

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DE MÉDECINE

ÉCOLE DOCTORALE CHIMIE BIOLOGIE

Année 2009

**Régulation transcriptionnelle
des canaux ioniques :
Implication dans la plasticité
et le remodelage électriques cardiaques**

THÈSE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale BIOLOGIE SANTE

Discipline : Sciences de la vie et de la santé

Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire

Présentée et soutenue publiquement par

Patrice NAUD

Le 6 octobre 2009, devant le jury ci-dessous

Président Mme LEMARCHAND Patricia, Professeur, *l'institut du thorax*, Inserm UMR915,
CNRS ERL3147, Nantes

Rapporteurs Mme FISET Céline, Professeure, *institut de cardiologie de Montréal*, (CANADA)
M. BARHANIN Jacques, Directeur de recherche, CNRS FRE3093 TIANP, Nice

Examineurs Mme RÜCKER-MARTIN Catherine, Cadre de recherche, CNRS UMR 8162, Paris

Directeur de thèse Mme DEMOLOMBE Sophie, Chargée de recherche, *l'institut du thorax*, Inserm
UMR915, CNRS ERL3147, Nantes

A Denis Escande.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	- 12 -
A. OBJECTIFS ET STRATEGIE	- 12 -
B. MODIFICATIONS PHYSIOLOGIQUES DE L'ACTIVITE ELECTRIQUE AU COURS DE LA MATURATION DES TISSUS CONTRACTILES CARDIAQUES	- 13 -
B.1. Hétérogénéité de l'activité électrique intrinsèque du cœur	- 13 -
B.1.a. Mise en évidence fonctionnelle à l'étage intégré : l'électrocardiogramme de surface	- 13 -
B.1.b. Mise en évidence fonctionnelle à l'étage cellulaire : le potentiel d'action	- 16 -
B.1.c. Mise en évidence fonctionnelle au niveau de la cellule isolée : les courants ioniques	- 18 -
B.1.d. Hétérogénéité moléculaire intrinsèque des tissus contractiles : les canaux ioniques	- 23 -
B.2. Modifications moléculaires et fonctionnelles des canaux ioniques avec l'âge à l'étage ventriculaire	- 27 -
B.2.a. Les canaux et courants sodiques	- 28 -
B.2.b. Les canaux et courants calciques	- 29 -
B.2.c. Les canaux et courants pacemaker	- 29 -
B.2.d. Les canaux et courants potassiques repolarisants	- 30 -
B.3. Modifications moléculaires et fonctionnelles des canaux ioniques avec l'âge à l'étage auriculaire	- 32 -
B.3.a. Les canaux et courants sodiques	- 32 -
B.3.b. Les canaux et courants calciques	- 32 -
B.3.c. Les canaux et courants pacemaker	- 33 -
B.3.d. Les canaux et courants potassiques repolarisants	- 33 -
C. MODIFICATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES DE L'ACTIVITE DONT LA PREVALENCE AUGMENTE AVEC L'AGE : EXEMPLE DE L'INSUFFISANCE CARDIAQUE	- 37 -
C.1. Impact de l'âge dans l'insuffisance cardiaque	- 38 -
C.2. Modifications transcriptionnelles des canaux ioniques dans l'insuffisance cardiaque	- 40 -
C.3. Modifications fonctionnelles des canaux ioniques	- 40 -
C.3.a. L'électrocardiogramme	- 40 -
C.3.b. Le potentiel d'action	- 41 -
C.3.c. Les courants ioniques	- 41 -

D. MECANISMES DES MODIFICATIONS TRANSCRIPTIONNELLES DES CANAUX IONIQUES CARDIAQUES	- 44 -
D.1. Etat des lieux sur les régulations transcriptionnelles des canaux ioniques établies dans le cœur	- 44 -
D.1.a. Le canal sodique cardiaque Nav1.5	- 44 -
D.1.b. Le canal calcique cardiaque Cav1.2	- 45 -
D.1.c. Les canaux potassiques cardiaques	- 46 -
D.2. Facteurs de transcription jouant un rôle dans la maturation cardiaque	- 50 -
D.3. Facteurs de transcription jouant un rôle dans l'insuffisance cardiaque	- 54 -
 MATERIEL ET METHODES	- 59 -
 A. MODELES EXPERIMENTAUX	- 60 -
A.1. Modèle murin du développement et de la maturation cardiaque	- 60 -
A.2. Modèle murin d'hypertrophie et d'insuffisance cardiaque	- 60 -
A.2.a. Induction du bloc auriculo-ventriculaire par radiofréquence chez la souris	- 60 -
A.2.b. Protocole expérimental	- 62 -
A.3. Modèle cellulaire de cardiomyocytes néonataux de souris en culture primaire	- 63 -
A.4. Electroporation des cardiomyocytes néonataux	- 63 -
 B. APPROCHES MOLECULAIRES	- 64 -
B.1. Préparation des ARN, contrôles qualité et rétrotranscription	- 64 -
B.2. RT-PCR quantitative à haut débit	- 64 -
B.2.a. Principe de la RT-PCR quantitative	- 64 -
B.2.b. Technologie des TaqMan® Low Density Arrays	- 66 -
B.3. Classification des données d'expression	- 67 -
B.3.a. Définition	- 68 -
B.3.b. Classification hiérarchique non-supervisée	- 68 -
* Distances inter-groupes	- 69 -
* Algorithmes ascendants	- 70 -
B.4. Statistiques	- 70 -
B.4.a. Déterminations des valeurs aberrantes	- 70 -
B.4.b. Tests statistiques	- 71 -
 C. APPROCHES ELECTROPHYSIOLOGIQUES	- 71 -
C.1. Electrocardiogramme de surface chez la souris	- 71 -
C.1.a. Enregistrement ECG chez la souris anesthésiée	- 72 -
C.1.b. Enregistrement ECG chez la souris vigile	- 73 -
C.2. Enregistrement du courant potassique Ito sur cardiomyocytes isolés par la technique de patch-clamp	- 73 -
C.2.a. Isolement des cardiomyocytes ventriculaires	- 73 -
C.2.b. Enregistrement du courant potassique Ito	- 74 -
C.3. Statistiques	- 75 -

D. OUTILS BIOINFORMATIQUES	- 75 -
D.1. Ingenuity Pathways Analysis	- 75 -
D.2. Cardiac Promoter Database	- 76 -
D.2.a. Construction de la base de promoteurs	- 76 -
D.2.b. Outils de prédiction des éléments cis-régulateurs	- 77 -
* Source des matrices	- 77 -
* Prédiction de la fixation des matrices	- 77 -
* Calcul de la surreprésentation de la fixation d'un facteur de transcription	- 78 -

RESULTATS	- 79 -
------------------	--------

A. PROFILS DES CANAUX IONIQUES ET DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION DONT L'EXPRESSION EST MODIFIEE AU COURS DE LA MATURATION VENTRICULAIRE CHEZ LA SOURIS	- 80 -
A.1. Les canaux ioniques	- 80 -
A.2. Les facteurs de transcription	- 83 -
A.3. Corrélation des profils des canaux et facteurs de transcription	- 86 -
A.3.a Corrélation des profils d'expression	- 86 -
A.3.b Identification des réseaux de régulation	- 89 -
* Prédiction de la sur-représentation des éléments cis-régulateurs sur les promoteurs de chaque cluster	- 89 -
* Réseaux d'interaction entre les facteurs de transcription co-régulés au cours du développement et de la maturation	- 92 -

B. MECANISMES QUI SOUS-TENDENT LE REMODELAGE ELECTRIQUE QUI PRECEDE L'HYPERTROPHIE VENTRICULAIRE DANS UN MODELE D'INSUFFISANCE CARDIAQUE CHEZ LA SOURIS	- 94 -
B.1. Remodelage électrique induit par un bloc auriculo-ventriculaire complet chez la souris	- 95 -
B.1.a. BAVc, arythmies précoces et hypertrophie	- 95 -
B.1.b. Remodelage ionique précoce	- 96 -
B.1.c. Diminution transitoire du principal courant repolarisant Ito	- 97 -
B.2. Mécanisme du remodelage électrique associé à un bloc auriculo-ventriculaire complet chez la souris	- 97 -
B.2.a. Corrélations des profils d'expression ventriculaire des sous-unités des canaux ioniques et des régulateurs de la transcription en fonction du temps chez la souris en BAVc	- 98 -
B.2.b. Analyse bioinformatique de réseaux d'interaction des régulateurs de la transcription sur-exprimés précocement après l'induction du bloc auriculo-ventriculaire complet	- 100 -
B.2.c. Analyses bioinformatiques de la sur-représentation des éléments cis-régulateurs dans les promoteurs des gènes sur-exprimés précocement après l'induction du bloc auriculo-ventriculaire complet	- 101 -

B.3. Mise en évidence d'un répresseur potentiel (Mef2d) du principal canal sodique cardiaque (Nav1.5)	- 103 -
DISCUSSION	- 107 -
A. INTERET DE L'APPROCHE GENOMIQUE DES CANAUX IONIQUES ET DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION	- 108 -
B. QUELLE EST LA SIGNIFICATIVITE DES CLUSTERS DES CANAUX IONIQUES ?	- 108 -
B.1. La méthode de clustering	- 108 -
B.2. La signification des données du clustering	- 110 -
C. LE MONDE DES ARNs : DES MOLECULES DONT L'EXPRESSION EST REGULEE PAR DIFFERENTS SYSTEMES	- 112 -
C.1. Relation entre l'excitabilité cellulaire et le contrôle de la transcription des canaux ioniques	- 112 -
C.2. Régulation de l'expression des canaux ioniques par les miRNA	- 114 -
D. OBJECTIFS	- 114 -
D.1. Validations in vitro et in vivo des facteurs de transcription candidats	- 114 -
D.1.a. Validation in vitro	- 115 -
* Utilisation des siRNA	- 115 -
* Essai rapporteur luciférase	- 115 -
* Approche ChIP on chips	- 115 -
D.1.b. Validation in vivo	- 116 -
D.2. Modélisation mathématique des données de génomique	- 116 -
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	- 117 -
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS ORALES	- 144 -
ANNEXES	- 146 -

LISTE DES ABREVIATIONS

ECG	ElectroCardioGramme
PA	Potentiel d'Action
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
RT-PCR	<i>Reverse transcription-polymerase chain reaction</i>
<i>HPRT</i>	<i>Hypoxanthine guanine PhosphoRibosyl Transferase</i>
<i>GAPDH</i>	<i>GlycerAldehyde 3-Phosphate DeHydrogenase</i>
A	Oreillettes (A pour Atrium, en anglais)
V	Ventricules
FT	Facteur de Transcription

LISTE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

- Figure 1** Premiers électrocardiogrammes (ECG) de l'histoire.
- FIGURE 2 :** Comparaison des électrocardiogrammes humain et murin, et des potentiels d'action ventriculaires et auriculaires correspondants.
- FIGURE 3 :** Potentiels d'action des tissus contractiles enregistrés chez l'Homme et la souris.
- FIGURE 4 :** Potentiels d'action épicardique et endocardique ventriculaires gauches.
- FIGURE 5 :** Représentations schématiques des potentiels d'action ventriculaire.
- FIGURE 6 :** Enregistrements de courants K^+ repolarisants dans l'oreillette et le ventricule humain.
- FIGURE 7 :** Enregistrements de la densité des courants K^+ repolarisants dans le ventricule et l'oreillette chez la souris adulte.
- FIGURE 8 :** Enregistrements de courants K^+ repolarisants dans l'épicaarde et l'endocarde chez l'Homme et la souris.
- FIGURE 9 :** Représentation schématique des potentiels d'action et des marqueurs moléculaires de l'oreillette, de l'endocarde, du ventricule et de l'épicaarde dans le cœur sain chez l'Homme.
- FIGURE 10 :** Signatures spécifiques d'expression des gènes codant les sous-unités des canaux ioniques, les connexines et les protéines de l'homéostasie calcique en fonction des compartiments cardiaques chez la souris.
- FIGURE 11 :** Densité de courants K^+ repolarisants dans des cellules atriales et ventriculaires à différents stades de développement post-natal chez la souris.
- FIGURE 12 :** Deux mécanismes physiopathologiques de l'insuffisance cardiaque : atteinte diastolique et systolique.
- FIGURE 13 :** Enregistrement de PA de cellules ventriculaires de patients non malade et insuffisant cardiaque.
- FIGURE 14 :** Courant I_{to} enregistré dans des cellules ventriculaires humaines de patients non malade et insuffisant cardiaque.
- FIGURE 15 :** Courant I_{K1} enregistré dans des cellules ventriculaires de patients non malade et insuffisant cardiaque.
- FIGURE 16 :** Courant I_f enregistré dans des cellules ventriculaires de patients non malade et insuffisant cardiaque.
- FIGURE 17 :** Représentations schématiques du développement cardiaque.
- FIGURE 18 :** Voies de signalisation et facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression des gènes lors de l'hypertrophie cardiaque.

- FIGURE 19 :** Electrocardiogramme (ECG) endocavitaire murin.
- FIGURE 20 :** Principe de la technologie *TaqMan*®.
- FIGURE 21 :** Représentation schématique des méthodes de calculs des $2^{-\Delta Ct}$ et $2^{-\Delta\Delta Ct}$
- FIGURE 22 :** Photographie d'une carte microfluide ou *Low Density Array*.
- FIGURE 23 :** Méthode de mesure des paramètres sur un électrocardiogramme de surface murin.
- FIGURE 24 :** Classification hiérarchique, à deux voies, des canaux ioniques
- FIGURE 25 :** Classification hiérarchique, à une voie, des canaux ioniques
- FIGURE 26 :** Classification hiérarchique, à une voie, des facteurs de transcription et cofacteurs
- FIGURE 27 :** Détail du cluster I regroupant les gènes dont l'expression augmente au cours du développement cardiaque.
- FIGURE 28 :** Détail du cluster II regroupant les gènes dont l'expression diminue au cours du développement cardiaque.
- FIGURE 29 :** Classification hiérarchique des gènes codant les facteurs de transcription et les sous-unités des canaux ioniques au cours du développement cardiaque.
- FIGURE 30 :** Représentation des régulations découvertes par l'étude des FTs sur-représentés dans les clusters.
- FIGURE 31 :** Réseaux de régulation et d'interaction de FTs réalisé d'après Ingenuity.
- FIGURE 32 :** Modifications de l'expression ventriculaire des sous-unités des canaux ioniques et des régulateurs de la transcription en fonction du temps après induction d'un bloc auriculo-ventriculaire complet (BAVc) chez la souris.
- FIGURE 33 :** Profils d'expression représentatifs des gènes codant les canaux ioniques et les facteurs de transcription du cluster I en fonction du temps après induction d'un bloc auriculo-ventriculaire complet (BAVc) chez la souris.
- FIGURE 34 :** Réseaux d'interaction connus entre les régulateurs de la transcription sur-exprimés à 12 h après l'induction du bloc auriculo-ventriculaire complet chez la souris.
- FIGURE 35 :** Prédictions bioinformatiques de la sur-représentation des éléments *cis*-régulateurs ATF et Jun sur les promoteurs des gènes sur-exprimés 12 heures après l'induction du bloc de conduction.
- FIGURE 36 :** Profils d'expression représentatifs des gènes codant le canal ionique Nav1.5 et le facteur de transcription Mef2d en fonction du temps après induction d'un bloc auriculo-ventriculaire complet (BAVc) chez la souris.
- FIGURE 37 :** Profils d'expression du gène Mef2d.
- FIGURE 38 :** Profils d'expression du gène *SCN5A*.

FIGURE 39 : Analyse par Western-blot du canal Nav1.5.

FIGURE 40 : Représentation des différentes voies de régulation du phénotype cellulaire électrophysiologique.

TABLEAUX

TABLEAU 1 :	Comparaison des valeurs physiologiques de tracés électrocardiographiques humain et murin.
TABLEAU 2 :	Caractéristiques communes au syndrome d'insuffisance cardiaque et au processus physiologique du vieillissement cardiaque.
TABLEAU 3 :	Mutations ou délétions de facteurs de transcription et anomalies du développement cardiaque chez la souris.
TABLEAU 4 :	Composition ionique des milieux intra-pipette et extracellulaire utilisés pour l'enregistrement du courant I_{to} .

EQUATIONS

ÉQUATION 1 :	Transformation d'une matrice de position vers une matrice de poids
ÉQUATION 2 :	Calcul du score corrigé

INTRODUCTION

A. Objectifs et stratégie

Mes travaux de thèse se sont focalisés sur l'électrogenèse cardiaque et les mécanismes qui sous-tendent son adaptation. Les cellules cardiaques sont capables d'adapter leurs propriétés électrophysiologiques à des contraintes externes physiologiques ou pathologiques. On parle alors respectivement de plasticité et de remodelage électriques.

Chez les mammifères, l'activité électrique cardiaque est sous la dépendance de plus de 30 courants ioniques (Boyett *et al.*, 1996). Ces courants sont générés par des canaux ioniques formés par l'association de sous-unités α , ou sous-unités "canal", et de sous-unités auxiliaires régulatrices (sous-unité β). Une cellule spécialisée comme la cellule cardiaque exprime une centaine de sous-unités α et β . La plasticité et le remodelage électriques résultent de la modification du nombre et/ou des propriétés électrophysiologiques des canaux ioniques à la membrane. Les variations du nombre peuvent être dues à une modification de leur transcription, de leur traduction, de leur adressage ou de leur dégradation (Rosati & McKinnon, 2004). Parmi toutes ces étapes, notre hypothèse est que les modifications transcriptionnelles des gènes codant les canaux ioniques jouent un rôle prépondérant dans la plasticité et le remodelage électriques. La transcription est : spécifique, finement régulée par de multiples facteurs, économique et adaptée à des réponses à moyen et long terme. Des études précédentes réalisées au sein du laboratoire nous ont déjà permis de valider cette hypothèse chez la souris et l'Homme, en définissant l'expression globale des canaux ioniques dans différentes situations physiologiques et pathologiques, et en montrant que les variations transcriptionnelles se répercutent au niveau fonctionnel. L'approche génomique nous a montré que cette régulation ne concerne pas uniquement quelques gènes mais des réseaux de canaux. Ces études ont aussi validé que les variations d'expression observées se répercutaient au niveau fonctionnel.

A l'heure actuelle, notre objectif est de comprendre quels sont les mécanismes impliqués dans la régulation transcriptionnelle des canaux ioniques et leurs liens avec l'excitabilité cellulaire cardiaque. Ces mécanismes sont fondamentaux puisqu'ils sont à l'origine de l'activité électrique normale du cœur et que leur perturbation conduit à la survenue de troubles du rythme létaux, principale cause de mortalité cardiovasculaire dans le monde.

Nous abordons cette question par une stratégie de biologie intégrative qui consiste à:

- 1/ définir les profils d'expression de l'ensemble des facteurs de transcription et des canaux ioniques cardiaques dans différentes situations physiologiques et pathologiques grâce à un outil de génomique (RT-PCR à haut débit) ;
- 2/ corréler les profils d'expression obtenus grâce à la méthode de *clustering*, en partant de l'hypothèse que les facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression des réseaux de canaux ioniques partagent avec ceux-ci un profil d'expression similaire ;
- 3/ utiliser des outils de bioinformatique pour identifier les facteurs de transcription les plus probables dans la régulation des réseaux de canaux identifiés dans l'étape 2 ;
- 4/ valider ces résultats sur des modèles expérimentaux *in vitro* ;
- 5/ étudier l'impact fonctionnel de ces régulateurs sur l'activité électrique cardiaque *in vivo*.

Le premier objectif de ma thèse a été d'étudier, afin de mieux les comprendre, les mécanismes physiologiques ayant lieu au cours du développement et de la maturation cardiaque chez la souris. Des applications existent dans les pathologies où il y a une réexpression du programme fœtal.

Dans la deuxième partie de mon travail, je me suis intéressé aux mécanismes qui conduisent à la survenue d'arythmies ventriculaires précoces dans un modèle murin de bloc auriculo-ventriculaire complet.

B. Modifications physiologiques de l'activité électrique au cours de la maturation des tissus contractiles cardiaques

B.1. Hétérogénéité de l'activité électrique intrinsèque du cœur

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

B.1.a. Mise en évidence fonctionnelle à l'étage intégré : l'électrocardiogramme de surface

L'électrocardiogramme (ECG) de surface est la technique la plus ancienne qui permet de révéler, à l'échelle de l'organisme, les différents phénomènes électriques associés aux battements cardiaques. Il représente l'intégration spatio-temporelle la plus achevée et la plus complexe du fonctionnement répétitif de protéines-canal. Le premier ECG humain, enregistré par Waller en 1887 à l'aide de l'électromètre capillaire, ne met en évidence que deux déflexions produites par deux événements ventriculaires (Waller, 1887) (**Figure 1A**). Cette technique était relativement sensible mais lente. Les enregistrements ont été améliorés par Einthoven (Einthoven, 1901) (**Figure 1B**), qui a par la suite mis au point le galvanomètre à cordes. Il publia en 1903 le premier ECG humain comportant 5 déflexions désignées PQRST (Einthoven, 1903) (**Figure 1C**), caractéristiques d'un tracé actuel : une onde lente (P), désignant l'activité électrique auriculaire, suivie par une série rapide de déflexions d'ondes (QRS) et une autre onde lente (T), représentant les différents événements électriques au niveau des ventricules.

L'ECG reflète la séquence d'évènements électriques associée au cycle de contraction (dépolarisation) et de relaxation (repolarisation) de chaque région du cœur. L'activité électrique myocardique chez l'Homme est initiée spontanément au niveau des cellules *pacemaker* du nœud sinoatrial (NSA), structure mise en évidence pour la première fois par Arthur Keith et Martin Flack au début du 20^{ème} siècle (Keith & Flack, 1907 ; Silverman & Hollman, 2007).

La vague d'excitation qui en émerge se propage rapidement à travers l'oreillette et la dépolarisation auriculaire qui en résulte donne lieu à l'onde P de l'ECG (**Figure 1C**). La première partie de l'onde P est produite par la dépolarisation de l'oreillette droite et la seconde, par la dépolarisation de l'oreillette gauche. Après un délai au niveau du nœud auriculo-ventriculaire (NAV), reflété par l'intervalle PR, l'excitation se propage aux ventricules par les fibres de His-Purkinje. La dépolarisation ventriculaire, reflétée par le complexe QRS, se propage depuis l'endocarde vers l'épicarde et depuis l'apex vers la base.

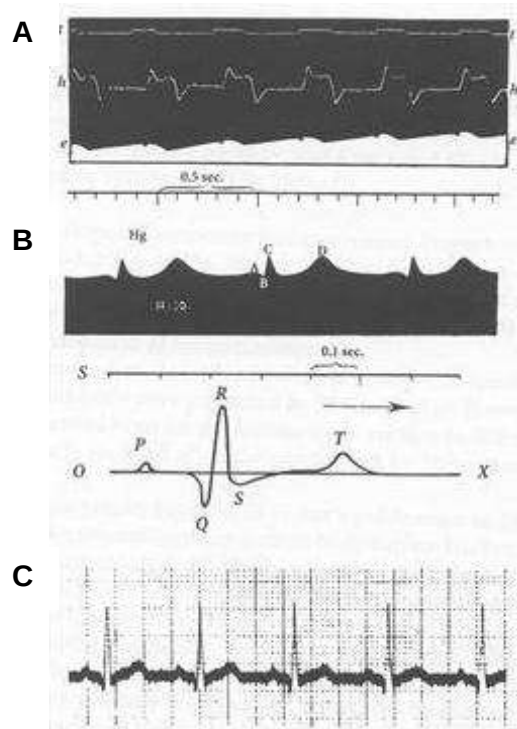


Figure 1 : Premiers électrocardiogrammes (ECG) de l'histoire **(A)** Enregistrement par Waller de l'ECG humain, à l'aide de l'électromètre capillaire. t, temps ; h, pulsation externe du cœur ; e, électrocardiogramme. **(B)** Tracé publié par Einthoven en 1902 enregistré avec l'électromètre capillaire. Les ondes sont nommées A, B, C et D. Le tracé inférieur est une correction mathématique effectuée par Einthoven. La terminologie utilisée est alors P, Q, R, S, et T. **(C)** Première publication d'ECG humain enregistré par le galvanomètre à cordes en 1903 (Janse & Rosen, 2006).

La repolarisation des oreillettes est masquée par le complexe QRS. L'intervalle ST correspond à la période d'excitation des ventricules jusqu'à leur phase de repolarisation. La forme de l'onde T de l'ECG illustre l'hétérogénéité de repolarisation qui existe au sein de la paroi ventriculaire. Le complexe QRS et l'onde T ayant la même polarité, les régions du ventricule qui se dépolarisent en dernier sont donc également celles qui se repolarisent en premier. Ainsi, l'épicarde est repolarisé avant l'endocarde et la base avant l'apex.

L'activité électrique cardiaque chez la souris est différente de celle de l'Homme. En effet, la fréquence cardiaque moyenne chez la souris vigile est d'environ 600 battements par minute, soit 10 fois plus rapide que chez l'Homme. De plus, le cœur de la souris diffère morphologiquement du cœur humain : la veine cave supérieure gauche persiste et se jette

dans l'oreillette droite, il n'y a pas de septum atrial secondaire, le NSA est localisé au contact de la veine cave supérieure au-dessus de sa jonction avec l'oreillette droite au lieu d'être dans l'oreillette elle-même (Doevendans *et al.*, 1998). Structuellement, le système de conduction (NSA, NAV, faisceau de His et réseau de Purkinje) est semblable à celui de l'Homme (Rentschler *et al.*, 2001), bien qu'il existe des connexions directes entre le faisceau de His et le septum interventriculaire qui permettent l'activation du septum interventriculaire de la base vers l'apex (van Rijen *et al.*, 2001). Une différence notable dans l'activité électrique cardiaque entre l'Homme et la souris est la repolarisation cardiaque : l'onde de repolarisation est accolée au complexe QRS chez la souris (**Figure 2**). De plus, l'onde T a une apparence biphasique constituée d'une phase rapide positive correspondant au début de la repolarisation ventriculaire (appelée J) et d'une phase lente négative correspondant à l'onde T (Liu *et al.*, 2004). Le complexe QRS et l'onde T ayant une polarité différente, cela indique une repolarisation tardive murine différente de celle qui est observée chez l'Homme.

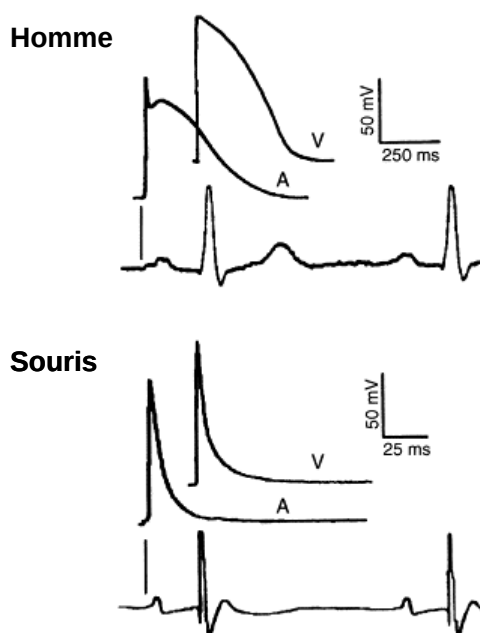


Figure 2 : Comparaison des électrocardiogrammes humain et murin, et des potentiels d'action ventriculaires et auriculaires correspondants (Nerbonne, 2004).

Le tableau 1 récapitule les principaux paramètres physiologiques mesurés à partir d'un tracé électrocardiographique chez l'Homme et la souris adulte vigile.

Tableau 1 : Comparaison des valeurs physiologiques de tracés électrocardiographiques humain et murin.

	Homme	Souris
Fréquence moyenne (batt./min)	60 à 80	500 à 600
Onde P (durée, ms)	< 120	< 14
Intervalle PR (durée, ms)	120 à 200	30 à 35
Complexe QRS (durée, ms)	< 100	< 13
Segment ST	isoélectrique	absent
Intervalle QTc (durée, ms)	< 450	< 60

B.1.b. Mise en évidence fonctionnelle à l'étage cellulaire : le potentiel d'action

Au niveau cellulaire, l'avènement des techniques électrophysiologiques dans les années 1950 à 1960 a permis d'enregistrer l'activité électrique spécifique des tissus contractiles, ainsi que celle des tissus de l'automatisme et de la conduction, sous la forme de potentiels d'action (PA) (HOFFMAN, 1959 ; HOFFMAN *et al.*, 1959 ; DE CARVALHO *et al.*, 1959). La sommation dans le temps et dans l'espace de ces PA est responsable des différentes ondes de l'ECG. L'étude des spécificités régionales de ces PA a permis de révéler, à une nouvelle échelle, l'hétérogénéité électrique cardiaque (Schram *et al.*, 2002).

Les PA myocardiques humains s'inscrivent en cinq phases successives : (I) une phase 0 de dépolarisation rapide, (II) une phase 1 de repolarisation précoce, (III) une phase de plateau (phase 2) suivie (IV) d'une phase 3 de repolarisation qui ramène le potentiel de membrane vers sa valeur de repos et enfin (V) une phase 4 qui correspond à une stabilisation du potentiel de repos à un niveau proche du potentiel d'équilibre des ions potassium (Nerbonne, 2004). Les cellules auriculaires et ventriculaires possèdent des caractéristiques électrophysiologiques différentes (Lauribe *et al.*, 1989 ; Jost *et al.*, 2005) (**Figure 3A**). Le potentiel de repos des cellules auriculaires (≈ -70 à -80 mV) est environ 5 à 10 mV plus dépolarisé que celui des ventricules (Schram *et al.*, 2002). La durée du PA auriculaire est plus courte que celle du PA ventriculaire et est caractérisée par une phase de repolarisation précoce rapide et une phase de repolarisation tardive lente par rapport au ventricule. A la différence du PA ventriculaire, une pente de dépolarisation diastolique peut être observée pendant la phase 4 du PA auriculaire (Schram *et al.*, 2002).

Il existe des différences très marquées entre les PA ventriculaires humain et murin (**Figures 3 et 4**). Chez la souris adulte, la phase de dépolarisation rapide (phase 0) est similaire à celle de l'Homme. La distinction se fait essentiellement au niveau de la

repolarisation. Le PA ventriculaire murin n'a pas de phase de plateau et la repolarisation est rapide (Nerbonne, 2004). De la même manière que chez l'Homme, les cellules auriculaires et ventriculaires possèdent des caractéristiques électrophysiologiques différentes chez la souris (Knollmann *et al.*, 2007). Le potentiel de repos des cellules auriculaires est moins hyperpolarisé que celui des ventricules et le PA auriculaire plus court que le PA ventriculaire. Cependant, à l'inverse de l'Homme, la repolarisation tardive est plus rapide dans les oreillettes par rapport aux ventricules (**Figure 3B**).

Chez l'Homme, l'hétérogénéité électrique au sein de la paroi ventriculaire a été bien établie. Par rapport à l'endocarde, le PA épicardique est caractérisé par une durée plus courte et une phase 1 de repolarisation proéminente suivie par une encoche (*spike and dome*) (Ravens & Wettwer, 1998) (**Figure 4A**). De même chez la souris, la durée du PA épicardique est plus courte que celle du PA endocardique (Brunet *et al.*, 2004 ; Costantini *et al.*, 2005) (**Figure 4B**).

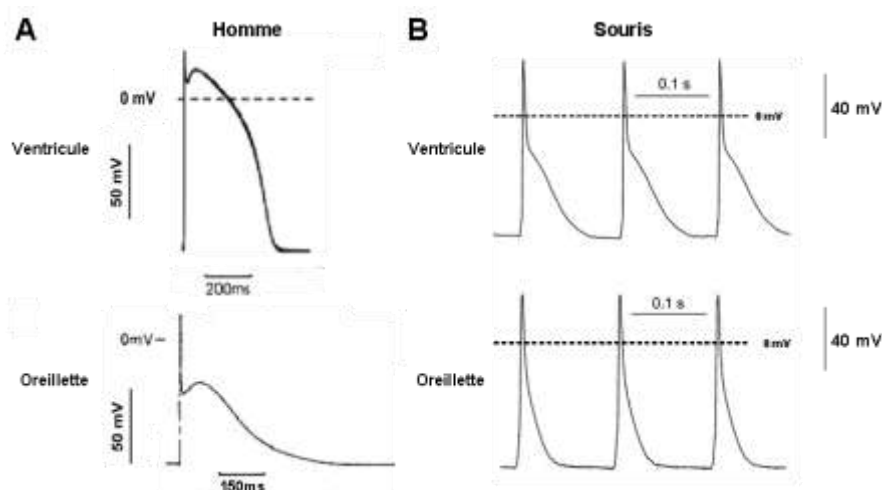


Figure 3 : Potentiels d'action des tissus contractiles enregistrés chez l'Homme et la souris. **(A)** Potentiels d'action ventriculaire (Jost *et al.*, 2005) et auriculaire (Lauribe *et al.*, 1989) chez l'Homme. **(B)** Potentiels d'action ventriculaire et auriculaire chez la souris (Knollmann *et al.*, 2007). La durée du PA dans le ventricule est plus longue que dans l'oreillette chez l'Homme et la souris.

Par ailleurs, une hétérogénéité électrique le long de l'axe apico-basal ainsi qu'entre le ventricule droit et gauche s'ajoutent à ce gradient transmural chez la souris et l'Homme. Ces hétérogénéités électriques concernent la durée de la phase de repolarisation : la durée du PA de la base est plus importante que celle de l'apex et elle est plus courte dans le ventricule droit que dans le ventricule gauche (Watanabe *et al.*, 1983 ; Di Diego *et al.*, 1996 ; Guo *et al.*, 1999 ; Baker *et al.*, 2000 ; Knollmann *et al.*, 2001 ; Brunet *et al.*, 2004 ; Szentadrassy *et al.*, 2005).

Cette hétérogénéité de la repolarisation au sein des ventricules est à l'origine de l'onde T sur l'ECG et elle est une composante majeure dans la survenue des arythmies par réentrées (Antzelevitch, 2007).

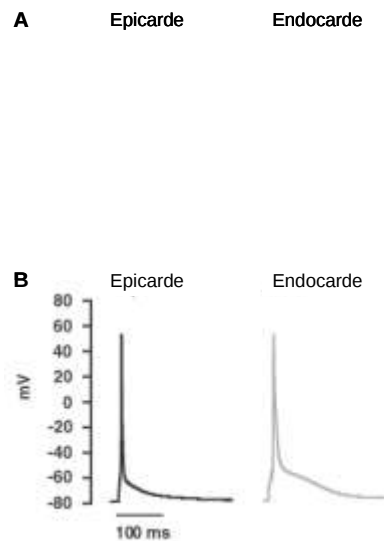


Figure 4 : Potentiels d'action épicardique et endocardique ventriculaires gauches. **(A)** Enregistrements chez l'Homme (Ravens & Wettwer, 1998 ; Antzelevitch, 2007). **(B)** Enregistrements chez la souris adulte (Dilly *et al.*, 2006). La durée du PA dans les deux espèces est plus longue dans l'endocarde que dans l'épicarde.

B.1.c. Mise en évidence fonctionnelle au niveau de la cellule isolée : les courants ioniques

Chacune des cinq phases successives des PA correspond à des mouvements d'ions spécifiques à travers la membrane des cellules cardiaques. Les méthodes d'analyse des courants ioniques, introduites par Hodgkin et Huxley en 1952, ont permis d'identifier leur rôle dans la genèse du potentiel d'action (HODGKIN & HUXLEY, 1952). Ils ont en effet établi des équations mathématiques décrivant les propriétés d'activation, de désactivation et d'inactivation des conductances potassique et sodique de l'axone géant de calmar. Ces équations ont ensuite été utilisées pour l'analyse des cinétiques des autres courants. En 1967, Reuter enregistra sur des fibres de Purkinje de mouton le premier courant calcique grâce à la technique de potentiel imposé (voltage-clamp) en double-sucrose-gap (Reuter, 1967). La majorité des connaissances actuelles concernant les courants ioniques cardiaques ont été obtenues grâce à la méthode de voltage-clamp comme, par exemple, la découverte du courant *pacemaker* I_f dans les cellules sinusales de lapin (Brown & DiFrancesco, 1980). Par la suite, le développement de techniques plus sensibles, comme le patch-clamp dans les années 1980 (Hamill *et al.*, 1981), a permis d'enregistrer de nouveaux courants tels que les deux composantes du courant calcique ($I_{Ca,L}$ et $I_{Ca,T}$) dans les cellules atriales de chien (Bean, 1985) ou bien encore les deux composantes du courant transitoire sortant I_{to} (I_{to1} ,

courant potassique, et I_{to2} , courant chlorure) dans les cellules de fibres de Purkinje de mouton (Coraboeuf & Carmeliet, 1982).

Chez l'Homme, la phase de dépolarisation rapide du PA ventriculaire est induite par l'activation du courant sodique (I_{Na}) (**Figure 5A**). Cette phase est suivie par une repolarisation transitoire reflétant l'inactivation des canaux sodiques et l'activation du courant potassique transitoire sortant I_{to} (nommé précédemment I_{to1}). I_{to} se caractérise par deux variants en terme de cinétique : $I_{to,fast}$ ($I_{to,f}$), présentant une cinétique d'inactivation rapide, et $I_{to,slow}$ ($I_{to,s}$), avec une cinétique d'inactivation lente (Nabauer *et al.*, 1996). Cette repolarisation transitoire ou "notch" influence l'amplitude de dépolarisation et la durée du plateau du PA. La dépolarisation membranaire active également les courants calciques voltage-dépendants. L'influx de calcium à travers les canaux de type L ($I_{Ca,L}$) durant la phase de plateau est le principal activateur du couplage excitation-contraction du myocarde. Durant cette phase, la sortie de potassium est élevée et au fur et à mesure que les canaux calciques s'inactivent, les courants potassiques sortants deviennent prédominants. Il en résulte une repolarisation qui ramène le potentiel de membrane au niveau du potentiel de repos. Contrairement aux canaux calciques et sodiques, il existe de multiples types de courants potassiques voltage-dépendants et voltage-indépendants qui contribuent à la repolarisation du PA. La plus grande diversité fonctionnelle se trouve parmi la famille des courants voltage-dépendants. Outre les deux types de courants sortants transitoires $I_{to,f}$ et $I_{to,s}$, il existe plusieurs courants à rectification retardée, dont I_{Kr} ($I_{K(rapide)}$), I_{Ks} ($I_{K(slow)}$) et I_{Kur} ($I_{K(ultrarapid)}$). La famille des courants voltage-indépendants comprend les courants à rectification entrante I_{K1} , $I_{K,ACh}$ et $I_{K,ATP}$. La durée du potentiel d'action cardiaque est déterminée par la balance entre les courants entrants dépolarisants et les courants sortants repolarisants, notamment durant les phases de plateau et de repolarisation. La résistance membranaire étant forte durant ces deux phases, des changements subtils de densité des courants ioniques peuvent induire des variations importantes de la durée du PA. Durant la phase 4 du PA, le courant I_{K1} permet la stabilisation du potentiel de repos vers le potentiel d'équilibre du potassium.

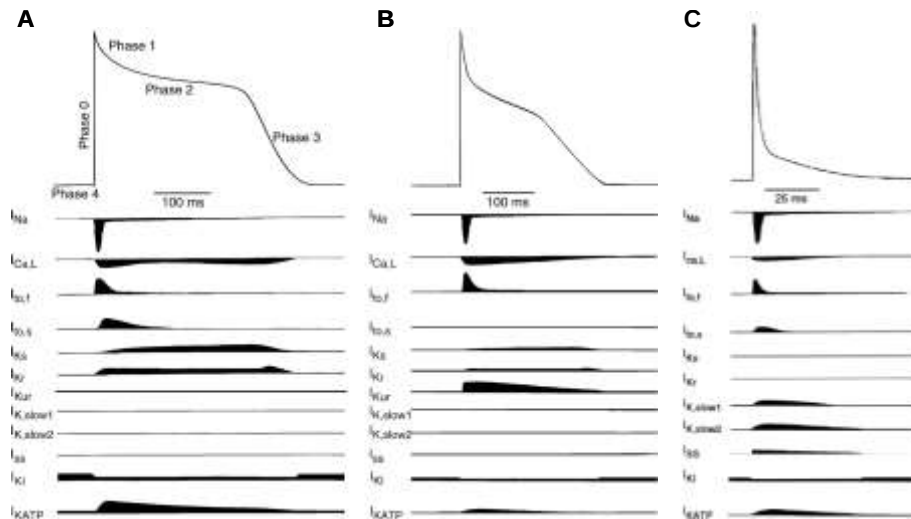


Figure 5 : Représentations schématiques des potentiels d'action ventriculaire (A) et auriculaire (B) humains et ventriculaire murin (C) ainsi que les courants ioniques associés (Nerbonne, 2004 ; Nerbonne & Kass, 2005).

L'hétérogénéité des PA auriculaires et ventriculaires chez l'Homme est associée à des différences dans la nature et dans les propriétés de différents courants ioniques (**Figures 5A et 5B**) (Nerbonne & Kass, 2005). Par exemple, le courant I_{Na} dans les cellules atriales humaines a des propriétés d'inactivation différentes de celui des cellules ventriculaires (Sakakibara *et al.*, 1992). Parmi les courants ioniques responsables de la phase 1 de repolarisation du PA, la densité du courant $I_{to,f}$ est plus importante dans l'oreillette par rapport au ventricule et $I_{to,s}$, à l'inverse, a une densité de courant plus faible (Varro *et al.*, 1993 ; Coraboeuf *et al.*, 1998 ; Nattel *et al.*, 2000 ; Nerbonne & Kass, 2005).

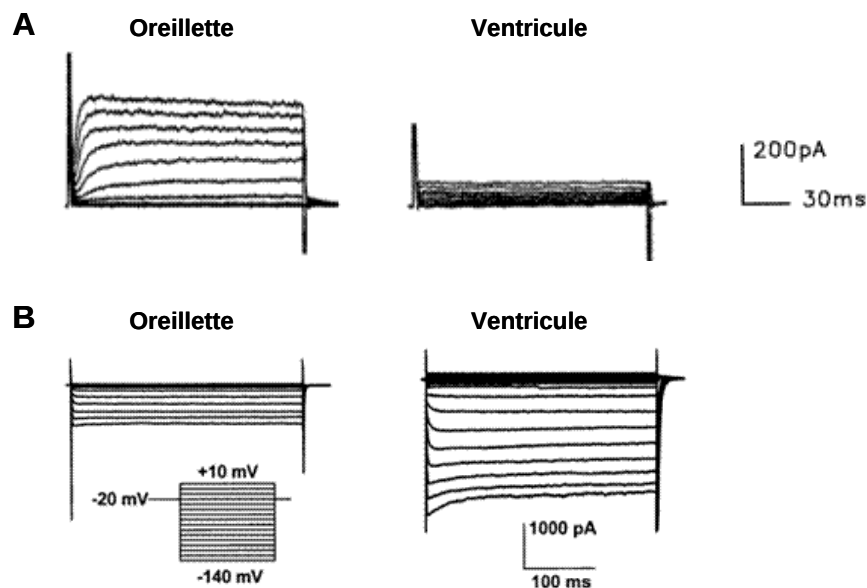


Figure 6 : Enregistrements de courants K^+ repolarisants dans l'oreillette et le ventricule humain. (A) Enregistrement du courant I_{Kur} (Li *et al.*, 1996). (B) Enregistrement du courant I_{K1} (Wang *et al.*, 1998).

De plus, le courant potassique ultrarapide à rectification retardée I_{Kur} , impliqué dans la phase 3 de repolarisation du PA, est présent dans les cellules auriculaires mais pas ventriculaires (Li *et al.*, 1996) (**Figure 6A**). Au contraire, la densité du courant I_{K1} est plus faible dans les oreillettes, expliquant la phase 3 de repolarisation plus lente par rapport aux ventricules et le potentiel de repos plus dépolarisé (Varro *et al.*, 1993 ; Wang *et al.*, 1998) (**Figure 6B**).

Les différences majeures entre les PA du myocarde contractile humain et murin concernent principalement les courants K^+ repolarisants (**Figures 5A et 5C**). En effet, chez la souris adulte, il n'y a pas de plateau et la repolarisation est rapide. Les principaux courants cardiaques repolarisants identifiés dans les cardiomyocytes ventriculaires murins sont I_{to} ($I_{to,f}$, $I_{to,s}$), $I_{K,slow}$ ($I_{K,slow1}$, $I_{K,slow2}$) et I_{ss} (Xu *et al.*, 1999a). Contrairement à ce qui est observé chez l'Homme, les courants I_{Ks} et I_{Kr} ont un rôle prépondérant durant la repolarisation ventriculaire embryonnaire mais ils ne sont pas (ou très peu) détectables dans les cardiomyocytes des souris adultes (Nerbonne *et al.*, 2001). Il faut noter que les acteurs de la phase de dépolarisation rapide (I_{Na}) et de repolarisation rapide (I_{to}) sont les mêmes chez la souris et l'Homme.

Chez la souris, l'amplitude globale des courants K^+ est similaire entre les oreillettes et les ventricules. Cependant, la densité des courants $I_{to,f}$ et $I_{K,slow}$, représentant la majorité des courants K^+ repolarisants, est plus importante dans les ventricules (Brouillette *et al.*, 2004 ; Nerbonne & Kass, 2005 ; Grandy *et al.*, 2007) (**Figure 7**). Une étude chez le rat a démontré que la densité du courant $I_{K,ACh}$ auriculaire est environ 6 fois supérieure à celle du ventricule (McMorn *et al.*, 1993). L'activation parasympathique du courant $I_{K,ACh}$ serait donc responsable du raccourcissement du PA dans les oreillettes. Lors de la stimulation parasympathique du courant $I_{K,ACh}$, le raccourcissement des PA au sein du tissu auriculaire est hétérogène (Ninomiya, 1966). Cette hétérogénéité contribuerait aux troubles du rythme supraventriculaires (Liu & Nattel, 1997). Par ailleurs, il a été montré dans différents modèles animaux que la densité du courant I_{K1} est plus faible dans les oreillettes par rapport aux ventricules (Melnik *et al.*, 2002 ; Dhamoon *et al.*, 2004). Cette différence pourrait expliquer le potentiel de repos plus dépolarisé des oreillettes mais elle paraît être beaucoup moins prononcée, si elle existe, chez la souris par rapport à l'Homme (Lomax *et al.*, 2003).

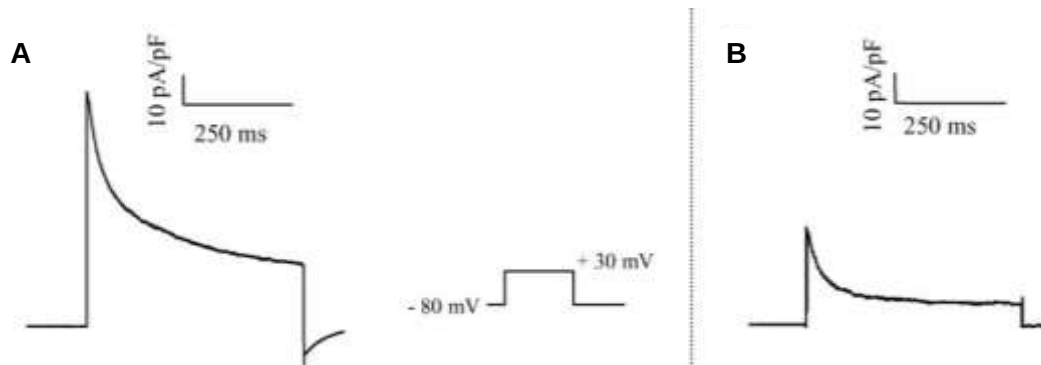


Figure 7 : Enregistrements de la densité des courants K^+ repolarisants dans le ventricule (**A**) et l'oreillette (**B**) chez la souris adulte (Brouillette *et al.*, 2004).

De même, les bases ioniques de l'hétérogénéité électrique au sein de la paroi ventriculaire ont été attribuées à la distribution asymétrique de différents courants ioniques. Chez l'Homme, il semble que l'hétérogénéité de repolarisation de la paroi ventriculaire soit principalement liée au courant potassique transitoire sortant I_{to} , qui présente une densité environ 4 fois plus importante dans l'épicaire par rapport à l'endocarde (**Figure 8A**) (Nabauer *et al.*, 1996 ; Brouillette *et al.*, 2004). Cette différence de densité est un élément clé de l'hétérogénéité de repolarisation transmurale puisqu'elle est associée à la présence spécifique du *spike and dome* au niveau du PA épicaire. La composante à cinétique d'inactivation rapide $I_{to,f}$ est majoritairement présente dans l'épicaire ventriculaire alors que la composante lente ($I_{to,s}$) caractérise l'endocarde (Kaab & Nabauer, 2001).

Chez la souris, l'hétérogénéité transmurale est liée aux courants $I_{to,f}$ et $I_{K,slow}$ qui présentent une densité de courant plus importante dans l'épicaire par rapport à l'endocarde de la paroi du ventricule gauche (Brunet *et al.*, 2004) (**Figure 8B**). D'autres différences électrophysiologiques au sein de la paroi ventriculaire existent. Chez le rat, les courants sodique I_{Na} et potassique I_{K1} présentent eux aussi un gradient transmural avec une densité supérieure dans l'endocarde par rapport à l'épicaire (Yao *et al.*, 1999 ; Ashamalla *et al.*, 2001).

