

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Création d'un pacemaker biologique cardiaque
-
Régulation physiologique du canal KCNQ1/KCNE1

THESE DE DOCTORAT

Ecole doctorale Chimie Biologie
Discipline : Sciences de la vie et de la santé
Spécialité : Physiologie

présentée
et soutenue publiquement par

PIRON Julien

le 21 mars 2008, devant le jury ci-dessous

<i>Président</i>	Mr. Pacaud Pierre , <i>Professeur, Université de Nantes, Inserm U915</i>
<i>Rapporteurs</i>	Mr. Bois Patrick , <i>Professeur, Université de Poitiers, UMR6187</i> Mr. Vivaudou Michel , <i>Professeur, Institut de biologie structurale, Grenoble</i>
<i>Examineur</i>	Mr. Duclohier Hervé , <i>Directeur de recherche, UMR6187, Poitiers</i>
<i>Codirecteurs de thèse</i>	Mr. Charpentier Flavien , <i>Directeur de recherche, Inserm U915, Nantes</i> Mr. Loussouarn Gildas , <i>Chargé de recherche, Inserm U915, Nantes</i>

INTRODUCTION - PACEMAKER BIOLOGIQUE	1
A. AUTOMATISME ET CONDUCTION DE L'INFLUX ELECTRIQUE CARDIAQUE	1
I. Activité contractile du coeur	1
1. Anatomie cardiaque humaine	1
2. Anatomie du cœur de souris	2
II. Système nodal	3
1. Le nœud sinusal	3
2. Du nœud sinusal vers les oreillettes	6
3. Des oreillettes vers le nœud auriculo-ventriculaire	6
4. Du nœud auriculo-ventriculaire au myocarde ventriculaire	7
III. Activité électrique cardiaque	9
1. Comparatison des potentiels d'action des cellules automatiques et des cellules myocardiques	9
1.1. La phase de dépolarisation	9
1.2. La phase de repolarisation	11
1.3. Le potentiel diastolique (phase 4)	12
2. Potentiel d'action chez la souris	13
IV. Les canaux ioniques générant l'automatisme	14
1. Le courant de pacemaker I_f	14
2. Les différents gènes HCN	17
2.1. Modèle d'expression cardiaque	17
2.2. Caractéristiques biophysiques des canaux HCN cardiaques	18
3. Voies de régulation des canaux HCN	19
3.1. Régulation des canaux HCN par la sous-unité MinK	19
3.2. Régulation des canaux HCN par les phosphoinositides	19
3.3. Régulation des canaux HCN par la kinase Src	20
3.4. Klotho : un nouveau partenaire de HCN ?	21
4. Implication des différents isoformes HCN dans l'automatisme	21
4.1. Analyse de la souris invalidée pour le gène <i>HCN2</i>	21
4.2. Analyse de la souris invalidée pour le gène <i>HCN4</i>	22
4.3. Mutation de HCN chez l'homme	23
5. Rôle du calcium dans l'automatisme	24
5.1. Les canaux calcium	24
5.2. L'horloge calcique intracellulaire	24
6. Régulation de l'automatisme par le système nerveux autonome	27
6.1. Les récepteurs adrénergiques	27
6.2. Les voies de signalisation	28
6.3. Les récepteurs couplés aux protéines G	28
6.4. Régulation de l'activité électrique des cellules sinusales	29
B. LES PATHOLOGIES CARDIAQUES	30
I. Les dysfonctions sinusales	30
II. Les troubles de conduction cardiaque	31
1. Classification clinique des troubles de la conduction auriculo-ventriculaire	32
C. LES PISTES DE THERAPIE CARDIAQUE	34
I. Le stimulateur électronique	34
II. Le pacemaker biologique	35

1. La thérapie cellulaire	35
1.1. Les cellules souches embryonnaires	36
1.2. Les cellules souches mésenchymateuses humaines adultes	36
1.3. Les cardiomyocytes néonataux	37
1.4. Les cardiomyocytes ventriculaires adultes	38
2. La thérapie génique	38
2.1. Pacemaker créé par surexpression du récepteur β_2	38
2.2. Pacemaker créé par une inhibition de I_{K1}	39
2.3. Pacemaker créé par transfert du canal HCN	39
2.4. Pacemaker créée par transfert d'un canal HCN muté	40
2.5. Pacemaker créée par transfert d'un canal synthétique	41
3. Limites de ces stratégies	42
4. Les vecteurs non-viraux	43
4.1. Les copolymères à blocs amphiphiles	43
4.2. Les plasmides d'expression	44
MATERIELS ET METHODES - PACEMAKER BIOLOGIQUE	45
A. INJECTION INTRACARDIAQUE	45
I. Formulation des plasmides	45
II. Manipulation des souris	45
1. Injection des transgènes	45
2. Induction du bloc auriculo-ventriculaire par radiofréquence	46
2.1. Principe de la technique	46
2.2. Protocole expérimental	47
III. Analyse	48
1. Suivi à long terme	48
2. Analyse de l'ECG et de l'électrocardiogramme intracardiaque	49
3. Injection du gène rapporteur	49
4. Immunohistochimie	50
5. Analyse statistique	50
RESULTATS - PACEMAKER BIOLOGIQUE	51
ARTICLE 1 : CREATION D'UN PACEMAKER BIOLOGIQUE CARDIAQUE PAR TRANSFERT DE GENES NON-VIRAL CHEZ LA SOURIS	51
I. Introduction	51
II. Résultats	51
III. Discussion - conclusion	58
CONCLUSION ET PERSPECTIVES - PACEMAKER BIOLOGIQUE	62

INTRODUCTION - KCNQ1-PIP₂	69
A. LE COURANT POTASSIQUE I_{Ks}	69
I. Structure et fonction des canaux potassiques dépendant du potentiel	69
1. Rôle des canaux potassiques dans la repolarisation cardiaque	69
2. Les canaux potassiques dépendant du potentiel	70
2.1. Structure des sous-unités α	70
2.2. Le <i>voltage-sensor</i>	74
2.3. Les mouvements du segment S4.....	74
2.4. Le couplage entre le <i>voltage-sensor</i> et l'ouverture du canal.....	75
II. Propriétés électrophysiologiques du courant I_{Ks}	76
1. Le gène KCNQ1	76
2. I _{Ks} , le courant généré par le canal KCNQ1-KCNE1	77
3. Bases structurales de l'interaction KCNQ1-KCNE1	78
4. La famille des sous-unités KCNE	79
5. Fonction du canal KCNQ1	80
5.1. Le mécanisme d'activation des canaux K _v	80
5.2. Le mécanisme d'inactivation des canaux KCNQ1	81
III. Les arythmies cardiaques associées à I_{Ks}	82
1. Le syndrome LQT1	82
2. Le syndrome du QT court	84
3. La fibrillation auriculaire.....	84
IV. Régulation du canal KCNQ1	85
1. Régulation du courant I _{Ks} par le système nerveux autonome	85
B. REGULATION DE I_{Ks} PAR LE PI(4,5)P₂	87
I. Le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate PI(4,5)P₂	87
1. Synthèse et dégradation du PIP ₂	87
2. Les fonctions du PI(4,5)P ₂	88
2.1. Le PIP ₂ régule l'activité de protéines membranaires	88
2.2. Le PIP ₂ régule le cytosquelette	89
3. La compartimentation cellulaire du PI(4,5)P ₂	90
4. La sensibilité des canaux ioniques au PIP ₂	91
II. Régulation de I_{Ks} par le PI(4,5)P₂	92
1. Le PIP ₂ stabilise l'état d'ouverture du canal KCNQ1-KCNE1	92
2. L'interaction entre le PIP ₂ et le canal KCNQ1-KCNE1	94
C. MECANO-SENSIBILITE DES CANAUX KCNQ1-KCNE1	97
I. Variations de l'osmolarité au sein de l'organisme	97
1. La sensibilité des myocytes cardiaques aux variations de l'osmolarité.....	98
2. La réponse des myocytes cardiaques aux variations de l'osmolarité	99
2.1. Rôle du cytosquelette lors du gonflement des cellules cardiaques	100
2.2. Rôle de I _{Ks} dans le processus de RVD, <i>regulatory cell volume decrease</i>	100
3. Rétrocontrôle mécano-électrique, MEF	101
II. Mécano-sensibilité du canal KCNQ1	103
1. Réponse de KCNQ1 à l'étirement membranaire	103
2. Implication des phospholipides dans la régulation de l'osmolarité	104
MATERIELS ET METHODES - KCNQ1-PIP₂	106

A. ETUDE DU COURANT I_{KS}	106
I. Ré-expression hétérologue dans des cellules de mammifère	106
1. Modèle cellulaire.....	106
2. Méthodes de culture.....	106
2.1. Conservation des cellules et mise en culture.....	106
2.2. Repiquage.....	106
3. Transfection des cellules COS-7.....	107
3.1. Transfection.....	107
3.2 Repiquage des cellules transfectées.....	108
4. Vecteurs d'expression eucaryotes utilisés.....	108
II. Technique électrophysiologique de patch-clamp	109
1. Principe de la technique.....	109
2. Dispositif expérimental.....	111
3. Composition des solutions utilisées.....	112
4. Étirement des cellules.....	114
5. Protocole de stimulation.....	114
6. Modélisation moléculaire.....	115
7. Analyse statistique.....	115
RESULTATS - KCNQ1-PIP₂	116
ARTICLE 1 : IMPAIRED KCNQ1-KCNE1 AND PHOSPHATIDYLINOSITOL-4,5-BISPHOSPHATE INTERACTION UNDERLIES THE LONG QT SYNDROME	116
I. Introduction	116
II. Résultats	117
III. Conclusion – Discussion	119
ARTICLE 2 : REGULATION DE L'ACTIVITE DE KCNQ1 PAR LA VARIATION DE L'INTERACTION PIP₂-MG²⁺ LORS DE STRESS OSMOTIQUES	123
I. Introduction	123
II. Résultats	125
III. Discussion - conclusion	139
CONCLUSION ET PERSPECTIVES - KCNQ1-PIP₂	144
AUTRES ARTICLES	149
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	150

Avant-propos

Chez les mammifères, l'activité contractile du cœur est sous la dépendance de la dépolarisation automatique de cellules, appelées cellules *pacemaker*. L'influx électrique issu de ces cellules se propage à l'ensemble du myocarde à travers le système de conduction. L'activité électrique périodique des cardiomyocytes (potentiel d'action) est la résultante de mouvements d'ions (courants ioniques) de part et d'autre de la membrane plasmique cellulaire à travers les canaux ioniques. C'est l'intégration de l'activité des différents canaux ioniques, Na^+ , K^+ et Ca^{2+} , qui est à l'origine de la naissance des potentiels d'action, éléments constitutifs de l'influx électrique.

Toutes les anomalies structurales ou fonctionnelles des canaux ioniques cardiaques peuvent influencer sur la genèse et/ou la propagation de l'influx électrique dans le cœur et être à l'origine de troubles du rythme potentiellement létaux. Ainsi, une dysfonction des cellules *pacemaker* ou un défaut de la conduction nécessite à l'heure actuelle l'implantation d'un stimulateur électronique. Le pacemaker électronique n'étant aujourd'hui que palliatif et non curatif, l'idée de mettre au point un pacemaker biologique a émergé. Le premier travail exposé dans cette thèse avait pour objectif de créer un pacemaker biologique par transfert de gène non viral.

La seconde partie de cette thèse consistait à préciser les mécanismes de régulation physiologique du canal KCNQ1 impliqué dans la repolarisation cardiaque. Le premier travail de cette seconde partie a permis de préciser un mécanisme moléculaire par lequel une mutation de KCNQ1 provoque le syndrome du QT long et plus particulièrement l'implication d'un phospholipide membranaire, le $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$, indispensable à l'activité du canal. Le canal KCNQ1 étant également impliqué dans la voie de régulation du volume cellulaire, un dernier travail a consisté à déterminer le mécanisme de sensibilité du canal aux variations de de l'osmolarité.

Introduction

Pacemaker Biologique

INTRODUCTION - PACEMAKER BIOLOGIQUE

A. Automatisation et conduction de l'influx électrique cardiaque

I. Activité contractile du cœur

1. Anatomie cardiaque humaine

Les fibres musculaires striées du myocarde sont rattachées les unes aux autres et forment un réseau appelé syncytium, c'est-à-dire un réseau de cellules reliées entre elles par des jonctions communicantes et donc fonctionnant d'un seul bloc. Le fonctionnement du cœur est automatique et spontané. Il dépend d'un système spécialisé intrinsèque, appelé tissu nodal. Ce tissu nodal comporte différents éléments : (i) le nœud de Keith et Flack ou nœud sinusal situé dans la paroi de l'oreillette droite, d'où vont naître toutes les stimulations de l'influx cardiaque, (ii) le noyau d'Aschoff-Tawara ou nœud auriculo-ventriculaire situé dans la cloison interauriculaire qui permet la contraction des oreillettes, (iii) le faisceau de His situé dans la cloison interventriculaire qui permet la contraction ventriculaire et (iv) le réseau de Purkinje situé dans la paroi des ventricules (figure 1).

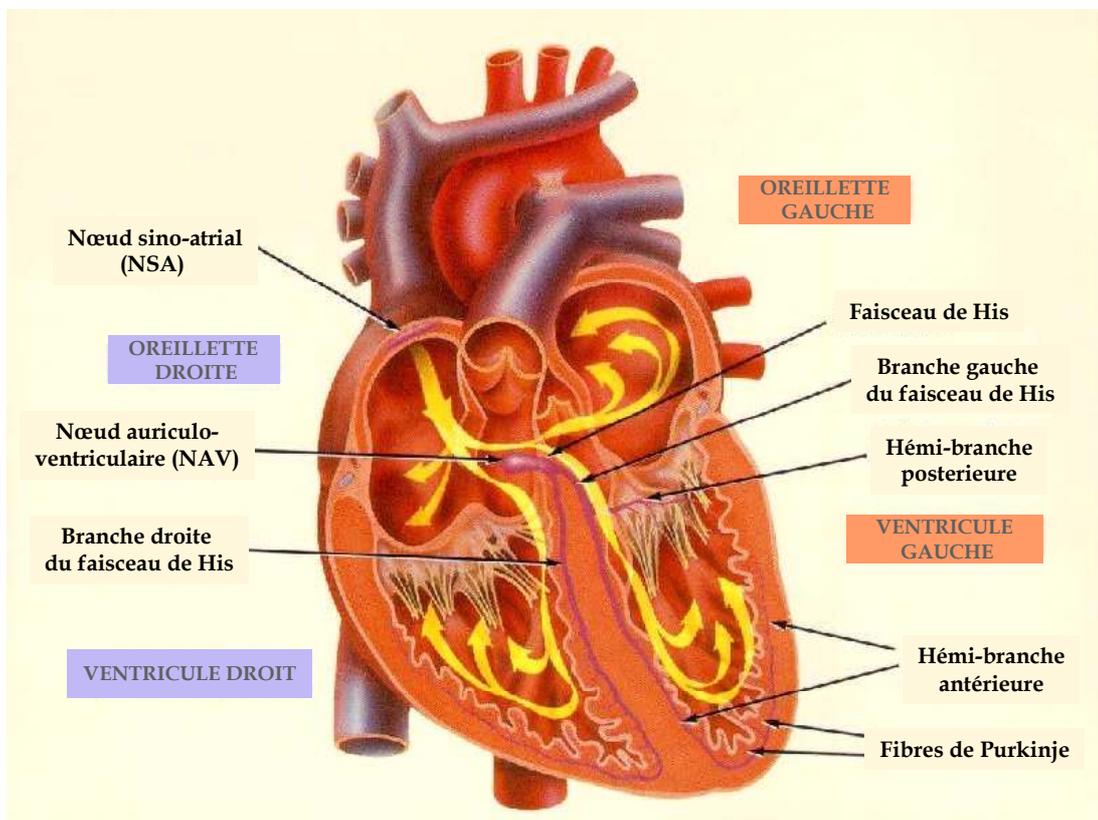


Figure 1 : Anatomie du cœur et de son système de conduction.

(www.bioen.utah.edu/faculty/sri/Lab8_humancardiovascular.htm)

2. Anatomie du cœur de souris

Il existe de nombreuses raisons à l'intérêt croissant pour l'analyse du système cardiovasculaire de la souris. La possibilité de réaliser des souris transgéniques, la manipulation des cellules souches embryonnaires ainsi que la connaissance du génome sont autant d'atouts à l'utilisation du modèle murin. Et les avantages pratiques de la souris sont la courte période de gestation et le faible coût d'entretien et de stabulation en comparaison des autres modèles de mammifères. De nombreux groupes de recherches se sont donc intéressés à la physiologie miniature de la souris. Puisque le but de ces études est leurs applications à la physiologie et aux pathologies humaines, il convient de considérer les différences avec le système cardiovasculaire humain.

La principale différence est bien sûr la taille. Le cœur d'une souris adulte pèse de 150 à 180 mg selon la lignée, pour un ratio « poids du cœur / poids du corps » de l'ordre de 5 à 6 mg/g, contre 4.5 à 5 mg/g chez l'homme. A l'échelle cellulaire, le cœur de souris contient approximativement 7 à 10 millions de myocytes. Le tissu ventriculaire gauche est presque entièrement constitué de cardiomyocytes (90%). Le diamètre de ce ventricule gauche est d'environ 2 mm, l'épaisseur du septum interventriculaire de 1,3 mm et la paroi du ventricule gauche de 1,5 mm. Son volume d'éjection est compris entre 25 et 40 μ l, ce qui rapporté au poids de l'animal correspond aux valeurs connues chez l'homme et les gros animaux. Le volume sanguin total de la souris est de 2,3 ml (soit 80 ml/kg contre 60-70 ml/kg chez l'homme). Du fait de sa petite taille et de sa densité mitochondriale plus importante, le cœur de souris requiert un apport énergétique supérieur par unité de temps et de masse que les plus grands animaux (Doevendans et coll., 1998).

D'un point de vue anatomique, le cœur de souris diffère légèrement du cœur humain : (i) la veine cave supérieure gauche persiste et se jette dans l'oreillette droite, (ii) il n'existe pas de septum atrial secondaire, (iii) le nœud sinusal est localisé dans la veine cave supérieure au-dessus de sa jonction avec l'oreillette droite au lieu d'être dans l'oreillette elle-même (Doevendans et coll., 1998). Par contre, le système de conduction (nœud sinusal, nœud AV, faisceau de His et réseau de Purkinje) est structurellement semblable à celui de l'homme (Rentschler et coll., 2001), bien qu'il existerait chez la souris des connections directes entre le faisceau de His et le septum interventriculaire (van Rijen et coll., 2001).

Le nœud sinusal de la souris, d'environ 1,5 mm de long et organisé parallèlement à la *crista terminalis*, est séparé du muscle atrial qui l'entoure par des tissus conjonctifs. Le tissu nodal est composé d'une seule structure compacte de cellules nodales dont la taille et l'orientation varient selon la région. Les cellules constitutives de cette zone compacte sont de petite taille et orientées perpendiculairement à la *crista terminalis*, alors que les cellules de la partie inférieure moins dense sont plus larges et orientées parallèlement à la *crista terminalis*. Il

existe une interface spécialisée, car riche en connexine, entre le nœud sinusal et le tissu auriculaire qui pourrait être nécessaire au pilotage par le tissu nodal du muscle atrial plus hyperpolarisé (Liu et coll., 2007).

La fréquence cardiaque moyenne chez une souris vigile est d'environ 600 battements par minute, soit 10 fois plus rapide que chez l'homme. Des différences entre lignées de souris consanguines ont été rapportées et attribuées à un tonus sympathique basal différent.

II. Système nodal

L'automatisme cardiaque est une fonction physiologique complexe qui requiert l'activité coordonnée du nœud sinusal et du système de conduction. L'influx électrique né au niveau du nœud sinusal dans l'oreillette droite se propage aux oreillettes, puis à l'ensemble des ventricules via le nœud auriculo-ventriculaire, les faisceaux de His et le réseau de Purkinje.

1. Le nœud sinusal

Le prototype naturel d'un pacemaker est le nœud sinusal (noeud sino-atrial), une structure composée de cardiomyocytes spécialisés et richement innervée par le système nerveux autonome. Dans toutes les espèces de mammifères, le nœud sinusal est localisé dans l'oreillette droite à la jonction entre la *crista terminalis*, une crête musculaire qui relie les parties antérieures des orifices des veines caves supérieure et inférieure, et le septum inter-atrial (Boyett et coll., 2000).

Plus que tous les autres tissus cardiaques (excepté le nœud auriculo-ventriculaire, nœud AV), le nœud sinusal est un tissu complexe et hétérogène malgré sa relative petite taille, et sa fonction dépend de cette complexité. Son architecture anatomique autant qu'électrique a évolué de manière à pouvoir diriger l'importante masse atriale l'entourant sans que son activité ne soit en retour supprimée par ce muscle atrial plus hyperpolarisé. Au-delà des nombreux courants ioniques qui permettent l'activité du nœud sinusal, l'architecture anatomique permettant une barrière électrique, la présence de cellules transitionnelles, et la notion de découplage électrique au sein même du tissu nodal contribuent également au fonctionnement de ce foyer automatique.

Pendant la diastole, c'est-à-dire la relaxation mécanique du cœur, les cardiomyocytes auriculaires et ventriculaires sont dépourvus d'activité électrique et sont au stade de repos à un potentiel membranaire hyperpolarisé. En absence de stimulation, ces cardiomyocytes dépourvus d'activité automatique sont donc incapables de déclencher un potentiel d'action, c'est-à-dire une augmentation large, rapide et prolongée du potentiel membranaire. En revanche, les myocytes du nœud sinusal, doués d'une activité automatique, présentent un potentiel d'action caractérisé non pas par un potentiel de repos mais par un potentiel diastolique maximal qui initie une pente de

dépolarisation diastolique lente permettant d'atteindre le seuil de déclenchement du potentiel d'action suivant (figure 2). L'activité électrique spontanée des cellules du nœud sinusal se traduit donc par l'émergence cyclique de potentiels d'action responsable de la propagation de l'excitation électrique à travers le cœur. Les cellules qui le composent possèdent une fréquence inhérente de décharge plus rapide que celle des autres pacemakers localisés à différents niveaux que sont le nœud auriculo-ventriculaire, les fibres de Purkinje voire les oreillettes ou les ventricules.

Le potentiel d'action des cellules du nœud sinusal est caractérisé par trois propriétés principales (figure 2) : (i) un potentiel diastolique maximal faible (entre -60 et -50 mV), (ii) une dépolarisation diastolique spontanée et lente, et (iii) un potentiel d'action dont la phase de dépolarisation est lente, l'amplitude faible et la durée longue.

La structure complexe du nœud sinusal abrite des populations cellulaires morphologiquement et fonctionnellement différentes qui coexistent pour produire l'activité pacemaker, en réponse à un large spectre d'influences hormonales et neuronales.

Quatre types cellulaires distincts ont été décrits dans le nœud sinusal. Trois types cellulaires nodaux faiblement striés, les *elongated spindle cells*, les *spindle cells* et les *spider cells*, sont distribués aléatoirement du centre vers la périphérie du sinus et présentent une activité électrique spontanée aux propriétés non distinctes (Mangoni et Nargeot, 2001 ; (Verheijck et coll., 1998). Le quatrième type cellulaire, les *rod cells*, sont du fait de leur striation, de leur quiescence et de leurs propriétés électrophysiologiques, de type atrial. Ces cellules sinusales sont entourées d'un abondant tissu conjonctif, constitué de fibroblastes et de collagène, qui augmente en quantité avec l'âge. Chez les jeunes, 50% du volume du nœud sinusal est occupé par des myocytes tandis que passé l'âge de 70 ans, ce pourcentage peut être seulement de 10% (Davies et coll., 1983). Toutefois, à ce jour, aucun lien n'a pu être mis en évidence entre un ralentissement de la conduction avec l'âge et l'évolution du contenu du tissu nodal en collagène.

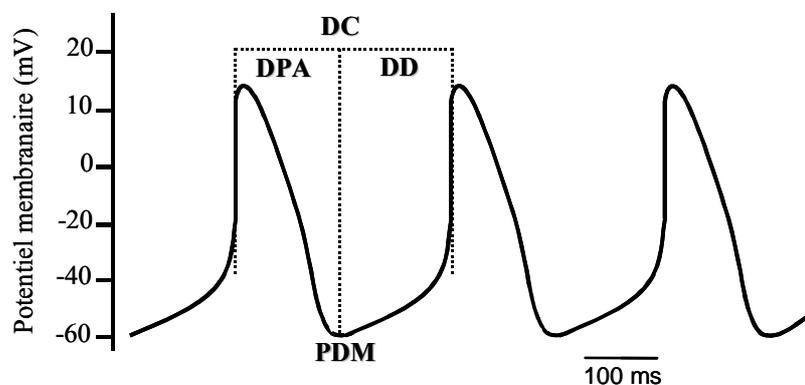


Figure 2 : Potentiel d'action des cellules du nœud sinusal.

PDM, potentiel diastolique maximal ; DC, durée du cycle ; DPA, durée du potentiel d'action ; DD, dépolarisation diastolique.

Les cellules situées à la périphérie du nœud sinusal ont un rythme intrinsèque plus rapide que les cellules du centre. Cependant, ce sont les cellules de la zone centrale qui imposent le rythme issu du nœud sinusal étant donné l'inhibition des cellules périphériques par les cellules atriales voisines (Boyett et coll., 2000).

L'activité électrique des cellules du nœud sinusal évolue graduellement du centre vers la périphérie. Les cellules sinusales centrales sont caractérisées par un potentiel diastolique maximal faible (moins négatif), une pente de dépolarisation diastolique forte, et leurs potentiels d'action présentent une vitesse de dépolarisation lente, une amplitude faible et une durée longue. Du centre vers le tissu atrial en passant par la périphérie du nœud, le potentiel diastolique maximal des cellules s'hyperpolarise, la pente de dépolarisation diastolique est plus faible, et les potentiels d'action se caractérisent par une vitesse de dépolarisation plus rapide, une amplitude plus importante et une durée plus courte (figure 3).

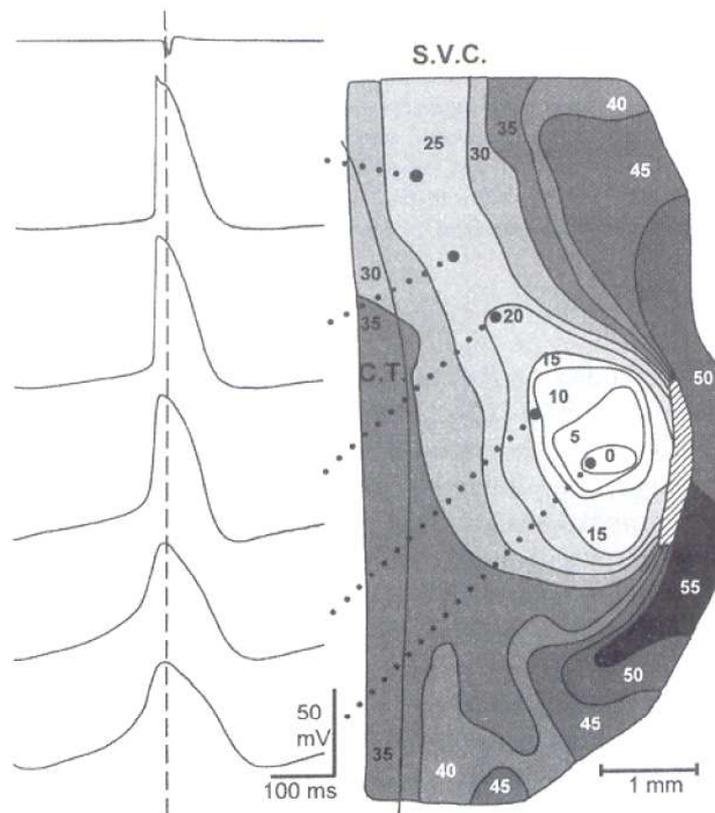


Figure 3 : Cartographie des différents potentiels d'action lors de la propagation de l'excitation dans le nœud sinusal du lapin.

Les traits délimitent les zones excitées par pas de 5 ms. Les nombres correspondent au temps d'activation en ms. La forme des potentiels d'action enregistrés du centre du nœud sinusal au tissu atrial sont figurés à gauche. Vers la périphérie, les potentiels d'action présentent une amplitude et une vitesse de dépolarisation augmentées tandis que la fréquence de dépolarisation diastolique diminue (Janse et coll., 1976).

Comme chez les plus gros mammifères, la dépolarisation diastolique lente des cellules sinusales chez la souris dépend d'un équilibre entre l'activation de courants ioniques entrants dépolarisants et la désactivation de courants ioniques sortants repolarisants au travers des différentes populations de canaux ioniques. Certaines protéines impliquées dans l'homéostasie calcique ou ionique cardiaque sont aussi primordiales.

L'hétérogénéité fonctionnelle observée entre la zone centrale et la zone périphérique du nœud sinusal s'explique par une expression variable des différents canaux ioniques impliqués dans la genèse des potentiels d'action. La multiplicité des courants constitue un phénomène de protection en cas de défaillance de l'un ou l'autre des mécanismes, tout comme l'existence de plusieurs zones pacemakers distinctes (Boyett et coll., 2000).

2. Du nœud sinusal vers les oreillettes

Avant de stimuler le nœud AV, l'onde de dépolarisation née au centre du nœud sinusal se propage en direction de la *crista terminalis*, voie de conduction commune pour l'activation des deux oreillettes, car l'influx électrique ne peut se propager à travers le septum inter-atrial. L'oreillette gauche est activée par la branche de Bachmann qui relie le nœud sinusal à l'oreillette gauche (Kléber et coll., 2001).

La propagation de l'influx électrique dépend de trois principaux déterminants : (1) le couplage cellulaire assuré par les canaux jonctionnels, les connexines ; (2) l'excitabilité cellulaire dépendant principalement des canaux sodiques (*Nav1.5*) et (3) l'architecture tissulaire comprenant la forme des cellules et le collagène interstitiel (van Rijen et coll., 2005).

3. Des oreillettes vers le nœud auriculo-ventriculaire

Il a longtemps été supposé que des connexions spécifiques entre le nœud sinusal et le nœud AV pouvaient constituer des voies de conduction privilégiées entre ces deux centres de commande de l'activité électrique cardiaque. Toutefois, anatomiquement, aucune structure n'a été identifiée à ce jour.

Le nœud AV est caractérisé par une conduction lente, responsable du décalage entre l'activation des oreillettes et des ventricules (Meijler et Janse, 1988). Cette vitesse lente de conduction est liée à la petite taille des cellules, au faible nombre de communications intercellulaires et au réseau complexe de fibres qui sont séparées par du tissu conjonctif. Ces caractéristiques, au moins pour les deux dernières, sont autant de points faibles théoriquement rencontrés lors de l'établissement d'un foyer d'automatisme dans le muscle ventriculaire. De plus, la dépolarisation des cellules du nœud AV est principalement sous la dépendance des canaux calciques, ce qui participe au ralentissement de la conduction dans le nœud (Kléber et

coll., 2001). Enfin, sa longue période réfractaire, qui s'étale après la repolarisation, lui permet de bloquer les battements prématurés ou trop rapides, et protège ainsi les ventricules des troubles du rythme supraventriculaires tels que la fibrillation auriculaire. Le nœud AV sert par ailleurs de pacemaker subsidiaire lors de dysfonction sinusale ou de bloc de conduction entre les oreillettes et ce même nœud AV.

