recommandations de l'HRS/EHRA/AHA en 2013 (Priori et al., 2013b). Quelques données suggèrent que les souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP} présenteraient des signes d'activation de la voie de signalisation dépendante de la PKA à savoir la phosphorylation de la Ser16 du phospholamban. Ces observations sont retrouvés dans le modèle murin sur-exprimant la PKA et associé à une insuffisance cardiaque (Antos et al., 2001). La PKA est connue pour être activée par les récepteurs $\beta 1$ -adrénergiques et une sur-activation de la PKA a été liée avec le développement d'une cardiomyopathie dilatée associée à des épisodes de mort subite (Antos et al., 2001). Il est intéressant de noter que l'activation prolongée des récepteurs $\beta 1$ -adrénergiques est connue pour activer la CaMKII au travers d'une voie dépendante de la PKC (Grimm and Brown, 2010). La cible visée par l'utilisation des β -bloquants dans le cadre du syndrome du QT long de type 3 pourrait alors être d'une part la PKA mais aussi la CaMKII. L'inhibition de la CaMKII

au travers des β -bloquants aurait pour effet de réduire le courant sodique persistant (Shryock et al., 2013) déjà augmenté avec la mutation ΔQKP mais aussi de prévenir les troubles du rythme associés à sa sur-activation (Qi et al., 2009). Il est intéressant de noter que l'activation de la PKA n'a pas été observée dans le ventricule droit des souris *Scn5a*^{+/ ΔQKP} . La surexpression de l'échangeur NCX1 observée dans notre étude est en corrélation avec l'absence d'activation de la voie PKA. En effet, une surexpression de NCX1 réduit la réponse β -adrénergique et donc inhibe l'activation de la PKA (Sato et al., 2004).

Dans cette étude, nous avons montré que les souris *Scn5a*^{+/ ΔQKP} présentaient une insuffisance cardiaque droite avec une stase veineuse hépatique importante alors que la dysfonction gauche semble moins prononcée. Cette atteinte préférentielle du ventricule droite est retrouvée dans d'autres pathologies telles que la dysplasie arythmogène du ventricule droit qui débute à droite et tend à se généraliser aux deux ventricules (Saffitz et al., 2010). Aucune mutation sur le canal sodique n'a été associée avec l'ARVC à ce jour. En revanche, de très nombreuses mutations sur les protéines des desmosomes ont été associées, parmi lesquelles on retrouve la plakophiline-2. En cas de perte d'expression de la plakophiline-2, l'expression du canal sodique est diminuée (Cerrone et al., 2012). La mutation ΔQKP , localisée dans la boucle reliant les domaines DIII et DIV du canal, proche du site d'interaction entre le canal et l' α -actinine (Ziane et al., 2010), l'interaction entre le canal et le cytosquelette peut être perturbée. Cette atteinte structurale du ventricule droit conforte l'idée selon laquelle l'interaction entre le canal sodique et ses partenaires est essentielle pour maintenir une fonction cardiaque correcte.

L'augmentation du courant sodique persistant est connue pour augmenter la concentration de calcium intracellulaire et activer la calmoduline en formant un complexe Ca^{2+} -calmoduline. Ce complexe est un effecteur majeur dans la cellule pouvant activer soit la CaMKII soit la calcineurine. Le modèle murin N₁₃₂₅S présente une augmentation de l'activité de la CaMKII en adéquation avec cette hypothèse (Zhang et al., 2011). De manière surprenante, l'activation de la voie CaMKII n'a pas été retrouvée dans notre étude en dépit d'une augmentation de l'expression de la CaMKII. La calmoduline est connue pour avoir deux sites d'interaction avec le canal sodique : la partie C-terminale (domaine IQ) et la boucle reliant les domaines DIII et DIV. Une méta-analyse a récemment confirmé ces sites d'interaction et montre que la mutation ΔQKP se situe au centre de la zone d'interaction au niveau de la boucle intracellulaire (Mruk et al., 2014). Concernant la mutation ΔKPQ située juste en amont, aucune étude ne s'est intéressée à ce jour à l'activation de la CaMKII dans le modèle historique de syndrome du QT long de type 3. Les travaux de Shah et ses collaborateurs ont montré que la fixation de la calmoduline sur la partie C-terminale était responsable du décalage de la courbe d'inactivation du courant sodique vers des potentiels plus positifs (Shah et al., 2006). Nos résultats préliminaires montrent un décalage vers des potentiels plus positifs de la courbe d'inactivation du canal sodique portant la mutation ΔQKP . Cette observation est davantage favorable à une interaction plus forte entre le canal sodique muté et la calmoduline que l'inverse. Ceci corrobore l'idée selon laquelle la disponibilité de la calmoduline *via* son interaction avec Nav1.5 semble être un acteur majeur dans le phénotype observé chez les souris

Scn5a^{+/ Δ QKP}.

Au delà du mécanisme mis en jeu chez les souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP}, l'hypothèse d'une interaction modifiée avec l' α -actinine et/ou la calmoduline apporte un argument de plus à la théorie selon laquelle le canal sodique a un rôle de protéine d'ancrage impliqué dans de nombreuses pathologies au travers de ses partenaires. En perspective de ce travail, il serait intéressant d'investiguer l'interaction entre le canal sodique et la calmoduline chez les souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP} puisqu'une augmentation de l'interaction pourrait conduire à une séquestration de la calmoduline et empêcher l'activation de la CaMKII et une diminution de l'interaction avec le canal pourrait au contraire empêcher sa localisation et réduire l'activation de la CaMKII.

Sur le plan thérapeutique, nous avons montré dans cette étude que le traitement en aigu avec la Ranolazine, l'inhibiteur le plus spécifique du courant sodique persistant disponible à l'heure actuelle (Antzelevitch et al., 2004), supprimait les troubles du rythme et tendait à normaliser l'intervalle QTc. Le problème majeur de la Ranolazine est son temps d'activité très court puisque l'effet n'est plus présent au bout d'à peine 10 minutes. Dans une étude clinique réalisée chez des patients atteints de la mutation Δ KPQ sur le gène *SCN5A*, Moss et ses collaborateurs montrent que l'effet bénéfique du traitement disparaît 2 heures après l'arrêt du traitement et ce malgré une perfusion de 8 heures (Moss et al., 2008). Des essais d'administration de la Ranolazine de manière chronique aux souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP} ont été réalisés sans que cela ne donne de résultat bénéfique sur une semaine de traitement dans l'eau de boisson. Les études MARISA, CARISA et ERICA réalisées chez des patients en stade III et IV de la NYHA montrent un effet bénéfique de la Ranolazine sur la fonction cardiaque (Chaitman, 2006). Dans ces études, la cible supposée de la Ranolazine est la β -oxydation des acides gras et non le canal sodique cardiaque. Plus récemment, l'étude RALI-DHF confirme un effet bénéfique de la Ranolazine sur la fonction cardiaque en mettant au centre de cet effet l'inhibition du courant sodique persistant associé aux cas d'insuffisance cardiaque (Maier et al., 2013). Parmi les raisons pouvant expliquer l'absence d'effet bénéfique sur une semaine chez les souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP}, la dose et le mode d'administration utilisés peuvent être en cause. En effet, deux doses de Ranolazine (14 mg/kg/j et 30 mg/kg/j) ont été utilisées et administrées dans l'eau de boisson. Les études réalisées chez l'Homme font état de trois prises journalières de plus de 250 mg chacune. De plus, aucune étude publiée chez la souris n'utilise la Ranolazine solubilisée dans l'eau de boisson. D'autres doses et d'autres moyens d'administration tel que l'incorporation dans l'alimentation seraient à investiguer. Aucun essai clinique ne montre pour le moment d'effet de la Ranolazine chez des patients souffrant de QT long et n'ayant pas d'insuffisance cardiaque associée. Un essai clinique de phase 2 portant sur 60 patients porteurs de mutations associées à un syndrome du QT long de type 3 visant à montrer l'efficacité du traitement à 2 mois et 6 mois va être lancé aux Etats-Unis (NCT01648205). Un autre essai clinique de phase 2 visant à montrer le potentiel anti-arythmique de la Ranolazine chez des patients porteurs de la mutation Δ KPQ va être lancé en Israël (NCT01728025). Actuellement en cours de caractérisation, un autre inhibiteur du courant

sodique, le GS-967, plus spécifique encore que la Ranolazine est en cours de développement (Belardinelli et al., 2013) et pourrait apporter des bénéfices plus élevés.

3 PERTINENCE DES MODELES D'ETUDE DE NAV1.5

Le canal sodique Nav1.5 est étudié depuis de nombreuses années dans des modèles de réexpression ou des modèles animaux. Ces études ont apporté une grande connaissance sur la relation génotype-phénotype des pathologies liées aux mutations sur le canal sodique. Ces modèles cellulaires expliquent cependant difficilement l'étendue des conséquences moléculaires et structurales que peuvent avoir ces mutations. Ces modèles simples ont l'avantage de placer le canal ionique dans un environnement totalement maîtrisé en s'affranchissant de sa modulation par telle ou telle protéine régulatrice. Certaines études essaient par transfection d'apporter des protéines régulatrices dans ces modèles mais ceci présente deux limites importantes. D'une part, la sur-expression conjointe d'un canal et d'une protéine régulatrice ne permet pas de recréer la stoechiométrie existante *in vivo* entre ces deux protéines. D'autre part, le canal sodique fonctionnant au sein d'un complexe multi-protéique, l'ajout d'une seule protéine régulatrice peut avoir des effets différents de ce que l'on observe *in vivo*. Ces études restent cependant indispensables pour comprendre la régulation du canal ou le *screening* des effets d'un variant mais ne doit pas être trop extrapolé au niveau des conséquences *in vivo*. Un des exemples les plus marquants quant à la différence d'effets entre le modèle *in vitro* et *in vivo* est rapporté par l'étude de la mutation D1275N sur le gène *SCN5A*. Suivant que l'on se place dans des cellules tsA201, CHO ou dans des cardiomyocytes, l'effet de la mutation D1275N est différent. Aucun effet de la mutation n'avait été observé dans les modèles de réexpression alors que des effets nets sur la densité du courant sodique et son inactivation ont été vus dans des cardiomyocytes (Watanabe et al., 2011). Des différences phénotypiques du même type ont aussi été observées lors de l'étude la mutation 1795insD. Dans les ovocytes de Xénope cette mutation induit uniquement une diminution de 50% de la densité du courant sodique associée avec un décalage des courbes d'activation et d'inactivation (Bezzina et al., 1999). Dans les cellules HEK293, une augmentation du courant sodique persistant a été associée à cette mutation (Veldkamp et al., 2000) et ce n'est que sur des cardiomyocytes que l'hypothèse d'une altération du trafic du canal à la membrane a été posée (Remme et al., 2006).

Le fonctionnement du canal sodique dans son environnement protéique est encore mal connu. L'identification de mutations sur le canal sodique associées aux cardiomyopathies dilatées a fait émerger l'idée selon laquelle une atteinte du canal sodique n'avait pas seulement des conséquences électriques mais pouvait aussi avoir des conséquences structurales. Le fait que les embryons de souris *Scn5a*^{-/-} et de souris *Scn5a*^{AKPQ/ΔKPQ} ne soient pas viables en raison d'anomalies structurales est un argument fort en faveur du rôle structural de Nav1.5 (Nuyens et al., 2001; Papadatos et al., 2002). Comme nous avons pu le montrer dans la première partie de cette thèse, le modèle murin hétérozygote pour le canal sodique Nav1.5 présente un remodelage de l'expression et de l'organisation de la Cx43

ainsi que l'activation de la voie du TGF- β . Dans la seconde partie de cette thèse nous avons montré qu'en plus de la dysfonction électrique, une dysfonction mécanique est présente chez des souris porteuses d'une mutation sur le canal sodique. Ceci ne remet pas en cause le potentiel arythmogène d'une dysfonction biophysique du canal sodique mais le canal Nav1.5 doit désormais être considéré comme une partie d'un tout. Ces observations ne sont possibles que par l'utilisation de modèles animaux. Comme nous avons pu le voir précédemment, le choix de la souche utilisée pour la génération d'un modèle murin peut constituer une limite importante dans l'étude du remodelage protéique secondaire à une mutation sur le canal sodique. A l'inverse, une étude comparative des fonds génétiques présentant des phénotypes différents peut aboutir à la mise en évidence de facteurs régulateurs de l'activité électrique cardiaque. Les études génétiques récentes montrent que la physiologie du canal sodique est encore plus complexe. L'expression de variants génétiques fréquents sur les gènes *SCN10A* et *HEY2* a récemment été montré comme modulant le phénotype observé chez les patients (Bezzina et al., 2013). Les modèles animaux possèdent leurs propres variants fréquents qui ne sont pas ceux des patients et ceci peut limiter l'extrapolation des données chez l'Homme.

L'utilisation de cardiomyocytes issus de cellules iPS (*induced Pluripotent Stem*) pourrait être une alternative aux systèmes de réexpression et aux modèles animaux. En effet ces cellules issues des patients possèdent les variants génétiques présents chez le patient et l'ensemble des protéines appartenant au complexe protéique du canal sodique est présent. Cependant, les cardiomyocytes ainsi obtenus présentent une maturité électrique et structurale (disques intercalaires, tubules T, jonctions communicantes) hétérogène au sein de la culture et différente de celle des cardiomyocytes à proprement parler. A l'heure actuelle, les cardiomyocytes obtenus ressemblent plus à des cardiomyocytes néonataux qu'à des cardiomyocytes adultes. Les niveaux d'expression des partenaires de Nav1.5 ne sont pas connus à ce niveau de maturité des cardiomyocytes. Dans l'hypothèse où ces protéines soient présentes dans des proportions identiques à celles observée dans des cardiomyocytes adultes, leurs interactions les uns vis-à-vis des autres n'est pas déterminé dans ce modèle. De plus, les pathologies progressives ou l'insuffisance cardiaque sont des pathologies au long court qui impliquent une imprégnation des cardiomyocytes dans un environnement pathologique subissant des contraintes mécaniques importantes. Ces conditions de vieillissement et de contraintes ne sont pas applicables *in vitro*. Les avancées récentes permettent de distinguer des cardiomyocytes atriaux, nodaux et ventriculaires mais l'architecture du cœur est bien plus complexe que cela. Le ventricule droit n'est pas le ventricule gauche, un cardiomyocyte sous-épicaire n'est pas un cardiomyocyte sous-endocardique. Ces différences fines ne sont pas encore maîtrisables avec les cardiomyocytes issus de cellules iPS mais la recherche doit être poursuivie pour y tendre. Malgré ces limites, des études récentes utilisant ces cellules retrouvent des données en adéquation avec ce que l'on observe chez les patients atteints de syndrome du QT long ou de tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique (CPVT). Ces cellules restent néanmoins de très bons candidats pour le *screening* de traitements visant à agir sur l'activité d'un canal et ont un fort potentiel dans les années à venir autant pour la recherche fondamentale que pour la recherche clinique

(Priori et al., 2013a).

Ces deux études permettent une avancée dans la compréhension des mécanismes arythmogènes et permettent de mieux comprendre les mécanismes reliant le canal Nav1.5 aux cardiomyopathies. Cela ouvre aussi la voie à de nouvelles thérapies ciblées visant soit à ralentir le processus fibrotique rencontré dans les cas de troubles progressifs de la conduction cardiaque, soit à réduire les troubles du rythme létaux rencontrés dans les cas de syndrome du QT long de type 3. Pour ces deux pathologies, les mécanismes moléculaires fins restent cependant encore à élucider.

Bibliographie

- Abriel, H., Cabo, C., Wehrens, X. H., Rivolta, I., Motoike, H. K., Memmi, M., Napolitano, C., Priori, S. G., and Kass, R. S. (2001). Novel Arrhythmogenic Mechanism Revealed by a Long-QT Syndrome Mutation in the Cardiac Na⁺ Channel. *Circ. Res.* 88, 740–745.
- Adam, O., Lavall, D., Theobald, K., Hohl, M., Grube, M., Ameling, S., Sussman, M. A., Rosenkranz, S., Kroemer, H. K., Schäfers, H. J., et al. (2010). Rac1-Induced Connective Tissue Growth Factor Regulates Connexin 43 and N-Cadherin Expression in Atrial Fibrillation. *JAC* 55, 469–480.
- Adelman, W. J., and Palti, Y. (1969). The influence of external potassium on the inactivation of sodium currents in the giant axon of the squid, *Loligo pealei*. *J. Gen. Physiol.* 53, 685–703.
- Adsit, G. S., Vaidyanathan, R., Galler, C. M., Kyle, J. W., and Makielski, J. C. (2013). Channelopathies from mutations in the cardiac sodium channel protein complex. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 61, 34–43.
- Agullo-Pascual, E., and Delmar, M. (2012). The Noncanonical Functions of Cx43 in the Heart. *J. Membr. Biol.* 245(8):477-82.
- Aiba, T., Hesketh, G. G., Liu, T., Carlisle, R., Villa-Abrille, M. C., O'Rourke, B., Akar, F. G., and Tomaselli, G. F. (2010). Na⁺ channel regulation by Ca²⁺/calmodulin and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in guinea-pig ventricular myocytes. *Cardiovasc. Res.* 85, 454–463.
- Aistrup, G. L., Gupta, D. K., Kelly, J. E., O'Toole, M. J., Nahhas, A. F., Chirayil, N., Misener, S., Beussink, L., Singh, N., Ng, J., et al. (2013). Inhibition of the Late Sodium Current Slows T-tubule Disruption During the Progression of Hypertensive Heart Disease in the Rat. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*.
- Akar, F. G., Spragg, D. D., Tunin, R. S., Kass, D. A., and Tomaselli, G. F. (2004). Mechanisms underlying conduction slowing and arrhythmogenesis in nonischemic dilated cardiomyopathy. *Circ. Res.* 95, 717–725.
- Akylbekova, E. L., Payne, J. P., Newton-Cheh, C., May, W. L., Fox, E. R., Wilson, J. G., Sarpong, D. F., Taylor, H. A., and Maher, J. F. (2014). Gene-environment interaction between SCN5A-1103Y and hypokalemia influences QT interval prolongation in African Americans: the Jackson Heart Study. *American Heart Journal* 167, 116–122.e1.
- Alings, M., and Wilde, A. (1999). “Brugada” Syndrome : Clinical Data and Suggested Pathophysiological Mechanism. *Circulation* 99, 666–673.
- Allouis, M., Le Bouffant, F., Wilders, R., Pérez, D., Schott, J.-J., Noireaud, J., Le Marec, H., Mérot, J., Escande, D., and Baró, I. (2006). 14-3-3 is a regulator of the cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5. *Circ. Res.* 98, 1538–1546.
- Amin, A. S., Asghari-Roodsari, A., and Tan, H. L. (2009). Cardiac sodium channelopathies. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 460, 223–237.
- Amin, A. S., Pinto, Y. M., and Wilde, A. A. (2013). Long QT syndrome: beyond the causal mutation. *J. Physiol. (Lond.)*.
- Amin, A. S., Tan, H. L., and Wilde, A. A. (2010). Cardiac ion channels in health and disease. *Heart Rhythm* 7, 117–26.
- An, R. H., Wang, X. L., Kerem, B., Benhorin, J., Medina, A., Goldmit, M., and Kass, R. S. (1998). Novel LQT-3 mutation affects Na⁺ channel activity through interactions between alpha- and beta1-

- subunits. *Circ. Res.* 83, 141–146.
- Anderson, K. P., Walker, R., Urie, P., Ershler, P. R., Lux, R. L., and Karwande, S. V. (1993). Myocardial electrical propagation in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Journal of Clinical Investigation* 92, 122–140.
- Anderson, P. A., and Greenberg, R. M. (2001). Phylogeny of ion channels: clues to structure and function. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 129, 17–28.
- Andrikopoulos, P., Fraser, S. P., Patterson, L., Ahmad, Z., Burcu, H., Ottaviani, D., Diss, J. K. J., Box, C., Eccles, S. A., and Djamgoz, M. B. A. (2011). Angiogenic functions of voltage-gated Na⁺ channels in human endothelial cells: modulation of Vascular endothelial growth factor (VEGF) signalling. *Journal of Biological Chemistry*.
- Annes, J. P., Munger, J. S., and Rifkin, D. B. (2003). Making sense of latent TGFβ activation. *J. Cell. Sci.* 116, 217–224.
- Antos, C. L., Frey, N., Marx, S. O., Reiken, S., Gaburjakova, M., Richardson, J. A., Marks, A. R., and Olson, E. N. (2001). Dilated Cardiomyopathy and Sudden Death Resulting From Constitutive Activation of Protein Kinase A. *Circ. Res.* 89, 997–1004.
- Antzelevitch, C., and Shimizu, W. (2002). Cellular mechanisms underlying the long QT syndrome. *Curr. Opin. Cardiol.* 17, 43–51.
- Antzelevitch, C., Belardinelli, L., Zygmunt, A. C., Burashnikov, A., Di Diego, J. M., Fish, J. M., Cordeiro, J. M., and Thomas, G. (2004). Electrophysiological effects of ranolazine, a novel antianginal agent with antiarrhythmic properties. *Circulation* 110, 904–10.
- Antzelevitch, C., Brugada, P., Brugada, J., and Brugada, R. (2005). Brugada syndrome: from cell to bedside. *Curr Probl Cardiol* 30, 9–54.
- Antzelevitch, C., Sicouri, S., Litovsky, S. H., Lukas, A., Krishnan, S. C., Di Diego, J. M., Gintant, G. A., and Liu, D. W. (1991). Heterogeneity within the ventricular wall. Electrophysiology and pharmacology of epicardial, endocardial, and M cells. *Circ. Res.* 69, 1427–1449.
- Anyukhovsky, E. P., Sosunov, E. A., Kryukova, Y. N., Prestia, K., Ozgen, N., Rivaud, M., Cohen, I. S., Robinson, R. B., and Rosen, M. R. (2010). Expression of skeletal muscle sodium channel (Nav1.4) or connexin32 prevents reperfusion arrhythmias in murine heart. *Cardiovasc. Res.* 89, 1–10.
- Appleton, G. O., Li, Y., Taffet, G. E., Hartley, C. J., Michael, L. H., Entman, M. L., Roberts, R., and Khoury, D. S. (2004). Determinants of cardiac electrophysiological properties in mice. *J Interv Card Electrophysiol* 11, 5–14.
- Artaud-Macari, E., Goven, D., Brayer, S., Hamimi, A., Besnard, V., Marchal-Somme, J., Ali, Z. E., Crestani, B., Kerdine-Römer, S., Boutten, A., et al. (2013). Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 nuclear translocation induces myofibroblastic dedifferentiation in idiopathic pulmonary fibrosis. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 66–79.
- Asazuma-Nakamura, Y., Dai, P., Harada, Y., Jiang, Y., Hamaoka, K., and Takamatsu, T. (2009). Cx43 contributes to TGF-β signaling to regulate differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *Exp. Cell Res.* 315, 1190–1199.
- Ashamalla, S. M., Navarro, D., and Ward, C. A. (2001). Gradient of sodium current across the left ventricular wall of adult rat hearts. *J. Physiol. (Lond.)* 536, 439–443.
- Ashpole, N. M., Herren, A. W., Ginsburg, K. S., Brogan, J. D., Johnson, D. E., Cummins, T. R., Bers, D. M., and Hudmon, A. (2012). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) regulates

- cardiac sodium channel NaV1.5 gating by multiple phosphorylation sites. *Journal of Biological Chemistry* 287, 19856–19869.
- Askar, S. F. A., Ramkisoensing, A. A., Schaliij, M. J., Bingen, B. O., Swildens, J., van der Laarse, A., Atsma, D. E., de Vries, A. A. F., Ypey, D. L., and Pijnappels, D. A. (2011). Antiproliferative treatment of myofibroblasts prevents arrhythmias in vitro by limiting myofibroblast-induced depolarization. *Cardiovasc. Res.* 90, 295–304.
- Askar, S. F., Bingen, B. O., Swildens, J., Ypey, D. L., van der Laarse, A., Atsma, D. E., Zeppenfeld, K., Schaliij, M. J., de Vries, A. A., and Pijnappels, D. A. (2012). Connexin43 silencing in myofibroblasts prevents arrhythmias in myocardial cultures: role of maximal diastolic potential. *Cardiovasc. Res.*
- Atorrasagasti, C., and Aquino, J. (2011). SPARC downregulation attenuates the profibrogenic response of hepatic stellate cells induced by TGF- β 1 and PDGF. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* May 2011, 300(5)G739-G748
- Au, C. G., Butler, T. L., Sherwood, M. C., Egan, J. R., North, K. N., and Winlaw, D. S. (2011). Increased connective tissue growth factor associated with cardiac fibrosis in the mdx mouse model of dystrophic cardiomyopathy. *Int J Exp Pathol* 92, 57–65.
- Balser, J. R. (2001). The cardiac sodium channel: gating function and molecular pharmacology. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33, 599–613.
- Balser, J. R., Nuss, H. B., Chiamvimonvat, N., Pérez-García, M. T., Marban, E., and Tomaselli, G. F. (1996). External pore residue mediates slow inactivation in mu 1 rat skeletal muscle sodium channels. *J. Physiol. (Lond.)* 494 (Pt 2), 431–442.
- Banerjee, I., Fuseler, J. W., Price, R. L., Borg, T. K., and Baudino, T. A. (2007). Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *AJP: Heart and Circulatory Physiology* 293, H1883–H1891.
- Barcellos-Hoff, M. H., Derynck, R., Tsang, M. L., and Weatherbee, J. A. (1994). Transforming growth factor-beta activation in irradiated doi:10.1172/JCI117045.
- Barnabei, M. S., Palpant, N. J., and Metzger, J. M. (2010). Influence of genetic background on ex vivo and in vivo cardiac function in several commonly used inbred mouse strains. *Physiol. Genomics* 42A, 103–113.
- Basu, A., Kligman, L. H., Samulewicz, S. J., and Howe, C. C. (2001). Impaired wound healing in mice deficient in a matricellular protein SPARC (osteonectin, BM-40). *BMC Cell Biol.* 2, 15.
- Baudino, T. A. (2006). Cardiac fibroblasts: friend or foe? *AJP: Heart and Circulatory Physiology* 291, H1015–H1026.
- Belardinelli, L., Liu, G., Smith-Maxwell, C., Wang, W.-Q., El-Bizri, N., Hirakawa, R., Karpinski, S., Li, C. H., Hu, L., Li, X.-J., et al. (2013). A novel, potent, and selective inhibitor of cardiac late sodium current suppresses experimental arrhythmias. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 344, 23–32.
- Benamer, N., Moha Ou Maati, H., Demolombe, S., Cantereau, A., Delwail, A., Bois, P., Bescond, J., and Faivre, J.-F. (2009). Molecular and functional characterization of a new potassium conductance in mouse ventricular fibroblasts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 46, 508–517.
- Benhorin, J., Goldmit, M., MacCluer, J. W., Blangero, J., Goffen, R., Leibovitch, A., Rahat, A., Wang, Q., Medina, A., Towbin, J., et al. (1998). Identification of a new SCN5A mutation, D1840G, associated with the long QT syndrome. Mutations in brief no. 153. Online. *Hum. Mutat.* 12, 72–73.