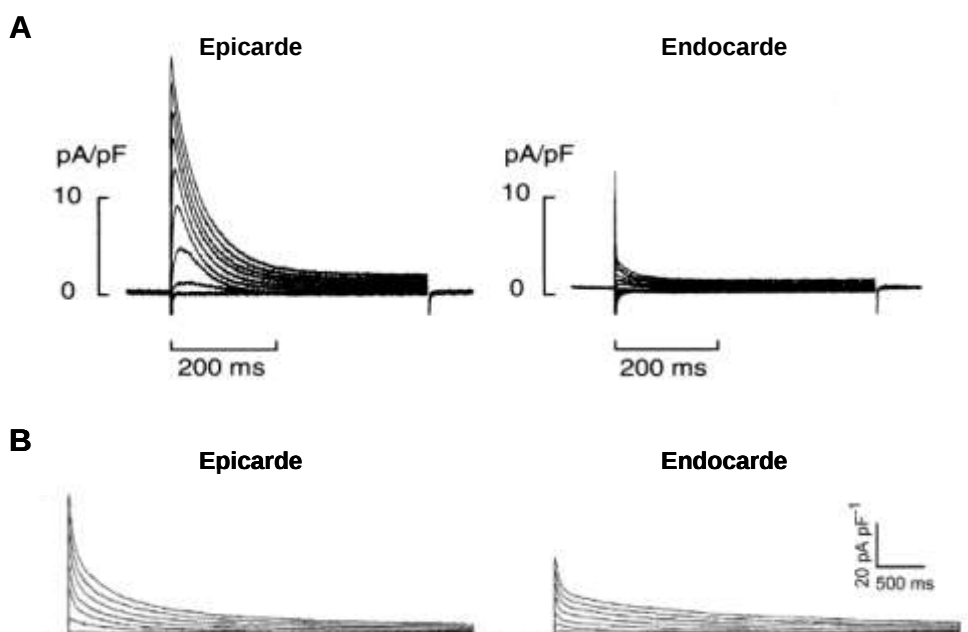


Figure 8 : Enregistrements de courants K^+ repolarisants dans l'épicarde et l'endocarpe chez l'Homme et la souris. (A) Enregistrements de la densité de courant I_{to} dans l'épicarde et l'endocarpe humain sain (Nabauer *et al.*, 1996). (B) Enregistrements de la densité des courants repolarisants K^+ dans l'épicarde et l'endocarpe ventriculaire gauche chez la souris adulte (Brunet *et al.*, 2004).

Par ailleurs, les hétérogénéités électriques le long de l'axe apico-basal ainsi qu'entre les ventricules droit et gauche ont principalement été associées à un gradient de densité des courants K^+ repolarisants impliquant principalement I_{to} (Di Diego *et al.*, 1996 ; Xu *et al.*, 1999a ; Brunet *et al.*, 2004 ; Szentadrassy *et al.*, 2005). Globalement, le gradient de densité des courants K^+ repolarisants dans le compartiment ventriculaire est le suivant : ventricule droit > épicarde du ventricule gauche (apex et base) > endocarpe du ventricule gauche (apex et base) > septum interventriculaire.

B.1.d. Hétérogénéité moléculaire intrinsèque des tissus contractiles : les canaux ioniques

Grâce au développement de la biologie moléculaire dans les années 1980, les premiers gènes codant des canaux Na^+ et K^+ ont été (Noda *et al.*, 1984 ; Papazian *et al.*, 1987). Depuis le séquençage du génome de l'Homme et de la souris, l'identification de plusieurs centaines de gènes codant pour les différentes sous-unités des canaux ioniques montre une importante diversité moléculaire et fonctionnelle (Lander *et al.*, 2001 ; Okazaki *et al.*, 2002). L'étude de l'expression des gènes (ou génomique) peut maintenant être appréhendée par les technologies de puces à ADN, pour les plus courantes, et par la RT-PCR quantitative à haut débit, pour la plus récente. Ces technologies permettent l'analyse

globale et simultanée de l'expression d'une partie ou de l'ensemble des gènes d'un organisme : le transcriptome. Les données présentées dans la suite de cette introduction seront principalement tirées de nos études récentes chez l'Homme et la souris montrant que les différences électrophysiologiques entre les régions cardiaques sont sous-tendues par des différences dans l'expression des canaux ioniques (Marionneau *et al.*, 2005 ; Gaborit *et al.*, 2007).

L'hétérogénéité de l'expression des gènes codant l'ensemble des sous-unités des canaux ioniques, des connexines et des protéines de l'homéostasie calcique dans le cœur humain sain, permet de discriminer le tissu auriculaire du tissu ventriculaire (Gaborit *et al.*, 2007). Cette étude suggère fortement que la spécificité de la fonction électrique de chaque compartiment cardiaque est sous-tendue par une expression transcriptionnelle régionale des canaux ioniques (**Figure 9**).

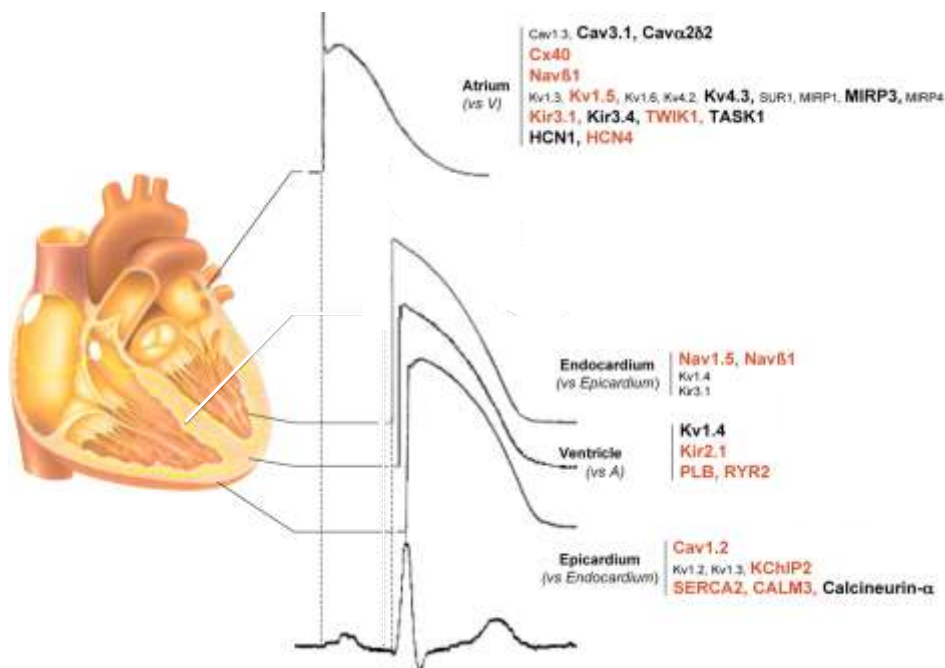


Figure 9 : Représentation schématique des potentiels d'action et des marqueurs moléculaires de l'oreillette, de l'endocarde, du ventricule et de l'épicarde dans le cœur sain chez l'Homme. La partie droite du schéma indique les marqueurs moléculaires spécifiques de chaque région cardiaque. En rouge sont indiqués les gènes les plus fortement exprimés, en noir et gras, les gènes d'expression intermédiaire et en noir, les gènes les plus faiblement exprimés (Gaborit *et al.*, 2007).

Chez l'Homme, la principale protéine-canal générant $I_{to,f}$ est Kv4.3. Son transcrit et sa protéine sont plus exprimés dans l'oreillette par rapport au ventricule comme sa sous-unité régulatrice KCHIP2. Ces résultats sont en accord avec une densité du courant $I_{to,f}$ plus importante dans l'oreillette par rapport au ventricule chez l'Homme (Nerbonne & Kass, 2005). A l'inverse, le transcrit de Kv1.4, principale protéine-canal du courant $I_{to,s}$, est spécifiquement exprimé dans le compartiment ventriculaire, résultat qui est à nouveau en

concordance avec les données fonctionnelles puisqu'une plus grande densité de ce courant a été enregistrée dans le ventricule par rapport à l'oreillette (Nerbonne & Kass, 2005). En accord avec les données fonctionnelles obtenues chez l'Homme ou le rat (McMorn *et al.*, 1993 ; Li *et al.*, 1996), parmi les sous-unités les plus exprimées et spécifiques de l'oreillette, on trouve : Kv1.5, responsable du courant I_{Kur} chez l'Homme ; Kir3.1 et Kir3.4, générant le courant $I_{K,ACh}$. Enfin, le transcrite de Kir2.1 est fortement et spécifiquement exprimé dans le ventricule, ce qui corrèle avec la densité du courant I_{K1} qu'il génère, plus importante dans le ventricule par rapport à l'oreillette (Varro *et al.*, 1993).

De la même manière que chez l'Homme, l'étude de notre équipe chez la souris montre que l'oreillette et le ventricule se distinguent par des signatures transcriptionnelles des canaux ioniques spécifiques à chacun des compartiments (Marionneau *et al.*, 2005) (**Figure 10**). Chez la souris, l'expression du gène codant pour Nav1.5, générant le courant I_{Na} TTX-insensible, est plus importante dans le ventricule par rapport à l'oreillette. Cette expression préférentielle concorde avec le rôle clef de Nav1.5 dans la conduction rapide de l'influx électrique dans le tissu ventriculaire (Papadatos *et al.*, 2002). A la différence de travaux précédents montrant une expression plus forte des transcrits de Kv4.2 dans le ventricule par rapport aux oreillettes (Dixon & McKinnon, 1994 ; Xu *et al.*, 1999b), cette étude a mis en évidence une expression similaire de cette sous-unité dans les deux compartiments contractiles. Or, chez la souris, la sous-unité Kv4.2 est la principale sous-unité canal générant le courant $I_{to,f}$ qui, à l'inverse de l'Homme, a une densité plus importante dans le ventricule par rapport à l'oreillette (Xu *et al.*, 1999b). L'hétérogénéité d'expression de $I_{to,f}$ entre le ventricule et l'oreillette ne serait donc pas due à l'expression préférentielle de Kv4.2 dans le ventricule, mais à celle de sa sous-unité régulatrice KChIP2 (Marionneau *et al.*, 2005). Le rôle essentiel de KChIP2 dans la génération du courant $I_{to,f}$ a été démontré en invalidant son gène chez la souris (Kuo *et al.*, 2001). Cette invalidation abroge totalement le courant I_{to} dans les ventricules. A l'inverse des gros mammifères comme l'Homme, Kv1.5 est plus exprimé dans le ventricule que dans l'oreillette chez la souris (Marionneau *et al.*, 2005). Ceci est en accord avec la densité de $I_{K,slow1}$, plus importante dans le ventricule par rapport à l'oreillette chez la souris (Grandy *et al.*, 2007). Par ailleurs, les souris pour lesquelles Kv1.5 a été inactivé possèdent un allongement du QT montrant un rôle majeur de Kv1.5 dans la repolarisation ventriculaire (London *et al.*, 1998). Comme pour l'Homme, les sous-unités Kir3.1 et Kir3.4 sont préférentiellement exprimées dans le tissu auriculaire (DePaoli *et al.*, 1994 ; Marionneau *et al.*, 2005). Ces résultats concordent avec les études montrant que le courant $I_{K,ACh}$ est plus important dans les oreillettes par rapport aux ventricules (McMorn *et al.*, 1993). Enfin, alors que la plus faible densité du courant I_{K1} dans l'oreillette, observée dans différents modèles animaux et chez l'Homme (dans un de nos travaux), a été expliquée par une plus faible expression du canal Kir2.1 dans l'oreillette par rapport au ventricule

(Melnik *et al.*, 2002 ; Dhamoon *et al.*, 2004 ; Gaborit *et al.*, 2007), l'expression de cette sous-unité ne varie pas entre ces deux compartiments chez la souris (Marionneau *et al.*, 2005). Ce résultat confirmerait la moindre hétérogénéité de I_{K1} entre l'oreillette et le ventricule chez la souris par rapport aux plus gros mammifères comme l'Homme (Lomax *et al.*, 2003).

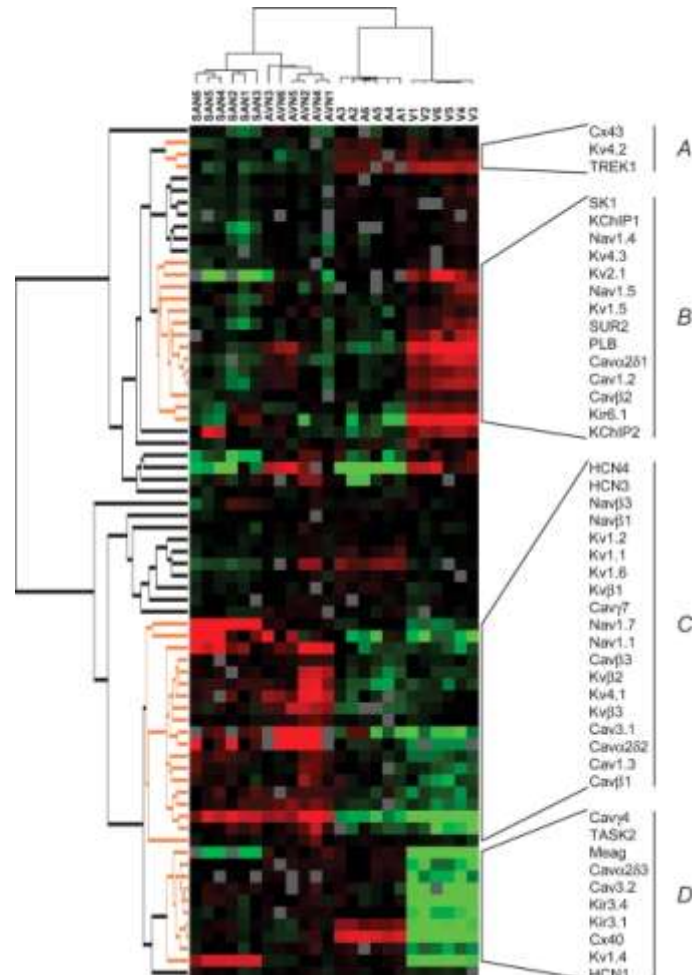


Figure 10 : Signatures spécifiques d'expression des gènes codant les sous-unités des canaux ioniques, les connexines et les protéines de l'homéostasie calcique en fonction des compartiments cardiaques chez la souris. Classification hiérarchique appliquée à 71 gènes (verticalement) et à 6 pools de nœuds sinusaux (SAN1-SAN6), nœuds auriculo-ventriculaires (AVN1-AVN6), d'oreillettes (A1-A6) et de ventricules (V1-V6) du cœur murin adulte (horizontalement). Chaque gène et chaque pool sont représentés par une ligne et une colonne, respectivement. Chaque carré coloré correspond au niveau d'expression relatif d'un gène. La gamme de couleur s'étend du vert (moins exprimé) au rouge (plus exprimé). Les valeurs manquantes sont représentées en gris. Les *clusters* de gènes A et C indiquent des gènes pertinents dans la discrimination des tissus de l'automatisme par rapport aux tissus contractiles alors que les *clusters* B et D discriminent les ventricules des oreillettes (Marionneau *et al.*, 2005).

Les bases moléculaires du gradient transmural des courants ioniques I_{Na} , $I_{to,f}$, $I_{to,s}$ et I_{K1} ont été attribuées à la distribution asymétrique de différentes sous-unités des canaux ioniques qui génèrent ces courants chez la souris, le rat, le chien et l'Homme (Rosati *et al.*, 2006 ; Teutsch *et al.*, 2007 ; Gaborit *et al.*, 2007). Nous avons notamment confirmé cette hypothèse en mettant en évidence un gradient d'expression entre l'épicarde et l'endocarde

pour les transcrits codant pour Nav1.5, Nav β 1, KChIP2 et Kv1.4 chez l'Homme (Gaborit *et al.*, 2007).

B.2. Modifications moléculaires et fonctionnelles des canaux ioniques avec l'âge à l'étage ventriculaire

L'étude du développement et de la maturation cardiaque apporte des connaissances sur de nombreux changements biologiques, y compris sur les altérations du système cardiovasculaire (Artman *et al.*, 2002). La réexpression du programme fœtal, les changements de l'électrophysiologie et les variations de l'expression des canaux ioniques sont autant de manifestations, signes de ces modifications. En plus des changements dans l'« embryologie moléculaire » déjà bien caractérisés, le cœur immature est capable de plasticité et de remodelage dans les mécanismes et la régulation de l'excitabilité, de la contraction, de la relaxation et des propriétés de conduction des cardiomyocytes. En dépit de nombreux progrès ces dernières années, l'étiologie et la nature de ces changements demeurent partiellement connues. Jusqu'à présent, les recherches expérimentales se sont attachées à l'étude d'un courant ou d'un canal ionique particulier, sans prendre en compte la régulation de l'ensemble des protagonistes (Wetzel & Klitzner, 1996). Chez la souris, le rat et le chien, le cœur néonatal présente une durée de potentiel d'action plus long, et un potentiel de membrane plus dépolarisé que le cœur adulte. A l'échelle cellulaire, de nombreux changements s'opèrent au niveau des canaux ioniques, incluant le courant transitoire sortant I_{to} , responsable de la repolarisation précoce du potentiel d'action (Kilborn & Fedida, 1990 ; Crumb, Jr. *et al.*, 1995), les altérations du courant rectifiant entrant I_{K1} , responsable du maintien du potentiel de membrane à un potentiel négatif (Kilborn & Fedida, 1990 ; Chen *et al.*, 1991 ; Masuda & Sperelakis, 1993), le courant calcique de type L $I_{Ca,L}$, responsable chez l'adulte de l'influx de calcium durant le potentiel d'action (Huynh *et al.*, 1992), le courant calcique de type T $I_{Ca,T}$ qui est impliqué dans l'activité pacemaker (Ferron *et al.*, 2002), et l'échangeur sodium-calcium, responsable de l'extrusion de calcium du cœur adulte, qui pourrait servir comme source d'influx de calcium dans le cœur immature (Artman *et al.*, 2000). Ces études sont souvent conduites sur des espèces différentes, ou à des stades de développement différents. Cela est problématique puisqu'il existe de grandes différences entre espèces concernant l'activité électrique et la composition en canaux ioniques cardiaques qui s'y rattachent (Harrell *et al.*, 2007). De plus, les études électrophysiologiques sur la maturation et le développement cardiaque sont difficilement comparables car effectuées sur des espèces différentes et surtout à des stades différents de cette maturation.

Ma stratégie consiste à comparer, dans une même espèce, l'expression de l'ensemble des canaux ioniques avec un choix exhaustif de stades de développement (embryonnaires E15,5, E18,5 et post-nataux P1, P7, P20, adulte). L'objectif final de ce projet est de comprendre les variations de l'électrogénèse cardiaque au cours du développement afin de mieux appréhender et interpréter les maladies, telles les arythmies, dont l'incidence augmente avec l'âge.

B.2.a. Les canaux et courants sodiques

Au niveau moléculaire, chez la souris, durant la cardiogenèse, le profil d'expression du gène *SCN5A* (codant le principal canal sodique cardiaque Nav1.5) connaît des variations importantes. Si son expression est détectée dès le stade embryonnaire E9.5, et qu'elle augmente jusqu'à un pic au jour E11.5, elle diminue ensuite jusqu'au stade E13.5 puis réaugmente sans discontinuer jusqu'à la naissance. Après cette dernière, l'expression de *SCN5A* augmente graduellement aux stades postnatal et adulte (Davies *et al.*, 1996 ; Zimmer *et al.*, 2002 ; Haufe *et al.*, 2005 ; Harrell *et al.*, 2007). Le niveau d'expression de la protéine Nav1.5 suit le même profil, avec une distribution de Nav1.5 uniforme dans le myocarde ventriculaire (Davies *et al.*, 1996 ; Zimmer *et al.*, 2002 ; Haufe *et al.*, 2005 ; Harrell *et al.*, 2007 ; Dominguez *et al.*, 2008a). La sous-unité régulatrice des canaux sodiques Nav β 1 suit ce même profil, sous-entendant que ces deux gènes pourraient avoir une régulation transcriptionnelle commune durant la cardiogenèse (Dominguez *et al.*, 2005). Au niveau fonctionnel, dans les cœurs de souris, de rat et de poulet, la densité des canaux sodiques est augmentée de façon marquée au cours du développement (Fujii *et al.*, 1988 ; Conforti *et al.*, 1993 ; Davies *et al.*, 1996). L'augmentation significative de la densité de canaux sodiques observée pourrait alors avoir un rôle dans la physiologie du cœur important lors du développement cardiaque (Davies *et al.*, 1996). Les évolutions des propriétés biophysiques et pharmacologiques du canal sodique sont encore peu connues entre les stades embryonnaires, néonataux et adultes chez la souris (Benndorf *et al.*, 1985 ; Nuss & Marban, 1994). L'étude du tissu ventriculaire au cours du développement montre de légers changements de la fonction du canal sodique puisqu'il est observé une augmentation de la vitesse de conduction (Rosen *et al.*, 1978 ; Fujii *et al.*, 1988). Dans des cellules ventriculaires de rat, des mesures directes des courants sodiques montrent également une augmentation du taux d'inactivation de ce canal au cours du développement (Qu & Robinson, 2004).

B.2.b. Les canaux et courants calciques

L'expression des gènes *CACNA1D* (isoformes 1a et 1b, variants d'épissage de l'exon 1) et *CACNA1C*, codant les canaux calciques de type L (Cav1.3 et Cav1.2 respectivement), apparaît dès 9.5 jours post coïtum, dans les myocytes ventriculaires chez la souris. A ce stade, *CACNA1D* a une expression plus importante que *CACNA1C*, et son isoforme 1b est alors plus exprimée que l'isoforme 1a. Lors de la deuxième moitié du développement embryonnaire, l'expression de *CACNA1D* diminue, tandis que celle de *CACNA1C* augmente. *CACNA1C* devient le type prééminent un peu avant la naissance (Takemura *et al.*, 2005).

Le gène *CACNA1H* codant le canal calcique de type T Cav3.2 est l'isoforme dont l'expression prédomine aux stades embryonnaires E9.5 à E18. L'expression de *CACNA1G* codant l'autre canal calcique de type T Cav3.1 augmente entre ces stades E9.5 et E18. Son expression demeure moins importante que celle de *CACNA1H* durant la période embryonnaire. Au stade adulte, à l'inverse, l'expression de *CACNA1G* devient plus importante que celle de *CACNA1H*, donnant lieu à une permutation de l'influence de l'expression des deux gènes durant la période périnatale (Niwa *et al.*, 2004 ; Harrell *et al.*, 2007).

Au niveau fonctionnel, l'amplitude globale du courant calcique est comparable entre les stades embryonnaires E9.5 et E18, puis augmente pour les stades adultes (Niwa *et al.*, 2004). Il existe des changements développementaux des courants de type L et de type T. L'équipe de J.P. Gomez a montré une diminution du courant de type T au cours de la maturation cardiaque (Gomez *et al.*, 1994). De nombreuses études sur des myocytes ventriculaires de différents mammifères (Osaka & Joyner, 1991 ; Masuda & Sperelakis, 1993 ; Wetzel *et al.*, 1993 ; Gomez *et al.*, 1994 ; Wetzel & Klitzner, 1996) ont rapporté une augmentation liée à l'âge du courant $I_{Ca,L}$ au cours du développement. Ceci peut être relié à une densité de canaux calciques de type L qui est moins importante pour le stade néonatal que pour le stade (Katsube *et al.*, 1998 ; Nguemo *et al.*, 2007).

B.2.c. Les canaux et courants pacemaker

Chez la souris, les transcrits du gène *HCN4* sont présents dès le stade 9.5 jours post coïtum et son expression est prédominante par rapport aux transcrits *HCN1*, *HCN2* et *HCN3*. L'expression de *HCN4* diminue ensuite très fortement jusqu'à la naissance puis réaugmente légèrement pour rester stable jusqu'au stade adulte. Après la naissance, le niveau d'expression de *HCN2* dépasse celui de *HCN4* et devient prédominant, tandis que *HCN1* et *HCN3* sont quasiment absents (Shi *et al.*, 1999 ; Marionneau *et al.*, 2005 ; Liu *et al.*, 2007).

Dans le ventricule humain adulte, à la différence de la souris, *HCN4* apparaît plus exprimé que *HCN2*, indiquant une différence de profil d'isotypes entre les espèces, et plus particulièrement entre la souris (Herrmann *et al.*, 2007 ; Harzheim *et al.*, 2008) et l'Homme (Schulze-Bahr *et al.*, 2003 ; Ueda *et al.*, 2004 ; Milanesi *et al.*, 2006 ; Nof *et al.*, 2007 ; Stillitano *et al.*, 2008). Au niveau fonctionnel, Yasui *et al.*, en 2001 ont montré chez la souris qu'un courant I_f , similaire à celui du nœud sinusal adulte, est présent dans les myocytes ventriculaires embryonnaires, courant qu'ils associent à l'expression du gène *HCN4* (Yasui *et al.*, 2001).

Des études plus anciennes sur le ventricule de poulet avaient déjà rapporté l'existence d'un courant I_f , aux stades précoces du développement embryonnaire. Chez la souris comme chez le poulet, le courant n'est pas mesuré aux stades embryonnaires tardifs (Sato & Sperelakis, 1991 ; Brochu *et al.*, 1992). Des études complémentaires ont par la suite montré que ce courant I_f est présent dans le ventricule de rat, à des potentiels physiologiques, chez l'adulte (Robinson *et al.*, 1997), tandis que d'autres (Cerbai *et al.*, 1999) ont rapporté un changement de la densité de courant qui diminue après la naissance. D'autre part, le courant I_f pourra être mis en évidence dans les stades adultes dans les ventricules âgés ou malades chez le rat (Cerbai *et al.*, 1994) et chez l'Homme (Cerbai *et al.*, 2001).

B.2.d. Les canaux et courants potassiques repolarisants

Au niveau moléculaire, l'expression du gène *KCNJ2*, codant le canal potassique à rectification entrante $Kir2.1$ augmente entre les stades embryonnaire et adulte (Harrell *et al.*, 2007). Au niveau fonctionnel, la densité du courant I_{K1} , responsable du maintien du potentiel de repos des myocytes adultes, est faible chez l'embryon et le fœtus et augmente durant le développement pré- puis post-natal, chez la souris et chez le rat (Josephson & Sperelakis, 1990 ; Chen *et al.*, 1991 ; Huynh *et al.*, 1992 ; Wahler, 1992 ; Masuda & Sperelakis, 1993 ; Xie *et al.*, 1997 ; Grandy *et al.*, 2007).

Chez la souris, l'expression des gènes *KCND2* et *KCND3* (codant respectivement les canaux potassiques $Kv4.2$ et $Kv4.3$, sous-unités responsables du courant I_{to}) augmente entre les stades embryonnaire et adulte. Le transcrit *KCNIP2* de la sous-unité régulatrice $KChIP2$ suit le même profil (Grandy *et al.*, 2007 ; Harrell *et al.*, 2007). Au niveau fonctionnel, l'association de cette sous-unité $KChIP2$ avec $Kv4.2$ et $Kv4.3$ chez la souris peut ainsi modifier la densité d' I_{to} (Kuo *et al.*, 2001 ; Shibata *et al.*, 2003 ; Pourrier *et al.*, 2003). En 2007, Grandy *et al.* montrent une augmentation de ce courant après la naissance. Cette

augmentation d' I_{to} au cours de la cardiogenèse est aussi répertoriée chez le rat et le chien (Kilborn & Fedida, 1990 ; Jeck & Boyden, 1992).

Chez la souris, le niveau d'ARNm des gènes *KCNA2*, *KCNA5*, et *KCNB1*, codant respectivement les canaux Kv1.2, Kv1.5, et Kv2.1, augmente de 3 à 5 fois entre la naissance et le stade adulte. L'analyse par Western Blot révèle, pour la même période, que: Kv1.2 augmente, tandis que Kv1.5 stagne, et que Kv2.1 diminue (Xu *et al.*, 1996).

Toujours chez la souris Franco *et al.* (2001) ont montré que l'ARNm de *KCNQ1* et *KCNH2* (ainsi que la protéine) sont exprimés dès 9.5 jours post coïtum. L'expression du gène *KCNE1*, sous-unité régulatrice de *KCNQ1*, est également constatée à ce stade précoce. Cette sous-unité possède en outre une expression purement ventriculaire à la fin de la période de gestation chez la souris (Franco *et al.*, 2001).

En règle générale, l'expression des gènes codant des canaux repolarisants augmente au cours du développement (Roberds & Tamkun, 1991 ; Wang & Duff, 1996). Ce phénomène est à même d'expliquer le raccourcissement du potentiel d'action observé au cours du développement et de la maturation cardiaque chez la souris.

Au niveau fonctionnel, Grandy *et al.* signalent en 2007 que le courant I_{Kslow} est significativement plus important dans les myocytes ventriculaires adultes de souris, comparés aux myocytes des stades néonataux et des stades intermédiaires. I_{Kslow} est composé de 2 courants I_{Kur} et I_{Kss} . La densité de courant I_{Kss} est plus importante pour les stades à 20 jours et adulte (quasi identique pour ces deux stades) comparé aux stades néonataux précoces 1 et 7 jours (également identiques pour ces stades). Cette augmentation semble être corrélée à la hausse de l'expression des gènes codant Kv1.2 et Kv2.1. I_{Kur} est similaire pour les stades 1, 7 et 20 jours postpartum. Il augmente significativement en densité pour le stade adulte, et n'est donc observé que tardivement, après la stabilisation de la durée du potentiel d'action. Au contraire, chez le rat, le courant I_{Kur} est faiblement exprimé dans les ventricules et il diminue avec le développement postnatal (Guo *et al.*, 1997).

Les composantes I_{Ks} et I_{Kr} du courant potassique retardé sont générés par les sous-unités canalaire KvLQT1 et Erg (codés par les gènes *KCNQ1* et *KCNH2*) respectivement. Le courant I_{Ks} est augmenté de façon importante dans les cellules ventriculaires au cours du développement cardiaque. I_{Ks} n'a été observé que dans les stades embryonnaires ventriculaires tardifs chez la souris (Franco *et al.*, 2001). Deux autres études chez la souris (Davies *et al.*, 1996 ; Wang & Duff, 1996) montrent une diminution de I_{Kr} par rapport à I_{Ks} entre les stades fœtaux précoces et les stades fœtaux tardifs ou néonataux. De même, le

ventricule de chien présente une diminution postnatale de I_{Kr} et une augmentation de la densité de courant I_{Ks} (Obreztkhikova *et al.*, 2003).

B.3. Modifications moléculaires et fonctionnelles des canaux ioniques avec l'âge à l'étage auriculaire

B.3.a. Les canaux et courants sodiques

Comme à l'étage ventriculaire, l'expression (ARNm et protéine) du canal sodique Nav1.5 augmente entre les stades embryonnaires et adultes chez la souris, ceci de façon uniforme dans les oreillettes. De plus, l'expression de la protéine Nav1.5 est plus élevée dans les oreillettes que dans les ventricules pour les stades postnataux (Dominguez *et al.*, 2008b). De la même façon, l'expression de la sous-unité régulatrice Nav β 1 est plus importante dans les oreillettes que dans les ventricules au stade adulte chez la souris. (Sakakibara *et al.*, 1992 ; Makita *et al.*, 1994). Cette forte expression dans l'oreillette de la sous-unité Nav1.5 et de la sous-unité auxiliaire Nav β 1 (Dominguez *et al.*, 2005) pourrait expliquer la plus grande excitabilité des cellules atriales par rapport aux cellules ventriculaires (Dominguez *et al.*, 2008a). Il est donc possible que le courant sodique I_{Na} augmente de façon similaire à l'expression du canal au cours de la maturation et du développement, comme il le fait pour les cellules ventriculaires. Aucune donnée fonctionnelle n'a été réalisée pour le vérifier jusqu'à présent.

B.3.b. Les canaux et courants calciques

Au niveau moléculaire, les transcrits des gènes *CACNA1G* et *CACNA1H* sont présents dans les tissus atriaux néonataux et adultes chez la souris. Dans les oreillettes, comme pour les ventricules, le canal néonatal calcique de type T est codé par le gène *CACNA1G* (Leuranguer *et al.*, 2000). Ceci est en accord avec le travail publié par Satin and Cribbs (2000), qui détermine l'isoforme *CACNA1G* comme celle supportant le courant calcique de type T dans une lignée de cellules dérivée de tissu atrial murin adulte. Les transcrits des gènes *CACNA1C* et *CACNA1E* sont également présents dans les oreillettes aux stades néonataux mais seuls subsistent les transcrits *CACNA1C* au stade adulte. A ce stade, *CACNA1C* est moins exprimé que *CACNA1G* qui code le canal responsable du courant $I_{Ca,T}$ (Leuranguer *et al.*, 2000).

Au niveau fonctionnel, chez le rat, après la naissance, la densité du courant $I_{Ca,T}$ des cellules atriales augmente pendant la première semaine puis diminue jusqu'au stade adulte. Les propriétés biophysiques du canal sont inchangées durant le développement postnatal. Ces résultats sont en contradiction avec ceux obtenus sur des myocytes atriaux de rat par Best *et al.* (1992) qui montrent un maximum de courant 5 semaines après la naissance.

A l'opposé du courant calcique de type T, la densité de courant calcique de type L demeure inchangé pour les oreillettes de rat entre 3 et 14 semaines. (Xu & Best, 1992). Chez l'Homme, il a été montré par deux études différentes que l'amplitude du courant augmente entre l'enfance et le stade adulte (Roca *et al.*, 1996 ; Tipparaju *et al.*, 2004). La courbe I/V du courant calcique de type L au cours de la maturation cardiaque dans les oreillettes reste encore à déterminer.

B.3.c. Les canaux et courants pacemaker

Dans les oreillettes du cœur humain sain, *HCN4* est la principale isoforme de la famille HCN à être représentée dans les stades embryonnaires (Shi *et al.*, 1999 ; Stieber *et al.*, 2003). Chez la souris, aux stades embryonnaires, l'expression de *HCN4*, ainsi que celle de *HCN3* sont 2 fois supérieures à celles des ventricules. Jusqu'à la naissance, ces deux isoformes voient leurs expressions diminuées (Yasui *et al.*, 2001). Après la naissance, les transcrits *HCN1*, 2, et 4 ont une expression croissante, particulièrement marquée pour *HCN4*. Ces expressions vont ensuite, après 2 semaines post-partum, soit diminuer (*HCN1* et *HCN4*), soit se stabiliser (*HCN2*) jusqu'au stade adulte. Faiblement exprimé durant la phase embryonnaire, *HCN1* apparaît restreint aux oreillettes durant les stades adultes. Quant à l'expression de *HCN3*, elle décline tout au long du développement atrial (Schweizer *et al.*, 2009).

B.3.d. Les canaux et courants potassiques repolarisants

En 2004, Trepanier-Boulay *et al.* relate une augmentation significative de l'expression des transcrits de différents canaux potassiques au cours du développement atrial chez la souris (Trepanier-Boulay *et al.*, 2004).

Concernant les canaux rectifiants entrants, la quantité d'ARNm de Kir2.1 est doublée entre le stade néonatal et le stade adulte. Au niveau fonctionnel, et en relation avec ces données d'expression, la densité de courant I_{K1} est 2 fois plus petite dans les cellules

néonatales atriales par rapport aux cellules des groupes plus âgés. I_{K1} augmente principalement la première semaine après la naissance. Le potentiel de membrane diminue et passe alors de -60 à -73mV durant cette période.

Le niveau d'expression des transcrits des canaux potassiques Kv4.2 et Kv4.3 a également été évalué entre les stades néonatal et adulte dans l'oreillette chez la souris. Entre ces stades, la quantité d'ARNm de Kv4.2 est augmentée de 6 fois; et celle de Kv4.3 de 3 fois. Au niveau fonctionnel, la densité du courant transitoire sortant I_{to} augmente, en parallèle, de 3 fois entre le stade néonatal et 20 jours, et jusqu'à 7 fois au stade adulte. A noter que le courant I_{to} reste toutefois significativement plus petit que pour les cellules ventriculaires à partir de la première semaine après la naissance (Grandy *et al.*, 2007). Chez l'Homme également, la densité de courant I_{to} est doublée entre l'enfance et le stade adulte (Crumb, Jr. *et al.*, 1995).

Chez la souris, une augmentation de l'expression postnatale (entre les stades néonataux et adultes) des transcrits de Kv1.5 (quantité triplée), de Kv2.1 (quantité doublée) est observée. L'expression de *KCNQ1* reste constante entre ces stades. Celle de sa sous-unité régulatrice *KCNE1* n'est pas détectée, à aucun des stades postnataux étudiés (Trepanier-Boulay *et al.*, 2004). En 2001, Franco *et al* ont étudié l'expression des canaux KvLQT1 et Erg dans les tissus embryonnaires et fœtaux de souris. L'ARNm et la protéine de *KCNQ1* et *KCNH2* respectivement sont retrouvés dès le stade embryonnaire E9.5, avec des niveaux comparables entre les oreillettes et les ventricules durant les stades embryonnaires et fœtaux. En revanche, leurs sous-unités régulatrices présentent un profil d'expression plus instable : *KCNE1*, sous-unité régulatrice de *KCNQ1*, est exprimée à un stade précoce de la maturation cardiaque (E9.5) mais est ensuite absent au stade fœtal. *KCNE2* (sous-unité régulatrice de *KCNH2*) est d'abord exprimée au stade embryonnaire E9.5 et cette expression est restreinte au myocarde atrial. *KCNE3* est exprimé dès E8.5 dans tout le muscle cardiaque puis, au cours de la maturation, se retrouve confiné au myocarde atrial. Au niveau fonctionnel, Davies *et al.* (1996) précisent qu' I_{Kr} est enregistré préférentiellement dans les cellules embryonnaires atriales du cœur de poulet, coïncidant avec l'expression régionalisée de *KCNE2*. Chez la souris, cette même équipe a montré qu' I_{Kr} est un courant dominant dans les stades embryonnaires précoces dans les oreillettes. Pour ces stades, l'expression de I_{Kr} est plus élevée que dans les ventricules. Dans les stades fœtaux, plus tardifs, aucune expression régionalisée n'est à noter. Le courant I_{Ks} , pour sa part, n'a pas pu être enregistré dans les cellules atriales, à aucun stade du développement embryonnaire (Davies *et al.*, 1996). Le courant I_{Kslow} , qui est faible dans les premières semaines postnatales, voit sa densité doublée à partir du 20^{ème} jour, avant d'augmenter encore

jusqu'au stade adulte chez la souris (Trepanier-Boulay *et al.*, 2004). En complément, il est possible, d'une part, de discriminer un courant I_{ss} plus petit au stade néonatal par rapport au stade adulte. La densité de ce courant est similaire pour les stades 7j, 20j, et adulte. D'autre part, la densité du courant I_{Kur} est évaluée comme étant identique entre oreillettes et ventricules au stade néonatal, tout en restant très faiblement exprimé (**Figure 11**). Il augmente ensuite très légèrement jusqu'au stade adulte, mais de façon moins importante que dans le ventricule (Grandy *et al.*, 2007).

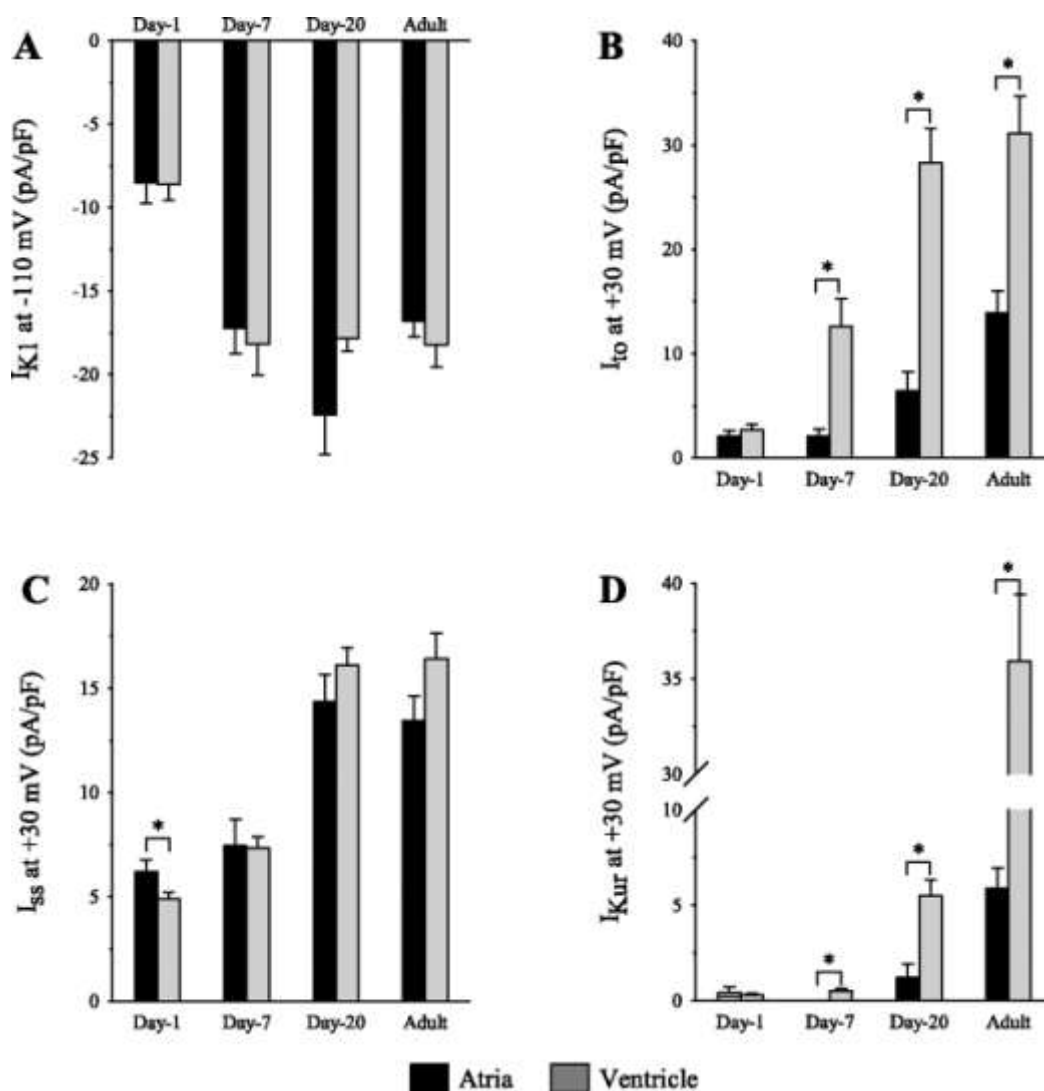


Figure 11 : Densité de courants K⁺ repolarisants dans des cellules atriales (en noir) et ventriculaires (en gris) à différents stades de développement post-natal (1 jour, 7 jours, 20 jours et adulte) chez la souris. (A) Densité de courant I_{K1} dans les cellules atriales et ventriculaires. (B) Densité de courant I_{to} dans les cellules atriales et ventriculaires. (C) Densité de courant I_{ss} dans les cellules atriales et ventriculaires. (D) Densité de courant I_{Kur} dans les cellules atriales et ventriculaires.

L'activité électrique du cœur évolue au cours du développement et de la maturation cardiaque. Il est possible de relier cette activité globale à la somme des activités des canaux ioniques cardiaques. Comme cela a été décrit précédemment, il existe une relation entre le

niveau d'expression de ces différents canaux et leur fonction. Ainsi, une augmentation de l'expression d'un canal potassique au cours du développement entraîne une augmentation du courant potassique qui influence à son tour l'activité électrique du cœur.

Ces études, qui ont été réalisées chez différentes espèces, montrent quelques variations suivant les espèces et demeurent incomplètes. Malgré ces dissemblances, ces études ont montré qu'au cours de la maturation, les modifications des courants ioniques sont corrélées aux variations de l'expression des canaux ioniques portant ces courants.

Notre objectif a donc été de déterminer l'ensemble des modifications de l'électrogenèse en étudiant l'expression des canaux ioniques cardiaques. Les variations transcriptionnelles de ces canaux sont encore peu connues. C'est pourquoi notre objectif ultime consiste à mieux définir les variations d'expression des canaux ioniques cardiaques d'une part, et des facteurs de transcription d'autre part, au cours du développement du cœur, et à différents stades pré et post-nataux.

Au cours du développement du cœur chez la souris, la durée du potentiel d'action diminue. Cela peut s'expliquer par une augmentation des courants sodiques, calciques et potassiques au cours de la maturation cardiaque. L'augmentation de ces courants est supportée par une augmentation de l'expression des canaux ioniques supportant ces courants. Notre objectif est donc d'établir les profils d'expression de ces canaux, et des facteurs de transcription cardiaques, au cours du développement du cœur.

C. Modifications physiopathologiques de l'activité dont la prévalence augmente avec l'âge : exemple de l'insuffisance cardiaque

L'insuffisance cardiaque se définit comme l'incapacité du cœur à assurer un débit sanguin suffisant aux différents tissus de l'organisme dans les conditions basales ou à l'effort. C'est une maladie évolutive qui dépend de différentes agressions et pathologies pouvant affecter la pompe cardiaque. C'est un syndrome clinique complexe qui résulte d'une dysfonction structurelle ou fonctionnelle et qui entraîne une incapacité du ventricule à se remplir ou à éjecter le sang. L'agression initiale conduisant à l'insuffisance cardiaque est la perte de cellules myocardiques fonctionnelles. Pour compenser cette perte de capacité, des mécanismes hémodynamiques et neuroendocrinologiques entrent en jeu. Ils augmentent la force de contraction du myocarde pour préserver la fonction cardiaque, ce qui aboutit au développement d'une hypertrophie compensatrice. A la suite de lésions cardiaques, les signes d'une insuffisance mettent du temps à se manifester. L'insuffisance n'apparaît en effet que lorsque les mécanismes compensateurs sont dépassés et ne peuvent plus contrebalancer les pertes fonctionnelles du myocarde.

Dans les pays développés, la cause principale de l'insuffisance cardiaque est coronarienne. Cependant, les atteintes myocardiques liées notamment à une cardiomyopathie dilatée ou hypertrophique, et les pathologies valvulaires (principalement aortiques et mitrales) sont également des causes fréquentes. L'insuffisance cardiaque peut également être la conséquence d'une maladie du péricarde, d'une cardiopathie congénitale ou encore d'un trouble du rythme ou de la conduction cardiaque tel que le bloc auriculo-ventriculaire.

Ces différentes étiologies sont à l'origine d'une atteinte : 1) systolique, correspondant à une perte de contractilité d'une partie du muscle cardiaque (infarctus du myocarde ou cardiomyopathie dilatée primitive, par exemple) ; 2) diastolique, et donc secondaire à une altération du remplissage cardiaque (cardiomyopathie hypertrophique, par exemple) ; ou 3) le plus souvent les deux (Jessup & Brozena, 2003 ; McMurray & Pfeffer, 2005) (**Figure 12**).

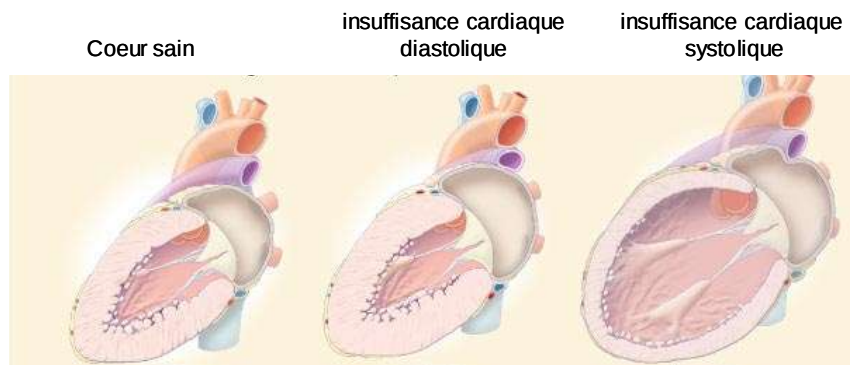


Figure 12 : Deux mécanismes physiopathologiques de l'insuffisance cardiaque : atteinte diastolique et systolique (Jessup & Brozena, 2003).

C.1. Impact de l'âge dans l'insuffisance cardiaque

A cause de son pronostic, l'insuffisance cardiaque est une maladie handicapante, voire létale. Environ 2 % de la population américaine et 1.8 % de la population européenne sont traités pour insuffisance cardiaque (Davies, 2001 ; Lloyd-Jones *et al.*, 2002). Avec le vieillissement de la population le nombre de personnes atteintes d'insuffisance cardiaque augmente de plus en plus. Selon l'étude américaine Cardiovascular Health Study, parmi la population âgée de 66 à 103 ans (n=4842), le taux d'insuffisants cardiaques symptomatiques atteint 19.3 %. Ce taux augmente de 10.6 % pour les personnes ayant entre 65 et 69 ans, à 42.5 % chez les patients de plus de 80 ans (Gottdiener *et al.*, 2000). Environ 80 % des patients qui y sont alors reconnus comme insuffisants ont plus de 65 ans, et 50 % ont plus de 75 ans (Alexander et Peterson, 2005). En France, le nombre d'insuffisants cardiaques est d'environ 500 000, il y a 120 000 nouveaux cas chaque année. L'âge moyen de survenue de l'insuffisance cardiaque est de 73.5 ans: deux tiers des patients ont plus de 70 ans (Delahaye et de Gevigney, 2002)

L'insuffisance cardiaque est actuellement une des causes majeures d'hospitalisation dans les pays occidentaux et représente environ 1 million d'admissions hospitalières chaque année aux Etats-Unis (Alexander et Peterson, 2005). En France, environ 3,5 millions de consultations et 150 000 hospitalisations par an sont réalisées pour insuffisance cardiaque. Plus de 32 000 décès annuels sont en rapport avec une insuffisance cardiaque. Les dépenses liées à l'insuffisance cardiaque représentent plus de 1 % des dépenses médicales totales (Delahaye et de Gevigney, 2002).