4. Du nœud auriculo-ventriculaire au myocarde ventriculaire

L'activité électrique née dans le nœud sinusal et propagée dans les oreillettes puis le nœud AV gagne ensuite le faisceau de His, ses branches et le réseau de Purkinje pour activer l'ensemble du myocarde ventriculaire.

Le faisceau de His se détache de la partie antérieure du nœud AV et se porte en avant sur la face droite du septum interventriculaire pour pénétrer dans le noyau fibreux central. Lorsqu'il atteint le bord inférieur du septum membraneux, il se divise en deux branches, une droite et une gauche. La branche droite du faisceau de His se propage dans la direction du tronc commun, sous l'endocarde de la face droite du septum, puis dans le myocarde. La branche gauche du faisceau de His s'étale largement sous la partie antérieure du septum membraneux, proche de l'endocarde du ventricule gauche. Chez l'homme, l'anatomie de la branche gauche est sujette à une importante variabilité. Le plus souvent, la branche gauche traverse le septum sous forme d'une large bande en dessous de la sigmoïde aortique. Elle se divise rapidement en un grand nombre de fibres très fines disposées en un faisceau postéro-inférieur et un faisceau antéro-supérieur.

Les branches droite et gauche du faisceau de His se transforment ensuite en un réseau formant les fibres de Purkinje s'étalant à la surface de l'endocarde des ventricules. L'entrelacement très important de ces fibres permet à l'influx électrique d'atteindre quasiment l'ensemble de l'endocarde des ventricules droit et gauche. Récemment une telle asymétrie du système His-Purkinje, similaire à celle observée chez les plus gros mammifères et l'homme, a été mise en évidence chez la souris (Miquerol et coll., 2004).

Les fibres du faisceau de His, ses branches et les fibres de Purkinje sont donc responsables de la propagation rapide de l'influx électrique du nœud AV vers les ventricules. Ces voies de conduction constituent également des zones potentielles de foyers jonctionnels automatiques responsables de rythmes d'échappement en cas de bloc AV. Elles servent alors de foyers d'automatisme secondaire comme peuvent l'être les cellules du nœud AV.

Au niveau cellulaire, la conduction électrique cardiaque se traduit par la propagation de potentiels d'action à travers les différents cardiomyocytes. Cliniquement, ce comportement électrique est résumé sur l'électrocardiogramme de surface (ECG) par les ondes P, QRS et T et les intervalles PR, QT et RR (figure 4).

L'intervalle QT qui contient le complexe QRS et l'onde T, reflète le temps nécessaire à la fois à la dépolarisation et à la repolarisation ventriculaire. L'onde P correspond à la dépolarisation des oreillettes. Le potentiel d'action ventriculaire et donc l'intervalle QT dure entre 200 et 400 ms.

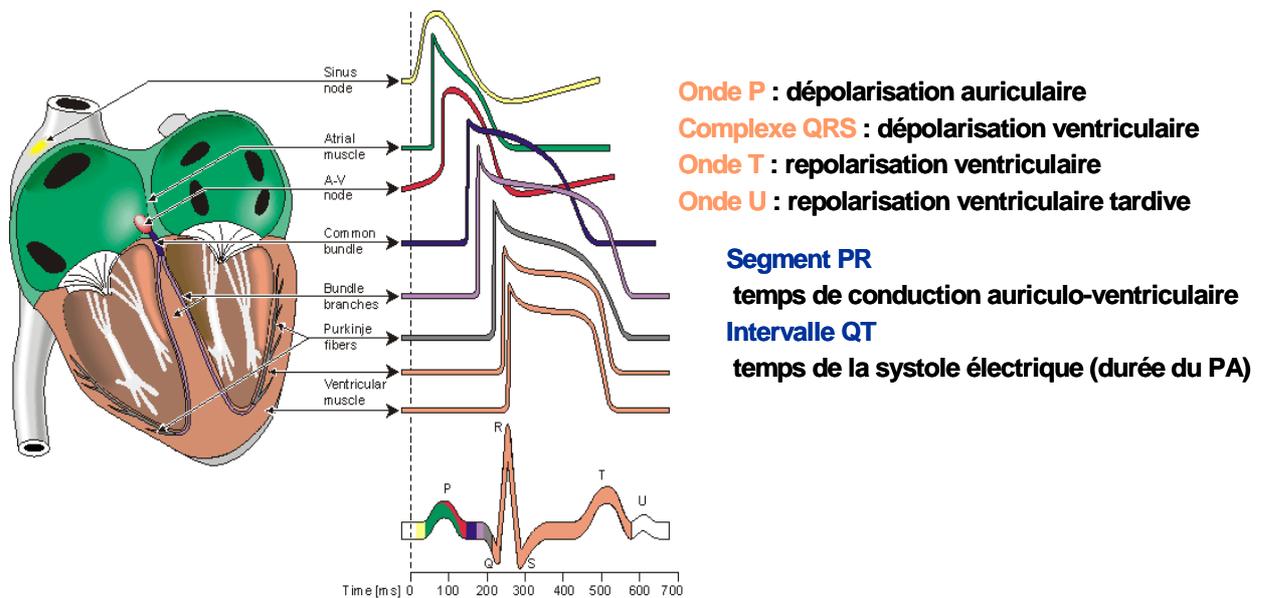


Figure 4 : Illustration des propriétés des potentiels d'action dans les différentes régions du cœur humain.

L'aspect de l'électrocardiogramme (ECG) de surface de la souris est différent de celui de l'homme car l'onde de repolarisation est accolée au complexe QRS. Celle-ci a une apparence biphasique constituée d'une phase rapide positive correspondant au début de la repolarisation (appelée J dans la littérature) et d'une phase lente négative correspondant à l'onde T (Liu et coll., 2004). Cette onde T négative suggère une repolarisation tardive murine différente de celle observée chez l'homme. Malgré tout, aucun intervalle ST ne peut être clairement distingué lors de l'émergence de l'onde T en phase finale du complexe QRS.

Les électrocardiogrammes de souris démontrent des intervalles significativement plus courts que ceux de l'homme (PR 140-220, QRS 70-100, QT 400, RR 857 ms), ce qui est en accord avec la petite taille et la fréquence contractile plus élevée de la souris.

L'hétérogénéité structurale du nœud sinusal pourrait donc impliquer que le pacemaker biologique créé requiert la conception d'un complexe de cellules génétiquement modifiées plutôt qu'une unique lignée cellulaire. Mais, l'objectif n'étant pas de recréer le nœud sinusal, la

structure finale du pacemaker viable et fonctionnel ne doit pas nécessairement reconstituer en détail l'architecture du pacemaker originel (tissu connectif, cellules transitionnelles, gradients ioniques, etc.). Ainsi, de la même manière que le stimulateur cardiaque électronique, il suffit de mimer, de répliquer des fonctions basiques du nœud sinusal. La génération d'un courant de pacemaker, la capacité de diriger les cardiomyocytes avoisinants, et l'autonomie de l'activité automatique face au milieu électrotonique du tissu l'entourant semblent être les principaux critères. La régulation par le système nerveux autonome est un critère supplémentaire envisageable dans le sens où il conférerait au pacemaker biologique un atout supplémentaire vis-à-vis du stimulateur électronique.

Il reste donc à évaluer si ces caractéristiques importantes du nœud sinusal peuvent être reproduites dans un pacemaker biologique grâce à une approche de transfert génique. Les courants ioniques initiateurs de l'automatisme de ce nœud sinusal semblent être les cibles envisageables en vue d'élaborer un pacemaker cardiaque biologique.

III. Activité électrique cardiaque

Il existe des variations régionales de la morphologie des potentiels d'action, la plus notable étant celle observée entre d'une part les oreillettes et les ventricules et d'autre part les cellules automatiques et les cellules myocardiques. Les caractéristiques responsables de ce phénomène sont les variations de canaux ioniques prédominants dans les différents types cellulaires (figure 5). Ces différences électrophysiologiques sont primordiales pour le développement d'un pacemaker biologique utilisant la thérapie génique.

1. Comparaison des potentiels d'action des cellules automatiques et des cellules myocardiques

1.1. La phase de dépolarisation

Suite à une stimulation, le myocyte ventriculaire subit une dépolarisation du potentiel membranaire conduisant à un potentiel d'action. Le potentiel d'action d'un myocyte ventriculaire (ou auriculaire) cardiaque consiste en 5 phases distinctes : la phase 0 (dépolarisation rapide), la phase 1 (repolarisation précoce rapide), la phase 2 (le plateau), la phase 3 (repolarisation finale) et la phase 4 (potentiel diastolique) (figure 5).

Lors d'un cycle cardiaque, initié dans le nœud sinusal puis propagé au nœud auriculo-ventriculaire, au faisceau de His, aux branches du faisceau de His puis au système de Purkinje, les cardiomyocytes ventriculaires sont dépolarisés (*ie*, le potentiel membranaire devient moins

négatif). Cette phase 0 du potentiel d'action est principalement due à l'activation des canaux sodiques. Le courant sodium I_{Na} rapide responsable de cette dépolarisation est généré par la sous-unité Nav1.5 majoritairement localisée au niveau des disques intercalaires (Papadatos et coll., 2002 ; Maier et coll., 2003). Au terme de cette dépolarisation, le potentiel membranaire est transitoirement positif et atteint un pic aux environs de +40 mV.

Contrairement aux cellules myocardiques caractérisées par un potentiel de repos, l'activité pacemaker des cellules automatiques se définit par une instabilité du potentiel de repos qui initie la propagation du potentiel d'action. Le potentiel diastolique maximal qui se substitue au potentiel membranaire de repos se situe aux alentours de -60 mV. Durant cette phase 4 du potentiel d'action, les cellules du nœud sinusal, tout comme celles du nœud auriculo-ventriculaire ou du système de Purkinje, subissent une lente dépolarisation diastolique (figure 6). Cette dépolarisation diastolique est le résultat de l'intégration de nombreux courants ioniques.

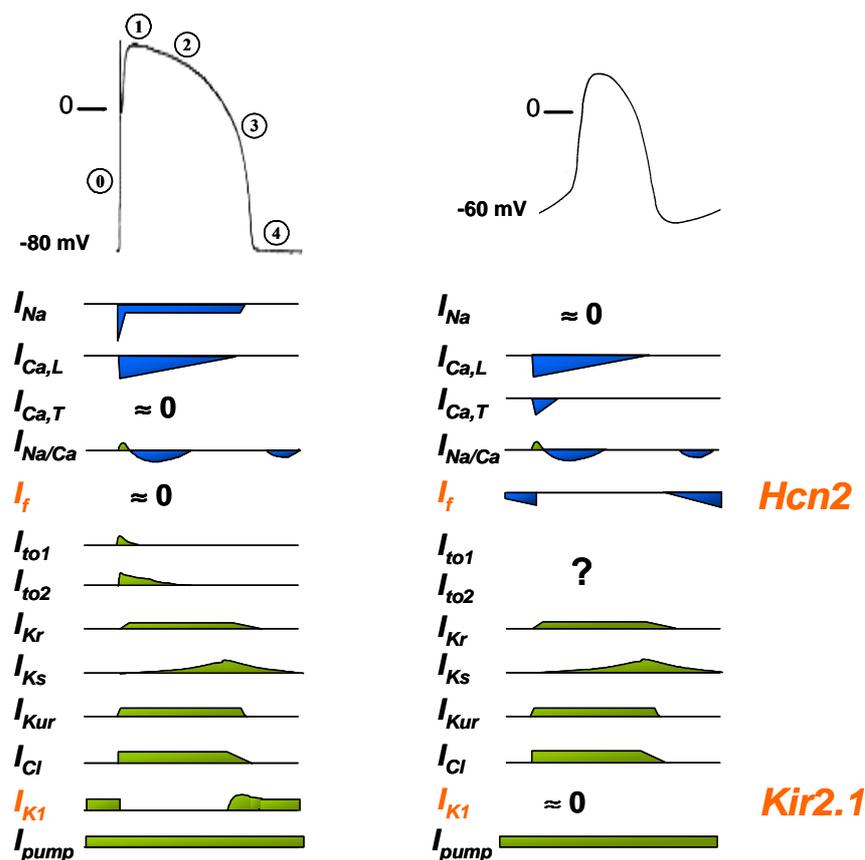


Figure 5 : Propriétés électrophysiologiques des cardiomyocytes ventriculaires et des cellules pacemakers cardiaques indiquant la contribution des différents canaux ioniques dans les potentiels d'action.

A ce jour, cinq courants dépolarisants participant à ces battements spontanés ont été détectés dans les cellules du nœud sinusal des mammifères : le courant entrant I_f activé par l'hyperpolarisation ; le courant calcique de type L, $I_{Ca,L}$; le courant entrant sodique soutenu, I_{st} ; le courant calcique de type T, $I_{Ca,T}$, et l'échangeur sodium-calcium, I_{NCX} (Seifert et coll., 1999 ; Bohn et coll., 2000 ; Zhang et coll., 2002). La repolarisation des cellules sinusales dépend de plusieurs courants potassiques distincts : les courants potassiques à rectification retardée, I_{Kr} , I_{Ks} et I_{Kur} et le courant sortant transitoire, I_{to} . En général, la régulation de l'automatisme des cellules du nœud sinusal est considéré comme étant dû au courant calcium $I_{Ca,L}$, à la désactivation dépendante du temps des canaux potassium et au courant I_f (Noble, 1984 ; Irisawa et coll., 1993). Le courant calcium $I_{Ca,L}$ est le courant pacemaker le plus important, puisque la genèse du potentiel d'action pacemaker est presque identique au potentiel d'activation du courant $I_{Ca,L}$. Des antagonistes calciques stoppent l'activité spontanée des cellules spontanées. A faible concentration, ces antagonistes suppriment et ralentissent la dernière partie de la dépolarisation (Satoh et Tsuchida, 1993). La contribution du courant calcium $I_{Ca,T}$ est limitée approximativement au premier tiers de la dépolarisation (Noble, 1984). En effet, les canaux calciques de type T s'activent à -80 mV, de manière similaire aux canaux sodium (Satoh, 1995).

1.2. La phase de repolarisation

La phase 1 marque ensuite l'initiation de la repolarisation. Dans les cellules non automatiques du type des myocytes ventriculaires, le début de la repolarisation coïncide avec l'inactivation des canaux Na^+ . Pendant cette phase, les cellules sont repolarisées premièrement par l'intervention du courant sortant potassique transitoire, I_{to} . La phase 2, ou phase plateau, s'établit suite à l'activation du courant entrant calcique, I_{Ca} , qui permet l'entrée de Ca^{2+} dans les cellules indispensable à la contraction musculaire. En parallèle, sont activés les courants sortants potassiques séparés en deux composantes : une composante rapide, I_{Kr} , et une seconde composante lente, I_{Ks} . Puisque les canaux calciques sont maintenus ouverts pendant cette phase 2, la repolarisation par les courants potassiques est limitée, le résultat en est une longue phase plateau. Durant la phase 3, les courants calciques sont inactivés, et les courants potassiques, principalement I_{Kr} et I_{K1} , permettent de repolariser le potentiel membranaire jusqu'au potentiel membranaire de repos.

Au sein du nœud sinusal, les canaux potassium à rectification retardée sont responsables de la repolarisation et modulent le potentiel diastolique après chaque potentiel d'action. Ce courant potassique est constitué des trois canaux distincts : à activation lente, I_{Ks} , à activation rapide, I_{Kr} , et à activation très rapide, I_{Kur} . Le courant potassium I_K est activé durant la phase de repolarisation (phase 3) du potentiel d'action. Après la repolarisation durant la diastole, les canaux potassium I_K se désactivent lentement. Cette désactivation entraîne une augmentation graduelle du ratio P_{Na}/P_K de la membrane plasmique. Cette augmentation potentialise la

dépolarisation diastolique. Récemment, il a été démontré que le mécanisme de pacemaker des cellules du nœud sinusal implique le courant I_{Kr} (Guo et coll., 1995 ; Shinagawa et coll., 2000 ; Matsuura et coll., 2002). Lorsque I_{Kr} est bloqué par un bloqueur spécifique, l'E-4031, l'activité spontanée est ralentie et des pauses sinusales se produisent dans les cellules du nœud sinusal de rat ou de cobaye.

1.3. Le potentiel diastolique (phase 4)

Durant la phase 4, le potentiel membranaire des cellules myocardiques reste inchangé principalement du fait de l'existence du courant I_{K1} , un courant potassique rectifiant entrant porté par les canaux *Kir2.1* et *Kir2.2*. L'activité électrique du ventricule est donc caractérisée par un potentiel membranaire de repos hyperpolarisé de l'ordre de -80 mV. Fonctionnellement, ce courant I_{K1} est responsable du maintien du potentiel de repos dans les myocytes cardiaques, c'est-à-dire qu'en réponse à une légère dépolarisation de la membrane, le canal I_{K1} permet un courant sortant repolarisant qui maintient ce potentiel de repos. I_{K1} étant absent des cellules pacemakers, les cellules automatiques présentent un potentiel diastolique dépolarisé, moins négatif, de l'ordre de -60 mV qui contribue, au moins en partie, à leur activité automatique intrinsèque (figure 5).

A la présence exclusive du courant I_{K1} dans les cellules dépourvues d'automatisme, il faut également ajouter le fait, que contrairement aux cellules du nœud sinusal, le courant de pacemaker, I_f , codé par les gènes *HCN*, est absent des cardiomyocytes ventriculaires. Bien que l'expression des canaux *HCN*, et notamment *HCN2*, ait été détectée dans le ventricule chez la souris (Moosmang et coll., 2001), le rôle du courant I_f dans le ventricule semble être mineur. Son absence ou sa faible contribution dans des conditions physiologiques est liée à la valeur très négative de son potentiel de demi-activation ventriculaire (environ -100 mV) qui pourrait s'expliquer par l'état phosphorylé des canaux *HCN* qui le génèrent (Yu et coll., 1993). L'activation du courant I_f à des valeurs de potentiels physiologiques a cependant été observée dans le ventricule hypertrophié chez de nombreuses espèces dont l'homme, et pourrait être à l'origine des troubles du rythme associés (Cerbai et coll., 2001).

Le courant entrant, I_{st} , spécifique aux cellules sinusales (Mitsuiye et coll., 2000), est un courant clé de l'activité pacemaker qui génère la dépolarisation diastolique (Guo et coll., 1997 ; Shinagawa et coll., 2000) puisqu'il est activé par des dépolarisations comprises dans la gamme de dépolarisation diastolique. Enfin, I_{st} est augmenté d'un facteur deux lors d'une stimulation β -adrénergique.

2. Potentiel d'action chez la souris

Au niveau électrique, les séquences de dépolarisation et repolarisation cardiaque chez la souris sont légèrement différentes de celles de l'homme. Par ailleurs, chez la souris, l'activation du septum interventriculaire se fait de la base vers l'apex et non de l'apex vers la base comme chez les plus gros mammifères grâce à des connexions directes entre les branches du faisceau de His et la base du septum (van Rijen et coll., 2001).

Il existe des différences très marquées entre les potentiels d'action ventriculaires humains et murins suggérant une expression et un rôle fonctionnel des canaux différents (figure 6).

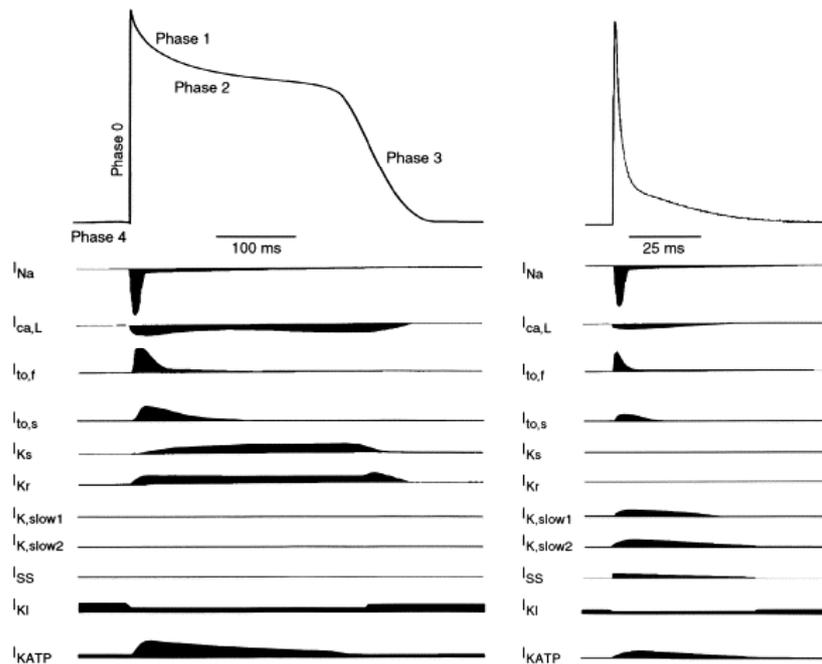


Figure 6 : Représentation schématique des courants ioniques et des potentiels d'action ventriculaires résultant de leur activation chez l'homme (à gauche) et la souris (à droite) (Nerbonne et coll., 2001).

Malgré tout, la phase de dépolarisation rapide (phase 0) chez la souris est similaire à celle de l'homme. C'est essentiellement au niveau de la repolarisation que la distinction se fait. Chez l'homme, cette phase de repolarisation est constituée d'une première phase de repolarisation rapide (phase 1) puis d'une phase plateau lente (phase 2) et enfin d'une phase de repolarisation terminale rapide (phase 3). Chez la souris adulte, la phase de plateau n'existe pas, et l'ensemble de la repolarisation est rapide. Les courants cardiaques repolarisants identifiés au niveau ventriculaire sont I_{to} ($I_{to,f}$, $I_{to,s}$), $I_{K,slow}$ ($I_{K,slow1}$, $I_{K,slow2}$) et I_{SS} (Xu et coll., 1999). Bien qu'ayant un rôle prépondérant dans la repolarisation ventriculaire embryonnaire (Wang et coll., 1996), et contrairement à ce qui est observé chez l'homme, les courants repolarisants I_{Ks} et I_{Kr} ne sont pas ou très peu détectables dans les cardiomyocytes de souris adultes (Nerbonne et coll., 2001).

Les différences majeures entre l'homme et la souris dans le tissu ventriculaire concernent donc principalement les courants potassiques repolarisants. Dans le nœud sinusal, ces différences sont beaucoup moins marquées car, entre autres, le courant I_{Kr} est présent.

IV. Les canaux ioniques générant l'automatisme

Malgré les considérables travaux réalisés par de nombreux groupes, la question de savoir lequel ou lesquels des courants dépolarisants cités précédemment initie l'automatisme est encore controversée. Cependant, les candidats les plus probables semblent être le courant pacemaker I_f et les courants calciques $I_{Ca,L}$ et $I_{Ca,T}$.

1. Le courant de pacemaker I_f

Le mécanisme ionique à l'origine de la dépolarisation diastolique est l'activation lors de la dernière fraction de la repolarisation du potentiel d'action du courant dépolarisant I_f activé par des hyperpolarisations. Lorsqu'il fut décrit pour la première fois dans le nœud sinusal de lapin, ce courant fut nommé le « *funny current* » du fait de ces nombreuses caractéristiques inhabituelles (Brown et coll., 1979).

Le courant I_f est porté par le canal HCN. Le génome code pour 4 isoformes *HCN* nommés *HCN1*, *HCN2*, *HCN3* et *HCN4*. Le clonage des canaux de la famille *HCN* à la fin des années 1990 (Clapham, 1998) eut lieu presque 20 ans après sa description originale. Le premier membre de cette famille fut cloné à partir du cerveau de souris (Santoro et coll., 1997 et 1998), et les autres membres furent clonés peu de temps après (Ludwig et coll., 1998 ; Ludwig et coll., 1999 ; Vaccari et coll., 1999 ; Ishii et coll., 1999 ; Seifert et coll., 1999).

Les canaux HCN présentent une structure typique des canaux potassiques dépendant du potentiel (figure 7). La structure primaire est composée de 6 segments transmembranaires, un segment S4 chargé positivement, et une séquence d'acides aminés GYG (glycine-tyrosine-glycine) au niveau du filtre de sélectivité du pore canalaire. Le canal HCN présente également une similarité avec les canaux activés par les nucléotides cycliques (CNG, *cyclic nucleotide-gated channel*) étant donné la présence du domaine de fixation des nucléotides cycliques, (CNBD, *cyclic nucleotide-binding domain*) au niveau de l'extrémité C-terminale.

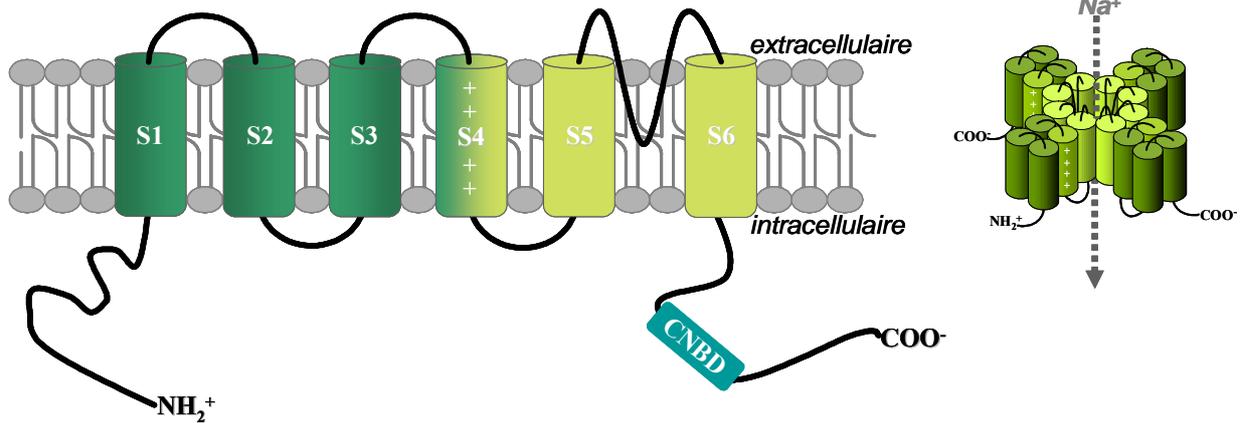


Figure 7 : Représentation schématique de la sous-unité α et de la structure tétramérique du canal HCN.

Un canal HCN n'est fonctionnel que sous la forme d'un tétramère. Il est ainsi formé par l'association de 4 sous-unités principales α à 6 segments transmembranaires chacune. Ces quatre sous-unités α forment le pore ionique.

Les caractéristiques uniques particulières du courant I_f à l'origine de son appellation sont au nombre de trois (DiFrancesco, 1993 ; Pape, 1996).

Premièrement, contrairement à la plupart des canaux dépendant du potentiel qui s'activent lors d'une dépolarisation de la membrane cellulaire, le canal I_f s'ouvre suite à une hyperpolarisation membranaire avec un seuil d'activation aux environs de -40 à -50 mV dans le nœud sinusal. La figure 8 illustre une courbe d'activation typique. Cette relation de la fraction de canaux ouverts en fonction du potentiel membranaire nous révèle que le courant est activé à des potentiels comprenant la gamme de dépolarisation diastolique.

Deuxièmement, I_f est un courant cationique non spécifique, puisque porté par les deux ions Na^+ et K^+ . Le ratio $P_{\text{Na}}/P_{\text{K}}$ de la perméabilité relative se situe entre 0,2 et 0,4 (Pape, 1996), ce qui est contraire à la présence de la séquence porique GYG (Gly-Thr-Gly) typique des canaux potassiques. Ces propriétés biophysiques inhabituelles et spécifiques à HCN restent pleinement à résoudre. En conséquence de ces propriétés, le courant I_f s'inverse à -25 mV et est dans le sens entrant pour des valeurs de potentiels membranaires inférieures à -65 , -75 mV. C'est la genèse de ce courant dépolarisant qui permet de dépolariser la membrane des cellules du nœud sinusal jusqu'au seuil d'activation des canaux calciques, et ainsi maintenir l'automaticité.

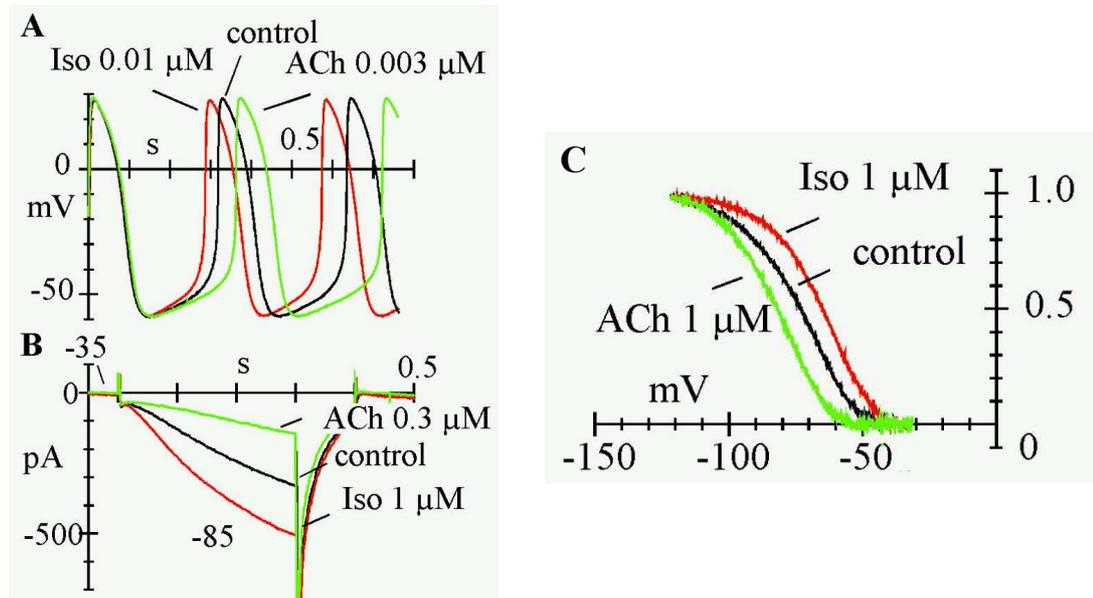


Figure 8 : Effets des agonistes autonomiques sur l'activité spontanée et sur le courant I_f du nœud sinusal du lapin. (A) potentiels d'action spontanés enregistrés en condition contrôlée et en présence soit d'isoprénaline (Iso) soit d'acétylcholine (ACh). (B) Courant I_f enregistré suite à une hyperpolarisation à -85 mV à partir d'un potentiel de maintien de -35 mV. L'amplitude du courant augmente avec l'isoprénaline et diminue avec l'acétylcholine. (C) Courbe d'activation qui reflète la fraction de canaux ouverts à différents potentiels en condition contrôlée et durant la perfusion des agonistes (Accili et coll., 1997).