- Benhorin, J., Taub, R., Goldmit, M., Kerem, B., Kass, R. S., Windman, I., and Medina, A. (2000). Effects of Flecainide in Patients With New SCN5A Mutation : Mutation-Specific Therapy for Long-QT Syndrome? *Circulation* 101, 1698–1706.
- Bennett, P. B., Yazawa, K., Makita, N., and George, A. L. (1995). Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia. *Nature* 376, 683–685.
- Benson, D. W., Wang, D. W., Dymment, M., Knilans, T. K., Fish, F. A., Strieper, M. J., Rhodes, T. H., and George, A. L. (2003). Congenital sick sinus syndrome caused by recessive mutations in the cardiac sodium channel gene (SCN5A). *Journal of Clinical Investigation* 112, 1019–1028.
- Bergestuen, D. S., Gravning, J., Haugaa, K. H., Sahakyan, L. G., Aakhus, S., Thiis-Evensen, E., Øie, E., Aukrust, P., Attramadal, H., and Edvardsen, T. (2010). Plasma CCN2/connective tissue growth factor is associated with right ventricular dysfunction in patients with neuroendocrine tumors. *BMC Cancer* 10, 6.
- Bers, D. M., Barry, W. H., and Despa, S. (2003). Intracellular Na⁺ regulation in cardiac myocytes. *Cardiovasc. Res.* 57, 897–912.
- Beyder, A., Rae, J. L., Bernard, C., Strege, P. R., Sachs, F., and Farrugia, G. (2010). Mechanosensitivity of Nav1.5, a voltage-sensitive sodium channel. *J. Physiol. (Lond.)* 588, 4969–4985.
- Bezzina, C. R., and Remme, C. A. (2008). Dilated Cardiomyopathy due to Sodium Channel Dysfunction: What Is the Connection? *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 1, 80–82.
- Bezzina, C. R., Barc, J., Mizusawa, Y., Remme, C. A., Gourraud, J. B., Simonet, F., Verkerk, A. O., Schwartz, P. J., Crotti, L., Dagradi, F., et al. (2013). Common variants at SCN5A-SCN10A and HEY2 are associated with Brugada syndrome, a rare disease with high risk of sudden cardiac death. *Nat. Genet.* 45, 1044–1049.
- Bezzina, C., Veldkamp, M. W., van den Berg, M. P., Postma, A. V., Rook, M. B., Viersma, J. W., van Langen, I. M., Tan-Sindhunata, G., Bink-Boelkens, M. T., van Der Hout, A. H., et al. (1999). A single Na(+) channel mutation causing both long-QT and Brugada syndromes. *Circ. Res.* 85, 1206–1213.
- Bhattacharyya, S., Ishida, W., Wu, M., Wilkes, M., Mori, Y., Hinchcliff, M., Leof, E., and Varga, J. (2009). A non-Smad mechanism of fibroblast activation by transforming growth factor- β via c-Abl and Egr-1: selective modulation by imatinib mesylate. *Oncogene* 28, 1285–1297.
- Bhattacharyya, S., Wu, M., Fang, F., Tourtellotte, W., Feghali-Bostwick, C., and Varga, J. (2011). Early growth response transcription factors: Key mediators of fibrosis and novel targets for anti-fibrotic therapy. *Matrix Biol.* 30, 235–242.
- Biernacka, A., and Frangogiannis, N. G. (2011). Aging and Cardiac Fibrosis. *Aging Dis* 2, 158–173.
- Biet, M., Barajas-Martínez, H., Ton, A.-T., Delabre, J.-F., Morin, N., and Dumaine, R. (2012). About half of the late sodium current in cardiac myocytes from dog ventricle is due to non-cardiac-type Na(+) channels. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 53, 593–8.
- Bishop, J. E., Greenbaum, R., Gibson, D. G., Yacoub, M., and Laurent, G. J. (1990). Enhanced deposition of predominantly type I collagen in myocardial disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 22, 1157–1165.
- Black, J. A., and Waxman, S. G. (2013). Noncanonical Roles of Voltage-Gated Sodium Channels. *Neuron* 80, 280–291.
- Bocquet, A., Sablayrolles, S., Vacher, B., and Le Grand, B. (2010). F 15845, a new blocker of the

- persistent sodium current prevents consequences of hypoxia in rat femoral artery. *Br. J. Pharmacol.* 161, 405–15.
- Borg, T. K., and Caulfield, J. B. (1981). The collagen matrix of the heart. *Fed. Proc.* 40, 2037–2041.
- Boukens, B. J., Hoogendijk, M. G., Verkerk, A. O., Linnenbank, A., van Dam, P., Remme, C. A., Fiolet, J. W., Opthof, T., Christoffels, V. M., and Coronel, R. (2012). Early repolarization in mice causes overestimation of ventricular activation time by the QRS duration. *Cardiovasc. Res.* 97, 182–191.
- Boukens, B. J., Sylva, M., de Vries, C. G.-D., Remme, C. A., Bezzina, C., Christoffels, V. M., and Coronel, R. (2013). Reduced Sodium Channel Function Unmasks Residual Embryonic Slow Conduction in the Adult Right Ventricular Outflow Tract. *Circ. Res.*
- Bowers, S. L. K., Banerjee, I., and Baudino, T. A. (2010). The extracellular matrix: at the center of it all. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 48, 474–482.
- Bozkaya, Y. T., Aydin, H. H., Celik, H. A., Kayikcioglu, M., Payzin, S., Kultursay, H., Aydin, M., Yesil, M., Can, L. H., and Hasdemir, C. (2008). Increased myocardial collagen turnover in patients with progressive cardiac conduction disease. *Pacing Clin Electrophysiol* 31, 1284–1290.
- Bradley, E., Webb, T. I., Hollywood, M. A., Sergeant, G. P., McHale, N. G., and Thornbury, K. D. (2013). The cardiac sodium current Nav1.5 is functionally expressed in rabbit bronchial smooth muscle cells. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 305, C427–C435.
- Braun, A. P., and Schulman, H. (1995). The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu. Rev. Physiol.* 57, 417–445.
- Brekken, R. A., and Sage, E. H. (2001). SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication. *Matrix Biol.* 19, 816–827.
- Bridge, J. H., Smolley, J. R., and Spitzer, K. W. (1990). The relationship between charge movements associated with I_{Ca} and I_{Na}-Ca in cardiac myocytes. *Science* 248, 376–378.
- Brini, M., and Carafoli, E. (2009). Calcium pumps in health and disease. *Physiol. Rev.* 89, 1341–1378.
- Brink, A. J., and Torrington, M. (1977). Progressive familial heart block--two types. *S. Afr. Med. J.* 52, 53–59.
- Brown, R. D., Ambler, S. K., Mitchell, M. D., and Long, C. S. (2005). The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 657–687.
- Brugada, J., Brugada, R., and Brugada, P. (1998). Right Bundle-Branch Block and ST-Segment Elevation in Leads V1 Through V3 : A Marker for Sudden Death in Patients Without Demonstrable Structural Heart Disease. *Circulation* 97, 457–460.
- Brugada, P., and Brugada, J. (1992). Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report. *JAC* 20, 1391–1396.
- Brugada, R., Campuzano, O., Sarquella-Brugada, G., Brugada, J., and Brugada, P. (2014). BRUGADA SYNDROME. *Methodist Debaquey Cardiovasc J* 10, 25–28.
- Burnstock, G., Brouns, I., Adriaensen, D., and Timmermans, J.-P. (2012). Purinergic signaling in the airways. *Pharmacol. Rev.* 64, 834–868.
- Camelliti, P., Borg, T. K., and Kohl, P. (2005). Structural and functional characterisation of cardiac

- fibroblasts. *Cardiovasc. Res.* 65, 40–51.
- Camelliti, P., Devlin, G. P., Matthews, K. G., Kohl, P., and Green, C. R. (2004a). Spatially and temporally distinct expression of fibroblast connexins after sheep ventricular infarction. *Cardiovasc. Res.* 62, 415–425.
- Camelliti, P., Green, C. R., LeGrice, I., and Kohl, P. (2004b). Fibroblast network in rabbit sinoatrial node: structural and functional identification of homogeneous and heterogeneous cell coupling. *Circ. Res.* 94, 828–835.
- Camino, A. M., Atorrasagasti, C., Maccio, D., Prada, F., Salvatierra, E., Rizzo, M., Alaniz, L., Aquino, J. B., Podhajcer, O. L., Silva, M., et al. (2008). Adenovirus-mediated inhibition of SPARC attenuates liver fibrosis in rats. *J Gene Med* 10, 993–1004.
- Camors, E., and Valdivia, H. H. (2014). CaMKII regulation of cardiac ryanodine receptors and inositol triphosphate receptors. *Front Pharmacol* 5, 101.
- Cannon, S. C., and Bean, B. P. (2010). Sodium channels gone wild: resurgent current from neuronal and muscle channelopathies. *J. Clin. Invest.* 120, 80–83.
- Carmona, R., Guadix, J. A., Cano, E., Ruiz-Villalba, A., Portillo-Sánchez, V., Pérez-Pomares, J. M., and Muñoz-Chápuli, R. (2010). The embryonic epicardium: an essential element of cardiac development. *J. Cell. Mol. Med.* 14, 2066–2072.
- Carthy, J., Garmaroudi, F., and Luo, Z. (2011). Wnt3a Induces Myofibroblast Differentiation by Upregulating TGF- β Signaling Through SMAD2 in a β -Catenin-Dependent Manner. *PLoS ONE*.
- Catterall, W. A. (2014). Structure and function of voltage-gated sodium channels at atomic resolution. *Exp. Physiol.* 99, 35–51.
- Catterall, W. A. (2012). Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. *J. Physiol. (Lond.)* 590, 2577–2589.
- Cerra, M. C., and Imbrogno, S. (2012). Phospholamban and cardiac function: a comparative perspective in vertebrates. *Acta Physiol (Oxf)* 205, 9–25.
- Cerrone, M., and Delmar, M. (2014). Desmosomes and the sodium channel complex_ Implications for arrhythmogenic cardiomyopathy and Brugada syndrome. *Trends Cardiovasc. Med.*, 1–7.
- Cerrone, M., Lin, X., Zhang, M., Agullo-Pascual, E., Pfenniger, A., Chkourko-Gusky, H., Novelli, V., Kim, C., Tirasawadichai, T., Judge, D. P., et al. (2013). Missense Mutations in Plakophilin-2 Cause Sodium Current Deficit and Associate with a Brugada Syndrome Phenotype. *Circulation*.
- Cerrone, M., Noorman, M., Lin, X., Chkourko, H., Liang, F.-X., van der Nagel, R., Hund, T., Birchmeier, W., Mohler, P., van Veen, T. A., et al. (2012). Sodium current deficit and arrhythmogenesis in a murine model of plakophilin-2 haploinsufficiency. *Cardiovasc. Res.* 95, 460–468.
- Chaitman (2006). Ranolazine for the Treatment of Chronic Angina and Potential Use in Other Cardiovascular Conditions. *Circulation* 113, 2462–2472.
- Chambers, J. C., Zhao, J., Terracciano, C. M. N., Bezzina, C. R., Zhang, W., Kaba, R., Navaratnarajah, M., Lotlikar, A., Sehmi, J. S., Kooner, M. K., et al. (2010). Genetic variation in SCN10A influences cardiac conduction. *Nat. Genet.* 42, 149–152.
- Chatelier, A., Mercier, A., Tremblier, B., Theriault, O., Moubarak, M., Benamer, N., Corbi, P., Bois, P., Chahine, M., and Faivre, J.-F. (2012). A distinct de-novo expression of Nav1.5 sodium channels in

- human atrial fibroblasts differentiated into myofibroblasts. *J. Physiol. (Lond.)*.
- Chen, J.-B., Liu, W.-J., Che, H., Liu, J., Sun, H.-Y., and Li, G.-R. (2012). Adenosine-5'-triphosphate up-regulates proliferation of human cardiac fibroblasts. *Br. J. Pharmacol.* 166, 1140–1150.
- Chen, M. M., Lam, A., Abraham, J. A., Schreiner, G. F., and Joly, A. H. (2000). CTGF expression is induced by TGF- β in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 32, 1805–1819.
- Chen, S.-J., Ning, H., Ishida, W., Sodin-Semrl, S., Takagawa, S., Mori, Y., and Varga, J. (2006a). The early-immediate gene EGR-1 is induced by transforming growth factor- β and mediates stimulation of collagen gene expression. *J. Biol. Chem.* 281, 21183–21197.
- Chen, T., Inoue, M., and Sheets, M. F. (2005). Reduced voltage dependence of inactivation in the SCN5A sodium channel mutation delF1617. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288, H2666–76.
- Chen, W., Wang, R., Chen, B., Zhong, X., Kong, H., Bai, Y., Zhou, Q., Xie, C., Zhang, J., Guo, A., et al. (2014). The ryanodine receptor store-sensing gate controls Ca^{2+} waves and Ca^{2+} -triggered arrhythmias. *Nat. Med.* 20, 184–192.
- Chen, Y., Corriden, R., Inoue, Y., Yip, L., Hashiguchi, N., Zinkernagel, A., Nizet, V., Insel, P. A., and Junger, W. G. (2006b). ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y₂ and A₃ receptors. *Science* 314, 1792–1795.
- Chen, Y., Yu, F. H., Surmeier, D. J., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (2006c). Neuromodulation of Na^{+} channel slow inactivation via cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C. *Neuron* 49, 409–420.
- Chiao, Y. A., Ramirez, T. A., Zamilpa, R., Okoronkwo, S. M., Dai, Q., Zhang, J., Jin, Y.-F., and Lindsey, M. L. (2012). Matrix metalloproteinase-9 deletion attenuates myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in ageing mice. *Cardiovasc. Res.* 96, 444–455.
- Chiquet, M., Gelman, L., Lutz, R., and Maier, S. (2009). From mechanotransduction to extracellular matrix gene expression in fibroblasts. *BBA - Molecular Cell Research* 1793, 911–920.
- Chkourko, H. S., Guerrero-Serna, G., Lin, X., Darwish, N., Pohlmann, J. R., Cook, K. E., Martens, J. R., Rothenberg, E., Musa, H., and Delmar, M. (2012). Remodeling of mechanical junctions and of microtubule-associated proteins accompany cardiac connexin43 lateralization. *Heart Rhythm* 9, 1133–1140.e6.
- Chu, G. (1998). Pentameric Assembly of Phospholamban Facilitates Inhibition of Cardiac Function in Vivo. *Journal of Biological Chemistry* 273, 33674–33680.
- Clancy, C. E. (2003). Non-Equilibrium Gating in Cardiac Na^{+} Channels: An Original Mechanism of Arrhythmia. *Circulation* 107, 2233–2237.
- 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.
- Cohen, S. A., and Levitt, L. K. (1993). Partial characterization of the rH1 sodium channel protein from rat heart using subtype-specific antibodies. *Circ. Res.* 73, 735–742.
- Constantinides, C., Angeli, S., and Mean, R. (2011). Murine cardiac hemodynamics following manganese administration under isoflurane anesthesia. *Ann Biomed Eng* 39, 2706–2720.
- Coppini, R., Ferrantini, C., Yao, L., Fan, P., Del Lungo, M., Stillitano, F., Sartiani, L., Tosi, B., Suffredini, S., Tesi, C., et al. (2013). Late sodium current inhibition reverses electromechanical

- dysfunction in human hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 127, 575–584.
- Cordeiro, J. M., Mazza, M., Goodrow, R., Ulahannan, N., Antzelevitch, C., and Di Diego, J. M. (2008). Functionally distinct sodium channels in ventricular epicardial and endocardial cells contribute to a greater sensitivity of the epicardium to electrical depression. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295, H154–62.
- Corriden, R., and Insel, P. A. (2010). Basal release of ATP: an autocrine-paracrine mechanism for cell regulation. *Science Signaling* 3, re1–re1.
- Curran, M. E., Splawski, I., Timothy, K. W., Vincent, G. M., Green, E. D., and Keating, M. T. (1995). A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* 80, 795–803.
- Cusdin, F. S., Clare, J. J., and Jackson, A. P. (2008). Trafficking and Cellular Distribution of Voltage-Gated Sodium Channels. *Traffic* 9, 17–26.
- Dai, P., Nakagami, T., Tanaka, H., Hitomi, T., and Takamatsu, T. (2007). Cx43 mediates TGF-beta signaling through competitive Smads binding to microtubules. *Mol. Biol. Cell* 18, 2264–2273.
- Danik, S., Cabo, C., Chiello, C., Kang, S., Wit, A. L., and Coromilas, J. (2002). Correlation of repolarization of ventricular monophasic action potential with ECG in the murine heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 283, H372–81.
- Davis, B. A., Edes, I., Gupta, R. C., Young, E. F., Kim, H. W., Steenaart, N. A., Szymanska, G., and Kranias, E. G. (1990). The role of phospholamban in the regulation of calcium transport by cardiac sarcoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biochem.* 99, 83–88.
- de Bakker, J. M., van Capelle, F. J., Janse, M. J., Tasseron, S., Vermeulen, J. T., de Jonge, N., and Lahpor, J. R. (1993). Slow conduction in the infarcted human heart. “Zigzag” course of activation. *Circulation* 88, 915–926.
- de Jong, S., van Veen, T. A., van Rijen, H. V., and de Bakker, J. M. (2010). Fibrosis and Cardiac Arrhythmias. *J Cardiovasc Pharmacol.* doi:10.1097/FJC.0b013e318207a35f.
- Deb, A., and Ubil, E. (2014). Cardiac fibroblast in development and wound healing. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 70, 47–55.
- Dendooven, A., Gerritsen, K. G., Nguyen, T. Q., Kok, R. J., and Goldschmeding, R. (2011). Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) ELISA: a novel tool for monitoring fibrosis. *Biomarkers* 16, 289–301.
- Deschênes, I., Neyroud, N., DiSilvestre, D., Marbán, E., Yue, D. T., and Tomaselli, G. F. (2002). Isoform-specific modulation of voltage-gated Na(+) channels by calmodulin. *Circ. Res.* 90, E49–57.
- Despa, S., and Bers, D. M. (2013). Journal of Molecular and Cellular Cardiology. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 61, 2–10.
- Despa, S., Bossuyt, J., Han, F., Ginsburg, K. S., Jia, L.-G., Kutchai, H., Tucker, A. L., and Bers, D. M. (2005). Phospholemman-phosphorylation mediates the beta-adrenergic effects on Na/K pump function in cardiac myocytes. *Circ. Res.* 97, 252–259.
- Despa, S., Islam, M. A., Pogwizd, S. M., and Bers, D. M. (2002). Intracellular [Na⁺] and Na⁺ pump rate in rat and rabbit ventricular myocytes. *J. Physiol. (Lond.)* 539, 133–143.
- Dhar Malhotra, J., Chen, C., Rivolta, I., Abriel, H., Malhotra, R., Mattei, L. N., Brosius, F. C., Kass, R.