Chez les personnes âgées, l'insuffisance cardiaque est plus difficile à diagnostiquer. Les changements concomitants au processus de vieillissement, ne facilitant pas ce diagnostic. En effet, l'insuffisance cardiaque chez les personnes âgées n'est souvent pas

correctement détectée (Doba *et al.*, 1999). Les patients et les médecins attribuent fréquemment (à tort) les symptômes de l'insuffisance à un processus « naturel » de vieillissement. D'ailleurs, l'imagerie cardiaque non invasive ne parvient pas toujours à discriminer une insuffisance cardiaque chez des patients âgés qui ont une fraction d'éjection ventriculaire gauche préservée. Chez ces patients, des dérèglements liés au processus naturel de vieillissement apparaissent. Ces changements regroupent différents symptômes du système cardiovasculaire, comme l'élévation de la pression systolique, de la pression pulsatile (différence entre les pressions artérielles diastolique et systolique), l'augmentation de la masse du ventricule gauche et de fréquentes maladies ischémiques, ainsi que des arythmies cardiaques, plus particulièrement la fibrillation auriculaire. Avec l'âge, la capacité du cœur à répondre à un stress diminue. Les ressemblances les plus marquantes entre les cœurs âgé et insuffisant sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau 2 : Caractéristiques communes au syndrome d'insuffisance cardiaque et au processus physiologique de vieillissement cardiaque.

Disturbance of peripheral pathomechanisms: disturbance of reflex regulation of the circulatory and respiratory systems (ergo-, chemo-, baroreceptors)
Common arrhythmias (atrial fibrillation)
Decreased tolerance of physical exercise (decreased oxygen demand)
Increased catabolism
Deficiency of anabolic hormones
Activation of inflammatory processes and coagulation (increased fibrinogen, factors V, VIII, IX etc.)
Insulin resistance
Nutrition disorders (lack of appetite)
Change of the body composition (decreased muscular mass)

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

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

C.2. Modifications transcriptionnelles des canaux ioniques dans l'insuffisance cardiaque

Tous ces changements du système cardiovasculaire, engendrés par l'insuffisance cardiaque, sont accompagnés d'une modification de l'expression des canaux ioniques (Tomaselli & Marban, 1999 ; Nattel *et al.*, 2007). La caractéristique la plus décrite de ce remodelage ionique est la diminution de l'expression des sous-unités des canaux ioniques générant I_{to} . Cette altération a été montrée dans plusieurs études chez l'Homme (Kaab *et al.*, 1998 ; Borlak & Thum, 2003 ; Zicha *et al.*, 2004) et dans différents modèles animaux (Zicha *et al.*, 2004 ; Akar *et al.*, 2005 ; Rose *et al.*, 2005). Ces équipes ont montré que la diminution de l'expression du transcrit et de la protéine Kv4.3 chez l'Homme, ou Kv4.2 chez l'animal, corrèle avec la diminution du courant I_{to} . L'expression de la sous-unité auxiliaire KChIP2 est soit diminuée (Rose *et al.*, 2005), soit invariante (Zicha *et al.*, 2004 ; Akar *et al.*, 2005) en fonction des études. Par ailleurs, au cours de l'insuffisance cardiaque, l'expression du canal Kir2.1, générant le courant I_{K1} , est diminuée (Borlak & Thum, 2003 ; Rose *et al.*, 2005) ou inchangée (Wang *et al.*, 1998 ; Kaab *et al.*, 1998 ; Akar *et al.*, 2005) chez l'Homme ou dans différents modèles animaux. Enfin, une récente étude a montré que l'expression des canaux HCN2 et HCN4, générant le courant I_f , est augmentée chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque (Stillitano *et al.*, 2008).

C.3. Modifications fonctionnelles des canaux ioniques

C.3.a. L'électrocardiogramme

Plusieurs anomalies électrocardiographiques ont été décrites dans l'insuffisance cardiaque. La plus fréquente est la tachycardie sinusale, illustrée par la diminution de la durée de l'intervalle RR, mécanisme d'adaptation à la réduction du volume d'éjection systolique. Une diminution de la dispersion de l'intervalle RR a été également décrite chez des cas d'insuffisance cardiaque (Tsunakawa *et al.*, 1993). Elle traduit un déséquilibre du système nerveux autonome, en faveur du système sympathique. L'insuffisance cardiaque est également associée à une augmentation de la durée du complexe QRS, traduisant un ralentissement de la conduction intra-ventriculaire (Tomaselli *et al.*, 1994). Par ailleurs, une

augmentation de la dispersion de l'intervalle QT semble être liée à un risque élevé de mort subite dans le cadre de l'insuffisance cardiaque (Barr *et al.*, 1994). La dilatation atriale associée à l'insuffisance cardiaque induit une augmentation de la durée de l'onde P. Enfin, l'ECG peut révéler tous types de troubles du rythme (hyperexcitabilité auriculaire et ventriculaire) et de la conduction (bloc de branche, bloc auriculo-ventriculaire et dysfonction sinusale) particulièrement fréquents dans l'insuffisance cardiaque.

C.3.b. Le potentiel d'action

Il est admis que quelque soit la cause de l'insuffisance cardiaque, la caractéristique commune est l'augmentation de la durée du PA ventriculaire (Beuckelmann *et al.*, 1993) (Figure 13).

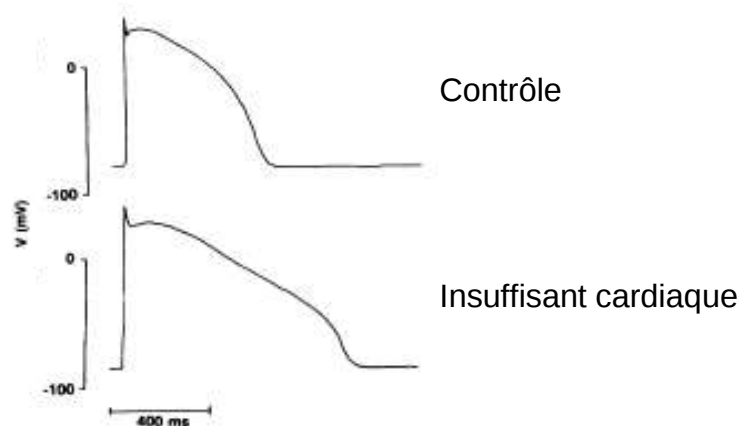


Figure 13 : Enregistrement de PA de cellules ventriculaires de patients non malade et insuffisant cardiaque (Beuckelmann *et al.*, 1993).

Chez l'Homme (Barr *et al.*, 1994 ; Berger *et al.*, 1997), comme dans les modèles animaux (Pak *et al.*, 1997), une hétérogénéité spatiale et temporelle de la durée du PA et de sa période réfractaire a été décrite, ce qui prédispose aux arythmies ventriculaires par réentrée (Pak *et al.*, 1997).

C.3.c. Les courants ioniques

Le résultat le plus caractéristique est la diminution de la densité du courant I_{to} chez l'Homme (Beuckelmann *et al.*, 1993 ; Wettwer *et al.*, 1994 ; Nabauer *et al.*, 1996) et dans différents modèles animaux (Xu & Best, 1991 ; Lue & Boyden, 1992 ; Potreau *et al.*, 1995 ; Kaab *et al.*, 1996 ; Zicha *et al.*, 2004). Les conséquences fonctionnelles de cette diminution

sont difficiles à évaluer puisque le rôle de I_{to} dans la modulation de la durée du PA reste controversé (**Figure 14**).

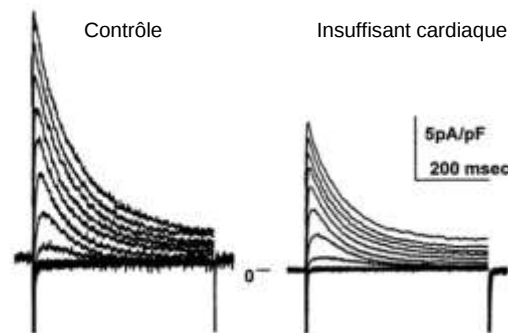


Figure 14 : Courant I_{to} enregistré dans des cellules ventriculaires humaines de patients non malade et insuffisant cardiaque (Kaab *et al.*, 1998).

Chez l'Homme, la densité du courant I_{K1} est également diminuée (Beuckelmann *et al.*, 1993). Du fait de sa participation à la phase terminale de repolarisation, cette réduction pourrait participer à l'allongement de la durée du PA (**Figure 15**).

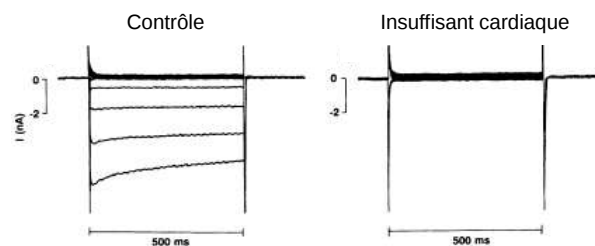


Figure 15 : Courant I_{K1} enregistré dans des cellules ventriculaires de patients non malade et insuffisant cardiaque (Beuckelmann *et al.*, 1993).

L'insuffisance cardiaque s'accompagne d'une augmentation du courant I_f (Cerbai *et al.*, 2001) (**Figure 16**), ce qui, conjointement avec une diminution du courant I_{K1} , pourrait prédisposer les cardiomyocytes ventriculaires à l'automatisme (Hoppe *et al.*, 1998).

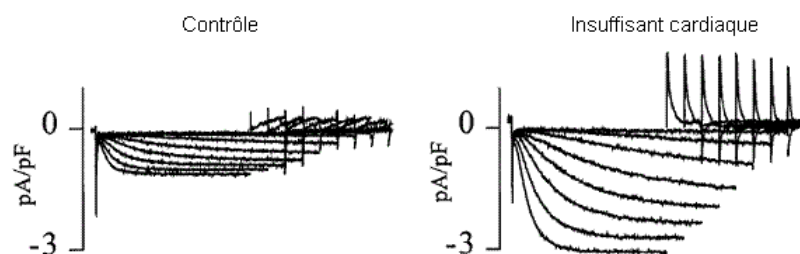


Figure 16 : Courant I_f enregistré dans des cellules ventriculaires de patients non malade et insuffisant cardiaque (Cerbai *et al.*, 2001).

L'insuffisance cardiaque est caractérisée par des anomalies du couplage excitation-contraction : diminution de la force de contraction, prolongation de la relaxation, une

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

De même, selon les études, une diminution du courant $I_{\text{Ca,L}}$ et une diminution du nombre de sites de fixation à la dihydropyridine ont été décrites chez les patients en insuffisance cardiaque (Takahashi *et al.*, 1992 ; Ouadid *et al.*, 1995).

D. Mécanismes des modifications transcriptionnelles des canaux ioniques cardiaques

D.1. Etat des lieux sur les régulations transcriptionnelles des canaux ioniques établies dans le cœur

Le clonage et la caractérisation fonctionnelle des promoteurs des canaux ioniques cardiaques ont débuté il y a environ 5 ans. Il faut noter cependant que la majorité des sites de fixation de facteurs de transcription n'ont pas systématiquement été validés *in vitro* ou *in vivo*.

D.1.a. Le canal sodique cardiaque Nav1.5

Les promoteurs humain et murin du gène *SCN5A*, codant le principal canal sodique cardiaque Nav1.5, ont récemment été clonés et caractérisés (Yang *et al.*, 2004 ; Shang & Dudley, Jr., 2005).

L'étude chez la souris montre que le gène *SCN5A* possède deux régions promotrices avec des départs de transcription distants d'une dizaine de bases (Shang & Dudley, Jr., 2005). Il existe donc plusieurs isoformes dont l'expression varie au cours du développement. Ces deux régions promotrices ont en commun des sites de fixation pour les facteurs de transcription Nkx2.5, GATA, MyoD, NF- κ B, Sp1 et c-Myc. La régulation transcriptionnelle de *SCN5A* par NF- κ B est activée par l'angiotensine II et la production d'H₂O₂ (Shang *et al.*, 2008) et conduit à une inhibition. Ce mécanisme serait mis en jeu dans des pathologies impliquant l'activation du stress oxydatif comme l'insuffisance cardiaque et participerait à la réduction des risques d'arythmies chez les patients traités avec des inhibiteurs de l'enzyme de conversion ou des bloqueurs des récepteurs à l'angiotensine II (McMurray, 2001 ; Eichhorn & Bristow, 2001 ; Lindholm *et al.*, 2003 ; Teo *et al.*, 2004). La régulation de *SCN5A* par Nkx2.5 a été mise en évidence grâce à un modèle de souris KO inducible pour ce facteur de transcription. Une diminution de l'expression de Nkx2.5 conduit à une diminution concomitante de l'expression de *SCN5A* (ARNm et protéine) confinée aux cellules ventriculaires avec des défauts de conduction et n'affecte pas les cellules atriales. Des motifs de fixation de Nkx2.5 sont présents sur le promoteur proximal de *SCN5A*, mais la fixation directe de Nkx2.5 sur ce promoteur reste encore à être démontrée (Briggs *et al.*, 2008). Par ailleurs, les souris qui surexpriment le répresseur de transcription Snail développent des troubles de la conduction et expriment moins le gène *SCN5A* que les souris sauvages. Snail, qui possède des sites de fixation sur le promoteur de *SCN5A*, diminue l'expression de ce gène. A l'inverse, l'expression de sa sous-unité régulatrice *SCN1b* est augmentée (Hesse *et al.*, 2007).

Chez l'Homme, le promoteur basal de l'isoforme majoritaire chez l'adulte du gène *SCN5A* montre une forte conservation de séquence avec celui de la souris et du rat (Yang *et al.*, 2004). Comme chez la souris, ce promoteur basal ne contient pas de boîte TATA, possède plusieurs départs de transcription proches d'une dizaine de bases et plusieurs sites de fixation potentiels pour Sp1 ainsi que pour MyoD et GATA. Par ailleurs, des polymorphismes dans cette région ont été associés à des niveaux d'expression variable de *SCN5A in vitro*, supportant le concept d'une variabilité inter-individuelle de la transcription de Nav1.5 chez l'Homme, en cas de syndrome de Brugada (Yang *et al.*, 2008). Cependant, ces polymorphismes ne touchent pas de sites de fixation jusque là identifiés pour des facteurs de transcription, montrant peut-être les limites des bases de données actuelles. L'expression de Nav1.5 est également modifiée, par des antiarythmiques tels que la mexilétine, son expression est augmentée, et par la concentration du calcium intracellulaire chez le rat et la souris. Plus la concentration de calcium intracellulaire augmente et plus l'expression de *SCN5A* diminue (Herfst *et al.*, 2004). Les mécanismes précis de cette régulation restent inexplorés.

D.1.b. Le canal calcique cardiaque Cav1.2

Dans le cœur, le gène *CACNA1C*, codant le principal canal calcique cardiaque Cav1.2, possède deux promoteurs chez l'Homme et le rat, l'un responsable de l'expression spécifique du canal dans les cardiomyocytes, l'autre de l'expression dans les cellules musculaires lisses (Pang *et al.*, 2003 ; Saada *et al.*, 2005). Lorsque la quantité de canaux calciques fonctionnels est augmentée ou diminuée, dans des conditions physiologiques ou pathologiques, cela entraîne des modifications importantes du couplage excitation-contraction. Jusqu'à présent, des études se sont attachées à discerner les régulations transcriptionnelles de Cav1.2, en se basant soit sur l'étude de son promoteur, soit sur les conséquences d'une dérégulation de ce canal. Le promoteur proximal cardiaque chez le rat ne contient pas de boîte TATA, et possède plusieurs séquences consensus pour la fixation de facteurs de transcription tels que Nkx2.5, MEF2 et MyoD, et pour AP-1, les CREB (*cAMP Response Element Binding proteins*), les STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) et les hormones sexuelles (Liu *et al.*, 2000).

In vitro, l'augmentation de l'activité du promoteur de *CACNA1C* en réponse à une stimulation hormonale au 8-Br_cAMP et à la testostérone montre une implication potentielle des sites de fixation CRE (*cAMP Response Element*) et HRE (*Hormone Response Element*) (Liu *et al.*, 2000). Le site de fixation HRE montre que l'augmentation d'I_{Ca,L} dans des conditions de stimulation par les œstrogènes serait la conséquence d'une augmentation de la transcription de *CACNA1C* (Pham & Rosen, 2002). L'augmentation de la transcription de *CACNA1C*

après stimulation par la phényléphrine ou l'isoprénaline implique les voies de signalisation α - et β -adrénergiques. La régulation de la transcription de Cav1.2 passerait par une régulation positive par AP-1 via l'activation de la Protéine kinase C (Whitmarsh & Davis, 1996 ; Liu *et al.*, 2000). Par ailleurs, il est possible d'augmenter l'expression de Cav1.2 après stimulation par l'angiotensine II via l'activation de CREB dans les cardiomyocytes atriaux chez la souris (Tsai *et al.*, 2007). Dans l'insuffisance cardiaque, il a été montré que la diminution de l'expression de Cav1.2 est la conséquence de l'activation de la voie de signalisation de la petite protéine G Ras (Ho *et al.*, 2001). Toujours dans le but de discriminer les facteurs responsables de la transcription de Cav1.2, une étude a montré récemment que la surexpression de Nkx2.5 ou de GATA-4 diminue l'expression de Cav1.2 dans des cardiomyocytes nouveau-nés de rat (Wang *et al.*, 2007). Jusqu'à présent, aucune fixation directe de facteur de transcription sur le promoteur de *CACNA1C* n'a été démontrée. Concernant les autres canaux calciques, une étude récente a présenté un rôle de Nkx2.5 en tant qu'activateur sur l'expression de Cav3.2 et d'inhibiteur sur celle de Cav1.3, en cas de surexpression de ce facteur (Wang *et al.*, 2007).

D.1.c. Les canaux potassiques cardiaques

Dans la famille des canaux potassiques, les promoteurs les plus étudiés concernent les gènes des canaux Kv4.2, Kv4.3 et KCHIP2, responsables de la génération du courant $I_{to,f}$. La région promotrice de *KCND3* (Kv4.3) chez le rat possède deux départs de transcription distincts séparés par une dizaine de nucléotides et correspondant à l'initiation de la transcription des isoformes cardiaque et neuronale. Cette région promotrice contient des sites de fixation putatifs pour AP-1, NF- κ B et les GATA (Zhang *et al.*, 2001a). La transcription de l'isoforme cardiaque est diminuée par une stimulation α -adrénergique à la phényléphrine (inducteur d'hypertrophie) qui impliquerait les AP1 (Whitmarsh & Davis, 1996 ; Zhang *et al.*, 2001a). Chez la souris, la région promotrice de *KCND3* contient plusieurs sites consensus pour la fixation des NFAT (Rossow *et al.*, 2004). Lors d'un infarctus du myocarde, l'activation de la voie de signalisation β -adrénergique/calciurine/NFATc3 induit la diminution de l'expression de Kv4.3 (Rossow *et al.*, 2004). Chez le chien, la diminution de l'activité de CREB, en cas d'activation des voies de signalisation à l'angiotensine II et calcique, lors du processus de mémoire cardiaque à court terme, induit une diminution de l'expression de Kv4.3 (Patberg *et al.*, 2003).

Les facteurs de transcription GATA-4, -6 et FOG2 régulent physiologiquement la transcription de *KCND2* (Kv4.2) dans les cardiomyocytes de rat (Jia & Takimoto, 2003). La surexpression de GATA-4 induit une augmentation plus importante de la transcription de Kv4.2 par rapport à la surexpression de GATA-6, alors que celle de FOG2 diminue la

transcription Kv4.2 en inhibant la fixation des GATA. Si ces résultats sont en accord avec l'augmentation de l'expression de GATA-4 et -6 associée à l'augmentation de l'expression de Kv4.2 au cours du développement, ils sont cependant en contradiction avec l'activation des GATA lors de l'hypertrophie. Ces données suggèrent l'existence d'autre(s) mécanisme(s) plus direct(s) pour la diminution physiopathologique de l'expression de Kv4.2 au cours de l'hypertrophie cardiaque, sans les connaître pour le moment (Liang *et al.*, 2001 ; Jia & Takimoto, 2003).

Au niveau physiologique, NFATc3 régulerait l'expression de Kv4.2 selon le même mécanisme que pour Kv4.3 chez la souris (Rossow *et al.*, 2004). L'établissement du gradient transmural de l'expression de Kv4.2 chez la souris serait aussi dépendant de l'activité de cette voie de signalisation calcineurine/NFATc3. Son activité est en effet plus importante dans l'endocarde que dans l'épicarde. La transcription de Kv4.2 serait alors réprimée dans l'endocarde ainsi que celle de Kv4.3 et KChIP2 (Rossow *et al.*, 2006), ceci, sous l'effet d'une stimulation β -adrénergique restreinte à l'épicarde (Rossow *et al.*, 2009). Une étude récente contredit ces résultats en montrant que l'activation de la voie calcineurine/NFAT active la transcription de Kv4.2, ceci lorsque la calcineurine est surexprimée, phénomène compensateur de l'hypertrophie (Gong *et al.*, 2006). Cela indique un rôle de modulateur précis qu'aurait la calcineurine, dépendant d'un contexte physiologique ou physiopathologique (ici, l'hypertrophie).

Le facteur de transcription Irx5, en concertation avec le facteur mBOP, a également été identifié comme responsable du gradient d'expression de Kv4.2 à travers la paroi ventriculaire chez la souris (Costantini *et al.*, 2005). Irx5 a un gradient d'expression transmural inverse de celui de Kv4.2 au sein de la paroi ventriculaire et inhibe sa transcription dans les cellules cardiaques (il active sa transcription dans les fibroblastes). Récemment, Irx4, qui n'a pas de gradient d'expression dans la paroi ventriculaire, a été identifié comme modulateur négatif d'Irx5. La régulation de l'expression de Kv4.2 est alors finement régulée suivant le ratio Irx4-Irx5 (He *et al.*, 2009).

Finalement, l'expression de Kv4.2, et plus précisément son gradient d'expression entre épicarde et endocarde, serait la conjonction de régulations croisées entre plusieurs facteurs de transcription tels que NFATc3, Irx4 et Irx5.

Le gène *KCNIP2*, codant la sous-unité régulatrice KChIP2, a trois promoteurs distincts chez l'Homme et deux chez la souris (Pruunsild & Timmusk, 2005). Au moins une de ces isoformes est exprimée dans le cœur. Chez le rat, l'expression de KChIP2 est contrôlée par deux voies issues de la signalisation des MAPK. Une première voie implique l'activation des JNK, induisant une réduction de l'expression de KChIP2 via une stimulation α -adrénergique. La seconde voie MEK-ERK intervient pour l'expression physiologique de *KCNIP2*, mais également lors d'une hypertrophie cardiaque. Cette voie induit alors une

diminution de l'expression de KCNIP2 par l'activation de la PKC (Jia & Takimoto, 2006). Chez le chien, CREB inhiberait la transcription de KChIP2 au cours du phénomène de mémoire cardiaque, comme cela a été également montré pour le gène codant Kv4.3 (Patberg *et al.*, 2005).

Pour le gène *KCNA4*, codant le canal Kv1.4 responsable de $I_{to,s}$, seul le promoteur basal chez la souris a été cloné et caractérisé (Wymore *et al.*, 1996). Cette étude a montré l'absence de boîte TATA et la présence de sites de fixation pour Sp1 et MyoD. Pour le moment, aucune étude ne vient valider la régulation directe ou indirecte du gène par ces facteurs.

Le promoteur de *KCNA5*, codant le canal Kv1.5 générant le courant I_{Kur} (ou I_{Kslow1}), a été cloné chez le rat (Mori *et al.*, 1993). Ce promoteur est dépourvu de boîte TATA, possède plusieurs sites de dépôts de transcription distants de quelques dizaines de nucléotides, et un site consensus CRE. L'AMPc régule l'expression physiologique de Kv1.5 de manière tissu-spécifique et notamment augmente l'expression de Kv1.5 dans les cardiomyocytes (Mori *et al.*, 1993). La même équipe a détaillé cette régulation. Elle passerait par l'activation de CREB. De plus, cette région promotrice contient un élément répresseur ou KRE (*Kv1.5 Repressor Element*) qui inhibe par défaut la transcription du gène (Mori *et al.*, 1995). Une protéine nommée KBF (*KRE Binding Protein*) se fixe sur cet élément répresseur pour lever la répression et jouerait un rôle activateur de l'expression spécifique de Kv1.5 dans le cœur (Valverde & Koren, 1999). Par ailleurs, le promoteur murin de *KCNA5* contient des sites de fixation pour le facteur de transcription Sp1. Sous conditions physiopathologiques, l'inhibition de l'activité de Sp1 lors du stress oxydatif induit une diminution de la transcription de Kv1.5 dans les cellules musculaires lisses (Fountain *et al.*, 2007). Enfin, chez la souris, sous stimulation β -adrénergique, l'activation de la voie de signalisation calcineurine/NFATc3 diminue l'expression de Kv1.5 dans le cœur (Rossow *et al.*, 2004), diminuant ainsi le courant I_{Kur} et pouvant induire des arythmies.

Deux promoteurs ont été identifiés pour le gène *KCNB1* (codant Kv2.1 ; I_{Kslow2}). Ces régions promotrices ont des séquences très conservées entre l'Homme, le rat et la souris. Dans le cœur, un seul promoteur semble être actif. On y retrouve des sites de fixation pour Sp1 et E2F, qui auront donc un rôle de régulateur potentiel sur la transcription du canal (Roder & Koren, 2006). Chez la souris et le rat, deux études montrent que la transcription de Kv2.1 est régulée par NFATc3 durant un processus pro-hypertrophique (Rossow *et al.*, 2004 ; Amberg *et al.*, 2004).

Récemment, deux dépôts de transcription ont été identifiés dans la région promotrice de *KCNQ1*, codant le canal KvLQT1 (Luo *et al.*, 2007 ; Luo *et al.*, 2008). Cette région régulatrice ne possède pas de boîte TATA et contient plusieurs sites de fixation potentiels pour MyoD, GATA-1, SRF, Hand2 et Sp1. Le facteur de transcription Sp1 serait donc un

activateur de la transcription de KvLQT1 et participerait à son expression hétérogène dans le cœur humain. Son expression est supérieure dans l'oreillette droite par rapport à la gauche et dans le ventricule droit par rapport au gauche. Selon une organisation et une composition des séquences régulatrices similaires à *KCNQ1*, les deux isoformes du gène *HERG1*, codant le canal Herg générant le courant I_{Kr} , seraient aussi régulées par le facteur de transcription Sp1 (Luo *et al.*, 2008). Le fait de cette similarité de séquences entre *KCNQ1* et *HERG1* implique que ceux-ci pourraient être régulés de la même façon. Il est concevable que la régulation des canaux se fasse en concordance, et que cette régulation de réseaux de canaux augmente l'impact de la réponse physiologique ou physiopathologique. Au début des années 1990, les promoteurs putatifs du rat et de la souris de *Kcne1* (Mink) ont été séquencés sans pour autant être caractérisés (Iwai *et al.*, 1990 ; Lesage *et al.*, 1992). Plus récemment, plusieurs équipes ont cloné et caractérisé les promoteurs alternatifs des isoformes spécifiques cardiaques de *KCNE1* chez l'Homme (Lundquist *et al.*, 2006 ; Mustapha *et al.*, 2007 ; Luo *et al.*, 2007). Ces promoteurs ne possèdent pas de boîte TATA et contiennent des sites de fixation pour MyoD, SRF, Sp1 et les GATA. Il existe une régulation positive de GATA sur la transcription de Mink en cas de stimulation par l'angiotensine II, lorsque les sites de fixation aux GATA sont accessibles. C'est le cas chez l'Homme qui possède plus de sites de fixation de GATA que la souris sur le promoteur de *KCNE1* (Mustapha *et al.*, 2007). Par ailleurs, la surexpression de Sp1 augmente l'expression de Mink et contrôlerait en partie son expression hétérogène dans le cœur humain (Luo *et al.*, 2007).

L'étude du promoteur minimal de *KCNJ2* (Kir2.1 ; I_{K1}) ne montre pas de présence de boîte TATA ou d'autres éléments initiateurs de la transcription (Redell & Tempel, 1998). Sa transcription est régulée par une activité combinée de facteur activateur Sp1, et des facteurs répresseurs Sp3 et NF-Y qui ont la capacité de se fixer directement sur le promoteur.

La capacité d'adaptation de la fonction cellulaire et du métabolisme énergétique à des contraintes physiologiques ou pathologique est vitale. En augmentant l'expression des canaux K_{ATP} , les facteurs de transcription FoxO1, -O3, and -F2 permettent d'améliorer la sensibilité des cellules à leur environnement. Les expressions des canaux ioniques Kir6.1 et Kir6.2, ainsi que celle de leurs sous-unités régulatrices SUR1 et SUR2, seraient contrôlées par ces différents membres de la famille des facteurs de transcription Fox. Ces facteurs de transcription contribueraient à l'hétérogénéité d'expression de ces sous-unités dans le cœur murin principalement autour de la zone péri-infarctée (Philip-Couderc *et al.*, 2008).

D.2. Facteurs de transcription jouant un rôle dans la maturation cardiaque

Les événements morphologiques et les remodelages tissulaires complexes qui surviennent pendant la formation du cœur sont accompagnés par des changements de l'expression de gènes initiés par de nombreux facteurs de transcription (**Figure 17**) (Bruneau, 2002 ; Moorman & Christoffels, 2003 ; Nemer, 2008). Ces facteurs de transcription peuvent réguler l'expression d'autres gènes de façon tissu-spécifique et quantitative. Ce sont les régulateurs principaux du développement embryonnaire et de nombreux facteurs de transcription qui régulent spécifiquement les gènes cardiaques ont déjà été décrits. Depuis quelques années, les récentes découvertes de mutations dominantes de facteurs de transcription conduisant à des anomalies cardiaques congénitales apportent une nouvelle impulsion à l'étude de ces facteurs lors du développement du cœur (Bruneau, 2002).

Les mutations humaines touchant des facteurs de transcription, ainsi que l'étude de leur expression au cours du développement et leur invalidation par transgénèse (**Tableau 3**) ont permis d'éclairer nos connaissances sur leur rôle dans le développement des différents compartiments cardiaques (Bruneau, 2002 ; Moorman & Christoffels, 2003 ; Nemer, 2008).

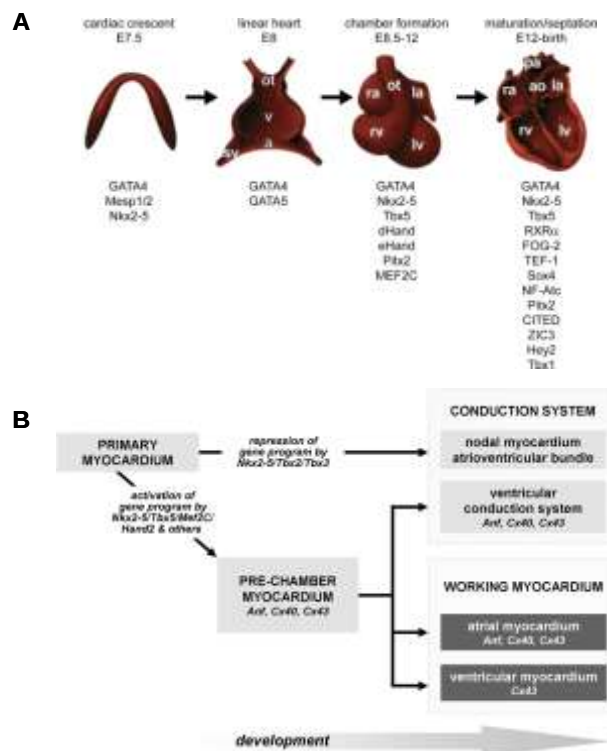


Figure 17 : Représentations schématiques du développement cardiaque. **(A)** Stades majeurs du développement cardiaque et facteurs de transcription impliqués. Les jours embryonnaires correspondent à l'embryogenèse chez la souris (Bruneau, 2002). **(B)** Formation et maintien des programmes d'expression de gènes en fonction des compartiments cardiaques (Moorman & Christoffels, 2003).

Tableau 3 : Mutations ou délétions de facteurs de transcription et anomalies du développement cardiaque chez la souris (Nemer, 2008)

Facteur de transcription	Phénotype	Référence
GATA-4	Cardia bifida	(Molkentin <i>et al.</i> , 1997)
Nkx2.5	Défauts de différenciation et de septation	(Lyons <i>et al.</i> , 1995)
MEF2C	Hypoplasie du ventricule droit et défauts de septation	(Lin <i>et al.</i> , 1997)
Tbx1	Défauts de septation	(Merscher <i>et al.</i> , 2001)
Tbx5	Hypoplasie atriale et défauts de septation	(Bruneau <i>et al.</i> , 2001b)
Hand2	Hypoplasie du ventricule droit	(Srivastava <i>et al.</i> , 1997)
Hey2	Défaut de septation ventriculaire et de formation des valves atrio-ventriculaires	(Sakata <i>et al.</i> , 2006)
Irx4	Cardiomyopathie post-natale	(Bruneau <i>et al.</i> , 2001a)

Parmi les 6 membres de la famille des facteurs de transcription GATA, GATA-4, -5 et -6 prédominent dans le cœur, où ils sont impliqués dans le développement et la spécialisation des compartiments (Molkentin, 2000 ; Peterkin *et al.*, 2005). Chez les mammifères, GATA-4 est le plus fortement exprimé. Il participe à l'établissement du programme cardiomyogénique des cellules du croissant cardiaque, à leur migration et à la formation du tube cardiaque, comme le démontre le développement de deux cœurs bilatéraux (*cardia bifida*) chez la souris GATA-4^{-/-} (Molkentin *et al.*, 1997 ; Harvey, 2002). GATA-4 est aussi impliqué dans les phases plus tardives du développement telles que la formation des valves et la septation (Peterkin *et al.*, 2005). Chez l'Homme, des mutations de GATA-4 sont associées à des malformations cardiaques et notamment à la Tétralogie de Fallot (Clark *et al.*, 2006 ; Nemer *et al.*, 2006). Le facteur de transcription GATA-5 participe à la formation de l'endocarde et GATA-6 au maintien de la spécificité myocardique chez les mammifères (Molkentin, 2000 ; Peterkin *et al.*, 2005). Ces facteurs de transcription peuvent agir en synergie avec un ou plusieurs autres facteurs de transcription ou cofacteurs tels que : Nkx2.5, SRF, MEF2, des membres des familles Tbx et NF-AT, les facteurs de transcription ubiquitaires p300 et YY1, et les cofacteurs FOG (*Friend of GATA-1*) (Peterkin *et al.*, 2005).

Le gène Nkx2.5 appartient à la famille des facteurs de transcription à homéoboîte (Harvey, 1996). Chez les vertébrés, il est exprimé précocement dans les cellules du croissant cardiaque, du tube linéaire et du deuxième champ cardiaque. Les embryons Nkx2.5^{-/-} forment un tube cardiaque mais la courbure et le développement du cœur sont bloqués. Les embryons meurent *in utero* (Lyons *et al.*, 1995). Chez l'Homme, des mutations sur le gène Nkx2.5 ont été identifiées chez des patients ayant des malformations cardiaques telles que des défauts de septation des oreillettes et des ventricules ainsi que des anomalies du système de conduction (Schott *et al.*, 1998). L'analyse des souris hétérozygotes Nkx2.5^{+/-}

a révélé des malformations du septum inter-atrial ainsi que des défauts de conduction avec une hypoplasie du NAV et du réseau des fibres de Purkinje (Biben *et al.*, 2000 ; Jay *et al.*, 2004 ; Pashmforoush *et al.*, 2004 ; Meysen *et al.*, 2007). Par ailleurs, l'analyse des souris Nkx2.5^{-/-} conditionnelles montre que ce facteur de transcription est aussi impliqué dans la régulation de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la conduction et la contraction (Briggs *et al.*, 2008). Du fait de son expression homogène dans le cœur, son rôle dans la régionalisation passe par des actions synergiques avec d'autres facteurs de transcription. Par exemple, dans le myocarde contractile et le système de conduction, Nkx2.5 agirait comme un co-activateur des GATA, de Tbx5 ou de Tbx3 en fonction du contexte (Peterkin *et al.*, 2005 ; Bakker *et al.*, 2008). Nkx2.5 est donc requis pour plusieurs aspects du développement cardiaque, des étapes précoces du développement au maintien du système de conduction pendant la vie adulte.

Les membres de la famille des facteurs de transcription MEF2 (*Myocyte enhancer factor 2*) contenant une boîte MAD (*MCM1, agamous, deficiens, and SRF*) se fixent sur les promoteurs de la majorité des gènes exprimés dans le muscle squelettique et cardiaque (Akazawa & Komuro, 2003). Parmi ces membres, MEF2C est exprimé précocement dans les cellules du croissant cardiaque et est un régulateur essentiel du programme cardiomyogénique (Bruneau, 2002). Chez les souris invalidées pour MEF2C, le développement du cœur s'arrête au stade de la courbure du tube cardiaque et le ventricule droit ne se développe pas, aboutissant à la mort *in utero* des embryons (Lin *et al.*, 1997). L'absence de ventricule droit corrèle avec la diminution de l'expression du facteur de transcription Hand2, impliqué dans la formation du ventricule droit, suggérant une action synergique de ces deux protéines (Moorman & Christoffels, 2003).

Les membres de la famille des facteurs de transcription à boîte T (Tbx) sont des régulateurs importants de la morphogenèse cardiaque. La délétion et des mutations de Tbx1 sont associées à un tronc artériel commun, un ventricule droit à double issue, une interruption de l'arc aortique, retrouvés chez les patients atteints du syndrome de DiGeorge (Lindsay *et al.*, 2001 ; Lindsay, 2001 ; Yagi *et al.*, 2003). Le rôle de Tbx1 dans la formation des arcs pharyngés et dans celle de la voie efférente du myocarde ainsi que dans la septation ventriculaire a été confirmé par transgénèse chez la souris (Merscher *et al.*, 2001 ; Jerome & Papaioannou, 2001 ; Vitelli *et al.*, 2002). Les répresseurs Tbx2 et Tbx3 sont impliqués dans le développement et le maintien du nœud sinusal et du système de conduction atrio-ventriculaire (Habets *et al.*, 2002 ; Harrelson *et al.*, 2004 ; Hoogaars *et al.*, 2007b ; Bakker *et al.*, 2008). Leurs expressions sont localisées au niveau de ces structures et leurs modes d'action passeraient par une répression du programme contractile des cardiomyocytes en association avec Nkx2.5 (Mommersteeg *et al.*, 2007 ; Hoogaars *et al.*, 2007a). Cependant, les mutations humaines dans le gène codant pour Tbx3 ne produisent

pas ou peu d'anomalies de la conduction, suggérant un effet compensateur par d'autres membres de la famille (Bamshad *et al.*, 1997 ; Meneghini *et al.*, 2006 ; Yutzey, 2008). Tbx5 est essentiel à la formation des oreillettes et du ventricule gauche. L'expression de Tbx5 initialement réparti selon un gradient postéro-antérieur dans le tube cardiaque, se restreint après la moitié de la gestation aux oreillettes et au ventricule gauche (Bruneau *et al.*, 1999 ; Liberatore *et al.*, 2000). Puis, elle diminue dans le ventricule gauche durant les stades postérieurs du développement pour aboutir à une faible expression au stade adulte (Bruneau, 2002). Les souris invalidées pour ce facteur de transcription ont un défaut de septation et une hypoplasie des oreillettes et du ventricule gauche (Bruneau *et al.*, 2001b). De façon intéressante, la souris invalidée à l'état hétérozygote reproduit le phénotype du syndrome d'Holt-Oram dont souffrent les patients porteurs de mutations autosomales dominantes dans le gène codant pour Tbx5, avec notamment des communications inter-auriculaire et inter-ventriculaire (Bruneau *et al.*, 2001b). L'étude des mutations humaines et des modèles murins transgéniques a mis en évidence que Tbx5 jouaient aussi un rôle important dans la formation de la partie supérieure du système de conduction atrio-ventriculaire (Bruneau *et al.*, 2001b ; Moskowitz *et al.*, 2007). Globalement, la compétition entre les répresseurs de la transcription Tbx2 et Tbx3 et l'activateur Tbx5 dans l'interaction avec Nkx2.5 serait à la base de la formation des chambres cardiaques, du processus de ballonnement et de la formation des structures de l'automatisme et de la conduction cardiaque (Bruneau, 2002 ; Stennard & Harvey, 2005 ; Yutzey, 2008). Par ailleurs, d'autres facteurs de transcription Tbx, tels que Tbx18 et Tbx20, sont aussi impliqués dans la maturation des lignées myogéniques, leur prolifération et la morphogénèse cardiaque (Stennard & Harvey, 2005).

Certains facteurs de transcription sont responsables de la bilatéralité droite/gauche du cœur. Par exemple, les facteurs de transcription à domaine hélice-boucle-hélice, Hand1 (eHand) et Hand2 (ou dHand), interviennent dans la spécialisation du ventricule gauche et du ventricule droit, respectivement (Yamagishi *et al.*, 2001 ; Bruneau, 2002). L'invalidation de Hand2 chez la souris induit une mortalité embryonnaire au stade de la courbure du tube cardiaque et une absence du segment destiné à former le futur ventricule droit (Srivastava *et al.*, 1997). Au niveau des oreillettes, le facteur de transcription Pitx2, préférentiellement exprimé dans l'oreillette gauche, régule l'asymétrie droite/gauche en contrôlant l'identité de l'oreillette gauche (Tessari *et al.*, 2008). Ce résultat est particulièrement intéressant dans la mesure où des variations de séquences proche du locus de PITX2 ont été montrées chez des patients atteints de fibrillation et de flutter atriaux (Gudbjartsson *et al.*, 2007).

Hey2 est un facteur de transcription spécifique des ventricules appartenant à la famille *Hairy* des facteurs de transcription à domaine hélice-boucle-hélice (Leimeister *et al.*, 1999). L'invalidation de Hey2 chez la souris provoque des phénotypes différents selon la souche

utilisée (Sakata *et al.*, 2006). Ces modèles suggèrent que Hey2 serait impliqué dans la septation ventriculaire, dans la formation des valves atrio-ventriculaires ainsi que dans la maturation des ventricules. L'expression préférentielle de Hey2 dans le ventricule permettrait de réprimer l'expression des gènes atriaux en faveur des gènes ventriculaires (Koibuchi & Chin, 2007).

L'expression du facteur de transcription Iroquois *Irx4* est restreinte au myocarde ventriculaire à tous les stades du développement ainsi que chez l'adulte (Bao *et al.*, 1999 ; Bruneau *et al.*, 2000). Son expression est réduite chez les souris invalidées pour *Nkx2.5* et *Hand2* dont la différenciation ventriculaire est compromise (Bruneau *et al.*, 2000). Ces résultats montrent que *Irx4* joue un rôle dans la spécificité ventriculaire et que ce rôle met en jeux *Nkx2.5* et *Hand2* (Bruneau *et al.*, 2000). Cependant, *Irx4* ne paraît pas être un régulateur central de la spécificité ventriculaire comme le démontre les souris *Irx4*^{-/-} qui n'ont qu'un défaut partiel de l'expression des gènes ventriculaires après la naissance (Bruneau *et al.*, 2001a). L'expression ventriculaire d'autres facteurs de transcription de la famille *Irx* (*Irx3* et *Irx5*) au cours du développement, suggère la possibilité d'un effet compensateur (Christoffels *et al.*, 2000).

En ce qui concerne la transcription des canaux ioniques au cours de la maturation, un seul exemple a pour l'instant été validé biologiquement, seule l'expression du gène *HCN4* a été étudiée. Dans des cœurs de rat invalidés pour le facteur de transcription NRSF (neuron-restrictive silencer factor), l'expression du gène *HCN4* augmente au cours du développement embryonnaire. Mieux, l'activité du promoteur de *HCN4* est augmentée au cours du développement embryonnaire en présence du NRSE (neuron-restrictive silencer element), site de fixation validée de NRSF sur ce promoteur (Kuratomi *et al.*, 2007). Cette action de NRSF pourrait se faire en coordination avec les HDAC de classe II (histone deacetylase) via la CaM Kinase (Calcium/calmoduline Kinase) (Nakagawa *et al.*, 2006).

D.3. Facteurs de transcription jouant un rôle dans l'insuffisance cardiaque

Les cardiomyocytes différenciés perdent leur capacité à proliférer peu de temps après la naissance. De nombreuses situations pathologiques (hypertension, pathologies valvulaires, infarctus du myocarde, cardiomyopathie ou bloc auriculo-ventriculaire) induisent une surcharge de travail au myocarde qui provoque en réponse une augmentation de la taille des cardiomyocytes, pouvant conduire à une insuffisance cardiaque. Cette hypertrophie cellulaire est accompagnée par une augmentation de la synthèse protéique et une réexpression des gènes fœtaux (Sadoshima & Izumo, 1997 ; Akazawa & Komuro, 2003 ;

Heineke & Molkentin, 2006). L'activation du programme des gènes fœtaux permet la synthèse coordonnée des protéines nécessaires à l'accroissement de la taille des myocytes et un meilleur ajustement des besoins en énergie de ces cellules. Des comparaisons de profils d'expression de gènes entre des cœurs normaux adultes, insuffisants, ou fœtaux ont montré une forte similarité des profils des cœurs fœtaux et insuffisants (Thum *et al.*, 2007). Ces changements de phénotype cellulaire sont précédés et accompagnés de la mise en jeu de nombreuses voies de signalisation dont la voie Ca^{2+} /calcineurine/NFAT (*Ca²⁺/calcineurine/nuclear factor of activated T-cell*), la voie PI3K/Akt/GSK-3 (*phosphoinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase-3*), la cascade des MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) et les protéines G couplées aux récepteurs à sept domaines transmembranaires (Frey & Olson, 2003 ; Heineke & Molkentin, 2006). Ces voies de signalisation impliquent pour la plupart le Ca^{2+} intracellulaire (Schaub *et al.*, 2006) et régulent l'activité de nombreux facteurs de transcription mais aussi le remodelage de la chromatine via les HDAC (Histone Desacétylase) (**Figure 18**).

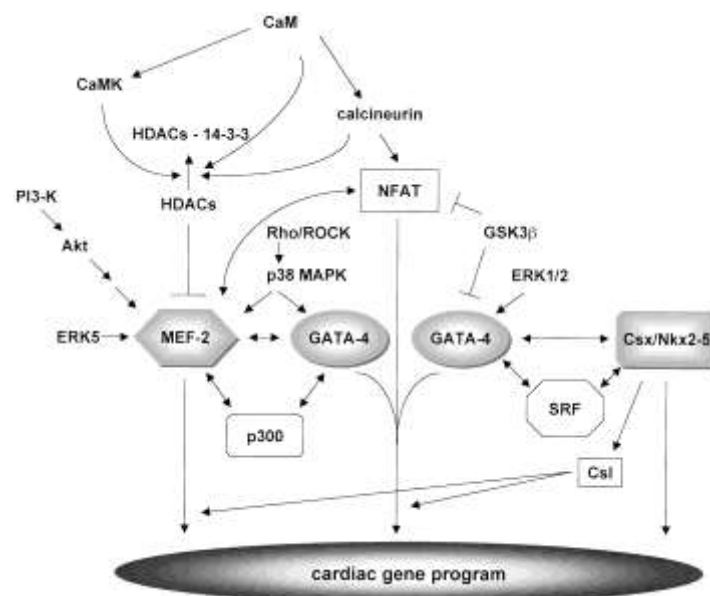


Figure 18 : Voies de signalisation et facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression des gènes lors de l'hypertrophie cardiaque. (Akazawa & Komuro, 2003)

Parmi les facteurs de transcription impliqués dans l'hypertrophie, GATA-4, MEF2, Hand1 et Hand2 ou bien encore Nkx2.5, ont précédemment été décrits comme jouant un rôle important dans l'embryogenèse cardiaque.

L'un des facteurs de transcription les mieux caractérisés dans cette pathologie est GATA-4. L'activation de GATA-4 en réponse à des stimuli hypertrophiques provoque l'expression d'un large spectre de gènes impliqués directement ou indirectement dans le développement de la pathologie tels que l'ANP (*atrial natriuretic peptide*), le BNP (*brain*

natriuretic peptide), l' α -MHC (α -myosin heavy chain), la β -MHC (β -myosin heavy chain) ou les troponines de type C ou I, par exemple (Liang & Molkentin, 2002 ; Akazawa & Komuro, 2003). La surexpression de GATA-4 dans le cœur produit une hypertrophie (Liang *et al.*, 2001), alors que sa délétion tissu-spécifique diminue le développement de l'hypertrophie ventriculaire suite à une surcharge de pression ou à l'entraînement physique (Oka *et al.*, 2006). De plus, GATA-4 est au centre de plusieurs voies de signalisation pro-hypertrophiques (**Figure 18**) (Akazawa & Komuro, 2003). Ces résultats suggèrent que GATA-4 est un acteur clef dans la génération de l'hypertrophie cardiaque.

Des membres de la famille des facteurs de transcription MEF2 sont aussi impliqués dans l'hypertrophie cardiaque (Czubryt & Olson, 2004). La surexpression de MEF2A ou de MEF2C dans le cœur provoque une cardiomyopathie dilatée et une augmentation du développement de l'hypertrophie suite à une surcharge de pression (Xu *et al.*, 2006). L'inactivation conditionnelle de MEF2D empêche le développement d'une hypertrophie suite à une stimulation β -adrénergique chronique ou à une surcharge de pression, alors que la sur-expression de ce facteur de transcription induit un remodelage cardiaque pathologique et une réactivation du programme d'expression de gènes fœtaux (Kim *et al.*, 2008). De plus, les MEF2 régulent l'expression de gènes inductibles lors de l'hypertrophie cellulaire (Akazawa & Komuro, 2003). Par ailleurs, ce sont des effecteurs importants de la signalisation calcique (Mellstrom *et al.*, 2008) (**Figure 18**). Enfin, les MEF2 peuvent agir en synergie avec les GATA, et notamment GATA-4 (Peterkin *et al.*, 2005).

Le facteur de transcription Nkx2.5 est surexprimé en réponse à des stimuli hypertrophiques (Thompson *et al.*, 1998 ; Saadane *et al.*, 1999). Cependant, des études ont montré que son activation constitutive n'est pas suffisante pour induire l'hypertrophie cardiaque. Son implication dans l'hypertrophie cardiaque passerait par ses interactions avec d'autres facteurs de transcription impliqués dans la pathologie tels que GATA-4 ou SRF (Akazawa & Komuro, 2003).