Troisièmement, la stimulation du système nerveux autonome modifie la dépendance au potentiel de l'activation du canal I_f , conduisant à une modification de la pente de dépolarisation diastolique et par voie de conséquence de la fréquence d'automaticité. Les agonistes β -adrénergiques augmentent le courant I_f en déplaçant la courbe d'activation vers des potentiels moins négatifs, d'où une augmentation de la pente de dépolarisation diastolique et une accélération de la fréquence cardiaque. Par opposition, les agonistes muscariniques réduisent le courant I_f en déplaçant la courbe d'activation vers des potentiels plus négatifs. La pente de dépolarisation est réduite et la fréquence cardiaque est alors ralentie. Ce déplacement de la courbe d'activation du canal I_f est dû à la stimulation ou à l'inhibition de l'adénylate cyclase (AC) par les protéines G couplées aux récepteurs du système nerveux autonome, responsable d'une augmentation ou d'une diminution de la concentration intracellulaire de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) (Figure 8 et 9).

L'AMPC ainsi produit est capable de se lier au canal I_f au niveau du domaine CNBD et ainsi d'accélérer les cinétiques d'activation et de déplacer la dépendance au potentiel de cette activation vers des potentiels moins négatifs. La modulation par l'AMPC peut être interprétée en tant que modèle allostérique, puisque l'AMPC se fixe préférentiellement sur les canaux à l'état ouvert et les bloque dans cet état ouvert.

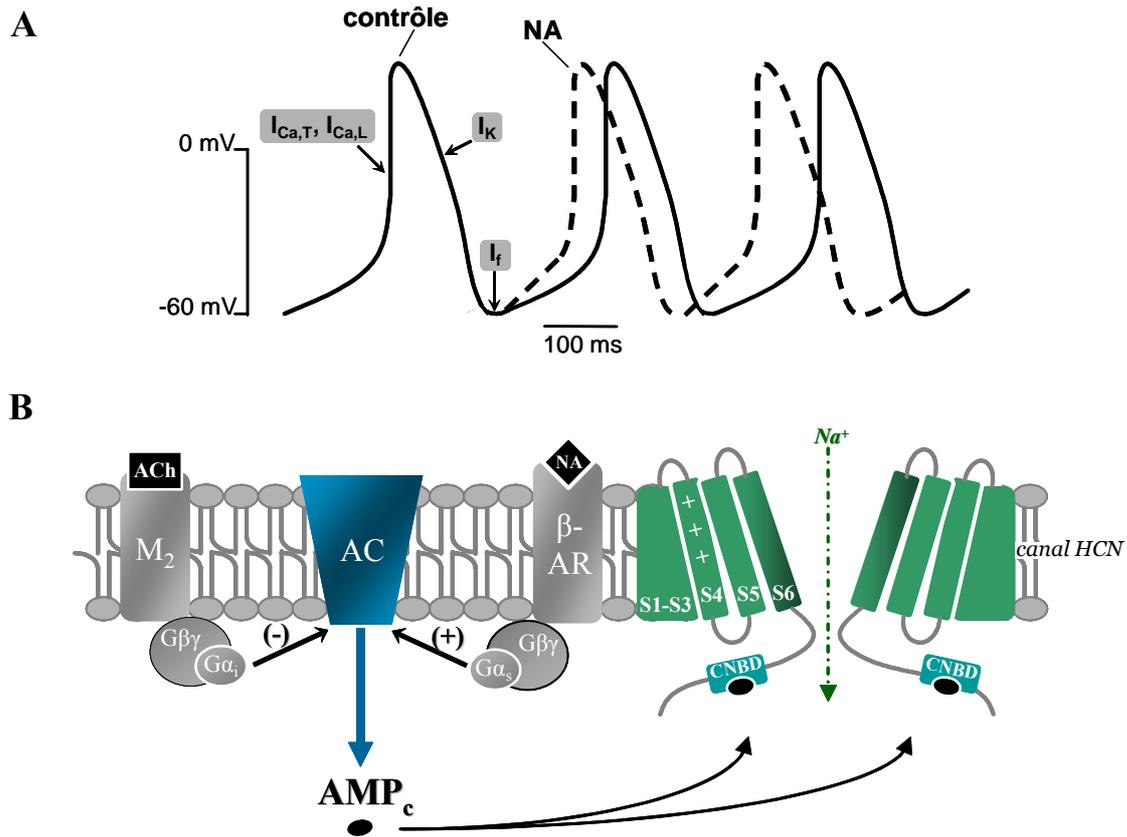


Figure 9 : Rôle de I_f dans la genèse des potentiels d'action pacemakers du nœud sinusal.

(A) Représentation schématique des potentiels d'action du nœud sinusal en condition contrôle, et après stimulation β -adrénergique avec de la norépinéphrine (NA). (B) Schéma d'une portion de membrane cellulaire du nœud sinusal indiquant la régulation des canaux HCN par la stimulation ou l'inhibition de la synthèse de l' AMP_c . M_2 , récepteur muscarinique de type 2 ; ACh, acétylcholine ; AC, adénylate cyclase ; $G\alpha_i$ (sous-unité inhibitrice de l'AC) et $G\beta\gamma$, sous-unité α et $\beta\gamma$ de la protéine G ; β -AR ; récepteur β -adrénergique ; $G\alpha_s$, sous-unité α de la protéine G (sous-unité stimulatrice de l'AC).

2. Les différents gènes HCN

2.1. Modèle d'expression cardiaque

Parmi les quatre gènes *HCN*, tous sont, à l'exception de *HCN3*, présents au niveau transcriptionnel dans le cœur.

Le niveau d'expression des trois gènes *HCN1*, *HCN2* et *HCN4* varie en fonction de la région cardiaque, de l'espèce, de l'âge et de l'état physiologique ou pathologique du cœur. Le gène HCN majoritaire dans le nœud sinusal adulte dans toutes les espèces étudiées jusqu'à maintenant (lapin, souris, homme) est *HCN4*, qui compose près de 80% des transcrits de HCN (Moosmang et coll., 2001 ; Shi et coll., 1999). L'isoforme *HCN1* représente 20% des ARNm totaux de HCN

dans le nœud sinusal de lapin, mais est très faiblement exprimé chez la souris, au contraire de HCN2 exprimé de manière modérée dans le nœud sinusal de souris. Le courant I_f chez la souris est donc conduit principalement par HCN4, le courant restant l'étant par HCN2. Mais le courant I_f peut aussi être généré par des structures canalaire hétéromériques, c'est-à-dire composée de monomères codés par des gènes différents. Tout comme les hétéromères HCN1-HCN2 (Chen et coll., 2001), et HCN1-HCN4 (Altomare et coll., 2003), des données récentes démontrent la formation d'hétéromères HCN2-HCN4 dans des tissus natifs (Whitaker et coll., 2007).

L'expression du gène HCN4 est restreinte aux régions cardiaques douées d'automatisme. Les formes transcrites et les protéines HCN4 sont fortement exprimées de manière sélective dans le nœud sinusal, le nœud auriculo-ventriculaire et dans les fibres de Purkinje. Quant à HCN2, ses transcrits sont exprimés à des niveaux significatifs dans des cardiomyocytes non automatiques au niveau des oreillettes et des ventricules. Au contraire de HCN4, HCN2 se caractérise donc par une distribution cardiaque ubiquitaire, avec une absence ou une faible sélectivité pour les tissus de conduction.

2.2. Caractéristiques biophysiques des canaux HCN cardiaques

Les courants produits par l'expression des trois isoformes HCN1, HCN2 et HCN4 sont tous activés par des hyperpolarisations mais présentent des cinétiques d'activation et de désactivation relativement différentes. L'isoforme HCN1 possède les cinétiques les plus rapides, suivi par HCN2 puis HCN4 (Altomare et coll., 2001). Les courants enregistrés dans les cellules HEK-293 exprimant les gènes HCN1 de souris, HCN2 humain et HCN4 humain ainsi que leurs courbes d'activation et de constante de temps d'activation sont illustrés dans la figure 10. Le potentiel de demi-activation ($V_{1/2}$) de la courbe d'activation, c'est-à-dire le potentiel membranaire pour lequel la moitié des canaux ioniques sont à l'état ouvert, est d'environ -73 mV pour HCN1, -92 mV pour HCN2 et -81 mV pour HCN4. Les valeurs de $V_{1/2}$ reportées dans la littérature diffèrent selon le type cellulaire mais indiquent dans tout les cas une valeur plus négative pour HCN2 que pour HCN4 et HCN1.

Bien que le mécanisme d'activation du canal soit probablement le même, l'efficacité d'action de l'AMPc change selon l'isoforme. HCN1 est l'isoforme qui répond le moins. Le décalage maximal de la courbe d'activation en présence d'AMPc obtenu avec des enregistrements de patch-clamp en configuration soit cellule-entière soit *inside-out* se situe dans les gammes suivantes : 2-6,7 mV (HCN1) ; 12-15 mV (HCN2) ; 15,2-23 mV (HCN4) (Accili et coll., 2002).

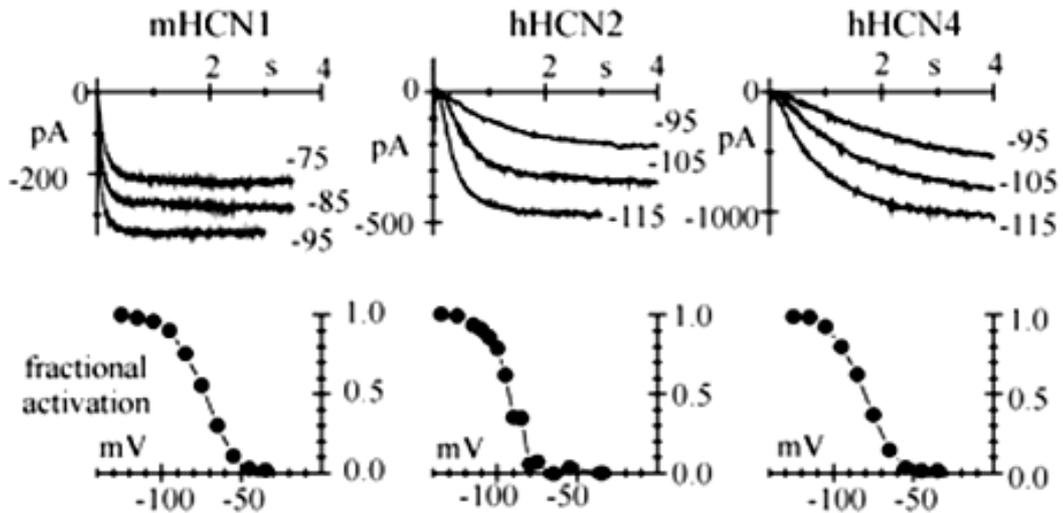


Figure 10 : Propriétés cinétiques des différents isoformes des canaux HCN.

Haut : courant enregistrés lors d'hyperpolarisation à partir d'un potentiel de maintien de -35 mV sur des cellules HEK-293 exprimant les canaux HCN1 murin, et les canaux HCN2 et HCN4 humains. Bas : courbe moyenne d'activation en fonction du potentiel membranaire (Accili et coll., 2002).

3. Voies de régulation des canaux HCN

3.1. Régulation des canaux HCN par la sous-unité MinK

La sous-unité β KCNE2 (ou MIRP1, *minK-related protein*), fortement exprimée dans les cellules du nœud sinusal, interagit avec le canal HCN. La transfection de cette sous-unité dans des myocytes ventriculaires de rats néonataux se traduit par une augmentation du courant I_f (quatre fois supérieur à celui de HCN exprimé seul) et une accélération des cinétiques d'activation et de désactivation. Ce gain d'amplitude n'est pas dû à un décalage de la $V_{1/2}$, puisque la courbe d'activation en fonction du potentiel de HCN est inchangée en présence de KCNE2. L'augmentation du courant I_f est uniquement corrélée à une stimulation de l'expression membranaire des canaux HCN (Yu et coll., 2001 ; Qu et coll., 2004). La surexpression de *MIRP1* en parallèle de HCN2 ou d'autres isoformes est donc une hypothèse envisageable pour créer une fonction pacemaker, tout en réduisant la surexpression nécessaire de HCN2 et en se rapprochant des caractéristiques du courant pacemaker natif.

3.2. Régulation des canaux HCN par les phosphoinositides

Récemment, des travaux ont révélé que les canaux HCN, au même titre que les canaux potassiques dépendant du potentiel (Kv), peuvent être régulés par des phospholipides

membranaires tel que le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂) endogène. L'application d'un analogue du PI(4,5)P₂, le dioctanoyl phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (diC8-PIP₂), décale la courbe d'activation de HCN2 vers des potentiels moins négatifs de manière dose-dépendante dans des cellules isolées du nœud sinusal de lapin (Pian et coll., 2006). Le courant I_f est ainsi augmenté dans des gammes de potentiels physiologiques.

Une seconde publication met en évidence que l'activité des canaux HCN et plus particulièrement son rôle dans l'automatisme cellulaire nécessite l'interaction avec le PI(4,5)P₂. La déplétion du PIP₂ ne modifie pas seulement la sensibilité au potentiel du canal, mais ralentit également la fréquence d'automatisme des cellules neuronales dopaminergiques (Zolles et coll., 2006). Mécaniquement, l'activation des canaux HCN est donc facilitée par les phosphoinositides insérés dans la membrane. Cette interaction électrostatique s'établit entre les charges négatives des groupements phosphates du PIP₂ et celles positives de la protéine canalaire, de manière similaire à la modulation des canaux Kv (Oliver et coll., 2004) et Kir (Baukrowitz et coll., 1998). Notons que contrairement à la régulation de HCN par l'AMPC pour laquelle les isoformes HCN2 et HCN4 sont plus sensibles que l'isoforme HCN1, le décalage de la V_{1/2} en présence de phosphoinositide est similaire pour tous les isoformes.

3.3. Régulation des canaux HCN par la kinase Src

Un nouveau mécanisme de régulation de l'activité du canal HCN par la kinase Src a été dernièrement indiqué. La kinase Src se fixe via son domaine SH3 à l'extrémité C-terminale de la protéine HCN et phosphoryle la tyrosine en position 476. Cette phosphorylation par la kinase Src permet d'accélérer les cinétiques d'activation du courant I_f sans altérer sa dépendance au potentiel, et contribue donc *in vivo* au contrôle de l'activité du canal HCN (Zong et coll., 2005). Cette interaction entre la kinase Src et le canal HCN révélée dans les cellules HEK293 a ensuite été validé dans des myocytes ventriculaires de rat (Arinsburg et coll., 2006). Mais contrairement au premier travail de Zong sur l'isoforme HCN2, Arinsburg et ses collaborateurs ont observé un décalage de la dépendance au potentiel de l'isoforme HCN4 vers des valeurs moins négatives lors de la stimulation de la Src kinase dans des cellules HEK293.

Se pose la question de savoir de quelle manière l'activité du canal HCN peut être régulée par la voie de la kinase Src. La protéine Src est liée au récepteur du glutamate NMDA (*N*-methyl-D-aspartate), et est donc régulée par un réseau de nombreux signaux impliquant Ras, l'éphrine B, les cytokines et les récepteurs aux intégrines (Salter et Kalia, 2004). La kinase Src peut également être stimulée par une interaction directe avec la protéine G_{as} (Ma and Huang, 2002). Comme signalé précédemment, de nombreux transmetteurs et hormones affectent le courant I_f via les récepteurs couplés aux protéines G et G_{as} / G_{ai} qui contrôlent l'activité de l'adénylate cyclase, et ainsi le niveau d'AMPC. Un lien entre les protéines G et Src pourrait permettre

d'envisager une fine régulation des mécanismes contrôlant la modulation du courant I_f par les récepteurs couplés aux protéines G.

3.4. Klotho : un nouveau partenaire de HCN ?

Le gène *klotho* code pour une protéine du même nom. Il agit comme un gène suppresseur du vieillissement en prolongeant la durée de vie lors de sa surexpression. Son invalidation induit à l'inverse un vieillissement accéléré. Les souris *klotho*^{-/-}, déficientes pour le gène *klotho*, présentent un vieillissement prématuré avec des signes d'artériosclérose, d'ostéoporose et des calcifications ectopiques dans plusieurs organes y compris le cœur (Kuro-o M et coll., 1997). L'exploration phénotypique cardiaque de ces souris a révélé une fréquence cardiaque intrinsèque plus lente, un effet chronotrope positif de l'isoprénaline plus faible, et un effet chronotrope négatif de l'acétylcholine plus fort par rapport aux souris sauvages. En condition de stress et lors du blocage du système nerveux autonome, ces souris développent une bradycardie résultant d'un arrêt sinusal ou d'un bloc de la conduction sino-atriale.

L'expression du gène *klotho* a été mise en évidence dans le nœud sinusal chez la souris. Bien que le nœud sinusal requiert l'expression du gène *klotho* pour assurer son activité automatique dans des conditions physiologiques, le rôle fonctionnel de Klotho dans le nœud sinusal reste à élucider (Takeshita et coll., 2004). Malgré tout, puisque le gène *klotho* code pour une protéine transmembranaire, il est possible que celle-ci soit essentielle à la fonction normale des canaux ioniques responsables de l'activité pacemaker, parmi lesquels HCN.

4. Implication des différents isoformes HCN dans l'automatisme

Afin de d'évaluer le rôle exact du courant I_f et l'implication des différents isoformes dans l'automatisme des cellules pacemakers, des souris transgéniques invalidées pour les gènes *HCN2* ou *HCN4* ont été créées et phénotypées. Des souris invalidées pour le gène *HCN1* ont été rapportées sous forme d'un résumé de congrès (Morozov et coll., 2000) mais aucune analyse phénotypique cardiaque n'a été publiée à ce jour.

4.1. Analyse de la souris invalidée pour le gène *HCN2*

Les souris transgéniques invalidées pour le gène *HCN2* développent des phénotypes cardiaques et neuronaux prononcés (Ludwig et coll., 2003). Outre les troubles neuronaux (réduction de l'activité motrice), les souris développent des arythmies cardiaques caractérisées par une variation de l'intervalle RR, mais des intervalles PQ, QRS et QT normaux ainsi que des

ondes individuelles de forme physiologique. Ces observations indiquent que les arythmies sont dues à une dysfonction du nœud sinusal et non pas à un trouble de la conduction ou de la repolarisation. Il est à noter que la variation de la fréquence cardiaque de ces souris déficientes en *HCN2*, pendant une activité ou une stimulation par injection d'un agoniste β -adrénergique, n'est pas différente de celle des souris sauvages. Ce résultat indique que l'isoforme *HCN2* n'est pas indispensable à la régulation sympathique du rythme cardiaque. L'étude électrophysiologique, en courant imposé, des cellules du nœud sinusal de ces souris révèle une hyperpolarisation du potentiel membranaire de 5 mV et une réduction de l'amplitude de I_f de 25%, en comparaison des animaux sauvages. Cette diminution du courant est donc corrélée au profil d'expression de l'isoforme *HCN2*.

Le rôle prédominant de *HCN2* semble donc être la stabilisation du potentiel membranaire diastolique. Sans cet isoforme, le potentiel membranaire est plus sensible aux fluctuations dans le sens d'une hyperpolarisation, d'où une génération plus difficile et donc moins régulière des potentiels d'action.

4.2. Analyse de la souris invalidée pour le gène *HCN4*

Les souris homozygotes déficientes en l'isoforme *HCN4*, aussi bien que les souris dépourvues de *HCN4* spécifiquement dans le cœur, meurent au stade embryonnaire entre les jours 9,5 et 11,5 (Stieber et coll., 2003). Dans les cardiomyocytes de ces embryons, le courant de pacemaker I_f est réduit de près de 80%. De plus, la fréquence cardiaque des embryons est réduite de 40% par rapport à la fréquence des embryons de souris sauvages. Enfin, contrairement aux souris sauvages, la fréquence cardiaque n'est pas augmentée par l'addition d'AMPc, suggérant que l'isoforme *HCN4* est responsable de la réponse à la stimulation sympathique, au moins au niveau embryonnaire. L'enregistrement des potentiels d'action révèle la présence de cellules cardiaques générant des potentiels d'action « primitifs » chez les souris sauvages et les souris mutantes (Hescheler et coll., 1997). Cependant, les potentiels pacemakers « matures » observés chez les souris sauvages à partir du 9^e jour ne sont jamais détectés chez les embryons déficients en *HCN4*. Ces résultats indiquent donc que *HCN4* contribue à la génération du potentiel pacemaker et à la détermination du rythme cardiaque basal.

Le rôle physiologique de *HCN4* chez l'animal adulte n'est pas encore bien défini. La mise au point d'animaux déficients pour le gène *HCN4*, mais de manière contrôlée dans le temps, permettrait de répondre à cette question. C'est dans cette optique, que 2 résumés de congrès décrivent l'élaboration de souris *HCN4*^{-/-} conditionnelles (Stieber et coll., 2003 ; Herrmann et coll., 2006, résumé non publié). La délétion de *HCN4* réduit I_f au niveau du nœud sinusal de plus de 75%. Il en résulte de fréquentes pauses sinusales, durant lesquelles aucun complexe n'est détectable à l'ECG. Cependant, contrairement aux embryons déficients pour le gène *HCN4*, ces souris *HCN4*^{-/-} ne perdent pas leur sensibilité au système nerveux autonome. Ces résultats

démontrent que le rôle de HCN4 est moins essentiel chez l'adulte que chez l'embryon, au moins chez la souris.

4.3. Mutation de HCN chez l'homme

Toutes les mutations rapportées dans les gènes *HCN* humains concernent exclusivement l'isoforme *HCN4*. Trois mutations dans le gène *HCN4* responsables d'arythmies ont été publiées. La première mutation à l'origine d'une forme tronquée de la protéine, puisque dépourvue du domaine CNBD, fut séquencée chez un patient avec des bradycardies sinusales et une incompetence chronotrope (Schulze-Bahr et coll., 2003). La protéine tronquée réexprimée est insensible à l'AMPC et se caractérise par des cinétiques de désactivation altérées.

La deuxième publication décrit un membre d'une famille porteur d'une mutation faux-sens dans l'extrémité C-terminale entre le segment transmembranaire S6 et le domaine CNBD de HCN4 (Ueda et coll., 2004). Cette mutation induit un défaut de transport à la membrane et par voie de conséquence une réduction de la densité de I_f . Le patient porteur de cette mutation développe de nombreux types d'arythmies, incluant une sévère bradycardie, un allongement de l'intervalle QT et des épisodes de Torsades de Pointe.

La dernière mutation présente dans une large famille avec une bradycardie sinusale moyenne (Milanesi et coll., 2006), est localisée dans le domaine CNBD et est responsable d'un décalage de la courbe d'activation du canal HCN4 vers des potentiels plus hyperpolarisés. En revanche, la sensibilité à l'AMPC est inchangée.

Le courant I_f , au travers de ces deux isoformes majoritaires HCN2 et HCN4, est donc accepté comme un composant du courant global d'automatisme présent dans le nœud sinusal, et à différents niveaux dans le nœud auriculo-ventriculaire et les fibres de Purkinje.

Que ce soient ses caractéristiques particulières d'activation par les hyperpolarisations, son expression préférentielle dans les tissus automatiques ou encore sa régulation par l'AMPC, tout concourt à valider l'hypothèse que I_f est responsable de l'initiation des battements cardiaques. A ces caractéristiques s'ajoutent les expériences montrant la corrélation entre l'expression des canaux pacemakers et l'activité pacemaker. Une telle corrélation est observée dans les myocytes ventriculaires durant le développement (Robinson et coll., 1997), dans des cas pathologiques (Cerbai et coll., 1997) ou lorsque l'expression de HCN est artificiellement augmentée (Qu et coll., 2001) ou supprimée (Er et coll., 2003). Une corrélation entre l'amplitude de I_f et la fréquence cardiaque est également enregistrée dans le nœud sinusal lors d'une comparaison entre animaux contrôles et animaux développant une insuffisance cardiaque (Verkerk et coll., 2003).

5. Rôle du calcium dans l'automatisme

5.1. Les canaux calcium

Parmi la famille des canaux ioniques, les canaux Ca^{2+} ont été proposés pour contribuer à l'activité pacemaker cardiaque. En effet, les canaux calciques sont fortement exprimés dans les cellules pacemakers et influencent la fréquence cardiaque. De plus, ils sont régulés par l'activité du système nerveux autonome que ce soit d'une manière positive ou négative.

La phase initiale de la dépolarisation diastolique est générée par l'activation du courant pacemaker I_f . L'activation du courant I_f permet d'atteindre le seuil d'activation des canaux calciques de type T, $\text{Cav}3.x$. Une forte expression des transcrits de $\text{Cav}3.1$ et une expression plus faible des transcrits de $\text{Cav}3.2$ ont été observées dans le nœud sinusal de la souris, alors que les transcrits de $\text{Cav}3.3$ n'ont été aucunement détectés (Bohn et coll., 2000 ; Mangoni et coll., 2003 ; Niwa et coll., 2004). L'abolition du courant $I_{\text{Ca,T}}$, ajoutée à la bradycardie sinusale des souris transgéniques invalidées pour le gène $\text{Cav}3.1$ indiquent la participation de la sous-unité $\text{Cav}3.1$ dans le courant $I_{\text{Ca,T}}$ (Mangoni et coll., 2006).

Le courant calcique de type L, $I_{\text{Ca,L}}$, généré par les canaux $\text{Cav}1.x$, s'active plus tardivement pour des potentiels de l'ordre de -50 mV. L'étude de souris transgéniques invalidées pour les gènes codant les sous-unités des canaux $\text{Cav}1.2$ et $\text{Cav}1.3$ a permis de démontrer le rôle essentiel de ces canaux dans l'activité pacemaker *in vivo* et *in vitro* des cardiomyocytes (Zhang et coll., 2002 ; Mangoni et coll., 2003). Bien que l'expression de ses transcrits ait été détectée à un plus faible niveau par rapport à $\text{Cav}1.2$, la contribution de $\text{Cav}1.3$ dans l'automatisme cardiaque semble majeure. En effet, les souris $\text{Cav}1.3^{-/-}$ présentent une dysfonction sinusale majeure, associée à une bradycardie sévère et des arythmies sino-atriales. Il faut noter que l'expression de $\text{Cav}1.3$ est limitée au nœud sinusal, au nœud auriculo-ventriculaire et aux oreillettes, et génère par conséquent le courant $I_{\text{Ca,L}}$ impliqué dans l'automatisme.

Globalement, ces études suggèrent donc que $I_{\text{Ca,T}}$, via la sous-unité $\text{Cav}3.1$, contribue à la phase précoce de la dépolarisation diastolique pendant que $I_{\text{Ca,L}}$, via la sous-unité $\text{Cav}1.3$, est impliqué dans la phase terminale de la dépolarisation diastolique. La sous-unité $\text{Cav}1.2$, activée à des potentiels plus dépolarisés (Koschak et coll., 2001), contribuerait quant à elle à la phase terminale de la dépolarisation diastolique et à la dépolarisation du potentiel d'action.

5.2. L'horloge calcique intracellulaire

L'idée que la libération spontanée de Ca^{2+} par le réticulum sarcoplasmique puisse initier et réguler l'activité automatique des cellules du nœud sinusal a depuis peu commencé à émerger. Les recherches sur les cardiomyocytes ventriculaires ont été dominées par l'étude de la contraction et donc de la régulation du calcium intracellulaire par des protéines contrôlant les

flux calciques dans et en dehors du cytosol (cycle calcique), particulièrement au travers de la membrane du réticulum sarcoplasmique, la structure cellulaire majeure de stockage du Ca^{2+} . En ce qui concerne l'automatisme cardiaque, les premières études sur l'origine de la fonction cardiaque étaient focalisées simultanément sur les deux propriétés du cœur, l'excitabilité et la contraction. Malgré tout, au contraire des myocytes ventriculaires, le champ de recherche sur les cellules pacemakers fût dominé par l'idée que la fonction pacemaker était seulement due à l'activité de l'ensemble des canaux ioniques de la membrane plasmique qui s'activent réciproquement pour produire les potentiels d'action spontanés.

Mais récemment, de nombreux laboratoires ont démontré que dans les cellules du nœud sinusal et dans les cellules atriales automatiques, la libération localisée de Ca^{2+} par le réticulum sarcoplasmique (RS) via les récepteurs à la ryanodine (RyR) déclenchée par les canaux calciques de type T, stimulent le courant entrant dépolarisant de l'échangeur sodium-calcium, I_{NCX} (Huser et coll., 2000). Bogdanov et ses collaborateurs (Bogdanov et coll., 2001) ont confirmé que cette libération spontanée du Ca^{2+} par le réticulum sarcoplasmique stimule le courant I_{NCX} et donc contribue à l'activité pacemaker des cellules du nœud sinusal. Le blocage soit de la libération du Ca^{2+} avec de la ryanodine, soit du courant I_{NCX} en substituant le sodium par du nickel, abolit complètement l'activité pacemaker.

Puis en 2003, il a été démontré que cette libération locale et cyclique de Ca^{2+} ne nécessite pas la dépolarisation de la membrane plasmique et que sa périodicité est très étroitement corrélée au rythme de l'activité spontanée (Vinogradova et coll., 2004). Durant les battements spontanés des cellules du nœud sinusal, l'oscillation rythmique et spontanée calcique est stoppée par l'apparition du potentiel d'action qui conduit à l'activation du courant $I_{\text{Ca,L}}$ pour libérer le calcium du RS et inhiber les récepteurs à la ryanodine. Durant la dernière partie de la dépolarisation diastolique, c'est-à-dire lorsque les pompes calciques (SERCA) permettent de reconstituer le stock calcique et de lever l'inhibition des RyR, la libération spontanée du Ca^{2+} via les RyR peut à nouveau être déclenchée. Cette augmentation sous-membranaire locale du calcium génère un courant dépolarisant via l'activation de l'échangeur I_{NCX} qui augmente la pente de dépolarisation diastolique et donc déclenche le potentiel d'action suivant (Vinogradova et coll., 2005).

Au même titre que I_f , I_{NCX} , initiateur de l'activité spontanée, est régulé par la stimulation sympathique. La stimulation des récepteurs β -adrénergiques augmente l'activité de la protéine kinase A (PKA) responsable de la phosphorylation du phospholamban, une sous-unité régulatrice des RyR, et des canaux calciques $I_{\text{Ca,L}}$. L'augmentation de l'amplitude de la libération spontanée de Ca^{2+} et l'amplification du courant I_{NCX} qui en résulte accélèrent la pente de dépolarisation diastolique et donc la fréquence cardiaque.

Le cycle calcique via les pompes calciques du réticulum sarcoplasmique, les RyR, et le courant I_{NCX} , ainsi que sa modulation par les récepteurs β -adrénergiques, semble donc être un mécanisme majeur de régulation de l'activité spontanée cardiaque (figure 11).