- S., and Isom, L. L. (2001). Characterization of sodium channel alpha- and beta-subunits in rat and mouse cardiac myocytes. *Circulation* 103, 1303–1310.
- Dobaczewski, M., Gonzalez-Quesada, C., and Frangogiannis, N. G. (2010). The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 48, 504–511.
- Dominguez, J. N., la Rosa, de, A., Navarro, F., Franco, D., and Aranega, A. E. (2008). Tissue distribution and subcellular localization of the cardiac sodium channel during mouse heart development. *Cardiovasc. Res.* 78, 45–52.
- Donoso, P., Mill, J. G., O'Neill, S. C., and Eisner, D. A. (1992). Fluorescence measurements of cytoplasmic and mitochondrial sodium concentration in rat ventricular myocytes. *J. Physiol. (Lond.)* 448, 493–509.
- Driesen, R. B., Nagaraju, C. K., Abi-Char, J., Coenen, T., Lijnen, P. J., Fagard, R. H., Sipido, K. R., and Petrov, V. V. (2014). Reversible and irreversible differentiation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc. Res.* 101, 411–422.
- Duclohier, H., and Spach, G. (2001). Artificial membrane excitability revisited and implications for the gating of voltage-dependent ion channels. *Gen. Physiol. Biophys.* 20, 361–374.
- Dumaine, R., Wang, Q., Keating, M. T., Hartmann, H. A., Schwartz, P. J., Brown, A. M., and Kirsch, G. E. (1996). Multiple mechanisms of Na⁺ channel--linked long-QT syndrome. *Circ. Res.* 78, 916–924.
- El-Sherif, N., Chinushi, M., Caref, E. B., and Restivo, M. (1997). Electrophysiological mechanism of the characteristic electrocardiographic morphology of torsade de pointes tachyarrhythmias in the long-QT syndrome: detailed analysis of ventricular tridimensional activation patterns. *Circulation* 96, 4392–4399.
- Elliott, M. R., Chekeni, F. B., Trampont, P. C., Lazarowski, E. R., Kadl, A., Walk, S. F., Park, D., Woodson, R. I., Ostankovich, M., Sharma, P., et al. (2009). Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* 461, 282–286.
- Fabritz, L., Damke, D., Emmerich, M., Kaufmann, S., Theis, K., Blana, A., Fortmüller, L., Laakmann, S., Hermann, S., Aleynichenko, E., et al. (2010). Autonomic modulation and antiarrhythmic therapy in a model of long QT syndrome type 3. *Cardiovasc. Res.* 87, 60–72.
- Fabritz, L., Kirchhof, P., Franz, M. R., Nuyens, D., Rossenbacker, T., Ottenhof, A., Haverkamp, W., Breithardt, G., Carmeliet, E., and Carmeliet, P. (2003). Effect of pacing and mexiletine on dispersion of repolarisation and arrhythmias in DeltaKPQ SCN5A (long QT3) mice. *Cardiovasc. Res.* 57, 1085–93.
- Fahmi, A. I., Patel, M., Stevens, E. B., Fowden, A. L., John, J. E., Lee, K., Pinnock, R., Morgan, K., Jackson, A. P., and Vandenberg, J. I. (2001). The sodium channel beta-subunit SCN3b modulates the kinetics of SCN5a and is expressed heterogeneously in sheep heart. *J. Physiol. (Lond.)* 537, 693–700.
- Featherstone, D. E., Richmond, J. E., and Ruben, P. C. (1996). Interaction between fast and slow inactivation in Skm1 sodium channels. *Biophysj* 71, 3098–3109.
- Follonier, L., Schaub, S., Meister, J.-J., and Hinz, B. (2008). Myofibroblast communication is controlled by intercellular mechanical coupling. *J. Cell. Sci.* 121, 3305–3316.
- Fontes, M. S. C., Raaijmakers, A. J. A., van Doorn, T., Kok, B., Nieuwenhuis, S., van der Nagel, R., Vos, M. A., de Boer, T. P., van Rijen, H. V. M., and Bierhuizen, M. F. A. (2014). Changes in Cx43

- and Nav1.5 expression precede the occurrence of substantial fibrosis in calcineurin-induced murine cardiac hypertrophy. *PLoS ONE* 9, e87226.
- Fontes, M. S., van Veen, T. A., de Bakker, J. M., and van Rijen, H. V. (2012). Functional consequences of abnormal Cx43 expression in the heart. *Biochim. Biophys. Acta* 1818, 2020–9.
- Fredj, S., Bescond, J., Louault, C., and Potreau, D. (2005). Interactions between cardiac cells enhance cardiomyocyte hypertrophy and increase fibroblast proliferation. *J. Cell. Physiol.* 202, 891–899.
- Fredj, S., Sampson, K., Liu, H., and Kass, R. (2006). Molecular basis of ranolazine block of LQT-3 mutant sodium channels: evidence for site of action. *Br. J. Pharmacol.* 148, 16–24.
- Frohnwieser, B., Chen, L. Q., Schreibmayer, W., and Kallen, R. G. (1997). Modulation of the human cardiac sodium channel alpha-subunit by cAMP-dependent protein kinase and the responsible sequence domain. *J. Physiol. (Lond.)* 498 (Pt 2), 309–318.
- Gaborit, N., Le Bouter, S., Szuts, V., Varro, A., Escande, D., Nattel, S., and Demolombe, S. (2007). Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart. *J. Physiol. (Lond.)* 582, 675–693.
- Gaietta, G., Deerinck, T. J., Adams, S. R., Bouwer, J., Tour, O., Laird, D. W., Sosinsky, G. E., Tsien, R. Y., and Ellisman, M. H. (2002). Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science* 296, 503–507.
- Gao, J., WANG, W., Cohen, I. S., and Mathias, R. T. (2005). Transmural gradients in Na/K pump activity and [Na⁺] in canine ventricle. *Biophysj* 89, 1700–1709.
- Gavillet, B., Rougier, J.-S., Domenighetti, A. A., Behar, R., Boixel, C., Ruchat, P., Lehr, H.-A., Pedrazzini, T., and Abriel, H. (2006). Cardiac sodium channel Nav1.5 is regulated by a multiprotein complex composed of syntrophins and dystrophin. *Circ. Res.* 99, 407–414.
- Ge, J., Sun, A., Paaanen, V., Wang, S., Su, C., Yang, Z., Li, Y., Jia, J., Wang, K., Zou, Y., et al. (2008). Molecular and Clinical Characterization of a Novel SCN5A Mutation Associated With Atrioventricular Block and Dilated Cardiomyopathy. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 1, 83–92.
- Goldbarg, A. N., Hellerstein, H. K., Bruell, J. H., and Daroczy, A. F. (1968). Electrocardiogram of the normal mouse, *Mus musculus*: general considerations and genetic aspects. *Cardiovasc. Res.* 2, 93–99.
- Goldin, A. L. (2003). Mechanisms of sodium channel inactivation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13, 284–290.
- Goldsmith, E. C., Hoffman, A., Morales, M. O., Potts, J. D., Price, R. L., McFadden, A., Rice, M., and Borg, T. K. (2004). Organization of fibroblasts in the heart. *Dev. Dyn.* 230, 787–794.
- Grant, A. O., Carboni, M. P., Neplioueva, V., Starmer, C. F., Memmi, M., Napolitano, C., and Priori, S. (2002). Long QT syndrome, Brugada syndrome, and conduction system disease are linked to a single sodium channel mutation. *Journal of Clinical Investigation* 110, 1201–1209.
- Gray, C. B. B., and Heller Brown, J. (2014). CaMKIIdelta subtypes: localization and function. *Front Pharmacol* 5, 15.
- Gray, R. P., McIntyre, H., Sheridan, D. S., and Fry, C. H. (2001). Intracellular sodium and contractile function in hypertrophied human and guinea-pig myocardium. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 442, 117–123.
- Greenlee, P. R., Anderson, J. L., Lutz, J. R., Lindsay, A. E., and Hagan, A. D. (1986). Familial

- automaticity-conduction disorder with associated cardiomyopathy. *West. J. Med.* 144, 33–41.
- Grimm, M., and Brown, J. H. (2010). β -Adrenergic receptor signaling in the heart: Role of CaMKII. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 48, 322–330.
- Groenewegen, W. A. (2002). A Cardiac Sodium Channel Mutation Cosegregates With a Rare Connexin40 Genotype in Familial Atrial Standstill. *Circ. Res.* 92, 14–22.
- Groenewegen, W. A., and Wilde, A. A. (2005). Letter regarding article by McNair et al, "SCN5A mutation associated with dilated cardiomyopathy, conduction disorder, and arrhythmia". *Circulation* 112, e9; author reply e9–10.
- Groenewegen, W. A., Bezzina, C. R., van Tintelen, J. P., Hoorntje, T. M., Mannens, M. M. A. M., Wilde, A. A. M., Jongsma, H. J., and Rook, M. B. (2003). A novel LQT3 mutation implicates the human cardiac sodium channel domain IVS6 in inactivation kinetics. *Cardiovasc. Res.* 57, 1072–1078.
- Gurusamy, N., Watanabe, K., Ma, M., Zhang, S., Muslin, A. J., Kodama, M., and Aizawa, Y. (2005). Inactivation of 14-3-3 protein exacerbates cardiac hypertrophy and fibrosis through enhanced expression of protein kinase C β 2 in experimental diabetes. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 957–962.
- Guzadthur, L., Pearcey, S. M., Duehmke, R. M., Jeevaratnam, K., Hohmann, A. F., Zhang, Y., Grace, A. A., Lei, M., and Huang, C. L. H. (2010). Atrial arrhythmogenicity in aged *Scn5a*^{+/ΔKPQ} mice modeling long QT type 3 syndrome and its relationship to Na⁺ channel expression and cardiac conduction. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 460, 593–601.
- Gwathmey, J. K., Yerevanian, A. I., and Hajjar, R. J. (2011). Cardiac gene therapy with SERCA2a: from bench to bedside. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 50, 803–812.
- Hain, J., Onoue, H., Mayrleitner, M., Fleischer, S., and Schindler, H. (1995). Phosphorylation modulates the function of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum from cardiac muscle. *J. Biol. Chem.* 270, 2074–2081.
- Hao, X., Zhang, Y., Zhang, X., Nirmalan, M., Davies, L., Konstantinou, D., Yin, F., Dobrzynski, H., Wang, X., Grace, A., et al. (2011). TGF- β 1 Mediated Fibrosis and Ion Channel Remodeling Are Key Mechanisms Producing the Sinus Node Dysfunction Associated with SCN5A Deficiency and Aging. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*.
- Hakim, P., Gurung, I. S., Pedersen, T. H., Thresher, R., Brice, N., Lawrence, J., Grace, A. A., and Huang, C. L. H. (2008). *Scn3b* knockout mice exhibit abnormal ventricular electrophysiological properties. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 98, 251–266.
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 391, 85–100.
- Harris, B. S., Zhang, Y., Card, L., Rivera, L. B., Brekken, R. A., and Bradshaw, A. D. (2011). SPARC Regulates Collagen Interaction with Cardiac Fibroblast Cell Surfaces. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*.
- Haudek, S. B., Xia, Y., Huebener, P., Lee, J. M., Carlson, S., Crawford, J. R., Pilling, D., Gomer, R. H., Trial, J., Frangogiannis, N. G., et al. (2006). Bone marrow-derived fibroblast precursors mediate ischemic cardiomyopathy in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 18284–18289.
- Haufe, V., Cordeiro, J. M., Zimmer, T., Wu, Y. S., Schiccitano, S., Benndorf, K., and Dumaine, R. (2005). Contribution of neuronal sodium channels to the cardiac fast sodium current *I*_{Na} is greater

- in dog heart Purkinje fibers than in ventricles. *Cardiovasc. Res.* 65, 117–127.
- Hecker, L., Jagirdar, R., Jin, T., and Thannickal, V. J. (2011). Reversible differentiation of myofibroblasts by MyoD. *Exp. Cell Res.* 317, 1914–1921.
- Herren, A. W., Bers, D. M., and Grandi, E. (2013). Post-translational modifications of the cardiac Na channel: contribution of CaMKII-dependent phosphorylation to acquired arrhythmias. *AJP: Heart and Circulatory Physiology* 305, H431–45.
- Hervé, J., Derangeon, M., Theveniauruissy, M., Miquerol, L., Sarrouilhe, D., and Gros, D. (2008). Connexines et canaux jonctionnels. Leurs rôles dans la propagation de l'activité électrique cardiaque et le développement du cœur. *Pathologie Biologie* 56, 334–341.
- Hilber, K., Sandtner, W., Zarrabi, T., Zebedin, E., Kudlacek, O., Fozzard, H. A., and Todt, H. (2005). Selectivity filter residues contribute unequally to pore stabilization in voltage-gated sodium channels. *Biochemistry* 44, 13874–13882.
- Hinz, B., Celetta, G., Tomasek, J. J., Gabbiani, G., and Chaponnier, C. (2001). Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol. Biol. Cell* 12, 2730–2741.
- Hoch, B., Meyer, R., Hetzer, R., Krause, E. G., and Karczewski, P. (1999). Identification and expression of delta-isoforms of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ. Res.* 84, 713–721.
- Hodgkin, A. L., and Huxley, A. F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol. (Lond.)* 117, 500–544.
- Hohenester, E., Sasaki, T., Giudici, C., Farndale, R. W., and Bächinger, H. P. (2008). Structural basis of sequence-specific collagen recognition by SPARC. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 18273–18277.
- Holm, H., Gudbjartsson, D. F., Sulem, P., Masson, G., Helgadottir, H. T., Zanon, C., Magnusson, O. T., Helgason, A., Saemundsdottir, J., Gylfason, A., et al. (2011). A rare variant in MYH6 is associated with high risk of sick sinus syndrome. *Nat. Genet.* 43, 316–320.
- Honen, B. N., and Saint, D. A. (2002). Heterogeneity of the properties of INa in epicardial and endocardial cells of rat ventricle. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 29, 161–166.
- Hong, K. M., Belperio, J. A., Keane, M. P., Burdick, M. D., and Strieter, R. M. (2007). Differentiation of human circulating fibrocytes as mediated by transforming growth factor-beta and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J. Biol. Chem.* 282, 22910–22920.
- Horn, M. A., Graham, H. K., Richards, M. A., Clarke, J. D., Greensmith, D. J., Briston, S. J., Hall, M. C. S., Dibb, K. M., and Trafford, A. W. (2012). Age-related divergent remodeling of the cardiac extracellular matrix in heart failure: Collagen accumulation in the young and loss in the aged. *J. Mol. Cell. Cardiol.*
- Houser, S. R. (2014). Role of RyR2 Phosphorylation in Heart Failure and Arrhythmias: Protein Kinase A-Mediated Hyperphosphorylation of the Ryanodine Receptor at Serine 2808 Does Not Alter Cardiac Contractility or Cause Heart Failure and Arrhythmias. *Circ. Res.* 114, 1320–1327.
- Hu, H., and Sachs, F. (1997). Stretch-activated ion channels in the heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29, 1511–1523.
- Huang, H., Priori, S. G., Napolitano, C., O'Leary, M. E., and Chahine, M. (2011). Y1767C, a novel SCN5A mutation, induces a persistent Na⁺ current and potentiates ranolazine inhibition of Nav1.5

- channels. *AJP: Heart and Circulatory Physiology* 300, H288–99.
- Huggins, J. P., Cook, E. A., Piggott, J. R., Mattinsley, T. J., and England, P. J. (1989). Phospholamban is a good substrate for cyclic GMP-dependent protein kinase in vitro, but not in intact cardiac or smooth muscle. *Biochem. J.* 260, 829–835.
- Hund, T. J., Koval, O. M., Li, J., Wright, P. J., Qian, L., Snyder, J. S., Gudmundsson, H., Kline, C. F., Davidson, N. P., Cardona, N., et al. (2010). A β (IV)-spectrin/CaMKII signaling complex is essential for membrane excitability in mice. *J. Clin. Invest.* 120, 3508–3519.
- Ieda, M., Tsuchihashi, T., Ivey, K. N., Ross, R. S., Hong, T.-T., Shaw, R. M., and Srivastava, D. (2009). Cardiac fibroblasts regulate myocardial proliferation through β 1 integrin signaling. *Dev. Cell* 16, 233–244.
- Inoki, I., Shiomi, T., Hashimoto, G., Enomoto, H., Nakamura, H., Makino, K.-I., Ikeda, E., Takata, S., Kobayashi, K.-I., and Okada, Y. (2002). Connective tissue growth factor binds vascular endothelial growth factor (VEGF) and inhibits VEGF-induced angiogenesis. *FASEB J.* 16, 219–221.
- Isom, L. L. (2002). The role of sodium channels in cell adhesion. *Front. Biosci.* 7, 12–23.
- Isom, L. L., and Catterall, W. A. (1996). Na⁺ channel subunits and Ig domains. *Nature* 383, 307–308.
- Jacquemet, V., and Henriquez, C. S. (2008). Loading effect of fibroblast-myocyte coupling on resting potential, impulse propagation, and repolarization: insights from a microstructure model. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294, H2040–52.
- Jansen JA, Noorman M, Musa H, Stein M, de Jong S, van der Nagel R, Hund TJ, Mohler PJ, Vos MA, van Veen TA, de Bakker JM, Delmar M, van Rijen HV. Reduced heterogeneous expression of Cx43 results in decreased Nav1.5 expression and reduced sodium current that accounts for arrhythmia vulnerability in conditional Cx43 knockout mice. *Heart Rhythm*. 2012;9:600–607.
- Johnson, C. M., Green, K. G., Kanter, E. M., Bou-Abboud, E., Saffitz, J. E., and Yamada, K. A. (1999). Voltage-gated Na⁺ channel activity and connexin expression in Cx43-deficient cardiac myocytes. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 10, 1390–401.
- Johnson, D. (2006). Isoform-specific Effects of the β 2 Subunit on Voltage-gated Sodium Channel Gating. *J. Biol. Chem.* 281, 25875–25881.
- Johnson, R. G., Reynhout, J. K., TenBroek, E. M., Quade, B. J., Yasumura, T., Davidson, K. G., Sheridan, J. D., and Rash, J. E. (2012). Gap junction assembly: roles for the formation plaque and regulation by the C-terminus of connexin43. *Mol. Biol. Cell* 23, 71–86. doi:10.1091/mbc.E11-02-0141.
- Kaczmarek-Hájek, K., Lörinczi, E., Hausmann, R., and Nicke, A. (2012). Molecular and functional properties of P2X receptors--recent progress and persisting challenges. *Purinergic Signal.* 8, 375–417. doi:10.1007/s11302-012-9314-7.
- Kakkar, R., and Lee, R. T. (2010). Intramyocardial Fibroblast Myocyte Communication. *Circ. Res.* 106, 47–57.
- Kamkin, A., Kiseleva, I., Isenberg, G., Wagner, K. D., Günther, J., Theres, H., and Scholz, H. (2003). Cardiac fibroblasts and the mechano-electric feedback mechanism in healthy and diseased hearts. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 82, 111–120.
- Kamkin, A., Kiseleva, I., Lozinsky, I., and Scholz, H. (2005). Electrical interaction of mechanosensitive fibroblasts and myocytes in the heart. *Basic Res. Cardiol.* 100, 337–345.

- Kamkin, A., Kiseleva, I., Wagner, K. D., Lammerich, A., Bohm, J., Persson, P. B., and Günther, J. (1999). Mechanically induced potentials in fibroblasts from human right atrium. *Exp. Physiol.* 84, 347–356.
- Kandalam, V., Basu, R., Moore, L., Fan, D., Wang, X., Jaworski, D. M., Oudit, G. Y., and Kassiri, Z. (2011). Lack of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 2 Leads to Exacerbated Left Ventricular Dysfunction and Adverse Extracellular Matrix Remodeling in Response to Biomechanical Stress. *Circulation*.
- Kanters, J. K., Yuan, L., Hedley, P. L., Stoevring, B., Jons, C., Bloch Thomsen, P. E., Grunnet, M., Christiansen, M., and Jespersen, T. (2014). Flecainide Provocation Reveals Concealed Brugada Syndrome in a Long QT Syndrome Family With a Novel L1786Q Mutation in SCN5A. *Circ. J.* 78, 1136–1143.
- Kaplan, S. (2004). Structural and molecular pathology of the heart in Carvajal syndrome. *Cardiovascular Pathology* 13, 26–32.
- Kaufmann, S. G., Westenbroek, R. E., Maass, A. H., Lange, V., Renner, A., Wischmeyer, E., Bonz, A., Muck, J., Ertl, G., Catterall, W. A., et al. (2013). Distribution and function of sodium channel subtypes in human atrial myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 61, 133–141.
- Kaur, K., Zarzoso, M., Ponce-Balbuena, D., Guerrero-Serna, G., Hou, L., Musa, H., and Jalife, J. (2013). TGF- β 1, released by myofibroblasts, differentially regulates transcription and function of sodium and potassium channels in adult rat ventricular myocytes. *PLoS ONE* 8, e55391.
- Kellenberger, S., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (1996). Movement of the Na⁺ channel inactivation gate during inactivation. *J. Biol. Chem.* 271, 30971–30979.
- Keller, D. I., Acharfi, S., Delacrétaiz, E., Benammar, N., Rotter, M., Pfammatter, J. P., Fressart, V., Guicheney, P., and Chahine, M. (2003). A novel mutation in SCN5A, delQKP 1507-1509, causing long QT syndrome: role of Q1507 residue in sodium channel inactivation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 35, 1513–21.
- Kirchhefer, U., Schmitz, W., Scholz, H., and Neumann, J. (1999). Activity of cAMP-dependent protein kinase and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human hearts. *Cardiovasc. Res.* 42, 254–261.
- Kjølbye, A. L., Dikshteyn, M., Eloff, B. C., Deschênes, I., and Rosenbaum, D. S. (2008). Maintenance of intercellular coupling by the antiarrhythmic peptide rotigaptide suppresses arrhythmogenic discordant alternans. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294, H41–9.
- Kohl, P., Camelliti, P., Burton, F. L., and Smith, G. L. (2005). Electrical coupling of fibroblasts and myocytes: relevance for cardiac propagation. *J Electrocardiol* 38, 45–50.
- Koitabashi, N., Arai, M., Kogure, S., Niwano, K., Watanabe, A., Aoki, Y., Maeno, T., Nishida, T., Kubota, S., Takigawa, M., et al. (2007). Increased connective tissue growth factor relative to brain natriuretic peptide as a determinant of myocardial fibrosis. *Hypertension* 49, 1120–1127.
- Koli, K., Saharinen, J., Hyytiäinen, M., Penttinen, C., and Keski-Oja, J. (2001). Latency, activation, and binding proteins of TGF-beta. *Microsc. Res. Tech.* 52, 354–362.
- Kranias, E. G., and Hajjar, R. J. (2012). Modulation of cardiac contractility by the phospholamban/SERCA2a regulatome. *Circ. Res.* 110, 1646–1660.
- Kreusser, M. M., and Backs, J. (2014). Integrated mechanisms of CaMKII-dependent ventricular remodeling. *Front Pharmacol* 5, 36.

- Kucera, J. P., Rohr, S., and Rudy, Y. (2002). Localization of sodium channels in intercalated disks modulates cardiac conduction. *Circ. Res.* 91, 1176–1182.
- Kurtenbach, S., Kurtenbach, S., and Zoidl, G. (2014). Gap junction modulation and its implications for heart function. *Front Physiol* 5, 82.
- Kyndt, F., Probst, V., Potet, F., Demolombe, S., Chevallier, J. C., Baró, I., Moisan, J. P., Boisseau, P., Schott, J. J., Escande, D., et al. (2001). Novel SCN5A mutation leading either to isolated cardiac conduction defect or Brugada syndrome in a large French family. *Circulation* 104, 3081–3086.
- Lammers, W. J., Schalij, M. J., Kirchhof, C. J., and Allessie, M. A. (1990). Quantification of spatial inhomogeneity in conduction and initiation of reentrant atrial arrhythmias. *Am. J. Physiol.* 259, H1254–63.
- Lande, G., Demolombe, S., Bammert, A., Moorman, A., CHARPENTIER, F., and Escande, D. (2001). Transgenic mice overexpressing human KvLQT1 dominant-negative isoform. Part II: Pharmacological profile. *Cardiovasc. Res.* 50, 328–334.
- Lanner, J. T., Georgiou, D. K., Joshi, A. D., and Hamilton, S. L. (2010). Ryanodine Receptors: Structure, Expression, Molecular Details, and Function in Calcium Release. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2, a003996–a003996.
- Larbig, R., Torres, N., Bridge, J. H. B., Goldhaber, J. I., and Philipson, K. D. (2010). Activation of reverse Na⁺-Ca²⁺ exchange by the Na⁺ current augments the cardiac Ca²⁺ transient: evidence from NCX knockout mice. *J. Physiol. (Lond.)* 588, 3267–3276.
- Lauf, U., Giepmans, B. N. G., Lopez, P., Braconnot, S., Chen, S. C., and Falk, M. M. (2002). Dynamic trafficking and delivery of connexons to the plasma membrane and accretion to gap junctions in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 10446–10451.
- Laurent, G., Saal, S., Amarouch, M. Y., Béziau, D. M., Marsman, R. F. J., Faivre, L., Barc, J., Dina, C., Bertaux, G., Barthez, O., et al. (2012). Multifocal Ectopic Purkinje-Related Premature Contractions. *JAC* 60, 144–156.
- Lazarowski, E. R. (2012). Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release. *Purinergic Signal.* 8, 359–373.
- Leask, A. (2010). Potential Therapeutic Targets for Cardiac Fibrosis: TGF β , Angiotensin, Endothelin, CCN2, and PDGF, Partners in Fibroblast Activation. *Circ. Res.* 106, 1675–1680.
- Leask, A., and Abraham, D. J. (2006). All in the CCN family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker. *J. Cell. Sci.* 119, 4803–4810.
- Leblanc, N., and Hume, J. R. (1990). Sodium current-induced release of calcium from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Science* 248, 372–376.
- Lenègre, J., and Moreau, P. (1963). [CHRONIC AURICULO-VENTRICULAR BLOCK. ANATOMICAL, CLINICAL AND HISTOLOGICAL STUDY]. *Arch Mal Coeur Vaiss* 56, 867–888.
- Leoni, A.-L., Gavillet, B., Rougier, J.-S., Marionneau, C., Probst, V., Le Scouarnec, S., Schott, J.-J., Demolombe, S., Bruneval, P., Huang, C. L. H., et al. (2010). Variable Nav1.5 Protein Expression from the Wild-Type Allele Correlates with the Penetrance of Cardiac Conduction Disease in the Scn5a^{+/-} Mouse Model. *PLoS ONE* 5, e9298.
- Lév, M., Kinare, S. G., and Pick, A. (1970). The Pathogenesis of Atrioventricular Block in Coronary