D'autres facteurs de transcription sont impliqués dans le développement de l'hypertrophie cardiaque. L'expression de Hand1 et/ou Hand2 est diminuée chez des patients atteints de cardiomyopathies, ainsi que dans des modèles animaux d'hypertrophie ventriculaires (Natarajan *et al.*, 2001 ; Thattaliyath *et al.*, 2002 ; Akazawa & Komuro, 2003), suggérant le rôle de ces facteurs de transcription dans l'inhibition de l'hypertrophie cellulaire. Cependant, les gènes régulés par Hand1 et Hand2 dans le cœur adulte sont encore peu connus. Le facteur de transcription à boîte MAD SRF (*Serum Response Factor*) régule l'expression de nombreux gènes cardiaques (Akazawa & Komuro, 2003). Sa surexpression provoque une hypertrophie (Zhang *et al.*, 2001b) et sa délétion spécifiquement dans le cœur chez la souris adulte induit une cardiomyopathie dilatée associée à des défauts de l'expression des gènes de structures cardiaques (Parlakian *et al.*, 2005). Des facteurs de

transcription de la famille NFAT (*Nuclear factor of activated T-cells*) ont été montrés comme nécessaires et suffisants pour induire l'hypertrophie cardiaque (Heineke & Molkentin, 2006). Par exemple, la délétion de NFATc3 diminue l'hypertrophie cardiaque induite par une surcharge de pression ou une stimulation à l'angiotensine II chez la souris (Wilkins *et al.*, 2002). Enfin, l'importance du facteur de transcription *nuclear factor* (NF)- κ B comme médiateur de hypertrophie dans le cœur adulte a été montré grâce à deux modèles de souris transgéniques (Kawano *et al.*, 2005 ; Freund *et al.*, 2005). La délétion de la sous-unité p50 de NF- κ B induit une réduction de l'hypertrophie cardiaque lors d'une stimulation chronique à l'angiotensine II (Kawano *et al.*, 2005). Les souris transgéniques exprimant un "super-répresseur" de NF- κ B montrent une atténuation de l'hypertrophie sous stimulation à l'angiotensine II ou à l'isoprénaline (Freund *et al.*, 2005).

La seule réponse connue du myocarde aux surcharges d'origine mécanique (dues à l'hypertension artérielle ou à un infarctus) était jusqu'ici l'hypertrophie. Celle-ci adapte le cœur aux nouvelles conditions de charge, à la fois en multipliant le nombre d'unités contractiles et en normalisant la tension pariétale. La mise en évidence de changements qualitatifs dans l'expression génétique du myocarde a constitué une grande première, puisqu'elle a permis d'expliquer, en termes moléculaires, le processus par lequel ce muscle adapte son économie aux nouvelles conditions de charge (Swynghedauw, 2006). Dans les situations telles que l'hypertension ou l'infarctus du myocarde, le cœur répond à une augmentation de post-charge par des processus de remodelage. Ces processus sont complexes, dynamiques, tributaires du temps et après une période d'adaptation, aboutissent finalement à une insuffisance cardiaque. Ils conduisent à des changements morphologiques comprenant une hypertrophie des cardiomyocytes, et à un dépôt de matrice extracellulaire menant à la fibrose. Cependant les mécanismes qui entraînent l'hypertrophie et la progression vers l'insuffisance cardiaque sont encore mal connus. De nombreux facteurs déclenchant le remodelage ont été identifiés (étirement, hormones, peptides vaso-actifs, inflammation, ischémie) mais il est difficile de différencier les réponses adaptatives des réponses délétères. Un nombre important de voies de signalisation incluant les MAP kinases, la protéine kinase C et la calcineurine conduisent à une altération de l'expression des gènes et sont responsables de la réponse hypertrophique du cœur. Dans les cardiomyocytes, le remodelage est caractérisé par une prolongation et une altération de la transition calcique suggérant que le myocyte altéré pourrait être un substrat d'arythmie. Cette hypertrophie s'accompagne d'une nouvelle programmation génétique caractérisée par l'expression de novo de plusieurs gènes fœtaux (Monceau *et al.*, 2006). Notre démarche consiste à étudier à la fois l'expression des canaux et des facteurs de transcription dans ces deux modèles : l'insuffisance et le développement cardiaque.

MATERIEL ET METHODES

Par une approche de biologie intégrée, mes travaux se sont intéressés à la régulation transcriptionnelle des canaux ioniques cardiaques dans des contextes de plasticité et de remodelage électriques. Pour cela, des études moléculaires, électrophysiologiques et des outils bioinformatiques ont été appliquées.

A. Modèles expérimentaux

A.1. Modèle murin du développement et de la maturation cardiaque

Dans une première approche, nous avons étudié la plasticité de l'expression des canaux ioniques et des facteurs de transcription au cours du développement et de la maturation dans le cœur chez la souris C57BL6/J. Les ventricules totaux ont été prélevés à différents stades de développement : le stade embryonnaire E15.5, stade précoce où le cœur présente une morphologie définitive ; le stade E18.5, juste avant la naissance ; le stade néonatal (un jour après la naissance, J1) ; une semaine après la naissance (J7) ; et les stades adultes : 20 jours (J20) et 10 semaines après la naissance (S10).

A.2. Modèle murin d'hypertrophie et d'insuffisance cardiaque

Dans une seconde étude, nous avons développé un modèle de bloc auriculaire (BAV) complet chez des souris CD1 adultes de 10 semaines. Ce bloc est réalisé en interrompant la conduction entre les oreillettes et les ventricules, au niveau du faisceau de His, par ablation par radiofréquence grâce à l'utilisation d'une sonde endocavitaire. La paroi libre du ventricule gauche est alors isolée pour en extraire les ARNs. Les prélèvements ont lieu avant l'ablation et à différents temps après le bloc : 12h, 24h, 48h et 5 jours post-BAV.

A.2.a. Induction du bloc auriculo-ventriculaire par radiofréquence chez la souris

L'ablation par radiofréquence consiste à délivrer une impulsion électrique au niveau du myocarde. Les effets physiologiques des courants de radiofréquence ont été décrits pour la première fois par Arsène d'Arsonval en 1893 (Justesen & Guy, 1985). Celui-ci avait observé que ce type de courant pouvait traverser le corps humain sans entraîner d'autres effets qu'un échauffement au point de contact entre les fils conducteurs et la peau. Les

travaux expérimentaux initiaux visant à évaluer l'utilisation des courants de radiofréquence pour l'ablation endocavitaire ont été effectués au milieu des années 1980. La première application clinique fut réalisée en 1986 pour une ablation de la jonction auriculo-ventriculaire (Lavergne *et al.*, 1986).

Les courants de radiofréquence sont des ondes électromagnétiques dont la fréquence varie entre 300 kHz et 3 MHz. Ces ondes peuvent être délivrées sous forme de trains continus (mode continu) ou intermittents (mode pulsé). Ils agissent principalement par effet thermique. Pour l'ablation de la jonction auriculo-ventriculaire, le courant de radiofréquence est délivré par l'intermédiaire d'un cathéter constitué de plusieurs électrodes.

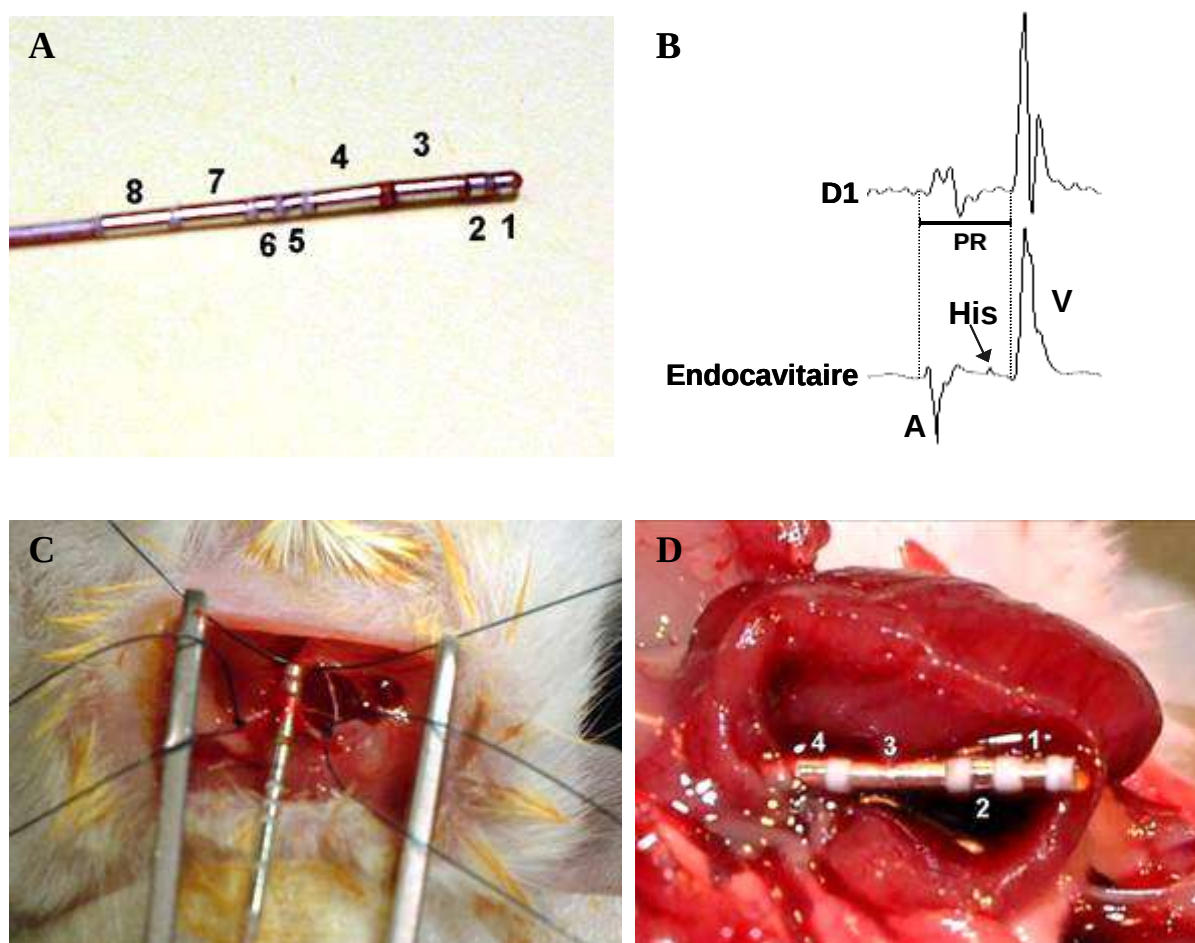


Figure 19 : Electrocardiogramme (ECG) endocavitaire murin. (A) Cathéter octopolaire 2F comportant 4 électrodes de petite surface (1,2,5,6) permettant l'enregistrement de signaux électriques et 4 électrodes de grande surface (3,4,7,8) utilisées à la fois pour l'enregistrement de signaux électriques et pour l'ablation du faisceau de His par radiofréquence. (B) ECG endocavitaire murin. Onde A, dépolarisation des oreillettes ; onde V, dépolarisation des ventricules. (C) Introduction du cathéter dans la veine jugulaire droite. (D) Vue latérale droite du positionnement du cathéter dans le cœur après résection de la paroi libre du ventricule droit.

A.2.b. Protocole expérimental

Des souris CD1® mâles de 10 semaines sont anesthésiées par une injection intrapéritonéale d'étomidate à la dose de 30 mg/kg. Un ECG de surface (D1) est enregistré simultanément avec l'ECG endocavitaire. La température de l'animal est contrôlée et maintenue à 37°C. Une anesthésie locale du point d'incision est obtenue par infiltration locale de lidocaïne 1% (50µl) entre la partie supérieure du thorax et la moitié du coup de l'animal. La veine jugulaire droite est isolée (**Figure 19C**) afin d'y introduire une sonde octopolaire 2F (espacement inter-électrodes de 0.5 mm ; Cordis Webster®, USA). La sonde octopolaire est ensuite avancée dans le cœur (**Figure 19D**) jusqu'à obtenir un enregistrement endocavitaire du faisceau de His (**Figure 19B**). L'ECG de surface D1 et l'électrogramme intracardiaque sont enregistrés sur un ordinateur à l'aide d'un convertisseur analogique-numérique (IOX 1.585, EMKA Technologies) pour monitoring et analyse ultérieure avec le logiciel ECG-Auto (EMKA Technologies). Après détection stable de l'activité du faisceau de His, l'ablation par radiofréquence est réalisée avec un générateur H200S (Osypka) à une intensité de 2W pendant 15s entre deux électrodes de grande surface (électrodes numérotées 3 et 4, **Figures 19A et 19D**). Si le premier tir est efficace, la conduction auriculo-ventriculaire est supprimée. Le ventricule bat alors à un rythme d'échappement idioventriculaire : la souris est en bloc auriculo-ventriculaire complet (BAVc). En cas d'échec, un second tir est tenté après une pause de 5 minutes (3 tirs au maximum pour chaque souris).

Après ablation du faisceau de His, la souris est stimulée au niveau ventriculaire à un rythme d'environ 240 battements/min (RR = 250 ms) pendant 5 minutes. A l'issue de cette période, la valeur de l'intervalle RR du rythme d'échappement spontané est déterminée. La souris est de nouveau stimulée en continu au rythme de 240 battements/min pendant 5 minutes, puis injectée avec une dose de 200 ng/g d'Isoprénaline par voie intrapéritonéale (Isuprel® 0,2 mg/ml, Hospira, Lake Forest, États-Unis). A la fin de la procédure, la sonde est retirée, la jugulaire droite ligaturée, l'incision recousue et la souris mise sur un tapis chauffant jusqu'au réveil pour éviter l'hypothermie.

Pour les souris suivies en télémétrie, l'induction du bloc auriculo-ventriculaire complet est réalisé 5 jours après l'implantation du capteur télémétrique.

A.3. Modèle cellulaire de cardiomyocytes néonataux de souris en culture primaire

Afin de valider biologiquement les interactions identifiées dans les modèles précédents, nous avons développé un modèle cellulaire de cardiomyocytes néonataux en culture. Il est possible d'électroporer ces cellules par des siRNA, dirigés contre les facteurs de transcription identifiés, par la méthode de nucléofection (Lonza).

Des souriceaux nouveaux-nés de 1 à 2 jours sont sacrifiés par décapitation. Les cœurs sont prélevés puis déposés dans une boîte de Pétri contenant du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium). Les ventricules sont séparés des oreillettes sous loupe binoculaire puis déposés dans une boîte de Pétri contenant du HBSS (Hank's Buffered Salt Solution). Sous hotte de culture, les ventricules sont dilacérés puis placés dans un système d'agitation avec 5 mL de solution enzymatique. Cette solution est composée de HBSS, de collagénase de type II (175 U/mL) et de pancréatine et est préalablement filtrée. La préparation est placée à l'incubateur (37°C, 5% CO₂) durant un premier cycle de 10 minutes. Après chacun de 7 cycles de 10 minutes, le surnageant, contenant les cardiomyocytes dissociés, est prélevé, placé dans 1 mL de sérum de veau fœtal tandis que 5 mL d'enzymes est ajouté aux ventricules en digestion. A l'issue des cycles enzymatiques, les cellules sont centrifugées et le culot est resuspendu avec du milieu de culture pour cardiomyocytes néonataux. Ce milieu est composé de DMEM, de 5% de sérum de veau fœtal, de 10% de sérum de cheval, et de 1% d'antibiotiques pénicilline/streptomycine. Les cardiomyocytes vont être séparés des fibroblastes par adhésion différentielle. Placés dans une boîte de Pétri à l'incubateur durant 1 heure, les fibroblastes vont adhérer au plastique, tandis que les cardiomyocytes néonataux demeurent en suspension. Les cardiomyocytes sont alors prêts à être transfectés.

A.4. Electroporation des cardiomyocytes néonataux

La transfection est effectuée par électroporation, et plus précisément par nucléofection grâce au système Amaxa (Lonza). Un million de cardiomyocytes en suspension sont placés dans une cuvette d'électroporation avec un mélange de solution de nucléofection (100µL) et de siRNA (100nM). Les cellules sont alors électroporées. Elles sont ensuite récupérées avec du milieu de culture chaud. Elles sont enfinensemencées dans des puits d'une plaque 12 puits préalablement coatée à la laminine, à raison de 500000 cellules par puits.

B. Approches moléculaires

Notre approche de biologie intégrée a nécessité de corrélérer les profils d'expression des gènes codant les sous-unités des canaux ioniques et les facteurs de transcription cardiaques en évaluant l'expression de l'ensemble de ces gènes dans des conditions soit physiologiques, soit pathologique. Pour cela, nous avons utilisé une technologie de génomique dédiée à ces familles de protéines : la RT-PCR quantitative *TaqMan*® à haut débit ou *TaqMan*® Low Density Array.

B.1. Préparation des ARN, contrôles qualité et rétrotranscription

L'extraction des ARN totaux (ARNt) des ventricules est réalisée selon la méthode décrite par Chomczynski et Sacchi (Chomczynski & Sacchi, 1987 ; Chomczynski & Sacchi, 2006), appliquée avec le Trizol (Invitrogen). Les ARNt sont ensuite traités à la DNase I (Sima Aldrich) afin d'éliminer l'ADN génomique. L'extraction des ARNt des cardiomyocytes néonataux mis en culture est réalisée par le kit Nucleospin® RNAII Nano Kit (Macherey Nagel).

La concentration des ARNt est évaluée par mesure de l'absorbance à 260nm (DO 260nm, NanoDrop ND-1000, NanoDrop Technologies). Seuls les ARNt pauvres en protéines (DO 260nm/280nm entre 1.8 et 2) sont retenus pour la suite de l'expérimentation. L'absence d'ADN génomique est vérifiée par PCR. La qualité des ARNt est contrôlée par une technique de micro-électrophorèse en capillaire sur gel d'acrylamide (Agilent 2100 Bioanalyser, Agilent). Seuls les ARNt ayant un RNA Integrity Number supérieur ou égal à 8 pour les échantillons murins et à 7.5 pour les échantillons humains sont retenus (Fleige & Pfaffl, 2006). La synthèse du premier brin d'ADN complémentaire (ADNc) est réalisée par rétrotranscription à partir des ARNt (de 200 à 2000 ng) à l'aide du kit High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems).

B.2. RT-PCR quantitative à haut débit

B.2.a. Principe de la RT-PCR quantitative

La quantification par PCR de l'expression des gènes a été réalisée à l'aide de la technologie *TaqMan*®. Cette technologie est commercialisée par la société Applied Biosystems sous la forme de kits d'analyse (*TaqMan Gene Expression Assays*) constitués

d'un couple d'amorces (amorces sens et anti-sens) et d'une sonde *TaqMan* spécifiques d'un gène. Les sondes *TaqMan* sont marquées en 5' par le rapporteur fluorescent 6-carboxyfluorescéine (FAM®, Applera Corp.) et en 3' par un quencheur non-fluorescent (**Figure 20**). Elles sont en majorité inter-exoniques et permettent de quantifier toutes les isoformes issues d'épissages alternatifs. Le principe de la technologie *TaqMan* repose sur la propriété exonucléasique 5'-3' de la *Taq DNA polymerase* (**Figure 20**). A chaque cycle de PCR, la *Taq DNA polymerase* clive l'extrémité 5' de la sonde *TaqMan* et libère ainsi le rapporteur fluorescent. La fluorescence émise par celui-ci ne sera donc plus transférée au quencheur et pourra alors être mesurée à sa longueur d'onde spécifique. L'efficacité de PCR des essais étant de 100%, autrement dit, la quantité de produits PCR est doublée à chaque cycle, la fluorescence émise est alors proportionnelle à la quantité de produits PCR synthétisés. Les essais *TaqMan* utilisés pour chaque projet sont listés dans l'**annexe 1**.

L'expression relative des gènes d'intérêt par rapport à un gène de référence invariant (quantification relative) est basée sur les méthodes de calculs des $2^{-\Delta Ct}$ et $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001 ; Schmittgen & Livak, 2008) (**Figure 21**).

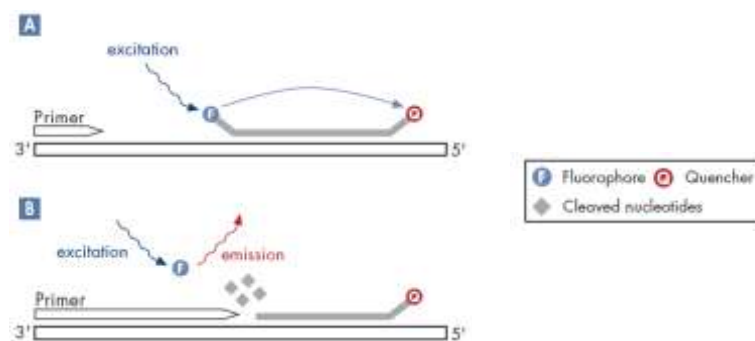


Figure 20 : Principe de la technologie *TaqMan*®. Représentation schématique en 2 étapes de la phase d'élongation de la réaction PCR.

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

Dans toutes les études présentées, la normalisation des données d'expression relative est réalisée par le gène de référence *HPRT* (*hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase*) dont l'expression est stable dans nos différentes conditions.

Figure 21 : Représentation schématique des méthodes de calculs des $2^{-\Delta Ct}$ et $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001 ; Schmittgen & Livak, 2008). Pour chaque condition expérimentale (A et B), le ΔCt est calculé selon la formule : $\Delta Ct = Ct_x - Ct_{ref.}$, où x correspond au gène analysé, et ref. au gène de référence utilisé pour la normalisation. Le calcul du $\Delta\Delta Ct$ permet ensuite de comparer l'expression du gène x dans la condition B par rapport à la condition A ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_B - \Delta Ct_A$). On notera ici que l'expression du gène de référence est stable entre les deux conditions A et B.

B.2.b. Technologie des TaqMan® Low Density Arrays

Dans l'objectif d'évaluer l'expression de l'ensemble des sous-unités des canaux ioniques et facteurs de transcription cardiaques, nous avons utilisé la technologie des cartes microfluides ou *Low Density Arrays* (Applied Biosystems). Une carte microfluide est constituée de 384 puits préalablement chargés par un essai *TaqMan* spécifique d'un gène (**Figure 22**). Huit réservoirs distribuent, via des micro-capillaires, les 384 puits disposés en 8 lignes de 48 puits. Deux configurations ont été utilisées :

- Pour l'analyse de l'expression des canaux ioniques cardiaques, nous avons choisi une configuration qui permet d'amplifier 96 gènes dans 4 échantillons simultanément. Les 96 gènes codent pour différentes sous-unités α et auxiliaires des canaux ioniques, des protéines impliquées dans l'homéostasie calcique, quelques facteurs de transcription, ainsi que pour des marqueurs spécifiques des compartiments cardiaques, des vaisseaux, des neurones, des fibroblastes, de l'inflammation et de l'hypertrophie cardiaque (**Annexe 1**).
- Pour l'analyse de l'expression des facteurs de transcription cardiaques, nous avons opté pour une configuration qui permet d'amplifier 192 gènes dans 2 échantillons simultanément. Les 192 gènes étudiés codent pour différents facteurs de transcription et

cofacteurs, quelques sous-unités α et auxiliaires des canaux ioniques ainsi que pour des marqueurs spécifiques (**Annexe 1**).

Figure 22 : Photographie d'une carte microfluide ou *Low Density Array*. Chaque réservoir distribue, via un micro-capillaire, 48 puits.

Cent nanogrammes d'ADNc combinés aux réactifs PCR *TaqMan Universal Master Mix* (1X) sont déposés dans chaque réservoir puis distribués par centrifugation via les micro-capillaires dans chacun des 48 puits. Chaque puits contient 1 ng d'ADNc dans un volume réactionnel de 1 μ l. Les puits sont scellés et les amplifications sont ensuite réalisées en simplicat à 50°C, 2 min - 95°C, 10 min suivi de 40 cycles : 95°C, 30 sec - 59,7°C, 1 min dans un thermocycleur *ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System*. Les données provenant de plusieurs *Low Density Arrays* sont analysées simultanément et extraites à l'aide du logiciel SDS 2.1. La méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ permet ensuite d'exprimer les résultats. Les gènes dont le Ct est supérieur à 34 sont éliminés pour leur manque de reproductibilité.

B.3. Classification des données d'expression

La mise en place de gènes différentiellement exprimés dans une matrice de données d'expression permet de rechercher et de visualiser les éventuels regroupements de gènes et/ou d'échantillons d'après leur profil d'expression. Les algorithmes de classification permettent ainsi de regrouper des échantillons selon leurs portraits moléculaires et des gènes selon leurs profils d'expression. Ces méthodes permettent donc d'identifier les gènes qui distinguent les groupes d'échantillons les uns des autres ainsi que les gènes qui varient de façon similaire. Pour chaque technologie que nous utiliserons, nous appliquerons des outils statistiques.

B.3.a. Définition

Les algorithmes de classification sont des méthodes de répartition d'un ensemble d'éléments en plusieurs sous-ensembles, sur la base de leurs similarités ou dissimilarités (Gilbert *et al.*, 2000 ; D'haeseleer, 2005). Le but est de construire des groupes qui minimisent la variabilité intra-groupe tout en maximisant les distances inter-groupes. Plus précisément, ils visent à trouver l'ensemble des groupes (gènes ou échantillons) dont les membres sont très similaires et distants des autres groupes sur la base de leur profil d'expression. Une matrice de données d'expression se compose de n gènes et m échantillons. Ces matrices peuvent être étudiées selon les lignes (gènes) et/ou selon les colonnes (échantillons). Deux grands types de méthodes de regroupement doivent être distingués et opposés. Les approches supervisées analysent les données d'expression au regard de connaissances préalables. Ces méthodes supervisées comprennent une phase initiale d'apprentissage sur des gènes et/ou échantillons dont la classification est connue, puis une phase de prédiction sur un ensemble d'autres gènes et/ou échantillons à classer. A l'opposé, les méthodes non supervisées regroupent les objets sans a priori (*data driven*). Ces techniques sont dites exploratoires (*exploratory techniques*) et sont essentiellement employées pour la découverte de classes (*class discovery*). Par exemple, l'application de ces techniques a montrée que la taxonomie actuelle des cancers regroupe des maladies distinctes sur le plan moléculaire (Golub *et al.*, 1999 ; Alizadeh *et al.*, 2000). De ce fait, n'ayant que peu de connaissances préalables des classifications de gènes à obtenir, seuls les approches non supervisées seront utilisées dans nos projets et décrites dans la suite de cette partie.

B.3.b. Classification hiérarchique non-supervisée

Les méthodes de classification non supervisée sont donc des techniques de regroupement (*clustering*) où un processus automatique sépare les données observées en groupes distincts sans aucune connaissance préalable des classes existantes. Au sein des approches non supervisées, les classifications hiérarchiques ascendantes et les méthodes par partitionnement sont les plus utilisées. Ces dernières imposent la définition préalable du nombre de groupes de gènes attendus, les méthodes des k-moyennes (*k-means*) et SOM (*Self-Organizing Maps*) sont les plus utilisées. D'abord utilisées en phylogénie, les méthodes de classification hiérarchique sont aujourd'hui les techniques de classification non supervisée les plus utilisées pour étudier les profils l'expression de gènes ou d'échantillons. Elles génèrent des suites de classes emboîtées qui définissent une hiérarchie de partitions. Les algorithmes de classification travaillent à partir des matrices de distances issues des

matrices de données d'expression. Actuellement, il existe trois principales modalités de calcul de distances entre les classes (distance inter-groupes) qui permettent de générer deux grands types d'algorithmes de classification hiérarchique : les algorithmes ascendants et les algorithmes descendants. Pour les algorithmes descendants, à chaque étape, un cluster est désigné pour être scindé en deux. Si l'on veut respecter strictement le critère de maximalisation de la distance entre descendants, on doit considérer toutes les partitions possibles du cluster en deux descendants, et retenir la meilleure. Cette procédure nécessite des calculs prohibitifs et est donc exagérément longue, même pour des clusters de taille modeste. Etant plus rapides et l'expérience montrant qu'ils fournissaient des résultats cohérents, nous ne décrivons ici que les algorithmes ascendants qui nous ont permis de classer nos différentes matrices de données.

*** Distances inter-groupes**

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

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

*** Algorithmes ascendants**

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

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

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

B.4. Statistiques

B.4.a. Déterminations des valeurs aberrantes

Dans nos résultats de quantification relative, nous ne pouvons exclure la survenue de valeurs aberrantes (*outliers*) liées, par exemple, à des erreurs de lecture de l'appareil. Un *outlier* est une valeur statistiquement qui n'est pas normalement distribuée par rapport à une

certaine population, et uniquement par rapport à la structure de cette population. De ce fait, le test de Dixon (Rorabacher, 1991) est appliqué sur les $2^{-\Delta Ct}$ afin de détecter les valeurs aberrantes. Il consiste à vérifier l'appartenance des individus d'une même population normale et peut-être utilisé dans le cas de petits échantillons ($n < 25$). Il est basé sur le calcul des rapports d'étendues aux extrémités. Les valeurs aberrantes sont repérées avec un risque de 5% et supprimées car elles accroissent l'hétérogénéité des séries statistiques.

B.4.b. Tests statistiques

Les résultats d'études du transcriptome correspondent aux moyennes des $2^{-\Delta Ct}$ ($\pm$ SEM) ou aux pourcentages de variation $(1 - 2^{-\Delta\Delta Ct}) \times 100$ ($\pm$ SEM) obtenus à partir de plusieurs échantillons. Les différents tests statistiques cités par la suite ont été réalisés sur les $2^{-\Delta Ct}$. Pour évaluer si la différence observée entre 2 groupes appariés est significative, le test non paramétrique de Wilcoxon est utilisé. Dans le cas de comparaison entre plusieurs groupes, une analyse de variance à une voie (ANOVA), complétée par le test de comparaison multiple de Tukey est réalisée. Une valeur de l'indice $p < 0,05$ est considérée comme significative.

Dans le cas de l'étude sur le développement et la maturation cardiaque, au vu du faible nombre d'échantillons par stade de développement ($n=3$), nous avons appliqué le test statistique de Kruskal et Wallis. Ce test non paramétrique est requis pour la comparaison de plus de 2 échantillons indépendants, avec de faibles effectifs et ne vérifiant pas la condition de normalité. Les différences notées sont considérées comme significatives au seuil 5 % (soit une p -value ≤ 0.05).

C. Approches électrophysiologiques

Dans l'optique de valider fonctionnellement les répercussions des variations des transcrits des canaux ioniques, nous avons évalué à l'étage intégré (électrocardiogrammes de surface) et cellulaire (*patch-clamp*) la corrélation entre ces variations d'expression et les modifications de l'activité électrique cardiaque chez la souris.

C.1. Electrocardiogramme de surface chez la souris

Chez l'Homme, l'électrocardiogramme (ECG) est composé de 12 dérivations distinctes parmi lesquelles les 6 dérivations des membres sont nommées D1, D2, D3, aVR,

aVL et aVF. Chez la souris anesthésiée, nous avons enregistré 1 ou 6 dérivation de l'ECG, tandis que chez la souris vigile nous avons enregistré la dérivation D2.

C.1.a. Enregistrement ECG chez la souris anesthésiée

L'enregistrement d'un ECG à 6 dérivation est obtenu à l'aide d'électrodes sous-cutanées de calibre 25 Gauge chez des souris CD1® mâles de 10 semaines (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) préalablement anesthésiées par injection intra-péritonéale (ip) d'étomidate (30 mg/kg ; Hypnomidate® 2mg/ml, Janssen-Cilag S.A.). Quatre électrodes sous-cutanées sont placées au niveau des membres antérieurs et postérieurs de la souris placée en décubitus dorsal dans une cage de Faraday. La température corporelle de l'animal est maintenue à 37°C à l'aide d'un tapis chauffant régulé par une sonde rectale (Harvard Apparatus, Paris, France). L'enregistrement ECG est réalisé 10 min après anesthésie. Les ECG sont filtrés entre 0,5 et 250 Hz et enregistrés sur un ordinateur via le convertisseur analogique-numérique IOX 1.585 (EMKA Technologies, Paris, France). Les mesures sont effectuées en dérivation D1 à l'aide du logiciel ECG auto 1.5.12.10 (EMKA Technologies) selon des critères prédéfinis (Lande *et al.*, 2001). L'intervalle PR (ou PQ) est mesuré du début de l'onde P jusqu'au début de l'onde Q, l'intervalle QRS du début de l'onde Q jusqu'au point d'intersection entre la ligne isoélectrique et le segment STr, et l'intervalle QT du début de l'onde Q jusqu'à la fin de l'onde T (**Figure 23**). La durée des intervalles PP, RR, PR, QRS, QT et de l'onde P est moyennée sur cinq complexes PQRST consécutifs.

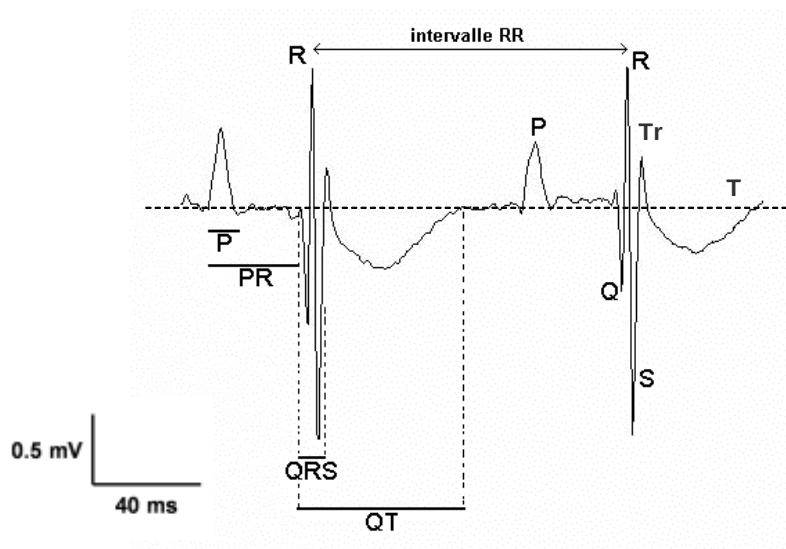


Figure 23 : Méthode de mesure des paramètres sur un électrocardiogramme de surface murin (dérivation D1).

C.1.b. Enregistrement ECG chez la souris vigile

Un enregistrement ECG en dérivation D2 est obtenu chez des souris CD1® mâles de 10 semaines vigiles grâce à l'implantation chirurgicale préalable de deux électrodes reliées à un capteur de télémétrie (TA10EA-F20, Data Sciences International). Une anesthésie générale (étomidate 45 mg/kg ip) puis une anesthésie locale de chacun des points d'incision (Lidocaïne 1%, 50 µl ; Rompun® 2%, Bayer Santé, Paris, France) sont réalisées au niveau du flanc de l'animal. Les deux électrodes sont placées en sous-cutanée et suturées au plan musculaire sur le thorax de façon à obtenir une dérivation D2. Le capteur de télémétrie est inséré dans une poche sous-cutanée au niveau du flanc. Les souris sont hébergées dans des cages individuelles dans une animalerie à température contrôlée avec des cycles jour/nuit de 12 h. Quatre jours minimum après l'implantation, les signaux ECG sont enregistrés en continu par l'intermédiaire d'un récepteur de télémétrie couplé au système d'acquisition et de conversion des données ART 2.3 Gold (Data Sciences International). Les paramètres ECG sont mesurés selon les critères utilisés chez la souris anesthésiée.

C.2. Enregistrement du courant potassique Ito sur cardiomyocytes isolés par la technique de patch-clamp

C.2.a. Isolement des cardiomyocytes ventriculaires

Les souris CD1® mâles de 10 semaines en rythme sinusal ou en bloc auriculo-ventriculaire complet sont héparinées (5000 U/kg ip ; Héparine sodique 500UI/5ml, Dakota Pharm, Paris, France) puis anesthésiées (étomidate 30 mg/kg). Après dislocation cervicale, le cœur est prélevé et placé dans une solution de Tyrode froide et oxygénée (solution 1 ; 100% O₂ ; NaCl 130 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM, KCl 5.4 mM, MgSO₄ 1.2 mM, CaCl₂ 1 mM, HEPES 10 mM, glucose 10 mM, 2,3-butanedione monoxine (BDM) 10 mM, pH 7.4 ajusté avec NaOH). L'aorte est canulée et perfusée avec la solution 1 sous microscope. La canule est fixée sur une colonne de Langendorff et le cœur est perfusé quelques minutes par la solution 1 à 37°C jusqu'à ce que les battements cardiaques soient réguliers et le perfusat dépourvu de sang. La solution 1 est ensuite remplacée pendant 5 min par la solution 1 dépourvue de Ca²⁺ et de BDM (solution 2). Puis le cœur est perfusé pendant 9 à 14 min par la solution 3 [solution 2 + CaCl₂ 25 µM, collagénase 0.25 mg/ml (Sigma type I 350 U/mg), protéase 0.065 mg/ml (Sigma type XIV 4.4 U/mg), taurine 20 mM] et enfin rincé pendant 5 min par la solution 4 (solution 2 + CaCl₂ 100 µM, taurine 20 mM, BDM 10 mM). Les oreillettes sont retirées et les ventricules sont coupés en cubes d'environ 1 mm³. L'isolement des myocytes est réalisé par agitation mécanique douce des cubes dans la solution 4 à

l'aide d'une pipette Pasteur polie. La suspension cellulaire obtenue est filtrée (250 μ m) et placée dans un tube à température ambiante pendant 5 min durant lesquelles les cellules se déposent par gravité dans le fond du tube. Le surnageant est alors éliminé et les cellules sont resuspendues dans la solution 4 dépourvue de BDM. Cette dernière étape est répétée une seconde fois. La concentration calcique de la solution de resuspension est enfin augmentée jusqu'à 900 μ M par incrément de 200 μ M toutes les 20 à 30 min. Les cellules sont utilisées pour les expériences de *patch-clamp* le jour même.

C.2.b. Enregistrement du courant potassique Ito

Les expériences de *patch-clamp* sont réalisées en configuration "cellule entière" (Hamill *et al.*, 1981). Les cellules sont perfusées en continu par une solution de Tyrode à température ambiante (NaCl 130 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM, KCl 5.4 mM, MgSO₄ 1.2 mM, CaCl₂ 1 mM, HEPES 10 mM, glucose 10 mM, pH 7.4 ajusté avec NaOH). Un système de micro-perfusion permet de perfuser localement la cellule avec le milieu extracellulaire. La composition ionique des milieux intra-pipette et extracellulaire sont indiquées dans le **tableau 4**. Les résistances des pipettes de patch sont comprises entre 2 et 3 M Ω . La stimulation, l'enregistrement et l'analyse des données sont effectués via le convertisseur A/D (Tecmar TM100 Labmaster, Scientific Solutions, Inc.) à l'aide des amplificateurs Axoclamp 200A (Axon Instruments, Inc.), RK300 (Bio-Logic) ou L/M-EPC7 (List-Medical) et du logiciel Acquis1 (Bio-Logic). Les densités de courant mesurées sont normalisées par rapport à la capacité membranaire de la cellule.

Nous nous sommes basés sur les travaux récents du groupe de Céline Fiset (Brouillette *et al.*, 2004). Le protocole consiste en une distinction des courants potassiques de la souris sur la base de leurs propriétés biophysiques et notamment de leurs cinétiques d'inactivation. L'enregistrement des courants K⁺ est réalisé à température ambiante avec des solutions extracellulaires et intra-pipettes dont la composition est donnée dans **le tableau 4**. La substitution du NaCl par le N-Methyl-D-Glucamine supprime le courant sodique I_{Na}. L'addition de 3 μ mol/L de nifédipine inhibe le courant calcique I_{Ca,L}.

Le courant global K⁺ repolarisant est mesuré par des sauts de potentiel d'une durée de 500 ms à 3 s d'intervalle. Ces sauts de potentiels sont appliqués de -80 mV (potentiel de maintien) à +30 mV. I_{to} est soustrait en utilisant un prépulse d'inactivation à -40mV précédant immédiatement le saut de potentiel.

Tableau 4 : Composition ionique des milieux intra-pipette et extracellulaire utilisés pour l'enregistrement du courant I_{to} .

	Milieu intra-pipette (mM)	Milieu extracellulaire (mM)
CaCl ₂	1	
EGTA	5	
Glucose		10
HEPES	5	10
K ₂ ATP	5	
K-aspartate	110	
KCl	20	5.4
Manitol		10
MgCl ₂ (free-Mg ²⁺ : 0.6)	2	
MgSO ₄		1.2
N-Méthyl-D-Glucamine		130
pH (ajusté avec)	7.2 (KOH)	7.4 (HCl)

C.3. Statistiques

Tous les résultats d'études électrophysiologiques présentés correspondent aux moyennes des paramètres ECG ou courants ioniques mesurés ($\pm$ SEM) obtenus à partir de plusieurs animaux et cardiomyocytes. Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du test *t* de Student, ou d'une analyse de variance (ANOVA) à une voie complétée par un test de comparaison multiple, le test de Tukey. Une valeur de l'indice $p < 0,05$ est considérée comme significative.

D. Outils bioinformatiques

L'utilisation d'outils de bioinformatique nous a permis de confirmer les facteurs de transcription les plus probables dans la régulation des canaux ioniques en établissant des réseaux d'interaction entre ces régulateurs et en prédisant leurs fixations sur les promoteurs des canaux ioniques.

D.1. Ingenuity Pathways Analysis

Ingenuity Pathways Analysis (IPA ; <http://www.ingenuity.com>) est une application logicielle qui permet de modéliser, d'analyser et de comprendre les systèmes biologiques et chimiques complexes. Les capacités de recherche d'IPA offrent une synthèse des connaissances bibliographiques actuellement disponibles sur les gènes, les familles de

protéines, les médicaments, les produits chimiques, les processus cellulaires et pathologiques, ainsi que sur les voies de signalisation et les voies métaboliques. La pertinence des regroupements des facteurs de transcription, issus de la classification des données d'expression, est testée en interrogeant IPA :

- d'une part, sur l'existence de réseaux d'interactions entre ces facteurs de transcription ;
- d'autre part, sur l'implication de ces régulateurs dans une même voie de signalisation.

D.2. Cardiac Promoter Database

Afin de prédire la fixation des facteurs de transcription sur les promoteurs des canaux ioniques, nous avons développé au sein de notre équipe nos propres outils bioinformatiques. *Cardiac Promoter Database* (http://cardioserve.nantes.inserm.fr/cardiac_database) est une base de données qui contient l'ensemble des prédictions des promoteurs des canaux ioniques et des facteurs de transcription de 4 espèces différentes (souris, Homme, rat, chien). Cette base comprend également des outils pour prédire, avec des critères contrôlés et sélectifs, les éléments *cis*-régulateurs présents sur les séquences promotrices de ces gènes. Cette application a été développée au sein de l'équipe par Jérôme Morissard. Elle se distingue des bases publiques en précisant les sources des promoteurs et matrices ainsi que les méthodes de prédiction appliquées.

D.2.a. Construction de la base de promoteurs

Les départs de transcription alternatifs (*Transcription Start Site*, TSS) de chaque gène sont prédits en utilisant des ARN messagers (ARNm) possédant une région 5'UTR (*UnTranslated Region*) extraits de Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank) et Ensembl (<http://www.ensembl.org>). Les ARNm des gènes orthologues provenant de *Mus musculus*, *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*, *Canis lupus*, *Bos taurus*, *Macaca mulatta* et *Gallus gallus* sont utilisés pour améliorer les prédictions. L'étude est réalisée avec un total de 5137 ARNm. La prédiction a permis de localiser 1810 TSS distincts pour 994 gènes : 271 pour la souris, 280 pour l'Homme, 254 pour le rat et 189 pour le chien. La validation de chaque TSS est réalisée en visualisant l'alignement avec les EST (*Expressed Sequence Tag*), en situant les îlots CpG (Gardiner-Garden & Frommer, 1987) et en vérifiant le chevauchement avec les ARNm "pleine longueur" (*Full length*) provenant de la *Database of Transcriptional Start Sites* (Wakaguri *et al.*, 2008) (<http://dbtss.hgc.jp>). Après une étape d'alignement sur les génomes de la souris (UCSC mm8), de l'Homme (UCSC hg18), du rat (UCSC rn4) et du chien (UCSC

CanFam2), une région allant de 2000 paires de base en amont à 500 paires de base en aval du TSS est extraite pour constituer les 1810 promoteurs de la base.

D.2.b. Outils de prédiction des éléments cis-régulateurs

Les outils de prédiction des éléments *cis*-régulateurs de *Cardiac Promoter Database* étudient la fixation des facteurs de transcription en utilisant leurs matrices (ou profils) sur les promoteurs des gènes de la base. Ces outils permettent d'observer les sites de fixation putatifs pour un facteur de transcription sur un promoteur, de regarder si ces sites de fixation sont conservés dans les autres espèces ou d'étudier la surreprésentation de la fixation d'un facteur de transcription sur un groupe de promoteurs par rapport à l'ensemble des promoteurs de la base.

*** Source des matrices**

Une matrice est une compilation de séquences connues pour fixer un facteur de transcription (Stormo, 2000). Pour chaque position, on compte l'occurrence de chacun des nucléotides (A, T, G, C) ce qui permet de constituer une matrice de fréquence. Les matrices de fréquence sont le matériel indispensable pour effectuer les prédictions, elles sont disponibles à partir de deux principales sources d'informations : *Transfac* (Wingender *et al.*, 1996) (*TRANScriptioN FACTor database public version 7.0*, <http://www.gene-regulation.com>) et *Jaspar* (Sandelin *et al.*, 2004) (<http://jaspar.genereg.net>). L'utilisation de 394 matrices provenant de *Transfac Public 7.0* et de 123 matrices provenant de *Jaspar* permet de tester 517 matrices correspondant à 581 facteurs de transcription.

*** Prédiction de la fixation des matrices**

La prédiction utilise des matrices de poids (*Position Weight Matrice*) pour s'affranchir notamment des problèmes générés par les 0 de la matrice de fréquence. **L'équation 1** est la formule pour passer d'une matrice de fréquence à une matrice de poids. A chaque position de la matrice, un poids est associé à chaque nucléotide. Ce poids sera négatif si la fréquence d'apparition du nucléotide apparaît inférieurement à la fréquence moyenne d'apparition des 4 nucléotides, et positif si la fréquence d'apparition est supérieure à celle-ci.

Équation 3 : Transformation d'une matrice de position vers une matrice de poids

$$p(b,i) = \log_2 \left(\frac{f(b,i) + \frac{\sqrt{N}}{4}}{N + \sqrt{N}} \right)$$

i, est une position du profil

b, est un nucléotide appartenant à l'ensemble A, C, G, T

p(b,i), est le poids associé à la position *i* du profil et au nucléotide *b*

f(b,i), est la fréquence observée du nucléotide *b* à la position *i* du profil

N, est le nombre de sites utilisés pour construire le profil

$$\frac{\frac{\sqrt{N}}{4}}{N + \sqrt{N}} \text{ est un compte correctif}$$

La prédiction est effectuée en scannant les deux brins (sens et anti-sens) de la séquence promotrice avec la matrice de poids à l'aide de **l'équation 2**. De cette manière, pour chaque position de la matrice de poids sur la séquence, un score corrigé est calculé. Ce score correspond à la somme de tous les poids associés aux nucléotides et aux positions du profil. Cette valeur est un moyen de quantifier la conservation de la séquence par rapport à la matrice. Le score corrigé varie de 0 à 100. La valeur 100 est obtenue quand les nucléotides les plus conservés à chaque position de la matrice sont les mêmes que ceux de la séquence analysée.

Équation 4 : Calcul du score corrigé

n = Largeur du profil

m = une position sur la séquence

$$\text{Score Total Minimal} = \sum_{i=1}^n (\text{Score Minimal}(i))$$

$$\text{Score Total Maximal} = \sum_{i=1}^n (\text{Score Maximal}(i))$$

$$\text{Score Corrigé}[m] = \frac{\text{Score}[m] - \text{Score Total Minimal}}{\text{Score Total Maximal} - \text{Score}[m]}$$

* Calcul de la surreprésentation de la fixation d'un facteur de transcription

Le test exact de Fisher permet de déterminer s'il existe une surreprésentation de la fixation d'une matrice sur un groupe de promoteurs sélectionnés par rapport à l'ensemble des promoteurs de la base (considéré comme la fréquence de fond). Ce test donne des résultats exacts pour des tableaux de contingence (2 lignes, 2 colonnes) avec un faible effectif. Il revient à tester l'indépendance de deux variables (promoteur sélectionné, promoteur de la base) chacune ayant deux modalités (fixation, non fixation de la matrice). Une valeur de l'indice $p < 0,05$ est considérée comme significative.

RESULTATS

A. Profils des canaux ioniques et des facteurs de transcription dont l'expression est modifiée au cours de la maturation ventriculaire chez la souris

L'étude du développement et de la maturation cardiaque nous renseigne sur de nombreux changements biologiques importants, dont les altérations de la fonction cardiovasculaire, et sur les modifications à l'échelle moléculaire qui sont de mieux en mieux connues dans le domaine de l'embryologie. Ces études permettent également une meilleure connaissance des principes fondamentaux régissant la plasticité ou le remodelage impliqués dans les mécanismes de la régulation de l'excitabilité, la contraction, la relaxation, et les propriétés de conduction des cellules cardiaques.

L'objectif de ce travail a été : (1) d'établir les profils d'expression des gènes codant les canaux ioniques dans les ventricules au cours de la maturation chez la souris adulte ; (2) d'établir les profils d'expression des gènes codant les facteurs de transcription dans les ventricules au cours de la maturation chez la souris adulte ; (3) d'identifier les facteurs de transcription responsables des modifications de l'expression des canaux ioniques au cours de la maturation cardiaque.

Pour répondre à ces questions, 157 gènes codant des facteurs de transcription et cofacteurs connus pour leur expression cardiaque (sources : www.celera.com, www.ncbi.nih.gov/entrez (Geo profiles), www.informatics.jax.org) ont été sélectionnés. L'analyse de l'expression transcriptionnelle de ces gènes dans les ventricules est réalisée à différents stades de la maturation : aux stades embryonnaires E15.5j et E18.5j, aux stades néonataux P1 et P7, et aux stades plus tardifs P20 et S10 (10^{ème} semaine, considéré comme le stade adulte).