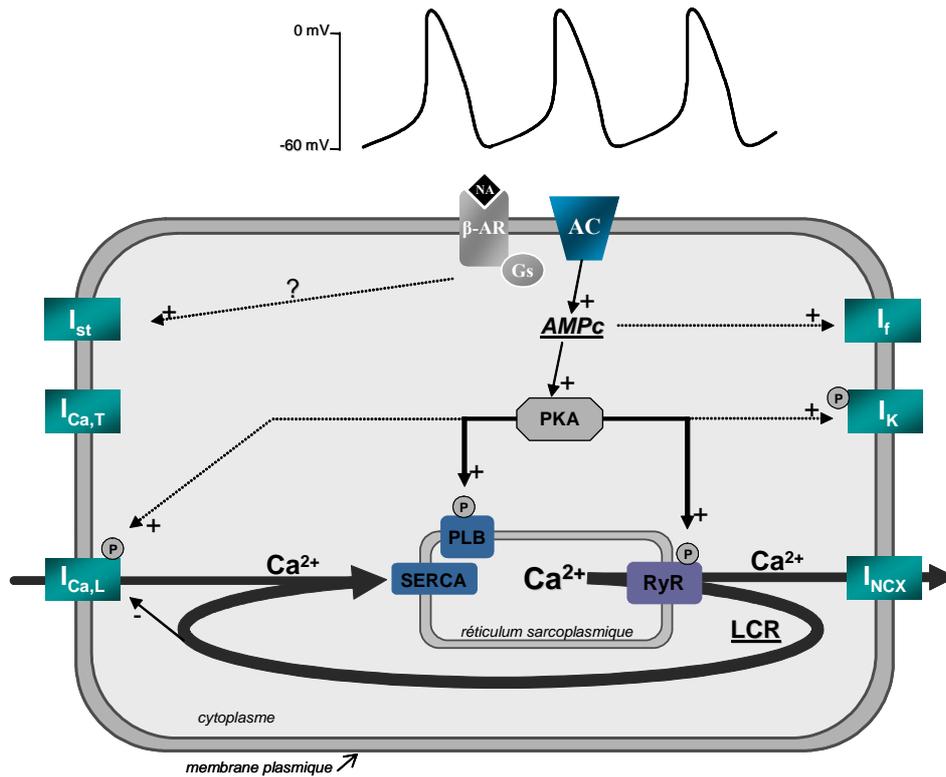


Figure 11 : Contrôle de l'automatisme des cellules du nœud sinusal par le cycle calcique spontané.

Dans les cellules du nœud sinusal, un taux élevé d'AMPc qui initie le cycle du calcium intracellulaire en activant la PKA responsable de la phosphorylation de la pompe calcique SERCA2 responsable du stockage du Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique (RS) et de la phosphorylation des récepteurs à la ryanodine (RyR) impliqués dans la libération locale de Ca^{2+} (LCR, local calcium release), ainsi que l'influx calcique au travers des canaux calciques $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ favorisent le cycle calcique spontané (flèche noire épaisse). La libération locale de Ca^{2+} (LCR) à partir du RS est liée à la dépolarisation diastolique via l'activation par le Ca^{2+} du courant entrant I_{NCX} . L'AMPc, de manière directe ou via l'activation de la PKA, régule les caractéristiques cinétiques des potentiels d'action spontanés (Maltsev et coll., 2006).

L'activité pacemaker cardiaque n'est donc pas dominée par un seul mécanisme moléculaire. Le réel mécanisme du pacemaker cardiaque est donc complexe et inclut une balance intégrative des deux processus intracellulaires et membranaires que sont le cycle calcique spontané et l'activation du courant I_{f} .

Cette idée que la dépolarisation diastolique est portée par deux mécanismes a été vérifiée dernièrement (Bucchi et coll., 2007). Les travaux de Bucchi et de ses collaborateurs, ont démontré que l'initiation de la dépolarisation diastolique correspond à l'activation du courant I_{f} . Le courant I_{f} contrôle la phase précoce de la dépolarisation diastolique et est la cible principale de la régulation par le système nerveux de la fréquence cardiaque via une modulation de la pente du potentiel diastolique. Le second mécanisme impliquant la libération transitoire du Ca^{2+} du

réticulum sarcoplasmique intervient dans la phase tardive de la diastole et détermine le seuil de déclenchement du potentiel d'action.

6. Régulation de l'automatisme par le système nerveux autonome

La recherche des principes fondamentaux qui gouvernent la réponse de la fréquence cardiaque au stress et aux exercices de la vie courante a fasciné les chercheurs depuis plus d'un siècle. Cette recherche a conduit à la découverte des neurohormones, de la norépinéphrine, de l'épinéphrine et des récepteurs adrénergiques et ouvert le champ de la biologie des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR, *G-protein-coupled receptor*).

6.1. Les récepteurs adrénergiques

La stimulation des récepteurs adrénergiques par les catécholamines régule divers processus physiologiques incluant le rythme cardiaque. Il existe trois sous-familles dans la famille des récepteurs adrénergiques : les récepteurs de type α_1 , les récepteurs de type α_2 , et les récepteurs de type β . Ces derniers sont classés en trois sous-types. Les récepteurs β_1 et β_2 étant les sous-types prédominants dans le cœur. La stimulation des récepteurs β -adrénergiques est la voie préférentielle pour augmenter les fonctions cardiaques en réponse au stress et aux exercices. Les conséquences de la régulation de la fonction cardiaque par ces récepteurs β -adrénergiques sont un effet inotrope positif (une augmentation de la contractilité), un effet lusitrope positif (une accélération de la relaxation), un effet chronotrope positif (une augmentation de la fréquence) et un effet dromotrope positif (accélération de la conduction).

Les récepteurs adrénergiques sont les prototypes de la superfamille des GPCR, laquelle est caractérisée par un motif conservé de sept segments transmembranaires avec des extrémités N-terminale et C-terminale intracellulaires. Une cascade de signalisation linéaire, ligand-récepteur-protéineG-second messenger-effecteur, est traditionnellement acceptée pour la transduction du signal des GPCR. La stimulation des trois sous-types de récepteurs β -adrénergiques active la cascade de signalisation impliquant la protéine G_s , l'adénylate cyclase, l'AMPc et la protéine kinase de type A et donc la phosphorylation des protéines cibles ou encore la fixation directe de l'AMPc sur les sites CNBD, tel que celui présent à l'extrémité C-terminale de la protéine HCN (DiFrancesco, 2006).

6.2. Les voies de signalisation

Les deux sous-types de récepteurs β -adrénergiques majoritaires coexistant dans le coeur, β_1 et β_2 , activent différentes voies de signalisation, et donc satisfont des rôles physiologiques et pathologiques distincts. Durant la dernière décennie, de nombreuses études ont révélé une différence fondamentale de couplage aux protéines G entre ces deux sous-types de récepteurs β -adrénergiques. En conséquence, la stimulation des récepteurs β_1 active une voie de signalisation qui s'étend à l'ensemble de la cellule, alors que la stimulation des récepteurs β_2 se traduit par une régulation locale et compartimentée du taux d'AMPc, un second messenger capable de moduler I_f (Rybin et coll., 2000).

Dans le cœur des espèces mammifères, incluant l'humain, la stimulation des récepteurs adrénergiques de type β_2 active en parallèle les voies des protéines G_s (G_s -AC-AMPc-PKA) et G_i (G_i - $G_{\beta\gamma}$ -PI3K-Akt), alors que la stimulation des récepteurs de type β_1 active uniquement la voie des protéines G_s (Xiao et coll., 1999). Ce couplage du récepteur β_2 avec la protéine G_i est essentiel à la compartimentation et au confinement de la signalisation AMPc/PKA. En effet, la séquence de signalisation $G_i/G_{\beta\gamma}/PI3K$ permet d'inhiber la phosphorylation des canaux calciques de type L, du phospholamban et des myofilaments par la PKA (Jo et coll., 2002). Notons également que la stimulation β_1 -adrénergique induit l'hypertrophie et l'apoptose, tandis que la stimulation β_2 -adrénergique permet la survie cellulaire.

6.3. Les récepteurs couplés aux protéines G

Les récepteurs couplés aux protéines G, existent dans un équilibre entre deux états conformationnels : une conformation inactive et une conformation active capable d'activer les protéines G. En absence de ligand, le récepteur peut tout de même transiter spontanément dans un état actif. L'équilibre entre les formes active et inactive permet alors un niveau basal d'activation. Par contre, une surexpression d'un récepteur donné augmente proportionnellement le nombre de récepteurs actifs.

Dans une souris transgénique, une surexpression cardiaque spécifique du récepteur β_2 augmente l'activité basale cardiaque de l'AC, d'où une accumulation d'AMPc responsable d'une stimulation de la contractilité cardiaque et de la fréquence cardiaque en absence d'agoniste β -adrénergique (Liggett et coll., 2000 ; Milano et coll., 1994). Des résultats similaires ont été reproduits dans des cardiomyocytes de souris adultes en culture, transfectés avec le gène *Adrb2* codant pour le récepteur β_2 (Zhou et coll., 2000). Puisque l'efficacité de la stimulation pharmacologique des récepteurs β -adrénergiques est limitée du fait du phénomène de désensibilisation et des effets proarythmiques, la surexpression modérée du récepteur β_2 est une voie potentielle de thérapie génique pour traiter l'insuffisance cardiaque.

De la même manière, la surexpression du récepteur β_2 semble être une possibilité de régulation du pacemaker biologique à travers des voies de régulation biologique en contrôlant le nombre de récepteurs et le couplage récepteur-effecteur. A ce titre, le couplage β_2 -HCN apparaît comme le choix le plus judicieux. En effet, une souris transgénique surexprimant le récepteur β_2 humain est caractérisée par une augmentation d'un facteur cinq de I_f au niveau des myocytes ventriculaires. Cette augmentation du courant de pacemaker est due à un décalage du potentiel de demi-activation ($V_{1/2}$) vers des potentiels moins négatifs et à une augmentation de l'expression des gènes *HCN* (Graf et coll., 2001). Ces deux mécanismes contribuent à l'existence d'un courant I_f plus ample aux potentiels diastoliques physiologiques. Etant donné l'absence d'hypertrophie cardiaque, l'augmentation de l'amplitude de I_f semble être directement associée à la surexpression du récepteur β_2 plutôt qu'à un phénomène indirect initié par l'hypertrophie.

Quant au récepteur β_1 , bien qu'étant le sous-type prédominant dans le myocarde, son activation ne déclenche au mieux qu'une faible activité automatique. En effet, chez la souris transgénique doublement invalidée pour les gènes *Adrb1* et *Adrb2*, la surexpression du récepteur β_1 , à des niveaux similaires ou supérieurs à ceux du récepteur β_2 , n'induit aucune augmentation, ni de la concentration intracellulaire de l'AMPC ni de l'amplitude de contraction (Zhou et coll., 2000).

La différence de réponse de I_f aux stimulations des récepteurs β_1 et β_2 adrénergiques, en plus d'être due aux propriétés intrinsèques des récepteurs, peut aussi résulter d'une différence de distribution subcellulaire. Dans les myocytes ventriculaires de rat, les récepteurs β_2 sont confinés dans les cavéoles. En revanche, les récepteurs β_1 sont, dans leur grande majorité, exclus de ces microdomaines membranaires constitutifs des rafts lipidiques (Rybin et coll., 2000 ; Xiang et coll., 2002 ; Steinberg, 2004). En conséquence, des résultats indiquent que dans les myocytes du nœud sinusal de lapin, la modulation β -adrénergique des canaux pacemakers est principalement opérée par les récepteurs β_2 adrénergiques, du fait de la co-localisation des canaux HCN et des récepteurs β_2 dans les cavéoles (Barbuti et coll., 2007).

Dans l'hypothèse d'une régulation du pacemaker biologique créé par l'expression du canal HCN, le récepteur β_2 apparaît donc comme un partenaire privilégié.

6.4. Régulation de l'activité électrique des cellules sinusales

La régulation par le système nerveux autonome de l'activité électrique des cellules sinusales se fait par la modulation de canaux précédemment évoqués appartenant à 5 familles distinctes : les canaux activés par l'hyperpolarisation (I_f), les canaux potassiques générant les courants I_{Ks} et I_{Kr} , les canaux calciques de type L ($I_{Ca,L}$), le canal potassique activé par l'acétylcholine ($I_{K,Ach}$) et les canaux générant le courant entrant soutenu (I_{st}) (Stieber et coll., 2004). Le tonus sympathique augmente la pente de dépolarisation diastolique tandis que le tonus vagal produit l'effet inverse (figure 9).

En plus de modifier les propriétés des canaux régulés, la stimulation par le système nerveux autonome entraîne un déplacement du site pacemaker primaire. Lors d'une stimulation vagale, l'activité pacemaker provient, non plus du centre, mais de la zone plus périphérique et caudale. Lors d'une stimulation adrénergique, l'automatisme naît au contraire dans une zone plus basse du nœud sinusal (Kléber et coll., 2001).

L'effet chronotrope positif de la stimulation sympathique est initiée par l'activation des récepteurs β -adrénergiques qui à leur tour stimulent l'adénylate cyclase (AC) qui convertit l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine monophosphate cyclique (AMPC) permettant d'initier la cascade de signalisation cellulaire comprenant l'activation de la protéine kinase de type A (pKA) et d'autres processus AMPC dépendants. Outre l'ouverture des canaux HCN, l'AMPC stimule les courants $I_{Ca,L}$ et I_{st} via une phosphorylation par la PKA (DiFrancesco et Mangoni, 1994 ; Mitsuiye et coll., 2000 ; Mangoni et coll., 2003). L'AMPC provoque également le relargage de calcium par le réticulum sarcoplasmique durant la phase de dépolarisation diastolique (Rigg and Terrar, 1996 ; Vinogradova et coll., 2002).

Par opposition, la libération d'acétylcholine par les terminaisons nerveuses parasympathiques, responsable de l'activation de $I_{K,Ach}$ et d'une hyperpolarisation membranaire soutenue (Mark et Herlitze, 2000), conduit à une réduction de la concentration cellulaire en AMPC (Hartzell, 1988), entraînant une déphosphorylation des canaux calciques $I_{Ca,L}$ (Petit-Jacques et coll., 1993) et des canaux responsables du courant I_{st} (Guo et coll., 1997).

B. Les pathologies cardiaques

I. Les dysfonctions sinusales

Bien que conservant la commande de l'intégralité de la fonction cardiaque, l'activité du nœud sinusal peut donc être anormale par sa fréquence trop élevée ou au contraire trop lente, ou par son irrégularité. Lorsqu'une bradycardie et/ou des pauses sinusales sont observées, on parle de dysfonction sinusale (Stieber et coll., 2004). Dans d'autres cas, le nœud sinusal peut cesser son activité (arrêt sinusal) et c'est alors un autre centre de commande (pacemaker secondaire) qui prend le relais de l'automatisme sinusal. Parmi les centres de commandes secondaires, il faut distinguer les centres supra-ventriculaires des centres ventriculaires. Les premiers (myocarde auriculaire, nœud auriculo-ventriculaire, tronc commun du faisceau de His) ne modifient pas la séquence normale d'activation de la masse ventriculaire, donnant un aspect électrique normal, non élargi, du complexe QRS. En revanche, les centres ventriculaires qui siègent au-dessous de la bifurcation du faisceau de His, soit sur une des deux branches, soit dans le réseau de Purkinje ou encore dans le myocarde ventriculaire commun, entraînent toujours un mode d'activation

anormal de la masse ventriculaire avec retard d'un ventricule par rapport à l'autre, se traduisant à l'ECG par un élargissement du complexe QRS.

Le *sick sinus syndrome* est une combinaison de symptômes tels que des étourdissements, une fatigue et des syncopes causés par une dysfonction du nœud sinusal. Il s'agit d'une pathologie cardiaque commune, puisqu'à l'origine de près de la moitié des implantations de stimulateurs électroniques (Lamas et coll., 2002). Cette dysfonction sinusale peut avoir plusieurs caractéristiques électrophysiologiques incluant une bradycardie sinusale, un arrêt sinusal, un bloc de sortie, une alternance de périodes de bradycardie et de tachycardie (Mangrum et DiMarco, 2000). La majorité des cas de ces symptômes est due à une dégénérescence idiopathique du nœud sinusal ou est secondaire à l'utilisation d'agents pharmacologiques. L'analyse de la séquence complète qui code pour les isoformes *HCN2* et *HCN4* du génome de deux larges familles présentant des *sick sinus syndrome* héréditaires n'a révélé aucune mutation (données non publiées de Ludwig, Biel et Hoffmann). Par contre, Schulze-Bahr et ses collaborateurs (Mangrum et DiMarco, 2000) ont découvert une mutation hétérozygote de *HCN4* chez un patient atteint de bradycardie sinusale idiopathique et d'incompétence chronotrope, c'est-à-dire d'absence d'accélération de la fréquence cardiaque. Cette mutation s'est révélée être à l'origine d'une protéine HCN4 tronquée au niveau du site CNBD, d'où l'impossibilité d'une stimulation par l'AMPc. De plus, cette protéine mutante se caractérise par une accélération des cinétiques de désactivation du canal, responsable d'une diminution de la disponibilité des canaux HCN4 et à l'origine de la bradycardie sinusale.

Dernièrement, l'étude d'une famille avec une bradycardie sinusale asymptomatique a permis de faire le lien entre cette dysfonction sinusale et une seconde mutation du canal HCN4 (G480R). Localisée dans la séquence GYG, cette mutation se traduit par un décalage de la courbe d'activation du canal HCN4 vers des potentiels membranaires plus négatifs, et un défaut de synthèse du gène et du trafic de la protéine (Nof et coll., 2007).

II. Les troubles de conduction cardiaque

De nombreuses étiologies sont connues pour entraîner des troubles de conduction. La cause la plus fréquemment observée est une dégénérescence progressive et idiopathique des voies de conduction comme initialement décrit par Lenègre (Lenègre et Moreau, 1963) et Lev (Lev, 1964). Cette dégénérescence est responsable selon les études de 33 à 69% des blocs auriculo-ventriculaires chroniques (Hejtmancik et coll., 1956 ; Davies, 1976). Les autres étiologies fréquentes comprennent l'ischémie myocardique, les calcifications dues aux valvulopathies aortiques ou mitrales et les diverses autres cardiomyopathies. A des degrés moindres, des cas de tumeurs, de cardiomyopathies congénitales, de maladies du collagène et d'atteintes traumatiques ou chirurgicales sont également recensés (Benson, 2004).

Aujourd'hui, la fréquence des étiologies ischémiques, essentiellement retrouvées en cas d'infarctus antérieur massif, a nettement diminué en comparaison de la fréquence observée dans l'étude de Davies (Davies, 1976). Cette diminution est corrélée à l'utilisation intensive des moyens de reperfusion à la phase aiguë de l'infarctus. En revanche, l'augmentation du nombre de patients bénéficiant d'une chirurgie cardiaque pourrait rendre compte de l'augmentation des blocs auriculo-ventriculaires postopératoires. De la même manière, l'augmentation du nombre de blocs auriculo-ventriculaires dégénératifs, qui touchent préférentiellement les personnes âgées, est très certainement due au vieillissement de la population.

Le bloc auriculo-ventriculaire peut être de degré très variable allant d'un simple ralentissement de la conduction jusqu'à son interruption complète. Toute comme la dysfonction sinusale, un trouble de la conduction entre les oreillettes et les ventricules, tel que le bloc auriculo-ventriculaire, nécessite l'implantation d'un stimulateur électronique cardiaque.

1. Classification clinique des troubles de la conduction auriculo-ventriculaire

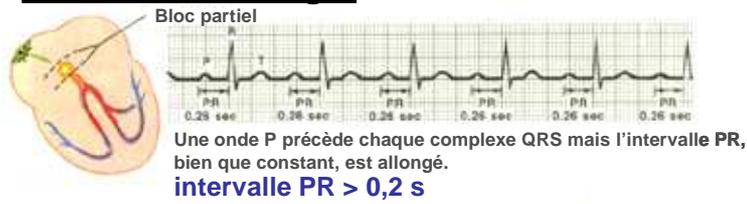
Les blocs auriculo-ventriculaires peuvent être de trois niveaux différents selon une gravité croissante (figure 12).

En bloc du premier degré (bloc AV I), toutes les impulsions atriales sont conduites aux ventricules mais avec un délai retardé. La durée de la conduction auriculo-ventriculaire, reflétée par l'intervalle PR, est ainsi allongée.

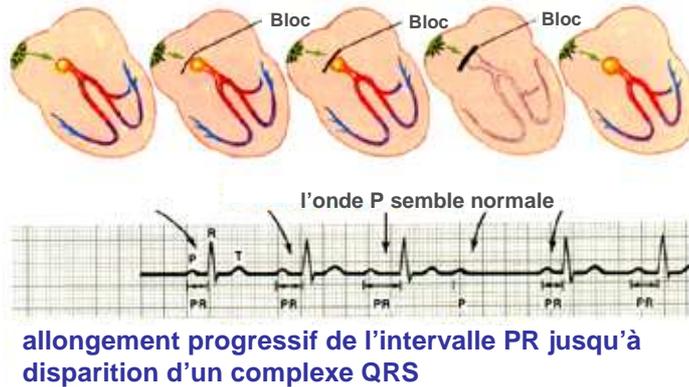
En bloc du deuxième degré (bloc AV II), un ou plusieurs influx auriculaires, mais pas la totalité, qui devraient être conduits ne parviennent pas jusqu'aux ventricules. Les blocs AV II sont divisés en deux groupes : les blocs AV II de type Mobitz I caractérisés par un allongement progressif de l'intervalle PR, appelé période de Luciani-Wenckebach, qui aboutit au blocage de l'onde P, et les blocs AV II de type Mobitz II où certaines ondes P ne sont pas conduites jusqu'aux ventricules mais sans allongement au préalable de la conduction. Un bloc AV II de type Mobitz I est dû à une atteinte au niveau du nœud AV alors que celui de type Mobitz II se caractérise par une origine infra-nodale, le plus souvent au niveau des branches ou du tronc du faisceau de His.

Enfin, en bloc du troisième degré (bloc AV III), aucun influx atrial ne parvient aux ventricules. Le faisceau de His, ses branches et les fibres de Purkinje qui constituent autant de zones potentielles de foyers jonctionnels automatiques responsables de rythmes d'échappement prennent alors le relais. Le foyer émergeant dans l'un ou l'autre de ces tissus sert alors de foyer d'automatisme secondaire comme peuvent l'être les cellules du nœud AV. En revanche, cet automatisme secondaire se caractérise par un rythme trop lent pour assurer une activité cardiaque normale suffisante.

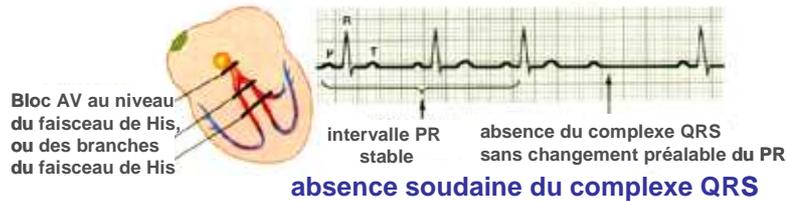
Bloc AV du 1^{er} degré



Bloc AV du 2nd degré, type Mobitz I



Bloc AV du 2nd degré, type Mobitz II



Bloc AV du 3^{ème} degré

oreillettes et ventricules sont dépolarisés indépendamment

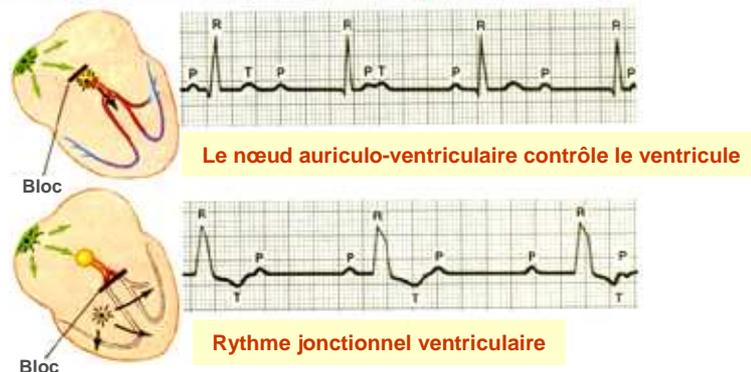


Figure 12 : Electrocardiogrammes associés aux blocs auriculo-ventriculaires de différents degrés. (<http://www.unm.edu/~lkravitz/EKG/avblocks.html>)

La localisation du bloc auriculo-ventriculaire est définie en fonction de sa localisation par rapport au niveau du faisceau de His. Les blocs suprahissiens se situent en amont du tronc commun et sont en général dus à une atteinte du nœud AV. Les blocs infrahissiens correspondent à des lésions localisées sur le faisceau de His. Ces blocs infrahissiens relèvent d'une atteinte bilatérale des voies de conduction intraventriculaire. Il est généralement considéré que le bloc est d'autant plus grave qu'il est situé plus bas.

C. Les pistes de thérapie cardiaque

I. Le stimulateur électronique

L'histoire de « l'électrothérapie du cœur » a commencé il y a plus d'un siècle par diverses observations concernant l'effet des courants électriques sur le muscle cardiaque. En 1958, Furman réussit à stimuler pendant 96 jours un patient relié à un appareil externe (Furman et Robinson, 1958). C'est cette même année que la première implantation d'un stimulateur cardiaque électronique chez l'homme fût réalisée par le docteur Ake Senning (Elmqvist, 1978). Depuis, le matériel a grandement évolué en terme de miniaturisation, de longévité et de complexité. A l'heure actuelle, plus de 600 000 stimulateurs électroniques sont implantés annuellement dans le monde.

Le pacemaker électronique, ou stimulateur cardiaque, est constitué de plusieurs éléments : la ou les batteries, les composants électroniques et les sondes-électrodes qui transmettent l'influx électrique au myocarde. Sous anesthésie locale, le boîtier est placé sous le muscle thoracique gauche et les sondes sont introduites dans la veine sous-clavière gauche jusqu'aux cavités ventriculaires.

Malgré les nombreuses améliorations en terme de technologies incorporées à l'intérieur de cet appareillage ainsi qu'en terme de méthode d'implantation, ce dispositif n'est pas entièrement inoffensif. Les complications les plus courantes sont des infections, des embolies, des dysfonctions mécaniques, lesquelles impliqueront, tout comme la fin de vie de la batterie (10 à 12 ans), le remplacement d'une partie ou de la totalité de l'appareillage. Des études rétrospectives et prospectives rapportent une incidence de 1,6% d'infection, dont 0,3% d'endocardite, des boîtiers de stimulateur électronique et de défibrillateurs (Catanchin et coll., 2007). D'autres complications telles que des pneumothorax, des thromboses ou des perforations sont également observées. Ces différentes complications peuvent conduire individuellement à une augmentation des troubles physiques et psychologiques et, dans de rares cas, au décès.

A ces différents désagréments s'ajoutent les complications propres aux jeunes enfants. L'implantation des stimulateurs électroniques chez les nouveaux-nés et les enfants est rendue difficile par la taille des vaisseaux sanguins, la croissance des enfants, et l'instabilité

hémodynamique du fait de leur niveau d'activité. De plus, la durée de vie de la batterie est relativement écourtée par rapport aux adultes étant donné leur fréquence cardiaque élevée et leur complète dépendance au stimulateur électronique dans la majorité des cas (Aellig et coll., 2007).

Enfin, depuis quelques années, existent des stimulateurs électroniques capables de faire varier leur fréquence d'entraînement, afin d'accélérer la fréquence cardiaque du patient, notamment à l'effort. On parle alors de stimulateur asservi. Le stimulateur électronique peut alors accélérer la fréquence cardiaque lorsque les besoins métaboliques l'exigent, notamment à l'effort. Malgré tout, les stimulateurs électroniques restent insensibles au système nerveux autonome. Ainsi, le rythme cardiaque ne peut pas être modulé correctement lors des exercices physiques et stress de la vie courante.

II. Le pacemaker biologique

Le pacemaker électronique n'étant aujourd'hui que palliatif et non curatif, l'idée de mettre au point un pacemaker biologique, lequel devra compléter ou remplacer le pacemaker électronique, a émergé. D'une part, la compréhension du pacemaker physiologique a suffisamment progressé pour permettre plusieurs hypothèses d'expérimentations. Et d'autre part, les avancées en thérapie génique cardiaque et thérapie cellulaire ont conduit à une variété de stratégies pour produire une fonction pacemaker *in vivo*.

1. La thérapie cellulaire

En ce qui concerne la thérapie cellulaire, les cellules souches embryonnaires et les cellules souches mésenchymateuses d'adultes ont toutes deux été utilisées pour tenter de créer un pacemaker biologique. Leur classification en tant que cellules souches est leur seul point commun.

Les cellules souches embryonnaires sont des cellules pluripotentes et possèdent donc le potentiel de se différencier en de nombreux types cellulaires de l'organisme. La stratégie habituelle est de diriger la différenciation de ces cellules vers une lignée qui possède les caractéristiques pacemakers et de les intégrer dans le tissu en tant que nouvelles cellules sinusales. Avec les cellules souches mésenchymateuses adultes, qui sont des cellules multipotentes et ne peuvent donc se différencier qu'en cellules dérivant du mésenchyme, la stratégie consiste à les utiliser en tant que plateforme pour porter le gène d'intérêt dans la région du cœur où les cellules devront se coupler aux myocytes adjacents. Au contraire de la thérapie génique, pour laquelle le couplage via les jonctions *gap* entre les cellules transfectées et les cellules non-transfectées est déjà effectif, les deux types de cellules souches requièrent le couplage avec les cellules avoisinantes pour être intégrées efficacement au sein du syncytium cardiaque.

1.1. Les cellules souches embryonnaires

En plus de pouvoir se différencier en de nombreuses lignées cellulaires, les cellules souches embryonnaires possèdent la propriété de fonctionner comme un syncytium. Les propriétés électrophysiologiques des cellules souches embryonnaires humaines ont été étudiées. Elles génèrent toute une gamme de potentiels d'action, qui vont des potentiels d'action de type cellule pacemaker (potentiel membranaire dépolarisé, dépolarisation diastolique, dépolarisation lente), aux potentiels d'action du type du myocarde mature (potentiel membranaire hyperpolarisé, absence de dépolarisation diastolique, dépolarisation rapide). L'étude des propriétés ioniques des cellules embryonnaires de souris a décrit des courants calciques $I_{Ca,L}$ dans les cellules précurseurs, ainsi que des courants sodiques et potassiques dépendant du potentiel dans la majorité des cellules matures (Hescheler et coll., 1997).

Ainsi, les cellules souches embryonnaires peuvent être une source de matériel biologique pour régénérer le myocarde ou initier l'activité électrique dans le cœur. L'utilisation de cellules cardiomyocytaires dérivées de cellules souches embryonnaires humaines a permis de créer un pacemaker biologique. Les cellules furent implantées dans le ventricule d'un porc en bloc auriculo-ventriculaire, et des expériences de cartographie ont révélé que l'activité pacemaker était originaire du site d'implantation (Kehat et coll., 2004).

1.2. Les cellules souches mésenchymateuses humaines adultes

En tant que plateforme pour la thérapie génique, les cellules souches mésenchymateuses humaines adultes semblent être un excellent matériel. Ces cellules sont facilement disponibles, et au contraire des cellules souches embryonnaires, leur utilisation n'entraîne aucune objection ou contrainte éthique. Des analyses préliminaires ont révélé que ces cellules souches mésenchymateuses humaines n'expriment pas les gènes *HCN2* et *HCN4*. En revanche, elles expriment de nombreux transcrits de *KCNQ1* (le gène codant pour la sous-unité α du canal portant le courant I_{Ks}) et la connexine 43 (Heubach et coll., 2004).

Les cellules souches mésenchymateuses humaines implantées sont préalablement transfectées avec le gène *HCN2*. Malgré tout, ces cellules ne possèdent pas tous les canaux nécessaires à l'initiation d'un potentiel d'action. Le déclenchement d'un potentiel d'action nécessite donc le couplage avec les myocytes du site d'implantation. Les auteurs avancent l'hypothèse que le potentiel membranaire élevé des myocytes initie l'ouverture des canaux HCN présents dans les cellules souches, ce qui permet l'établissement d'un potentiel de pacemaker. Cette action pourrait générer un courant des cellules souches vers les myocytes qui seront à leur tour dépolarisés. Et lorsque le potentiel membranaire des myocytes atteint le potentiel seuil, un potentiel d'action est déclenché.