- Disease. *Circulation* 42, 409–425.
- Li, B., Dedman, J. R., and Kaetzel, M. A. (2006). Nuclear Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in the murine heart. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1763, 1275–1281.
- Li, G.-R., Lau, C.-P., and Shrier, A. (2002). Heterogeneity of sodium current in atrial vs epicardial ventricular myocytes of adult guinea pig hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34, 1185–1194.
- Li, G.-R., Sun, H.-Y., Chen, J.-B., Zhou, Y., Tse, H.-F., and Lau, C.-P. (2009). Characterization of Multiple Ion Channels in Cultured Human Cardiac Fibroblasts. *PLoS ONE* 4, e7307.
- Lin, X., Zemlin, C., Hennan, J. K., Petersen, J. S., and Veenstra, R. D. (2008). Enhancement of ventricular gap-junction doi:10.1093/cvr/cvn100.
- Lindegger, N., Hagen, B. M., Marks, A. R., Lederer, W. J., and Kass, R. S. (2009). Diastolic transient inward current in long QT syndrome type 3 is caused by Ca^{2+} overload and inhibited by ranolazine. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 47, 326–334.
- Liu, H., Zein, El, L., Kruse, M., Guinamard, R., Beckmann, A., Bozio, A., Kurtbay, G., Megarbane, A., Ohmert, I., Blaysat, G., et al. (2010). Gain-of-Function Mutations in. *Circulation: Cardiovascular Genetics* 3, 1–20.
- Lokuta, A. J., Meyers, M. B., Sander, P. R., Fishman, G. I., and Valdivia, H. H. (1997). Modulation of cardiac ryanodine receptors by sorcin. *J. Biol. Chem.* 272, 25333–25338.
- 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. G., Lopatin, A. N., et al. (2007). Sodium channel *Scn1b* null mice exhibit prolonged QT and RR intervals. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 43, 636–647.
- Lovelock, J. D., Baker, A. H., Gao, F., Dong, J.-F., Bergeron, A. L., McPheat, W., Sivasubramanian, N., and Mann, D. L. (2005). Heterogeneous effects of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases on cardiac fibroblasts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288, H461–8.
- Lovelock, J. D., Monasky, M. M., Jeong, E.-M., Lardin, H. A., Liu, H., Patel, B. G., Taglieri, D. M., Gu, L., Kumar, P., Pokhrel, N., et al. (2012). Ranolazine improves cardiac diastolic dysfunction through modulation of myofilament calcium sensitivity. *Circ. Res.* 110, 841–50.
- Lowe, J. S., Palygin, O., Bhasin, N., Hund, T. J., Boyden, P. A., Shibata, E., Anderson, M. E., and Mohler, P. J. (2008). Voltage-gated Nav channel targeting in the heart requires an ankyrin-G dependent cellular pathway. *J. Cell Biol.* 180, 1–14.
- Lown, B. (1967). Electrical reversion of cardiac arrhythmias. *Br Heart J* 29, 469–489.
- Luczak, E. D., and Anderson, M. E. (2014). CaMKII oxidative activation and the pathogenesis of cardiac disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.*
- Ma, J., Luo, A., Wu, L., Wan, W., Zhang, P., Ren, Z., Zhang, S., Qian, C., Shryock, J. C., and Belardinelli, L. (2012). Calmodulin kinase II and protein kinase C mediate the effect of increased intracellular calcium to augment late sodium current in rabbit ventricular myocytes. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 302, C1141–51.
- MacKenna, D. A., Summerour, S. R., and Villarreal, F. J. (2000). Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis. *Cardiovasc. Res.* 46, 257–263.
- Maffeo, C., and Aksimentiev, A. (2009). Structure, Dynamics, and Ion Conductance of the

- Phospholamban Pentamer. *Biophysj* 96, 4853–4865.
- Maier, L. S. (2003). Transgenic CaMKII δ C Overexpression Uniquely Alters Cardiac Myocyte Ca²⁺ Handling: Reduced SR Ca²⁺ Load and Activated SR Ca²⁺ Release. *Circ. Res.* 92, 904–911.
- Maier, L. S., and Sossalla, S. (2013). The late Na current as a therapeutic target: Where are we? *J. Mol. Cell. Cardiol.* 61, 44–50.
- Maier, L. S., Layug, B., Karwatowska-Prokopczuk, E., Belardinelli, L., Lee, S., Sander, J., Lang, C., Wachter, R., Edelmann, F., Hasenfuss, G., et al. (2013). RAnoLazIne for the treatment of diastolic heart failure in patients with preserved ejection fraction: the RALI-DHF proof-of-concept study. *JACC Heart Fail* 1, 115–122.
- Maier, S. K. G., Westenbroek, R. E., McCormick, K. A., Curtis, R., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (2004). Distinct subcellular localization of different sodium channel α and β subunits in single ventricular myocytes from mouse heart. *Circulation* 109, 1421–1427.
- Makielski, J. C., and Farley, A. L. (2006). Na⁽⁺⁾ current in human ventricle: implications for sodium loading and homeostasis. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 17 Suppl 1, S15–S20.
- Makita, N. (2002). Drug-Induced Long-QT Syndrome Associated With a Subclinical SCN5A Mutation. *Circulation* 106, 1269–1274.
- Makita, N., Behr, E., Shimizu, W., Horie, M., Sunami, A., Crotti, L., Schulze-Bahr, E., Fukuhara, S., Mochizuki, N., Makiyama, T., et al. (2008). The E1784K mutation in SCN5A is associated with mixed clinical phenotype of type 3 long QT syndrome. *J. Clin. Invest.* 118, 2219–29.
- Makita, N., Seki, A., Sumitomo, N., Chkourko, H., Fukuhara, S., Watanabe, H., Shimizu, W., Bezzina, C. R., Hasdemir, C., Mugishima, H., et al. (2012). A Connexin40 Mutation Associated With a Malignant Variant of Progressive Familial Heart Block Type I. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 5, 1–30.
- Maleckar, M. M., Greenstein, J. L., Giles, W. R., and Trayanova, N. A. (2009). Electrotonic coupling between human atrial myocytes and fibroblasts alters myocyte excitability and repolarization. *Biophys. J.* 97, 2179–2190.
- Malhotra, J. D. (2004). Tyrosine-phosphorylated and Nonphosphorylated Sodium Channel β Subunits Are Differentially Localized in Cardiac Myocytes. *Journal of Biological Chemistry* 279, 40748–40754.
- Malhotra, J. D., Kazen-Gillespie, K., Hortsch, M., and Isom, L. L. (2000). Sodium channel β subunits mediate homophilic cell adhesion and recruit ankyrin to points of cell-cell contact. *J. Biol. Chem.* 275, 11383–11388.
- Maltsev, V. A., and Undrovinas, A. (2008). Late sodium current in failing heart: friend or foe? *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 96, 421–51.
- Maltsev, V. A., Kyle, J. W., and Undrovinas, A. (2009). Late Na⁺ current produced by human cardiac Na⁺ channel isoform Nav1.5 is modulated by its β 1 subunit. *J Physiol Sci* 59, 217–225.
- Maltsev, V. A., Reznikov, V., Undrovinas, N. A., Sabbah, H. N., and Undrovinas, A. (2008). Modulation of late sodium current by Ca²⁺, calmodulin, and CaMKII in normal and failing dog cardiomyocytes: similarities and differences. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294, H1597–608.
- Maltsev, V. A., Sabbah, H. N., Higgins, R. S. D., Silverman, N., Lesch, M., and Undrovinas, A. I. (1998). Novel, Ultraslow Inactivating Sodium Current in Human Ventricular Cardiomyocytes.

- Circulation* 98, 2545–2552.
- Maltsev, V. A., Silverman, N., Sabbah, H. N., and Undrovinas, A. I. (2007). Chronic heart failure slows late sodium current in human and canine ventricular myocytes: Implications for repolarization variability. *European Journal of Heart Failure* 9, 219–227.
- Manabe, I. (2002). Gene Expression in Fibroblasts and Fibrosis: Involvement in Cardiac Hypertrophy. *Circ. Res.* 91, 1103–1113.
- Mandache, E., Unge, G., Appelgren, L. E., and Ljungqvist, A. (1973). The proliferative activity of the heart tissues in various forms of experimental cardiac hypertrophy studied by electron microscope autoradiography. *Virchows Arch B Cell Pathol* 12, 112–122.
- Mann, S. A., Castro, M. L., Ohanian, M., Guo, G., Zodgekar, P., Sheu, A., Stockhammer, K., Thompson, T., Playford, D., Subbiah, R., et al. (2012). R222Q SCN5A Mutation Is Associated With Reversible Ventricular Ectopy and Dilated Cardiomyopathy. *JAC* 60, 1566–1573.
- Mantegazza, M., Franceschetti, S., and Avanzini, G. (1998). Anemone toxin (ATX II)-induced increase in persistent sodium current: effects on the firing properties of rat neocortical pyramidal neurones. *J. Physiol. (Lond.)* 507 (Pt 1), 105–116.
- Maruyama, M., Lin, S.-F., Xie, Y., Chua, S.-K., Joung, B., Han, S., Shinohara, T., Shen, M. J., Qu, Z., Weiss, J. N., et al. (2011). Genesis of phase 3 early afterdepolarizations and triggered activity in acquired long-QT syndrome. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 4, 103–111.
- Marijjanowski, M. M., Teeling, P., Mann, J., and Becker, A. E. (1995). Dilated cardiomyopathy is associated with an increase in the type I/type III collagen ratio: a quantitative assessment. *JAC* 25, 1263–1272.
- Martin, C. A., Guzadhur, L., Grace, A. A., Lei, M., and Huang, C. L. H. (2011). Mapping of reentrant spontaneous polymorphic ventricular tachycardia in a Scn5a^{+/-} mouse model. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*.
- Martin, C. A., Zhang, Y., Grace, A. A., and Huang, C. L.-H. (2010). In vivo studies of Scn5a^{+/-} mice modeling Brugada syndrome demonstrate both conduction and repolarization abnormalities. *J Electrocardiol* 43, 433–9.
- Martini, B., Nava, A., Thiene, G., Buja, G. F., Canciani, B., Scognamiglio, R., Daliento, L., and Dalla Volta, S. (1989). Ventricular fibrillation without apparent heart disease: description of six cases. *American Heart Journal* 118, 1203–1209.
- Marx, S. O., Reiken, S., Hisamatsu, Y., Jayaraman, T., Burkhoff, D., Rosemblyt, N., and Marks, A. R. (2000). PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* 101, 365–376.
- Massagué, J. (2000). How cells read TGF-beta signals. *Nature reviews. Molecular cell biology* 1, 169–78. doi:10.1038/35043051.
- Masson, S., Arosio, B., Luvarà, G., Gagliano, N., Fiordaliso, F., Santambrogio, D., Vergani, C., Latini, R., and Annoni, G. (1998). Remodelling of cardiac extracellular matrix during beta-adrenergic stimulation: upregulation of SPARC in the myocardium of adult rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30, 1505–1514.
- Matthews, G. D. K., Guzadhur, L., Grace, A., and Huang, C. L. H. (2012). Nonlinearity between action potential alternans and restitution, which both predict ventricular arrhythmic properties in Scn5a^{+/-} and wild-type murine hearts. *J. Appl. Physiol.* 112, 1847–1863.

- Mattiazzi, A., and Kranias, E. G. (2014). The role of CaMKII regulation of phospholamban activity in heart disease. *Front Pharmacol* 5, 5.
- Mays, P. K., McAnulty, R. J., Campa, J. S., and Laurent, G. J. (1991). Age-related changes in collagen synthesis and degradation in rat tissues. Importance of degradation of newly synthesized collagen in regulating collagen production. *Biochem. J.* 276 (Pt 2), 307–313.
- McCurdy, S., Baicu, C. F., Heymans, S., and Bradshaw, A. D. (2010). Cardiac extracellular matrix remodeling: Fibrillar collagens and Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC). *J. Mol. Cell. Cardiol.* 48, 544–549.
- McNair, W. P. (2004). SCN5A Mutation Associated With Dilated Cardiomyopathy, Conduction Disorder, and Arrhythmia. *Circulation* 110, 2163–2167.
- Medeiros-Domingo, A., Kaku, T., Tester, D. J., Iturralde-Torres, P., Itty, A., Ye, B., Valdivia, C., Ueda, K., Canizales-Quinteros, S., Tusié-Luna, M. T., et al. (2007). SCN4B-encoded sodium channel beta4 subunit in congenital long-QT syndrome. *Circulation* 116, 134–142.
- Meregalli, P., Wilde, A., and Tan, H. (2005). Pathophysiological mechanisms of Brugada syndrome: Depolarization disorder, repolarization disorder, or more? *Cardiovasc. Res.* 67, 367–378.
- Milberg, P., Pott, C., Fink, M., Frommeyer, G., Matsuda, T., Baba, A., Osada, N., Breithardt, G., Noble, D., and Eckardt, L. (2008). Inhibition of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger suppresses torsades de pointes in an intact heart model of long QT syndrome-2 and long QT syndrome-3. *Heart Rhythm* 5, 1444–1452.
- Miller, T. E. (2004). Recurrent Third-Trimester Fetal Loss and Maternal Mosaicism for Long-QT Syndrome. *Circulation* 109, 3029–3034.
- Minamisawa, S., Hoshijima, M., Chu, G., Ward, C. A., Frank, K., Gu, Y., Martone, M. E., Wang, Y., Ross, J., Kranias, E. G., et al. (1999). Chronic phospholamban-sarcoplasmic reticulum calcium ATPase interaction is the critical calcium cycling defect in dilated cardiomyopathy. *Cell* 99, 313–322.
- Miragoli, M. (2006). Electrotonic Modulation of Cardiac Impulse Conduction by Myofibroblasts. *Circ. Res.* 98, 801–810.
- Mishra, S., Gray, C. B. B., Miyamoto, S., Bers, D. M., and Brown, J. H. (2011a). Location Matters: Clarifying the Concept of Nuclear and Cytosolic CaMKII Subtypes. *Circ. Res.* 109, 1354–1362.
- Mishra, S., Undrovinas, N. A., Maltsev, V. A., Reznikov, V., Sabbah, H. N., and Undrovinas, A. (2011b). Post-transcriptional silencing of SCN1B and SCN2B genes modulates late sodium current in cardiac myocytes from normal dogs and dogs with chronic heart failure. *AJP: Heart and Circulatory Physiology* 301, H1596–605.
- Mitchell, G. F., Jeron, A., and Koren, G. (1998). Measurement of heart rate and Q-T interval in the conscious mouse. *Am. J. Physiol.* 274, H747–51.
- Moore, L., Fan, D., Basu, R., Kandalam, V., and Kassiri, Z. (2011). Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) in heart failure. *Heart Fail Rev* 17, 693–706.
- Moorman, A. F., and Lamers, W. H. (1994). Molecular anatomy of the developing heart. *Trends Cardiovasc. Med.* 4, 257–264.
- Moreno, J. D., and Clancy, C. E. (2012). Pathophysiology of the cardiac late Na current and its potential as a drug target. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 52, 608–19.

- Moss, A. J., Zareba, W., Schwarz, K. Q., Rosero, S., McNitt, S., and Robinson, J. L. (2008). Ranolazine shortens repolarization in patients with sustained inward sodium current due to type-3 long-QT syndrome. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 19, 1289–93.
- Motoike, H. K., Liu, H., Glaaser, I. W., Yang, A.-S., Tateyama, M., and Kass, R. S. (2004). The Na⁺ channel inactivation gate is a molecular complex: a novel role of the COOH-terminal domain. *J. Gen. Physiol.* 123, 155–65.
- Moustakas, A., and Heldin, C.-H. (2005). Non-Smad TGF-beta signals. *J. Cell. Sci.* 118, 3573–84.
- Movesian, M. A., Nishikawa, M., and Adelstein, R. S. (1984). Phosphorylation of phospholamban by calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase. Stimulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium uptake. *J. Biol. Chem.* 259, 8029–8032.
- Möllmann, H., Nef, H. M., Kostin, S., Kalle, von, C., Pilz, I., Weber, M., Schaper, J., Hamm, C. W., and Elsässer, A. (2006). Bone marrow-derived cells contribute to infarct remodelling. *Cardiovasc. Res.* 71, 661–671.
- Mruk, K., Farley, B. M., Ritacco, A. W., and Kobertz, W. R. (2014). Calmodulation meta-analysis: Predicting calmodulin binding via canonical motif clustering. *J. Gen. Physiol.* 144, 105–114.
- Munger, J. S., Huang, X., Kawakatsu, H., Griffiths, M. J., Dalton, S. L., Wu, J., Pittet, J. F., Kaminski, N., Garat, C., Matthay, M. A., et al. (1999). The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 96, 319–328.
- Murphy, B. J., Rogers, J., Perdichizzi, A. P., Colvin, A. A., and Catterall, W. A. (1996). cAMP-dependent phosphorylation of two sites in the alpha subunit of the cardiac sodium channel. *J. Biol. Chem.* 271, 28837–28843.
- Münch, G., Bölc, B., Karczewski, P., and Schwinger, R. H. G. (2002). Evidence for calcineurin-mediated regulation of SERCA 2a activity in human myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34, 321–334.
- Naccarelli, G. V., and Antzelevitch, C. (2001). The Brugada syndrome: clinical, genetic, cellular, and molecular abnormalities. *Am. J. Med.* 110, 573–581.
- Nag, A. C. (1980). Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution. *Cytobios* 28, 41–61.
- Nagase, H., Visse, R., and Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.* 69, 562–573.
- Nagatomo, T., January, C. T., and Makielski, J. C. (2000). Preferential block of late sodium current in the LQT3 DeltaKPQ mutant by the class I(C) antiarrhythmic flecainide. *Mol. Pharmacol.* 57, 101–107.
- Nerbonne, J. (2004). Studying cardiac arrhythmias in the mouse--a reasonable model for probing mechanisms? *Trends Cardiovasc. Med.* 14, 83–93.
- Nguyen, H. M., and Goldin, A. L. (2010). Sodium channel carboxyl-terminal residue regulates fast inactivation. *J. Biol. Chem.* 285, 9077–89.
- Nguyen, T. P., Qu, Z., and Weiss, J. N. (2014). Cardiac fibrosis and arrhythmogenesis: The road to repair is paved with perils. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 70, 83–91.
- Nicoll, D. A., Ottolia, M., Goldhaber, J. I., and Philipson, K. D. (2013). 20 years from NCX purification

- and cloning: milestones. *Adv. Exp. Med. Biol.* 961, 17–23.
- Nishida, M., Sato, Y., Uemura, A., Narita, Y., Tozaki-Saitoh, H., Nakaya, M., Ide, T., Suzuki, K., Inoue, K., Nagao, T., et al. (2008). P2Y₆ receptor-Gα_{12/13} signalling in cardiomyocytes triggers pressure overload-induced cardiac fibrosis. *EMBO J.* 27, 3104–3115.
- Nishio, S., Teshima, Y., Takahashi, N., Thuc, L. C., Saito, S., Fukui, A., Kume, O., Fukunaga, N., Hara, M., Nakagawa, M., et al. (2012). Activation of CaMKII as a key regulator of reactive oxygen species production in diabetic rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 52, 1103–1111.
- Noble, D., and Noble, P. J. (2006). Late sodium current in the pathophysiology of cardiovascular disease: consequences of sodium-calcium overload. *Heart* 92 Suppl 4, iv1–iv5.
- Norris, R. A., Borg, T. K., Butcher, J. T., Baudino, T. A., Banerjee, I., and Markwald, R. R. (2008). Neonatal and adult cardiovascular pathophysiological remodeling and repair: developmental role of periostin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1123, 30–40.
- Nuss, H. B., Chiamvimonvat, N., Pérez-García, M. T., Tomaselli, G. F., and Marban, E. (1995). Functional association of the beta 1 subunit with human cardiac (hH1) and rat skeletal muscle (mu 1) sodium channel alpha subunits expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Gen. Physiol.* 106, 1171–1191.
- Nuyens, D., Stengl, M., Dugarmaa, S., Rossenbacker, T., Compernelle, V., Rudy, Y., Smits, J. F., Flameng, W., Clancy, C. E., Moons, L., et al. (2001). Abrupt rate accelerations or premature beats cause life-threatening arrhythmias in mice with long-QT3 syndrome. *Nat. Med.* 7, 1021–7.
- Okamoto, Y., Chaves, A., Chen, J., Kelley, R., Jones, K., Weed, H. G., Gardner, K. L., Gangi, L., Yamaguchi, M., Klomkleaw, W., et al. (2001). Transgenic mice with cardiac-specific expression of activating transcription factor 3, a stress-inducible gene, have conduction abnormalities and contractile dysfunction. *Am. J. Pathol.* 159, 639–650.
- 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.
- Ottolia, M., Nicoll, D. A., and Philipson, K. D. (2009). Roles of two Ca²⁺-binding domains in regulation of the cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchanger. *Journal of Biological Chemistry* 284, 32735–32741.
- Ottolia, M., Torres, N., Bridge, J. H. B., Philipson, K. D., Goldhaber, J. I., and Bridge, J. H. (2013). Na/Ca exchange and contraction of the heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.*
- Oxenoid, K., and Chou, J. J. (2005). The structure of phospholamban pentamer reveals a channel-like architecture in membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 10870–10875.
- Oxford, E. M., Musa, H., Maass, K., Coombs, W., Taffet, S. M., and Delmar, M. (2007). Connexin43 Remodeling Caused by Inhibition of Plakophilin-2 Expression in Cardiac Cells. *Circ. Res.* 101, 703–711.
- Papadatos, G. A., Wallerstein, P. M. R., Head, C. E. G., Ratcliff, R., Brady, P. A., Benndorf, K., Saumarez, R. C., Trezise, A. E. O., Huang, C. L. H., Vandenberg, J. I., et al. (2002). Slowed conduction and ventricular tachycardia after targeted disruption of the cardiac sodium channel gene *Scn5a*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 6210–6215.
- Papp, Z., Borbely, A., and Paulus, W. J. (2014). CrossTalk opposing view: The late sodium current is not an important player in the development of diastolic heart failure (heart failure with a preserved ejection fraction). *J. Physiol. (Lond.)* 592, 415–417.
- Park, D. J., Freitas, T. A., Wallick, C. J., Guyette, C. V., and Warn-Cramer, B. J. (2006). Molecular

- dynamics and in vitro analysis of Connexin43: A new 14-3-3 mode-1 interacting protein. *Protein Sci.* 15, 2344–2355.
- Park, W. J., and Oh, J. G. (2013). SERCA2a: a prime target for modulation of cardiac contractility during heart failure. *BMB Rep* 46, 237–243.
- Pauschinger, M., Knopf, D., Petschauer, S., Doerner, A., Poller, W., Schwimmbeck, P. L., Kühl, U., and Schultheiss, H. P. (1999). Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio. *Circulation* 99, 2750–2756.
- Pavlov, E., Bladen, C., Winkfein, R., Diao, C., Dhaliwal, P., and French, R. J. (2005). The pore, not cytoplasmic domains, underlies inactivation in a prokaryotic sodium channel. *Biophysj* 89, 232–242.
- Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N., and Catterall, W. A. (2011). The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* 475, 353–358.
- Pedrotty, D. M., Klinger, R. Y., Kirkton, R. D., and Bursac, N. (2009). Cardiac fibroblast paracrine factors alter impulse conduction and ion channel expression of neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* 83, 688–697.
- Penuela, S., Gehi, R., and Laird, D. W. (2013). The biochemistry and function of pannexin channels. *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 15–22.
- Perbal, B. (2004). CCN proteins: multifunctional signalling regulators. *Lancet* 363, 62–64.
- Pereon, Y., Lande, G., Demolombe, S., Nguyen The Tich, S., Sternberg, D., Le Marec, H., and David, A. (2003). Paramyotonia congenita with an SCN4A mutation affecting cardiac repolarization. *Neurology* 60, 1–3.
- Petitprez, S., Zmoos, A. F., Ogrodnik, J., Balse, E., Raad, N., El-Haou, S., Albesa, M., Bittihn, P., Luther, S., Lehnart, S. E., et al. (2011). SAP97 and Dystrophin Macromolecular Complexes Determine Two Pools of Cardiac Sodium Channels Nav1.5 in Cardiomyocytes. *Circ. Res.* 108, 294–304.
- Phanish, M. K., Winn, S. K., and Dockrell, M. E. C. (2010). Connective tissue growth factor-(CTGF, CCN2)--a marker, mediator and therapeutic target for renal fibrosis. *Nephron Exp. Nephrol.* 114, e83–92.
- Plummer, N. W., and Meisler, M. H. (1999). Evolution and diversity of mammalian sodium channel genes. *Genomics* 57, 323–331.
- Polyakova, V., Loeffler, I., Hein, S., Miyagawa, S., Piotrowska, I., Dammer, S., Risteli, J., Schaper, J., and Kostin, S. (2010). Fibrosis in endstage human heart failure: Severe changes in collagen metabolism and MMP/TIMP profiles. *Int. J. Cardiol.*
- Pourrier, M., Williams, S., McAfee, D., Belardinelli, L., and Fedida, D. (2014). CrossTalk proposal: The late sodium current is an important player in the development of diastolic heart failure (heart failure with a preserved ejection fraction). *J. Physiol. (Lond.)* 592, 411–414.
- Priori, S. G., Bloise, R., and Crotti, L. (2001). The long QT syndrome. *Europace* 3, 16–27.
- Priori, S. G., Napolitano, C., Di Pasquale, E., and Condorelli, G. (2013a). Induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in studies of inherited arrhythmias. *Journal of Clinical Investigation* 123, 84–91.
- Priori, S. G., Schwartz, P. J., Napolitano, C., Bloise, R., Ronchetti, E., Grillo, M., Vicentini, A.,