A.1. Les canaux ioniques

L'analyse globale des données d'expression révèle une discrimination entre chaque stade de développement (**Figure 24**). L'expression des différents canaux ioniques cardiaques permet de séparer nettement 2 sous-clusters. Ainsi, nous pouvons distinguer un sous-cluster précoce, comprenant les stades E15,5, E18,5 et P1, et un sous-cluster tardif, englobant les stades P7, P20 et S10. L'expression des canaux ioniques est donc très différente entre ces deux sous-clusters. Des canaux faiblement exprimés dans un de ces groupes seront fortement exprimés dans le second.

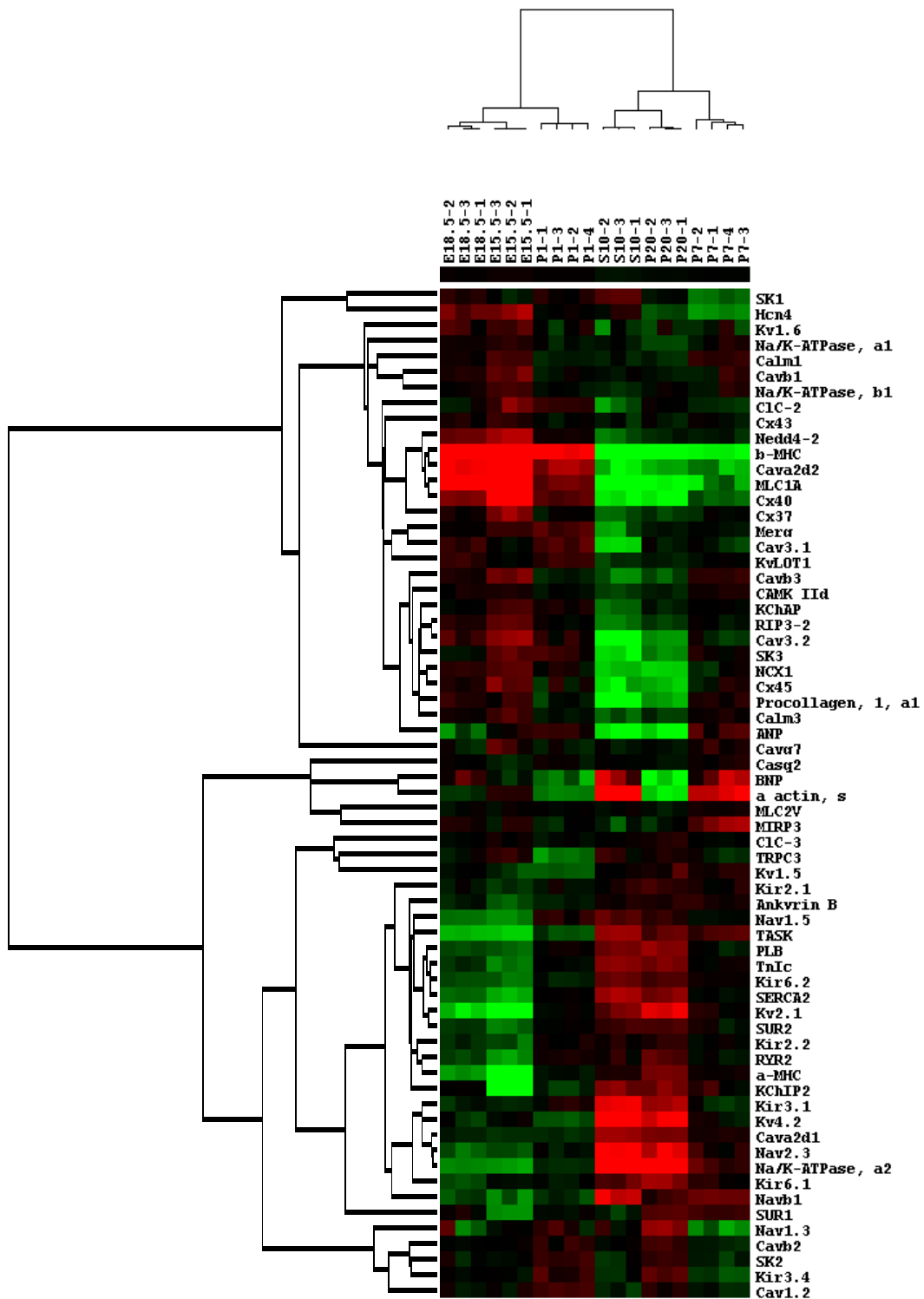


Figure 24 : Classification hiérarchique à deux voies appliquée à 65 gènes codant les protéines impliquées dans l'activité électrique (verticalement) en fonction de 20 échantillons de différents stades de développement du cœur chez la souris (horizontalement). Chaque gène et chaque stade sont représentés par une ligne et une colonne, respectivement. Chaque case colorée correspond au niveau d'expression relative du gène (ΔC_t). La gamme de couleur s'étend du vert (moins exprimé) au rouge (plus exprimé).

De plus, les échantillons de stades différents sont clairement séparés les uns des autres par la classification hiérarchique. Ceci implique que chacun des stades étudiés

présente une signature moléculaire spécifique de part l'expression des canaux ioniques dans les ventricules chez la souris. Il n'y a pas de différences marquées de l'expression des canaux ioniques au sein de chaque stade de développement. Nous pouvons donc imposer la classification des échantillons biologiques en fonction du temps (du stade E15.5 au stade S10) (**Figure 25**) afin d'identifier plus facilement les groupes de gènes codant les canaux ioniques dont l'expression varie de la même façon au cours du développement.

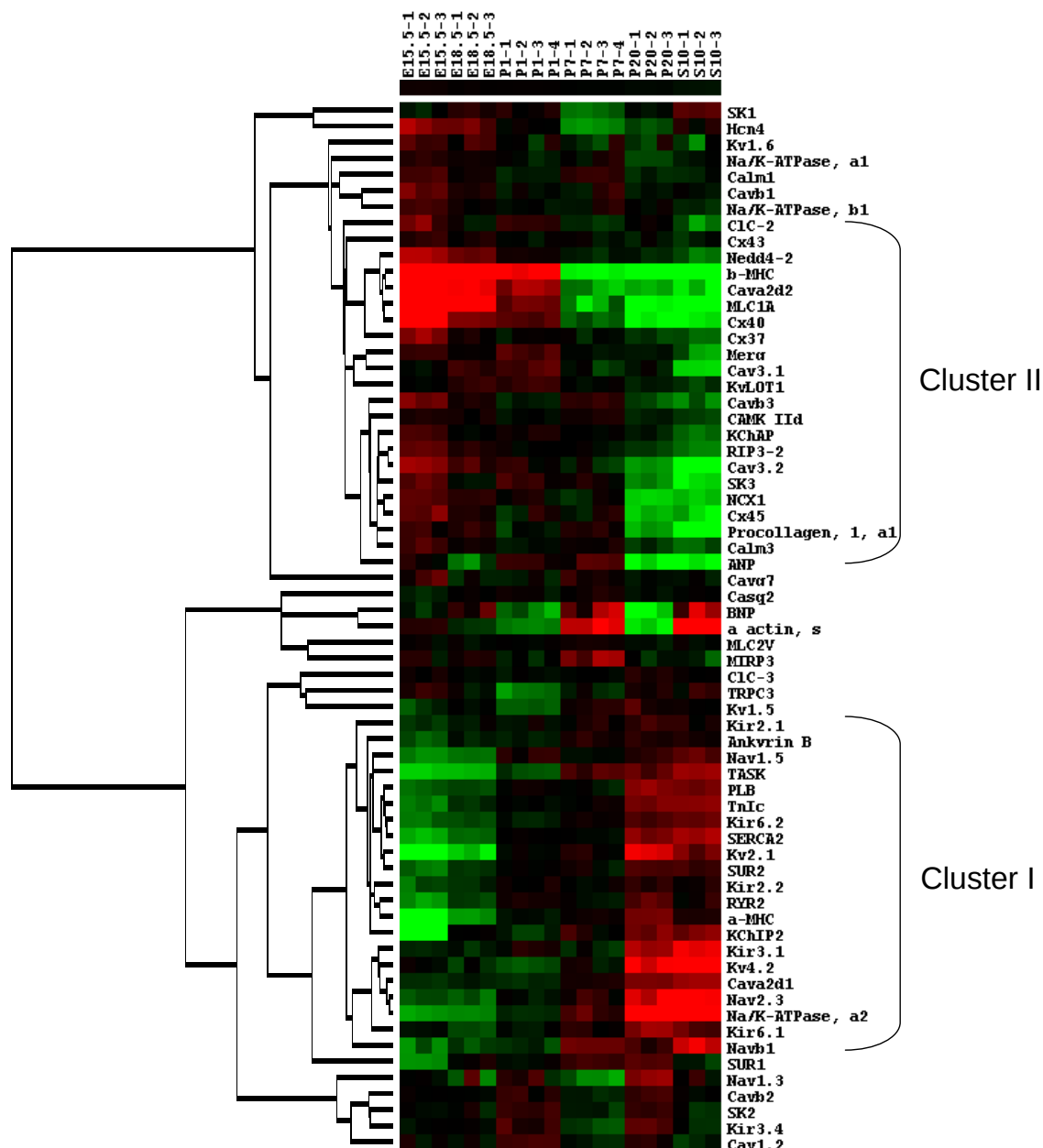


Figure 25 : Classification hiérarchique à une voie appliquée à 65 gènes codant les protéines impliquées dans l'activité électrique (verticalement) en fonction de 20 échantillons de différents stades de développement du cœur chez la souris, classés dans l'ordre chronologique (horizontalement). Chaque gène et chaque stade sont représentés par une ligne et une colonne, respectivement. Chaque case colorée correspond au niveau d'expression relative du gène (ΔCt). La gamme de couleur s'étend du vert (moins exprimé) au rouge (plus exprimé).

La classification hiérarchique des gènes met en évidence deux groupes fortement corrélés : le cluster I, dont les gènes ont une expression qui augmente au cours du temps et le cluster II dont les gènes ont une expression qui diminuent. Ces clusters contiennent respectivement 21 et 22 gènes codant des canaux ioniques, des protéines de l'homéostasie calcique ou des protéines de structure. Dans le premier cluster, des canaux connus pour leur rôle important dans l'électrogenèse cardiaque sont répertoriés. A titre d'exemple, nous pouvons citer Nav1.5, Kv2.1, Kir2.1 et Kv4.2. Dans le second cluster, nous retrouvons des canaux et des échangeurs dont l'expression diminue et dont la littérature fait déjà état. Il s'agit du canal Cav3.2, de l'échangeur sodium/calcium NCX1, du récepteur à l'IP3 par exemple. Une protéine de structure telle que la chaîne légère de la myosine MLC1A voit également son expression diminuer, puisqu'elle sera restreinte au tissu auriculaire au cours du développement cardiaque.

A.2. Les facteurs de transcription

Comme pour les canaux ioniques, l'analyse globale des données d'expression révèle une discrimination entre une phase précoce (E15,5, E18,5, P1) et une phase tardive (7, P20, S10) mais également entre chaque stade de développement. Nous pouvons imposer la classification des échantillons biologiques dans l'ordre chronologique de la maturation cardiaque (du stade embryonnaire E15.5 au stade adulte S10) afin de retrouver les gènes codant les facteurs de transcription dont les variations d'expression sont similaires au cours du développement (**Figure 26**).

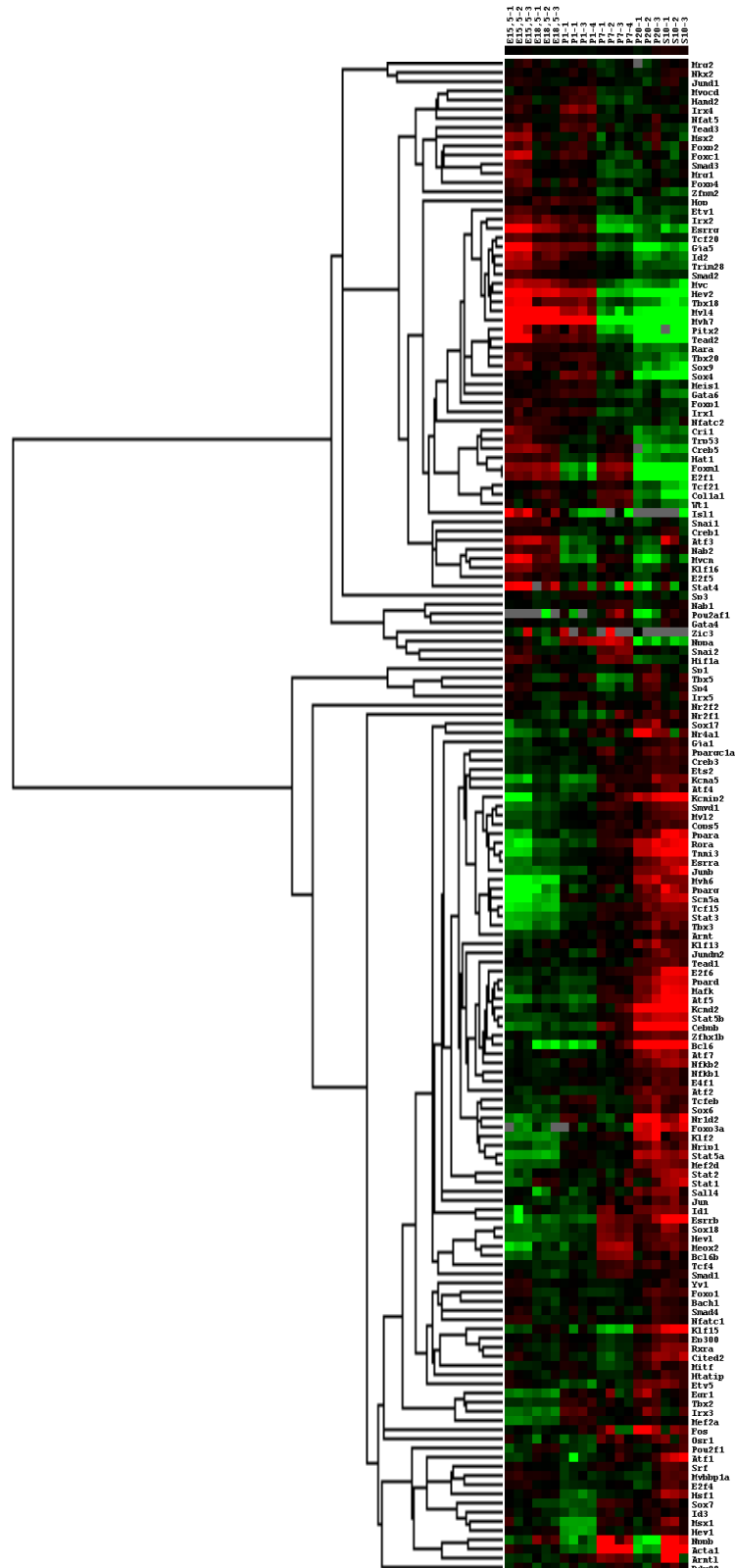


Figure 26 : Classification hiérarchique appliquée à 165 gènes codant **les facteurs de transcription et cofacteurs** (verticalement) en fonction de 20 échantillons de différents stades de développement du cœur chez la souris, classés dans l'ordre chronologique (horizontalement). Chaque gène et chaque stade sont représentés par une ligne et une colonne, respectivement. Chaque case colorée correspond au niveau d'expression relative du gène (ΔC_t). La gamme de couleur s'étend du vert (moins exprimé) au rouge (plus exprimé). Les valeurs manquantes sont représentées en gris.

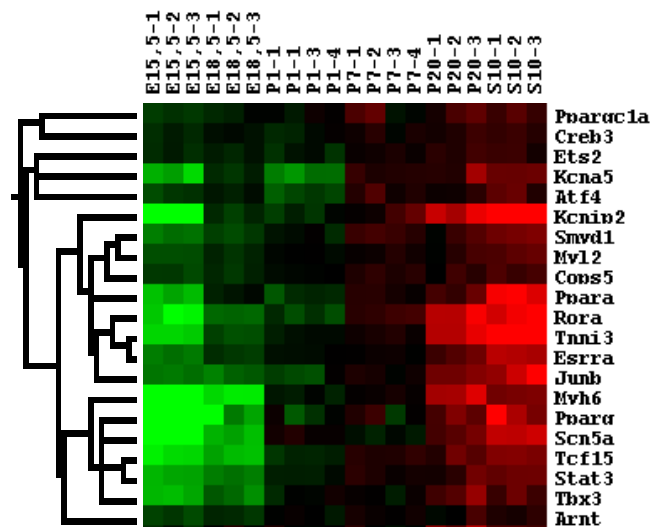


Figure 27 : Détail du **cluster I** regroupant les gènes dont l'expression **augmente** au cours du développement cardiaque. Une sélection arbitraire issue de la classification hiérarchique appliquée aux **facteurs de transcription et cofacteurs** (verticalement) en fonction de 20 échantillons de différents stades de développement du cœur chez la souris, classés dans l'ordre chronologique (horizontalement). Chaque gène et chaque stade sont représentés par une ligne et une colonne, respectivement. Chaque case colorée correspond au niveau d'expression relative du gène (ΔCt). La gamme de couleur s'étend du vert (moins exprimé) au rouge (plus exprimé).

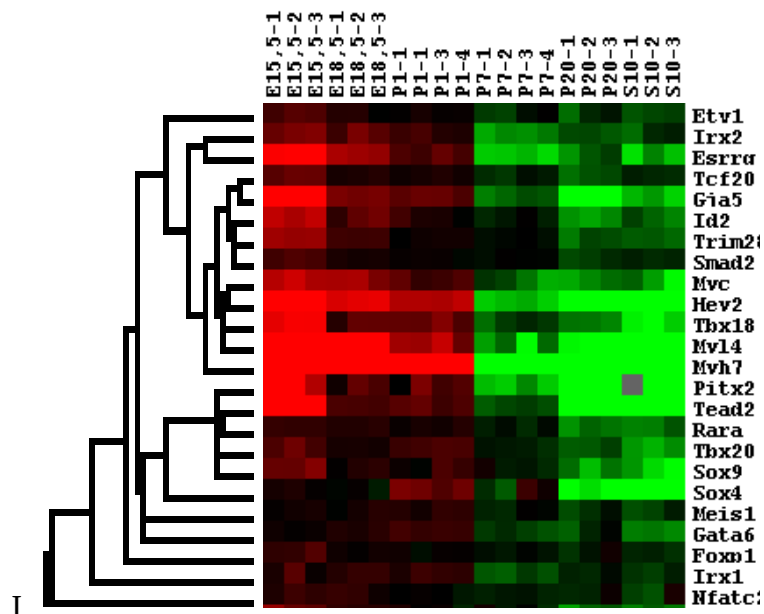


Figure 28 : Détail du **cluster II** regroupant les gènes dont l'expression **diminue** au cours du développement cardiaque. Une sélection arbitraire issue de la classification hiérarchique appliquée aux **facteurs de transcription et cofacteurs** (verticalement) en fonction de 20 échantillons de différents stades de développement du cœur chez la souris, classés dans l'ordre chronologique (horizontalement). Chaque gène et chaque stade sont représentés par une ligne et une colonne, respectivement. Chaque case colorée correspond au niveau d'expression relative du gène (ΔCt). La gamme de couleur s'étend du vert (moins exprimé) au rouge (plus exprimé). Les valeurs manquantes sont représentées en gris.

Deux clusters (I et II) sont mis en évidence suivant la similarité des profils d'expression des facteurs de transcription au cours du développement. Le cluster I (**Figure 27**) comprend 18 facteurs de transcription dont l'expression augmente au cours de la maturation cardiaque. On peut citer *Tbx3*, *Stat3*, et *Smyd1* à titre d'exemple. Leur rôle est déjà reconnu dans la différenciation du muscle cardiaque. La présence de canaux codés tels *SCN5A* et *KCNIP2* dans ce cluster confirme que les facteurs de transcription présents ont une variation d'expression similaire à celle de ces canaux au cours du développement. Le second cluster (**Figure 28**) présente des facteurs dont l'expression diminue au cours du développement. Certains sont déjà connus pour leur rôle dans l'embryogenèse cardiaque (*Gata6*, *Tbx18*, *Tbx20*). Il est donc normal de les retrouver dans la phase précoce du développement du cœur.

A.3. Corrélation des profils des canaux et facteurs de transcription

A.3.a Corrélation des profils d'expression

Nous avons ensuite associé les profils d'expression des canaux ET des facteurs de transcription (**Figure 29**). La classification hiérarchique obtenue organise ces différents gènes suivant la similarité de leur profil d'expression au cours du développement et de la maturation cardiaque.

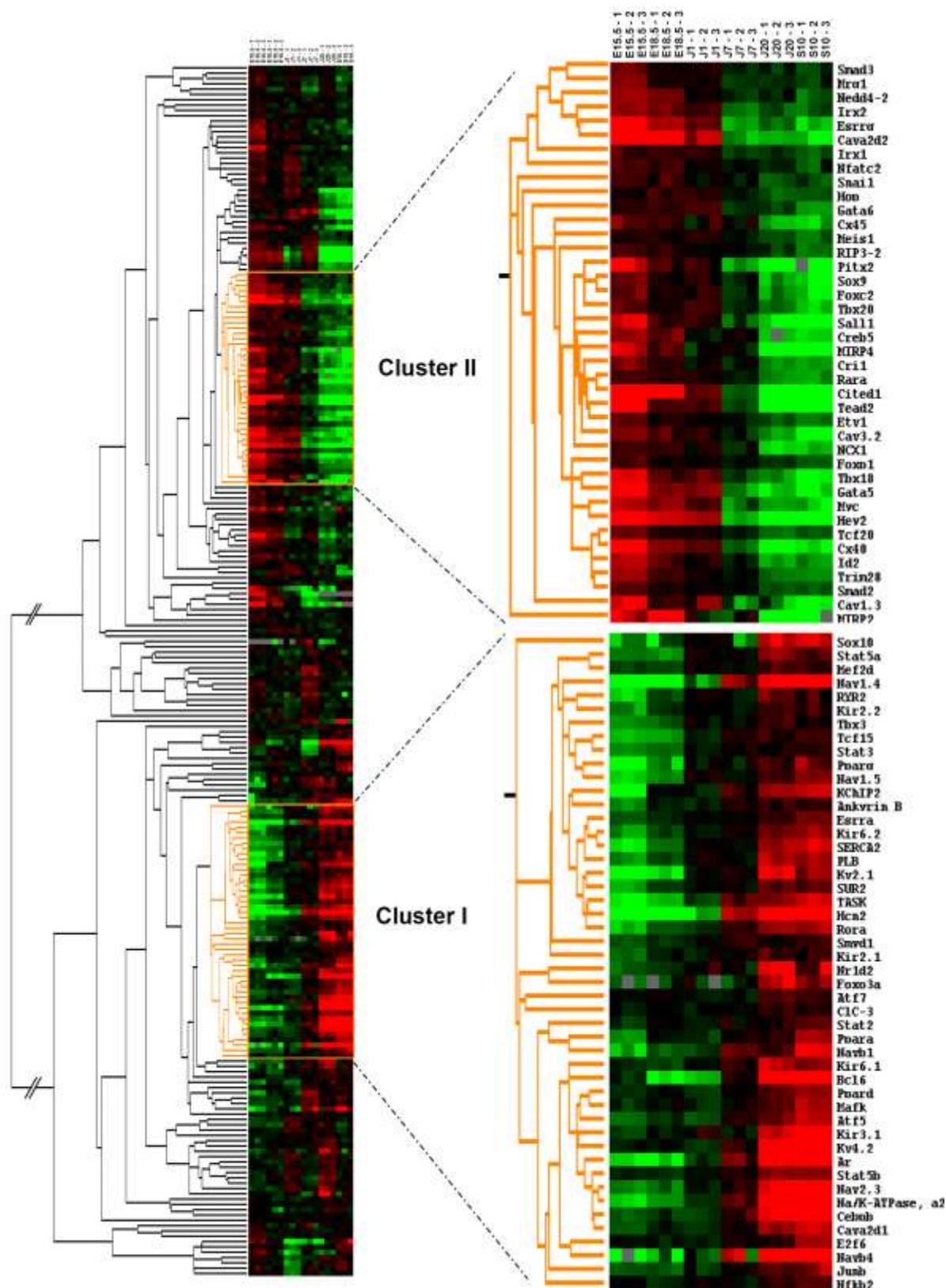


Figure 29 : Classification hiérarchique appliquée à 128 gènes codant les facteurs de transcription et les sous-unités des canaux ioniques (verticalement) et 6 stades de développement (E15.5, E18.5, P1, P7, P20, S10) du cœur de souris. La gamme de couleur s'étend du vert (moins exprimé) au rouge (plus exprimé). Les valeurs manquantes sont représentées en gris.

Le clustering obtenu met en évidence deux groupes de gènes dont l'expression est fortement corrélée. Le cluster I regroupe les gènes dont l'expression augmente au cours du temps. Le cluster II associe les gènes dont l'expression diminue au cours du développement cardiaque. Ces clusters rassemblent respectivement 48 et 40 gènes codant des canaux et des facteurs de transcription. Les canaux ioniques et les facteurs de transcription que nous avons identifiés préalablement comme ayant une expression qui augmente au cours du temps se retrouvent réunis au sein du cluster I. Ceux dont nous avons décrit une diminution de leur expression au cours du développement sont associés au sein du cluster II. Le but de cette association est de découvrir des régulations de canaux par les facteurs qui leur sont associés, au sein du même cluster.

Dans le premier cluster, nous pouvons citer à titre d'exemple les facteurs de transcription ATF6, Foxo3a, E2F6, et Esrr α , ainsi que les canaux Kir6.1, Kir6.2, Nav2.3. Dans le cluster II, les facteurs de transcription Nedd4-2, GATA5 et GATA6 sont associés aux connexines Cx40 et Cx45, ainsi qu'au canal Cav1.3 et à la sous-unité régulatrice Cav α 2 δ 2.

La représentation des données d'expression sous la forme des $2^{-\Delta Ct}$ moyens pour chaque stade (n=3) renseigne sur le niveau d'expression des gènes et permet d'avoir une vision plus précise des variations d'un gène au cours du développement par rapport à la méthode de clustering. Le test statistique de « *Kruskall et Wallis* » a été réalisé pour identifier les canaux et facteurs de transcription dont l'expression est significativement différente par rapport au stade E15.5. 90% et 92% des gènes des clusters I et II présentent une différence statistique significative dans un à trois stades de développement par rapport à E15.5.

Les figures montrées en **annexes 2-A à 2-D** représentent les niveaux d'expression. Plusieurs profils peuvent être distingués : 1/ des gènes sont faiblement exprimé (0<niveau d'expression<50 en valeur arbitraire). A titre d'exemple, nous pouvons citer le canal Cav1.3 et les facteurs de transcription Ar, Sox10, Foxc2. Malgré une expression faible, les variations de celle-ci sont statistiquement significatives entre le stade adulte et le stade embryonnaire E15.5. 2/ D'autres gènes ont un faible niveau d'expression au stade embryonnaire qui augmente brutalement aux stades adultes. Parmi ces gènes, on peut citer les canaux : Nav β 4, Kv2.1 et les facteurs de transcription Cebpb, et Stat5b. 3/ A l'inverse, des gènes ayant un niveau d'expression élevé aux stades embryonnaires voient leur expression diminuer fortement aux stades postnataux. C'est le cas des facteurs de transcription : NFATc2, Cited1 et Hey2. 4/ Enfin, certains gènes présentent un profil d'expression variant de façon plus progressive. Esrr α , Mef2d, Nav1.5 et RYR2 font parti des gènes dont l'expression augmente de façon régulière jusqu'au stade adulte. A l'inverse, une diminution

progressive est constatée pour d'autres gènes comme NCX1, RIP3-2, Cav3.2 ou encore Nedd4-2.

A.3.b Identification des réseaux de régulation

Le cluster I contient 23 canaux et 25 facteurs de transcription. Le cluster II contient 9 canaux et 31 facteurs de transcription. La validation biologique de l'ensemble de ces régulations potentielles n'étant pas possible, il convient d'affiner notre sélection. Afin d'identifier les facteurs de transcription les plus à même d'être impliqués dans la régulation des réseaux de canaux des clusters, nous nous sommes aidés des outils bioinformatiques.

*** Prédiction de la sur-représentation des éléments cis-régulateurs sur les promoteurs de chaque cluster**

Pour mettre en évidence la sur-représentation de la fixation d'un facteur de transcription appartenant à un cluster, on compare sa fixation sur les promoteurs des différents gènes du cluster par rapport à l'ensemble des promoteurs de la base « Cardiac Promoter Database ». Cette base contient les promoteurs de 1092 gènes cardiaques impliqués dans l'activité électrique du cœur. L'analyse statistique est réalisée en utilisant le test de Fisher.

La **Figure 30** illustre les résultats de cette analyse bioinformatique pour les cluster I et II. Les éléments cis-régulateurs des facteurs de transcription représentés en vert sont sur-représentés sur les promoteurs des gènes codant les canaux (indiqués en blanc).

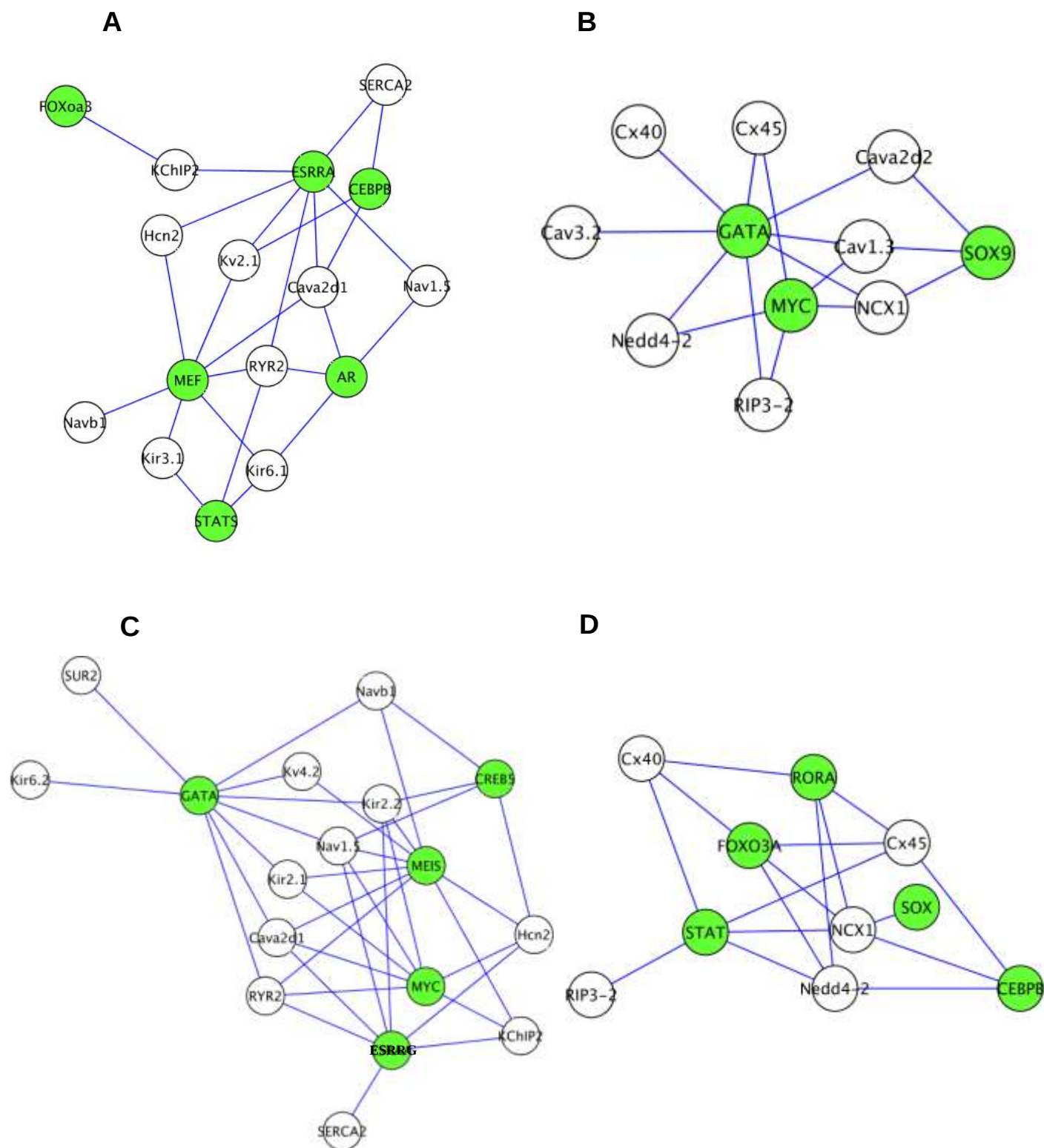


Figure 30 : Représentation des régulations découvertes par l'étude des FTs sur-représentés dans les clusters. En vert, les FTs et en blanc, les promoteurs des canaux ioniques. Chaque relation FT-promoteur représente une interaction directe prédite par analyse bioinformatique de la région promotrice. A/ réseau de régulation positive des FTs du cluster I sur les canaux du même cluster. B/ réseau de régulation positive des FTs du cluster II sur les canaux du même cluster. C/ réseau de régulation négative des FTs du cluster II sur les canaux du cluster I. D/ réseau de régulation négative des FTs du cluster I sur les canaux du cluster II.

La **Figure 30A** illustre les résultats obtenus avec les facteurs de transcription appartenant au cluster I sur les promoteurs des gènes de canaux du cluster I. Ils représentent donc des activateurs potentiels des canaux de ce cluster. On peut citer le facteur de transcription Esrr α qui pourrait réguler de façon positive la transcription des canaux : Nav1.5, Kv2.1, HCN2, RYR2, la pompe SERCA2 et les sous-unités KChIP2, Cav α 2 δ 1.

La **Figure 30B** concerne les gènes sous-exprimés au cours du développement (cluster II). L'analyse bioinformatique prédit une sur-représentation du facteur de transcription GATA sur les promoteurs du cluster II. GATA pourrait donc réguler positivement l'expression du réseau de canaux constitué des gènes codant pour les canaux Cav3.2, Cav1.3, Cav α 2 δ 2, l'échangeur NCX1, RIP3-2 (récepteur à l'IP3), Nedd4-2 et des gènes comme les connexines 40 et 45.

Afin d'identifier les facteurs de transcription répresseurs, nous avons réalisé la prédiction de la fixation des facteurs de transcription du cluster II sur les promoteurs gènes des canaux du cluster I (**Figure 30C**). Cette analyse montre que GATA pourrait réguler négativement un ensemble de protéines impliquées dans le signal électrique comme le canal sodique Nav1.5 et sa sous-unité régulatrice Nav β 1, ainsi que les canaux potassiques Kv4.2, Kir2.1 et Kir2.2 impliqués dans les courants I_{to} et I_{K1} . GATA pourrait également avoir un impact sur le courant K_{ATP} en jouant sur la régulation de Kir6.2 et la sous-unité SUR2.

De la même façon, l'analyse bioinformatique des facteurs de transcription de la **Figure 30D** représente le réseau de régulation négatif obtenu par l'étude de sur-représentation des facteurs de transcription du cluster I sur les promoteurs de gènes codant les canaux du cluster II.

En conclusion, on peut dire que des facteurs de transcription peuvent avoir un rôle activateur sur certains canaux et un rôle répresseur sur d'autres. Par ailleurs, nous avons décrits des facteurs de transcription capables d'activer ou de réprimer un même groupe de canaux. A titre d'exemple, GATA pourrait activer l'expression de Nedd4-2, Cx40, Cx45, NCX1, RIP3-2 (**Figure 30B**) et à l'inverse, STAT réprimerait leur expression (**Figure 30D**). Cependant, cette approche présente une limite. Nous pouvons prédire la probabilité de la fixation de tel facteur de transcription sur tel promoteur de canal grâce aux bases de données qui fournissent les matrices (séquence du site de fixation d'un facteur de transcription sur le promoteur). Malheureusement, ces éléments cis-régulateurs ne sont décrits que pour 300 facteurs de transcription seulement (correspondant aux 517 matrices disponibles, toutes espèces confondues). Un facteur de transcription peut en effet posséder plusieurs matrices différentes. Chez l'Homme, il existe près de 3000 facteurs de

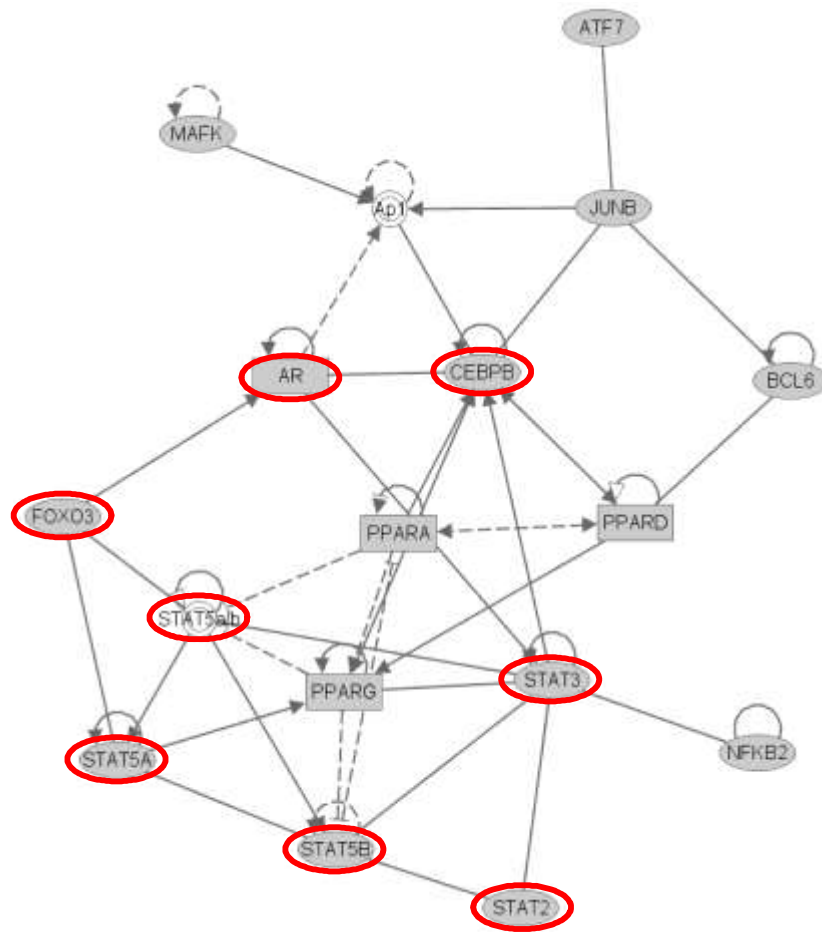
transcription. Une deuxième limite est due au fait que la séquence promotrice n'est pas toujours identifiée pour nos gènes d'intérêts.

*** Réseaux d'interaction entre les facteurs de transcription co-régulés au cours du développement et de la maturation**

Nous avons ensuite utilisé la base de données Ingenuity, qui repose sur les données bibliographiques, dans le but de déterminer si les facteurs de transcription sont connus pour interagir entre eux. Il s'agit de la plus grande base de données de cette nature qui héberge les relations biologiques et chimiques extraites de la littérature scientifique. A partir d'une liste de gènes, cette base construit les réseaux de régulation et d'interactions connus entre les facteurs de transcription. Les interactions directes entre deux molécules sont représentées par un trait plein. L'interaction indirecte est schématisée en pointillé. Cette dernière correspond à une régulation des facteurs de transcription entre eux, faisant intervenir des molécules intermédiaires.

Les interactions entre les facteurs de transcription du cluster I sont illustrées dans la **Figure 31A**. Huit facteurs de transcription sont annotés en rouge. Ils correspondent aux facteurs de transcription identifiés par l'analyse bioinformatique précédente. La **Figure 31B** correspond au réseau obtenu avec la liste des facteurs de transcription du cluster II.

A



B

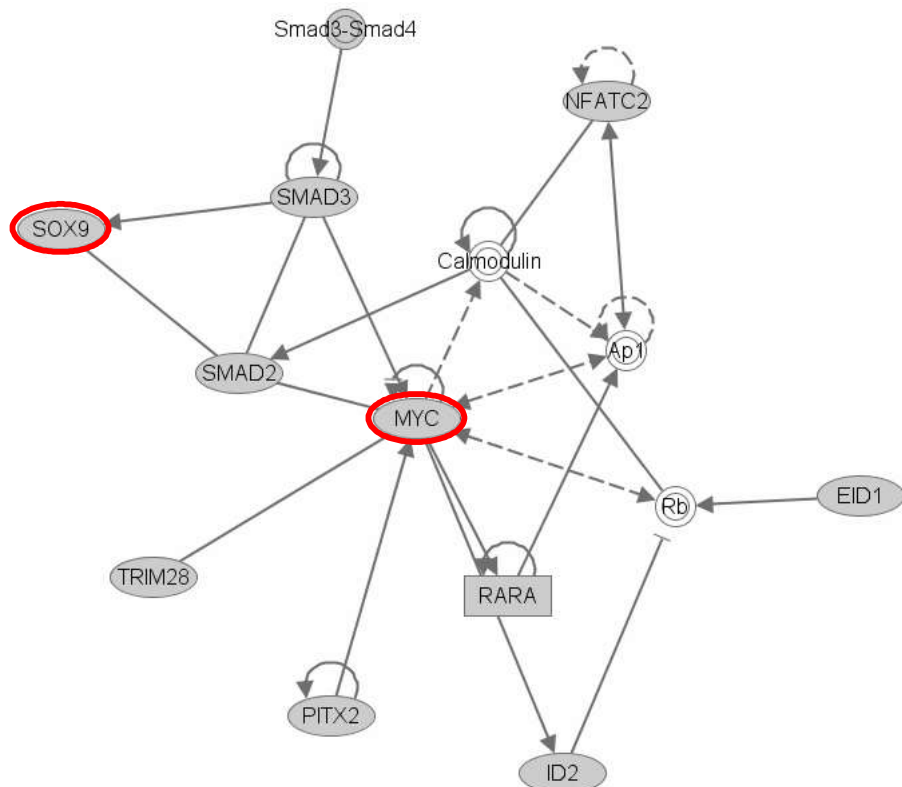


Figure 31 : Réseaux de régulation et d'interaction de FTs réalisé d'après Ingenuity. A/ réseau des FTs UP au cours du développement (cluster I). **B/** réseau des FTs DOWN au cours du développement (cluster II). En rouge sont marqués les FTs sur-représentés d'après l'analyse bioinformatique.

En conclusion, nous avons mis en évidence pour la première fois les profils d'expression de 70 canaux et 158 facteurs de transcription au cours du développement et de la maturation cardiaque chez la souris. Cela nous a permis d'identifier 23 canaux et 25 facteurs de transcription sur-exprimés au cours du temps et 9 canaux et 31 facteurs de transcription sous-exprimés. L'analyse bioinformatique a permis de déterminer les régulations les plus probables des facteurs de transcription sur la transcription des canaux. Nous pouvons citer par exemple les facteurs de transcription Ar et Esrr α , qui pourraient réguler positivement la transcription du canal Nav1.5. Esrr α serait également capable de réguler positivement les protéines de l'homéostasie calcique SERCA2 et RYR2. Stat5b pourrait assurer la régulation des canaux rectifiant entrant Kir3.1 et Kir6.1. Mef2d contrôlerait HCN2 et Kv2.1, tandis que GATA dirigerait la transcription des sous-unités calciques Cav α 2 δ 2, Cav3.2 et Cav1.3. Ce dernier serait également sous le contrôle des facteurs Myc et Sox9. Concernant les facteurs de transcription ayant un rôle inhibiteur, nous pouvons citer GATA, qui régulerait le canal Nav1.5 et sa sous-unité régulatrice Nav β 1, ainsi que le canal Kv4.2. Le facteur Meis1 influencerait la transcription des canaux potassiques Kv4.2 et sa sous-unité régulatrice KCHIP2, Kir6.2 et sa sous-unité SUR2, ainsi que les canaux potassiques rectifiants Kir2.1 et Kir2.2. Foxo3a régulerait quant à lui les connexines 40 et 45 de façon négative.

B. Mécanismes qui sous-tendent le remodelage électrique qui précède l'hypertrophie ventriculaire dans un modèle d'insuffisance cardiaque chez la souris

La dissection des voies de signalisation moléculaire du processus d'hypertrophie représente un challenge important car elle peut révéler des pistes thérapeutiques. Le remodelage ventriculaire est lié à la libération paracrine et autocrine d'angiotensine II, à l'augmentation du calcium intracellulaire, à la libération du facteur natriurétique atrial et du TNF- α , et à la réexpression de gènes fœtaux (Massin & Coremans, 2001). Ce dernier point est en lien direct avec notre étude précédente.

B.1. Remodelage électrique induit par un bloc auriculo-ventriculaire complet chez la souris

L'insuffisance cardiaque est un problème majeur de santé publique dans les pays industrialisés, avec une mortalité à 8 ans de plus de 80% (Tomaselli & Zipes, 2004). Près de 50% des décès sont soudains et inattendus. L'incidence élevée de la mort subite est liée à la survenue de troubles du rythme ventriculaires qui sont la conséquence de modifications d'expression des canaux ioniques (ou remodelage ionique) (Tomaselli & Marban, 1999). Les études consacrées à la caractérisation du remodelage des canaux ioniques dans les modèles d'hypertrophie ventriculaire (typiquement un allongement de la durée du potentiel d'action) et d'insuffisance cardiaque ont été limitées à quelques gènes. Une caractérisation exhaustive de ce remodelage est pourtant indispensable à la compréhension des mécanismes des troubles du rythme et à leur prévention. Longtemps considéré comme une conséquence de l'hypertrophie, le remodelage ionique pourrait à l'inverse en être un précurseur, comme le suggère une étude sur un modèle canin d'hypertrophie secondaire à un bloc auriculo-ventriculaire complet (BAVc) (Schoenmakers *et al.*, 2003).

Notre hypothèse est que le remodelage électrique précoce et l'hypertrophie ventriculaire sont associés à un remodelage ionique complexe. Nous avons développé un nouveau modèle de BAVc chez la souris afin de caractériser à large échelle la cinétique d'apparition du remodelage ionique associé à ces deux processus. De plus, nous avons vérifié si l'amplitude du principal courant repolarisant chez la souris I_{to} était modifié et nous avons déterminé si la variation de ce courant précède ou non l'apparition du processus hypertrophique.

B.1.a. BAVc, arythmies précoces et hypertrophie

L'induction du BAVc induit une forte bradycardie ventriculaire (fréquence divisée par ~2.5) et un allongement significatif des intervalles QRS et QT (Table 1 de la publication « **Time-course of molecular remodeling and spontaneous ventricular tachycardia in a mouse model of acute complete atrioventricular block** », en fin du manuscrit de thèse).

Le suivi télémétrique des souris a mis en évidence des épisodes spontanés de tachycardies ventriculaires polymorphes dans les 24 heures qui suivent l'induction du BAVc (Figures 2A et 2B de la publication). Ces arythmies précèdent l'augmentation du poids du cœur qui survient 2 jours post-BAVc (Table 1 de la publication). Cette augmentation du poids du cœur est associée à des modifications d'expression des gènes codant pour des protéines

contractiles et des marqueurs de l'hypertrophie (Figure 3 de la publication). Ainsi, les actines α cardiaque et squelettique, la chaîne lourde β de la myosine (β -MHC) et le facteur natriurétique neuronal (BNP) sont sur-exprimés de façon significative dans les cœurs des souris en BAVc par rapport aux cœurs des souris n'ayant pas subi la procédure de BAV. A l'inverse, la troponine I cardiaque et la chaîne légère de la myosine 2 ventriculaire (MLC2V) sont sous-exprimés. La fonction ventriculaire a également été explorée. A l'aide de cathéters de mesures de pression, nous avons observé que 5 jours après l'induction du BAVc, les souris conservent une fonction contractile ventriculaire et une pression systolique inchangées par rapport au groupe de souris contrôles. En revanche, la pression diastolique et la relaxation des ventricules sont diminuées. Nous interprétons ces données comme l'établissement d'une hypertrophie compensée au cinquième jour après l'induction du BAVc.

B.1.b. Remodelage ionique précoce

L'étude des profils d'expression des gènes codant pour les sous-unités α et β des canaux ioniques cardiaques, les connexines et les protéines de l'homéostasie calcique par la technologie des TLDA a montré la mise en place d'un remodelage ionique complexe en deux temps. La phase précoce apparaît dans les premières heures post-BAVc, et la deuxième phase plus tardive, associé au développement de l'hypertrophie, se met en place à partir du deuxième jour après l'induction du BAVc (Figure 4 de la publication). Dans les premières heures post-BAVc, l'adaptation au rythme idio-ventriculaire se traduit par une modification de l'expression des sous-unités α et β des canaux ioniques, certaines sont transitoires et d'autres, au contraire, se maintiennent dans le temps (Figures 5, 6 et 7 de la publication). Douze heures après l'induction du BAVc, 5 gènes sont sur-exprimés incluant Nav1.5, Kv1.5, Kv2.1, et 9 gènes sont sous-exprimés dont Nav β 1, MinK, la connexine 43 (Cx43). L'altération de l'expression de ces gènes est transitoire (Nav1.5, Kv1.5, Nav β 1, Cx43) ou maintenue (Kv2.1, MinK) aux deuxième et cinquième jours post-BAVc. Parmi les gènes codant les canaux potassiques dont l'expression varie précocement, la sous-unité α Kv4.2 est diminuée de façon transitoire à 1 et 2 jours puis revient à son niveau contrôle à 5 jours. L'expression du gène codant pour sa sous-unité régulatrice KCHIP2 diminue selon la même cinétique mais ne revient pas à son niveau initial au cinquième jour. L'expression de 10 autres gènes codant les sous-unités des canaux ioniques est altérée à partir du deuxième jour (dont KvLQT1, Kir6.2) ou au cinquième jour (Cav1.2, Kir6.1). L'expression de gènes codant des protéines de l'homéostasie calcique est aussi altérée durant la phase tardive du remodelage ionique, dont SERCA2 et RYR2.