Le potentiel d'action pourrait ensuite se propager aux autres cellules du myocarde. L'implantation dans la paroi ventriculaire gauche chez le chien, de cellules souches mésenchymateuses préalablement transfectées avec le gène *HCN2* a ainsi permis d'exprimer un rythme d'échappement localisé au niveau du site d'injection. Ce rythme idioventriculaire fonctionnait à un rythme d'approximativement 60 battements par minute (BPM) contre 45 BPM pour le foyer d'échappement des animaux contrôles (Potapova et coll., 2004).

Dans l'étude citée ci-dessus, la transfection des cellules souches mésenchymateuses était réalisée grâce à une électroporation. L'expression du transgène *HCN2* ne peut donc être que transitoire. Mais dernièrement, des cellules souches mésenchymateuses de lapin furent transfectées avec le même gène *HCN2* grâce à un lentivirus. Ces lentivirus sont capables d'intégrer le transgène dans le génome de l'hôte. Bien que n'ayant pas vérifié cette expression à long terme du transgène, les auteurs ont démontré que les cellules souches mésenchymateuses transfectées avec *HCN2* par un lentivirus peuvent être modifiées pour devenir des cellules pacemakers (Zhou et coll., 2007).

L'utilisation des cellules souches dans le cadre de la thérapie cellulaire est une alternative à la thérapie génique lorsque celle-ci est réalisée grâce à des vecteurs viraux. En revanche, dans le cas de l'utilisation de vecteurs non viraux la thérapie cellulaire perd son avantage non pathogène sur la thérapie génique.

1.3. Les cardiomyocytes néonataux

Toujours dans le cadre de la thérapie cellulaire, une première alternative aux cellules souches est l'utilisation de cellules différenciées possédant les caractéristiques d'automatisme d'intérêt. Ainsi l'idée d'employer des cardiomyocytes néonataux est apparue dès lors qu'il fût démontré que ces cellules transplantées pouvaient s'intégrer morphologiquement et se synchroniser électriquement avec le myocarde hôte (Rubart et coll., 2003). En 2002, Ruhparwar et ses collaborateurs ont démontré la possibilité de générer un pacemaker biologique via l'implantation, dans le cœur de chien, de cardiomyocytes auriculaires fœtaux, incluant des cellules du nœud sinusal, avec un rythme intrinsèque rapide (Ruhparwar et coll., 2002). De la même manière, des xénotransplantations ont été réalisées lors de la greffe de cardiomyocytes fœtaux ou néonataux humains chez des porcs en bloc auriculo-ventriculaire. Suite à l'ablation du nœud auriculo-ventriculaire trois à quatre semaines après l'implantation, le rythme d'échappement qui émerge du lieu d'implantation, de l'ordre de 89 BPM contre 30 BPM chez les porcs contrôles, est accéléré de manière significative lors d'une stimulation par l'agoniste β -adrénergique, l'isoprénaline (Lin et coll., 2005).

Ces études démontrent donc que les cardiomyocytes auriculaires néonataux sont capables de survivre et de s'intégrer dans le myocarde hôte, et de générer une fonction pacemaker sensible à

la stimulation adrénergique. Malgré tout, persiste un doute quant à la survie des cellules et l'expression de leur fonction à long terme au sein d'un cœur malade après traitement par des immunosuppresseurs.

1.4. Les cardiomyocytes ventriculaires adultes

Dernièrement, une autre alternative aux cellules souches fut explorée, en tentant de convertir des cardiomyocytes ventriculaires en cellules pacemakers par une fusion cellulaire somatique (Cho et coll., 2007). Grâce au polyéthylène glycol 1500, un agent fusionnel (Lentz et Lee, 1999), des fibroblastes de poumon de cobaye exprimant le gène *HCNI* sont fusionnés avec des myocytes ventriculaires isolés de la même espèce. Les hétérocaryons ainsi formés exhibent un automatisme intrinsèque augmenté par une stimulation β -adrénergique. En revanche, initialement envisagée pour répondre aux inconvénients de l'utilisation des cellules souches que sont leur migration et leur prolifération une fois injecté dans le tissu (Cao et coll., 2006), cette étude n'a pas démontré l'émergence d'un foyer d'automatisme après injection des hétérocaryons dans l'apex de cœur de cobaye.

2. La thérapie génique

De récentes avancées dans le domaine de la thérapie génique cardiaque sont porteuses de grandes promesses pour l'éventuel traitement de pathologies cardiaques. Le transfert cardiaque de gène a été utilisé afin de moduler le substrat électrophysiologique des tissus cibles. Ainsi, le transfert génique de canaux potassiques a permis de moduler la repolarisation, et les données suggèrent que la durée des potentiels d'action peut être significativement raccourcie par de telles approches (Nuss et coll., 1999). De la même manière, le transfert adénoviral de la sous unité α inhibitrice de la protéine G ($G_{\alpha i2}$) dans le nœud auriculo-ventriculaire de porc, a permis de contrôler le rythme cardiaque dans un modèle de fibrillation auriculaire (Bauer et coll., 2004).

Ces résultats sont autant de preuves de concept, qui permettent d'envisager le transfert de gène comme une voie de développement de pacemakers biologiques.

2.1. Pacemaker créé par surexpression du récepteur β_2

Les approches initiales de transfert de gène avaient pour objectif de modifier le tonus adrénergique du pacemaker cardiaque natif en transfectant les récepteurs adrénergiques dans la région tissulaire. Cette approche de thérapie génique pour réaliser un pacemaker biologique *in situ* qui prouva la réalité du concept fut réalisée par Edelberg et al (Edelberg et coll., 1998 et

2001). Dans leur seconde étude, Edelberg et ses collaborateurs ont incorporé le gène codant pour le récepteur β -adrénergique de type 2 (*Adrb2*) dans un plasmide nu et l'ont injecté dans la paroi de l'oreillette droite du porc. Le rythme auriculaire était augmenté de 40% pendant 24 heures, 2 jours après l'injection. Les limites de cette stratégie sont que les pacemakers endogènes défectueux sont toujours intacts et que ce récepteur β_2 est utilisé en tant que stimulateur non spécifique du rythme cardiaque. Cela peut influencer d'autres canaux, autres que les canaux HCN, également sensibles aux catécholamines.

Face à ces limitations, l'idée de manipuler directement les canaux ioniques pour transformer les cardiomyocytes quiescents en cellules pacemakers semble plus appropriée. Les deux principaux courants dont l'expression est modulée dans ce but sont le courant potassique à rectification entrante, I_{K1} et le courant pacemaker, I_f .

2.2. Pacemaker créé par une inhibition de I_{K1}

Miake et ses collaborateurs (Miake et coll., 2002) ont expérimenté l'altération de canaux ioniques déjà existants en vue de générer un pacemaker biologique. Leur stratégie était d'exprimer une isoforme dominante négative de *Kir2.1*, le gène codant pour le canal qui génère le courant I_{K1} , afin de réduire ce courant. La substitution des acides aminés Glycine, Tyrosine et Glycine en position 144 à 146 par trois Alanines produit une isoforme dominante négative du gène *Kir2.1*, *Kir2.1 AAA*, codant pour des sous-unités à l'origine de canaux non conducteurs. Cette isoforme dominante négative de *Kir2.1* est transfectée, via un adénovirus, dans la cavité ventriculaire gauche de cobayes. Trois à 4 jours après l'injection, la densité du courant I_{K1} enregistré à la surface des myocytes ventriculaires est réduite d'approximativement 80% et un rythme ventriculaire ectopique est enregistré sur les électrocardiogrammes.

2.3. Pacemaker créé par transfert du canal HCN

La preuve que la surexpression du canal générant le courant de pacemaker I_f pouvait conduire à créer un pacemaker biologique cardiaque fût apportée par Qu et ses collaborateurs. Après avoir observé que la transfection par *HCN2* augmentait significativement le rythme spontané de cardiomyocytes néonataux de rats (Qu et coll., 2001), ils ont généré un pacemaker *in vivo*, via l'injection adénovirale du gène *HCN2* dans le muscle auriculaire gauche (Qu et coll., 2003) ou dans la branche gauche du faisceau de His de chiens (Plotnikov et coll., 2004).

Cette capacité de *HCN2* à générer un foyer pacemaker au sein d'un tissu originellement quiescent, fut confirmée dans un modèle de chien avec un *sick sinus syndrome* induit à l'aide d'un cathéter et d'une ablation chimique (Niu et coll., 2006). Le rythme cardiaque est significativement augmenté 24 heures après l'injection du gène dans la région du nœud sinusal

de l'animal. L'expression de HCN2, révélée par RT-PCR et de manière indirecte par la visualisation de la fluorescence du gène rapporteur de la GFP (*green fluorescence protein*) permet d'augmenter la fréquence cardiaque de près de 50% puisque passant de 105 BPM chez les chiens contrôles à 150 BPM chez les chiens injectés.

Jusqu'à récemment, seule l'isoforme HCN2 avait été testée en vue de créer un pacemaker dans les modèles animaux cités ci-dessus. L'isoforme HCN4, pourtant majoritaire dans les tissus nodaux automatiques des différentes espèces, n'avait pas été employée. Sur la base des travaux de Er et de ses collaborateurs en 2003 (Er et coll., 2003), qui démontraient que la surexpression de HCN4 dans des myocytes ventriculaires néonataux en culture accélérât la fréquence de battement dans les mêmes proportions que la surexpression de HCN2, Cai et ses collaborateurs ont réussi à générer un pacemaker en surexprimant le gène HCN4 (Cai et coll., 2007). Dans un modèle de porc en bloc auriculo-ventriculaire induit 4 à 5 jours après injection adénovirale du gène *HCN4*, le rythme d'échappement ventriculaire enregistré est en moyenne de 69 BPM contre 41 BPM chez les porcs non injectés. A la différence des pacemakers biologiques générés par la surexpression de HCN2 dont la sensibilité au système nerveux sympathique n'a pas été étudiée, ces travaux révèlent que le rythme idioventriculaire en présence de HCN4 est augmenté de 33% par une stimulation adrénérgique via l'injection d'isoprénaline.

2.4. Pacemaker crée par transfert d'un canal HCN muté

La forme mutante du gène *HCN1*, *HCN1-Δ-Δ-Δ*, correspond à une délétion d'une partie du segment S3-S4 (EVY 235-237) qui favorise l'état d'ouverture du canal (Tsang et coll., 2004). Exprimé dans des cardiomyocytes ventriculaires ou auriculaires de cobayes isolés, le canal *HCN1-Δ-Δ-Δ* génère un courant dont les caractéristiques biophysiques miment plus correctement, que les canaux HCN1 non mutés, celles du courant I_f hétéromultimérique des tissus nodaux. A partir de ces observations, Tse et ses collaborateurs, ont tenté de créer un pacemaker biologique fonctionnant à un rythme physiologique chez le porc, c'est-à-dire de l'ordre de 70 BPM, dans un modèle de porc avec un *sick sinus syndrome* (Tse et coll., 2006). Dix à 14 jours après injection du canal *HCN1-Δ-Δ-Δ* dans la paroi auriculaire gauche, un rythme atrial spontané avec une moyenne de 64 BPM est enregistré. Les animaux étant équipés d'un pacemaker électronique, l'émergence de ce foyer ectopique permet de réduire la dépendance temporelle à ce stimulateur de 69% à 14%. En revanche, l'administration d'isoprénaline ne permet pas, ou très peu, d'augmenter le rythme spontané atrial, ce qui suggère que ce foyer ectopique n'est pas régulé par le système nerveux sympathique.

2.5. Pacemaker crée par transfert d'un canal synthétique

Bien que n'étant pas fonctionnel dans des conditions physiologiques, les gènes *HCN*, et plus particulièrement les isoformes *HCN1* et *HCN2*, sont exprimés dans les tissus quiescents tel que le ventricule et peuvent contribuer à la genèse d'arythmie. On peut alors envisager que l'utilisation des gènes *HCN* en vue de créer un pacemaker biologique peut induire des conséquences non prédictibles quant à l'hétéromérisation, et donc au rythme selon les individus concernés. Kashiwakura et ses collaborateurs ont donc suggéré d'injecter un canal pas ou peu exprimé dans les tissus quiescents et dont quelques mutations ponctuelles permettent d'exprimer un courant mimant les caractéristiques du courant I_f . C'est pour cette raison, que le canal potassique sortant transitoire activé normalement par des dépolarisations, $Kv1.4$, fut converti en canal non sélectif activé par des hyperpolarisations grâce à quatre mutations (trois mutations, R447N, L448A et R453I localisées dans le segment S4, et la quatrième, G528S, au niveau du filtre de sélectivité du pore). Le transfert de ce canal synthétique, qui génère, dans des cellules HEK293, un courant entrant avec des cinétiques d'activation proches de HCN, permet de générer un rythme ventriculaire dans des cobayes rendus bradycardes chimiquement (Kashiwakura et coll., 2006). Soixante douze heures après injection, des ECG révèlent des foyers ectopiques monomorphes chez les cobayes injectés avec le canal synthétique. Aucun foyer ectopique n'est enregistré chez les cobayes contrôles.

A la vue de ces différentes études, le courant I_f , quelque soit le canal HCN utilisé et sous une forme mutée ou non, apparaît donc comme une cible attractive en vue de réaliser un pacemaker biologique. Ses effets sont limités à la phase de dépolarisation diastolique et n'affecte donc pas la repolarisation du potentiel d'action, au contraire de I_{K1} . L'atténuation de I_{K1} par l'expression du dominant négatif, induit un ralentissement de la phase de repolarisation et donc un allongement de la durée du potentiel d'action. Cet allongement du potentiel d'action peut être arythmogène par lui-même en augmentant la dispersion transmurale de la repolarisation ou bien être à la base d'activité déclenchée à partir de post-dépolarisations précoces (*early afterdepolarizations*, EAD). Ainsi, l'utilisation de I_{K1} semble plus appropriée en tant que modulateur du pacemaker biologique. Des modèles informatiques non linéaires ont permis de démontrer la possible utilisation combinée de I_{K1} et I_f . Théoriquement, dans les cardiomyocytes ventriculaires humains sous-exprimant I_{K1} (diminution de 25% de la conductance de I_{K1}), l'expression de I_f facilite l'automatisme. L'automatisme généré par la surexpression de I_f est, de manière très intéressante, amélioré du point de vue de sa stabilité et de sa capacité initiatrice lorsque la conductance du courant I_{K1} des cellules non-pacemakers avoisinantes est réduite à une plus faible valeur (Kurata et coll., 2007). Un second modèle informatique, le modèle multicellulaire linéaire de potentiel d'action de Luo-Rudy, a également démontré la possible émergence d'une activité automatique par surexpression du courant I_f ou par suppression du

courant I_{K1} . La grande différence, et non des moindres, entre ces deux types d'approches est la réponse à la stimulation β -adrénergique. La stimulation β -adrénergique entraîne des effets négligeables sur la fréquence des potentiels d'action générés par la suppression de I_{K1} . Par contre, la stimulation β -adrénergique des cellules surexprimant I_f induit une augmentation de la fréquence d'automatisme de 30% (Viswanathan et coll., 2006).

Enfin, la surexpression du récepteur β_2 -adrénergique semble être réellement arythmogène étant donné une augmentation non spécifique de la réponse du tissu transfecté au système nerveux sympathique, c'est-à-dire aux catécholamines.

Nous pouvons tout de même envisager de coexprimer le récepteur β_2 -adrénergique avec le gène *HCN2*, étant donné la régulation et leur association préférentielle et donc rendre le pacemaker biologique plus sensible au système nerveux autonome.

3. Limites de ces stratégies

La première limitation de ces études est que la majorité d'entre elles a été réalisée sur des animaux intacts, et non pas sur un modèle clinique, ce qui oblige à utiliser des agents pharmacologiques ou une stimulation vagale pour révéler l'existence d'un foyer pacemaker. Et à partir des données publiées, la manière dont la fonction du pacemaker biologique émerge lors d'une stimulation vagale n'est pas claire. Ces modèles d'études sont donc très éloignés de la situation clinique réelle, d'où notre choix de travailler sur un modèle animal en bloc auriculo-ventriculaire chronique.

Un suivi à long terme de la fonctionnalité du pacemaker biologique créé et de l'expression du transgène serait intéressant. Du fait de leur taille, de leur coût et des équipements indispensables qu'ils requièrent, les gros mammifères, tels que le chien et le cochon, ne peuvent être utilisés dans le cadre d'un suivi à long terme. L'utilisation des petits rongeurs apparaît donc plus appropriée. Par contre, les larges animaux seront certainement utiles pour développer les outils et les procédures d'injection du gène chez l'humain après avoir prouvé la faisabilité de la thérapie génique cardiaque à long terme chez les rongeurs.

Enfin, la principale limite de ces études, qui est un problème inhérent à la thérapie génique, est l'utilisation de virus. En effet, les adénovirus défectifs pour la réplication possèdent un léger potentiel infectieux qui conduit à une expression transitoire de la fonction pacemaker et à une réponse inflammatoire. L'expression du transgène est en effet transitoire et non détectable dans la plupart des tissus après deux semaines. Cela résulte en partie de son incapacité à s'intégrer au génome en restant en général sous forme extra-chromosomique, épisomale. Ce profil d'expression ne convient donc pas à la correction à long terme d'une maladie chronique mais est adaptée à la destruction ciblée de cellules, aux protocoles d'immunothérapie et aux

maladies aiguës. C'est pourquoi les virus sont utilisés dans des essais cliniques contre le cancer. Leur efficacité de transduction s'allie dans ce cas à leur toxicité et à leur immunogénicité.

Quant aux rétrovirus, susceptibles de permettre une fonctionnalité à long terme du fait de l'intégration du vecteur au génome, ils présentent un fort risque carcinogène et infectieux. En plus d'être à l'heure actuelle inutilisables *in vivo* car rapidement inactivés par le système du complément humain, les rétrovirus pénètrent le noyau à la faveur de la mitose et s'avère donc inutilisables en thérapie cardiaque puisque les myocytes sont des cellules post-mitotiques. Parmi les rétrovirus, seuls les lentivirus pénètrent activement dans le noyau et peuvent donc traduire les cellules quiescentes.

De la même manière, les virus adéno-associé (AAV) transduisent efficacement les cellules prolifératives et quiescentes. A noter que dans les myocytes, le transgène s'associe de manière stable à la chromatine sous forme de concatémères circulaires de grande taille, non intégrés aux chromosomes. L'AAV apparaît donc comme un vecteur de choix pour l'obtention d'une expression à long terme d'un transgène, mais à condition que ce dernier soit de très petite taille. En effet, le transgène ne doit pas dépasser 5000 nucléotides. Il en est d'ailleurs de même pour les rétrovirus et lentivirus qui présentent l'inconvénient majeur de limiter la taille du transgène à 7,5 kb et 8 kb respectivement.

4. Les vecteurs non-viraux

4.1. Les copolymères à blocs amphiphiles

La situation est différente en ce qui concerne les vecteurs non viraux et le développement clinique d'une thérapie génique ne nécessitant pas de virus ne semble pas irréalisable. Les vecteurs non viraux sont en effet caractérisés par une production aisée et économique, une absence de pathogénicité et d'immunogénicité qui laisse envisager des administrations répétées et une grande flexibilité quant à la taille de la molécule d'ADN à insérer.

Dans notre laboratoire, le groupe de Bruno Pitard a développé des méthodes efficaces de transfert de gène dans le muscle cardiaque *in vivo* en utilisant des polymères amphiphiles (Pitard et coll., 2004). Ces travaux ont pu démontrer le fait que l'injection intramusculaire du mélange ADN-vecteur pouvait conduire à une transfection cellulaire très localisée. Cette caractéristique est totalement appropriée à notre objectif de générer un foyer automatique.

Les polymères amphiphiles, ou copolymères à blocs amphiphiles et non-ioniques, sont constitués de groupements éthylène oxyde (EO) hydrophiles et de groupements propylène oxyde (PO) hydrophobes, arrangés en une structure de type $(EO)_x-(PO)_y-(EO)_x$ (figure13). Les chaînes PO hydrophobes permettent l'interaction puis la fusion avec la membrane indispensable à l'entrée des complexes à l'intérieur des cellules. Les chaînes EO, hydrophiles, maintiennent la solubilité des complexes vecteur-ADN (Kabanov et coll., 2005). Le mécanisme par lequel les

blocs copolymères amphiphiles permettent l'expression du transgène n'est pas clair. Les blocs copolymères amphiphiles ont la propriété de perturber la membrane plasmique (Maskarinec et coll., 2002), aboutissant à l'internalisation des agents pharmacologiques (Liaw et Lin, 2000). Et, les molécules d'ADN associées pourraient être directement délivrées dans le cytoplasme.

Le bloc copolymère utilisé pour vectoriser les gènes susceptibles de créer localement un pacemaker cardiaque, est le tétronic 304. Sa structure de base est une unité centrale de 30 motifs PO localisés entre deux chaînes composées chacune de 75 motifs EO. Le poloxamine 304 est une structure tétrafonctionnelle composée de quatre structures de base centrées autour d'un motif éthylènediamine (figure 13). Son efficacité de transfection a été positivement testée *in vivo* via l'expression de β -galactosidase dans la paroi ventriculaire gauche de coeur de rat puis l'expression d'érythropoïétine (EPO) et de dystrophine dans le muscle antérieur du tibia de souris (Pitard et coll., 2004).

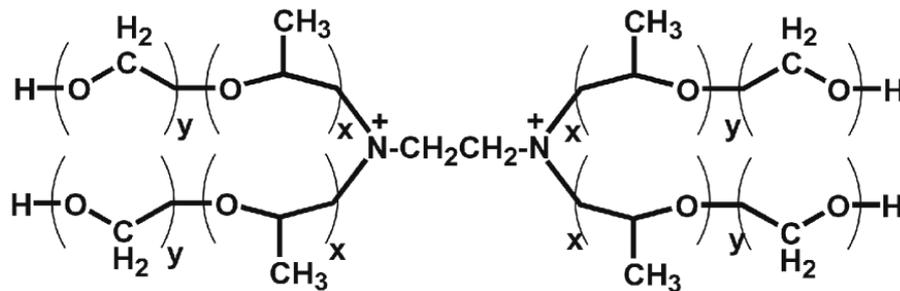


Figure 13 : Structure générale des poloxamines.

4.2. Les plasmides d'expression

L'expression de la protéine dans les cellules transduites se fait à l'aide de vecteurs d'expression, ou plasmides, qui sont des molécules d'ADN doubles brins circulaires super-enroulées. Ces plasmides contiennent généralement : une origine de répllication bactérienne qui permet leur production dans des souches bactériennes, un gène dont l'expression confère la résistance à un antibiotique et donc la sélection des clones bactériens, et une cassette d'expression contenant le transgène sous le contrôle d'un promoteur. Le choix du promoteur qui gouverne l'expression du transgène revêt une importance particulière. Les promoteurs viraux, comme le promoteur précoce du cytomégalovirus (pCMV) sont caractérisés par un haut niveau d'expression constitutive du transgène (Boshart et coll., 1985). Alternativement, le choix peut se porter sur des promoteurs inductibles capables de réguler l'expression du transgène ou des promoteurs spécifiques d'un tissu capables de cibler son expression.

Matériels & Méthodes

Pacemaker Biologique

MATERIELS ET METHODES - PACEMAKER BIOLOGIQUE

A. Injection intracardiaque

I. Formulation des plasmides

La totalité des plasmides utilisés lors des différentes expériences est sous la dépendance du même promoteur humain du cytomégalovirus (CMV) : le plasmide pcIK-CAT contenant le gène codant pour la chloramphénicol acétyle transférase (CAT), et les plasmides pcDNA3-mHnc2 et pcDNA3-Adrb2 contenant respectivement les séquences codantes des gènes murins codant pour le canal pacemaker Hcn2 activé par des hyperpolarisations et pour le récepteur β_2 adrénergique (Adrb2). Le plasmide pcDNA3 ne contenant aucune cassette d'expression est utilisé pour les souris *sham*.

La formulation de l'ADN avec le tétronic 304, un poloxamine fourni par BASF (Mount Olive, NJ), est préparée sous forme d'un mélange équivolumique de tétronic 304 (10% dans de l'eau) et d'ADN plasmidique (25% de plasmide pcDNA3-Adrb2 et 75% de plasmide pcDNA3-mHnc2) dans du Tyrode.

II. Manipulation des souris

1. Injection des transgènes

Les souris males adultes sont anesthésiées par une injection intrapéritonéale de kétamine (100 mg/kg; Imalgène 500[®], Merial, France) et de xylazine (20 mg/kg; Rompun 2%[®], Bayer Pharma, France). Une analgésie est obtenue par injection sous-cutanée de 1 mg/kg de nalbuphine (Nubain[®], CERB, France). Les souris sont ventilées à 140 cycles/min à l'aide d'un ventilateur (Minivent Type 845, Hugo Sachs Electronik). La température corporelle est maintenue à 37°C avec un tapis chauffant. Après la thoracotomie gauche dans le cinquième espace intercostal, chaque souris reçoit une injection de 10 μ L de solution d'ADN et de tétronic 304 avec une seringue Hamilton 10- μ L dans la paroi du ventricule gauche.

2. Induction du bloc auriculo-ventriculaire par radiofréquence

2.1. Principe de la technique

Décrite en 1969 par Benjamin Scherlag, l'exploration électrocardiographique endocavitaire est réalisée couramment chez l'homme depuis cette date. Complément de l'ECG de surface, elle permet dans notre cas d'enregistrer l'activité du faisceau de His.

La stimulation cardiaque est assurée par des impulsions délivrées par un générateur, l'influx électrique étant transmis au myocarde par l'intermédiaire d'électrodes endocardiques disposées à l'extrémité d'un cathéter. Les cathéters multipolaires permettent un recueil de l'activité électrique intracardiaque et l'analyse de sa propagation. Les sondes enregistrent l'activité électrique de certaines parties précises du cœur : l'oreillette (onde A), le faisceau de His (onde H) et le ventricule (onde V, figure 14).

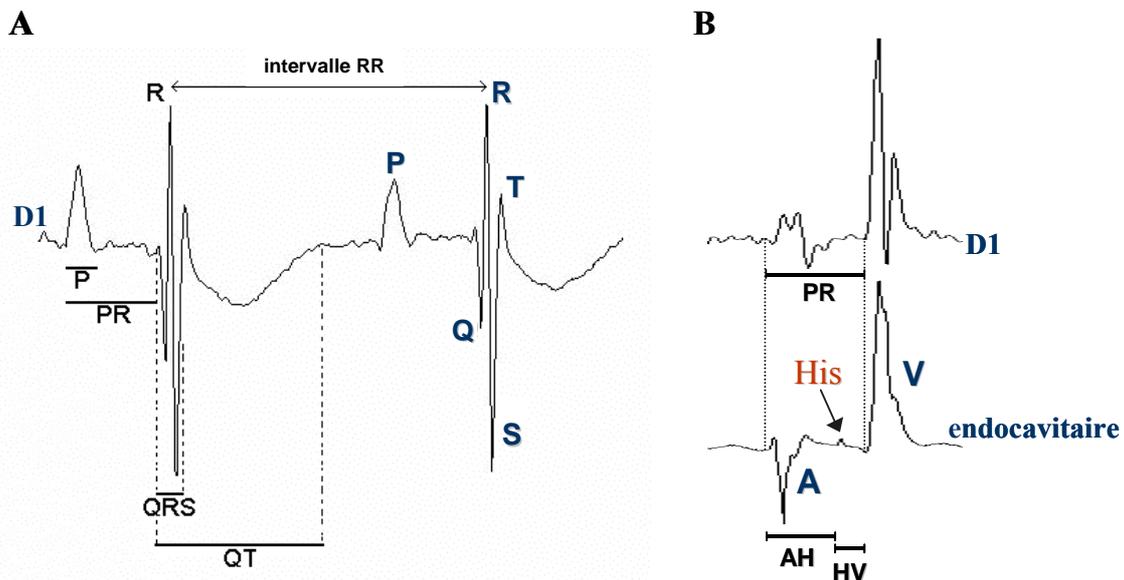


Figure 14 : Méthode de mesure des valeurs sur (A) l'ECG de surface D1 et (B) l'enregistrement intracardiaque.

Le principe de base de l'ablation par radiofréquence est de délivrer une impulsion électrique au niveau du myocarde. Les effets physiologiques des courants de radiofréquence ont été décrits pour la première fois par Darsonval en 1893. 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 80, et la première application

clinique fut réalisée en 1986 pour une ablation de la jonction auriculo-ventriculaire (Lavergne et coll., 1986).

Les courants de radiofréquence sont des ondes électromagnétiques dont la fréquence varie entre 300 kHz et 3 MHz. Il s'agit d'ondes de courant et de tension de forme sinusoïdale qui peuvent être délivrés sous forme de trains continus (mode continu) ou intermittents (mode pulsé). Il agit principalement par effet thermique. Cette énergie est véhiculée au niveau du cœur par l'intermédiaire d'électrodes. Pour l'ablation du nœud auriculo-ventriculaire, le courant de radiofréquence est généralement délivré au tissu cible par l'intermédiaire d'un cathéter constitué de plusieurs électrodes en son extrémité.

2.2. Protocole expérimental

Les souris sont anesthésiées par une injection intrapéritonéale d'étomidate à la dose de 30 mg/kg (Hypnomidate® 2 mg/ml, Janssen-Cilag S.A). La souris est placée sur un tapis chauffant rétrocontrôlé par une sonde rectale afin de maintenir une température corporelle de 37°C, et un ECG de surface D1 est enregistré pendant 3 minutes à l'aide de deux électrodes sous-cutanées de calibre 25 Gauge.

Ensuite, une analgésie par injection sous cutanée de Nubain 3µg/kg et une anesthésie locale par injection de xylocaine 1% (dose 40mg/kg) sous-cutanée sont réalisées. La veine jugulaire droite est enfin isolée et une sonde octopolaire 2F avec un espacement entre électrodes de 0,5 mm (Cordis Webster®, USA) est alors introduite dans le cœur via cette veine jugulaire droite (figure 15).

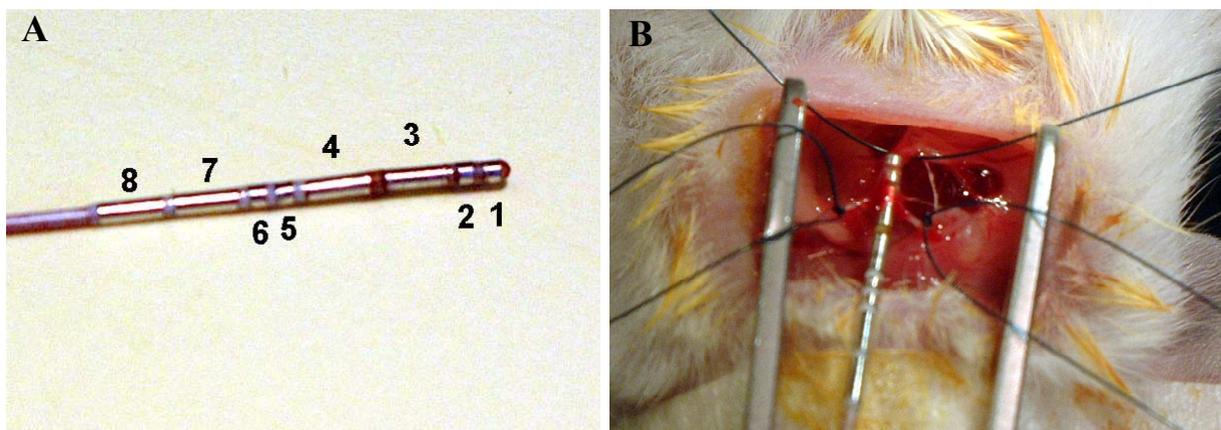


Figure 15 : Introduction de la sonde dans la veine jugulaire droite.