- Spazzolini, C., Nastoli, J., Bottelli, G., et al. (2003). Risk stratification in the long-QT syndrome. *N. Engl. J. Med.* 348, 1866–1874.
- Priori, S. G., Wilde, A. A., Horie, M., Cho, Y., Behr, E. R., Berul, C., Blom, N., Brugada, J., Chiang, C.-E., Huikuri, H., et al. (2013b). Executive summary: HRS/EHRA/APHRS expert consensus statement on the diagnosis and management of patients with inherited primary arrhythmia syndromes. *Europace* 15, 1389–1406.
- Priori, S. G., Wilde, A. A., Horie, M., Cho, Y., Behr, E. R., Berul, C., Blom, N., Brugada, J., Chiang, C.-E., Huikuri, H., et al. (2013c). HRS/EHRA/APHRS expert consensus statement on the diagnosis and management of patients with inherited primary arrhythmia syndromes: document endorsed by HRS, EHRA, and APHRS in May 2013 and by ACCF, AHA, PACES, and AEPC in June 2013. *Heart Rhythm* 10, 1932–1963.
- Probst, V. (2003). Haploinsufficiency in combination with aging causes SCN5A-linked hereditary Lenègre disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 41, 643–652.
- Qi, X., Yeh, Y. H., Chartier, D., Xiao, L., Tsuji, Y., Brundel, B. J. J. M., Kodama, I., and Nattel, S. (2009). The Calcium/Calmodulin/Kinase System and Arrhythmogenic Afterdepolarizations in Bradycardia-Related Acquired Long-QT Syndrome. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 2, 295–304.
- Qin, N., D'Andrea, M. R., Lubin, M.-L., Shafae, N., Codd, E. E., and 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.
- Qu, Y., Rogers, J. C., Chen, S. F., McCormick, K. A., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (1999). Functional roles of the extracellular segments of the sodium channel alpha subunit in voltage-dependent gating and modulation by beta1 subunits. *J. Biol. Chem.* 274, 32647–32654.
- Qu, Y., Rogers, J., Tanada, T., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (1994). Modulation of cardiac Na⁺ channels expressed in a mammalian cell line and in ventricular myocytes by protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 3289–3293.
- Qu, Z., Karagueuzian, H. S., Garfinkel, A., and Weiss, J. N. (2004). Effects of Na(+) channel and cell coupling abnormalities on vulnerability to reentry: a simulation study. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286, H1310–21.
- Quignard, J. F., Ryckwaert, F., Albat, B., Nargeot, J., and Richard, S. (1997). A novel tetrodotoxin-sensitive Na⁺ current in cultured human coronary myocytes. *Circ. Res.* 80, 377–382.
- Rao, P., and Kowey, P. R. (2014). Drug-induced long-QT syndrome and torsade de pointes: an underrated problem? *Europace* 16, 4–5.
- Rastogi, S., Sharov, V. G., Mishra, S., Gupta, R. C., Blackburn, B., Belardinelli, L., Stanley, W. C., and Sabbah, H. N. (2008). Ranolazine combined with enalapril or metoprolol prevents progressive LV dysfunction and remodeling in dogs with moderate heart failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295, H2149–55.
- Remme, C. A., Scicluna, B. P., Verkerk, A. O., Amin, A. S., van Brunschot, S., Beekman, L., Deneer, V. H. M., Chevalier, C., Oyama, F., Miyazaki, H., et al. (2009a). Genetically Determined Differences in Sodium Current Characteristics Modulate Conduction Disease Severity in Mice With Cardiac Sodium Channelopathy. *Circ. Res.* 104, 1283–1292.
- Remme, C. A., Verkerk, A. O., Hoogaars, W. M. H., Aanhaanen, W. T. J., Scicluna, B. P., Annink, C., Hoff, den, M. J. B., Wilde, A. A. M., Veen, T. A. B., Veldkamp, M. W., et al. (2009b). The cardiac sodium channel displays differential distribution in the conduction system and transmural

- heterogeneity in the murine ventricular myocardium. *Basic Res. Cardiol.* 104, 511–522.
- Remme, C. A., 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., et al. (2006). Overlap syndrome of cardiac sodium channel disease in mice carrying the equivalent mutation of human SCN5A-1795insD. *Circulation* 114, 2584–94.
- Ren, X., and Philipson, K. D. (2013). The topology of the cardiac $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, NCX1. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 57, 68–71.
- Rentz, T. J., Poobalarahi, F., Bornstein, P., Sage, E. H., and Bradshaw, A. D. (2007). SPARC regulates processing of procollagen I and collagen fibrillogenesis in dermal fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 282, 22062–22071.
- Rhett, J. M., Ongstad, E. L., Jourdan, J., and Gourdie, R. G. (2012). Cx43 Associates with Na(v)1.5 in the Cardiomyocyte Perinexus. *J. Membr. Biol.* 245, 411–22.
- Rhett, J. M., Veeraraghavan, R., Poelzing, S., and Gourdie, R. G. (2013). The perinexus: Sign-post on the path to a new model of cardiac conduction? *Trends Cardiovasc. Med.* 23, 222–228.
- Rich, J. N., Shi, Q., Hjelmeland, M., Cummings, T. J., Kuan, C.-T., Bigner, D. D., Counter, C. M., and Wang, X.-F. (2003). Bone-related genes expressed in advanced malignancies induce invasion and metastasis in a genetically defined human cancer model. *J. Biol. Chem.* 278, 15951–15957.
- Ridinger, H., Rutenberg, C., Lutz, D., Buess, A., Petersen, I., Amann, K., and Maercker, C. (2009). Expression and tissue localization of beta-catenin, alpha-actinin and chondroitin sulfate proteoglycan 6 is modulated during rat and human left ventricular hypertrophy. *Exp. Mol. Pathol.* 86, 23–31.
- Rivolta, I. (2001). Inherited Brugada and Long QT-3 Syndrome Mutations of a Single Residue of the Cardiac Sodium Channel Confer Distinct Channel and Clinical Phenotypes. *Journal of Biological Chemistry* 276, 30623–30630.
- Rivolta, I., Clancy, C. E., Tateyama, M., Liu, H., Priori, S. G., and Kass, R. S. (2002). A novel SCN5A mutation associated with long QT-3: altered inactivation kinetics and channel dysfunction. *Physiol. Genomics* 10, 191–197.
- ROMANO, C., GEMME, G., and PONGIGLIONE, R. (1963). [RARE CARDIAC ARRHYTHMIAS OF THE PEDIATRIC AGE. II. SYNCOPAL ATTACKS DUE TO PAROXYSMAL VENTRICULAR FIBRILLATION. (PRESENTATION OF 1ST CASE IN ITALIAN PEDIATRIC LITERATURE)]. *Clin Pediatr (Bologna)* 45, 656–683.
- Rook, M. B., Evers, M. M., Vos, M. A., and Bierhuizen, M. F. A. (2012). Biology of cardiac sodium channel Nav1.5 expression. *Cardiovasc. Res.* 93, 12–23.
- Rosker, C., Salvarani, N., Schmutz, S., Grand, T., and Rohr, S. (2011). Abolishing Myofibroblast Arrhythmogenicity by Pharmacological Ablation of α -Smooth Muscle Actin Containing Stress Fibers. *Circ. Res.* 109, 1120–1131.
- Royer, A. (2005). Mouse Model of SCN5A-Linked Hereditary Lenegre's Disease: Age-Related Conduction Slowing and Myocardial Fibrosis. *Circulation* 111, 1738–1746.
- Sabbah, H. N., Chandler, M. P., Mishima, T., Suzuki, G., Chaudhry, P., Nass, O., Biesiadecki, B. J., Blackburn, B., Wolff, A., and Stanley, W. C. (2002). Ranolazine, a partial fatty acid oxidation (pFOX) inhibitor, improves left ventricular function in dogs with chronic heart failure. *J. Card. Fail.* 8, 416–422.

- Saffitz, J. E., Asimaki, A., and Huang, H. (2010). Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: new insights into mechanisms of disease. *Cardiovascular Pathology* 19, 166–170.
- Sag, C. M., Wagner, S., and Maier, L. S. (2013). Role of oxidants on calcium and sodium movement in healthy and diseased cardiac myocytes. *Free Radical Biology and Medicine* 63, 338–349.
- Sag, C. M., Mallwitz, A., Wagner, S., Hartmann, N., Schotola, H., Fischer, T. H., Ungeheuer, N., Herting, J., Shah, A. M., Maier, L. S., et al. (2014). Enhanced late INa induces proarrhythmogenic SR Ca leak in a CaMKII-dependent manner. *J. Mol. Cell. Cardiol.*
- Sakakibara, Y., Wasserstrom, J. A., Furukawa, T., Jia, H., Arentzen, C. E., Hartz, R. S., and Singer, D. H. (1992). Characterization of the sodium current in single human atrial myocytes. *Circ. Res.* 71, 535–546.
- Salama, G., and London, B. (2007). Mouse models of long QT syndrome. *J. Physiol. (Lond.)* 578, 43–53.
- Salama, G., Baker, L., Wolk, R., Barhanin, J., and London, B. (2009). Arrhythmia phenotype in mouse models of human long QT. *J Interv Card Electrophysiol* 24, 77–87.
- Sato, M., Gong, H., Terracciano, C. M. N., Ranu, H., and Harding, S. E. (2004). Loss of beta-adrenoceptor response in myocytes overexpressing the Na⁺/Ca²⁺-exchanger. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 36, 43–48.
- Sato, P. Y., Coombs, W., Lin, X., Nekrasova, O., Green, K., Isom, L. L., Taffet, S., and Delmar, M. (2011). Interactions Between Ankyrin-G, Plakophilin-2, and Connexin43 at the Cardiac Intercalated Disc. *Circ. Res.*
- Sato, P. Y., Musa, H., Coombs, W., Guerrero-Serna, G., Patino, G. A., Taffet, S. M., Isom, L. L., and Delmar, M. (2009). Loss of Plakophilin-2 Expression Leads to Decreased Sodium Current and Slower Conduction Velocity in Cultured Cardiac Myocytes. *Circ. Res.* 105, 523–526.
- Schellings, M. W. M., van Almen, G. C., Sage, E. H., and Heymans, S. (2009). Thrombospondins in the heart: potential functions in cardiac remodeling. *J Cell Commun Signal* 3, 201–213.
- Schott, J. J., Alshinawi, C., Kyndt, F., Probst, V., Hoorntje, T. M., Hulsbeek, M., Wilde, A. A. M., Escande, D., Mannens, M. M., and Le Marec, H. (1999). Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A. *Nat. Genet.* 23, 20–21.
- Schroeter, A., Walzik, S., Blechschmidt, S., Haufe, V., Benndorf, K., and Zimmer, T. (2010). Structure and function of splice variants of the cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 49, 16–24.
- Schulze-Bahr, E., Neu, A., Friederich, P., Kaupp, U. B., Breithardt, G., Pongs, O., and Isbrandt, D. (2003). Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease. *Journal of Clinical Investigation* 111, 1537–1545.
- Schwartz, P. J. (2014). Cardiac sympathetic denervation to prevent life-threatening arrhythmias. *Nature Publishing Group*, 1–8.
- Schwartz, P. J. (1985). Idiopathic long QT syndrome: progress and questions. *American Heart Journal* 109, 399–411.
- Schwartz, P. J., and Locati, E. (1985). The idiopathic long QT syndrome: pathogenetic mechanisms and therapy. *Eur. Heart J.* 6 Suppl D, 103–114.
- Schwartz, P. J., Stramba-Badiale, M., Crotti, L., Pedrazzini, M., Besana, A., Bosi, G., Gabbarini, F.,

- Goulene, K., Insolia, R., Mannarino, S., et al. (2009). Prevalence of the congenital long-QT syndrome. *Circulation* 120, 1761–1767.
- Scicluna, B. P., Tanck, M. W. T., Remme, C. A., Beekman, L., Coronel, R., Wilde, A. A. M., and Bezzina, C. R. (2011). Quantitative trait loci for electrocardiographic parameters and arrhythmia in the mouse. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 50, 380–389.
- Scriven, D. R. L., and Moore, E. D. W. (2013). Ca²⁺ channel and Na⁺/Ca²⁺ exchange localization in cardiac myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 58, 22–31.
- Shah, V. N., Wingo, T. L., Weiss, K. L., Williams, C. K., Balser, J. R., and Chazin, W. J. (2006). Calcium-dependent regulation of the voltage-gated sodium channel hH1: intrinsic and extrinsic sensors use a common molecular switch. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 3592–3597.
- Shi, R., Zhang, Y.-W., Yang, C., Huang, C., Zhou, X., Qiang, H., Grace, A. A., Huang, C. L. H., and Ma, A. (2008). The cardiac sodium channel mutation delQKP 1507-1509 is associated with the expanding phenotypic spectrum of LQT3, conduction disorder, dilated cardiomyopathy, and high incidence of youth sudden death. *Europace* 10, 1329–1335.
- Shimizu, W., Ohe, T., Kurita, T., Takaki, H., Aihara, N., Kamakura, S., Matsuhisa, M., and Shimomura, K. (1991). Early afterdepolarizations induced by isoproterenol in patients with congenital long QT syndrome. *Circulation* 84, 1915–1923.
- Shryock, J. C., Song, Y., Rajamani, S., Antzelevitch, C., and Belardinelli, L. (2013). The Arrhythmogenic Consequences of Increasing Late I_{Na} in the Cardiomyocyte. *Cardiovasc. Res.*
- Shy, D., Gillet, L., and Abriel, H. (2013). Cardiac sodium channel NaV1.5 distribution in myocytes via interacting proteins: the multiple pool model. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 886–894.
- Sicouri, S., Antzelevitch, D., Heilmann, C., and Antzelevitch, C. (1997). Effects of sodium channel block with mexiletine to reverse action potential prolongation in in vitro models of the long term QT syndrome. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 8, 1280–1290.
- Simon, A. M., Goodenough, D. A., and Paul, D. L. (1998). Mice lacking connexin40 have cardiac conduction abnormalities characteristic of atrioventricular block and bundle branch block. *Current Biology* 8, 1–4.
- Sipido, K. R., Maes, M., and Van de Werf, F. (1997). Low efficiency of Ca²⁺ entry through the Na(+)-Ca²⁺ exchanger as trigger for Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum. A comparison between L-type Ca²⁺ current and reverse-mode Na(+)-Ca²⁺ exchange. *Circ. Res.* 81, 1034–1044.
- Sipido, K. R., Varro, A., and Eisner, D. (2006). Sodium calcium exchange as a target for antiarrhythmic therapy. *Handb Exp Pharmacol*, 159–199.
- Small, E. M., Thatcher, J. E., Sutherland, L. B., Kinoshita, H., Gerard, R. D., Richardson, J. A., DiMaio, J. M., Sadek, H., Kuwahara, K., and Olson, E. N. (2010). Myocardin-related transcription factor-a controls myofibroblast activation and fibrosis in response to myocardial infarction. *Circ. Res.* 107, 294–304.
- SMITS, J., VELDKAMP, M., Bezzina, C., BHUIYAN, Z., Wedekind, H., SCHULZEBAHR, E., and Wilde, A. (2005). Substitution of a conserved alanine in the domain IIIS4–S5 linker of the cardiac sodium channel causes long QT syndrome. *Cardiovasc. Res.* 67, 459–466.
- Snider, P., Standley, K. N., Wang, J., Azhar, M., Doetschman, T., and Conway, S. J. (2009). Origin of cardiac fibroblasts and the role of periostin. *Circ. Res.* 105, 934–947.
- Song, Y., Shryock, J. C., and Belardinelli, L. (2008). An increase of late sodium current induces delayed

- afterdepolarizations and sustained triggered activity in atrial myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294, H2031–9.
- Sossalla, S., Wagner, S., Rasenack, E. C., Ruff, H., Weber, S. L., Schöndube, F. A., Tirilomis, T., Tenderich, G., Hasenfuss, G., Belardinelli, L., et al. (2008). Ranolazine improves diastolic dysfunction in isolated myocardium from failing human hearts--role of late sodium current and intracellular ion accumulation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 45, 32–43.
- Souders, C. A., Bowers, S. L. K., and Baudino, T. A. (2009). Cardiac Fibroblast: The Renaissance Cell. *Circ. Res.* 105, 1164–1176.
- Spach, M. S., Dolber, P. C., and Heidlage, J. F. (1988). Influence of the passive anisotropic properties on directional differences in propagation following modification of the sodium conductance in human atrial muscle. A model of reentry based on anisotropic discontinuous propagation. *Circ. Res.* 62, 811–832.
- Speerschneider, T., and Thomsen, M. B. (2013). Physiology and analysis of the electrocardiographic T wave in mice. *Acta Physiol (Oxf)* 209, 262–271.
- Stokoe, K. S., Balasubramaniam, R., Goddard, C. A., Colledge, W. H., Grace, A. A., and Huang, C. L. H. (2007). Effects of flecainide and quinidine on arrhythmogenic properties of Scn5a^{+/-} murine hearts modelling the Brugada syndrome. *J. Physiol. (Lond.)* 581, 255–275.
- Studenik, C. R., Zhou, Z., and January, C. T. (2001). Differences in action potential and early afterdepolarization properties in LQT2 and LQT3 models of long QT syndrome. *Br. J. Pharmacol.* 132, 85–92.
- Stühmer, 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.
- Su, C., Bevan, J. A., and Burnstock, G. (1971). [3H]adenosine triphosphate: release during stimulation of enteric nerves. *Science* 173, 336–338.
- Sun, Y. (2000). Infarct scar: a dynamic tissue. *Cardiovasc. Res.* 46, 250–256.
- Swaney, J. S., Roth, D. M., Olson, E. R., Naugle, J. E., Meszaros, J. G., and Insel, P. A. (2005). Inhibition of cardiac myofibroblast formation and collagen synthesis by activation and overexpression of adenylyl cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 437–442.
- Szabó, G., Szentandrassy, N., Bíró, T., Tóth, B. I., Czifra, G., Magyar, J., Bányász, T., Varró, A., Kovács, L., and Nánási, P. P. (2005). Asymmetrical distribution of ion channels in canine and human left-ventricular wall: epicardium versus midmyocardium. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 450, 307–316.
- Takeda, N., and Manabe, I. (2011). Cellular Interplay between Cardiomyocytes and Nonmyocytes in Cardiac Remodeling. *Int J Inflam* 2011, 535241.
- Takeda, N., Manabe, I., Uchino, Y., Eguchi, K., Matsumoto, S., Nishimura, S., Shindo, T., Sano, M., Otsu, K., Snider, P., et al. (2010). Cardiac fibroblasts are essential for the adaptive response of the murine heart to pressure overload. *J. Clin. Invest.* 120, 254–265.
- Tanaka, H., Nishimaru, K., Aikawa, T., Hirayama, W., Tanaka, Y., and Shigenobu, K. (2002). Effect of SEA0400, a novel inhibitor of sodium-calcium exchanger, on myocardial ionic currents. *Br. J. Pharmacol.* 135, 1096–1100.
- Thandavarayan, R. A., Giridharan, V. V., Sari, F. R., Arumugam, S., Veeraveedu, P. T., Pandian, G. N.,

- Palaniyandi, S. S., Ma, M., Suzuki, K., Gurusamy, N., et al. (2011). Depletion of 14-3-3 protein exacerbates cardiac oxidative stress, inflammation and remodeling process via modulation of MAPK/NF- κ B signaling pathways after streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Cell. Physiol. Biochem.* 28, 911–922.
- Thompson, S. A., Blazeski, A., Copeland, C. R., Cohen, D. M., Chen, C. S., Reich, D. M., and Tung, L. (2014). Journal of Molecular and Cellular Cardiology. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 68, 29–37.
- Thompson, S. A., Copeland, C. R., Reich, D. H., and Tung, L. (2011). Mechanical Coupling Between Myofibroblasts and Cardiomyocytes Slows Electric Conduction in Fibrotic Cell Monolayers. *Circulation.*
- Tian, X.-L., Yong, S. L., Wan, X., Wu, L., Chung, M. K., Tchou, P. J., Rosenbaum, D. S., Van Wagoner, D. R., Kirsch, G. E., and Wang, Q. (2004). Mechanisms by which SCN5A mutation N1325S causes cardiac arrhythmias and sudden death in vivo. *Cardiovasc. Res.* 61, 256–267.
- Tian, Y., and Morrissey, E. E. (2012). Importance of myocyte-nonmyocyte interactions in cardiac development and disease. *Circ. Res.* 110, 1023–1034.
- Tikhonov, D. B., and Zhorov, B. S. (2007). Sodium channels: ionic model of slow inactivation and state-dependent drug binding. *Biophysj* 93, 1557–1570.
- Todt, H., Dudley, S. C., Kyle, J. W., French, R. J., and Fozzard, H. A. (1999). Ultra-slow inactivation in mu1 Na⁺ channels is produced by a structural rearrangement of the outer vestibule. *Biophysj* 76, 1335–1345.
- Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., and Brown, R. A. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 349–363.
- Tusscher, Ten, K. H. W. J., and Panfilov, A. V. (2007). Influence of diffuse fibrosis on wave propagation in human ventricular tissue. *Europace* 9 Suppl 6, vi38–45.
- Ufret-Vincenty, C. A., Baro, D. J., Lederer, W. J., Rockman, H. A., Quinones, L. E., and Santana, L. F. (2001). Role of sodium channel deglycosylation in the genesis of cardiac arrhythmias in heart failure. *J. Biol. Chem.* 276, 28197–28203.
- Ulbricht, W. (2005). Sodium channel inactivation: molecular determinants and modulation. *Physiol. Rev.* 85, 1271–1301.
- Valdivia, C. R., Nagatomo, T., and 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., and Makielski, J. C. (2009). GPD1L links redox state to cardiac excitability by PKC-dependent phosphorylation of the sodium channel SCN5A. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297, H1446–H1452.
- van Amerongen, M. J., Bou-Gharios, G., Popa, E., van Ark, J., Petersen, A. H., van Dam, G. M., van Luyn, M. J. A., and Harmsen, M. C. (2008). Bone marrow-derived myofibroblasts contribute functionally to scar formation after myocardial infarction. *J. Pathol.* 214, 377–386.
- van den Berg, M. P., van den Heuvel, F., van Tintelen, J. P., Volders, P. G. A., and van Gelder, I. C. (2014). Successful treatment of a patient with symptomatic long QT syndrome type 3 using ranolazine combined with a beta-blocker. *Int. J. Cardiol.* 171, 90–92.
- van den Boogaard, M., Smemo, S., Burnicka-Turek, O., Arnolds, D. E., van de Werken, H. J. G., Klous, P., McKean, D., Muehlschlegel, J. D., Moosmann, J., Toka, O., et al. (2014). A common genetic

- variant within SCN10A modulates cardiac SCN5A expression. *J. Clin. Invest.* 124, 1844–1852.
- van der Merwe, P. L., Weymar, H. W., Torrington, M., and Brink, A. J. (1988). Progressive familial heart block (type I). A follow-up study after 10 years. *S. Afr. Med. J.* 73, 275–276.
- van der Merwe, P. L., Weymar, H. W., Torrington, M., and Brink, A. J. (1986). Progressive familial heart block. Part II. Clinical and ECG confirmation of progression--report on 4 cases. *S. Afr. Med. J.* 70, 356–357.
- van Rijen, H. V. M. (2004). Slow Conduction and Enhanced Anisotropy Increase the Propensity for Ventricular Tachyarrhythmias in Adult Mice With Induced Deletion of Connexin43. *Circulation* 109, 1048–1055.
- van Veen, T. A. B. (2005). Impaired Impulse Propagation in Scn5a-Knockout Mice: Combined Contribution of Excitability, Connexin Expression, and Tissue Architecture in Relation to Aging. *Circulation* 112, 1927–1935.
- Vanhoutte, D., and Heymans, S. (2010). TIMPs and cardiac remodeling: “Embracing the MMP-independent-side of the family.” *J. Mol. Cell. Cardiol.* 48, 445–453.
- Vasquez, C., and Morley, G. E. (2012). The Origin and Arrhythmogenic Potential of Fibroblasts in Cardiac Disease. *J. Cardiovasc. Transl. Res.*
- Vasquez, C., Benamer, N., and Morley, G. E. (2011). The cardiac fibroblast: functional and electrophysiological considerations in healthy and diseased hearts. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 57, 380–388.
- Vasquez, C., Mohandas, P., Louie, K. L., Benamer, N., Bapat, A. C., and Morley, G. E. (2010). Enhanced Fibroblast-Myocyte Interactions in Response to Cardiac Injury. *Circ. Res.* 107, 1011–1020.
- Vassilev, P. M., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (1988). Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. *Science* 241, 1658–1661.
- Vaughan, M. B., Howard, E. W., and Tomasek, J. J. (2000). Transforming growth factor-beta1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. *Exp. Cell Res.* 257, 180–189.
- Vaughn, B. P., Robson, S. C., and Burnstock, G. (2012). Pathological roles of purinergic signaling in the liver. *J. Hepatol.* 57, 916–920.
- Vedantham, V., and Cannon, S. C. (1998). Slow inactivation does not affect movement of the fast inactivation gate in voltage-gated Na⁺ channels. *J. Gen. Physiol.* 111, 83–93.
- Veldkamp, M. W., Viswanathan, P. C., Bezzina, C., Baartscheer, A., Wilde, A. A., and Balser, J. R. (2000). Two distinct congenital arrhythmias evoked by a multidysfunctional Na⁺ channel. *Circ. Res.* 86, E91–7.
- Vilin, Y. Y., Fujimoto, E., and Ruben, P. C. (2001). A single residue differentiates between human cardiac and skeletal muscle Na⁺ channel slow inactivation. *Biophys. J.* 80, 2221–2230.
- Vilin, Y. Y., Makita, N., George, A. L., and Ruben, P. C. (1999). Structural determinants of slow inactivation in human cardiac and skeletal muscle sodium channels. *Biophys. J.* 77, 1384–1393.
- Vostrikov, V. V., Mote, K. R., Verardi, R., and Veglia, G. (2013). Structural Dynamics and Topology of Phosphorylated Phospholamban Homopentamer Reveal Its Role in the Regulation of Calcium Transport. *Structure/Folding and Design* 21, 2119–2130.