B.1.c. Diminution transitoire du principal courant repolarisant I_{to}

En relation avec l'allongement du QT, l'hypertrophie ventriculaire est généralement associée à une diminution de l'amplitude des courants K^+ repolarisants. Chez la souris, la repolarisation dépend fortement du courant I_{to} . Nous avons donc vérifié si les modifications transcriptionnelles observées pour Kv4.2 et KChIP2 ont une répercussion au niveau protéique et au niveau fonctionnel sur le courant I_{to} . Nos résultats montrent une diminution de l'expression de la protéine Kv4.2 et une diminution du courant I_{to} . Ces corrélations n'ont pas pu être établies en ce qui concerne KChIP2 (Figure 8 de la publication).

Dans ce modèle, nous avons mis en évidence deux types de remodelage ionique. Un remodelage précoce lié aux troubles du rythme avant le premier jour post-BAVc, et un remodelage tardif lié à l'hypertrophie ventriculaire à partir du deuxième jour. Contrairement aux modèles de chien et de lapin, une diminution transitoire de I_{to} est observée après la survenue des troubles du rythme et avant le processus hypertrophique. Nos résultats suggèrent que la variation d' I_{to} dépendrait de mécanismes différents de ceux impliqués dans les troubles du rythme et/ou l'hypertrophie. Cependant, il reste difficile de conclure de façon définitive sur le rôle précis de la réduction de I_{to} dans le déclenchement de l'hypertrophie dans notre modèle. Cette diminution pourrait en effet constituer un signal déclencheur du remodelage ionique associé à l'hypertrophie qui permet par exemple l'activation de voies transcriptionnelles. Dans ce modèle, la cinétique de variation de l'expression des canaux ioniques nous paraît être pertinente pour étudier les facteurs de transcription impliqués dans la régulation de leur expression. Cette étude sera présentée dans la partie suivante.

B.2. Mécanisme du remodelage électrique associé à un bloc auriculo-ventriculaire complet chez la souris

Le modèle murin de bloc auriculo-ventriculaire complet (BAVc) montre un remodelage des canaux ioniques précoce, associé à des troubles du rythme précédant l'hypertrophie ventriculaire. L'objectif de la seconde partie de ce projet est d'identifier les régulateurs de la transcription des sous-unités des canaux ioniques qui sont responsables du remodelage ionique précoce chez la souris en BAVc. Nous avons évalué le profil d'expression ventriculaire de 157 gènes codant des facteurs de transcription et cofacteurs par RT-PCR quantitative à haut-débit (*Low Density Arrays*) à 12 h, 24 h, 2 et 5 jours après l'induction du bloc de conduction. La corrélation entre les profils d'expression de ces facteurs

de transcription et ceux des sous-unités des canaux ioniques obtenus dans la première partie de cette étude, ainsi que l'utilisation d'outils de bioinformatique, ont permis de proposer des facteurs de transcription susceptibles de réguler l'expression des canaux ioniques cardiaques Nav1.5 et Kv1.5.

B.2.a. Corrélations des profils d'expression ventriculaire des sous-unités des canaux ioniques et des régulateurs de la transcription en fonction du temps chez la souris en BAVc

Parmi les 157 gènes codant les régulateurs de la transcription analysés (**Annexe 3**), l'expression de 133 gènes a pu être détectée dans le ventricule gauche des souris. Les amplifications des gènes codant les facteurs Hand1 et Mef2c sont de mauvaise qualité et inexploitable au vu de trop grandes variabilités, signe d'une mauvaise qualité des sondes utilisées. Vingt-deux autres gènes codant des régulateurs de la transcription n'ont pas été analysés du fait de leur trop faible expression dans plus de 75% des échantillons testés.

Au regard de la cinétique de variation de l'expression des gènes (**Figure 32**), 3 groupes de gènes, comprenant des "vagues" de régulation précoce (cluster I), intermédiaire (cluster II) et tardive (cluster III), sont mis en évidence (**Figure 32A**). Nous nous focalisons sur les modifications transcriptionnelles de la phase précoce.

Cette phase contient les facteurs de transcription susceptibles de réguler non seulement la transcription des canaux ioniques du même groupe, mais aussi celle des groupes suivants. Ce cluster I contient 7 canaux ioniques, et 17 facteurs de transcription et cofacteurs (**Figure 32B**).

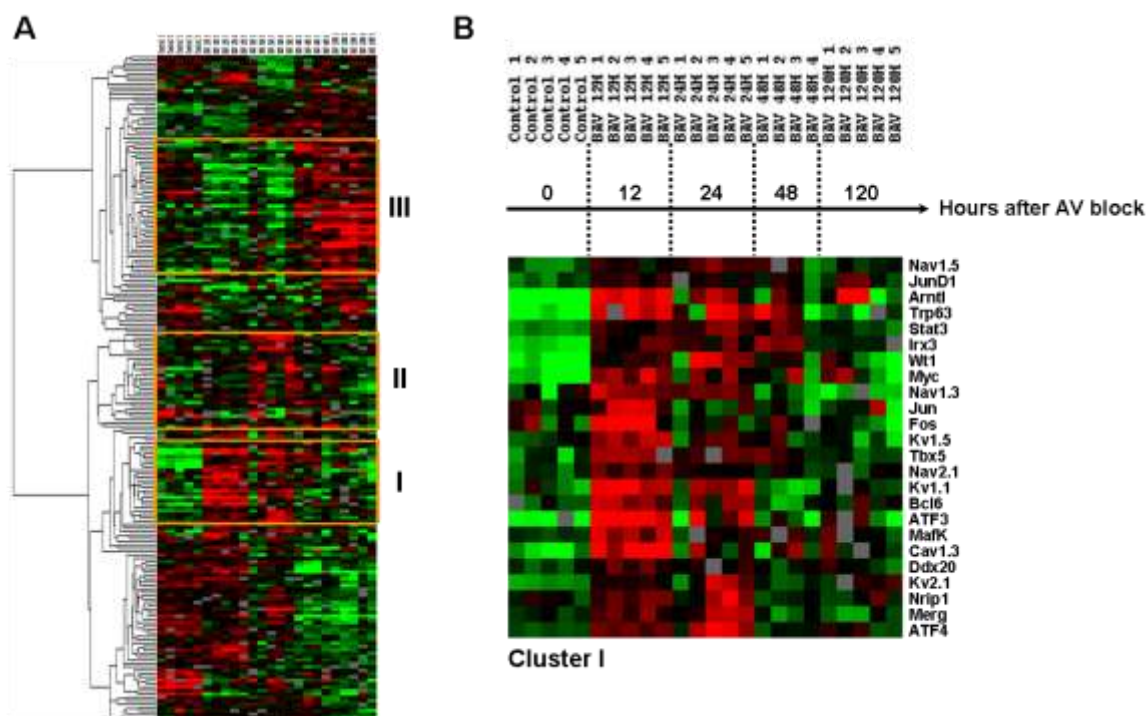


Figure 32 : Modifications de l'expression ventriculaire des sous-unités des canaux ioniques et des régulateurs de la transcription en fonction du temps après induction d'un bloc auriculo-ventriculaire complet (BAVc) chez la souris. **(A)** Classification hiérarchique appliquée à 197 gènes comprenant 133 régulateurs de la transcription et 64 sous-unités des canaux ioniques (verticalement). Les échantillons ventriculaires des souris contrôles, et des souris en BAVc, sacrifiées 12 h (BAV 12H), 24 h (BAV 24H), 2 jours (BAV 48H), et 5 jours (BAV 120H) après son induction sont classés en fonction de la cinétique (horizontalement). Chaque gène et chaque échantillon sont représentés par une ligne et une colonne, respectivement. Chaque case colorée correspond au niveau d'expression relative du gène (ΔCt). La gamme de couleur s'étend du vert lumineux (moins exprimé) au rouge lumineux (plus exprimé). Les valeurs manquantes sont représentées en gris. Trois groupes de gènes qui reflètent les vagues d'activation de l'expression des gènes en fonction du temps ont été sélectionnés : gènes avec une surexpression précoce (Cluster I), intermédiaire (Cluster II) et tardive (Cluster III). **(B)** Détail du groupe de gènes surexprimés précocement (Cluster I) comprenant 7 canaux ioniques et 17 régulateurs de la transcription.

La **figure 33** illustre les profils d'expression typiques des gènes appartenant au cluster I. Parmi ces gènes, on retrouve le principal canal sodique cardiaque Nav1.5 et le canal potassique Kv1.5, générant respectivement les courants I_{Na} et I_{Kslow1} , ainsi que les facteurs de transcription ATF3, ATF4, Jun et Fos.

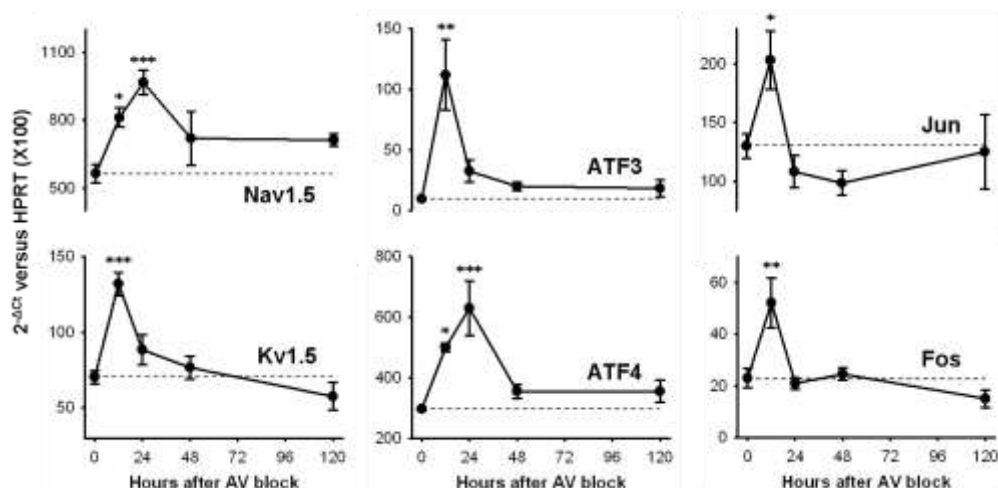


Figure 33 : Profils d'expression représentatifs des gènes codant les canaux ioniques et les facteurs de transcription du cluster I en fonction du temps après induction d'un bloc auriculo-ventriculaire complet (BAVc) chez la souris. L'expression relative des gènes (axe Y) en fonction du temps (axe X) est exprimée en $2^{-\Delta C_t}$, représentant le ratio d'expression du gène par rapport au gène de référence HPRT (X100), et correspond à la moyenne $\pm$ SEM calculée à partir de 4 à 5 ventricules gauche de souris contrôles (temps 0), et des souris en BAVc, sacrifiées 12 h, 24 h, 48 h et 120 heures après son induction. Significativité du test de Tukey : *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ versus les souris contrôles.

B.2.b. Analyse bioinformatique de réseaux d'interaction des régulateurs de la transcription sur-exprimés précocement après l'induction du bloc auriculo-ventriculaire complet

La pertinence des regroupements des facteurs de transcription et cofacteurs appartenant au cluster I est testée en utilisant *Ingenuity Pathways Analysis*, qui reconstitue des réseaux de gènes connus pour interagir entre eux d'après les données de la littérature. Parmi les 17 régulateurs de la transcription contenus dans le cluster I, 12 sont connus pour interagir entre eux (**Figure 34**). De plus, il faut noter que la moitié d'entre eux (ATF3, ATF4, Fos, Jun, JunD1 et MafK) appartiennent à la famille des AP-1 (activating-proteins 1) (Karin et al., 1997).

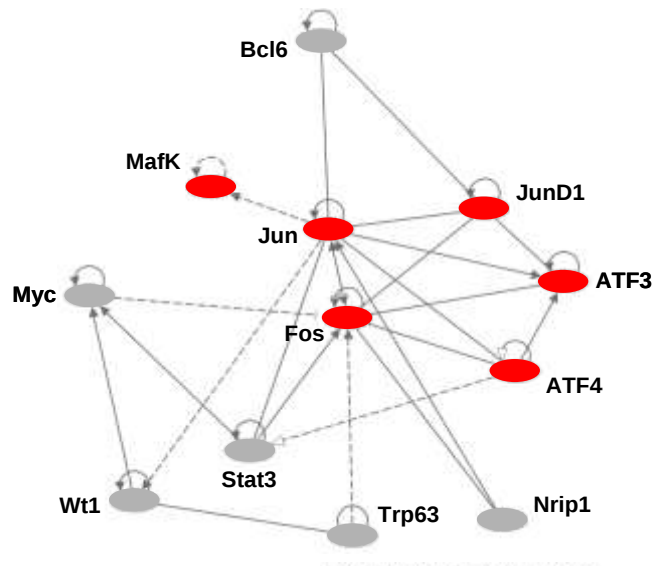


Figure 34 : Réseaux d'interaction connus entre les régulateurs de la transcription sur-exprimés à 12 h après l'induction du bloc auriculo-ventriculaire complet chez la souris. Ces réseaux ont été établis en utilisant *Ingenuity Pathways Analysis* (<https://analysis.ingenuity.com>). Les ellipses symbolisent les régulateurs de la transcription appartenant au cluster I. Les membres de la famille AP-1 (activating proteins 1) sont indiqués en rouge.

B.2.c. Analyses bioinformatiques de la sur-représentation des éléments *cis*-régulateurs dans les promoteurs des gènes sur-exprimés précocement après l'induction du bloc auriculo-ventriculaire complet

Parmi les facteurs de transcription appartenant aux réseaux indiqués sur la **figure 32**, nous avons identifié ceux dont les éléments *cis*-régulateurs sont surreprésentés dans l'ensemble des promoteurs des gènes qui sont sur-exprimés 12 heures après le bloc de conduction dans notre modèle murin : promoteurs des gènes codant pour les régulateurs de la transcription et pour les canaux ioniques confondus. Les prédictions ont été réalisées en utilisant notre base de données de promoteurs et nos outils de prédiction des éléments *cis*-régulateurs des promoteurs des gènes (*Cardiac Promoter Database*, http://cardioserve.nantes.inserm.fr/cardiac_database). Les prédictions ont été testées pour les facteurs de transcription dont la différence d'expression était statistiquement significative à 12 heures et pour lesquels nous disposions de matrices de bonne qualité pour leurs éléments *cis*-régulateurs. L'analyse a été réalisée sur la séquence des gènes allant de -2000 pb en amont à +500 pb en aval du principal départ de transcription.

La prédiction montre que l'élément *cis*-régulateur ATF (M00017), un membre de la famille des CREB/ATF, se fixe sur 11 promoteurs, avec la probabilité de 1/1000 que cette fixation soit due au hasard (**Figure 35A**).

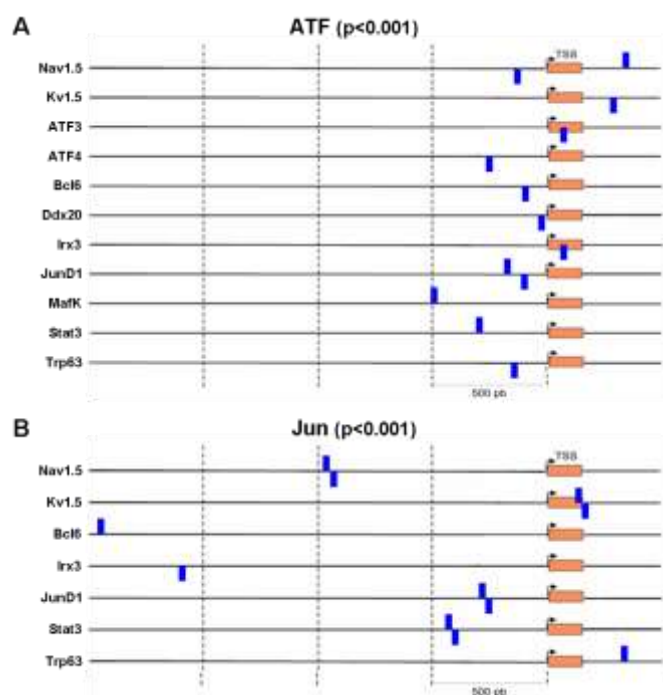


Figure 35 : Prédictions bioinformatiques de la surreprésentation des éléments *cis*-régulateurs ATF et Jun sur les promoteurs des gènes sur-exprimés 12 heures après l'induction du bloc de conduction. **(A)** Surreprésentation de la présence de l'élément *cis*-régulateur ATF (M00017). **(B)** Surreprésentation de la présence de l'élément *cis*-régulateur Jun (M00041). Les prédictions ont été réalisées en utilisant notre base de données de promoteurs et nos outils de prédiction des éléments *cis*-régulateurs (Cardiac Promoter Database, http://cardioserve.nantes.inserm.fr/cardiac_database). L'analyse a été réalisée sur la séquence du gène allant de -2000 pb en amont à +500 pb en aval du départ de transcription indiqué par une flèche (TSS, Transcription Start Site). Les sites de prédiction de fixation des facteurs de transcription sont symbolisés par les rectangles bleus. La prédiction est effectuée en scannant les deux brins de la séquence : brin sens (orientation vers le haut du rectangle) et brin anti-sens (orientation vers le bas du rectangle). p, significativité du test exact de Fischer.

ATF se fixe notamment sur les promoteurs des gènes codant Nav1.5 et Kv1.5, suggérant qu'ATF3 et/ou ATF4 régule l'expression de ces canaux. De même, la prédiction de la fixation de Jun (M00041) se retrouve sur 7 promoteurs, avec la probabilité de 1/1000 que cette fixation soit due au hasard (**Figure 35B**). Jun se fixe aussi potentiellement sur les promoteurs des gènes codant Nav1.5 et pour Kv1.5, suggérant que ces deux canaux pourraient être co-régulés à la fois par les ATFs et par Jun.

Notre modèle de souris en BAVc présente un remodelage précoce des canaux ioniques dont une augmentation de l'expression des canaux Nav1.5 et Kv1.5, générant les courants dépolarisant I_{Na} et repolarisant I_{Kslow1} , respectivement. Nous nous sommes servis de cette cinétique de remodelage ionique dans ce modèle afin d'identifier les régulateurs de la transcription des sous-unités des canaux ioniques.

Nous avons corrélié les profils d'expression des régulateurs de la transcription avec ceux des sous-unités des canaux ioniques. L'utilisation d'outils de bioinformatique a permis de proposer les facteurs de transcription de la famille AP-1 (ATF3, ATF4 et Jun) comme des

candidats à la régulation de l'expression des canaux ioniques cardiaques Nav1.5 et Kv1.5, suggérant que ces deux canaux pourraient être co-régulés. La suite de cette étude consiste à établir la validation biologique des régulations transcriptionnelles des canaux ioniques.

B.3. Mise en évidence d'un répresseur potentiel (Mef2d) du principal canal sodique cardiaque (Nav1.5)

Les membres de la famille des facteurs de transcription Mef2 ont un rôle bien connu en tant que régulateurs de l'expression des gènes cardiaques durant le développement. Dans cette famille, Mef2d y joue un rôle particulier. En effet, les souris ayant une mutation perte-de-fonction de ce gène sont viables, mais elles ne développent aucune réponse au stress qui conduit normalement à une hypertrophie cardiaque, une fibrose, et à l'activation des gènes fœtaux (Kim *et al.*, 2008). D'autre part, nous savons, grâce au modèle de souris KO hétérozygotes pour le gène *SCN5A* à notre disposition, que ce dernier est responsable de développement d'anomalies de conduction et de fibrose en cas de dysfonctionnement (Royer *et al.*, 2005). De plus, une de nos études a également montré un gradient d'expression inverse entre *MEF2D* et *SCN5A* entre l'épicarde et l'endocarde. Nous avons donc émis l'hypothèse que Mef2d serait un régulateur de Nav1.5 (codé par *SCN5A*). Dans notre modèle de BAVc, les 2 gènes ont un profil d'expression inverse après l'induction du bloc auriculo-ventriculaire (**Figure 36**).

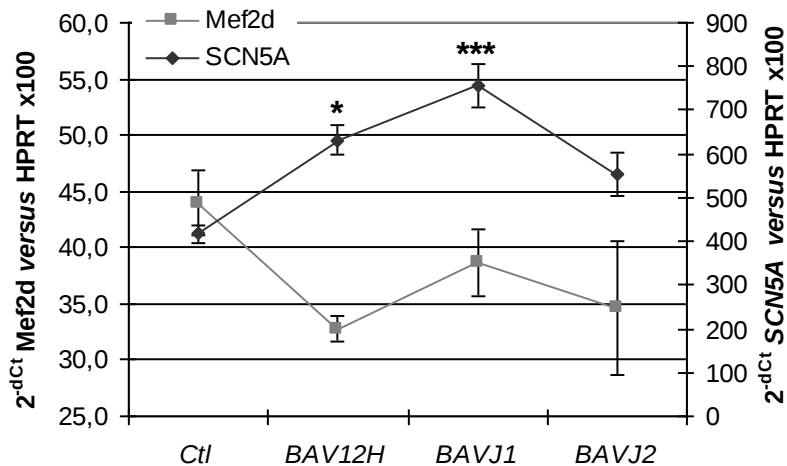


Figure 36 : Profils d'expression représentatifs des gènes codant le canal ionique Nav1.5 et le facteur de transcription Mef2d en fonction du temps après induction d'un bloc auriculo-ventriculaire complet (BAVc) chez la souris. L'expression relative des gènes (axe Y) en fonction du temps (axe X) est exprimée en $2^{-\Delta C_t}$, représentant le ratio d'expression du gène par rapport au gène de référence HPRT (X100), et correspond à la moyenne $\pm$ SEM calculée à partir de 4 à 5 ventricules gauche de souris contrôles (temps 0), et des souris en BAVc, sacrifiées 12 h, 24 h, 48 h et 120 heures après son induction. Significativité du test de Tukey : *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ versus les souris contrôles.

La transfection (par nucléofection) de siRNA dirigé contre Mef2d a été réalisée dans des cardiomyocytes néonataux de souris. Nous avons évalué d'une part les modifications de l'expression de ce facteur Mef2d dans les cardiomyocytes, et les variations de l'expression du gène SCN5A d'autre part. Les résultats sont présentés dans les **Figures 37 et 38** suivantes.

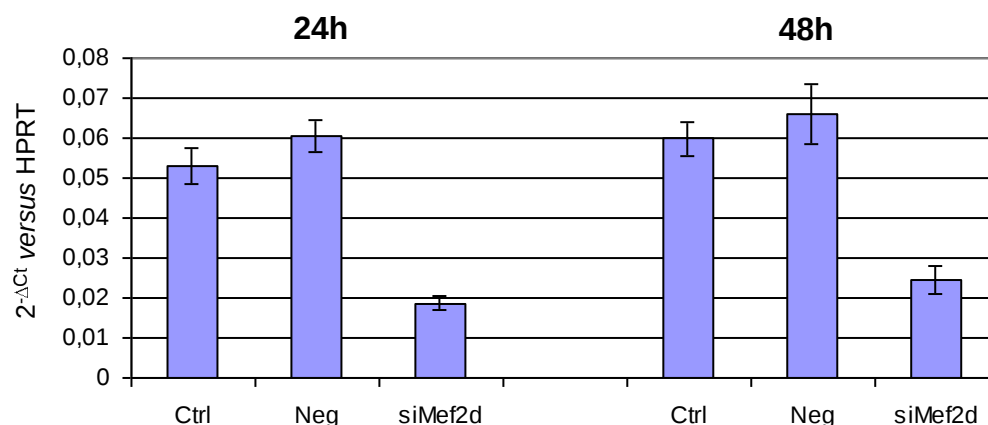


Figure 37 : Profils d'expression du gène Mef2d. L'expression relative (axe Y) en fonction des conditions de transfection (axe X) est exprimée en $2^{-\Delta C_t}$, représentant le ratio d'expression du gène par rapport au gène de référence HPRT, et correspond à la moyenne $\pm$ SEM calculée à partir de N=6 transfections. Les cellules non transfectées sont identifiées comme « Ctrl », les cellules transfectées par un siRNA scramble par « Neg », et les cellules transfectées par le siRNA dirigé contre Mef2d par « siMef2d ».

Après 24 et 48h de culture, l'expression de Mef2d ne change pas dans les cellules non transfectées. Pour bien les interpréter, nous comparons les données de l'expression de Mef2d obtenues entre des cellules transfectées par un siRNA scramble *versus* des cellules transfectées par le siRNA dirigé contre Mef2d. L'expression de Mef2d dans les cellules transfectées par le siRNA scramble ne varie pas par rapport à celle observée dans les cellules contrôles, ni à 24h, ni à 48h. La nucléofection n'influence pas cette expression. La transfection du siMef2d diminue l'expression de sa cible de 60% environ au bout de 24h, et cette diminution est conservée jusqu'à 48h après la nucléofection.

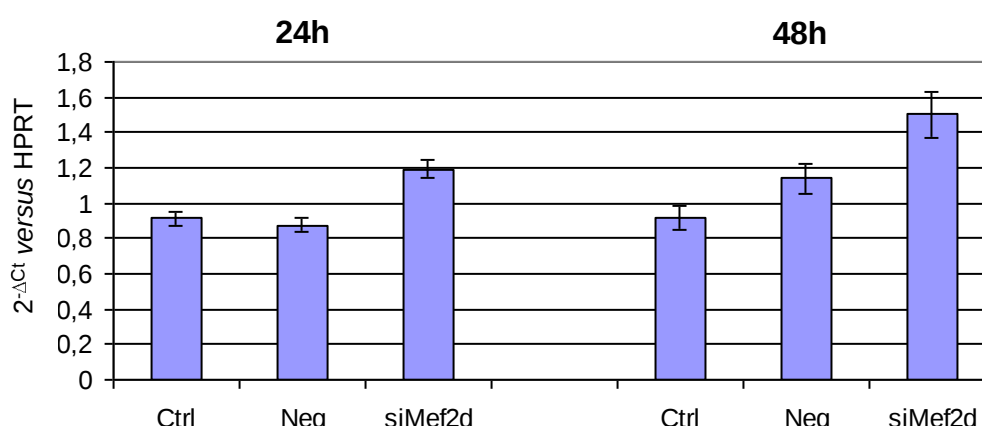


Figure 38 : Profils d'expression du gène *SCN5A*. L'expression relative (axe Y) en fonction des conditions de transfection (axe X) est exprimée en $2^{-\Delta C_t}$, représentant le ratio d'expression du gène par rapport au gène de référence *HPRT*, et correspond à la moyenne $\pm$ SEM calculée à partir de N=6 transfections.

L'expression de *SCN5A* ne varie pas dans les cellules contrôles 24h ou 48h après ensemencement. Dans les cellules transfectées par le siRNA scramble, l'expression de *SCN5A* est identique à celle observée dans les cellules contrôles. Son expression augmente par contre très légèrement 48h après la transfection. L'expression de l'ARNm de *SCN5A*, sous l'effet de la nucléofection du siMef2d, est augmentée de 45% 24h après la transfection, et elle reste augmentée de 30% après 48h.

Ces premières données nous montrent un rôle potentiel de Mef2d en tant que régulateur négatif de *SCN5A*. Nous avons cherché à vérifier ces résultats par Western-blot en observant, sur les mêmes cellules, les variations d'expression de la protéine Nav1.5, canal sodique codé par *SCN5A* (**Figure 39**).

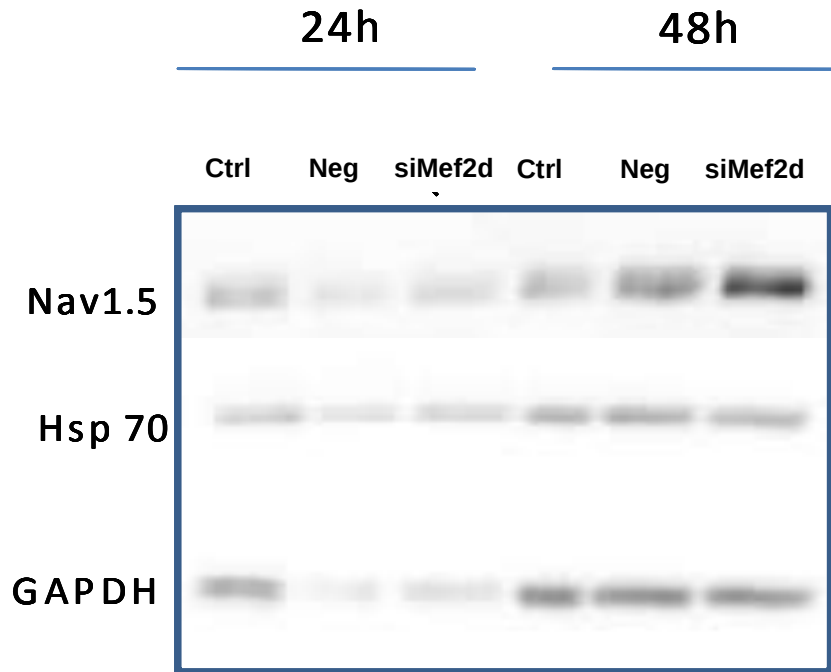


Figure 39 : Analyse par Western-blot du canal Nav1.5 à 24h et 48h, dans des cardiomyocytes néonataux de souris non transfectés (Ctrl), transfectés par un siRNA scramble (Neg), ou par un siRNA dirigé contre Mef2d (siMef2d). Nav1.5 est révélé par un anticorps anti-Nav1.5. Hsp70 et GAPDH sont utilisés comme contrôle de dépôt.

Ces résultats concordent avec les variations de l'ARNm observées. La quantité de protéine Nav1.5 augmente légèrement à 24h puis nettement 48h après la nucléofection du siRNA dirigé contre Mef2d. L'augmentation de 50% de l'expression de la protéine 48h après la transfection est en décalage avec l'augmentation de l'expression des l'ARNm de *SCN5A* qui a lieu plus tôt. Ce décalage peut s'expliquer par le fait que demie-vie de Nav1.5 est estimée à 35 h. L'augmentation de la transcription de *SCN5A* aura donc un impact sur la traduction qui aura lieu plusieurs heures plus tard. Ces résultats suggèrent que Mef2d serait un facteur de transcription inhibiteur de *SCN5A* dans notre modèle d'insuffisance chez la souris.

Nous envisageons de poursuivre des expérimentations pour valider notre hypothèse. Nous devons vérifier par des techniques de biochimie que Mef2d est capable de se fixer sur le promoteur de *SCN5A*. Des expériences complémentaires de patch clamp seront menées afin de démontrer les implications électrophysiologiques sur le courant I_{Na} lors de l'extinction de Mef2d dans des cardiomyocytes néonataux de souris nouveaux-nés.

DISCUSSION

A. Intérêt de l'approche génomique des canaux ioniques et des facteurs de transcription

Notre approche novatrice dans le domaine de l'électrophysiologie cardiaque permet d'appréhender sans *a priori* les régulateurs potentiels de la transcription des canaux ioniques. Fort de notre expérience de génomique, la stratégie que nous avons choisi d'adopter a consisté à établir des **corrélations entre les profils** d'expression transcriptionnels des canaux ioniques et des facteurs de transcription cardiaques dans différentes conditions physiologiques et pathologiques. Notre stratégie repose en effet sur l'hypothèse selon laquelle les facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression des canaux ioniques partagent avec ceux-ci un profil d'expression similaire. Afin de tester la pertinence des clusters et ne pouvant pas tester biologiquement l'ensemble des facteurs de transcription susceptibles de réguler l'expression des canaux ioniques de ces clusters, nous avons utilisé des outils bioinformatiques. Nous avons ainsi pu mettre en évidence certaines régulations putatives, avant de réaliser les validations biologiques nécessaires. Cette dernière étape nécessite la mise en œuvre de techniques de biochimie et d'explorations fonctionnelles *in vitro* et *in vivo*.

Cette approche présente toutefois une critique majeure liée au fait que l'activité des facteurs de transcription peut ne pas être régulée par leur niveau d'expression transcriptionnel, mais par d'autres mécanismes tels que leur translocation dans le noyau et/ou des modifications post-traductionnelles. Cependant, une étude récente, utilisant la même méthodologie que la notre, a pu montrer que ATF3 régulait négativement l'expression de TLR4 (*Toll-like receptor 4*) dans les macrophages (Gilchrist *et al.*, 2006). Ce travail illustre donc que le niveau d'expression d'une partie des facteurs de transcription corrèle avec leur niveau d'activité.

B. Quelle est la significativité des clusters des canaux ioniques ?

B.1. La méthode de clustering

La classification (ou clustering) est une technique désormais très utilisée pour la recherche de groupes de gènes dont l'expression de l'ARNm est similaire (Yona *et al.*, 2009). Bien qu'il existe différentes méthodes pour organiser des tableaux de mesures de l'expression de gènes, l'ordonnancement de ces résultats conduit le plus souvent à une collection importante de données chiffrées, difficilement interprétable. Ces données peuvent

être représentées sous la forme d'un graphique, figurant chaque point de mesure avec une couleur qui est le reflet quantitatif et qualitatif des observations expérimentales originales. Au final, la représentation de données d'expression complexes, au travers d'une organisation statistique et d'une présentation plus graphique, permet aux scientifiques d'assimiler et d'examiner des données d'expression de façon plus intuitive (Eisen *et al.*, 1998). La méthode de classification hiérarchique est utile dans l'analyse de l'expression de gènes, mais peut être appliquée dans d'autres contextes. Cette méthode est dite additive (« agglomérative » pour les anglo-saxons) (Sneath et Sokal, 1973). Le procédé de classification débute avec chaque gène pris individuellement, comme un cluster à part entière. Successivement, ces clusters sont mélangés pour en former de nouveaux, plus grands, jusqu'au moment où tous les gènes sont compris dans une seule et même grande classification. L'organisation de ces clusters est représentée par un arbre hiérarchique binaire : le dendrogramme. Ce dernier peut être découpé à un niveau de hiérarchisation spécifique, afin de déterminer le nombre désiré de clusters. La topologie de ces clusters est un arbre binaire. La méthode de classification hiérarchique est de type déterministique : chaque gène sera assigné à un seul cluster. Un nombre important de clusters sera ainsi créé. La classification sera également appliquée aux gènes dont la disposition dans la représentation graphique sera, là aussi, informative (Yin *et al.*, 2006). Toutefois, cette méthode présente quelques désavantages. Par exemple, le mélange optimal de deux clusters à chaque étape peut conduire à une classification totale qui ne sera pas optimale. A cause des caractéristiques déterministiques de cette méthode, une mauvaise désignation faite plus tôt dans l'analyse ne pourra pas être corrigée (Yin *et al.*, 2006).

Nous considérons toutefois que la classification hiérarchique constitue un très bon moyen de classer les gènes suivant leur similarité de profil, montrant leur association par une fonction commune ou une régulation commune. Ainsi, notre groupe a pu mettre en évidence que la classification hiérarchique des seuls canaux ioniques permet de discriminer les différentes régions du cœur. Les canaux ioniques exprimés sont en effet différents suivant la région cardiaque étudiée. Chez l'Homme et la souris, nos travaux ont montré que les ventricules et les oreillettes ont des profils d'expression canalaire spécifiques (Marionneau *et al.*, 2005 ; Gaborit *et al.*, 2007). De même, il est possible de discriminer l'épicarde de l'endocarde murin par le seul profil d'expression différentiel des canaux ioniques. Enfin, nos travaux ont permis de démontrer que le syndrome de Brugada pourrait être diagnostiqué suivant le profil d'expression de quelques canaux ioniques chez le patient (Gaborit *et al.*, 2009).

Ce type de méthode de sélection de gènes s'est déjà montrée utile pour expliquer d'autres aspects physiopathologiques cardiaque (Tan *et al.*, 2002 ; Grzeskowiak *et al.*, 2003 ; Hall *et al.*, 2004). Toutefois, une telle stratégie ne permet pas d'identifier le réseau de régulation des facteurs permettant l'expression de gènes (Danko & Pertsov, 2009). Il a déjà été montré depuis longtemps que les gènes impliqués dans une fonction physiologique commune sont régulés en groupe (Eisen *et al.*, 1998 ; Iyer *et al.*, 1999). Dans de tels groupes, aussi appelés « modules de co-régulation », les gènes sont soumis à des changements d'expression similaires, dont les ratios sont conservés dans différentes conditions physiologiques (Gupta & Liu, 2005). Notre but est d'identifier de tels modules, en supposant que ces modules puissent donner des informations sur les facteurs de transcription qui en contrôlent l'expression (Danko & Pertsov, 2009). D'où la nécessité de compléter notre étude par une approche bioinformatique, renseignant sur les possibilités des facteurs de transcription à réguler un cluster bien défini.

B.2. La signification des données du clustering

Dans un premier temps, la classification hiérarchique a permis de valider les données obtenues dans nos deux projets portant sur l'insuffisance cardiaque et sur le développement cardiaque. Puisque certains résultats étaient déjà décrits dans la littérature, nous avons pu valider la véracité de nos données en les confrontant avec celles présentées dans la bibliographie. Ainsi, il était déjà connu que l'expression de Kv4.2 augmente en cas d'insuffisance, comme c'est le cas dans notre premier modèle. Un autre exemple : l'expression des transcrits du canal sodique Nav1.5 augmente au cours du développement cardiaque. Nous avons également pu le vérifier dans notre second modèle, comme pour tous les canaux décrits dans la littérature. Une fois ces vérifications d'usage réalisées, la validité des données d'expression des facteurs de transcription pouvait être acceptée. Pour autant, cela n'exclut pas que les associations faites entre facteurs de transcription et canaux ioniques pouvaient être erronées, malgré le recoupement avec les données bioinformatiques à notre disposition. Là encore, nous avons cherché si le rôle que l'on prêtait aux facteurs de transcription sélectionnés avait un sens « physiologique ». En effet, nous partons du principe que les gènes co-régulés partagent une fonction ou une régulation commune. Nous avons donc recherché si ces facteurs avaient déjà un rôle connu et décrit dans la littérature, et qui irait dans le sens de nos « couples » facteurs de transcription / canaux ioniques. Concernant le modèle d'insuffisance cardiaque, le clustering présente un cluster contenant 7 canaux ioniques (et notamment le canal sodique Nav1.5) et 17 facteurs de transcription. La pertinence du regroupement de ces facteurs est testée en utilisant "The Ingenuity Pathways

Knowledge Base » (<https://analysis.ingenuity.com>), qui reconstitue des réseaux de gènes connus pour interagir entre eux d'après les données de la littérature. Parmi les 17 facteurs de transcription, 12 sont connus pour interagir. De plus, il faut noter que la moitié (ATF3, ATF4, Fos, MafK, Jun et JunD1) appartiennent à la même famille, celle des AP-1 (activating-proteins 1) (Karin *et al.*, 1997), suggérant un rôle critique de cette voie de signalisation dans la survenue des tachycardies ventriculaires. Nous observons d'autres interactions cohérentes avec des études précédentes, comme celle qui concerne ATF3 et le phospholamban (PLN). En effet, il a été montré qu'ATF3 réprime l'expression du PLN (Gao *et al.*, 2004). Dans le modèle de BAV, l'expression du PLN diminue 12h après la sur-expression d'ATF3. Dans ce premier modèle, nous avons pu mettre en évidence une régulation négative de Mef2d sur l'expression de *SCN5A*. Il est déjà connu que des modifications du courant sodique entraînent des troubles de la conduction et des arythmies et par la suite, une hypertrophie (Royer *et al.*, 2005). D'autre part, Mef2d est un déterminant majeur dans la réponse au stress menant à l'hypertrophie (Kim *et al.*, 2008). L'association de ces 2 gènes est aussi appuyée par le fait qu'ils possèdent un profil inverse dans un gradient épicarde/endocarde. *SCN5A* est plus exprimé dans l'endocarde, tandis que Mef2d est plus exprimé dans l'épicarde, ceci chez l'Homme et la souris. Ce profil inverse n'est toutefois pas observé dans l'étude portant sur le développement cardiaque. En effet, sur un même promoteur, un facteur de transcription peut avoir une activité inverse (activateur ou répresseur) en fonction des stimulus extérieurs ou des facteurs de transcription à proximité. Toutefois, nous pouvons rapporter ce que nous observons dans le modèle d'hypertrophie avec ce que nous voyons dans notre second modèle concernant le développement cardiaque. En effet, une réexpression du programme fœtal est observée en cas de remodelage hypertrophique. Si l'on regarde l'expression du facteur de transcription GATA6 et celle de *KCND2* (codant le canal potassique Kv4.2 générant I_{to}) au cours du développement cardiaque, ces 2 gènes ont un profil inverse. GATA6 serait un régulateur négatif de la transcription de Kv4.2. Le facteur GATA6 a un rôle connu comme activateur de la morphogenèse hypertrophique, lorsqu'il est surexprimé (ou très exprimé, ce qui est le cas dans les stades précoces du développement) (Liang *et al.*, 2001). Une des caractéristique de l'hypertrophie est la diminution du courant I_{to} et des transcrits Kv4.2. Dans notre dernier modèle, *KCND2* est effectivement plus faiblement exprimé dans les stades précoces du développement cardiaque. Cela nous conforte donc dans notre hypothèse que GATA6 serait un facteur capable d'inhiber la transcription de *KCND2*. Nous avons émis l'hypothèse que Sox9 pouvait être un régulateur positif de Cav1.3 et Cav α 2 δ 2. La littérature montre le rôle de Sox9 dans la calcification lors de la valvulogenèse, via l'apport de calcium (Lincoln *et al.*, 2007). Sox9 pourrait stimuler cette calcification en activant l'expression de gènes codant des canaux calciques tels Cav1.3 ou Cav α 2 δ 2. Nous avons proposé Foxo3a comme régulateur négatif des connexines 40 et 45.

Lorsque Foxo3a est surexprimé, cela induit une diminution de la taille des cellules transfectées (Sengupta *et al.*, 2009). Or, les connexines sont connues pour avoir un rôle important dans la croissance cellulaire (Yamasaki *et al.*, 1999). Il est possible que Foxo3a agissent sur la croissance cellulaire en inhibant la transcription de ces connexines. Enfin, nous avons supposé un rôle important du facteur de transcription Meis1 sur de nombreux potassiques. L'absence de Meis1 conduit à des anomalies cardiaques congénitales (Stankunas *et al.*, 2008), sans qu'il soit pour l'instant possible de relier ces anomalies avec les canaux potassiques évoqués plus haut.

Le clustering va donc nous permettre de mettre en évidence des régulations de canaux ioniques. Toutefois, il existe quelques limites. La régulation de la transcription des canaux ioniques pourrait passer par d'autres systèmes de contrôle que les facteurs de transcription. Les petits ARN, tels que les microRNA par exemple, ont la capacité d'influencer la stabilité et le mécanisme de traduction de l'ARNm. Malgré l'utilisation d'outils bioinformatiques, nos résultats pourraient également refléter des régulations qui n'existent pas, ou qui seraient indirectes. C'est pourquoi il est nécessaire de valider nos résultats par différentes techniques de biochimie et d'exploration fonctionnelle.

C. Le monde des ARNs : des molécules dont l'expression est régulée par différents systèmes

C.1. Relation entre l'excitabilité cellulaire et le contrôle de la transcription des canaux ioniques

Dans un système idéal, le paramètre qui devrait réguler l'expression des canaux ioniques est le phénotype électrophysiologique. On peut donc émettre l'hypothèse d'un rétro-contrôle par le potentiel membranaire ou encore par le calcium intracellulaire, de l'expression des régulateurs de la transcription des canaux ioniques (Rosati & McKinnon, 2004). L'excitabilité cellulaire affecterait en retour la transcription des canaux ioniques et ainsi influencerait directement le phénotype électrophysiologique (**Figure 40**). Un exemple classique concerne les mécanismes électrophysiologiques de la fibrillation auriculaire. Plus la fréquence auriculaire est élevée (soit pathologiquement par l'intermédiaire de foyers ectopiques situés au niveau des veines pulmonaires par exemple, soit expérimentalement avec l'implantation d'un pacemaker artificiel) et plus la durée du potentiel d'action auriculaire diminue à long terme. Ce phénomène d'adaptation de la durée du potentiel d'action à la

fréquence cardiaque est la conséquence d'une diminution de l'amplitude du courant calcique de type L. Ce remodelage électrique des cellules auriculaires a aussi été observé sur des modèles cellulaires *in vitro* stimulés à haute fréquence (Yang *et al.*, 2005).

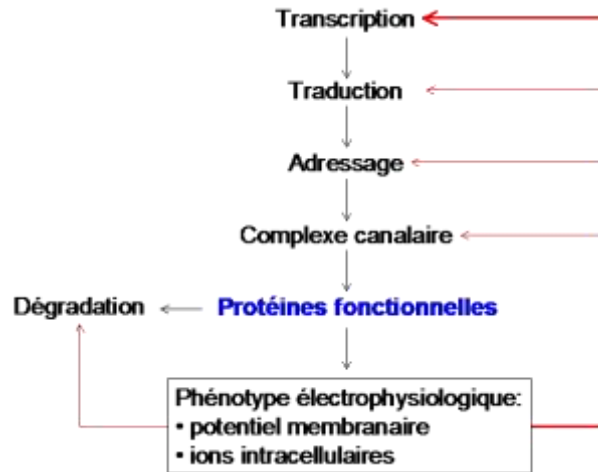


Figure 40 : Représentation des différentes voies de régulation du phénotype cellulaire électrophysiologique.

Les mécanismes reliant l'excitabilité cellulaire à la modulation transcriptionnelle des canaux ioniques sont inconnus. On peut émettre différentes hypothèses sur la nature "des senseurs électriques", qui ont pour fonction d'informer la machinerie de transcription des modifications nécessaires au maintien physiologique ou éventuellement à l'adaptation pathologique de l'électrogenèse cellulaire. Les canaux calciques potentiel-dépendants sont eux-mêmes de bons candidats pour remplir cette fonction. Leur ouverture dépolarise la cellule (plateau du potentiel d'action) et l'influx calcique influence aussi l'expression génique (notamment ceux codant les canaux ioniques) (Buonanno & Fields, 1999 ; Spitzer *et al.*, 2000). En effet, le calcium intracellulaire module l'activité de multiples facteurs de transcription. Les exemples les plus classiques sont les membres de la famille des CREB, NFAT et MEF2 (Xia *et al.*, 2000 ; West *et al.*, 2002 ; McKinsey *et al.*, 2002 ; Hogan *et al.*, 2003). Les canaux calciques sont actuellement les candidats privilégiés dans la boucle de rétrocontrôle reliant l'activité électrique à la régulation de l'expression des canaux ioniques. Cependant, les signaux Ca^{2+} impliqués (locaux, globaux, toniques, phasiques...) ne sont pas bien connus et les voies de signalisation demeurent obscures. A ce propos, une étude récente décrit une voie très originale dans laquelle l'extrémité C-terminale du canal calcique est clivée et joue alors le rôle d'un facteur de transcription (Gomez-Ospina *et al.*, 2006). L'un de nos futurs objectifs consistera à définir le rôle du calcium intracellulaire dans la régulation de la transcription des canaux ioniques cardiaques.

Cependant, le calcium n'est certainement pas le seul facteur impliqué dans la relation excitabilité-transcription. Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle les ions sodiques

seraient impliqués dans cette régulation. Ce rôle du sodium sur la transcription a d'ailleurs été suggéré dans les neurones (Linden *et al.*, 1993 ; Rose, 2002). Par ailleurs, il a été montré qu'un blocage de l'activité des canaux sodiques entraîne en réaction une augmentation de leur propre transcription (Duff *et al.*, 1992 ; Kang *et al.*, 1997). Nous utiliserons dans l'avenir des cardiomyocytes en culture, des outils pharmacologiques, des mesures quantitatives du sodium intracellulaire et une approche de transfection transitoire permettant de moduler l'expression des canaux sodiques et protéines régulatrices afin d'aborder le rôle spécifique du sodium dans la régulation transcriptionnelle des canaux ioniques cardiaques.

C.2. Régulation de l'expression des canaux ioniques par les miRNA

Ces deux dernières années, un nouveau champ d'investigation de la régulation de l'expression des gènes dans le système cardiovasculaire a émergé : le domaine des microARN ou miRNA. La découverte de la régulation de l'expression des gènes par les miRNA au cours de processus physiologiques et pathologiques tels que le développement du cœur ou l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaques (Latronico *et al.*, 2007 ; Catalucci *et al.*, 2008 ; Scalbert & Bril, 2008) laisse présager de nombreuses découvertes concernant la régulation de l'expression des canaux ioniques. Les premiers travaux dans ce domaine montrent que les miRNA miR-1 et miR-133 sont impliqués dans la répression de la traduction des ARNm des canaux HCN2-HCN4, KvLQT1 et MinK, ainsi que de Kir2.1 et de la Cx43, dans des conditions physiologiques (hétérogénéité d'expression des canaux dans le cœur sain) ou pathologiques (diabète et hypertrophie) (Luo *et al.*, 2007 ; Yang *et al.*, 2007 ; Luo *et al.*, 2008). Les miRNA constituent donc un nouveau système de régulation de l'électrogenèse cellulaire pouvant être à l'origine d'arythmies cardiaques et par conséquent, ils seraient de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles dans l'avenir.

D. Objectifs

D.1. Validations in vitro et in vivo des facteurs de transcription candidats

Pendant ma thèse nous avons mis en place les deux premières étapes de notre stratégie servant à identifier les candidats les plus probables à la régulation de l'expression

des canaux. Il est cependant indispensable de valider biologiquement ces interactions par les analyses décrites ci-dessous.