(A) La sonde octopolaire 2F avec 8 électrodes (4 électrodes de petite surface 1,2,5,6 et 4 électrodes de grande surface 3,4,7,8 utilisées pour l'ablation par radiofréquence). (B) L'entrée de la sonde dans la veine jugulaire préalablement fixée par les fils stériles 5.0 non résorbables.

L'électrocardiogramme de surface (dérivation D1) est enregistré avec deux électrodes sous-cutanées. La sonde d'exploration est positionnée afin d'obtenir l'enregistrement du faisceau de His ainsi que l'électrogramme atrial et ventriculaire. 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, Paris, France) pour monitoring et analyse ultérieure avec le logiciel ECG-Auto (Emka Technologies). Une stimulation ventriculaire programmée est réalisée avec un stimulateur UHS 20 Biotronik. Le seuil de stimulation, correspondant à l'énergie minimale entraînant une dépolarisation ventriculaire est déterminé et les stimulations sont ensuite effectuées à une intensité de une fois et demi ce seuil.

Après la 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, figure 15). Si le premier tir est efficace, le rythme sinusal est supprimé, le ventricule bat à un rythme d'échappement idioventriculaire : la souris est en bloc auriculo-ventriculaire chronique (BAVc). En cas d'échec, un second tir est tenté après une pause de 5 minutes (5 tirs au maximum pour chaque souris).

Après ablation, la souris est stimulée au niveau ventriculaire à un rythme d'environ 240 btm/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 ensuite stimulée en continu au rythme de 240 btm/min pendant 5 minutes, puis injectée avec une dose de 200 ng/g d'Isoprénaline 0,2 mg/ml (Isoprénaline chlorhydrate) par voie intrapéritonéale. A la fin de la procédure, la sonde est retirée, la souris recousue et mise sur un tapis chauffant pour éviter l'hypothermie jusqu'au réveil.

III. Analyse

1. Suivi à long terme

Le principal avantage du transfert de gène à l'origine du pacemaker biologique dans notre modèle est qu'il est aisé de suivre son fonctionnement par un simple électrocardiogramme de surface à des dates définies.

Les souris sont anesthésiées grâce à une injection intrapéritonéale d'étomidate à la dose de 30 mg/kg (Hypnomidate® 2 mg/ml, Janssen-Cilag S.A). Les animaux sont ensuite placés dorsalement sur le tapis chauffant et des ECG six dérivations sont réalisés à l'aide de quatre

électrodes sous-cutanées 25-gauge placées à chacun des membres antérieurs et postérieurs de la souris.

2. Analyse de l'ECG et de l'électrocardiogramme intracardiaque

L'électrogramme intracardiaque et l'ECG de surface sont analysés grâce aux logiciels spécifiques de conversion analogique numérique IOX-1.585 et ECG auto (EMKA technologies, Paris, France).

Les intervalles P, PR, QRS, QT et RR sont mesurés sur cinq complexes successifs de l'ECG de surface D1 et moyennés. Le complexe QRS est mesuré du début de l'onde Q jusqu'au point d'intersection entre la ligne isoélectrique et la pente ascendante allant du sommet de l'onde S à la partie positive de l'onde T. L'intervalle QT est mesuré du début du complexe QRS à la fin de l'onde T. Et l'intervalle PR (ou très exactement PQ) est mesuré du début de l'onde P jusqu'au début de l'onde Q (figure 14).

L'analyse de l'ECG permet également de révéler l'axe électrique du cœur, c'est-à-dire l'angle du champ électrique généré par les cellules cardiaques lors de l'activation ventriculaire. On assimile ce champ à un vecteur unique dans le plan frontal. L'axe se mesure par la comparaison des amplitudes respectives du segment QRS (positivité – négativité) dans les dérivations frontales. La plus grande positivité du QRS (onde R) donne une bonne idée de l'axe du cœur. Etant donné que la dépolarisation physiologique se fait du nœud auriculo-ventriculaire vers la pointe des ventricules, l'axe moyen du cœur est situé entre 30° et 60°. Au-delà de ces valeurs, on parle de déviation axiale gauche ou de déviation axiale droite. Un axe anormal peut être le signe de perturbations dans la séquence d'activation des ventricules ou même de dommages cellulaires. Un axe situé dans le no man's land (180°-270°) évoque une origine ventriculaire des QRS. Il traduit une activation de la pointe du cœur vers la base et donc le contraire de ce qui se produit en cas d'activation via le faisceau de His.

3. Injection du gène rapporteur

Deux, 3, 5 et 8 jours après l'injection du plasmide pCIK-CAT (31 µg/10µl), les cœurs des souris sont disséqués, congelés dans l'azote liquide et homogénéisés dans 1 ml de tampon de lyse (Proméga, Charbonnières, France), supplémenté avec un mélange d'inhibiteurs de protéases (Proméga). Après centrifugation à 10000 tour/min pendant 5 minutes, l'activité de la chloramphénicol acétyl transférase (CAT) est mesurée à partir d'un aliquot de supernageant grâce au lecteur de plaques à marqueurs multiples VICTOR² (PerkinElmer, Les Ulis, France), en utilisant un kit ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*, Proméga,

Madison, WI, USA). Chaque échantillon de cœur est analysé en duplicate. L'activité de la CAT, c'est-à-dire son niveau d'expression, est déterminée dans 200 µl de surnageant, en accord avec les instructions du fournisseur. Une gamme de référence est réalisée à chaque étape.

4. Immunohistochimie

Juste après l'euthanasie des souris, les cœurs sont prélevés, rincés dans du PBS, et séchés. Le cœur est ensuite fixé dans du Tissue-Tek[®] (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA), plongé dans de l'iso-pentane refroidit au contact de l'azote liquide. L'organe est ensuite coupé au cryostat en fines sections de 8 µm récupérées sur des lames de verre. Les coupes sont finalement fixées par un bain d'acétone pendant 10 min, puis stockées à -80°C pendant 12h.

Pour les expériences d'immunomarquage, les anticorps primaires utilisés sont l'anticorps anti-GFP polyclonal (rabbit) (Chemicon, CA, USA). Ces anticorps sont ensuite couplés à l'anticorps anti-rabbit IgG-Biotinylé (Sigma, St Louis, MO, USA), puis à la Streptavidine-HRP (Dako Cytomacion, Denmark).

5. Analyse statistique

Les logiciels de Microsoft Office Excel et SigmaStat ont été utilisés pour faire une comparaison des valeurs entre les groupes des souris avec le test *t* de Student et le test d'analyse de la variance (ANOVA) à une voie ou deux voies complétées par un test de Tukey lorsque nécessaire. $P < 0.05$ est considéré comme une différence statistique significative. Les valeurs sont exprimées sous la forme de moyenne \pm s.e.m.

Résultats

Pacemaker Biologique

RESULTATS - PACEMAKER BIOLOGIQUE

Article 1 : Création d'un pacemaker biologique cardiaque par transfert de gènes non-viral chez la souris.

I. Introduction

L'activité électrique cardiaque dépend du bon fonctionnement du tissu nodal constitué du nœud sinusal et des voies de conduction dont fait partie le faisceau de His. Tout trouble de la conduction cardiaque ou dysfonction du nœud sinusal nécessite à l'heure actuelle l'implantation d'un stimulateur électronique. Cependant, malgré les progrès réalisés, les stimulateurs électroniques présentent de nombreux inconvénients qui ont stimulé l'idée de créer des pacemakers biologiques.

Outre la thérapie cellulaire, différentes stratégies de thérapie génique ont prouvé la faisabilité du concept. Ainsi, la capacité du gène HCN2, codant pour le canal du même nom responsable du courant de pacemaker I_f , à générer un foyer pacemaker au sein d'un tissu originellement quiescent fut confirmée dans des modèles de chien (Qu et coll., 2003 ; Plotnikov et coll., 2004).

L'utilisation de modèles animaux intacts et de vecteurs viraux sont autant d'éléments qui éloignent ces modèles d'études de la situation clinique. Dans l'optique de se rapprocher des conditions cliniques, nous avons décidé de réaliser un pacemaker biologique grâce à un vecteur non-viral du type des blocs copolymères amphiphiles, le tétronic 304, et ce chez des souris en bloc auriculo-ventriculaire complet (BAVc). Ce modèle pathologique permet un suivi à long terme du fonctionnement du pacemaker biologique induit par l'expression de deux transgènes *HCN2* et *Adrb2*, qui code le récepteur β_2 -adrénergique.

Cette étude a fait l'objet d'un manuscrit soumis à la revue *Molecular Therapy* (article page 62).

II. Résultats

Un immunomarquage combiné à une quantification de l'expression de la protéine CAT (chloramphénicol transférase) nous ont permis de démontrer la faisabilité de l'expression d'un transgène dans la paroi libre du ventricule gauche du cœur de souris grâce au vecteur amphiphile à blocs copolymères, le tétronic 304. L'expression de la CAT est

maximale et stabilisée à partir de cinq jours après transfection (figure 16). Afin de profiter pleinement de l'expression maximale du transgène, l'ablation du faisceau de His par radiofréquence qui conduit au BAVc est réalisée cinq jours après injection des transgènes.

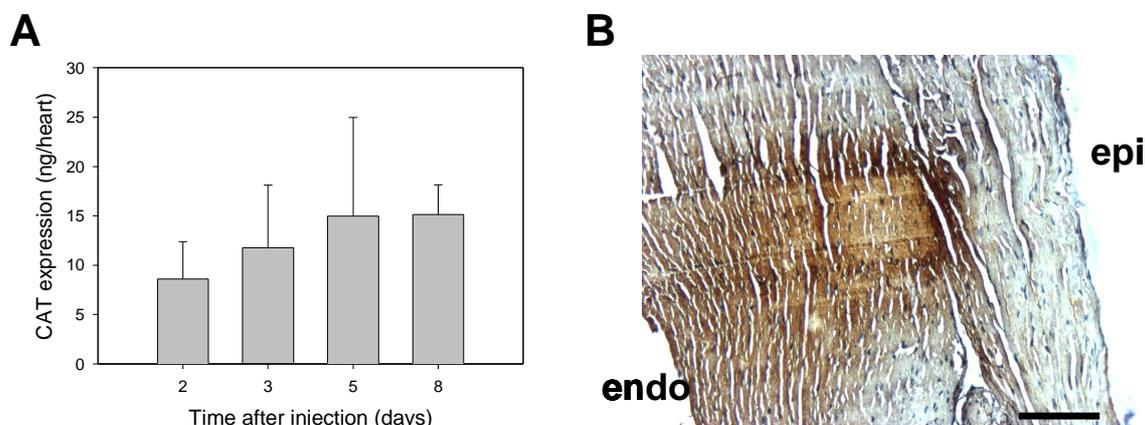


Figure 16 : Expression myocardiale d'un gène rapporteur.

A. Expression du gène rapporteur CAT en fonction du temps après injection dans le myocarde du ventricule gauche. Chaque point est la moyenne \pm sem de cinq à sept valeurs. **B.** Immunohistochimie avec des anti-corps anti-CAT d'une section du ventricule gauche d'une souris injectée avec le mélange tétronic 304/plasmide CAT. Endo, endocarde ; épi, épicarde. Echelle : 500 μ m.

Les premiers essais basés sur le gène *HCN2* transfecté seul, ont permis de voir émerger un rythme d'échappement ventriculaire moyen plus rapide que celui des souris *sham* injectées avec un plasmide non-codant, mais de manière non-significative. Etant donné la capacité des vecteurs non-viraux à transfecter conjointement plusieurs plasmides, nous avons tenté d'optimiser le rythme d'échappement ventriculaire en co-transfectant le récepteur β_2 -adrénergique codé par le gène *Adrb2*. La surexpression du récepteur β_2 -adrénergique dont on sait qu'il s'associe préférentiellement avec les canaux HCN et augmente le courant pacemaker généré (Graf et coll., 2001), permet d'augmenter de manière significative le rythme moyen du pacemaker biologique créé (figure 17).

Les souris en BAVc nous permettent de réaliser un suivi à long terme de la fonctionnalité du pacemaker biologique ainsi que de l'expression du transgène. De quelques minutes après l'ablation du faisceau de His jusqu'à cinq jours après BAVc, les rythmes d'échappements ventriculaires sont identiques chez les souris *sham* et les souris HCN2-*Adrb2*. Entre temps, le rythme s'est accéléré de manière identique. L'étude de la durée des intervalles QRS et des axes électriques nous révèle des complexes également similaires dans l'ensemble des souris qui constituent les deux groupes. La durée moyenne des intervalles

QRS ($13,42 \pm 0,54$ ms chez les souris HCN2-Adrb2 versus $12,28 \pm 0,8$ ms chez les souris *sham*) et la médiane normale des axes électriques, signifient que les foyers d'échappements enregistrés quelques minutes et cinq jours après BAVc sont localisés au niveau du faisceau de His juste au-dessous de la zone d'ablation.

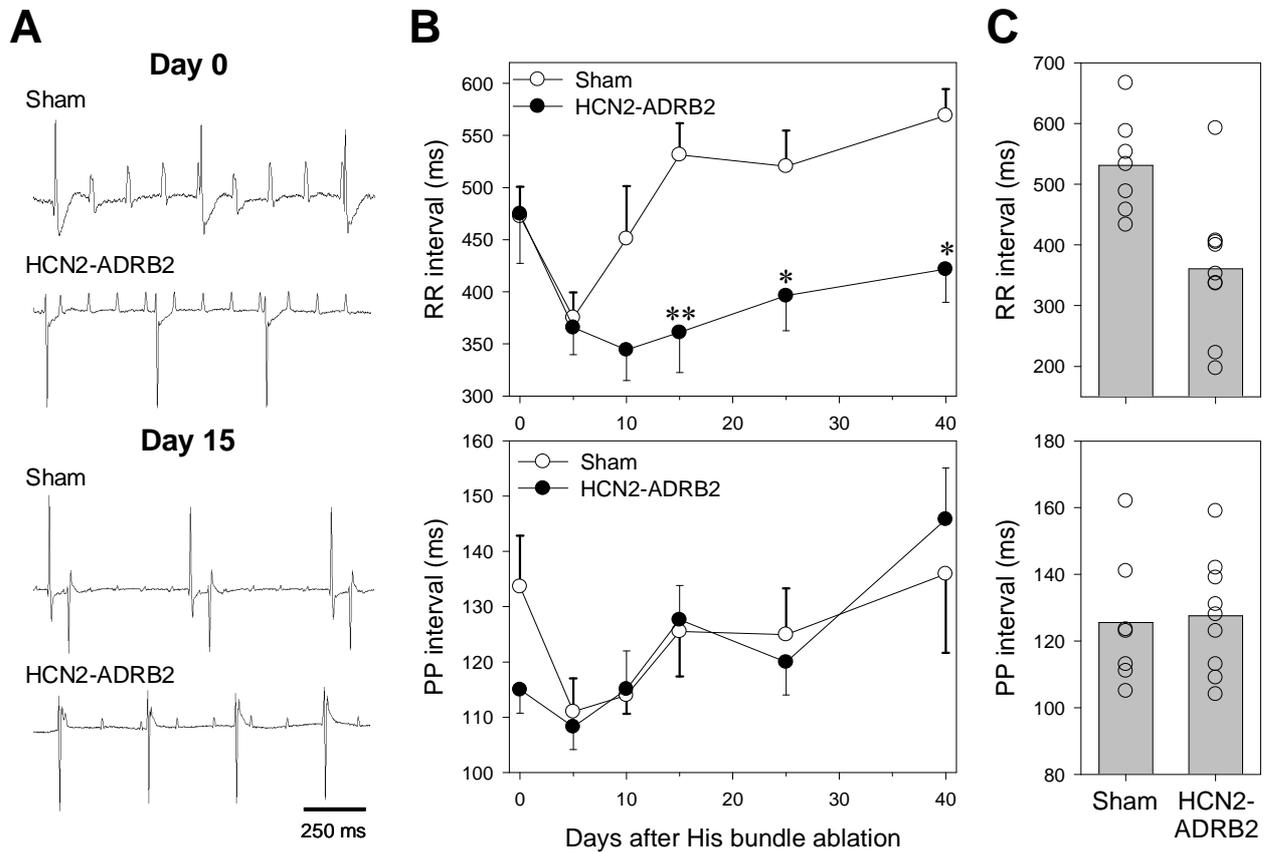


Figure 17 : Suivi à long terme des rythmes d'échappements ventriculaires.

A. ECG représentatifs chez une souris *sham* et une souris HCN2-ADRB2 le jour de l'ablation du faisceau de His (*Day 0*) et 15 jours plus tard (*Day 15* ; 20 jours après injection des plasmides). Les deux souris sont en bloc auriculo-ventriculaire complet (BAVc). B. Suivi pendant 40 jours des intervalles RR (graphique du haut) et des intervalles PP (graphique du bas) des souris *sham* ($n = 7$) des souris HCN2-ADRB2 ($n = 9$) après ablation du faisceau de His (Jour 0). *,** ; $p < 0.05$ et $p < 0.01$, respectivement *versus* les valeurs correspondantes chez les souris *sham*. C. Moyennes (barres) et valeurs individuelles (cercle) des intervalles RR et PP des souris *sham* et HCN2-ADRB2 au jour 15.

En revanche, à partir de dix jours après BAVc, le rythme d'échappement ventriculaire des souris *sham* décroît considérablement, pendant que celui des souris HCN2-Adrb2 se stabilise. Le rythme d'échappement ventriculaire des souris HCN2-Adrb2 est ainsi plus rapide, et ce, de manière significative entre quinze jours et quarante jours après BAVc. Quinze jours après BAVc, le gain de rythme est de l'ordre de 59 %. Le rythme

d'échappement moyen des souris HCN2-Adrb2 est de 184 ± 23 battements par minute (bpm) contre 116 ± 7 bpm chez les souris *sham*.

En tenant compte de l'évolution de l'intervalle PP, qui peut être considéré comme un marqueur du tonus sympathique, nous pouvons interpréter l'augmentation du rythme d'échappement des deux groupes de souris jusqu'à cinq jours après BAVc, puis la baisse progressive du rythme d'échappement des seules souris *sham*, comme étant liés aux variations du tonus sympathique (figure 17). Les souris HCN2-Adrb2, moins sensibles à la chute du tonus sympathique du fait de la surexpression du récepteur β_2 -adrénergique, voient leur rythme d'échappement se stabiliser.

La caractérisation des complexes QRS enregistrés quinze jours après BAVc a révélé la localisation des foyers d'échappements des souris HCN2-Adrb2 non plus dans le septum interventriculaire mais au niveau du ventricule gauche, lieu de l'injection des transgènes. La durée moyenne des intervalles QRS est allongée (durée QRS = $18,38 \pm 0,54$ ms) et l'axe électrique médian est dévié vers la droite (axe QRS = $121 \pm 45^\circ$), preuve que le foyer d'automatisme est localisé ailleurs que dans le septum interventriculaire (figure 3, article 1, page 59).

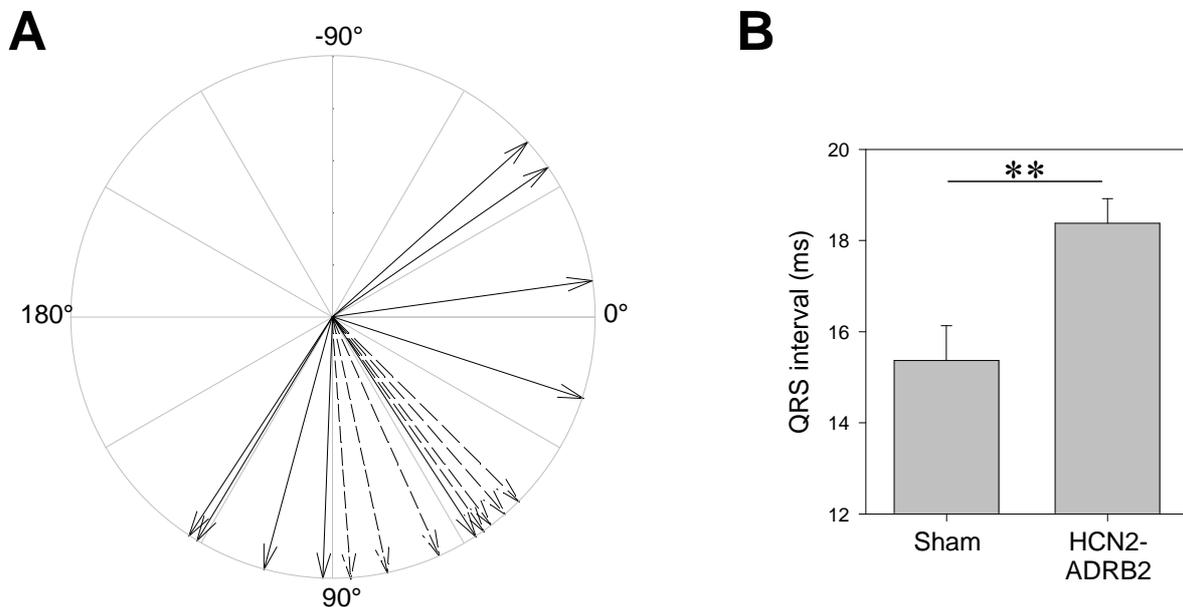


Figure 18 : Caractérisation des complexes QRS 15 jours après ablation du faisceau de His.

A. Axe électrique individuel des souris *sham* (flèches discontinues) et des souris HCN2-ADRB2 (flèches continues). **B.** Moyennes (barres) et valeurs individuelles (cercle) des intervalles QRS des souris *sham* et HCN2-ADRB2 au jour 15. ** $p < 0.01$ versus les valeurs correspondantes chez les souris *sham*.

L'expression des transgènes et donc la fonctionnalité du pacemaker biologique induit, fut également vérifiée via un immunomarquage dirigé contre la protéine GFP (Green Fluorescent Protein) couplée au canal HCN2. Dans un second groupe de souris, un plasmide codant pour la protéine de fusion HCN2-GFP accompagne celui codant *Adrb2*. Le suivi à long terme des souris, tant au niveau des rythmes d'échappements enregistrés que des caractéristiques des complexes QRS, permet de vérifier que le pacemaker biologique induit en présence de cette protéine de fusion est identique en tout point à celui généré en absence de la GFP. Des immunomarquages réalisés sur des coupes de cœurs de souris prélevés 10, 24, 31 et 40 jours après BAVc, ont tous trois permis de vérifier l'expression des transgènes pendant la durée du suivi à long terme. Le transgène est bien exprimé au sein d'un foyer unique dans la paroi libre du ventricule gauche au moins 45 jours après injection. Et le calcul du volume de l'ovoïde qui englobe la zone d'expression des transgènes a permis d'estimer le nombre de cardiomyocytes exprimant HCN2 aux environs de 6500 (figure 19).

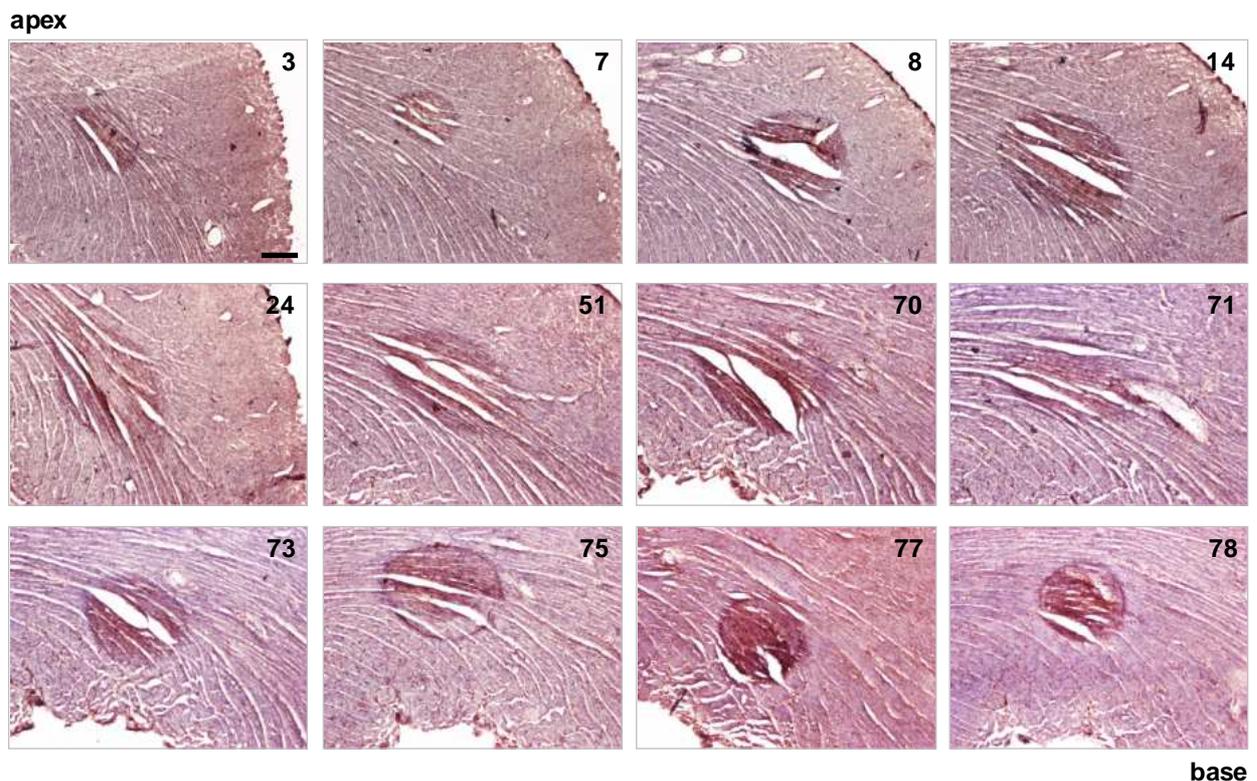


Figure 19 : Immunomarquage du transgène de l'apex vers la base.

Immunomarquage de la protéine de fusion HCN2-GFP sur 12 sections de 8 μm de tissu représentatives de la paroi libre du ventricule gauche injecté avec les plasmides codant GFP-HCN2 et ADRB2 31 jours après BAVc (36 jours après injection). L'expression focalisée du transgène dans la paroi libre du ventricule gauche est indiquée par la coloration marron foncée. Dans ce cœur, 88 sections montrent un immunomarquage. Les numéros des sections sont indiqués dans le coin en haut à droite de la microphotographie. La barre d'échelle figurée en bas à droite de la section 3 et qui représente 200 μm s'applique à toutes les sections.

Jusqu'à quarante jours après BAVc, le rythme d'échappement ventriculaire des souris HCN2-Adrb2 est stabilisé et est donc plus rapide que celui des souris *sham* qui continue à décroître progressivement. Ce gain de fréquence cardiaque permet d'allonger la durée de vie des souris. Chez les souris, le BAVc s'accompagne du développement d'une hypertrophie puis d'une insuffisance cardiaque, responsables d'une mortalité précoce deux à trois mois après ablation. Les souris HCN2-Adrb2 voient leur durée de vie allongée de plus de trois semaines, la médiane de vie des souris HCN2-Adrb2 étant de 134 jours contre 110 jours pour les souris *sham* (figure 20). Comme l'indique la corrélation entre la durée de vie et le rythme d'échappement moyen des souris mesuré entre le dixième et le quarantième jour post-ablation, les souris possédant le rythme d'échappement le plus rapide survivent le plus longtemps.

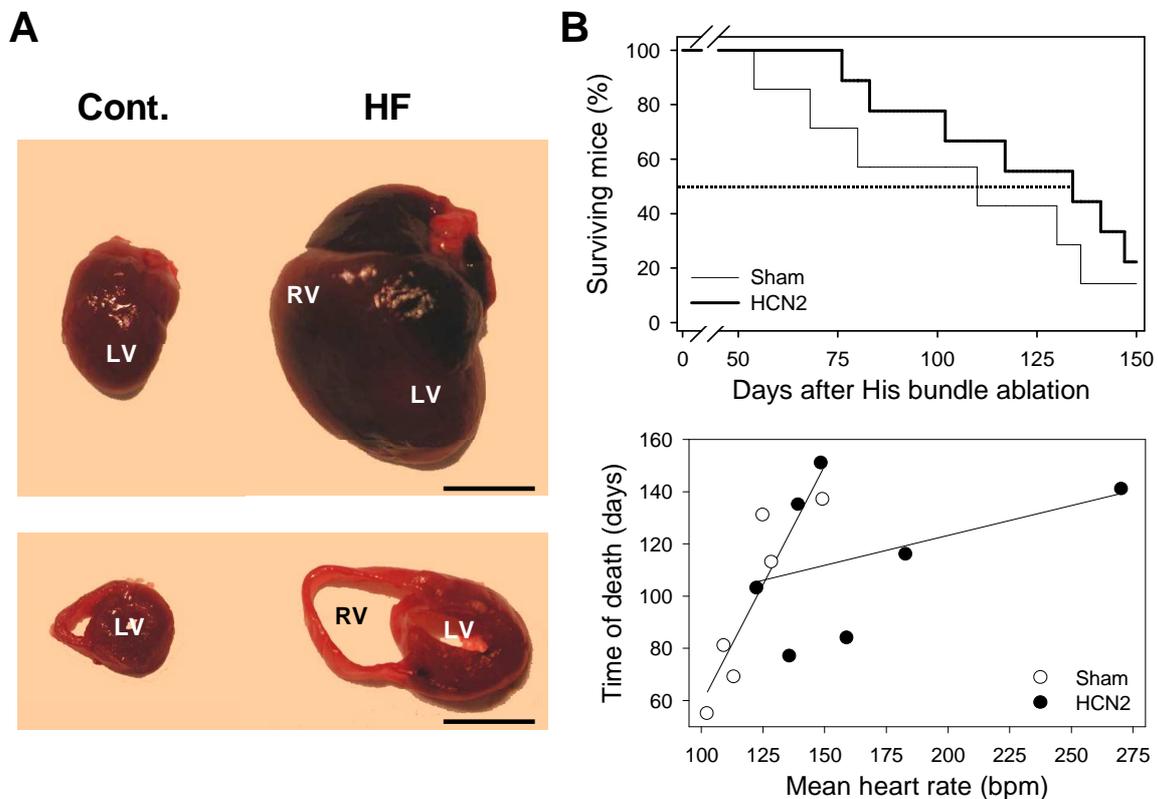


Figure 20 : Caractérisation des complexes QRS 15 jours après ablation du faisceau de His.