- Wagner, S., Dybkova, N., Rasenack, E. C. L., Jacobshagen, C., Fabritz, L., Kirchhof, P., Maier, S. K. G., Zhang, T., Hasenfuss, G., Brown, J. H., et al. (2006). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na⁺ channels. *Journal of Clinical Investigation* 116, 3127–3138.
- Wagner, S., Rokita, A. G., Anderson, M. E., and Maier, L. S. (2013). Redox regulation of sodium and calcium handling. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 1063–1077.
- Wagner, S., Ruff, H. M., Weber, S. L., Bellmann, S., Sowa, T., Schulte, T., Anderson, M. E., Grandi, E., Bers, D. M., Backs, J., et al. (2011). Reactive oxygen species-activated Ca/calmodulin kinase II δ is required for late I(Na) augmentation leading to cellular Na and Ca overload. *Circ. Res.* 108, 555–565.
- Wang, D. W. (2002). Clinical, Genetic, and Biophysical Characterization of. *Circulation* 105, 1–7.
- Wang, D. W., Crotti, L., Shimizu, W., Pedrazzini, M., Cantu, F., De Filippo, P., Kishiki, K., Miyazaki, A., Ikeda, T., Schwartz, P. J., et al. (2008). Malignant perinatal variant of long-QT syndrome caused by a profoundly dysfunctional cardiac sodium channel. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 1, 370–378.
- Wang, D. W., Yazawa, K., George, A. L., and Bennett, P. B. (1996). Characterization of human cardiac Na⁺ channel mutations in the congenital long QT syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 13200–13205.
- Wang, J. C., Sonnylal, S., Arnett, F. C., De Crombrughe, B., and Zhou, X. (2011a). Attenuation of expression of extracellular matrix genes with sirnas to SPARC and CTGF in skin fibroblasts of CTGF transgenic mice. *Int J Immunopathol Pharmacol* 24, 595–601.
- Wang, J., Wang, Q., Watson, L. J., Jones, S. P., and Epstein, P. N. (2011b). Cardiac overexpression of 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 protects mitochondrial DNA and reduces cardiac fibrosis following transaortic constriction. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*.
- Wang, J.-C., Lai, S., Guo, X., Zhang, X., de Crombrughe, B., Sonnylal, S., Arnett, F. C., and Zhou, X. (2010). Attenuation of fibrosis in vitro and in vivo with SPARC siRNA. *Arthritis Res. Ther.* 12, R60.
- Wang, Q., Shen, J., Splawski, I., Atkinson, D., Li, Z., Robinson, J. L., Moss, A. J., Towbin, J. A., and Keating, M. T. (1995). SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* 80, 805–811.
- Wang, S., and Wang, G. K. (1996). Slow inactivation of muscle mu1 Na⁺ channels in permanently transfected mammalian cells. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 432, 692–699.
- Ward, C. A., and Giles, W. R. (1997). Ionic mechanism of the effects of hydrogen peroxide in rat ventricular myocytes. *J. Physiol. (Lond.)* 500 (Pt 3), 631–642.
- Ward, D. E., Ho, S. Y., and Shinebourne, E. A. (1984). Familial atrial standstill and inexcitability in childhood. *Am. J. Cardiol.* 53, 965–967.
- WARD, O. C. (1964). A NEW FAMILIAL CARDIAC SYNDROME IN CHILDREN. *J Ir Med Assoc* 54, 103–106.
- Watanabe, H., Darbar, D., Kaiser, D. W., Jiramongkolchai, K., Chopra, S., Donahue, B. S., Kannankeril, P. J., and Roden, D. M. (2009). Mutations in sodium channel β 1- and β 2-subunits associated with atrial fibrillation. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 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., et al. (2008). Sodium channel β 1 subunit mutations

- associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans. *Journal of Clinical Investigation*.
- Watanabe, H., Yang, T., Stroud, D. M., Lowe, J. S., Harris, L., Atack, T. C., Wang, D. W., Hipkens, S. B., Leake, B., Hall, L., et al. (2011). Striking In Vivo Phenotype of a Disease-Associated Human SCN5A Mutation Producing Minimal Changes in Vitro. *Circulation* 124, 1001–1011.
- Watson, C. L., and Gold, M. R. (1997). Modulation of Na⁺ current inactivation by stimulation of protein kinase C in cardiac cells. *Circ. Res.* 81, 380–386.
- Weber, C. R., Piacentino, V., Houser, S. R., and Bers, D. M. (2003). Dynamic regulation of sodium/calcium exchange function in human heart failure. *Circulation* 108, 2224–2229.
- Weber, K. T. (1989). Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *JAC* 13, 1637–1652.
- Wedekind, H., Smits, J. P. P., Schulze-Bahr, E., Arnold, R., Veldkamp, M. W., Bajanowski, T., Borggrefe, M., Brinkmann, B., Warnecke, I., Funke, H., et al. (2001). De Novo Mutation in the SCN5A Gene Associated With Early Onset of Sudden Infant Death. *Circulation* 104, 1158–1164.
- Wegener, A. D., Simmerman, H. K., Lindemann, J. P., and Jones, L. R. (1989). Phospholamban phosphorylation in intact ventricles. Phosphorylation of serine 16 and threonine 17 in response to beta-adrenergic stimulation. *J. Biol. Chem.* 264, 11468–11474.
- Wehrens, X. H. T., Lehnart, S. E., Reiken, S. R., and Marks, A. R. (2004). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ. Res.* 94, e61–70.
- Wehrens, X. H. T., Lehnart, S. E., Reiken, S., Vest, J. A., Wronska, A., and Marks, A. R. (2006). Ryanodine receptor/calcium release channel PKA phosphorylation: a critical mediator of heart failure progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 511–518.
- Wehrens, X. H. T., Rossenbacker, T., Jongbloed, R. J., Gewillig, M., Heidbüchel, H., Doevendans, P. A., Vos, M. A., Wellens, H. J. J., and Kass, R. S. (2003). A novel mutation L619F in the cardiac Na⁺ channel SCN5A associated with long-QT syndrome (LQT3): a role for the I-II linker in inactivation gating. *Hum. Mutat.* 21, 552–552.
- Wei, C.-J., Xu, X., and Lo, C. W. (2004). Connexins and cell signaling in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 811–838.
- Weisser-Thomas, J. (2003). Calcium entry via Na/Ca exchange during the action potential directly contributes to contraction of failing human ventricular myocytes. *Cardiovasc. Res.* 57, 974–985.
- West, J. W., Patton, D. E., Scheuer, T., Wang, Y., Goldin, A. L., and Catterall, W. A. (1992). A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na⁺-channel inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 10910–10914.
- Westenbroek, R. E., Bischoff, S., Fu, Y., Maier, S. K., Catterall, W. A., and Scheuer, T. (2013). Localization of sodium channel subtypes in mouse ventricular myocytes using quantitative immunocytochemistry. *J. Mol. Cell. Cardiol.*
- Wiegerinck, R. F., Verkerk, A. O., Belterman, C. N., van Veen, T. A. B., Baartscheer, A., Opthof, T., Wilders, R., de Bakker, J. M. T., and Coronel, R. (2006). Larger cell size in rabbits with heart failure increases myocardial conduction velocity and QRS duration. *Circulation* 113, 806–813.
- Wilde, A. A., Postema, P. G., Di Diego, J. M., Viskin, S., Morita, H., Fish, J. M., and Antzelevitch, C. (2010). The pathophysiological mechanism underlying Brugada syndrome: depolarization versus

- repolarization. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 49, 543–53.
- Witcher, D. R., Kovacs, R. J., Schulman, H., Cefali, D. C., and Jones, L. R. (1991). Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity. *J. Biol. Chem.* 266, 11144–11152.
- Wu, J., Zhang, Y., Zhang, X., Cheng, L., Lammers, W. J., Grace, A. A., Fraser, J. A., Zhang, H., Huang, C. L.-H., and Lei, M. (2012). Altered sinoatrial node function and intra-atrial conduction in murine gain-of-function *Scn5a*^{+/ΔKPQ} hearts suggest an overlap syndrome. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 302, H1510–23.
- Wu, R. X., Laser, M., Han, H., Varadarajulu, J., Schuh, K., Hallhuber, M., Hu, K., Ertl, G., Hauck, C. R., and Ritter, O. (2006). Fibroblast migration after myocardial infarction is regulated by transient SPARC expression. *J. Mol. Med.* 84, 241–252.
- Xiao, Y., Tang, J., Hu, W., Xie, J., Maertens, C., Tytgat, J., and Liang, S. (2005). Jingzhaotoxin-I, a novel spider neurotoxin preferentially inhibiting cardiac sodium channel inactivation. *J. Biol. Chem.* 280, 12069–12076.
- Yan, G. X., and Antzelevitch, C. (1998). Cellular Basis for the Normal T Wave and the Electrocardiographic Manifestations of the Long-QT Syndrome. *Circulation* 98, 1928–1936.
- Yan, G. X., Wu, Y., Liu, T., Wang, J., Marinchak, R. A., and Kowey, P. R. (2001). Phase 2 Early Afterdepolarization as a Trigger of Polymorphic Ventricular Tachycardia in Acquired Long-QT Syndrome : Direct Evidence From Intracellular Recordings in the Intact Left Ventricular Wall. *Circulation* 103, 2851–2856.
- Yang, T., Atack, T. C., Stroud, D. M., Zhang, W., Hall, L., and Roden, D. M. (2012). Blocking *scn10a* channels in heart reduces late sodium current and is antiarrhythmic. *Circ. Res.* 111, 322–32.
- Yanmei, F., Yaqin, W., Haibo, S., Huiqun, Z., Zhengnong, C., Dongzhen, Y., and Shankai, Y. (2008). Cochlear implantation in patients with Jervell and Lange-Nielsen syndrome, and a review of literature. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 72, 1723–1729.
- Yao, A., Su, Z., Nonaka, A., Zubair, I., Lu, L., Philipson, K. D., Bridge, J. H., and Barry, W. H. (1998). Effects of overexpression of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger on [Ca²⁺]_i transients in murine ventricular myocytes. *Circ. Res.* 82, 657–665.
- Yao, L., Fan, P., Jiang, Z., Viatchenko-Karpinski, S., Wu, Y., Korniyev, D., Hirakawa, R., Budas, G. R., Rajamani, S., Shryock, J. C., et al. (2011). Nav1.5-dependent persistent Na⁺ influx activates CaMKII in rat ventricular myocytes and N1325S mice. *AJP: Cell Physiology* 301, C577–86.
- Yarbrough, T. L., Lu, T., Lee, H.-C., and Shibata, E. F. (2002). Localization of cardiac sodium channels in caveolin-rich membrane domains: regulation of sodium current amplitude. *Circ. Res.* 90, 443–449.
- Yong, S. L., Ni, Y., Zhang, T., Tester, D. J., Ackerman, M. J., and Wang, Q. K. (2007). Characterization of the cardiac sodium channel SCN5A mutation, N1325S, in single murine ventricular myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352, 378–383.
- Yoon, J.-Y., Ho, W.-K., Kim, S.-T., and Cho, H. (2009). Journal of Molecular and Cellular Cardiology. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 47, 475–484.
- Yoon, P. O., Lee, M.-A., Cha, H., Jeong, M. H., Kim, J., Jang, S. P., Choi, B. Y., Jeong, D., Yang, D. K., and Hajjar, R. J. (2010). The opposing effects of CCN2 and CCN5 on the development of cardiac hypertrophy and fibrosis. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 49, 294–303.

- Young, K. A., and Caldwell, J. H. (2005). Modulation of skeletal and cardiac voltage-gated sodium channels by calmodulin. *J. Physiol. (Lond.)* 565, 349–370.
- Yu, F. H., and Catterall, W. A. (2003). Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol.* 4, 207.
- Yu, F. H., Westenbroek, R. E., Silos-Santiago, I., McCormick, K. A., Lawson, D., Ge, P., Ferriera, H., Lilly, J., DiStefano, P. S., Catterall, W. A., et al. (2003). Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2. *Journal of Neuroscience* 23, 7577–7585.
- Yue, L., Xie, J., and Nattel, S. (2011). Molecular determinants of cardiac fibroblast electrical function and therapeutic implications for atrial fibrillation. *Cardiovasc. Res.* 89, 744–753.
- Zachariah, J. P., Colan, S. D., Lang, P., Triedman, J. K., Alexander, M. E., Walsh, E. P., Berul, C. I., and Cecchin, F. (2012). Circulating matrix metalloproteinases in adolescents with hypertrophic cardiomyopathy and ventricular arrhythmia. *Circ Heart Fail* 5, 462–6.
- Zaza, A., and Rocchetti, M. (2013). The late Na⁺ current--origin and pathophysiological relevance. *Cardiovasc Drugs Ther* 27, 61–68.
- Zaza, A., Belardinelli, L., and Shryock, J. C. (2008). Pathophysiology and pharmacology of the cardiac "late sodium current.". *Pharmacol. Ther.* 119, 326–339.
- Zeisberg, E. M., Tarnavski, O., Zeisberg, M., Dorfman, A. L., McMullen, J. R., Gustafsson, E., Chandraker, A., Yuan, X., Pu, W. T., Roberts, A. B., et al. (2007). Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat. Med.* 13, 952–961.
- Zeng, J., and Rudy, Y. (1995). Early afterdepolarizations in cardiac myocytes: mechanism and rate dependence. *Biophysj* 68, 949–964.
- Zhang, T. (2003). The deltaC Isoform of CaMKII Is Activated in Cardiac Hypertrophy and Induces Dilated Cardiomyopathy and Heart Failure. *Circ. Res.* 92, 912–919.
- Zhang, T., Guo, T., Mishra, S., Dalton, N. D., Kranias, E. G., Peterson, K. L., Bers, D. M., and Brown, J. H. (2010). Phospholamban ablation rescues sarcoplasmic reticulum Ca(2+) handling but exacerbates cardiac dysfunction in CaMKIIdelta(C) transgenic mice. *Circ. Res.* 106, 354–362.
- Zhang, T., S, Yong, R. L., Drinko, J. K., Popović, Z. B., Shryock, J. C., Belardinelli, L., Wang, Q. K., and Yong, S. L. (2011). LQTS mutation N1325S in cardiac sodium channel gene SCN5A causes cardiomyocyte apoptosis, cardiac fibrosis and contractile dysfunction in mice. *Int. J. Cardiol.* 147, 239–245.
- Zhang, Y., Hartmann, H. A., and SATIN, J. (1999). Glycosylation influences voltage-dependent gating of cardiac and skeletal muscle sodium channels. *J. Membr. Biol.* 171, 195–207.
- Zhang, Y., Kanter, E. M., Laing, J. G., Aprhys, C., Johns, D. C., Kardami, E., and Yamada, K. A. (2008). Connexin43 Expression Levels Influence Intercellular Coupling and Cell Proliferation of Native Murine Cardiac Fibroblasts. *Cell Commun Adhes* 15, 289–303.
- Zhang, Y., Wang, J., Chang, S., Zhou, N., Xing, H., Wang, L., Huang, C., Ma, A., Huang, C. L. H., Lei, M., et al. (2014a). The SCN5A Mutation A1180V is Associated With Electrocardiographic Features of LQT3. *Pediatr Cardiol* 35, 295–300.
- Zhang, Y., Wu, J., King, J. H., Huang, C. L. H., and Fraser, J. A. (2014b). Measurement and interpretation of electrocardiographic QT intervals in murine hearts. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*.

- Zhao, L., and Eghbali-Webb, M. (2001). Release of pro- and anti-angiogenic factors by human cardiac fibroblasts: effects on DNA synthesis and protection under hypoxia in human endothelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1538, 273–282.
- Zhou, B., Gise, von, A., Ma, Q., Hu, Y. W., and Pu, W. T. (2010). Genetic fate mapping demonstrates contribution of epicardium-derived cells to the annulus fibrosis of the mammalian heart. *Dev. Biol.* 338, 251–261.
- Zhou, J., Yi, J., Hu, N., George, A. L., and Murray, K. T. (2000). Activation of protein kinase A modulates trafficking of the human cardiac sodium channel in *Xenopus* oocytes. *Circ. Res.* 87, 33–38.
- Zhou, Y., Morais-Cabral, J. H., Kaufman, A., and MacKinnon, R. (2001). Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* 414, 43–48.
- Ziane, R., Huang, H., Moghadaszadeh, B., Beggs, A. H., Levesque, G., and Chahine, M. (2010). Cell membrane expression of cardiac sodium channel Na(v)1.5 is modulated by alpha-actinin-2 interaction. *Biochemistry* 49, 166–78.
- Zong, X. G., Dugas, M., and Honerjäger, P. (1992). Relation between veratridine reaction dynamics and macroscopic Na current in single cardiac cells. *J. Gen. Physiol.* 99, 683–697.
- Zsebo, K., Yaroshinsky, A., Rudy, J. J., Wagner, K., Greenberg, B., Jessup, M., and Hajjar, R. J. (2014). Long-Term Effects of AAV1/SERCA2a Gene Transfer in Patients With Severe Heart Failure: Analysis of Recurrent Cardiovascular Events and Mortality. *Circ. Res.* 114, 101–108.

- Annexe -

Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate (PIP₂) Stabilizes the Open Pore Conformation of the Kv11.1 (hERG) Channel

Nicolas Rodriguez,^{†‡§} Mohamed Yassine Amarouch,^{†‡§} Jérôme Montnach,^{†‡§} Julien Piron,^{†‡§} Alain J. Labro,^{||} Flavien Charpentier,^{†‡§¶} Jean Mérot,^{†‡§} Isabelle Baró,^{†‡§} and Gildas Loussouarn^{†‡§*}

[†]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Nantes, France; [‡]Centre National de la Recherche Scientifique, Nantes, France; [§]Université de Nantes, Faculté de Médecine, l'institut du thorax, Nantes, France; [¶]Centre Hospitalier Universitaire Nantes, l'institut du thorax, Nantes, France; and ^{||}Laboratory for Molecular Biophysics, Physiology, and Pharmacology, Department of Biomedical Sciences, University of Antwerp, Antwerp, Belgium

ABSTRACT Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) is a phospholipid that has been shown to modulate several ion channels, including some voltage-gated channels like Kv11.1 (hERG). From a biophysical perspective, the mechanisms underlying this regulation are not well characterized. From a physiological perspective, it is critical to establish whether the PIP₂ effect is within the physiological concentration range. Using the giant-patch configuration of the patch-clamp technique on COS-7 cells expressing hERG, we confirmed the activating effect of PIP₂. PIP₂ increased the hERG maximal current and concomitantly slowed deactivation. Regarding the molecular mechanism, these increased amplitude and slowed deactivation suggest that PIP₂ stabilizes the channel open state, as it does in KCNE1-KCNQ1. We used kinetic models of hERG to simulate the effects of the phosphoinositide. Simulations strengthened the hypothesis that PIP₂ is more likely stabilizing the channel open state than affecting the voltage sensors. From the physiological aspect, we established that the sensitivity of hERG to PIP₂ comes close to that of KCNE1-KCNQ1 channels, which lies in the range of physiological PIP₂ variations.

INTRODUCTION

Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) is a phospholipid present in the inner leaflet of the cell plasma membrane that is implicated in many physiological functions, such as production of the second messengers inositol trisphosphate and diacylglycerol, membrane trafficking, cytoskeleton attachment, and regulation of ion channels and transporters (1). PIP₂ notably regulates several cardiac potassium channels, such as Kir6.2, Kir2.1, Kv11.1 (hERG), and Kv7.1 (KCNQ1), implicated in the I_{KATP} , I_{K1} , I_{Kr} , and I_{Ks} currents, respectively (2–6). McDonald and co-workers were the first to describe the PIP₂ sensitivity of a voltage-gated potassium (Kv) channel, hERG (6). This channel, encoded by the human ether-à-go-go related gene (*hERG*, or *KCNH2*), is responsible for the rapid delayed rectifier K⁺ current, I_{Kr} , in the heart and several other cell types. In Chinese hamster ovary (CHO) cells expressing hERG channels, PIP₂ application in the pipette led to an increase in current and a change in activation and inactivation gating (6).

A key question is the molecular mechanism of this PIP₂ regulation. Previous work suggested that this mechanism was similar in ion channels as various as Kir (inwardly rectifying potassium) and Kv channels: PIP₂ stabilizes the channel open state of Kir6.2 (7) and the Kv channel KCNQ1 (8). For KCNQ1 recorded in the inside-out configuration, this stabilization of the open state resulted in a slowed deactivation with no effect on activation. It was

surprising to find, in the work by MacDonald and colleagues, that PIP₂ addition (from the pipette on CHO cells in a whole-cell configuration) led to completely different effects on hERG biophysical parameters: an accelerated activation with no effect on deactivation (6). Two main hypotheses can be proposed to explain these differences: 1), the molecular mechanism underlying Kir6.2 and KCNQ1 modulation by PIP₂ does not apply to hERG channels; or 2), the molecular mechanism underlying Kir6.2 and KCNQ1 modulation applies to hERG, but the difference in the biophysical effects of PIP₂ is due to the configuration of the experimental setup (whole-cell in hERG versus inside-out in KCNQ1). To address this question, we studied the effects of PIP₂ on hERG under experimental conditions used previously for KCNQ1, mainly the giant-patch configuration. This configuration is characterized by rapid PIP₂ depletion after patch excision and allows direct addition of exogenous PIP₂ after this depletion. In this configuration, hERG and KCNQ1 biophysical changes induced by PIP₂ insertion are quite similar (slowed deactivation with no effect on activation). We also show that, similar to the case for KCNQ1, the effects of PIP₂ on hERG are much more convincingly modeled by an influence on a voltage-independent transition step late in the activation pathway, suggesting a stabilization of the open state, as in KCNQ1.

Another key question is whether this PIP₂ regulation is physiologically relevant. A method to gain insight about this is to study the effects of physiological variations of PIP₂. Indeed, in isolated rabbit cardiac myocytes, α 1-adrenergic stimulation activates phospholipase C and results in

Submitted November 25, 2009, and accepted for publication June 1, 2010.

*Correspondence: gildas.loussouarn@inserm.fr

Editor: Toshinori Hoshi.

© 2010 by the Biophysical Society
0006-3495/10/08/1110/9 \$2.00

doi: 10.1016/j.bpj.2010.06.013

a slight decrease in I_{Kr} (6). One limitation to this study was that activation of a receptor may trigger several regulatory pathways in parallel (9), sometimes leading to an apparent PIP₂ insensitivity (10). We used several approaches to quantify the channel PIP₂ sensitivity, and compared it with the well-characterized KCNQ1 PIP₂ sensitivity (2,5,9). The results led us to the conclusion that hERG would be sensitive to moderate PIP₂ changes in the range of physiological concentrations, but that at low PIP₂ levels, a fraction of hERG current persists, which may lead to an apparent lower PIP₂ sensitivity compared to that of KCNQ1.

METHODS

Cell culture and transfection

The cell line COS-7, derived from the African green monkey kidney, was obtained from the American Type Culture Collection (CRL-1651, Rockville, MD) and cultured in DMEM supplemented with 10% serum and antibiotics (100 IU/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin), all from GIBCO, (Paisley, Scotland). Cells were transiently transfected with the plasmids using Fugene-6 (Roche Molecular Biochemical, Indianapolis, IN) according to the standard protocol recommended by the manufacturer.

hERG cDNA (a kind gift from D. Roden, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN) was subcloned into the mammalian expression vector pSI (Promega, Madison, WI). The human pCDNA3.1-KCNE1-KCNQ1 concatemer, human KCNE1 linked to the N-terminus of the human KCNQ1 (11), is a kind gift from R. S. Kass (The Center for Molecular Therapeutics, Columbia Presbyterian Medical Center, New York, NY). The plasmid coding for the green fluorescent protein (pEGFP) used to identify transfected cells was purchased from Clontech (Palo Alto, CA).

For giant-patch experiments on hERG, relative DNA composition was 60% pSI-hERG and 40% pEGFP (of a total of 2 µg of DNA). For giant-patch experiments on KCNE1-KCNQ1, relative DNA composition was 60% pCDNA3-KCNE1-KCNQ1 and 40% pEGFP (of a total of 2 µg of DNA). For giant patch experiments on cotransfected hERG and KCNE1-KCNQ1, relative DNA composition was 60% pCDNA3-KCNE1-KCNQ1, 30% pSI-hERG, and 10% pEGFP (of a total of 2 µg of DNA).