D.1.a. Validation in vitro

*** Utilisation des siRNA**

La transfection de cardiomyocytes néonataux de souris par des siRNA (petits ARN interférents) dirigés contre un facteur de transcription nous a déjà permis l'identification des canaux dont il contrôle l'expression et donc de valider les prédictions effectuées précédemment, à la fois au niveau de l'ARNm et au niveau de la protéine. Cette approche limite cependant le choix des facteurs de transcription candidats à des gènes exprimés au stade néonatal. L'expression transcriptionnelle des canaux ioniques étant modifiée, les conséquences fonctionnelles seront évaluées par patch-clamp. Si l'expression des facteurs de transcription n'est pas suffisante dans les cardiomyocytes néonataux, il est possible de sur-exprimer le gène codant le facteur de transcription d'intérêt. Nous envisageons également la transfection de cardiomyocytes adultes par des adénovirus.

*** Essai rapporteur luciférase**

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

*** Approche ChIP on chips**

Elle devrait permettre par la suite d'identifier les gènes dont l'expression est contrôlée par un facteur de transcription en particulier (Weinmann, 2004). Cette méthode consiste à immunoprécipiter la chromatine (ChIP) avec un anticorps dirigé contre un facteur de transcription, et hybrider l'ADN co-immunoprécipité sur une puce à ADN (chip) contenant des régions inter-géniques, et en particulier, des régions promotrices. Elle est accessible dans l'unité grâce aux travaux menés par Rémi Houlgatte et les chercheurs de son équipe et de sa plate-forme génomique. Cette approche couplée à l'analyse globale de l'expression des canaux ioniques lors de l'inhibition de l'expression du facteur de transcription par siRNA

dans les cardiomyocytes néonataux nous permettra de mettre en place des réseaux de régulation de l'expression des canaux ioniques.

D.1.b. Validation in vivo

Notre but ultime est de vérifier que les régulations mises en évidence ont des conséquences fonctionnelles *in vivo*. Cette étape est certainement la plus importante. De manière générale, l'utilisation de modèles transgéniques murins conditionnels devrait permettre de palier à la létalité et de limiter au maximum la mise en place d'un remodelage ionique compensateur de l'inactivation du facteur de transcription. L'effet de l'inactivation ou de la sur-expression conditionnelle des facteurs de transcription sélectionnés sera alors évalué au niveau électrophysiologique (ECG et patch-clamp), protéique (Western blot) et transcriptionnel (*Low Density Arrays*).

D.2. Modélisation mathématique des données de génomique

Nous réaliserons également l'intégration de nos données génomiques des canaux ioniques dans des modèles mathématiques de l'activité électrique cardiaque (Noble, 2004) tels que les modèles de potentiel d'action à l'échelle cellulaire, et les modèles de l'électrocardiogramme de surface à l'échelle de l'organe. Un certain nombre de ces modèles mathématiques de PA sont disponibles dans l'unité. Nous bénéficierons donc de l'aide précieuse de Gildas Loussouarn et de nos proches collaborateurs dans ce domaine que sont Colleen Clancy et Mark Boyett. Dans ce contexte, les réseaux de régulation de l'expression des sous-unités des canaux ioniques jouent un rôle primordial. Il faudra donc avoir connaissance des conséquences fonctionnelles des phénomènes d'adaptation moléculaire et être en mesure d'intégrer ces données à l'échelle de la cellule, du tissu et de l'organe. Cet objectif ambitieux ne pourra être envisagé qu'à long terme après l'accumulation et la comparaison de plusieurs études.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Akar FG, Wu RC, Juang GJ, Tian Y, Burysek M, Disilvestre D, Xiong W, Armoundas AA, Tomaselli GF. Molecular Mechanisms Underlying K⁺ Current Downregulation in Canine Tachycardia-Induced Heart Failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2005**. 288(6):H2887-H2896.

Akazawa H & Komuro I. Roles of Cardiac Transcription Factors in Cardiac Hypertrophy. *Circ Res*. **2003**. 92(10):1079-88.

Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J, Jr., Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM. Distinct Types of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Identified by Gene Expression Profiling. *Nature*. **2000**. 403(6769):503-11.

Amberg GC, Rossow CF, Navedo MF, Santana LF. NFATc3 Regulates Kv2.1 Expression in Arterial Smooth Muscle. *J Biol Chem*. **2004**. 279(45):47326-34.

Antzelevitch C. Role of Spatial Dispersion of Repolarization in Inherited and Acquired Sudden Cardiac Death Syndromes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2007**. 293(4):H2024-H2038.

Artman, Haddock, Coetzee. Calcium Regulation in the Developing Heart. *Etiology and Morphogenesis of Congenital HeartDisease*. **2000**.:289-91.

Artman, Mahony, Teitel. *Neonatal Cardiology*. **2002**.(New York: McGraw Hill)

Ashamalla SM, Navarro D, Ward CA. Gradient of Sodium Current Across the Left Ventricular Wall of Adult Rat Hearts. *J Physiol*. **2001**. 536(Pt 2):439-43.

Baker LC, London B, Choi BR, Koren G, Salama G. Enhanced Dispersion of Repolarization and Refractoriness in Transgenic Mouse Hearts Promotes Reentrant Ventricular Tachycardia. *Circ Res*. **2000**. 86(4):396-407.

Bakker ML, Boukens BJ, Mommersteeg MT, Brons JF, Wakker V, Moorman AF, Christoffels VM. Transcription Factor Tbx3 Is Required for the Specification of the Atrioventricular Conduction System. *Circ Res*. **2008**. 102(11):1340-9.

Bamshad M, Lin RC, Law DJ, Watkins WC, Krakowiak PA, Moore ME, Franceschini P, Lala R, Holmes LB, Gebuhr TC, Bruneau BG, Schinzel A, Seidman JG, Seidman CE, Jorde LB. Mutations in Human TBX3 Alter Limb, Apocrine and Genital Development in Ulnar-Mammary Syndrome. *Nat Genet*. **1997**. 16(3):311-5.

Bao ZZ, Bruneau BG, Seidman JG, Seidman CE, Cepko CL. Regulation of Chamber-Specific Gene Expression in the Developing Heart by Irx4. *Science*. **1999**. 283(5405):1161-4.

Barr CS, Naas A, Freeman M, Lang CC, Struthers AD. QT Dispersion and Sudden Unexpected Death in Chronic Heart Failure. *Lancet*. **1994**. 343(8893):327-9.

Bean BP. Two Kinds of Calcium Channels in Canine Atrial Cells. Differences in Kinetics, Selectivity, and Pharmacology. *J Gen Physiol.* **1985.** 86(1):1-30.

Benndorf K, Boldt W, Nilius B. Sodium Current in Single Myocardial Mouse Cells. *Pflugers Arch.* **1985.** 404(2):190-6.

Berger RD, Kasper EK, Baughman KL, Marban E, Calkins H, Tomaselli GF. Beat-to-Beat QT Interval Variability: Novel Evidence for Repolarization Lability in Ischemic and Nonischemic Dilated Cardiomyopathy. *Circulation.* **1997.** 96(5):1557-65.

Beuckelmann DJ, Nabauer M, Erdmann E. Alterations of K⁺ Currents in Isolated Human Ventricular Myocytes From Patients With Terminal Heart Failure. *Circ Res.* **1993.** 73(2):379-85.

Biben C, Weber R, Kesteven S, Stanley E, McDonald L, Elliott DA, Barnett L, Koentgen F, Robb L, Feneley M, Harvey RP. Cardiac Septal and Valvular Dymorphogenesis in Mice Heterozygous for Mutations in the Homeobox Gene Nkx2-5. *Circ Res.* **2000.** 87(10):888-95.

Borlak J & Thum T. Hallmarks of Ion Channel Gene Expression in End-Stage Heart Failure. *FASEB J.* **2003.** 17(12):1592-608.

Boyett MR, Harrison SM, Janvier NC, McMorn SO, Owen JM, Shui Z. A List of Vertebrate Cardiac Ionic Currents Nomenclature, Properties, Function and Cloned Equivalents. *Cardiovasc Res.* **1996.** 32(3):455-81.

Briggs LE, Takeda M, Cuadra AE, Wakimoto H, Marks MH, Walker AJ, Seki T, Oh SP, Lu JT, Sumners C, Raizada MK, Horikoshi N, Weinberg EO, Yasui K, Ikeda Y, Chien KR, Kasahara H. Perinatal Loss of Nkx2-5 Results in Rapid Conduction and Contraction Defects. *Circ Res.* **2008.**

Brochu RM, Clay JR, Shrier A. Pacemaker Current in Single Cells and in Aggregates of Cells Dissociated From the Embryonic Chick Heart. *J Physiol.* **1992.** 454:503-15.

Brouillette J, Clark RB, Giles WR, Fiset C. Functional Properties of K⁺ Currents in Adult Mouse Ventricular Myocytes. *J Physiol.* **2004.** 559(Pt 3):777-98.

Brown H & DiFrancesco D. Voltage-Clamp Investigations of Membrane Currents Underlying Pace-Maker Activity in Rabbit Sino-Atrial Node. *J Physiol.* **1980.** 308:331-51.

Bruneau BG. Transcriptional Regulation of Vertebrate Cardiac Morphogenesis. *Circ Res.* **2002.** 90(5):509-19.

Bruneau BG, Bao ZZ, Fatkin D, Xavier-Neto J, Georgakopoulos D, Maguire CT, Berul CI, Kass DA, Kuroski-de Bold ML, de Bold AJ, Conner DA, Rosenthal N, Cepko CL, Seidman CE, Seidman JG. Cardiomyopathy in Irx4-Deficient Mice Is Preceded by Abnormal Ventricular Gene Expression. *Mol Cell Biol.* **2001a.** 21(5):1730-6.

Bruneau BG, Bao ZZ, Tanaka M, Schott JJ, Izumo S, Cepko CL, Seidman JG, Seidman CE. Cardiac Expression of the Ventricle-Specific Homeobox Gene Irx4 Is Modulated by Nkx2-5 and DHand. *Dev Biol.* **2000.** 217(2):266-77.

Bruneau BG, Logan M, Davis N, Levi T, Tabin CJ, Seidman JG, Seidman CE. Chamber-Specific Cardiac Expression of Tbx5 and Heart Defects in Holt-Oram Syndrome. *Dev Biol.* **1999.** 211(1):100-8.

Bruneau BG, Nemer G, Schmitt JP, Charron F, Robitaille L, Caron S, Conner DA, Gessler M, Nemer M, Seidman CE, Seidman JG. A Murine Model of Holt-Oram Syndrome Defines Roles of the T-Box Transcription Factor Tbx5 in Cardiogenesis and Disease. *Cell.* **2001b.** 106(6):709-21.

Brunet S, Aimond F, Li H, Guo W, Eldstrom J, Fedida D, Yamada KA, Nerbonne JM. Heterogeneous Expression of Repolarizing, Voltage-Gated K⁺ Currents in Adult Mouse Ventricles. *J Physiol.* **2004.** 559(Pt 1):103-20.

Buonanno A & Fields RD. Gene Regulation by Patterned Electrical Activity During Neural and Skeletal Muscle Development. *Curr Opin Neurobiol.* **1999.** 9(1):110-20.

Catalucci D, Latronico MV, Condorelli G. MicroRNAs Control Gene Expression: Importance for Cardiac Development and Pathophysiology. *Ann N Y Acad Sci.* **2008.** 1123:20-9.

Cerbai E, Barbieri M, Mugelli A. Characterization of the Hyperpolarization-Activated Current, I_f, in Ventricular Myocytes Isolated From Hypertensive Rats. *J Physiol.* **1994.** 481 (Pt 3):585-91.

Cerbai E, Pino R, Sartiani L, Mugelli A. Influence of Postnatal-Development on I_f Occurrence and Properties in Neonatal Rat Ventricular Myocytes. *Cardiovasc Res.* **1999.** 42(2):416-23.

Cerbai E, Sartiani L, DePaoli P, Pino R, Maccherini M, Bizzarri F, DiCiolla F, Davoli G, Sani G, Mugelli A. The Properties of the Pacemaker Current I_f in Human Ventricular Myocytes Are Modulated by Cardiac Disease. *J Mol Cell Cardiol.* **2001.** 33(3):441-8.

Chen F, Wetzel GT, Friedman WF, Klitzner TS. Single-Channel Recording of Inwardly Rectifying Potassium Currents in Developing Myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* **1991.** 23(3):259-67.

Chomczynski P & Sacchi N. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal Biochem.* **1987.** 162(1):156-9.

Chomczynski P & Sacchi N. The Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction: Twenty-Something Years on. *Nat Protoc.* **2006.** 1(2):581-5.

Christoffels VM, Keijser AG, Houweling AC, Clout DE, Moorman AF. Patterning the Embryonic Heart: Identification of Five Mouse Iroquois Homeobox Genes in the Developing Heart. *Dev Biol.* **2000.** 224(2):263-74.

Clark KL, Yutzey KE, Benson DW. Transcription Factors and Congenital Heart Defects. *Annu Rev Physiol.* **2006.** 68:97-121.

Conforti L, Tohse N, Sperelakis N. Tetrodotoxin-Sensitive Sodium Current in Rat Fetal Ventricular Myocytes--Contribution to the Plateau Phase of Action Potential. *J Mol Cell Cardiol.* **1993.** 25(2):159-73.

Coraboeuf E & Carmeliet E. Existence of Two Transient Outward Currents in Sheep Cardiac Purkinje Fibers. *Pflugers Arch.* **1982**. 392(4):352-9.

Coraboeuf E, Coulombe A, Deroubaix E, Hatem S, Mercadier JJ. [Transient Outward Potassium Current and Repolarization of Cardiac Cells]. *Bull Acad Natl Med.* **1998**. 182(2):325-33.

Costantini DL, Arruda EP, Agarwal P, Kim KH, Zhu Y, Zhu W, Lebel M, Cheng CW, Park CY, Pierce SA, Guerchicoff A, Pollevick GD, Chan TY, Kabir MG, Cheng SH, Husain M, Antzelevitch C, Srivastava D, Gross GJ, Hui CC, Backx PH, Bruneau BG. The Homeodomain Transcription Factor *Irx5* Establishes the Mouse Cardiac Ventricular Repolarization Gradient. *Cell.* **2005**. 123(2):347-58.

Crumb WJ, Jr., Pigott JD, Clarkson CW. Comparison of *I_{to}* in Young and Adult Human Atrial Myocytes: Evidence for Developmental Changes. *Am J Physiol.* **1995**. 268(3 Pt 2):H1335-H1342.

Czubryt MP & Olson EN. Balancing Contractility and Energy Production: the Role of Myocyte Enhancer Factor 2 (MEF2) in Cardiac Hypertrophy. *Recent Prog Horm Res.* **2004**. 59:105-24.

D'haeseleer P. How Does Gene Expression Clustering Work? *Nat Biotechnol.* **2005**. 23(12):1499-501.

Danko CG & Pertsov AM. Identification of Gene Co-Regulatory Modules and Associated Cis-Elements Involved in Degenerative Heart Disease. *BMC Med Genomics.* **2009**. 2:31.

Davies C. European Society of Cardiology 2000. Amsterdam, The Netherlands, 26-30 August, 2000. *Heart Fail Monit.* **2001**. 1(3):107-9.

Davies MP, An RH, Doevendans P, Kubalak S, Chien KR, Kass RS. Developmental Changes in Ionic Channel Activity in the Embryonic Murine Heart. *Circ Res.* **1996**. 78(1):15-25.

DE CARVALHO AP, DE MELLO WC, HOFFMAN BF. Electrophysiological Evidence for Specialized Fiber Types in Rabbit Atrium. *Am J Physiol.* **1959**. 196(3):483-8.

DePaoli AM, Bell GI, Stoffel M. G Protein-Activated Inwardly Rectifying Potassium Channel (GIRK1/KGA) mRNA in Adult Rat Heart and Brain by in Situ Hybridization Histochemistry. *Mol Cell Neurosci.* **1994**. 5(6):515-22.

Dhamoon AS, Pandit SV, Sarmast F, Parisian KR, Guha P, Li Y, Bagwe S, Taffet SM, Anumonwo JM. Unique Kir2.x Properties Determine Regional and Species Differences in the Cardiac Inward Rectifier K⁺ Current. *Circ Res.* **2004**. 94(10):1332-9.

Di Diego JM, Sun ZQ, Antzelevitch C. *I_{to}* and Action Potential Notch Are Smaller in Left Vs. Right Canine Ventricular Epicardium. *Am J Physiol.* **1996**. 271(2 Pt 2):H548-H561.

Dilly KW, Rossow CF, Votaw VS, Meabon JS, Cabarrus JL, Santana LF. Mechanisms Underlying Variations in Excitation-Contraction Coupling Across the Mouse Left Ventricular Free Wall. *J Physiol.* **2006**. 572(Pt 1):227-41.

- Dixon JE & McKinnon D. Quantitative Analysis of Potassium Channel mRNA Expression in Atrial and Ventricular Muscle of Rats. *Circ Res*. **1994**. 75(2):252-60.
- Doba N, Tomiyama H, Nakayama T. Drugs, Heart Failure and Quality of Life: What Are We Achieving? What Should We Be Trying to Achieve? *Drugs Aging*. **1999**. 14(3):153-63.
- Doevendans PA, Daemen MJ, de Muinck ED, Smits JF. Cardiovascular Phenotyping in Mice. *Cardiovasc Res*. **1998**. 39(1):34-49.
- Dominguez JN, de la RA, Navarro F, Franco D, Aranega AE. Tissue Distribution and Subcellular Localization of the Cardiac Sodium Channel During Mouse Heart Development. *Cardiovasc Res*. **2008b**. 78(1):45-52.
- Dominguez JN, de la RA, Navarro F, Franco D, Aranega AE. Tissue Distribution and Subcellular Localization of the Cardiac Sodium Channel During Mouse Heart Development. *Cardiovasc Res*. **2008a**. 78(1):45-52.
- Dominguez JN, Navarro F, Franco D, Thompson RP, Aranega AE. Temporal and Spatial Expression Pattern of Beta1 Sodium Channel Subunit During Heart Development. *Cardiovasc Res*. **2005**. 65(4):842-50.
- Duff HJ, Offord J, West J, Catterall WA. Class I and IV Antiarrhythmic Drugs and Cytosolic Calcium Regulate mRNA Encoding the Sodium Channel Alpha Subunit in Rat Cardiac Muscle. *Mol Pharmacol*. **1992**. 42(4):570-4.
- Eichhorn EJ & Bristow MR. The Carvedilol Prospective Randomized Cumulative Survival (COPERNICUS) Trial. *Curr Control Trials Cardiovasc Med*. **2001**. 2(1):20-3.
- Einthoven W. Sur Un Nouveau Galvanomètre. *Arch Néerl Des Sciences Exact Nat*. **1901**. 6:625-33.
- Einthoven W. Die Galvanometrische Registrierung Des Menschlichen Elektrokardiogramms, Zugleichs Eine Beurteilung Anwendung Des Capillär-Elektrometers in Der Physiologie. *Pflügers Arch Gesamte Physiol*. **1903**. 99:472-80.
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster Analysis and Display of Genome-Wide Expression Patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1998**. 95(25):14863-8.
- Ferron L, Capuano V, Deroubaix E, Coulombe A, Renaud JF. Functional and Molecular Characterization of a T-Type Ca(2+) Channel During Fetal and Postnatal Rat Heart Development. *J Mol Cell Cardiol*. **2002**. 34(5):533-46.
- Fleige S & Pfaffl MW. RNA Integrity and the Effect on the Real-Time QRT-PCR Performance. *Mol Aspects Med*. **2006**. 27(2-3):126-39.
- Fountain SJ, Cheong A, Li J, Dondas NY, Zeng F, Wood IC, Beech DJ. K(v)1.5 Potassium Channel Gene Regulation by Sp1 Transcription Factor and Oxidative Stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2007**. 293(5):H2719-H2725.
- Franco D, Demolombe S, Kupersmidt S, Dumaine R, Dominguez JN, Roden D, Antzelevitch C, Escande D, Moorman AF. Divergent Expression of Delayed Rectifier K(+) Channel Subunits During Mouse Heart Development. *Cardiovasc Res*. **2001**. 52(1):65-75.

Freund C, Schmidt-Ullrich R, Baurand A, Dunger S, Schneider W, Loser P, El Jamali A, Dietz R, Scheidereit C, Bergmann MW. Requirement of Nuclear Factor-KappaB in Angiotensin II- and Isoproterenol-Induced Cardiac Hypertrophy in Vivo. *Circulation*. **2005**. 111(18):2319-25.

Frey N & Olson EN. Cardiac Hypertrophy: the Good, the Bad, and the Ugly. *Annu Rev Physiol*. **2003**. 65:45-79.

Fujii S, Ayer RK, Jr., DeHaan RL. Development of the Fast Sodium Current in Early Embryonic Chick Heart Cells. *J Membr Biol*. **1988**. 101(3):209-23.

Gaborit N, Le Bouter S, Szuts V, Varro A, Escande D, Nattel S, Demolombe S. Regional and Tissue Specific Transcript Signatures of Ion Channel Genes in the Non-Diseased Human Heart. *J Physiol*. **2007**. 582(Pt 2):675-93.

Gaborit N, Wichter T, Varro A, Szuts V, Lamirault G, Eckardt L, Paul M, Breithardt G, Schulze-Bahr E, Escande D, Nattel S, Demolombe S. Transcriptional Profiling of Ion Channel Genes in Brugada Syndrome and Other Right Ventricular Arrhythmogenic Diseases. *Eur Heart J*. **2009**. 30(4):487-96.

Gao MH, Tang T, Guo T, Sun SQ, Feramisco JR, Hammond HK. Adenylyl Cyclase Type VI Gene Transfer Reduces Phospholamban Expression in Cardiac Myocytes Via Activating Transcription Factor 3. *J Biol Chem*. **2004**. 279(37):38797-802.

Gardiner-Garden M & Frommer M. CpG Islands in Vertebrate Genomes. *J Mol Biol*. **1987**. 196(2):261-82.

Gilbert DR, Schroeder M, van Helden J. Interactive Visualization and Exploration of Relationships Between Biological Objects. *Trends Biotechnol*. **2000**. 18(12):487-94.

Gilchrist M, Thorsson V, Li B, Rust AG, Korb M, Roach JC, Kennedy K, Hai T, Bolouri H, Aderem A. Systems Biology Approaches Identify ATF3 As a Negative Regulator of Toll-Like Receptor 4. *Nature*. **2006**. 441(7090):173-8.

Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES. Molecular Classification of Cancer: Class Discovery and Class Prediction by Gene Expression Monitoring. *Science*. **1999**. 286(5439):531-7.

Gomez JP, Potreau D, Branka JE, Raymond G. Developmental Changes in Ca²⁺ Currents From Newborn Rat Cardiomyocytes in Primary Culture. *Pflugers Arch*. **1994**. 428(3-4):241-9.

Gomez-Ospina N, Tsuruta F, Barreto-Chang O, Hu L, Dolmetsch R. The C Terminus of the L-Type Voltage-Gated Calcium Channel Ca(V)_{1.2} Encodes a Transcription Factor. *Cell*. **2006**. 127(3):591-606.

Gong N, Bodi I, Zobel C, Schwartz A, Molkentin JD, Backx PH. Calcineurin Increases Cardiac Transient Outward K⁺ Currents Via Transcriptional Up-Regulation of Kv4.2 Channel Subunits. *J Biol Chem*. **2006**. 281(50):38498-506.

Gottdiener JS, Arnold AM, Aurigemma GP, Polak JF, Tracy RP, Kitzman DW, Gardin JM, Rutledge JE, Boineau RC. Predictors of Congestive Heart Failure in the Elderly: the Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol*. **2000**. 35(6):1628-37.

Grandy SA, Trepanier-Boulay V, Fiset C. Postnatal Development Has a Marked Effect on Ventricular Repolarization in Mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2007**. 293(4):H2168-H2177.

Grzeskowiak R, Witt H, Drungowski M, Thermann R, Hennig S, Perrot A, Osterziel KJ, Klingbiel D, Scheid S, Spang R, Lehrach H, Ruiz P. Expression Profiling of Human Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*. **2003**. 59(2):400-11.

Gudbjartsson DF, Arnar DO, Helgadóttir A, Gretarsdóttir S, Holm H, Sigurdsson A, Jonasdóttir A, Baker A, Thorleifsson G, Kristjansson K, Pálsson A, Blondal T, Sulem P, Backman VM, Hardarson GA, Palsdóttir E, Helgason A, Sigurjonsdóttir R, Sverrisson JT, Kostulas K, Ng MC, Baum L, So WY, Wong KS, Chan JC, Furie KL, Greenberg SM, Sale M, Kelly P, MacRae CA, Smith EE, Rosand J, Hillert J, Ma RC, Ellinor PT, Thorgeirsson G, Gulcher JR, Kong A, Thorsteinsdóttir U, Stefansson K. Variants Conferring Risk of Atrial Fibrillation on Chromosome 4q25. *Nature*. **2007**. 448(7151):353-7.

Guo W, Kamiya K, Liu W, Toyama J. Developmental Changes of the Ultrarapid Delayed Rectifier K⁺ Current in Rat Ventricular Myocytes. *Pflugers Arch*. **1997**. 433(4):442-5.

Guo W, Xu H, London B, Nerbonne JM. Molecular Basis of Transient Outward K⁺ Current Diversity in Mouse Ventricular Myocytes. *J Physiol*. **1999**. 521 Pt 3:587-99.

Gupta M & Liu JS. De Novo Cis-Regulatory Module Elicitation for Eukaryotic Genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2005**. 102(20):7079-84.

Habets PE, Moorman AF, Clout DE, van Roon MA, Lingbeek M, van Lohuizen M, Campione M, Christoffels VM. Cooperative Action of Tbx2 and Nkx2.5 Inhibits ANF Expression in the Atrioventricular Canal: Implications for Cardiac Chamber Formation. *Genes Dev*. **2002**. 16(10):1234-46.

Hall JL, Grindle S, Han X, Fermin D, Park S, Chen Y, Bache RJ, Mariash A, Guan Z, Ormaza S, Thompson J, Graziano J, Sam Lazaro SE, Pan S, Simari RD, Miller LW. Genomic Profiling of the Human Heart Before and After Mechanical Support With a Ventricular Assist Device Reveals Alterations in Vascular Signaling Networks. *Physiol Genomics*. **2004**. 17(3):283-91.

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording From Cells and Cell-Free Membrane Patches. *Pflugers Arch*. **1981**. 391(2):85-100.

Harrell MD, Harbi S, Hoffman JF, Zavadil J, Coetzee WA. Large-Scale Analysis of Ion Channel Gene Expression in the Mouse Heart During Perinatal Development. *Physiol Genomics*. **2007**. 28(3):273-83.

Harrelson Z, Kelly RG, Goldin SN, Gibson-Brown JJ, Bollag RJ, Silver LM, Papaioannou VE. Tbx2 Is Essential for Patterning the Atrioventricular Canal and for Morphogenesis of the Outflow Tract During Heart Development. *Development*. **2004**. 131(20):5041-52.

- Harvey RP. NK-2 Homeobox Genes and Heart Development. *Dev Biol.* **1996.** 178(2):203-16.
- Harvey RP. Patterning the Vertebrate Heart. *Nat Rev Genet.* **2002.** 3(7):544-56.
- Harzheim D, Pfeiffer KH, Fabritz L, Kremmer E, Buch T, Waisman A, Kirchhof P, Kaupp UB, Seifert R. Cardiac Pacemaker Function of HCN4 Channels in Mice Is Confined to Embryonic Development and Requires Cyclic AMP. *EMBO J.* **2008.** 27(4):692-703.
- Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, Meyer M, Pieske B, Holtz J, Holubarsch C, Posival H, Just H, Drexler H. Relation Between Myocardial Function and Expression of Sarcoplasmic Reticulum Ca(2+)-ATPase in Failing and Nonfailing Human Myocardium. *Circ Res.* **1994.** 75(3):434-42.
- Haufe V, Camacho JA, Dumaine R, Gunther B, Bollensdorff C, von Banchet GS, Benndorf K, Zimmer T. Expression Pattern of Neuronal and Skeletal Muscle Voltage-Gated Na⁺ Channels in the Developing Mouse Heart. *J Physiol.* **2005.** 564(Pt 3):683-96.
- He W, Jia Y, Takimoto K. Interaction Between Transcription Factors Iroquois Proteins 4 and 5 Controls Cardiac Potassium Channel Kv4.2 Gene Transcription. *Cardiovasc Res.* **2009.** 81(1):64-71.
- Heineke J & Molkentin JD. Regulation of Cardiac Hypertrophy by Intracellular Signalling Pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2006.** 7(8):589-600.
- Herfst LJ, Rook MB, Jongsma HJ. Trafficking and Functional Expression of Cardiac Na⁺ Channels. *J Mol Cell Cardiol.* **2004.** 36(2):185-93.
- Herrmann S, Stieber J, Stockl G, Hofmann F, Ludwig A. HCN4 Provides a 'Depolarization Reserve' and Is Not Required for Heart Rate Acceleration in Mice. *EMBO J.* **2007.** 26(21):4423-32.
- Ho PD, Fan JS, Hayes NL, Saada N, Palade PT, Glembotski CC, McDonough PM. Ras Reduces L-Type Calcium Channel Current in Cardiac Myocytes. Corrective Effects of L-Channels and SERCA2 on [Ca(2+)]_i Regulation and Cell Morphology. *Circ Res.* **2001.** 88(1):63-9.
- HODGKIN AL & HUXLEY AF. A Quantitative Description of Membrane Current and Its Application to Conduction and Excitation in Nerve. *J Physiol.* **1952.** 117(4):500-44.
- HOFFMAN BF. Electrophysiology of Single Cardiac Cells. *Bull N Y Acad Med.* **1959.** 35:689-706.
- HOFFMAN BF, DE CARVALHO AP, MELLO WC, CRANEFIELD PF. Electrical Activity of Single Fibers of the Atrioventricular Node. *Circ Res.* **1959.** 7(1):11-8.
- Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A. Transcriptional Regulation by Calcium, Calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* **2003.** 17(18):2205-32.
- Hoogaars WM, Barnett P, Moorman AF, Christoffels VM. T-Box Factors Determine Cardiac Design. *Cell Mol Life Sci.* **2007a.** 64(6):646-60.

Hoogaars WM, Engel A, Brons JF, Verkerk AO, de Lange FJ, Wong LY, Bakker ML, Clout DE, Wakker V, Barnett P, Ravesloot JH, Moorman AF, Verheijck EE, Christoffels VM. Tbx3 Controls the Sinoatrial Node Gene Program and Imposes Pacemaker Function on the Atria. *Genes Dev.* **2007b**. 21(9):1098-112.

Hoppe UC, Jansen E, Sudkamp M, Beuckelmann DJ. Hyperpolarization-Activated Inward Current in Ventricular Myocytes From Normal and Failing Human Hearts. *Circulation.* **1998**. 97(1):55-65.

Huynh TV, Chen F, Wetzel GT, Friedman WF, Klitzner TS. Developmental Changes in Membrane Ca²⁺ and K⁺ Currents in Fetal, Neonatal, and Adult Rabbit Ventricular Myocytes. *Circ Res.* **1992**. 70(3):508-15.

Iwai M, Masu M, Tsuchida K, Mori T, Ohkubo H, Nakanishi S. Characterization of Gene Organization and Generation of Heterogeneous mRNA Species of Rat ISK Protein. *J Biochem.* **1990**. 108(2):200-6.

Iyer VR, Eisen MB, Ross DT, Schuler G, Moore T, Lee JC, Trent JM, Staudt LM, Hudson J, Jr., Boguski MS, Lashkari D, Shalon D, Botstein D, Brown PO. The Transcriptional Program in the Response of Human Fibroblasts to Serum. *Science.* **1999**. 283(5398):83-7.

Janse MJ & Rosen MR. History of Arrhythmias. *Handb Exp Pharmacol.* **2006**.(171):1-39.

Jay PY, Harris BS, Maguire CT, Buerger A, Wakimoto H, Tanaka M, Kupersmidt S, Roden DM, Schultheiss TM, O'Brien TX, Gourdie RG, Berul CI, Izumo S. Nkx2-5 Mutation Causes Anatomic Hypoplasia of the Cardiac Conduction System. *J Clin Invest.* **2004**. 113(8):1130-7.

Jeck CD & Boyden PA. Age-Related Appearance of Outward Currents May Contribute to Developmental Differences in Ventricular Repolarization. *Circ Res.* **1992**. 71(6):1390-403.

Jerome LA & Papaioannou VE. DiGeorge Syndrome Phenotype in Mice Mutant for the T-Box Gene, Tbx1. *Nat Genet.* **2001**. 27(3):286-91.

Jessup M & Brozena S. Heart Failure. *N Engl J Med.* **2003**. 348(20):2007-18.

Jia Y & Takimoto K. GATA and FOG2 Transcription Factors Differentially Regulate the Promoter for Kv4.2 K(+) Channel Gene in Cardiac Myocytes and PC12 Cells. *Cardiovasc Res.* **2003**. 60(2):278-87.

Jia Y & Takimoto K. Mitogen-Activated Protein Kinases Control Cardiac KChIP2 Gene Expression. *Circ Res.* **2006**. 98(3):386-93.

Josephson IR & Sperelakis N. Developmental Increases in the Inwardly-Rectifying K⁺ Current of Embryonic Chick Ventricular Myocytes. *Biochim Biophys Acta.* **1990**. 1052(1):123-7.

Jost N, Virag L, Bitay M, Takacs J, Lengyel C, Biliczki P, Nagy Z, Bogats G, Lathrop DA, Papp JG, Varro A. Restricting Excessive Cardiac Action Potential and QT Prolongation: a Vital Role for IKs in Human Ventricular Muscle. *Circulation.* **2005**. 112(10):1392-9.

Justesen DR & Guy AW. Arsene Jacques D'Arsonval: a Brief History. *Bioelectromagnetics.* **1985**. 6(2):111-4.

Kaab S & Nabauer M. Diversity of Ion Channel Expression in Health and Disease. *European Heart Journal Supplements*. **2001**. 3:K31-K40.

Kaab S, Dixon J, Duc J, Ashen D, Nabauer M, Beuckelmann DJ, Steinbeck G, McKinnon D, Tomaselli GF. Molecular Basis of Transient Outward Potassium Current Downregulation in Human Heart Failure: a Decrease in Kv4.3 mRNA Correlates With a Reduction in Current Density. *Circulation*. **1998**. 98(14):1383-93.

Kaab S, Nuss HB, Chiamvimonvat N, O'Rourke B, Pak PH, Kass DA, Marban E, Tomaselli GF. Ionic Mechanism of Action Potential Prolongation in Ventricular Myocytes From Dogs With Pacing-Induced Heart Failure. *Circ Res*. **1996**. 78(2):262-73.

Kang JX, Li Y, Leaf A. Regulation of Sodium Channel Gene Expression by Class I Antiarrhythmic Drugs and n - 3 Polyunsaturated Fatty Acids in Cultured Neonatal Rat Cardiac Myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1997**. 94(6):2724-8.

Karin M, Liu Z, Zandi E. AP-1 Function and Regulation. *Curr Opin Cell Biol*. **1997**. 9(2):240-6.

Katsube Y, Yokoshiki H, Nguyen L, Yamamoto M, Sperelakis N. L-Type Ca²⁺ Currents in Ventricular Myocytes From Neonatal and Adult Rats. *Can J Physiol Pharmacol*. **1998**. 76(9):873-81.

Kawano S, Kubota T, Monden Y, Kawamura N, Tsutsui H, Takeshita A, Sunagawa K. Blockade of NF-KappaB Ameliorates Myocardial Hypertrophy in Response to Chronic Infusion of Angiotensin II. *Cardiovasc Res*. **2005**. 67(4):689-98.

Keith A & Flack M. The Form and Nature of the Muscular Connections Between the Primary Divisions of the Vertebrate Heart. *J Anat Physiol*. **1907**. 41(Pt 3):172-89.

Kilborn MJ & Fedida D. A Study of the Developmental Changes in Outward Currents of Rat Ventricular Myocytes. *J Physiol*. **1990**. 430:37-60.

Kim Y, Phan D, van Rooij E, Wang DZ, McAnally J, Qi X, Richardson JA, Hill JA, Bassel-Duby R, Olson EN. The MEF2D Transcription Factor Mediates Stress-Dependent Cardiac Remodeling in Mice. *J Clin Invest*. **2008**. 118(1):124-32.

Knollmann BC, Katchman AN, Franz MR. Monophasic Action Potential Recordings From Intact Mouse Heart: Validation, Regional Heterogeneity, and Relation to Refractoriness. *J Cardiovasc Electrophysiol*. **2001**. 12(11):1286-94.

Knollmann BC, Schober T, Petersen AO, Sirenko SG, Franz MR. Action Potential Characterization in Intact Mouse Heart: Steady-State Cycle Length Dependence and Electrical Restitution. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2007**. 292(1):H614-H621.

Koibuchi N & Chin MT. CHF1/Hes2 Plays a Pivotal Role in Left Ventricular Maturation Through Suppression of Ectopic Atrial Gene Expression. *Circ Res*. **2007**. 100(6):850-5.

Kuo HC, Cheng CF, Clark RB, Lin JJ, Lin JL, Hoshijima M, Nguyen-Tran VT, Gu Y, Ikeda Y, Chu PH, Ross J, Giles WR, Chien KR. A Defect in the Kv Channel-Interacting Protein 2 (KChIP2) Gene Leads to a Complete Loss of I(to) and Confers Susceptibility to Ventricular Tachycardia. *Cell*. **2001**. 107(6):801-13.

Kuratomi S, Kuratomi A, Kuwahara K, Ishii TM, Nakao K, Saito Y, Takano M. NRSF Regulates the Developmental and Hypertrophic Changes of HCN4 Transcription in Rat Cardiac Myocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. **2007**. 353(1):67-73.

Lande G, Demolombe S, Bammert A, Moorman A, Charpentier F, Escande D. Transgenic Mice Overexpressing Human KvLQT1 Dominant-Negative Isoform. Part II: Pharmacological Profile. *Cardiovasc Res*. **2001**. 50(2):328-34.

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D et al. Initial Sequencing and Analysis of the Human Genome. *Nature*. **2001**. 409(6822):860-921.

Latronico MV, Catalucci D, Condorelli G. Emerging Role of MicroRNAs in Cardiovascular Biology. *Circ Res*. **2007**. 101(12):1225-36.

Lauribe P, Escande D, Nottin R, Coraboeuf E. Electrical Activity of Human Atrial Fibres at Frequencies Corresponding to Atrial Flutter. *Cardiovasc Res*. **1989**. 23(2):159-68.

Lavergne T, Guize L, Le Heuzey JY, Carcone P, Geslin J, Cousin MT. Closed-Chest Atrioventricular Junction Ablation by High-Frequency Energy Transcatheter Desiccation. *Lancet*. **1986**. 2(8511):858-9.

Leimeister C, Externbrink A, Klamt B, Gessler M. Hey Genes: a Novel Subfamily of Hairy- and Enhancer of Split Related Genes Specifically Expressed During Mouse Embryogenesis. *Mech Dev*. **1999**. 85(1-2):173-7.

Lesage F, Attali B, Lazdunski M, Barhanin J. ISK, a Slowly Activating Voltage-Sensitive K⁺ Channel. Characterization of Multiple cDNAs and Gene Organization in the Mouse. *FEBS Lett*. **1992**. 301(2):168-72.

Lauranguer V, Monteil A, Bourinet E, Dayanithi G, Nargeot J. T-Type Calcium Currents in Rat Cardiomyocytes During Postnatal Development: Contribution to Hormone Secretion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2000**. 279(5):H2540-H2548.

Li GR, Feng J, Yue L, Carrier M, Nattel S. Evidence for Two Components of Delayed Rectifier K⁺ Current in Human Ventricular Myocytes. *Circ Res*. **1996**. 78(4):689-96.

Liang Q, De Windt LJ, Witt SA, Kimball TR, Markham BE, Molkentin JD. The Transcription Factors GATA4 and GATA6 Regulate Cardiomyocyte Hypertrophy in Vitro and in Vivo. *J Biol Chem*. **2001**. 276(32):30245-53.

Liang Q & Molkentin JD. Divergent Signaling Pathways Converge on GATA4 to Regulate Cardiac Hypertrophic Gene Expression. *J Mol Cell Cardiol*. **2002**. 34(6):611-6.

Liberatore CM, Searcy-Schrick RD, Yutzey KE. Ventricular Expression of Tbx5 Inhibits Normal Heart Chamber Development. *Dev Biol*. **2000**. 223(1):169-80.

- Lin Q, Schwarz J, Bucana C, Olson EN. Control of Mouse Cardiac Morphogenesis and Myogenesis by Transcription Factor MEF2C. *Science*. **1997**. 276(5317):1404-7.
- Lincoln J, Kist R, Scherer G, Yutzey KE. Sox9 Is Required for Precursor Cell Expansion and Extracellular Matrix Organization During Mouse Heart Valve Development. *Dev Biol*. **2007**. 305(1):120-32.
- Linden DJ, Smeyne M, Connor JA. Induction of Cerebellar Long-Term Depression in Culture Requires Postsynaptic Action of Sodium Ions. *Neuron*. **1993**. 11(6):1093-100.
- Lindholm LH, Persson M, Alaupovic P, Carlberg B, Svensson A, Samuelsson O. Metabolic Outcome During 1 Year in Newly Detected Hypertensives: Results of the Antihypertensive Treatment and Lipid Profile in a North of Sweden Efficacy Evaluation (ALPINE Study). *J Hypertens*. **2003**. 21(8):1563-74.
- Lindner M, Erdmann E, Beuckelmann DJ. Calcium Content of the Sarcoplasmic Reticulum in Isolated Ventricular Myocytes From Patients With Terminal Heart Failure. *J Mol Cell Cardiol*. **1998**. 30(4):743-9.
- Lindsay EA. Chromosomal Microdeletions: Dissecting Del22q11 Syndrome. *Nat Rev Genet*. **2001**. 2(11):858-68.
- Lindsay EA, Vitelli F, Su H, Morishima M, Huynh T, Pramparo T, Jurecic V, Ogunrinu G, Sutherland HF, Scambler PJ, Bradley A, Baldini A. Tbx1 Haploinsufficiency in the DiGeorge Syndrome Region Causes Aortic Arch Defects in Mice. *Nature*. **2001**. 410(6824):97-101.
- Liu G, Iden JB, Kovithavongs K, Gulamhusein R, Duff HJ, Kavanagh KM. In Vivo Temporal and Spatial Distribution of Depolarization and Repolarization and the Illusive Murine T Wave. *J Physiol*. **2004**. 555(Pt 1):267-79.
- Liu J, Dobrzynski H, Yanni J, Boyett MR, Lei M. Organisation of the Mouse Sinoatrial Node: Structure and Expression of HCN Channels. *Cardiovasc Res*. **2007**. 73(4):729-38.
- Liu L, Fan QI, El Zaru MR, Vanderpool K, Hines RN, Marsh JD. Regulation of DHP Receptor Expression by Elements in the 5'-Flanking Sequence. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2000**. 278(4):H1153-H1162.
- Liu L & Nattel S. Differing Sympathetic and Vagal Effects on Atrial Fibrillation in Dogs: Role of Refractoriness Heterogeneity. *Am J Physiol*. **1997**. 273(2 Pt 2):H805-H816.
- Livak KJ & Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C(T)$) Method. *Methods*. **2001**. 25(4):402-8.
- Lloyd-Jones DM, Larson MG, Leip EP, Beiser A, D'Agostino RB, Kannel WB, Murabito JM, Vasan RS, Benjamin EJ, Levy D. Lifetime Risk for Developing Congestive Heart Failure: the Framingham Heart Study. *Circulation*. **2002**. 106(24):3068-72.
- Lomax AE, Kondo CS, Giles WR. Comparison of Time- and Voltage-Dependent K⁺ Currents in Myocytes From Left and Right Atria of Adult Mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2003**. 285(5):H1837-H1848.

London B, Jeron A, Zhou J, Buckett P, Han X, Mitchell GF, Koren G. Long QT and Ventricular Arrhythmias in Transgenic Mice Expressing the N Terminus and First Transmembrane Segment of a Voltage-Gated Potassium Channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1998**. 95(6):2926-31.

Lue WM & Boyden PA. Abnormal Electrical Properties of Myocytes From Chronically Infarcted Canine Heart. Alterations in Vmax and the Transient Outward Current. *Circulation*. **1992**. 85(3):1175-88.

Lundquist AL, Turner CL, Ballester LY, George AL, Jr. Expression and Transcriptional Control of Human KCNE Genes. *Genomics*. **2006**. 87(1):119-28.

Luo X, Xiao J, Lin H, Li B, Lu Y, Yang B, Wang Z. Transcriptional Activation by Stimulating Protein 1 and Post-Transcriptional Repression by Muscle-Specific MicroRNAs of IKs-Encoding Genes and Potential Implications in Regional Heterogeneity of Their Expressions. *J Cell Physiol*. **2007**. 212(2):358-67.

Luo X, Xiao J, Lin H, Lu Y, Yang B, Wang Z. Genomic Structure, Transcriptional Control, and Tissue Distribution of HERG1 and KCNQ1 Genes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2008**. 294(3):H1371-H1380.

Lyons I, Parsons LM, Hartley L, Li R, Andrews JE, Robb L, Harvey RP. Myogenic and Morphogenetic Defects in the Heart Tubes of Murine Embryos Lacking the Homeo Box Gene Nkx2-5. *Genes Dev*. **1995**. 9(13):1654-66.

Maier LS, Braunhalter J, Horn W, Weichert S, Pieske B. The Role of SR Ca(2+)-Content in Blunted Inotropic Responsiveness of Failing Human Myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. **2002**. 34(4):455-67.

Makita N, Bennett PB, Jr., George AL, Jr. Voltage-Gated Na⁺ Channel Beta 1 Subunit MRNA Expressed in Adult Human Skeletal Muscle, Heart, and Brain Is Encoded by a Single Gene. *J Biol Chem*. **1994**. 269(10):7571-8.

Marionneau C, Couette B, Liu J, Li H, Mangoni ME, Nargeot J, Lei M, Escande D, Demolombe S. Specific Pattern of Ionic Channel Gene Expression Associated With Pacemaker Activity in the Mouse Heart. *J Physiol*. **2005**. 562(Pt 1):223-34.

Massin M & Coremans C. [Chronic Heart Failure in Children: Recent Contributions of Physiopathology and Therapeutic Implications]. *Arch Pediatr*. **2001**. 8(10):1099-107.

Masuda H & Sperelakis N. Inwardly Rectifying Potassium Current in Rat Fetal and Neonatal Ventricular Cardiomyocytes. *Am J Physiol*. **1993**. 265(4 Pt 2):H1107-H1111.

McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN. MEF2: a Calcium-Dependent Regulator of Cell Division, Differentiation and Death. *Trends Biochem Sci*. **2002**. 27(1):40-7.

McMorn SO, Harrison SM, Zang WJ, Yu XJ, Boyett MR. A Direct Negative Inotropic Effect of Acetylcholine on Rat Ventricular Myocytes. *Am J Physiol*. **1993**. 265(4 Pt 2):H1393-H1400.

McMurray JJ. Angiotensin II Receptor Antagonists for the Treatment of Heart Failure: What Is Their Place After ELITE-II and Val-HeFT? *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* **2001.** 2(2):89-92.

McMurray JJ & Pfeffer MA. Heart Failure. *Lancet.* **2005.** 365(9474):1877-89.

Mellstrom B, Savignac M, Gomez-Villafuertes R, Naranjo JR. Ca²⁺-Operated Transcriptional Networks: Molecular Mechanisms and in Vivo Models. *Physiol Rev.* **2008.** 88(2):421-49.

Melnyk P, Zhang L, Shrier A, Nattel S. Differential Distribution of Kir2.1 and Kir2.3 Subunits in Canine Atrium and Ventricle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2002.** 283(3):H1123-H1133.

Meneghini V, Odent S, Platonova N, Egeo A, Merlo GR. Novel TBX3 Mutation Data in Families With Ulnar-Mammary Syndrome Indicate a Genotype-Phenotype Relationship: Mutations That Do Not Disrupt the T-Domain Are Associated With Less Severe Limb Defects. *Eur J Med Genet.* **2006.** 49(2):151-8.

Mercadier JJ, Lompre AM, Duc P, Boheler KR, Fraysse JB, Wisnewsky C, Allen PD, Komajda M, Schwartz K. Altered Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺(+)-ATPase Gene Expression in the Human Ventricle During End-Stage Heart Failure. *J Clin Invest.* **1990.** 85(1):305-9.

Merscher S, Funke B, Epstein JA, Heyer J, Puech A, Lu MM, Xavier RJ, Demay MB, Russell RG, Factor S, Tokooya K, Jore BS, Lopez M, Pandita RK, Lia M, Carrion D, Xu H, Schorle H, Kobler JB, Scambler P, Wynshaw-Boris A, Skoultschi AI, Morrow BE, Kucherlapati R. TBX1 Is Responsible for Cardiovascular Defects in Velo-Cardio-Facial/DiGeorge Syndrome. *Cell.* **2001.** 104(4):619-29.

Meysen S, Marger L, Hewett KW, Jarry-Guichard T, Agarkova I, Chauvin JP, Perriard JC, Izumo S, Gourdie RG, Mangoni ME, Nargeot J, Gros D, Miquerol L. Nkx2.5 Cell-Autonomous Gene Function Is Required for the Postnatal Formation of the Peripheral Ventricular Conduction System. *Dev Biol.* **2007.** 303(2):740-53.

Milanesi R, Baruscotti M, Gneccchi-Ruscione T, DiFrancesco D. Familial Sinus Bradycardia Associated With a Mutation in the Cardiac Pacemaker Channel. *N Engl J Med.* **2006.** 354(2):151-7.

Molkentin JD. The Zinc Finger-Containing Transcription Factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously Expressed Regulators of Tissue-Specific Gene Expression. *J Biol Chem.* **2000.** 275(50):38949-52.

Molkentin JD, Lin Q, Duncan SA, Olson EN. Requirement of the Transcription Factor GATA4 for Heart Tube Formation and Ventral Morphogenesis. *Genes Dev.* **1997.** 11(8):1061-72.