A. Exemple représentatif de cœurs (photo en haut) isolé d'une souris en BAVc pendant 2 mois (HF ; gauche) et d'une souris contrôle d'âge comparable (Cont. ; droite). Les photos du bas illustrent des sections ventriculaires transversales des mêmes cœurs. Les échelles sont en mm. **B.** En haut, évolution du taux de survie (axe Y, en pourcentage) des souris *sham* (n = 7) et des souris HCN2-ADRB2 (n = 9) en fonction du temps après l'ablation du faisceau de His durant une période de 150 jours (axe X). En bas, Durée de la période de survie après ablation du faisceau de His (axe Y) en fonction de la moyenne du rythme cardiaque aux jours 10, 15, 25 et 40 après ablation du faisceau de His pour chacune des souris *sham* (n = 6) et HCN2-ADRB2 (n = 7) qui meurent suite à l'insuffisance cardiaque.

Bien que la durée de vie des souris HCN2-Adrb2 soit allongée, il apparaît à la vue de la quantification par RT-PCR des transcrits des marqueurs de l'hypertrophie cardiaque, que sont le BNP, l' α -actine et la SERCA2, que l'évolution de l'hypertrophie n'est pas limitée chez ces souris HCN2-Adrb2. Au moment du décès des souris, le poids du cœur et le ratio poids du cœur/poids du corps, indiquent que les cœurs des souris HCN2-Adrb2 sont tout autant dilatés que ceux des souris *sham*.

De la même manière, la survenue des troubles du rythme lors des premiers jours, tels que la tachycardie ventriculaire, caractéristiques des BAVc, n'est pas réduite chez les souris HCN2-Adrb2. Il apparaît donc clairement que, contrairement à l'allongement de la durée de vie qu'il induit, le pacemaker biologique créé ne permet aucun bénéfice fonctionnel lors des cinq premiers jours de la pathologie.

Lors des enregistrements des ECG réalisés tout au long du suivi électrocardiographique, une injection d'isoprénaline, un agoniste β -adrénergique, nous a permis de vérifier que le pacemaker biologique est bien modulable par le système nerveux autonome. Le rythme d'échappement ventriculaire est en effet significativement plus sensible chez les souris HCN2-Adrb2 que chez les souris *sham*. L'augmentation du rythme du pacemaker biologique est plus de deux fois plus importante que celle du rythme d'échappement des souris *sham* ($37,71 \pm 6,18$ % chez les souris HCN2-Adrb2 versus $22,08 \pm 4,06$ % chez les souris *sham* ; figure 21).

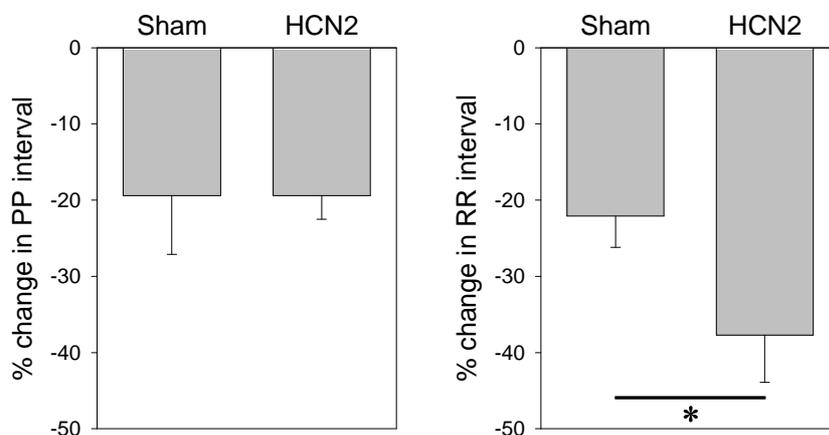


Figure 21 : Effet de l'isoprotérénol (40 μ g/kg) sur le rythme d'échappement ventriculaire après ablation du faisceau de His. Histogramme illustrant le pourcentage de changement des intervalles PP (à gauche) et RR (à droite) induit par l'injection d'isoprotérénol chez les souris *sham* (n = 6) et les souris HCN2-ADRB2 (n = 8). *, p<0,05 versus les souris *sham*.

III. Discussion - conclusion

Ce modèle de souris en bloc auriculo-ventriculaire complet nous a permis de démontrer la possibilité de créer un pacemaker biologique cardiaque grâce au vecteur non-viral, le tétronic 304, appartenant à la famille des vecteurs amphiphiles à blocs copolymères. L'utilisation du tétronic 304 est basée sur une première étude qui avait vérifié la capacité de ce vecteur à transférer de manière efficace les muscles squelettiques et cardiaques *in vivo* (Pitard *et coll.*, 2002 ; Pitard *et coll.*, 2004 ; Richard *et coll.*, 2005).

Pour réaliser cette étude, nous nous sommes appuyés sur les travaux qui avaient démontré la faisabilité d'un tel pacemaker grâce à l'injection du gène *HCN2* codant pour le canal ionique responsable du courant de pacemaker, I_f (Qu *et coll.*, 2003 ; Plotnikov *et coll.*, 2004). Au-delà de l'alternative qu'offre les vecteurs non-viraux aux risques potentiels inhérents aux vecteurs viraux, cette étude constitue une démonstration que la thérapie génique peut permettre de générer un pacemaker biologique cardiaque à moyen terme et suffisamment performant pour allonger la durée de vie. Nous avons également démontré la capacité de ces vecteurs non-viraux à induire un pacemaker biologique généré par la collaboration entre deux gènes distincts, *HCN2* et *Adrb2*, et modulable par le système nerveux sympathique. Cette capacité des vecteurs non-viraux à transférer de multiples plasmides peut d'ailleurs être utilisée pour soit réguler le pacemaker généré, soit ajuster sa fréquence.

Le fait que l'expression des transgènes soit focalisée en un point unique est totalement approprié à la genèse d'une zone d'automaticité unique, le but étant bien sûr d'éviter la naissance de plusieurs zones pacemakers, ce qui serait une source potentielle d'arythmies. Dans les nombreux travaux de conception d'un pacemaker biologique, aucune expérimentation n'avait vérifié l'unicité du pacemaker biologique créé soit par transfection adénovirale soit par implantation de cellules souches (Cai *et coll.*, 2007 ; Plotnikov *et coll.*, 2007). D'ailleurs, la vérification indirecte de l'expression du transgène par fluorescence de la GFP après isolement des cardiomyocytes ventriculaires de porc transfectés par un vecteur adénoviral exprimant *HCN4*, a révélé une proportion de myocytes transfectés de près de 10%. Ce pourcentage élevé signifie que la zone transfectée est très étendue et donc non focalisée (Cai *et coll.*, 2007).

Les expériences d'immunomarquage nous ont également permis d'estimer le nombre de cardiomyocytes transfectés aux alentours de 6500. Ceci démontre d'une part le caractère très localisé de la transfection et, d'autre part, la nécessité de ne transformer finalement qu'un très petit nombre de cellules en vue de créer un pacemaker biologique. Jusqu'à présent, les seules indications du nombre de cellules nécessaires à l'élaboration d'un pacemaker faisait état de sept cent milles cellules souches mésenchymateuses humaines (40% de cellules transfectées par *HCN2*) nécessaires pour voir émerger une activité automatique au sein du ventricule gauche de chien (Plotnikov *et coll.*, 2007).

Finalement, la réalisation de deux groupes distincts de souris, l'un injecté avec le gène *HCN2* non couplé à la GFP et le second avec la protéine de fusion HCN2-GFP, permet de vérifier que la GFP utilisée en tant que marqueur indirect de l'expression du transgène ne modifie en rien, ni dans un sens ni dans l'autre, les caractéristiques du pacemaker biologique créé par le transfert des gènes *HCN2* et *Adrb2*.

Identique au rythme d'échappement des souris *sham* jusqu'au cinquième jour après BAVc, le rythme d'échappement des souris HCN2-Adrb2 est plus rapide dès le dixième jour post-ablation, et l'est de manière significative quinze jours après BAVc. A cet instant du suivi électrocardiographique, le rythme d'échappement des souris HCN2-Adrb2 est 59% plus rapide, puis se maintient à un rythme aux alentours de 40% plus rapide jusqu'au quarantième jour.

Pour tenter d'expliquer cette évolution divergente des rythmes d'échappements enregistrés au sein des deux groupes, il convient de tenir compte de l'évolution de l'activité auriculaire dont l'intervalle PP est considéré comme un marqueur du tonus sympathique. Il s'avère en effet que la cinétique d'évolution du rythme d'échappement des souris *sham* est identique à celle de l'intervalle PP. Lorsque le tonus sympathique augmente entre le jour du BAVc et cinq jours plus tard, le rythme d'échappement des souris *sham*, tout comme d'ailleurs celui des souris HCN2-Adrb2, augmente dans les mêmes proportions. Puis, lorsque le tonus sympathique commence à décroître à partir du dixième jour après BAVc, le rythme d'échappement des souris *sham* diminue également, et ce, toujours dans les mêmes proportions.

En revanche, le pacemaker biologique des souris HCN2-Adrb2, dont on suppose qu'il est moins sensible aux variations du tonus sympathique du fait de la surexpression du récepteur β_2 -adrénergique, ne subit pas la baisse du tonus sympathique, et voit son rythme se stabiliser tout au long du suivi électrocardiographique.

En d'autres termes, jusqu'à cinq jours après BAVc, le rythme idioventriculaire Hissien, stimulé par le tonus sympathique, prend l'ascendant sur le pacemaker biologique créé dans le ventricule gauche. En revanche, au-delà du cinquième jour, lors de la chute du tonus sympathique, le rythme d'échappement Hissien décline. Le pacemaker biologique prend alors le relais, d'où la stabilisation du rythme d'échappement des souris HCN2-Adrb2 à une fréquence qui correspond finalement au rythme propre du pacemaker biologique induit. Pour expliquer cette cinétique, deux possibilités, qu'on ne peut vérifier, sont envisageables : soit les deux foyers ont pratiquement le même rythme, soit le pacemaker biologique émerge assez tardivement.

Révéler par la quantification de l'expression de la CAT, le taux d'échec des injections de l'ordre de 11%, peut expliquer la variabilité des rythmes d'échappements enregistrés chez les souris HCN2-Adrb2. Ainsi, la non significativité de l'augmentation importante de 30% du rythme d'échappement des souris HCN2-Adrb2 par rapport aux souris *sham* dix jours après

BAVc, peut s'expliquer par cette variabilité des rythmes observés en corrélation avec le taux d'échec. A dix jours comme à quinze jours après BAVc, au moins une souris HCN2-Adrb2 parmi les neuf souris qui constituent le groupe, exprime un rythme d'échappement similaire à ceux enregistrés chez les souris *sham*. Au vue de cette variabilité inhérente à la difficulté du modèle, il est donc possible d'avancer l'hypothèse que le pacemaker créé possède un rythme moyen plus élevé que celui enregistré dans le groupe HCN2-Adrb2.

Dans notre modèle d'étude, le pacemaker biologique est fonctionnel environ quarante cinq jours après injection, et l'expression des transgènes a pu être vérifié au moins quarante cinq jours post-injection. Cette fonctionnalité dans le temps du pacemaker biologique est du même ordre de grandeur que les six semaines du suivi longitudinal de la fonction du pacemaker biologique créé par implantation de cellules souches mésenchymateuses humaines, préalablement transfectées par *HCN2*, dans le ventricule gauche de cœur de chien (Plotnikov et coll., 2007). L'utilisation de vecteurs non viraux permet donc d'atteindre les mêmes durées de fonctionnalité du pacemaker que les vecteurs adénoviraux ou les cellules souches. De manière inattendue, la durée de l'expression du transgène est donc conséquente. Les premiers travaux de transfection *in vivo* par des vecteurs non-viraux au sein de notre laboratoire, avaient fait part d'une expression transitoire des transgènes de courte durée (Pitard et coll., 2004). Une première explication est l'origine bactérienne des gènes rapporteurs utilisés précédemment, qui pourrait expliquer l'expression très courte du transgène suite à une réaction immunitaire. Et deuxièmement, le fait que nous travaillons sur un modèle animal pathologique, et non pas sur un modèle sain comme ce fut le cas pour ces études, permet d'avancer l'hypothèse d'une stimulation du promoteur plasmidique (le promoteur CMV, cytomégalovirus) par des facteurs de transcription activés par le processus hypertrophique, le tonus sympathique élevé, ou bien encore par des voies de signalisation activées pour répondre à la bradycardie associée au BAVc.

Chez les souris, le bloc auriculo-ventriculaire complet induit une hypertrophie ventriculaire qui dégénère en insuffisance cardiaque. Cette évolution de l'hypertrophie n'est pas limitée chez les souris HCN2-Adrb2. Cette observation n'est pas étonnante dans le sens où jusqu'à cinq jours après BAVc, les rythmes d'échappements sont identiques entre les deux groupes. Or, comme le démontre l'étude par notre groupe des cinétiques du remodelage ionique dans un modèle de souris en BAVc (Bignolais *et coll.*, article en soumission, en partie « autres articles » page 149), le développement rapide de l'hypertrophie dès les douze premières heures est trop précoce pour être réduit par l'émergence d'un rythme d'échappement ventriculaire plus rapide. Et ce d'autant plus que jusqu'à cinq jours après BAVc, le rythme d'échappement des souris transgéniques est identique à celui des souris non transfectées.

Il apparaît donc clairement que, contrairement à l’allongement de la durée de vie qu’il induit, le pacemaker biologique créé ne permet aucun bénéfice fonctionnel lors des cinq premiers jours de la pathologie. Peut-être est-ce dû à son rythme intrinsèque encore trop faible pour qu’il puisse prendre le dessus sur le rythme d’échappement naturel Hissien. Seul le ralentissement de l’activité de ce rythme d’échappement Hissien permet l’émergence du pacemaker biologique induit. L’optimisation de la fréquence du pacemaker pourrait permettre à celui-ci de supplanter dès les premiers instants le rythme d’échappement ventriculaire Hissien, et limiter la survenue de l’hypertrophie et des tachycardies ventriculaires associées.

Conclusion et Perspectives

Pacemaker Biologique

CONCLUSION ET PERSPECTIVES - PACEMAKER BIOLOGIQUE

Depuis l'élaboration de notre modèle d'induction de pacemaker basé sur le gène HCN2, certaines études sont venues confirmer notre choix. Premièrement, en ce qui concerne la prépondérance de l'isoforme HCN4 au sein des cellules automatiques du nœud sinusal, des expériences de capture laser conjuguées à des RT-PCR ont suggéré que l'isoforme HCN2 serait finalement l'isoforme dominante au niveau des cellules sinusales de rat, du moins au niveau des ARN. Ces résultats restent bien sûr à confirmer au niveau protéique (Huang et coll., 2007). Cette observation remet en cause le rôle majeur de l'isoforme HCN4, et remet du coup en exergue celui de HCN2, au demeurant plus sensible aux voies de régulation sympathique.

Et quant à la possibilité d'utiliser les canaux Ca^{2+} , il existe un débat concernant lequel du cycle Ca^{2+} ou de I_f est à l'origine de l'automatisme des cellules spécialisées. Cependant, des travaux récents confirment le choix des gènes HCN dans l'optique de créer un pacemaker biologique cardiaque. En effet, plusieurs études démontrent qu'au cours du développement puis du vieillissement, la diminution du rythme cardiaque est corrélée à une diminution de l'expression des canaux HCN qui n'est pas efficacement contrebalancée par l'augmentation du courant $I_{Ca,L}$.

L'étude de Huang et de ses collaborateurs citée précédemment, a révélé que le niveau d'expression des transcrits HCN2 et HCN4 diminuait au cours du développement (Huang et coll., 2007). Ces résultats confirment ceux obtenus précédemment par Accili et ses collaborateurs qui démontraient qu'entre des myocytes isolés du nœud sinusal de lapins nouveaux-nés et adultes, la densité de courant I_f est une fois et demi plus importante dans les myocytes néonataux (Accili *et coll.*, 1997). Le ralentissement de l'activité sinusale au cours du développement et du vieillissement serait donc lié à une diminution de I_f . Dans le même temps, une seconde équipe a démontré que cette diminution de I_f au cours du développement pouvait être secondaire à une diminution marquée du taux d'AMPc dans les cellules sinusales (Yang et coll., 2006). Donc, même si cette diminution de I_f , dépendante de l'âge, ne peut être seulement reliée à une diminution de l'expression des transcrits, il n'en reste pas moins que les messagers de *HCN2* et *HCN4* sont progressivement (Huang et coll., 2007) diminués au cours du vieillissement.

Il a été démontré que la diminution de l'expression des isoformes HCN était en partie contrebalancée par une augmentation de courant $I_{Ca,L}$ (Protas et coll., 2001). Mais cette potentialisation de $I_{Ca,L}$ ne permet pas de maintenir un rythme cardiaque équivalent, ce qui laisse penser que les courants Ca^{2+} sont potentiellement moins performants que I_f pour initier l'activité automatique. A la vue de ces résultats, auxquels s'ajoutent les contraintes d'homéostasie Ca^{2+} et les risques de modification de la repolarisation des potentiels d'action

ventriculaires lors de la surexpression des canaux Ca^{2+} , les gènes *HCN* semblent être les candidats les plus appropriés à l'initiation d'une automaticité au sein de cellules quiescentes. Ceci est confirmé par Michels et ses collaborateurs qui ont rapporté que l'activation des canaux HCN unitaires se faisait à des potentiels membranaires moins négatifs et que l'amplitude des courants unitaires était plus importante que celle observée lors d'expériences menées en configuration cellule-entière (Michels et coll., 2005).

Le fait que l'injection intracardiaque du complexe transgène-tétronc 304 conduise à l'expression focalisée du pacemaker induit est approprié à notre objectif de générer un foyer unique de pacemaker. Or, dans les études précédemment réalisées grâce à des adénovirus, la vérification de l'expression du transgène par mesure électrophysiologique ou même d'immunomarquage sur myocytes isolés, ne permettait pas de confirmer l'existence d'une unique zone transfectée. Étant donné le pouvoir de diffusion et de réplication des vecteurs viraux, il est possible d'envisager l'existence de multiples zones cellulaires transfectées. L'existence de ces multiples foyers d'automaticité est susceptible d'engendrer des troubles du rythme du fait de la compétition entre ces différents pacemakers. De plus, un autre avantage des vecteurs non-viraux est leur capacité à co-transfecter de multiples plasmides d'expression, étant donné leur limite haute de taille plus élevée que les adénovirus. Preuve en est la transfection de cellules musculaires squelettiques par le plasmide contenant l'ADNc de la dystrophine d'une taille importante de 16,1kb (Richard et coll., 2005). Cette particularité des vecteurs non-viraux nous offre ainsi l'opportunité de co-transfecter plusieurs gènes pour optimiser ou réguler le pacemaker biologique.

En ce qui concerne l'optimisation du pacemaker biologique induit, deux voies s'offrent à nous. Soit améliorer les caractéristiques du canal exprimé, soit utiliser des outils d'expression plus performants.

En ce qui concerne la modification des caractéristiques du canal transfecté, l'objectif pourrait être premièrement d'augmenter l'amplitude du courant généré et d'accélérer ses cinétiques d'activation. Pour ce faire, l'utilisation d'un plasmide codant les sous-unités HCN1 et HCN2 concaténées est une piste de choix, puisque le courant ainsi généré se caractérise par une activation accélérée proche de celle de HCN1, tout en conservant une régulation sympathique supérieure similaire à celle de HCN2. Une autre particularité de ce concatémère est la conservation du phénomène d'hystérésis propre à HCN1, dont certains travaux permettent d'affirmer qu'il diminue le risque d'arythmies dans les cellules pacemakers (Azene et coll., 2005 ; Mannikko et coll., 2005 ; Elinder et coll., 2006).

Une autre possibilité en vue de l'amélioration des caractéristiques biophysiques du transgène HCN est de lui adjoindre la sous-unité β Mirp1 (KCNE2). Il a été démontré que la co-transfection de Mirp1 avec HCN2 dans des ovocytes de xénope permet d'augmenter la densité

de I_f et d'accélérer ses cinétiques d'activation grâce à une interaction directe avec HCN2 (Yu et coll., 2001).

Au-delà de l'amélioration des caractéristiques du canal sauvage, il est également possible d'envisager de transférer des canaux mutés. Un mutant HCN, Y331D, qui se caractérise par un gain de fonction, semble être une piste de choix (Macri et Accili, 2004). Un premier essai avec un mutant de HCN (E324A), lui aussi caractérisé par un gain de fonction, n'a pas permis de créer un pacemaker biologique plus rapide que par l'intermédiaire du canal HCN2 sauvage (Bucchi et coll., 2006). Bien que s'activant pour des potentiels moins négatifs et possédant des cinétiques d'activation plus rapides, le canal mutant E324A génère des courants de plus faible amplitude aux alentours des potentiels proches du potentiel membranaire de repos des cardiomyocytes ventriculaires. Peut-être est-ce là la raison de son incapacité à produire un pacemaker plus rapide. En revanche, le mutant Y331D, génère des courants de plus grande densité que le sauvage, ce qui laisse augurer un possible gain de fonction du pacemaker biologique.

Une seconde possibilité est de transformer des canaux autres que HCN pour leur fournir des caractéristiques d'activation et de régulation plus appropriées, c'est-à-dire plus proche de celles du canal HCN. Un exemple est le canal Kv1.4 converti en canal non sélectif activé par des hyperpolarisations, du type de HCN, grâce à quatre mutations. Mais, en dehors de l'argument du contrôle de l'hétérogénéité des rythmes obtenus selon les individus concernés, le pacemaker créé par ce canal synthétique ne se caractérise par aucun gain de rythme. De plus, la régulation par le système nerveux sympathique n'a pas été vérifiée et les auteurs ne décrivent que des évènements fréquents de battements idioventriculaires monomorphiques et non pas une activité régulière du pacemaker ventriculaire (Kashiwakura et coll., 2006).

Ainsi, il semble préférable de s'appuyer sur le canal HCN originel avec tous les avantages qu'il comporte, tant au niveau de sa régulation par le système nerveux sympathique qu'au niveau de sa faible conductance propice au minimum de bouleversement du fonctionnement des cellules modifiées.

La seconde voie consisterait à augmenter la capacité d'expression en utilisant des promoteurs plus forts ou fonctionnels à plus long terme. Mais des travaux réalisés récemment au sein de notre laboratoire ont démontré la possible expression à très long terme d'un transgène, sous la dépendance du même promoteur CMV, grâce à un vecteur non-viral. Le gène de l'EPO (érythropoïétine) injecté à quatre reprises à l'aide d'un vecteur de la famille des poloxamines à blocs copolymères dans le tibia antérieur d'un modèle de souris anémiées, permet d'exprimer l'EPO pendant au moins neuf mois (durée de l'étude) à des taux qui permettent de corriger la dysfonction rénale (Richard et coll., en soumission).

Une fois cet objectif atteint, l'augmentation du rythme du pacemaker créé sera peut-être en mesure de prolonger la vie des modèles animaux et donc rendre possible un suivi à plus long terme de l'expression des transgènes. Et si ce gain de fonction permet de retarder

suffisamment le décès, peut-être cela signifierait-il que le rythme généré est capable de réduire voire de stopper le phénomène d'hypertrophie ou du moins celui de l'insuffisance cardiaque.

Toujours dans la perspective d'améliorer la fonctionnalité du pacemaker biologique, se pose aussi la question du site d'injection le plus approprié. Pour espérer stimuler efficacement l'ensemble du cœur et de manière synchronisée, il semble préférable de créer le pacemaker biologique au sein même des voies de conduction et ce le plus haut possible, c'est-à-dire dans le tronc commun du faisceau de His lors de BAVc ou au sein même des oreillettes pour une dysfonction sinusale. Notons tout de même, que malgré l'injection de notre système dans le ventricule gauche de souris en dehors des voies de conduction, le gain d'activité obtenu est supérieur à ceux obtenus dans l'oreillette gauche ou la branche gauche du faisceau de His chez le chien (25% plus rapide que les animaux contrôles) (Qu et coll., 2003 ; Plotnikov et coll., 2004).

Notre modèle de création d'un pacemaker biologique est aussi à terme un modèle de développement des stratégies de transfection du tissu cardiaque, en vue d'améliorer les connaissances de la thérapie génique dans d'autres pathologies cardiaques. En effet, au niveau cardiaque, la thérapie génique peut également avoir pour objectif de résoudre les troubles du rythme. En ce sens, la repolarisation cardiaque fut ciblée dans le cadre d'études de thérapie génique anti-arythmique. Le transfert génique du canal K^+ Shaker a permis de réduire la durée du potentiel d'action de cardiomyocytes de souris néo-natales non insuffisantes et de cardiomyocytes de chien insuffisants (Johns et coll., 1995 ; Nuss et coll., 1996). Des résultats similaires furent obtenus dans des modèles *in vivo* utilisant la vectorisation adénovirale globale par voie coronarienne chez des cobayes sains (Ennis et coll., 2002 ; Mazhari et coll., 2002). Ces deux investigations ont démontré le raccourcissement de l'intervalle QT suite au transfert génique. De la même manière, des souris transgéniques porteuses d'un syndrome du QT long ont vu leur repolarisation restaurée suite à l'injection du gène Kv1.5 (Brunner et coll., 2003).

Plus récemment, il a été démontré que le transfert génique dans la paroi ventriculaire visant à accélérer la repolarisation permettait d'inhiber les arythmies ventriculaires chez des porcs (Sasano et coll., 2006). Le nombre croissant d'études pré-cliniques de thérapie génique cardiaque démontre une fois de plus la faisabilité de celles-ci et multiplie les bases scientifiques pour les futurs essais cliniques chez l'humain.

D'ailleurs qu'en est-il des essais cliniques, l'objectif avoué à long terme des différentes études? Les différents modèles d'études sont autant de pistes de stratégies thérapeutiques et constituent les bases des futurs essais cliniques. Dans le cas de pathologies cardiaques différentes, au moins deux essais cliniques ont vu le jour ces dernières années.

Réalisés aux Etats-Unis sous la direction du Docteur RJ Hajjar, à Boston, ces essais cliniques visent à contrecarrer l'insuffisance cardiaque en manipulant le cycle calcique intracellulaire. Bien que les résultats de ces études ne soient pas encore connus, leurs méthodologies et leurs objectifs sont clairement annoncés. Le premier de ces essais cliniques est une étude de phase 1, qui consiste en l'administration intracoronarienne d'un vecteur adéno-associé recombinant AAV codant pour la protéine SERCA2a chez des patients insuffisants cardiaque, du fait d'une cardiomyopathie ischémique ou non ischémique. Le second essai clinique concerne des sujets avec une cardiomyopathie non ischémique en fin de stade. Un vecteur AAV codant également pour SERCA2a est injecté dans la paroi libre du ventricule gauche. Les objectifs de ces deux essais cliniques sont de caractériser d'une part la faisabilité, la sécurité de l'utilisation des vecteurs viraux, et d'autre part, de vérifier l'efficacité de transduction et les effets de la surexpression de la protéine SERCA2a dans des cœurs humains insuffisants.

Le transfert génique pour créer un pacemaker biologique cardiaque dans des modèles expérimentaux animaux apparaît donc faisable, du moins à court terme (plusieurs semaines). Cependant, ces approches méritent d'être validées dans des modèles animaux relevant à long terme avant d'envisager des essais cliniques. De plus, les rythmes cardiaques obtenus dans la plupart des études sont relativement faibles et semblent donc inutiles cliniquement. Cependant, notre étude permet au moins d'offrir une alternative au troisième défaut majeur des études réalisées jusqu'à maintenant, qui est l'utilisation de vecteurs viraux avec tous les risques que cela comporte : réponse inflammatoire et risque carcinogène. De plus, nous avons pu vérifier que les transgènes vectorisés par le vecteur non-viral pouvait s'exprimer plus d'un mois. Ce délai d'expression est à rapprocher des limites temporelles d'expression des transgènes enregistrées lors de transfection adénovirales.

Et que dire de l'alternative proposée par la thérapie cellulaire ? A notre connaissance, aucune stratégie cellulaire n'a permis de créer un pacemaker biologique cardiaque plus performant que ceux obtenus par transfert génique. La thérapie génique permet de modifier des cellules déjà présentes au sein du tissu cible. Ces cellules sont donc déjà couplées aux cellules avoisinantes, ce qui facilite probablement la propagation de l'impulsion pacemaker de ces cardiomyocytes dans lesquels le ou les transgènes sont exprimés vers ceux dont la fonction originelle est conservée. Au contraire, les cellules souches requièrent un couplage hétérogène entre des cellules qui possèdent notamment des populations différentes de connexines. Et bien que la voie cellulaire permette de se passer des vecteurs viraux, l'utilisation de cellules souches, ou autres, présente de nombreuses limites, telles que la provenance, la purification, le risque de différenciation, la question de l'intégration avec les cellules hôtes, la réponse immunitaire, leur durée de vie, et leur potentiel proarythmique et néoplasique. Et finalement, le choix des vecteurs non-viraux permet de contourner les

problèmes inhérents aux vecteurs viraux, et dans ce cas, les cellules souches perdent leur principal avantage non pathogène sur la thérapie génique.

Avant l'application clinique, puisque tel est le but à plus ou moins long terme, des études supplémentaires sont donc nécessaires pour déterminer la stratégie la plus performante et la plus pertinente en vue de créer un pacemaker biologique efficace à long terme et sans risque secondaire. Au-delà du choix des gènes, des vecteurs et du site d'injection, se pose aussi la question de la méthodologie d'injection. En effet, afin de minimiser voire de supprimer toute lésion et inflammation post-injection, il convient d'optimiser le système de délivrance du transgène. Car, aussi bien dans notre modèle d'étude que dans ceux du groupe de M. Rosen (Plotnikov et coll., 2004), l'intervention chirurgicale induit la formation d'hématomes qui peuvent être durant une courte période source d'arythmies. Ces hématomes apparaissent quelque soit le contenu injecté, transgène ou plasmide non codant. En d'autres termes, cela signifie que cette inflammation est causée par l'aiguille servant à l'injection. Il est d'ailleurs fort probable que cette inflammation participe à la tachycardie enregistrée durant les premiers jours qui suivent le BAVc.

La thérapie cardiaque via une activité pacemaker biologique semble donc prometteuse que ce soit par la voie de la thérapie cellulaire et/ou génique. Comparé à un stimulateur électronique, un pacemaker biologique offre de plus grandes possibilités de réponses aux besoins physiologiques de l'organisme. Et plusieurs études ont récemment démontré que le pacemaker biologique pouvait réduire la dépendance au stimulateur électronique, suggérant que la combinaison d'un pacemaker biologique et d'un stimulateur électronique est envisageable (Bucchi et coll., 2006). Ce tandem pourrait permettre des battements cardiaques plus efficaces et sécurisés, et surtout d'économiser la batterie et donc d'allonger le délai entre deux interventions, avec les risques que cela comporte.

Malgré toutes ces avancées, il n'y a pourtant aujourd'hui ni d'immédiateté scientifique ni de justification éthique à extrapoler dès maintenant la technologie aux humains. Il existe encore trop d'inconvénients dans chacune des alternatives, dont le principal n'est autre que la nature transitoire de l'expression du transgène. Le fonctionnement du pacemaker biologique durant plusieurs semaines, voire plusieurs mois, dans un cœur humain, pourrait, au mieux, reproduire les résultats obtenus chez l'animal et, au pire, entraîner une insuffisance désastreuse du fait d'arythmies ou de conséquences inattendues. En conclusion, le pacemaker biologique en est aujourd'hui au même stade que l'était le stimulateur électronique à la fin des années soixante. Il reste donc à élargir la compréhension pré-clinique afin de déterminer si le pacemaker biologique se rapprochera à terme de la fiabilité, de la longévité et de l'utilité de son pendant électronique.