Electrophysiology

The effect of PIP₂ on hERG was studied using the inside-out configuration of the patch-clamp technique, which allows direct access to the inner leaflet of the plasma membrane. hERG channels were expressed in COS-7 cells. To obtain current amplitudes compatible with an accurate determination of the biophysical parameters, giant patches of membrane (diameter ~10 µm) were excised.

From 24 to 72 h after transfection, COS-7 cells were mounted on the stage of an inverted microscope and constantly superfused at a rate of ~2 mL/min. Experiments were performed at room temperature (23 ± 2°C). Acquisition and analysis were performed using Acquis1 software (Bio-Logic Science Instruments, Claix, France). Electrodes were connected to a patch-clamp amplifier (RK-400, Bio-Logic). For giant-patch experiments, the procedure described in Hilgemann (12) was adapted to excise giant patches from COS-7 cells. Pipettes were pulled from borosilicate glass capillaries (glass type 8250, King Precision Glass, Claremont, CA) on a vertical puller (P30, Sutter Instruments, Novato, CA) and fire-polished using a microforge (MF-83, Narishige, Tokyo, Japan) to obtain tip diameters of ~10 µm for patch pipettes and 20 µm for excision pipettes. The excision pipette, filled with the standard solution, was connected to a 20-mL syringe to apply suction for excision. A microperfusion system allowed local application and rapid change of the different experimental solutions (13).

Four protocols for hERG currents

Activation protocol. From a holding potential of –100 mV, five voltage steps (to –85, –70, –55, –40, and +30 mV) of 2 s each were followed by a 1-s step at the holding potential, every 16 s.

This protocol facilitated several measurements:

Maximal current, measured as the peak tail current after the +30 mV step.

Half-activation potential, where peak tail currents at each potential were fitted by a Boltzmann function:

$$\frac{I_{\text{peak}}(V_m)}{\text{Max}(I_{\text{peak}}(V_m))} = \frac{1}{1 + \exp(-(V_m - V_{1/2})/k)}$$

Deactivation time constant at –100 mV, where deactivation time constants for a single protocol were measured twice, after voltage steps at –55 mV and –40 mV, and averaged. These values were obtained from a single exponential fit of the tail current after complete recovery from inactivation (after 1.5 times the time to peak).

Activation time constant at –55 mV, at which potential hERG was not completely inactivated, allowing accurate measurement of activation kinetics. The activating current was fitted by a single exponential fit after inactivation reached a steady state ($t > 30$ ms after the beginning of the –55-mV step).

Recovery from inactivation time constant at –100 mV, obtained by a single exponential fit of the tail current after the +30-mV step. The tail current was fitted from the start of repolarization to the peak.

Inactivation protocol. From a holding potential of +30 mV, 13 hyperpolarized voltage steps (from –130 mV to –10 mV in 10-mV increments) of 70 ms each were followed by a 230-ms step at the holding potential. This protocol enabled characterization of the steady-state inactivation of hERG from a fully activated/inactivated holding state. The half-inactivation potential was obtained by a Boltzmann fit of the peak current at each step divided by the electromotive force:

$$\frac{I_{\text{peak}}(V_m)/V_m}{\text{Max}(I_{\text{peak}}(V_m)/V_m)} = \frac{1}{1 + \exp(+ (V_m - V_{1/2})/k)}$$

Envelope protocol. From a holding potential of –100 mV, 13 depolarized steps (to –10, 0, 10, or 20 mV) of increasing duration (from 10 ms to 500 ms). These envelope protocols made it possible to discover the activation kinetics of hERG otherwise hidden by inactivation at potentials of –10 mV to 20 mV.

PIP₂-Mg²⁺ and polylysine protocol. From a holding potential of –100 mV, every 3 s the potential was stepped to 30 mV for 1 s. In this protocol, the maximal hERG current was measured as the peak tail current at –100 mV.

Protocol for all KCNE1-KCNQ1 currents

From a holding potential of –60 mV, every 3.5 s the potential was stepped to +40 mV for 1.5 s. This protocol was used for the PIP₂-Mg²⁺ and polylysine experiments; the KCNE1-KCNQ1 current was measured as the peak tail current at –60 mV.

Protocol for hERG and KCNE1-KCNQ1 together during cotransfection experiments

From a holding potential of –100 mV, every 3.5 s the potential was stepped to +60 mV for 1.5 s. KCNE1-KCNQ1 current was measured as the current increase during the step (because of inactivation, hERG current was stable and very low at this potential, so that any current increase after a few milliseconds could be reliably attributed to the activation of KCNE1-KCNQ1 channels). hERG current was measured from the recovery from inactivation measured during the tail potential (difference between peak tail current and

current at the beginning of the tail). KCNE1-KCNQ1 alone did not show any recovery from inactivation (since it does not inactivate) when submitted to this protocol (data not shown), so that the observed recovery in cotransfection experiments could be reliably attributed to hERG (Fig. S1 in the Supporting Material).

Statistical significance of the observed effects was assessed by Student's *t*-test ($N > 30$), Wilcoxon's test, or two-way ANOVA.

Solutions and drugs

For giant-patch experiments, cells were superfused with a standard solution containing (in mmol/L) 145 KCl, 10 HEPES, and 1 EGTA, pH 7.3 with KOH. A solution of (in mmol/L) 145 K-gluconate, 10 HEPES, and 1 EGTA, pH 7.3 with KOH, was used to superfuse the cell during K^+ current measurements and to fill the tip of the patch pipette. PIP₂ (Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France) was diluted to 5 μ mol/L in the K^+ current measurement solution and sonicated on ice for 30 min before application to inside-out patches. 1,2-dioctanoyl-4,5-bisphosphate (diC8-PIP₂) was purchased from Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI). Polylysine 10 kDa was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) and dissolved in a 3-mg/mL stock in water.

Kinetic models

Three Markov kinetic models were used (see Fig. 3, Fig. S3, and Fig. S4). They were adapted from previously described hERG models (14–16). For the model shown in Fig. 3, activation and inactivation are uncoupled and the hERG current is $I = N \times g \times P_O \times P_{NI} \times (V_m - V_r)$, where $N \times g$ (N is the number of channels present and g the single-channel conductance) represents the maximal conductance of the membrane, P_O the probability that the activation gate is in the open state (O), and P_{NI} the probability that the inactivation gate is in the noninactivated state (NI). V_m is the membrane potential and V_r the reversal potential of the hERG current. The same concentration of potassium is applied on both sides of the patch for all experiments and V_r is set to 0 mV.

Optimization was performed with ModelMaker v4.0 (AP Benson, Wallingford, United Kingdom) using the Marquardt method. Optimization was aimed at minimizing the mean square distance between currents measured for three protocols (see Results) and corresponding simulated currents. All transition rates had the form $\alpha = \alpha_1 \times \exp(\alpha_2 \times V_m)$. α_2 was set to 0 mV⁻¹ in the case of voltage-independent transitions.

The inactivation transition rates of the model with uncoupled activation/inactivation (see Fig. 3) and the weakly coupled model (Fig. S3 A) were determined by two fits (see Fig. S2). The four free parameters (α_{I1} , α_{I2} , β_{I1} , and β_{I2}) were adjusted to fit the inactivation curve and recovery from inactivation kinetics:

$$I_{rel} = \frac{1}{1 + \beta_{I1}/\alpha_{I1} \times \exp((- \alpha_{I2} + \beta_{I2}) \times V_m)}$$

$$\tau_{rec} = \frac{1}{\alpha_{I1} \times \exp(\alpha_{I2} \times V_m) + \beta_{I1} \times \exp(\beta_{I2} \times V_m)}$$

RESULTS

PIP₂ modulation of hERG channels

The effect of PIP₂ on hERG was studied using the inside-out configuration of the patch-clamp technique. For several channels it has been demonstrated that patch excision results in a current decrease (rundown) attributable at least partially

to a decrease in membrane PIP₂ levels, and that PIP₂ at least partially reverses this rundown (8). Consequently, we first examined the effect of excision and PIP₂ application on the activity of hERG channels. Currents were measured during three distinct step protocols detailed in the Methods section. 1), An activation protocol (Fig. 1 A, left) was used to construct the activation curve (Fig. 1 B, left). Applied every 16 s, this protocol indicated the evolution of half-activation potential and deactivation, activation, and recovery from inactivation kinetics (Fig. 1 C). 2), An inactivation protocol (Fig. 1 A, middle) was used to construct the inactivation curve (Fig. 1 B, middle) at specific time points: after excision (control), after rundown, and after PIP₂ application. 3), An envelope protocol (Fig. 1 A, right) was used to measure the activation kinetics (Fig. 1 B, right) at potentials where inactivation masks activation (−10, 0, +10, and +20 mV).

Data from a representative patch, on which all protocols were run, are shown in Fig. 1. The averaged biophysical parameters measured in the three conditions (control, after rundown, and after PIP₂ application) are shown in Fig. 2. The currents measured with the three protocols illustrate the decrease in hERG current ~15 min after excision (Fig. 1 A). The maximal current decreased below one-quarter of its initial level within ~10 min (Fig. 1 C), but in most of the cells, a current persisted after rundown. The remaining current may correspond to a PIP₂-independent component, or it may be due to residual membrane PIP₂ levels. Concomitantly with its rundown, hERG current showed an acceleration of both the activation and deactivation kinetics (Figs. 1 C and 2). hERG voltage dependence of activation shifted by about −18 mV toward negative potentials. Channel inactivation was also affected: the half-inactivation potential was shifted by about +15 mV toward positive potentials, and recovery from inactivation was accelerated (Figs. 1, B and C, and 2).

Patch excision may lead to additional changes in the channel environment than beside PIP₂ depletion. To confirm the PIP₂ modulation of hERG, we added 5 μ mol/L PIP₂ when the biophysical parameters were stable. Within a few minutes of PIP₂ superfusion, the current amplitude increased but did not reach the initial current level observed right after excision (Figs. 1 C and 2). Regarding the activation gate, deactivation slowed down to initial levels. However, addition of PIP₂ did not restore channel activation kinetics, indicating that the changes in this parameter observed upon patch rupture are unrelated to the depletion of PIP₂. All these observations (incomplete current recovery, complete deactivation kinetics recovery, and no change in activation kinetics) were made previously for the PIP₂ effect on KCNQ1 (8). In that work, the incomplete current recovery was attributed to a PIP₂-independent rundown that could be prevented by addition of MgATP. This was not the case for hERG (data not shown). Regarding inactivation, PIP₂ slowed the recovery from inactivation

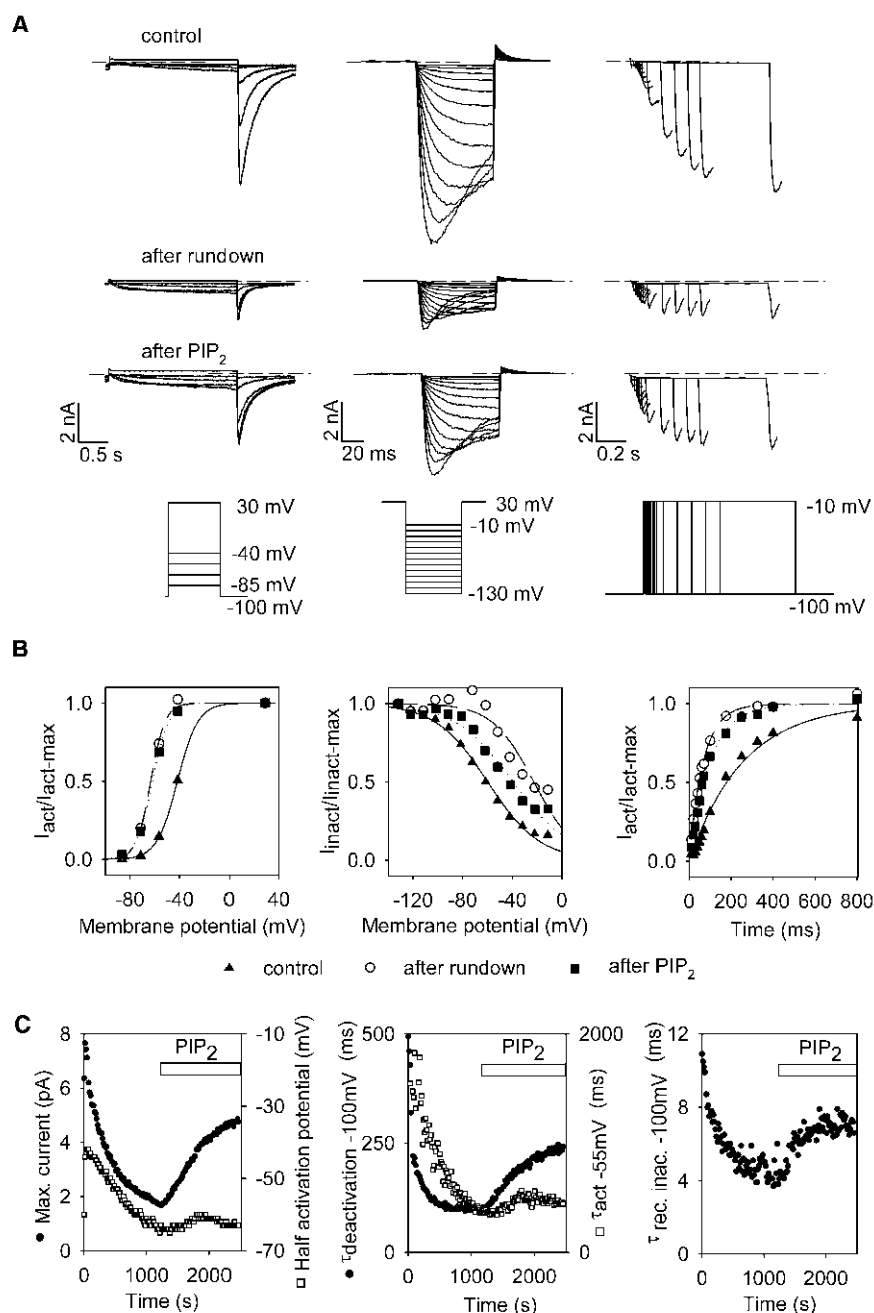


FIGURE 1 Rundown of hERG and reversal by PIP₂ application. Data from a giant patch of a representative COS-7 cell transfected with hERG and studied in the inside-out configuration. (A) hERG current in response to an activation protocol (left), an inactivation protocol (middle), and an envelope protocol (right). Tail currents are proportional to the activation of hERG in the first protocol. Peak currents divided by the electromotive force are proportional to the extent of inactivation in the second protocol. Peak currents represent the time course of channel activation in the envelope protocol. Shown are the control current after excision ($t = 1/4$ 60 s), the current after rundown ($t = 1/4$ 1076 s), and the current after addition of PIP₂ ($t = 1/4$ 1757 s, 5 nmol/L PIP₂ is added at $t = 1/4$ 1200 s). (B) Activation curve (left), inactivation curve (middle), and time course of the peak inward current amplitude (right) at -10 mV, obtained from the recordings shown in A. Activation and inactivation curves are fitted by Boltzmann equations. The measurement points (symbols) and fits (lines) are indicated for control (triangles, solid line), after rundown (circles, dashed line), and after PIP₂ addition (squares, dotted line). (C) Kinetics of hERG biophysical parameters during rundown and after 5 nmol/L PIP₂ addition. These parameters are measured from the activation protocol repeated every 16 s. Solid symbols indicate maximal current, 100 mV deactivation, and recovery-from-inactivation time constants; open symbols indicate half-activation potential and -55 mV activation time constant.

at -100 mV and shifted the half-inactivation potential toward negative potentials back toward initial control values (Figs. 1 C and 2).

PIP₂ favors the open state of the hERG channel

We observed that PIP₂ effects on hERG were very close to those observed on KCNQ1 in the same experimental conditions (mainly the giant-patch configuration): increased current, slowed deactivation, and no effect on activation kinetics. However, the effects of PIP₂ on hERG were quite different if PIP₂ was applied in the patch pipette

(i.e., accelerated activation and no effect on deactivation) (6). Altogether, these observations stress the importance of experimental conditions in studying the effect of PIP₂ on a current. Of most importance, the similarity between the effect of PIP₂ on hERG and that on KCNQ1 suggests a similar molecular mechanism for this regulation.

Using kinetic models, we showed previously that PIP₂ affects the late conformational changes of the KCNQ1 pore domain leading to channel opening rather than the early conformational changes implicating S4 movement (8). We used the same strategy in this study, to explore whether PIP₂ affects the late conformational changes also in hERG.

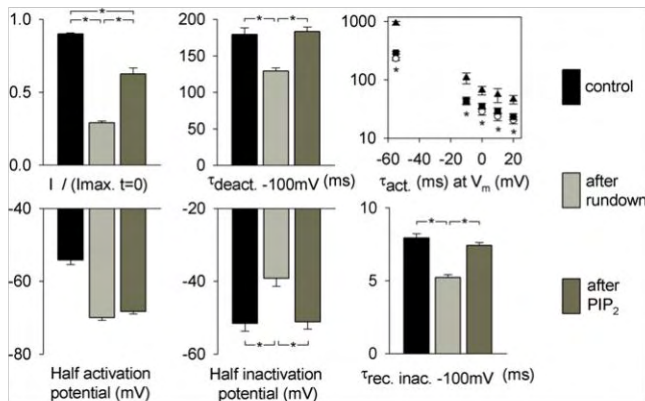


FIGURE 2 Biophysical parameters variation for hERG during rundown and after PIP₂ addition. Biophysical parameters are averaged. Maximal current, half-activation potential, and time constants for deactivation at -100 mV and activation at -55 mV were obtained from 81–90 patches. Activation time constants at -10 to 20 mV were obtained from 14–23 patches. Half-inactivation potential and recovery from inactivation time constant at -100 mV were obtained from 27 and 45 patches, respectively. Black bars represent control, measured after excision; light gray bars represent the current after 5–10 min rundown and before PIP₂ addition; and dark gray bars indicate the current > 2 min after PIP₂ addition (* $p < 0.05$). A Bonferroni correction was applied for multiple comparison between time constants of activation. There was a significant difference between time constants of activation measured in control and after rundown, but not between the after-rundown and after-PIP₂ conditions.

In the model used, we hypothesize that the voltage sensor movements are predominantly described by the early and voltage-dependent transitions in the activation pathway, whereas the pore opening is predominantly described by the late and voltage-independent transition, as suggested for other channels (8,17). Modification of several biophysical parameters of hERG implies that the effect of PIP₂ cannot be simply a modification of the number of active channels (since in that case only the maximal current would be altered). This observation justifies the need for kinetic models to determine the transition rates between hERG conformations that are sensitive to PIP₂. We already mentioned that after 10 min of rundown, hERG biophysical parameters were almost stable. As a consequence, the modification of hERG current after PIP₂ addition could be mainly attributed to the PIP₂ effect. We thus used current recordings after ~ 15 min of rundown (before PIP₂ addition) and after PIP₂ addition (~ 10 min later) as constraints for our kinetic models. To limit the number of free parameters, we first used the simplest model that fitted our data correctly (Fig. 3). In this model, hERG activation and inactivation processes are uncoupled. This is consistent with a recent study (18) and makes it possible to address independently the effect of PIP₂ on channel activation and inactivation. However, the question of the activation/inactivation coupling being still open, we also used coupled models (cf. below and the Supporting Material). To take into account the PIP₂ effect on the inactivation process, the transition rates of this process (a_i and b_i) were determined before and after PIP₂ addition from

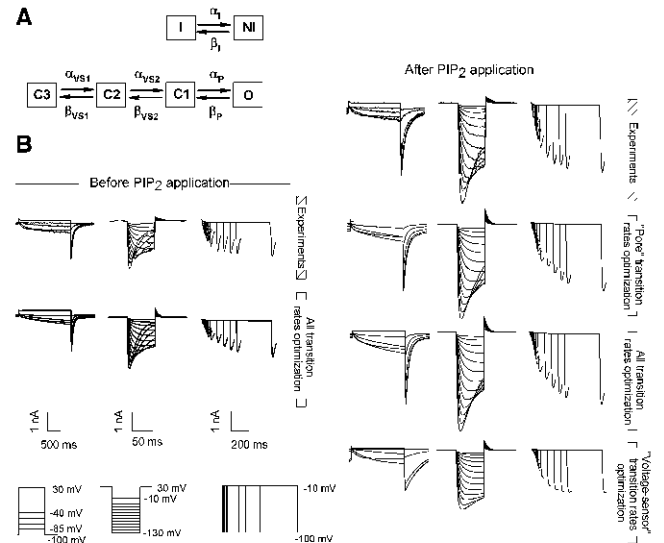


FIGURE 3 (A) Kinetic model of hERG currents before and after PIP₂ application. Activation and inactivation are modeled as uncoupled processes. The channel is open when it is in the O and NI states at the same time. To focus on activation properties, transition rates regarding inactivation (a_i , b_i) are determined before and after PIP₂ addition from a concomitant fit of voltage-dependent inactivation rates and recovery-from-inactivation kinetics (Fig. S2). (B) Simulated and recorded hERG currents for the three protocols before and after PIP₂ application. The transition rates and biophysical parameters determined from these simulations are shown in Table S1. Optimization of the late voltage-independent transitions (a_P , b_P), supposed to be related to the pore domain, leads to a reasonable fit of the PIP₂ effect that is as good as the fit obtained by optimizing all transition rates. Conversely, optimization of early voltage-dependent transition rates (a_{VS1} , b_{VS1} , a_{VS2} , b_{VS2}), supposed to be mainly related to the voltage sensing of hERG, leads to a poor fit of the PIP₂ effect.

a concomitant fit of the inactivation curve and the voltage dependency of the kinetics of recovery from inactivation (Fig. S2). Subsequently, these inactivation kinetics were fixed, and only the transition rates of the activation process were optimized to fit our data.

We fitted all the current recordings obtained with the three different pulse protocols shown in Fig. 1 A. First, transition rates regarding activation before PIP₂ addition were optimized (Table S1) and the current recordings were well fitted for each protocol (Fig. 3). The biophysical parameters obtained from the simulations were also close to those determined from the experiments (Table S1). Second, to determine which transition rates varied after PIP₂ addition, we optimized separately the values of the transition rates related to the voltage sensing (early voltage-dependent transitions: a_{S1} , b_{S1} , a_{S2} and b_{S2}), the transition rates related to the pore (late voltage-independent transitions: a_P , b_P), and all the transition rates regarding activation (a_{S1} , b_{S1} , a_{S2} , b_{S2} , a_P and b_P). The fit obtained by optimizing only the pore transition rates was reasonably good, almost as good as the fit obtained by optimizing all the transition rates (Fig. 3). Biophysical parameters were also determined (Table S1). Modifying the late transition rates was sufficient to simulate the two main

effects of PIP₂: increase of maximal current and slowing of deactivation (Table S1, bold print). On the contrary, optimization of the voltage sensor transition rates was unable to fit the experimental current recordings despite having more free parameters. These simulations indicated that the effect of PIP₂ on hERG current could be fully explained by a change of a late and voltage-independent transition rate that is probably related to the pore, leading to a stabilization of the open state. We also demonstrated that this conclusion was valid for other kinetic models of hERG that show weak or strong coupling between activation and inactivation (see Discussion and Fig. S3 and Fig. S4); hence, this conclusion certainly did not result from the choice of an oversimplified description of hERG. A kinetic model is not an absolute proof for one or another mechanism, and it is still possible that PIP₂ exerts a dual effect both on the pore and the voltage-sensor. However, these models suggest that a stabilization of the pore is sufficient to explain the PIP₂ effect.

hERG presents a PIP₂ affinity close to that of KCNE1-KCNQ1

When studying the PIP₂ dependency of a channel, it is important to make sure that the affinity is compatible with a physiological regulation by PIP₂. A common method is to add the PIP₂ analog diC8-PIP₂ on the cytosolic side of the membrane. This facilitates dose-response measurements and sorting of the affinities of different channels. We observed that hERG

was only weakly activated by addition of up to 100 nmol/L diC8-PIP₂ on the cytosolic face of the membrane (Fig. S5). We also noticed that the application of diC8-PIP₂ led to an acceleration of channel deactivation, as opposed to slowing of deactivation by PIP₂, showing that the effect of diC8-PIP₂ on hERG does not reproduce the effect of PIP₂.