Mommersteeg MT, Hoogaars WM, Prall OW, Gier-de Vries C, Wiese C, Clout DE, Papaioannou VE, Brown NA, Harvey RP, Moorman AF, Christoffels VM. Molecular Pathway for the Localized Formation of the Sinoatrial Node. *Circ Res.* **2007.** 100(3):354-62.

Monceau, Camors, Charlemagne. Physiopathologie Du Remodelage Ventriculaire. *MT Cardio.* **2006.** 2(3):273-9.

Moorman AF & Christoffels VM. Cardiac Chamber Formation: Development, Genes, and Evolution. *Physiol Rev.* **2003**. 83(4):1223-67.

Mori Y, Folco E, Koren G. GH3 Cell-Specific Expression of Kv1.5 Gene. Regulation by a Silencer Containing a Dinucleotide Repetitive Element. *J Biol Chem.* **1995**. 270(46):27788-96.

Mori Y, Matsubara H, Folco E, Siegel A, Koren G. The Transcription of a Mammalian Voltage-Gated Potassium Channel Is Regulated by CAMP in a Cell-Specific Manner. *J Biol Chem.* **1993**. 268(35):26482-93.

Moskowitz IP, Kim JB, Moore ML, Wolf CM, Peterson MA, Shendure J, Nobrega MA, Yokota Y, Berul C, Izumo S, Seidman JG, Seidman CE. A Molecular Pathway Including Id2, Tbx5, and Nkx2-5 Required for Cardiac Conduction System Development. *Cell.* **2007**. 129(7):1365-76.

Movsesian MA, Karimi M, Green K, Jones LR. Ca(2+)-Transporting ATPase, Phospholamban, and Calsequestrin Levels in Nonfailing and Failing Human Myocardium. *Circulation.* **1994**. 90(2):653-7.

Mustapha Z, Pang L, Nattel S. Characterization of the Cardiac KCNE1 Gene Promoter. *Cardiovasc Res.* **2007**. 73(1):82-91.

Nabauer M, Beuckelmann DJ, Uberfuhr P, Steinbeck G. Regional Differences in Current Density and Rate-Dependent Properties of the Transient Outward Current in Subepicardial and Subendocardial Myocytes of Human Left Ventricle. *Circulation.* **1996**. 93(1):168-77.

Nakagawa Y, Kuwahara K, Harada M, Takahashi N, Yasuno S, Adachi Y, Kawakami R, Nakanishi M, Tanimoto K, Usami S, Kinoshita H, Saito Y, Nakao K. Class II HDACs Mediate CaMK-Dependent Signaling to NRSF in Ventricular Myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* **2006**. 41(6):1010-22.

Natarajan A, Yamagishi H, Ahmad F, Li D, Roberts R, Matsuoka R, Hill S, Srivastava D. Human EHAND, but Not DHAND, Is Down-Regulated in Cardiomyopathies. *J Mol Cell Cardiol.* **2001**. 33(9):1607-14.

Nattel S, Maguy A, Le Bouter S, Yeh YH. Arrhythmogenic Ion-Channel Remodeling in the Heart: Heart Failure, Myocardial Infarction, and Atrial Fibrillation. *Physiol Rev.* **2007**. 87(2):425-56.

Nattel S, Matthews C, De Blasio E, Han W, Li D, Yue L. Dose-Dependence of 4-Aminopyridine Plasma Concentrations and Electrophysiological Effects in Dogs : Potential Relevance to Ionic Mechanisms in Vivo. *Circulation.* **2000**. 101(10):1179-84.

Nemer G, Fadlalah F, Usta J, Nemer M, Dbaibo G, Obeid M, Bitar F. A Novel Mutation in the GATA4 Gene in Patients With Tetralogy of Fallot. *Hum Mutat.* **2006**. 27(3):293-4.

Nemer M. Genetic Insights into Normal and Abnormal Heart Development. *Cardiovasc Pathol.* **2008**. 17(1):48-54.

Nerbonne JM. Studying Cardiac Arrhythmias in the Mouse--a Reasonable Model for Probing Mechanisms? *Trends Cardiovasc Med.* **2004**. 14(3):83-93.

Nerbonne JM & Kass RS. Molecular Physiology of Cardiac Repolarization. *Physiol Rev.* **2005**. 85(4):1205-53.

Nerbonne JM, Nichols CG, Schwarz TL, Escande D. Genetic Manipulation of Cardiac K(+) Channel Function in Mice: What Have We Learned, and Where Do We Go From Here? *Circ Res.* **2001**. 89(11):944-56.

Nguemo F, Fleischmann BK, Schunkert H, Hescheler J, Reppel M. Functional Expression and Inactivation of L-Type Ca²⁺ Currents During Murine Heart Development - Implications for Cardiac Ca²⁺ Homeostasis. *Cell Physiol Biochem.* **2007**. 20(6):809-24.

Ninomiya I. Direct Evidence of Nonuniform Distribution of Vagal Effects on Dog Atria. *Circ Res.* **1966**. 19(3):576-83.

Niwa N, Yasui K, Opthof T, Takemura H, Shimizu A, Horiba M, Lee JK, Honjo H, Kamiya K, Kodama I. Cav3.2 Subunit Underlies the Functional T-Type Ca²⁺ Channel in Murine Hearts During the Embryonic Period. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2004**. 286(6):H2257-H2263.

Noble D. Modeling the Heart. *Physiology (Bethesda)*. **2004**. 19:191-7.

Noda M, Shimizu S, Tanabe T, Takai T, Kayano T, Ikeda T, Takahashi H, Nakayama H, Kanaoka Y, Minamino N, . Primary Structure of Electrophorus Electricus Sodium Channel Deduced From cDNA Sequence. *Nature.* **1984**. 312(5990):121-7.

Nof E, Luria D, Brass D, Marek D, Lahat H, Reznik-Wolf H, Pras E, Dascal N, Eldar M, Glikson M. Point Mutation in the HCN4 Cardiac Ion Channel Pore Affecting Synthesis, Trafficking, and Functional Expression Is Associated With Familial Asymptomatic Sinus Bradycardia. *Circulation.* **2007**. 116(5):463-70.

Nuss HB & Marban E. Electrophysiological Properties of Neonatal Mouse Cardiac Myocytes in Primary Culture. *J Physiol.* **1994**. 479 (Pt 2):265-79.

O'Rourke B, Kass DA, Tomaselli GF, Kaab S, Tunin R, Marban E. Mechanisms of Altered Excitation-Contraction Coupling in Canine Tachycardia-Induced Heart Failure, I: Experimental Studies. *Circ Res.* **1999**. 84(5):562-70.

Obrezhtchikova MN, Sosunov EA, Plotnikov A, Anyukhovsky EP, Gainullin RZ, Danilo P, Yeom ZH, Robinson RB, Rosen MR. Developmental Changes in IKr and IKs Contribute to Age-Related Expression of Dofetilide Effects on Repolarization and Proarrhythmia. *Cardiovasc Res.* **2003**. 59(2):339-50.

Oka T, Maillet M, Watt AJ, Schwartz RJ, Aronow BJ, Duncan SA, Molkenstein JD. Cardiac-Specific Deletion of Gata4 Reveals Its Requirement for Hypertrophy, Compensation, and Myocyte Viability. *Circ Res.* **2006**. 98(6):837-45.

Okazaki Y, Furuno M, Kasukawa T, Adachi J, Bono H, Kondo S, Nikaido I, Osato N, Saito R, Suzuki H, Yamanaka I, Kiyosawa H, Yagi K, Tomaru Y, Hasegawa Y, Nogami A, Schonbach C, Gojobori T, Baldarelli R, Hill DP, Bult C, Hume DA, Quackenbush J, Schriml LM, Kanapin A, Matsuda H, Batalov S, Beisel KW, Blake JA, Bradt D, Brusica V, Chothia C, Corbani LE, Cousins S, Dalla E, Dragani TA, Fletcher CF, Forrest A, Frazer KS, Gaasterland T, Gariboldi M, Gissi C, Godzik A, Gough J, Grimmond S, Gustincich S, Hirokawa N,

Jackson IJ, Jarvis ED, Kanai A et al. Analysis of the Mouse Transcriptome Based on Functional Annotation of 60,770 Full-Length cDNAs. *Nature*. **2002**. 420(6915):563-73.

Osaka T & Joyner RW. Developmental Changes in Calcium Currents of Rabbit Ventricular Cells. *Circ Res*. **1991**. 68(3):788-96.

Ouadid H, Albat B, Nargeot J. Calcium Currents in Diseased Human Cardiac Cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. **1995**. 25(2):282-91.

Pak PH, Nuss HB, Tunin RS, Kaab S, Tomaselli GF, Marban E, Kass DA. Repolarization Abnormalities, Arrhythmia and Sudden Death in Canine Tachycardia-Induced Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. **1997**. 30(2):576-84.

Pang L, Koren G, Wang Z, Nattel S. Tissue-Specific Expression of Two Human Ca(v)1.2 Isoforms Under the Control of Distinct 5' Flanking Regulatory Elements. *FEBS Lett*. **2003**. 546(2-3):349-54.

Papadatos GA, Wallerstein PM, Head CE, Ratcliff R, Brady PA, Benndorf K, Saumarez RC, Trezise AE, Huang CL, Vandenberg JJ, Colledge WH, Grace AA. Slowed Conduction and Ventricular Tachycardia After Targeted Disruption of the Cardiac Sodium Channel Gene *Scn5a*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2002**. 99(9):6210-5.

Papazian DM, Schwarz TL, Tempel BL, Jan YN, Jan LY. Cloning of Genomic and Complementary DNA From Shaker, a Putative Potassium Channel Gene From *Drosophila*. *Science*. **1987**. 237(4816):749-53.

Parlakian A, Charvet C, Escoubet B, Mericskay M, Molkentin JD, Gary-Bobo G, De Windt LJ, Ludovsky MA, Paulin D, Daegelen D, Tuil D, Li Z. Temporally Controlled Onset of Dilated Cardiomyopathy Through Disruption of the SRF Gene in Adult Heart. *Circulation*. **2005**. 112(19):2930-9.

Pashmforoush M, Lu JT, Chen H, Amand TS, Kondo R, Pradervand S, Evans SM, Clark B, Feramisco JR, Giles W, Ho SY, Benson DW, Silberbach M, Shou W, Chien KR. Nkx2-5 Pathways and Congenital Heart Disease; Loss of Ventricular Myocyte Lineage Specification Leads to Progressive Cardiomyopathy and Complete Heart Block. *Cell*. **2004**. 117(3):373-86.

Patberg KW, Obrezhtchikova MN, Giardina SF, Symes AJ, Plotnikov AN, Qu J, Chandra P, McKinnon D, Liou SR, Rybin AV, Shlapakova I, Danilo P, Jr., Yang J, Rosen MR. The CAMP Response Element Binding Protein Modulates Expression of the Transient Outward Current: Implications for Cardiac Memory. *Cardiovasc Res*. **2005**. 68(2):259-67.

Patberg KW, Plotnikov AN, Quamina A, Gainullin RZ, Rybin A, Danilo P, Jr., Sun LS, Rosen MR. Cardiac Memory Is Associated With Decreased Levels of the Transcriptional Factor CREB Modulated by Angiotensin II and Calcium. *Circ Res*. **2003**. 93(5):472-8.

Peterkin T, Gibson A, Loose M, Patient R. The Roles of GATA-4, -5 and -6 in Vertebrate Heart Development. *Semin Cell Dev Biol*. **2005**. 16(1):83-94.

Pham TV & Rosen MR. Sex, Hormones, and Repolarization. *Cardiovasc Res*. **2002**. 53(3):740-51.

Philip-Couderc P, Tavares NI, Roatti A, Lerch R, Montessuit C, Baertschi AJ. Forkhead Transcription Factors Coordinate Expression of Myocardial KATP Channel Subunits and Energy Metabolism. *Circ Res*. **2008**. 102(2):e20-e35.

Piacentino V, III, Weber CR, Chen X, Weisser-Thomas J, Margulies KB, Bers DM, Houser SR. Cellular Basis of Abnormal Calcium Transients of Failing Human Ventricular Myocytes. *Circ Res*. **2003**. 92(6):651-8.

Pieske B, Maier LS, Bers DM, Hasenfuss G. Ca²⁺ Handling and Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Content in Isolated Failing and Nonfailing Human Myocardium. *Circ Res*. **1999**. 85(1):38-46.

Potreau D, Gomez JP, Fares N. Depressed Transient Outward Current in Single Hypertrophied Cardiomyocytes Isolated From the Right Ventricle of Ferret Heart. *Cardiovasc Res*. **1995**. 30(3):440-8.

Pourrier M, Schram G, Nattel S. Properties, Expression and Potential Roles of Cardiac K⁺ Channel Accessory Subunits: MinK, MiRPs, KChIP, and KChAP. *J Membr Biol*. **2003**. 194(3):141-52.

Pruunsild P & Timmusk T. Structure, Alternative Splicing, and Expression of the Human and Mouse KCNIP Gene Family. *Genomics*. **2005**. 86(5):581-93.

Qu J & Robinson RB. Cardiac Ion Channel Expression and Regulation: the Role of Innervation. *J Mol Cell Cardiol*. **2004**. 37(2):439-48.

Ravens U & Wettwer E. Electrophysiological Aspects of Changes in Heart Rate. *Basic Res Cardiol*. **1998**. 93 Suppl 1:60-5.

Redell JB & Tempel BL. Multiple Promoter Elements Interact to Control the Transcription of the Potassium Channel Gene, KCNJ2. *J Biol Chem*. **1998**. 273(35):22807-18.

Reinecke H, Studer R, Vetter R, Just H, Holtz J, Drexler H. Role of the Cardiac Sarcolemmal Na(+)-Ca²⁺ Exchanger in End-Stage Human Heart Failure. *Ann N Y Acad Sci*. **1996**. 779:543-5.

Rentschler S, Vaidya DM, Tamaddon H, Degenhardt K, Sassoon D, Morley GE, Jalife J, Fishman GI. Visualization and Functional Characterization of the Developing Murine Cardiac Conduction System. *Development*. **2001**. 128(10):1785-92.

Reuter H. The Dependence of Slow Inward Current in Purkinje Fibres on the Extracellular Calcium-Concentration. *J Physiol*. **1967**. 192(2):479-92.

Roberds SL & Tamkun MM. Developmental Expression of Cloned Cardiac Potassium Channels. *FEBS Lett*. **1991**. 284(2):152-4.

Robinson RB, Yu H, Chang F, Cohen IS. Developmental Change in the Voltage-Dependence of the Pacemaker Current, I_f, in Rat Ventricle Cells. *Pflugers Arch*. **1997**. 433(4):533-5.

Roca TP, Pigott JD, Clarkson CW, Crumb WJ, Jr. L-Type Calcium Current in Pediatric and Adult Human Atrial Myocytes: Evidence for Developmental Changes in Channel Inactivation. *Pediatr Res*. **1996**. 40(3):462-8.

Roder K & Koren G. The K⁺ Channel Gene, *Kcnb1*: Genomic Structure and Characterization of Its 5'-Regulatory Region As Part of an Overlapping Gene Group. *Biol Chem.* **2006.** 387(9):1237-46.

Rorabacher DB. Statistical Treatment for Rejection of Deviant Values: Critical Values of Dixon's "Q" Parameter and Related Subrange Ratios at the 95% Confidence Level. *Anal Chem.* **1991.** 63(2):139-46.

Rosati B, Grau F, McKinnon D. Regional Variation in mRNA Transcript Abundance Within the Ventricular Wall. *J Mol Cell Cardiol.* **2006.** 40(2):295-302.

Rosati B & McKinnon D. Regulation of Ion Channel Expression. *Circ Res.* **2004.** 94(7):874-83.

Rose CR. Na⁺ Signals at Central Synapses. *Neuroscientist.* **2002.** 8(6):532-9.

Rose J, Armoundas AA, Tian Y, Disilvestre D, Burysek M, Halperin V, O'Rourke B, Kass DA, Marban E, Tomaselli GF. Molecular Correlates of Altered Expression of Potassium Currents in Failing Rabbit Myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2005.** 288(5):H2077-H2087.

Rosen MR, Reder RF, Hordof AJ, Davies M, Danilo P, Jr. Age-Related Changes in Purkinje Fiber Action Potentials of Adult Dogs. *Circ Res.* **1978.** 43(6):931-8.

Rossow CF, Dilly KW, Santana LF. Differential Calcineurin/NFATc3 Activity Contributes to the Ito Transmural Gradient in the Mouse Heart. *Circ Res.* **2006.** 98(10):1306-13.

Rossow CF, Minami E, Chase EG, Murry CE, Santana LF. NFATc3-Induced Reductions in Voltage-Gated K⁺ Currents After Myocardial Infarction. *Circ Res.* **2004.** 94(10):1340-50.

Royer A, van Veen TA, Le Bouter S, Marionneau C, Griol-Charhbili V, Leoni AL, Steenman M, van Rijen HV, Demolombe S, Goddard CA, Richer C, Escoubet B, Jarry-Guichard T, Colledge WH, Gros D, de Bakker JM, Grace AA, Escande D, Charpentier F. Mouse Model of SCN5A-Linked Hereditary Lenegre's Disease: Age-Related Conduction Slowing and Myocardial Fibrosis. *Circulation.* **2005.** 111(14):1738-46.

Saada NI, Carrillo ED, Dai B, Wang WZ, Dettbarn C, Sanchez J, Palade P. Expression of Multiple CaV1.2 Transcripts in Rat Tissues Mediated by Different Promoters. *Cell Calcium.* **2005.** 37(4):301-9.

Saadane N, Alpert L, Chalifour LE. Expression of Immediate Early Genes, GATA-4, and Nkx-2.5 in Adrenergic-Induced Cardiac Hypertrophy and During Regression in Adult Mice. *Br J Pharmacol.* **1999.** 127(5):1165-76.

Sadoshima J & Izumo S. The Cellular and Molecular Response of Cardiac Myocytes to Mechanical Stress. *Annu Rev Physiol.* **1997.** 59:551-71.

Sakakibara Y, Wasserstrom JA, Furukawa T, Jia H, Arentzen CE, Hartz RS, Singer DH. Characterization of the Sodium Current in Single Human Atrial Myocytes. *Circ Res.* **1992.** 71(3):535-46.

- Sakata Y, Koibuchi N, Xiang F, Youngblood JM, Kamei CN, Chin MT. The Spectrum of Cardiovascular Anomalies in CHF1/Hey2 Deficient Mice Reveals Roles in Endocardial Cushion, Myocardial and Vascular Maturation. *J Mol Cell Cardiol.* **2006.** 40(2):267-73.
- Sandelin A, Alkema W, Engstrom P, Wasserman WW, Lenhard B. JASPAR: an Open-Access Database for Eukaryotic Transcription Factor Binding Profiles. *Nucleic Acids Res.* **2004.** 32(Database issue):D91-D94.
- Satoh H & Sperelakis N. Identification of the Hyperpolarization-Activated Inward Current in Young Embryonic Chick Heart Myocytes. *J Dev Physiol.* **1991.** 15(4):247-52.
- Scalbert E & Bril A. Implication of MicroRNAs in the Cardiovascular System. *Curr Opin Pharmacol.* **2008.** 8(2):181-8.
- Schaub MC, Hefti MA, Zaugg M. Integration of Calcium With the Signaling Network in Cardiac Myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* **2006.** 41(2):183-214.
- Schmittgen TD & Livak KJ. Analyzing Real-Time PCR Data by the Comparative C(T) Method. *Nat Protoc.* **2008.** 3(6):1101-8.
- Schoenmakers M, Ramakers C, van Opstal JM, Leunissen JD, Londono C, Vos MA. Asynchronous Development of Electrical Remodeling and Cardiac Hypertrophy in the Complete AV Block Dog. *Cardiovasc Res.* **2003.** 59(2):351-9.
- Schott JJ, Benson DW, Basson CT, Pease W, Silberbach GM, Moak JP, Maron BJ, Seidman CE, Seidman JG. Congenital Heart Disease Caused by Mutations in the Transcription Factor NKX2-5. *Science.* **1998.** 281(5373):108-11.
- Schram G, Pourrier M, Melnyk P, Nattel S. Differential Distribution of Cardiac Ion Channel Expression As a Basis for Regional Specialization in Electrical Function. *Circ Res.* **2002.** 90(9):939-50.
- Schulze-Bahr E, Neu A, Friederich P, Kaupp UB, Breithardt G, Pongs O, Isbrandt D. Pacemaker Channel Dysfunction in a Patient With Sinus Node Disease. *J Clin Invest.* **2003.** 111(10):1537-45.
- Schweizer PA, Yampolsky P, Malik R, Thomas D, Zehelein J, Katus HA, Koenen M. Transcription Profiling of HCN-Channel Isoforms Throughout Mouse Cardiac Development. *Basic Res Cardiol.* **2009.**
- Sengupta A, Molkentin JD, Yutzey KE. FoxO Transcription Factors Promote Autophagy in Cardiomyocytes. *J Biol Chem.* **2009.**
- Shang LL & Dudley SC, Jr. Tandem Promoters and Developmentally Regulated 5'- and 3'-MRNA Untranslated Regions of the Mouse Scn5a Cardiac Sodium Channel. *J Biol Chem.* **2005.** 280(2):933-40.
- Shang LL, Sanyal S, Pfahnl AE, Jiao Z, Allen J, Liu H, Dudley SC, Jr. NF-KappaB-Dependent Transcriptional Regulation of the Cardiac Scn5a Sodium Channel by Angiotensin II. *Am J Physiol Cell Physiol.* **2008.** 294(1):C372-C379.

Shi W, Wymore R, Yu H, Wu J, Wymore RT, Pan Z, Robinson RB, Dixon JE, McKinnon D, Cohen IS. Distribution and Prevalence of Hyperpolarization-Activated Cation Channel (HCN) mRNA Expression in Cardiac Tissues. *Circ Res*. **1999**. 85(1):e1-e6.

Shibata R, Misonou H, Campomanes CR, Anderson AE, Schrader LA, Doliveira LC, Carroll KI, Sweatt JD, Rhodes KJ, Trimmer JS. A Fundamental Role for KChIPs in Determining the Molecular Properties and Trafficking of Kv4.2 Potassium Channels. *J Biol Chem*. **2003**. 278(38):36445-54.

Silverman ME & Hollman A. Discovery of the Sinus Node by Keith and Flack: on the Centennial of Their 1907 Publication. *Heart*. **2007**. 93(10):1184-7.

Spitzer NC, Lautermilch NJ, Smith RD, Gomez TM. Coding of Neuronal Differentiation by Calcium Transients. *Bioessays*. **2000**. 22(9):811-7.

Srivastava D, Thomas T, Lin Q, Kirby ML, Brown D, Olson EN. Regulation of Cardiac Mesodermal and Neural Crest Development by the BHLH Transcription Factor, DHAND. *Nat Genet*. **1997**. 16(2):154-60.

Stankunas K, Shang C, Twu KY, Kao SC, Jenkins NA, Copeland NG, Sanyal M, Selleri L, Cleary ML, Chang CP. Pbx/Meis Deficiencies Demonstrate Multigenetic Origins of Congenital Heart Disease. *Circ Res*. **2008**. 103(7):702-9.

Stannius HF. Zwei Reihen Physiologischer Versuche. **1852**. 2:85-100.

Stennard FA & Harvey RP. T-Box Transcription Factors and Their Roles in Regulatory Hierarchies in the Developing Heart. *Development*. **2005**. 132(22):4897-910.

Stieber J, Herrmann S, Feil S, Loster J, Feil R, Biel M, Hofmann F, Ludwig A. The Hyperpolarization-Activated Channel HCN4 Is Required for the Generation of Pacemaker Action Potentials in the Embryonic Heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2003**. 100(25):15235-40.

Stillitano F, Lonardo G, Zicha S, Varro A, Cerbai E, Mugelli A, Nattel S. Molecular Basis of Funny Current (If) in Normal and Failing Human Heart. *J Mol Cell Cardiol*. **2008**. 45(2):289-99.

Stormo GD. DNA Binding Sites: Representation and Discovery. *Bioinformatics*. **2000**. 16(1):16-23.

Swynghedauw B. Phenotypic Plasticity of Adult Myocardium: Molecular Mechanisms. *J Exp Biol*. **2006**. 209(Pt 12):2320-7.

Szentadrassy N, Banyasz T, Biro T, Szabo G, Toth BI, Magyar J, Lazar J, Varro A, Kovacs L, Nanasi PP. Apico-Basal Inhomogeneity in Distribution of Ion Channels in Canine and Human Ventricular Myocardium. *Cardiovasc Res*. **2005**. 65(4):851-60.

Takahashi T, Allen PD, Lacro RV, Marks AR, Dennis AR, Schoen FJ, Grossman W, Marsh JD, Izumo S. Expression of Dihydropyridine Receptor (Ca²⁺ Channel) and Calsequestrin Genes in the Myocardium of Patients With End-Stage Heart Failure. *J Clin Invest*. **1992**. 90(3):927-35.

Takemura H, Yasui K, Opthof T, Niwa N, Horiba M, Shimizu A, Lee JK, Honjo H, Kamiya K, Ueda Y, Kodama I. Subtype Switching of L-Type Ca²⁺ Channel From Cav1.3 to Cav1.2 in Embryonic Murine Ventricle. *Circ J*. **2005**. 69(11):1405-11.

Tan FL, Moravec CS, Li J, Apperson-Hansen C, McCarthy PM, Young JB, Bond M. The Gene Expression Fingerprint of Human Heart Failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2002**. 99(17):11387-92.

Teo K, Yusuf S, Sleight P, Anderson C, Mookadam F, Ramos B, Hilbrich L, Pogue J, Schumacher H. Rationale, Design, and Baseline Characteristics of 2 Large, Simple, Randomized Trials Evaluating Telmisartan, Ramipril, and Their Combination in High-Risk Patients: the Ongoing Telmisartan Alone and in Combination With Ramipril Global Endpoint Trial/Telmisartan Randomized Assessment Study in ACE Intolerant Subjects With Cardiovascular Disease (ONTARGET/TRANSCEND) Trials. *Am Heart J*. **2004**. 148(1):52-61.

Tessari A, Pietrobon M, Notte A, Cifelli G, Gage PJ, Schneider MD, Lembo G, Campione M. Myocardial Pitx2 Differentially Regulates the Left Atrial Identity and Ventricular Asymmetric Remodeling Programs. *Circ Res*. **2008**. 102(7):813-22.

Teutsch C, Kondo RP, Dederko DA, Chrast J, Chien KR, Giles WR. Spatial Distributions of Kv4 Channels and KChip2 Isoforms in the Murine Heart Based on Laser Capture Microdissection. *Cardiovasc Res*. **2007**. 73(4):739-49.

Thattaliyath BD, Livi CB, Steinhilper ME, Toney GM, Firulli AB. HAND1 and HAND2 Are Expressed in the Adult-Rodent Heart and Are Modulated During Cardiac Hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun*. **2002**. 297(4):870-5.

Thompson JT, Rackley MS, O'Brien TX. Upregulation of the Cardiac Homeobox Gene Nkx2-5 (CSX) in Feline Right Ventricular Pressure Overload. *Am J Physiol*. **1998**. 274(5 Pt 2):H1569-H1573.

Thum T, Galuppo P, Wolf C, Fiedler J, Kneitz S, van Laake LW, Doevendans PA, Mummery CL, Borlak J, Haverich A, Gross C, Engelhardt S, Ertl G, Bauersachs J. MicroRNAs in the Human Heart: a Clue to Fetal Gene Reprogramming in Heart Failure. *Circulation*. **2007**. 116(3):258-67.

Tipparaju SM, Kumar R, Wang Y, Joyner RW, Wagner MB. Developmental Differences in L-Type Calcium Current of Human Atrial Myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2004**. 286(5):H1963-H1969.

Tomaselli GF, Beuckelmann DJ, Calkins HG, Berger RD, Kessler PD, Lawrence JH, Kass D, Feldman AM, Marban E. Sudden Cardiac Death in Heart Failure. The Role of Abnormal Repolarization. *Circulation*. **1994**. 90(5):2534-9.

Tomaselli GF & Marban E. Electrophysiological Remodeling in Hypertrophy and Heart Failure. *Cardiovasc Res*. **1999**. 42(2):270-83.

Tomaselli GF & Zipes DP. What Causes Sudden Death in Heart Failure? *Circ Res*. **2004**. 95(8):754-63.

Trepanier-Boulay V, Lupien MA, St Michel C, Fiset C. Postnatal Development of Atrial Repolarization in the Mouse. *Cardiovasc Res*. **2004**. 64(1):84-93.

Tsai CT, Wang DL, Chen WP, Hwang JJ, Hsieh CS, Hsu KL, Tseng CD, Lai LP, Tseng YZ, Chiang FT, Lin JL. Angiotensin II Increases Expression of Alpha1C Subunit of L-Type Calcium Channel Through a Reactive Oxygen Species and CAMP Response Element-Binding Protein-Dependent Pathway in HL-1 Myocytes. *Circ Res*. **2007**. 100(10):1476-85.

Tsunakawa H, Miyamoto N, Kawabata M, Mashima S. [Electrocardiogram in Heart Failure]. *Nippon Rinsho*. **1993**. 51(5):1222-32.

Ueda K, Nakamura K, Hayashi T, Inagaki N, Takahashi M, Arimura T, Morita H, Higashiuesato Y, Hirano Y, Yasunami M, Takishita S, Yamashina A, Ohe T, Sunamori M, Hiraoka M, Kimura A. Functional Characterization of a Trafficking-Defective HCN4 Mutation, D553N, Associated With Cardiac Arrhythmia. *J Biol Chem*. **2004**. 279(26):27194-8.

Valverde P & Koren G. Purification and Preliminary Characterization of a Cardiac Kv1.5 Repressor Element Binding Factor. *Circ Res*. **1999**. 84(8):937-44.

van Rijen HV, van Veen TA, van Kempen MJ, Wilms-Schopman FJ, Potse M, Krueger O, Willecke K, Opthof T, Jongsma HJ, de Bakker JM. Impaired Conduction in the Bundle Branches of Mouse Hearts Lacking the Gap Junction Protein Connexin40. *Circulation*. **2001**. 103(11):1591-8.

Varro A, Nanasi PP, Lathrop DA. Potassium Currents in Isolated Human Atrial and Ventricular Cardiocytes. *Acta Physiol Scand*. **1993**. 149(2):133-42.

Vitelli F, Morishima M, Taddei I, Lindsay EA, Baldini A. Tbx1 Mutation Causes Multiple Cardiovascular Defects and Disrupts Neural Crest and Cranial Nerve Migratory Pathways. *Hum Mol Genet*. **2002**. 11(8):915-22.

Wahler GM. Developmental Increases in the Inwardly Rectifying Potassium Current of Rat Ventricular Myocytes. *Am J Physiol*. **1992**. 262(5 Pt 1):C1266-C1272.

Wakaguri H, Yamashita R, Suzuki Y, Sugano S, Nakai K. DBTSS: Database of Transcription Start Sites, Progress Report 2008. *Nucleic Acids Res*. **2008**. 36(Database issue):D97-101.

Waller AD. A Demonstration on Man of Electromotive Changes Accompanying the Heart's Beat. *J Physiol*. **1887**. 8(5):229-34.

Wang L & Duff HJ. Identification and Characteristics of Delayed Rectifier K⁺ Current in Fetal Mouse Ventricular Myocytes. *Am J Physiol*. **1996**. 270(6 Pt 2):H2088-H2093.

Wang Y, Morishima M, Zheng M, Uchino T, Mannen K, Takahashi A, Nakaya Y, Komuro I, Ono K. Transcription Factors Csx/Nkx2.5 and GATA4 Distinctly Regulate Expression of Ca²⁺ Channels in Neonatal Rat Heart. *J Mol Cell Cardiol*. **2007**. 42(6):1045-53.

Wang Z, Yue L, White M, Pelletier G, Nattel S. Differential Distribution of Inward Rectifier Potassium Channel Transcripts in Human Atrium Versus Ventricle. *Circulation*. **1998**. 98(22):2422-8.

- Watanabe T, Delbridge LM, Bustamante JO, McDonald TF. Heterogeneity of the Action Potential in Isolated Rat Ventricular Myocytes and Tissue. *Circ Res*. **1983**. 52(3):280-90.
- Weinmann AS. Novel ChIP-Based Strategies to Uncover Transcription Factor Target Genes in the Immune System. *Nat Rev Immunol*. **2004**. 4(5):381-6.
- West AE, Griffith EC, Greenberg ME. Regulation of Transcription Factors by Neuronal Activity. *Nat Rev Neurosci*. **2002**. 3(12):921-31.
- Wettwer E, Amos GJ, Posival H, Ravens U. Transient Outward Current in Human Ventricular Myocytes of Subepicardial and Subendocardial Origin. *Circ Res*. **1994**. 75(3):473-82.
- Wetzel GT, Chen F, Klitzner TS. Ca²⁺ Channel Kinetics in Acutely Isolated Fetal, Neonatal, and Adult Rabbit Cardiac Myocytes. *Circ Res*. **1993**. 72(5):1065-74.
- Wetzel GT & Klitzner TS. Developmental Cardiac Electrophysiology Recent Advances in Cellular Physiology. *Cardiovasc Res*. **1996**. 31 Spec No:E52-E60.
- Whitmarsh AJ & Davis RJ. Transcription Factor AP-1 Regulation by Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathways. *J Mol Med*. **1996**. 74(10):589-607.
- Wilkins BJ, De Windt LJ, Bueno OF, Braz JC, Glascock BJ, Kimball TF, Molkentin JD. Targeted Disruption of NFATc3, but Not NFATc4, Reveals an Intrinsic Defect in Calcineurin-Mediated Cardiac Hypertrophic Growth. *Mol Cell Biol*. **2002**. 22(21):7603-13.
- Wingender E, Dietze P, Karas H, Knuppel R. TRANSFAC: a Database on Transcription Factors and Their DNA Binding Sites. *Nucleic Acids Res*. **1996**. 24(1):238-41.
- Wymore RS, Negulescu D, Kinoshita K, Kalman K, Aiyar J, Gutman GA, Chandy KG. Characterization of the Transcription Unit of Mouse Kv1.4, a Voltage-Gated Potassium Channel Gene. *J Biol Chem*. **1996**. 271(26):15629-34.
- Xia Y, McMillin JB, Lewis A, Moore M, Zhu WG, Williams RS, Kellems RE. Electrical Stimulation of Neonatal Cardiac Myocytes Activates the NFAT3 and GATA4 Pathways and Up-Regulates the Adenylosuccinate Synthetase 1 Gene. *J Biol Chem*. **2000**. 275(3):1855-63.
- Xie LH, Takano M, Noma A. Development of Inwardly Rectifying K⁺ Channel Family in Rat Ventricular Myocytes. *Am J Physiol*. **1997**. 272(4 Pt 2):H1741-H1750.
- Xu H, Dixon JE, Barry DM, Trimmer JS, Merlie JP, McKinnon D, Nerbonne JM. Developmental Analysis Reveals Mismatches in the Expression of K⁺ Channel Alpha Subunits and Voltage-Gated K⁺ Channel Currents in Rat Ventricular Myocytes. *J Gen Physiol*. **1996**. 108(5):405-19.
- Xu H, Guo W, Nerbonne JM. Four Kinetically Distinct Depolarization-Activated K⁺ Currents in Adult Mouse Ventricular Myocytes. *J Gen Physiol*. **1999a**. 113(5):661-78.
- Xu H, Li H, Nerbonne JM. Elimination of the Transient Outward Current and Action Potential Prolongation in Mouse Atrial Myocytes Expressing a Dominant Negative Kv4 Alpha Subunit. *J Physiol*. **1999b**. 519 Pt 1:11-21.

Xu J, Gong NL, Bodi I, Aronow BJ, Backx PH, Molkenstein JD. Myocyte Enhancer Factors 2A and 2C Induce Dilated Cardiomyopathy in Transgenic Mice. *J Biol Chem*. **2006**. 281(14):9152-62.

Xu X & Best PM. Postnatal Changes in T-Type Calcium Current Density in Rat Atrial Myocytes. *J Physiol*. **1992**. 454:657-72.

Xu XP & Best PM. Decreased Transient Outward K⁺ Current in Ventricular Myocytes From Acromegalic Rats. *Am J Physiol*. **1991**. 260(3 Pt 2):H935-H942.

Yagi H, Furutani Y, Hamada H, Sasaki T, Asakawa S, Minoshima S, Ichida F, Joo K, Kimura M, Imamura S, Kamatani N, Momma K, Takao A, Nakazawa M, Shimizu N, Matsuoka R. Role of TBX1 in Human Del22q11.2 Syndrome. *Lancet*. **2003**. 362(9393):1366-73.

Yamagishi H, Yamagishi C, Nakagawa O, Harvey RP, Olson EN, Srivastava D. The Combinatorial Activities of Nkx2.5 and DHAND Are Essential for Cardiac Ventricle Formation. *Dev Biol*. **2001**. 239(2):190-203.

Yamasaki H, Krutovskikh V, Mesnil M, Tanaka T, Zaidan-Dagli ML, Omori Y. Role of Connexin (Gap Junction) Genes in Cell Growth Control and Carcinogenesis. *C R Acad Sci III*. **1999**. 322(2-3):151-9.

Yang B, Lin H, Xiao J, Lu Y, Luo X, Li B, Zhang Y, Xu C, Bai Y, Wang H, Chen G, Wang Z. The Muscle-Specific MicroRNA MiR-1 Regulates Cardiac Arrhythmogenic Potential by Targeting GJA1 and KCNJ2. *Nat Med*. **2007**. 13(4):486-91.

Yang P, Koopmann TT, Pfeufer A, Jalilzadeh S, Schulze-Bahr E, Kaab S, Wilde AA, Roden DM, Bezzina CR. Polymorphisms in the Cardiac Sodium Channel Promoter Displaying Variant in Vitro Expression Activity. *Eur J Hum Genet*. **2008**. 16(3):350-7.

Yang P, Kupersmidt S, Roden DM. Cloning and Initial Characterization of the Human Cardiac Sodium Channel (SCN5A) Promoter. *Cardiovasc Res*. **2004**. 61(1):56-65.

Yang Z, Shen W, Rottman JN, Wikswo JP, Murray KT. Rapid Stimulation Causes Electrical Remodeling in Cultured Atrial Myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. **2005**. 38(2):299-308.

Yao JA, Jiang M, Fan JS, Zhou YY, Tseng GN. Heterogeneous Changes in K Currents in Rat Ventricles Three Days After Myocardial Infarction. *Cardiovasc Res*. **1999**. 44(1):132-45.

Yasui K, Liu W, Opthof T, Kada K, Lee JK, Kamiya K, Kodama I. I(f) Current and Spontaneous Activity in Mouse Embryonic Ventricular Myocytes. *Circ Res*. **2001**. 88(5):536-42.

Yeung KY, Haynor DR, Ruzzo WL. Validating Clustering for Gene Expression Data. *Bioinformatics*. **2001**. 17(4):309-18.

Yin L, Huang CH, Ni J. Clustering of Gene Expression Data: Performance and Similarity Analysis. *BMC Bioinformatics*. **2006**. 7 Suppl 4:S19.

Yona G, Dirks W, Rahman S. Comparing Algorithms for Clustering of Expression Data: How to Assess Gene Clusters. *Methods Mol Biol*. **2009**. 541:479-509.

Yutzey KE. Teed Off: Cardiac Conduction System Development Requires T-Box Transcription Factors. *Circ Res.* **2008.** 102(11):1295-7.

Zhang TT, Takimoto K, Stewart AF, Zhu C, Levitan ES. Independent Regulation of Cardiac Kv4.3 Potassium Channel Expression by Angiotensin II and Phenylephrine. *Circ Res.* **2001a.** 88(5):476-82.

Zhang X, Azhar G, Chai J, Sheridan P, Nagano K, Brown T, Yang J, Khrapko K, Borrás AM, Lawitts J, Misra RP, Wei JY. Cardiomyopathy in Transgenic Mice With Cardiac-Specific Overexpression of Serum Response Factor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2001b.** 280(4):H1782-H1792.

Zicha S, Xiao L, Stafford S, Cha TJ, Han W, Varro A, Nattel S. Transmural Expression of Transient Outward Potassium Current Subunits in Normal and Failing Canine and Human Hearts. *J Physiol.* **2004.** 561(Pt 3):735-48.

Zimmer T, Bollensdorff C, Haufe V, Birch-Hirschfeld E, Benndorf K. Mouse Heart Na⁺ Channels: Primary Structure and Function of Two Isoforms and Alternatively Spliced Variants. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2002.** 282(3):H1007-H1017.

**PUBLICATIONS
ET COMMUNICATIONS ORALES**

- ARTICLES ORIGINAUX

The N-terminal juxtamembranous domain of KCNQ1 is critical for channel surface expression: implications in the Romano-Ward LQT1 syndrome.

Dahimène S, Alcoléa S, Naud P, Jourdon P, Escande D, Brasseur R, Thomas A, Baró I, Mérot J.

Developing cell therapy techniques for respiratory disease: Intratracheal delivery of genetically engineered stem cells in a murine model of airway injury.

Leblond AL, Naud P, Forest V, Gourden C, Sagan C, Romefort B, Mathieu E, Delorme B, Collin C, Pages JC, Sensebe L, Pitard B, Lemarchand P.

Time-course of molecular remodeling and spontaneous ventricular tachycardia in a mouse model of acute complete atrioventricular block

Naud P, Bignolais O, Le Quang K, El Harchi A, Piron J, Leoni AL, Escande D, Demolombe S, Charpentier F.

- COMMUNICATIONS ORALES

Genomic and functional expression of cardiac progenitors derived from mouse embryonic stem cells

Naud P., Dagouassat M., Lemarchand P., Jourdon P. (2005) Ecole d'été, Le Croisic (France)

Mechanism of sodium channel Nav1.5 transcriptional regulation : an integrative biology approach

Naud P., Bignolais O., Morissard J., Demolombe S. (2007) Ecole d'été, Le Croisic (France)

Regional and tissue specific expression signatures of transcription regulators and ion channel genes in the adult mouse heart : a comprehensive transcriptomic approach

Naud P., Bignolais O., Morissard J., Marionneau C., Lei M., Demolombe S. (9-11 avril 2008) 3ème Congrès commun de la Société de Physiologie et de la Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique (SFPT), Clermont Ferrand, (France)

New insights into the mechanisms of the cardiac electrophysiological changes during development and maturation in mouse

Naud P., Courboulain A., Morissard J., Demolombe S. (25-27 septembre 2008) Rencontre institut du thorax (Nantes) – cardiomet (Lausanne), Nantes (France)

New insights into the mechanisms of the cardiac electrophysiological changes with aging in mice

Naud P., Courboulain A., Morissard J., Frelin Y., Charpentier F., Demolombe S., (15-17 avril 2009) 4ème Congrès commun de la Société de Physiologie et de la Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique (SFPT), Marseille, (France), Poster commenté

ANNEXES

[Circ Res.](#) 2006 Nov 10;99(10):1076-83. Epub 2006 Oct 19.

The N-terminal juxtamembranous domain of KCNQ1 is critical for channel surface expression: implications in the Romano-Ward LQT1 syndrome.

[Dahimène S](#), [Alcoléa S](#), [Naud P](#), [Jourdon P](#), [Escande D](#), [Brasseur R](#), [Thomas A](#), [Baró I](#), [Mérot J](#).

Inserm, U533, Nantes, France.

N-terminal mutations in the KCNQ1 channel are frequently linked to fatal arrhythmias in newborn children and adolescents but the cellular mechanisms involved in this dramatic issue remain, however, to be discovered. Here, we analyzed the trafficking of a series of N-terminal truncation mutants and identified a critical trafficking motif of KCNQ1. This determinant is located in the juxtamembranous region preceding the first transmembrane domain of the protein. Three mutations (Y111C, L114P and P117L) implicated in inherited Romano-Ward LQT1 syndrome, are embedded within this domain. Reexpression studies in both COS-7 cells and cardiomyocytes showed that the mutant proteins fail to exit the endoplasmic reticulum. KCNQ1 subunits harboring Y111C or L114P exert a dominant negative effect on the wild-type KCNQ1 subunit by preventing plasma membrane trafficking of heteromultimeric channels. The P117L mutation had a less pronounced effect on the trafficking of heteromultimeric channels but altered the kinetics of the current. Furthermore, we showed that the trafficking determinant in KCNQ1 is structurally and functionally conserved in other KCNQ channels and constitutes a critical trafficking determinant of the KCNQ channel family. Computed structural predictions correlated the potential structural changes introduced by the mutations with impaired protein trafficking. In conclusion, our studies unveiled a new role of the N-terminus of KCNQ channels in their trafficking and its implication in severe forms of LQT1 syndrome.

PMID: 17053194 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Data Supplement (unedited) at:

<http://circres.ahajournals.org/cgi/content/full/01.RES.0000250262.12219.95/DCI>

ou exemplaire papier de la thèse

[Hum Gene Ther.](#) 2009 Nov;20(11):1329-43.

Developing cell therapy techniques for respiratory disease: intratracheal delivery of genetically engineered stem cells in a murine model of airway injury.

[Leblond AL](#), [Naud P](#), [Forest V](#), [Gourden C](#), [Sagan C](#), [Romefort B](#), [Mathieu E](#), [Delorme B](#), [Collin C](#), [Pagès JC](#), [Sensebé L](#), [Pitard B](#), [Lemarchand P](#).

1 INSERM, UMR915, Institut du Thorax , Nantes, F-44000 France .

Abstract Interest has increased in the use of exogenous stem cells to optimize lung repair and serve as carriers of a therapeutic gene for genetic airway diseases such as cystic fibrosis. We investigated the survival and engraftment of exogenous stem cells after intratracheal injection, in a murine model of acute epithelial airway injury already used in gene therapy experiments on cystic fibrosis. Embryonic stem cells and mesenchymal stem cells were intratracheally injected 24 hr after 2% povidone iodine administration, when epithelial airway injury was maximal. Stem cells were transfected with reporter genes immediately before administration. Reporter gene expression was analyzed in trachea-lungs and bronchoalveolar lavage, using nonfluorescence, quantitative, and sensitive methods. Enzyme-linked immunosorbent assay quantitative results showed that 0.4 to 5.5% of stem cells survived in the injured airway. Importantly, no stem cells survived in healthy airway or in the epithelial lining fluid. Using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside staining, transduced mesenchymal stem cells were detected in injured trachea and bronchi lumen. When the epithelium was spontaneously regenerated, the in vivo amount of engrafted mesenchymal stem cells from cell lines decreased dramatically. No stem cells from primary culture were located within the lungs at 7 days. This study demonstrated the feasibility of intratracheal cell delivery for airway diseases with acute epithelial injury.

PMID: 19606934 [PubMed - in process]

Plasticité et remodelage électriques cardiaques : rôle de la régulation transcriptionnelle des canaux ioniques

Nos approches génomiques ont montré que les cellules cardiaques adaptent leurs propriétés électrophysiologiques aux contraintes physiologiques ou pathologiques à long terme en modifiant l'expression transcriptionnelle de réseaux de canaux ioniques. Cependant, les mécanismes fondamentaux qui lient le phénotype électrophysiologique à la machinerie de transcription restent peu connus. Afin de mieux les comprendre, j'ai développé une approche de biologie intégrée consistant à : 1/ établir les profils d'expression de l'ensemble des facteurs de transcription cardiaques; 2/ corrélérer ces profils avec ceux des canaux ioniques afin d'identifier les facteurs de transcription et les canaux dont l'expression varie de façon similaire; 3/ prédire la fixation des facteurs de transcription sur les promoteurs des canaux ioniques du même cluster par bioinformatique ; 4/ invalider ou surexprimer les facteurs de transcription présélectionnés dans des cardiomyocytes en culture et étudier l'impact moléculaire sur la transcription des canaux ioniques et l'impact fonctionnel sur leur activité en patch-clamp. Pendant ma thèse, j'ai cherché à identifier les mécanismes physiologiques responsables de l'évolution de l'activité électrique intrinsèque du cœur avec l'âge et les mécanismes physiopathologiques du remodelage électrique dans l'insuffisance cardiaque. Mes résultats suggèrent dans ce dernier cas un rôle de Mef2d dans la régulation du gène *SCN5A*, codant le principal canal sodique responsable de la dépolarisation des cardiomyocytes et de la conduction du signal électrique. Les perspectives de ce travail sont de valider *in vivo* les mécanismes du couplage excitation-transcription de l'activité électrique du cœur suggérés par mes résultats en utilisant des modèles transgéniques.

Mots clefs : canaux ioniques – transcription – remodelage moléculaire – remodelage électrique – génomique – bioinformatique – biologie cellulaire

Cardiac plasticity and electrical remodeling: role of transcriptional regulation of ion channels

Our genomic approaches have shown that the cardiac cells adapt their electrophysiological properties to physiological or pathological situations by modifying gene expression levels of networks of the ionic channels sub-units. These modifications are generally consistent with the electrophysiological properties of the cardiac cells and are precisely regulated. However, the fundamental mechanisms implicated in this transcriptional regulation are not much known. To better understand these mechanisms, I developed an integrative approach which allows investigating this question in a global way. It consists in: 1/ defining expression pattern of all the cardiac transcription factors ; 2/ correlating these profile with those of ion channel to identify transcription factors and channels that share a similar pattern ; 3/ predicting using bioinformatics transcription factor binding site on ion channels of the same cluster ; 4/ invalidating or surexpressing transcription factors in neonatal cardiomyocytes *in vitro* , and in studying their molecular effects on ion channels transcription, and their functional effects on their activity by patch-clamp. During my PhD. I was concerned in identifying physiological mechanisms responsible of cardiac electrical activity evolution with aging, and the physiopathological mechanisms during electrical remodeling in the failure heart. The first results suggest that transcription factor Mef2d could regulate ion channel gene SCN5A. The perspectives of this work are to keep on validating *in vitro* the supposed excitation-transcription coupling mechanisms of the cardiac electrical activity suggested by my results, using transgenic models.

Keywords: ion channels – transcription– molecular remodeling – electrical remodeling – genomics – bioinformatics – cell biology.