To quantify the affinity of hERG for PIP₂, we used another approach based on the fact that 1), the PIP₂ sensitivity of KCNQ1 is well characterized, and 2), this sensitivity is proven to be in a physiological range (2,5,9). We cotransfected hERG and KCNE1-KCNQ1 in the same cells and measured, in the same patch, current rundown upon patch excision and recovery after PIP₂ addition for both hERG and KCNE1-KCNQ1. We first compared channel rundown, which for both currents started immediately after excision and was concomitant (Fig. 4 B). A difference, however, was the presence of a PIP₂-independent fraction of hERG current, as described above. An even more reliable test was to look at the effect of PIP₂ addition, since PIP₂ insertion may be quick, and this avoids the bias of the KCNE1-KCNQ1 PIP₂-independent rundown (8). Both channels responded at the same time (Fig. 4 B) and thus appeared to be sensitive to the same range of PIP₂ concentration. This was further supported by the correlation in magnitude of hERG and KCNE1-KCNQ1 current amplitudes in response to PIP₂ (Fig. 4 C).

To further compare hERG and KCNE1-KCNQ1 PIP₂ affinities, we applied polylysine (3 mg/mL) to shield PIP₂

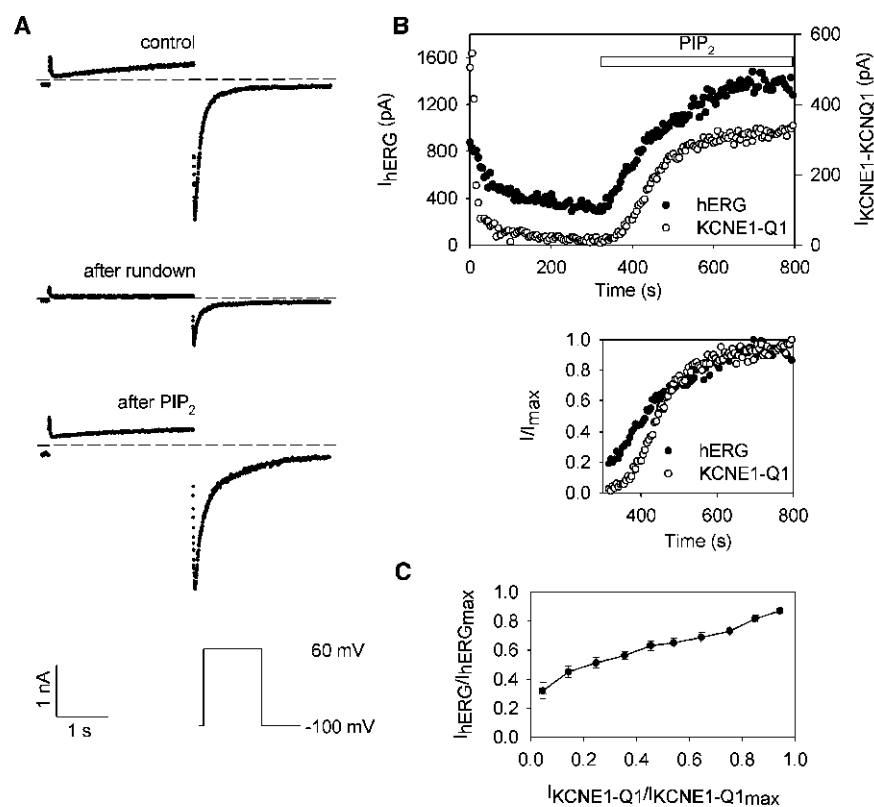


FIGURE 4 Concomitant responses to PIP₂ of cotransfected hERG and KCNE1-KCNQ1. (A) Measured currents of a representative cell (protocol shown in the inset). hERG current was computed from the recovery from inactivation (KCNE1-KCNQ1 does not inactivate); KCNE1-KCNQ1 current was computed from the current increase during the prepulse (hERG current is stable after a few milliseconds at high potential). Currents are shown after excision (control, $t = 5$ s), after rundown ($t = 290$ s), and after PIP₂ addition ($t = 780$ s; 5 nmol/L PIP₂ is added at $t = 315$ s). (B) Kinetics of hERG (solid circles) and KCNE1-KCNQ1 (open circles) currents of a representative cell (the same as in A). (Upper graph) Current amplitudes. (Lower graph) Current amplitudes after PIP₂ addition normalized to their steady-state values after complete PIP₂ effect. (C) hERG versus KCNE1-KCNQ1 normalized current amplitudes during PIP₂ application ($N = 11$ cells). hERG and KCNE1-KCNQ1 currents are normalized to their steady state after PIP₂ addition.

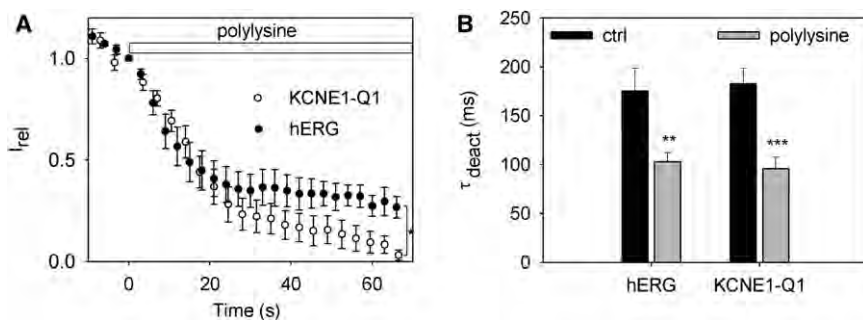


FIGURE 5 Comparison of the polylysine-induced rundown of hERG and KCNE1-KCNQ1 currents. (A) Time course of hERG and KCNE1-KCNQ1 current rundown after 3 μ g/mL polylysine application at time 0. hERG current was evaluated from the peak tail current of a 1-s step at +30 mV followed by repolarization at -100 mV repeated every 3 s ($N = 8$ cells). KCNE1-KCNQ1 current was evaluated from the current at the end of a 1.5-s step at +40 mV followed by repolarization at -60 mV repeated every 3.5 s ($N = 11$ cells). $*p < 0.05$; two-way ANOVA. (B) Deactivation time constants obtained from a monoexponential fit of the deactivating tail current before (*ctrl*) and after the polylysine-induced rundown. For KCNE1, deactivation was measured when a minimal current persisted (hERG, $N = 8$ cells; KCNE1, $N = 11$ cells). $**p < 0.01$; $***p < 0.001$.

negative charges and to accelerate current rundown (5). This should minimize the bias of the KCNE1-KCNQ1 PIP₂-independent rundown. Fig. 5 A shows that polylysine-triggered rundowns were similar in hERG and KCNE1-KCNQ1 within the first 20 s, but that hERG and KCNE1-KCNQ1 then diverged. KCNE1-KCNQ1 reached zero within 60 s, a time at which a fraction of hERG current persisted. This suggests a similar PIP₂ sensitivity at high open probability, but a divergent PIP₂ sensitivity at low open probability. To control that polylysine was specifically targeting PIP₂, we checked whether deactivation was accelerated. Indeed, we observed an acceleration of deactivation similar to that observed during the spontaneous rundown (compare Figs. 2 and 5 B).

A final approach in comparing hERG and KCNE1-KCNQ1 PIP₂ sensitivity was to apply different concentrations of Mg²⁺ to control the concentration of available PIP₂ in the membrane patch. It has been shown in Kir channels that intracellular Mg²⁺ inhibition is correlated with the strength of channel-PIP₂ interaction (19). Mg²⁺ inhibits the channel by screening the PIP₂ negative charge in a manner similar to that of polylysine, but reversibly and in a concentration-dependent manner (20). We thus applied a range of Mg²⁺ concentrations to a patch—after addition of PIP₂—to obtain a range of available PIP₂ concentrations for hERG and KCNE1-KCNQ1 (Fig. 6, A and B). After stabilization of hERG maximal current, increasing doses of Mg²⁺ were applied to chelate PIP₂, and this resulted in an increasing (and reversible) inhibition of hERG and KCNE1-KCNQ1 currents. Mg²⁺ dose-response curves are shown in Fig. 6 C. The KCNE1-KCNQ1 dose-response curve was close to that of hERG: the half-maximal inhibitory concentrations (IC₅₀) for Mg²⁺ were 4.7 mmol/L and 4.8 mmol/L, with Hill coefficients of 0.8 and 1.0, for hERG and KCNE1-KCNQ1, respectively. To control that Mg²⁺ was specifically targeting PIP₂, we checked whether deactivation was accelerated. Indeed, we observed an acceleration of deactivation similar to that observed during the spontaneous rundown (compare Fig. 2

and Fig. 6 D). These results indicate that the affinity of hERG for PIP₂ is close to that of KCNE1-KCNQ1 and that hERG is likely to be sensitive to PIP₂ variations in the same concentration range.

Based on the convergent results of 1), cotransfection experiments, 2), polylysine effects, and 3), [PIP₂] modulation by Mg²⁺, we concluded that hERG has a PIP₂ sensitivity close to that of KCNE1-KCNQ1 and is thus likely to respond to physiological changes in PIP₂ concentration. However, experiments with the spontaneous rundown and with polylysine clearly showed that a fraction of hERG current is poorly sensitive or insensitive to PIP₂, which may lead to some difference in the channel physiological regulation.

DISCUSSION

This study suggests that the molecular effect of PIP₂, that is, a stabilization of the open state, is applicable to various, if not all, PIP₂-sensitive potassium channels: the pore-forming subunit of the K_{ATP} channel Kir6.2, the voltage-dependent channels KCNQ1 (Kv7.1), and, as shown in this study, hERG (Kv11.1). In addition, this study suggests that both KCNQ1 and hERG are regulated by physiological PIP₂ levels.

Comparison of the PIP₂ effects observed in the whole-cell and giant-patch configurations

The activating effect of PIP₂ on hERG has been demonstrated in CHO cells using the whole-cell configuration with PIP₂ in the pipette (6) and in rabbit atrial myocytes submitted to α 1A-adrenergic stimulation (21). The effect was clear but moderate. In this study, the giant-patch experiments on COS cells confirmed the activating effect of PIP₂ on hERG and showed that PIP₂ could strongly increase hERG current, notably by increasing its maximal amplitude by up to three times (Fig. 4 B). The changes in the recovery-from-inactivation time constant were also qualitatively the same as those measured in CHO cells using the whole-cell

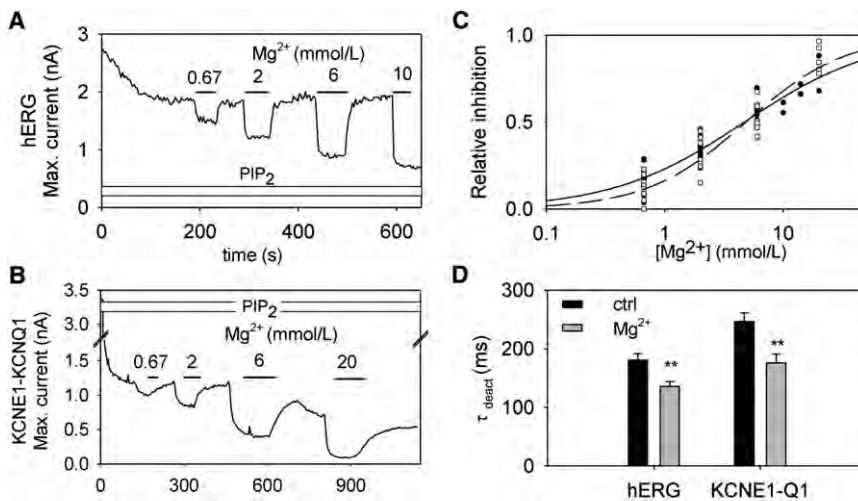


FIGURE 6 Mg^{2+} dose response of hERG and KCNE1-KCNQ1 in the presence of PIP₂ (A) hERG maximal current of a representative cell. hERG maximal current was evaluated from the peak tail current of a 1-s step at 30 mV followed by repolarization at -100 mV repeated every 3 s. PIP₂ was continuously applied. Various concentrations of Mg^{2+} were added as indicated. (B) KCNE1-KCNQ1 maximal current of a representative cell. KCNE1-KCNQ1 maximal current was evaluated from the current at the end of a 1.5-s step at $+40$ mV followed by repolarization at -60 mV repeated every 3.5 s. Various concentrations of Mg^{2+} were added as indicated. (C) Mg^{2+} dose response data from hERG ($N = 10$ cells) and KCNE1-KCNQ1 ($N = 8$ cells). Hill fits are presented for hERG (solid line) and KCNE1-KCNQ1 (dashed line). (D) Deactivation time constants obtained from a monoexponential fit of the deactivating tail current before (control) and after 6 mM Mg^{2+} application in hERG ($N = 10$ cells) and KCNE1-KCNQ1 ($N = 8$ cells). $**p < 0.01$.

configuration, with PIP₂ dialyzed from the pipette. However, the observed effect of PIP₂ on half-activation potential and on deactivation and activation time constants differed largely between the two configurations. Two major differences between the whole-cell and giant-patch configurations may explain the divergent observations. 1), In the whole-cell configuration PIP₂ is added in excess, causing an increase in membrane PIP₂, whereas PIP₂ levels are decreased in the giant-patch configuration. This may explain why deactivation is not modified in whole-cell experiments but is accelerated during rundown and slowed by PIP₂ application in giant-patch experiments. Deactivation may be at its maximal level at physiological PIP₂ concentrations, explaining the absence of effect when PIP₂ is added in the pipette. 2), In the whole-cell configuration, it was not possible to distinguish between diffusion of PIP₂ from the pipette and the dilution of many cytosolic molecules. In the giant-patch experiments, on the other hand, we were able to observe that the prominent acceleration of activation kinetics and the leftward shift of the activation curve caused by patch excision could not be recovered by PIP₂ application, indicating that these processes are unrelated to PIP₂ depletion. In a similar way, it is possible that in the whole-cell experiments the changes in these two parameters are not due to PIP₂ depletion but rather to the dilution of cytosolic factors.

The biophysical effects of PIP₂ on hERG current are consistent with a stabilization of the open state

To explore which state(s) is affected by PIP₂, kinetic models of hERG were evaluated. The ongoing debate on whether or not channel activation and inactivation are coupled complicates the choice of the best model for testing the PIP₂

effect (18). Therefore, several scenarios (no, weak, or strong coupling) were explored. Data from the uncoupled model are presented above.

The model shown in Fig. S3 is a weak inactivation/activation coupling model. The coupling is said to be weak because transition rates of the last activation step (α_P and β_P) do not depend on the inactivation state. The inactivation rates α_I and β_I were still set by the fit of the voltage-dependent inactivation rates and recovery from inactivation kinetics to limit the number of free parameters. The early voltage-dependent transition rates were also supposed to be linked to the voltage sensor and the late voltage-independent step to the pore. Based on the simulated currents and biophysical parameters (Fig. S3 and Table S2), it still seems likely that the late voltage-independent step controlled the PIP₂ effect.

The model of Fig. S4 is a classical model of coupled inactivation. Late transitions are voltage-dependent and activation and inactivation processes cannot be clearly distinguished for these transitions. However, the early transitions may still be linked to the voltage sensor and the late transitions to the pore. There were no imposed inactivation parameters for this model. The late, but not the early, transition changes accounted well for the PIP₂ effect. Altogether, all these models support the idea that PIP₂ acts on late transitions and stabilizes the open pore conformation.

In all models (no, weak, and strong coupling), the best fit to the electrophysiological data was obtained when late transition rates probably corresponding to pore opening were optimized. Optimization of the voltage sensor transition rates resulted in an inadequate fit of the experimental data. This observation led us to conclude that PIP₂ exerts its effect by acting on a late voltage-independent transition, favoring the open conformation of the pore domain. However, since optimizing all transition rates gave an

equally satisfying result we cannot fully rule out that PIP₂ also modulates other transition rates in addition to the late voltage-independent rate.

Physiological relevance of the PIP₂ effect on hERG

To address the difficult question of the physiological relevance of the PIP₂ effect on hERG, it is critical to evaluate the channel PIP₂ sensitivity. To obtain a quantification of the sensitivity of a channel to PIP₂, addition of soluble diC8-PIP₂ is commonly used (5). To our surprise, hERG was shown to be weakly sensitive to diC8-PIP₂ in our experiments, most probably because of the channel's lower affinity for this short-chain PIP₂. Some experimental data from inward rectifiers show that the maximal effect of short-chain PIP₂ is lower than that of PIP₂, suggesting a lower affinity (22). To explore hERG sensitivity to native PIP₂, we designed three experiments to compare the PIP₂ sensitivity of hERG with that of KCNE1-KCNQ1, which is well characterized: 1), cytosolic PIP₂ application on giant patches presenting both KCNE1-KCNQ1 and hERG channels showed a concomitant increase in both currents; 2), polylysine-induced rundown presented similar kinetics for both channels; and 3), concomitant addition of the phospholipid and various concentrations of Mg²⁺ controlled PIP₂ levels, indicating a similar sensitivity of hERG and KCNE1-KCNQ1 channels to Mg²⁺. All these data support the idea that hERG and KCNE1-KCNQ1 channels have a similar affinity to PIP₂. However, the experiments performed also shed light on the persistence of a fraction of hERG current at low PIP₂ levels, which may give rise to a different response to physiological events, leading to a profound decrease in membrane PIP₂ levels.

SUPPORTING MATERIAL

Five figures and a table are available at [http://www.biophysj.org/biophysj/supplemental/S0006-3495\(10\)00723-X](http://www.biophysj.org/biophysj/supplemental/S0006-3495(10)00723-X).

We thank Béatrice Leray, Marie-Joseph Louerat, Sylvie Leroux, and Agnes Carcouët for expert technical assistance.

This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and from the Agence Nationale de la Recherche to G.L. and N.R. (ANR-05-JCJC-0160-01) and to I.B. (ANR COD/A05045GS). G.L. and I.B. are recipients of a tenured position supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). J.P. was supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM).

REFERENCES

- McLaughlin, S., J. Wang, ..., D. Murray. 2002. PIP₂ and proteins: interactions, organization, and information flow. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 31:151–175.
- Park, K. H., J. Piron, ..., G. Loussouarn. 2005. Impaired KCNQ1-KCNE1 and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate interaction underlies the long QT syndrome. *Circ. Res.* 96:730–739.
- Huang, C. L., S. Feng, and D. W. Hilgemann. 1998. Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP₂ and its stabilization by Gβγ. *Nature*. 391:803–806.
- Hilgemann, D. W., and R. Ball. 1996. Regulation of cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchange and KATP potassium channels by PIP₂. *Science*. 273:956–959.
- Zhang, H., L. C. Craciun, ..., D. E. Logothetis. 2003. PIP₂ activates KCNQ channels, and its hydrolysis underlies receptor-mediated inhibition of M currents. *Neuron*. 37:963–975.
- Bian, J., J. Cui, and T. V. McDonald. 2001. HERG K⁺ channel activity is regulated by changes in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Circ. Res.* 89:1168–1176.
- Enkvetchakul, D., G. Loussouarn, ..., C. G. Nichols. 2000. The kinetic and physical basis of K_{ATP} channel gating: toward a unified molecular understanding. *Biophys. J.* 78:2334–2348.
- Loussouarn, G., K. H. Park, ..., D. Escande. 2003. 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.* 22:5412–5421.
- Matavel, A., and C. M. Lopes. 2009. PKC activation and PIP₂ depletion underlie biphasic regulation of IKs by Gq-coupled receptors. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 46:704–712.
- Gamper, N., Y. Li, and M. S. Shapiro. 2005. Structural requirements for differential sensitivity of KCNQ K⁺ channels to modulation by Ca²⁺/calmodulin. *Mol. Biol. Cell.* 16:3538–3551.
- Wang, W., J. Xia, and R. S. Kass. 1998. MinK-KvLQT1 fusion proteins, evidence for multiple stoichiometries of the assembled IsK channel. *J. Biol. Chem.* 273:34069–34074.
- Hilgemann, D. W. 1989. Giant excised cardiac sarcolemmal membrane patches: sodium and sodium-calcium exchange currents. *Pflügers Arch.* 415:247–249.
- Loussouarn, G., I. Baró, and D. Escande. 2006. KCNQ1 K⁺ channel-mediated cardiac channelopathies. *Methods Mol. Biol.* 337:167–183.
- Kiehn, J., A. E. Lacerda, and A. M. Brown. 1999. Pathways of HERG inactivation. *Am. J. Physiol.* 277:H199–H210.
- Clancy, C. E., and Y. Rudy. 2001. Cellular consequences of HERG mutations in the long QT syndrome: precursors to sudden cardiac death. *Cardiovasc. Res.* 50:301–313.
- Wang, S., S. Liu, ..., R. L. Rasmusson. 1997. A quantitative analysis of the activation and inactivation kinetics of HERG expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* 502:45–60.
- Gagnon, D. G., and F. Bezanilla. 2009. A single charged voltage sensor is capable of gating the *Shaker* K⁺ channel. *J. Gen. Physiol.* 133:467–483.
- Choveau, F. S., A. El Harchi, ..., G. Loussouarn. 2009. Transfer of rolf S3-S4 linker to HERG eliminates activation gating but spares inactivation. *Biophys. J.* 97:1323–1334.
- Du, X., H. Zhang, ..., D. E. Logothetis. 2004. Characteristic interactions with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate determine regulation of kir channels by diverse modulators. *J. Biol. Chem.* 279:37271–37281.
- Suh, B. C., and B. Hille. 2007. Electrostatic interaction of internal Mg²⁺ with membrane PIP₂ seen with KCNQ K⁺ channels. *J. Gen. Physiol.* 130:241–256.
- Bian, J. S., and T. V. McDonald. 2007. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate interactions with the HERG K⁺ channel. *Pflügers Arch.* 455:105–113.
- Rohács, T., C. Lopes, ..., D. E. Logothetis. 2002. Assaying phosphatidylinositol bisphosphate regulation of potassium channels. *Methods Enzymol.* 345:71–92.

TROUBLES DU RYTHME CARDIAQUE ET CARDIOMYOPATHIES ASSOCIES AU CANAL SODIQUE Nav1.5

Le canal sodique Nav1.5 est responsable de la genèse et de la propagation du potentiel d'action cardiaque. Il est aujourd'hui considéré comme faisant partie d'un complexe macromoléculaire impliqué dans des pathologies électriques mais aussi structurales.

Dans une première partie, nous avons caractérisé le remodelage myocardique dans un modèle murin invalidé à l'état hétérozygote pour *Scn5a* (la souris *Scn5a*^{+/-}). Nous avons pu montrer que le développement de fibrose ventriculaire était dépendant de la voie du TGF-β et était associée avec le remodelage de l'expression et de l'organisation de la Connexine43. Nous avons aussi pu montrer que la réduction seule du courant sodique n'induisait pas la pathologie, la présence de la protéine à la membrane est donc déterminante. Cette étude montre une interaction fonctionnelle entre Nav1.5 et la Connexine43 dans la physiopathologie de la maladie de Lenègre.

Dans une deuxième partie, nous avons développé un nouveau modèle murin de syndrome du QT long de type 3, la souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP}. Ce modèle regroupe l'ensemble des caractéristiques cliniques retrouvées chez les patients que ce soit l'allongement de l'intervalle QTc, les arythmies ventriculaires et la dilatation myocardique. L'étude de cette mutation *in vivo* a permis de confirmer la présence courant sodique persistant de mettre en évidence le remodelage pathologique des protéines associées au cycle du calcium. Le traitement aigu de ces souris avec la Ranolazine supprime les arythmies ventriculaires et normalise l'intervalle QTc. Ceci ouvre la voie à l'utilisation de cette molécule en traitement chronique pour améliorer la survie des patients atteints de syndrome QT long de type 3.

Mots-clés : Nav1.5, Connexine43, remodelage myocardique, fibrose cardiaque, cardiomyopathie dilatée, maladie de Lenègre, syndrome du QT long de type 3

CARDIAC ARRYTHMIAS AND CARDIOMYOPATHIES ASSOCIATED WITH NAV1.5 SODIUM CHANNEL

Nav1.5 is the main sodium channel implicated in genesis and propagation of cardiac action potential. Currently, it's a part of a macromolecular complex involved in electrical and structural disorders.

In a first part, we have characterized myocardial remodelling in a mouse model heterozygously invalidated for *Scn5a* (*Scn5a*^{+/-} mice). We demonstrated that ventricular fibrotic process is TGF-β dependant and is associated with Connexin43 expression and organization remodelling. We also demonstrated that reduction of sodium current is not sufficient to induce pathology, the loss of Nav1.5 protein is the fundamental in this process. This study shows a functional interaction between Nav1.5 and Connexin43 in the Lenègre disease processing.

In a second part, we have developed a new mice model for type 3 long QT syndrome, the *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice. This model reproduces the phenotype of the human mutation carriers, long QT syndrome, ventricular arrhythmias and heart failure. *In vivo* study permits to confirm persistent sodium current and to focus on pathological remodelling of calcium cycle's proteins. Acute treatment using Ranolazine suppresses arrhythmias and normalise QTc. That opens the possibility to use Ranolazine as a chronic treatment for mice and for patients witch develop type 3 long QT syndrome.

Keywords: Nav1.5, Connexin43, myocardial remodelling, cardiac fibrosis, dilated cardiomyopathy, Lenègre disease, type 3 long QT syndrome