Introduction

KCNQ1 - PIP₂

INTRODUCTION - KCNQ1-PIP₂

A. Le courant potassique I_{Ks}

I. Structure et fonction des canaux potassiques dépendant du potentiel

1. Rôle des canaux potassiques dans la repolarisation cardiaque

Au même titre que l'activité automatique du nœud sinusal, le maintien d'une activité rythmique cardiaque normale dans chaque compartiment est dépendant du bon fonctionnement d'un ensemble de canaux ioniques. L'électrocardiogramme enregistré à la surface du corps permet de révéler certaines dysfonctions des canaux ioniques appelées « canalopathies ». En effet, des mutations portées par des gènes codant pour des canaux ioniques sont responsables de formes spécifiques d'arythmies cardiaques héréditaires, telles que la fibrillation auriculaire et les syndromes du QT long ou du QT court. Parmi les nombreux canaux qui gouvernent la forme des potentiels d'action cardiaques, les canaux potassiques (K⁺) ont un rôle primordial dans la repolarisation et donc dans le contrôle de la durée du potentiel d'action (figure 22). Plusieurs classes de canaux K⁺ avec des cinétiques, des dépendances au potentiel et des propriétés pharmacologiques différentes participent de concert au potentiel de repos, à l'amplitude, à la durée et à la période réfractaire du potentiel d'action cardiaque. Le dérèglement de l'activité d'un seul de ces canaux peut conduire à différents types d'arythmies.

Le courant K⁺ à rectification retardée, I_{Ks}, responsable de la repolarisation qui fait suite à la phase de plateau du potentiel d'action ventriculaire, est constitué de deux composantes : la composante rapide (I_{Kr}) générée par le canal HERG (Trudeau et coll., 1995), et la composante lente (I_{Ks}) générée par l'association moléculaire du canal KCNQ1 avec la protéine régulatrice KCNE1 (également appelée minK pour *minimal potassium channel*) (Barhanin et coll., 1996 ; Sanguinetti et coll., 1996).

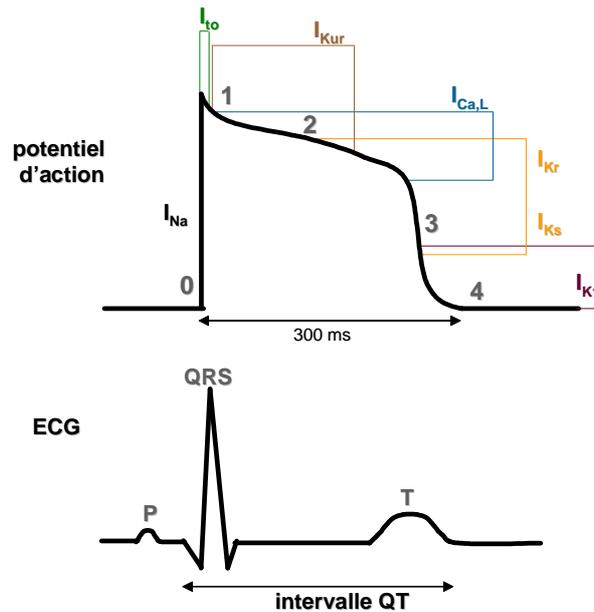


Figure 22 : Courants ioniques contribuant au potentiel d'action ventriculaire.

Le potentiel d'action ventriculaire est aligné avec le tracé électrocardiographique selon son temps d'action durant l'ECG. La dépolarisation initiale (phase 0) se produit via l'entrée rapide de sodium (I_{Na}). La repolarisation rapide (phase 1) est médiée par le courant sortant K^+ transitoire, I_{to} . Le plateau (phase 2) reflète la balance entre les courants entrants Na^+ , les courants entrants Ca^{2+} de type L, les courants sortants K^+ , I_{Kur} puis I_{Kr} et I_{Ks} . L'augmentation de la conductance de I_{Kr} et I_{Ks} complète la repolarisation avec la participation du courant K^+ à rectification entrante, I_{K1} . La cellule retourne à un potentiel membranaire de repos (phase 4) jusqu'à la prochaine dépolarisation.

2. Les canaux potassiques dépendant du potentiel

2.1. Structure des sous-unités α

Les canaux K^+ sont des protéines transmembranaires qui conduisent de manière sélective les ions K^+ à travers la membrane plasmique cellulaire à la fréquence de 10^6 à 10^8 ions par seconde. Ces canaux sont dotés de caractéristiques particulières: un pore qui permet le flux d'ions à travers la membrane hydrophobe, un filtre de sélectivité perméable uniquement aux ions K^+ et un système de portes permettant la transition entre les conformations ouverte et fermée. Depuis le premier clonage d'un canal K^+ à partir du locus *Shaker* chez la Drosophile (Papazian et coll., 1987), plus de deux cents gènes exprimant des canaux K^+ ont été découverts (Shieh et coll., 2000). Sur la base des différences structurales, on distingue trois grandes classes de canaux potassiques :

- les canaux à deux segments transmembranaires et une boucle du pore (2TM-1P)
- les canaux à quatre segments transmembranaires et deux boucles du pore (4TM-2P)
- les canaux à six segments transmembranaires (S1 à S6) et une boucle du pore (6TM-1P).

Les canaux KCNQ1 appartiennent à cette dernière classe qui regroupe les canaux K⁺ dépendant du potentiel (K_v) activés par une dépolarisation (figure 23). La sous-unité α KCNQ1 est ainsi composée de six segments transmembranaires (S1 à S6), d'une boucle P située entre les segments S5 et S6, et d'une extrémité C-terminale qui constitue près de 60% du canal (figure 23).

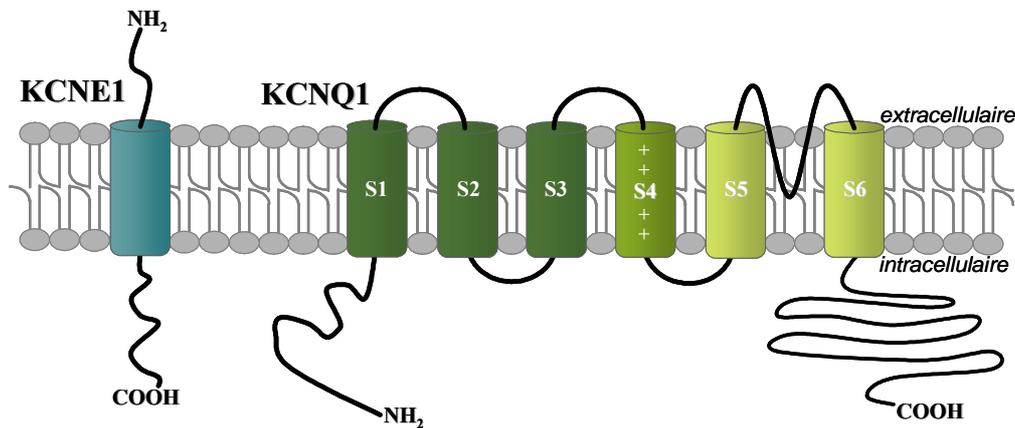


Figure 23 : Représentation schématique de la sous-unité α KCNQ1 et de la sous-unité β KCNE1.

Cette structure particulière d'un canal à boucle P fut mise à jour pour la première fois lors de l'étude cristallographique du canal KcsA de la bactérie *Streptomyces Lividans* appartenant à la classe des canaux 2TM-1P (Doyle et coll., 1998). Ainsi, depuis la première description des courants Na⁺ et K⁺ de l'axone géant de calmar en 1952 par Hodgkin et Huxley (Hodgkin et coll., 1952), la structure atomique des canaux ioniques est restée floue jusqu'en 1998. Jusqu'à cette date, seule l'approche structure-fonction dans laquelle un résidu est muté et les conséquences fonctionnelles sont étudiées électrophysiologiquement permettait d'explorer le comportement biophysique des canaux ioniques. Bien que les régions fonctionnelles importantes du canal furent révélées par ces études, les mécanismes de sélectivité ionique et d'ouverture/fermeture du canal étaient mal compris. Cette déficience fut donc comblée par cette première structure cristallographique d'un canal K⁺ bactérien.

Le pore du canal KcsA, constitué de quatre sous-unités α composées chacune de deux segments transmembranaires, est ainsi délimité par l'orientation des hélices α des deux segments transmembranaires M1 et M2. Du milieu extracellulaire vers le cytoplasme, le pore est compartimenté en un vestibule externe aqueux délimité par une couronne d'acides aminés porteurs de charges négatives, un vestibule interne aqueux et une cavité centrale aqueuse (figure 24). Tous ces compartiments sont constitués principalement de résidus hydrophobes. Au sein de chacune des quatre sous-unités α qui constituent le canal, des atomes d'oxygène délimitent une zone de faible hydratation qui permet le transport en file indienne des ions K⁺. Du côté intracellulaire, les extrémités C-terminales des segments S6 interagissent pour

délimiter le diamètre du pore. A l'état fermé, les quatre hélices s'entrecroisent de sorte à rendre impossible le passage des ions K^+ . Lors de l'ouverture du canal, les hélices s'écartent et ouvrent ainsi le passage.

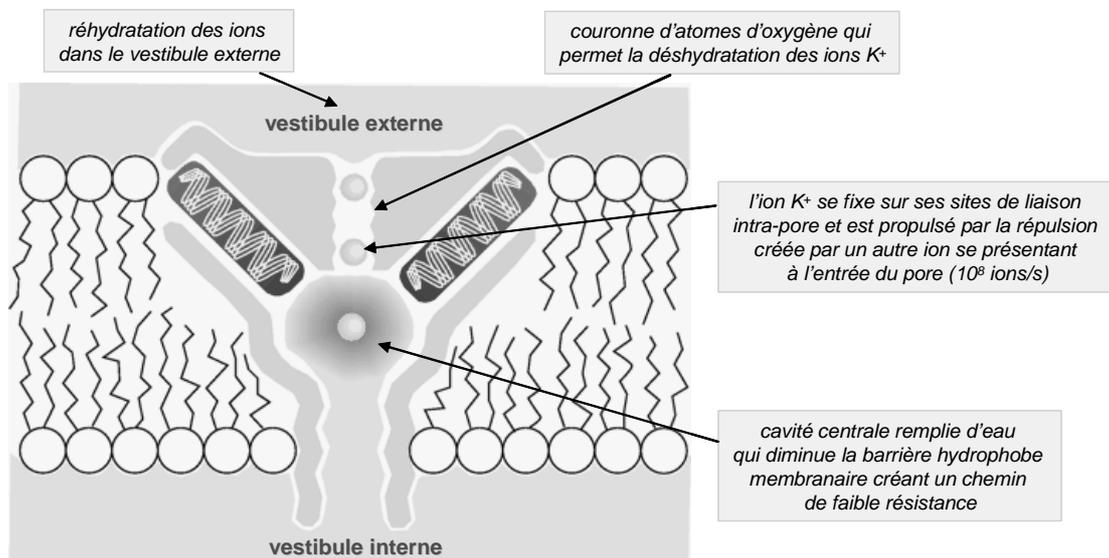


Figure 24 : Représentation schématique du déplacement des ions K^+ au sein du pore.

Les hélices α et les boucles P délimitent une cavité centrale aqueuse. Les ions se déplacent en file indienne et sont stabilisés au sein de la cavité par des interactions électrostatiques établies par les extrémités C-terminales des hélices du pore (Doyle et coll., 1998).

Comme le prouve la génération d'un canal fonctionnel par une protéine chimère construite avec la région S5-P-S6 des canaux Kv remplacée par la région correspondante du canal KcsA, les propriétés de conductance de ce canal KcsA sont très proches de celles des canaux K^+ dépendant du potentiel (Lu et coll., 2001). La structure cristallographique du canal KcsA a donc révélé la structure tridimensionnelle du pore des canaux K^+ dépendant du potentiel. Cependant, étant composé uniquement de deux segments transmembranaires et de la boucle P, ce canal ne nous informe pas sur la structure des segments S1 à S4. La *voltage-sensor* et les mécanismes de couplage ainsi que les phénomènes d'ouverture et de fermeture des canaux restaient également à élucider. La cristallisation en 2003 du canal bactérien KvAP (Jiang et coll., 2003), puis, en 2005, du canal neuronal Kv1.2 (Long et coll., 2005) appartenant tout deux à la classe des canaux 6TM-1P, apportera de nouveaux éléments pour mieux comprendre les mécanismes impliqués.

D'abord suggérée par une étude comparative de l'interaction d'une toxine avec les sous-unités sauvages et mutées du canal Shaker (MacKinnon, 1991), la stoechiométrie des sous-unités α des canaux Kv fut vérifiée par la cristallisation du canal neuronal Kv1.2. En

dehors du fait que la structure ancestrale du pore KcsA est fortement conservée des procaryotes aux eucaryotes, il en ressort qu'un canal K^+ dépendant du potentiel est formé par l'association de quatre sous-unités principales α (figure 25). Ces quatre sous-unités α forment le pore ionique et peuvent être associées à des sous-unités régulatrices β et à des protéines auxiliaires. Chaque sous-unité α comprend six segments transmembranaires divisés en deux modules fonctionnels distincts. Le premier module S1-S4 détecte les variations du potentiel membranaire et le second module S5-S6 forme le pore. Comme dans le canal KcsA, le pore possède un filtre de sélectivité aux ions K^+ défini par la séquence d'acides aminés Thr-Val-Gly-Thr-Gly. Ce filtre de sélectivité des canaux K^+ dépendant du potentiel est localisé au niveau de l'extrémité C-terminale de la boucle P, c'est-à-dire du côté extracellulaire du pore. Une autre particularité du pore est la présence du motif Pro-X-Pro qui permet une courbure de l'hélice du segment S6. L'étude de la cristallisation du canal Kv1.2 a permis d'identifier ce motif comme un des éléments du pore qui participe au mécanisme de couplage entre le pore et le *voltage-sensor*.

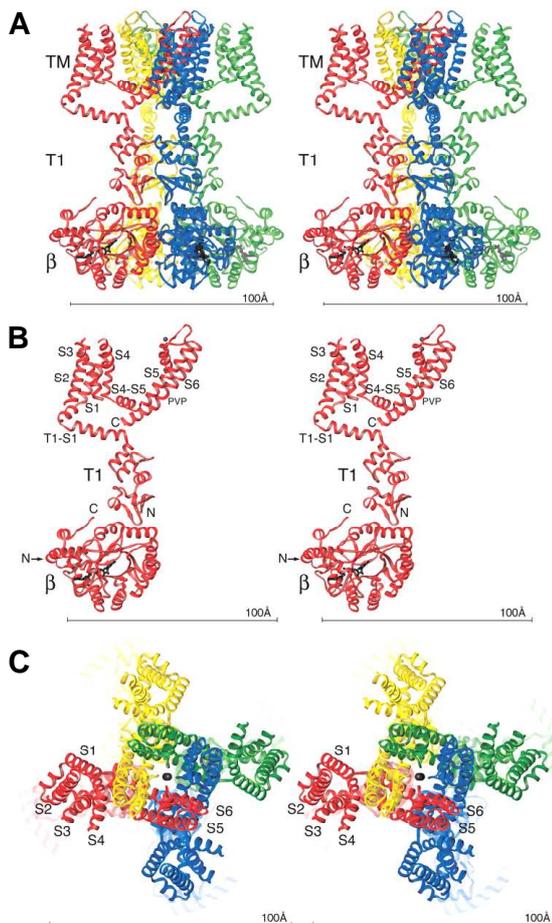


Figure 25 : Représentation stéréoscopique du complexe formé par le canal Kv1.2 et sa sous-unité β .

(A) Vue de côté d'une représentation en ruban des quatre sous-unités du canal colorées différemment (incluant le *voltage-sensor* et le pore). Le milieu extracellulaire est figuré en haut et le milieu intracellulaire en bas. Chaque sous-unité de la sous-unité tétramérique β est colorée selon la sous-unité du canal avec laquelle elle est en contact. L'abréviation TM indique la partie intégrale transmembranaire du complexe.

(B) Représentation d'une seule sous-unité du canal Kv1.2 et de la sous-unité β . Les sigles S1 à S6, PVP, N et C désignent respectivement les six segments transmembranaires, la séquence Pro-Val-Pro du segment S6, et les extrémités N-terminale et C-terminale de Kv1.2 et de la sous-unité β .

(C) Vue du dessus de la représentation en ruban de la face extracellulaire du pore. Les quatre sous-unités sont colorées différemment. (Long et coll., 2005)

2.2. Le voltage-sensor

Une propriété intéressante des canaux ioniques dépendant du potentiel est leur sensibilité aux changements tenus du potentiel membranaire. Cette sensibilité des canaux dépendant du potentiel intervient grâce au *voltage-sensor* composé par le segment transmembranaire S4. Ce segment S4 contient de nombreux résidus chargés positivement (lysine ou arginine), au nombre de cinq à sept selon les canaux et espacés approximativement de trois acides aminés. Dès 1984, Noda et ses collaborateurs ont analysé la séquence du segment S4 d'un canal Na⁺ dépendant du potentiel. La présence importante de résidus chargés positivement les avaient conduit à désigner le segment S4 comme candidat aux mécanismes de détection des variations du potentiel membranaire (Noda et coll., 1984). Par la suite, l'étude des effets de mutations neutralisant les charges positives du segment S4 de nombreux canaux dépendant du potentiel ont démontré la contribution de ce segment à la détection des variations du potentiel membranaire (Aggarwal et MacKinnon, 1996 ; Seoh et coll., 1996). Et plus récemment, l'immobilisation du segment S4 et les réductions consécutives du courant de porte et de l'activation des canaux ont définitivement attribué le rôle de *voltage-sensor* à ce segment (Horn et coll., 2000 ; Ding et Horn, 2001).

2.3. Les mouvements du segment S4

La sensibilité de ce segment S4 à toute variation du potentiel membranaire se traduit par un mouvement du segment qui permet un changement de conformation du canal indispensable à la transition de l'état fermé à l'état ouvert (Yellen, 2002 ; Jiang et coll., 2003). Trois différents modèles de mouvement de S4 ont été proposés. Le plus ancien suggère un déplacement minimal (2-3 Å), faisant passer les charges positives du segment S4 d'une crevasse intracellulaire à une crevasse extracellulaire lors de l'activation du canal (Bezannila, 2002 ; Yang et coll., 1996). Le deuxième modèle est une translation-rotation autour de l'axe de l'hélice α de S4 (Baker et coll., 1998). Selon les différentes études soutenant ce modèle, le segment S4 subirait une translation de 5 à 13 Å et une torsion de 60 à 180°. Alors que les deux premiers modèles ont été obtenus d'après des expériences de mutagenèse, de FRET et de modification chimiques de cystéines introduites, le troisième modèle plus récent, provient de données structurales. En 2003, Jiang et ses collaborateurs ont publié la structure cristallographique du canal bactérien KvAP, aboutissant à ce troisième modèle du *voltage-sensor* : le « *voltage sensor paddle* » (Jiang et coll., 2003). Ce modèle traduit un déplacement de plus de 15 Å, toujours du côté intracellulaire vers le côté extracellulaire, de la structure composée du segment S4 et d'une partie du segment S3 (hélice S3b). La particularité la plus importante de ce modèle est qu'une grande partie du *voltage sensor* interagit non pas avec le reste de la protéine mais avec des lipides de la membrane plasmique.

2.4. Le couplage entre le *voltage-sensor* et l'ouverture du canal

Si le couplage entre les mouvements du *voltage-sensor* et l'ouverture de la porte d'activation est aujourd'hui largement admis (Sigworth, 1994 ; Sigg et Bezanilla, 1997), les bases moléculaires de ce couplage ne sont pas encore élucidées. Trois mécanismes plus ou moins complémentaires sont aujourd'hui proposés. Le premier des mécanismes avancés est le déplacement du segment S4 à l'origine d'un déplacement de la boucle extracellulaire S3-S4 qui interagirait ainsi avec la partie supérieure du pore (Tang et Papazian, 1997 ; Bezanilla, 2000). La deuxième hypothèse est que le déplacement du segment S4 provoquerait le déplacement puis la fixation de la boucle intracellulaire S4-S5 à l'extrémité C-terminale des segments S6 qui délimitent la porte d'activation (McCormack et coll., 1991 ; Lu et coll., 2001 ; Ding et Horn, 2002 ; Tristani-Firouzi et coll., 2002). Cette hypothèse suppose donc que l'interaction entre la boucle S4-S5 et l'extrémité C-terminale est dépendante de l'état conformationnel du canal. En revanche, la cristallographie du canal Kv1.2 suggère que cette interaction entre la boucle S4-S5 et le segment S6 est constante. L'interaction S4-S5/S6 étant indépendante de l'état du canal, le mouvement des segments S4 est directement transmis aux segments S6 qui s'éloignent les uns des autres pour laisser le passage aux ions potassiums (Long et coll., 2005). Et troisième hypothèse, le couplage se ferait grâce à l'interaction directe entre le segment S4 et les hélices α des segments S6 (Li-Smerin et coll., 2000).

Au même titre que le couplage entre le *voltage-sensor* et la porte d'activation, la réalité physique de la transition entre l'état fermé et l'état ouvert est encore inconnue. Mais plusieurs observations permettent d'élaborer une hypothèse sur le mécanisme impliqué. Premièrement, la structure cristallographique du canal bactérien KcsA indique que les quatre sous-unités M2 qui longent le vestibule interne forment un tepee renversé. Le point de convergence de ces quatre hélices α forme la porte d'entrée intracellulaire du pore (Doyle et coll., 1998). De plus, des études de spectroscopie du domaine M2 du canal KcsA, ont révélé que la structure en forme de tepee s'ouvre lors de l'ouverture du canal. Cette ouverture du tepee correspondant à l'éloignement des hélices α (Perozo et coll., 1998). Puis, la comparaison des structures cristallographiques du canal KcsA et du canal bactérien Mthk (*Methanobacterium thermoautotrophicum*) respectivement à l'état fermé et à l'état ouvert, a permis d'envisager le mécanisme d'ouverture d'un canal K⁺ typique (Perozo, 2002). Le canal s'ouvrirait grâce à une articulation localisée à proximité du centre du segment TM2 du canal KcsA et représentée par un résidu glycine (Gly83), un résidu qui permet une certaine flexibilité. Le balancement d'un angle de 30° de la première moitié de l'extrémité C-terminale, à l'opposé de l'axe central de symétrie du tétramère, permet d'élargir la voie de conduction initialement trop étroite pour permettre le flux des ions (figure 26).

Le mécanisme d'activation des canaux Kv est différent de celui du canal bactérien KcsA. L'articulation des segments M2 ou de l'hélice S6 au niveau de la glycine qui

caractérise l'activation des canaux bactériens ne permet pas d'expliquer l'activation des canaux Kv eucaryotes tels que Shaker. L'hélice S6 des canaux Kv est en fait constituée d'un motif Pro-X-Pro, absent dans les canaux procaryotes, qui forme un coude présent à la fois à l'état fermé et à l'état ouvert (del Camino, 2000). La cristallisation de Kv1.2 a ensuite suggéré que la porte d'activation symbolisée par le segment S6 s'ouvre au niveau de ce coude dessiné par ce motif PXP (Long et coll., 2005). Un mouvement de bascule du segment S6 au niveau de coude PXP, indépendant de l'état conformationnel du canal, permet l'ouverture du canal.

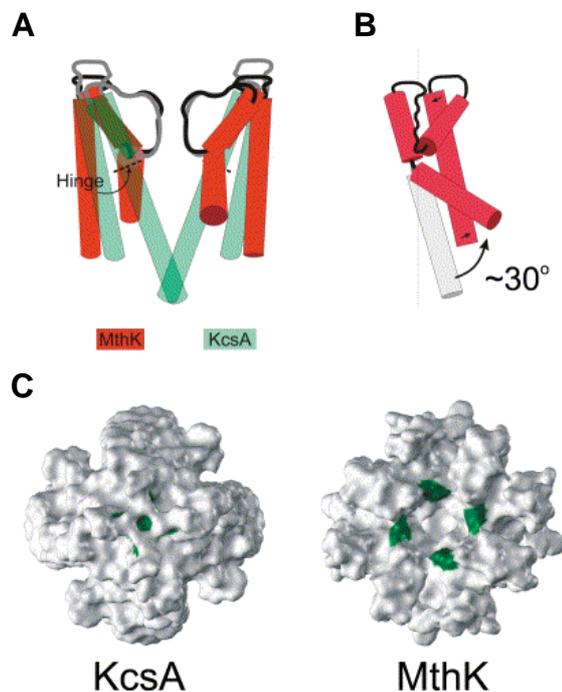


Figure 26 : Comparaison des structures transmembranaires des canaux KcsA et Mthk.

(A) Superposition de KcsA (vert) et Mthk (rouge). Le filtre de sélectivité est utilisé comme point de référence. Seules deux sous-unités sont représentées pour plus de clarté.

(B) Vue comparative d'une sous-unité unique de l'axe central de symétrie du tétramère (ligne pointillée).

(C) Vue intracellulaire de la surface accessible au solvant (2Å) pour KcsA (à gauche) et MthK (à droite). Les surfaces vertes représentent la partie la plus étroite du pore : V115 (KcsA) et A88 (Mthk). (Perozo, 2002)

II. Propriétés électrophysiologiques du courant I_{Ks}

1. Le gène *KCNQ1*

Le gène *KCNQ1*, autrefois nommé KvLQT1, localisé sur le chromosome 11 humain, code pour la sous-unité α *KCNQ1* du canal qui génère le courant potassique sortant à composante lente, I_{Ks} . Depuis le clonage de *KCNQ1* (Barhanin et coll., 1996 ; Sanguinetti et coll., 1996), la famille *KCNQ* s'est élargie avec quatre autres membres nommés *KCNQ2*, *KCNQ3*, *KCNQ4* et *KCNQ5*. Exprimé dans le cœur, *KCNQ1* l'est aussi dans d'autres tissus tels que le rein, les poumons, le placenta, le colon et l'oreille interne (Shieh et coll., 2000), ce qui explique la surdité observée dans le syndrome de Jervell-Lange-Nielsen (Barhanin et coll.,

1996). En revanche, *KCNQ1* n'est pas exprimé dans le foie, le cerveau et les muscles squelettiques (Splawski et coll., 2000).

2. I_{Ks} , le courant généré par le canal *KCNQ1-KCNE1*

Suite au clonage de *KCNQ1*, le canal a pu être exprimé dans des systèmes d'expression hétérologue, en vue de caractériser le courant ainsi généré. Le canal *KCNQ1* dépendant du potentiel s'ouvre progressivement suite à des dépolarisations croissantes de la membrane plasmique et génère un courant K^+ qui s'active rapidement. Lors d'une dépolarisation prolongée, les canaux *KCNQ1* s'inactivent partiellement (Splawski et coll., 1997 ; Pusch, 1998 ; Wang et coll., 1998). *KCNQ1*, exprimé seul, est donc responsable d'un courant sortant potassique, de faible amplitude, mais dont la cinétique rapide ne correspond pas à celle de I_{Ks} (figure 27A). En revanche, la co-expression de *KCNQ1* et de la sous-unité β *KCNE1* engendre un courant de grande amplitude, qui s'active lentement et qui possède toutes les caractéristiques de I_{Ks} (figure 27C).

Le gène *KCNE1* fut initialement cloné et exprimé en 1988 par Takumi et ses collaborateurs, mais demeura une protéine orpheline pendant de nombreuses années (Takumi et coll., 1988). L'expression de *KCNE1* dans des ovocytes de xénope produit un courant K^+ dépendant du potentiel avec une cinétique d'activation lente, ressemblant au courant I_{Ks} . En revanche, ce courant ne peut pas être reproduit après transfection par *KCNE1* de cellules de mammifères telles que les cellules COS-7 (figure 27B). Ne possédant pas de boucle P, la protéine *KCNE1* ne peut pas former à elle seule un véritable canal. En réalité, le courant K^+ enregistré lors de l'expression de *KCNE1* dans des ovocytes de xénope (Busch et coll., 1992) est dû à l'activation par *KCNE1* de canaux *KCNQ1* endogènes (Sanguinetti et coll., 1996).

Le couple *KCNQ1-KCNE1* génère donc la composante lente du courant K^+ (I_{Ks}) impliquée dans la repolarisation des myocytes cardiaques. Par rapport au courant généré par la seule expression de *KCNQ1*, le canal *KCNQ1-KCNE1* génère un courant dont l'amplitude est augmentée, la courbe d'activation déplacée vers des potentiels plus positifs, les cinétiques d'activation et de désactivation ralenties et une inactivation presque complètement absente (Splawski et coll., 1997). I_{Ks} s'active donc beaucoup plus lentement que les autres courants K^+ , et son amplitude maximale n'est atteinte que pour de longues dépolarisations membranaires, d'où une contribution de I_{Ks} plus importante à partir de la fin de la phase 2 du potentiel d'action cardiaque (figure 22).

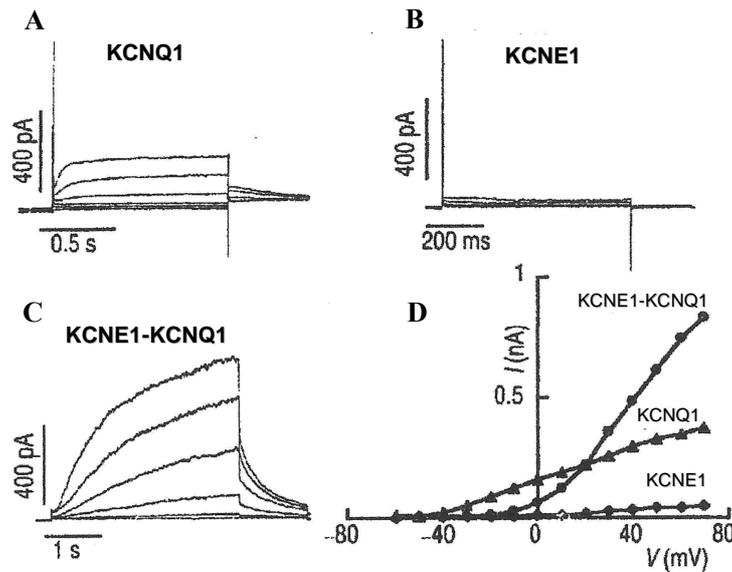


Figure 27 : Courants générés par les sous-unités KCNE1 et KCNQ1.

Courants K⁺ obtenus en réponse à des sauts de potentiel de -60 mV à +70 mV par incréments de 20 mV à partir d'un potentiel de maintien de -80 mV avec une phase de repolarisation à -40 mV dans des cellules COS transfectées avec : (A) KCNQ1, (B) KCNE1 seul, (C) KCNQ1 et KCNE1, (D) courbe courant/potentiel (incrément 10 mV) des courants montrés en (A) (B) et (C) (d'après Barhanin et coll., 1996).

Au delà de l'abolition de l'inactivation, l'augmentation du niveau du courant en présence de KCNE1, est probablement aussi due à une augmentation de la conductance unitaire du canal. Plusieurs travaux ont observé une multiplication de la conductance unitaire de l'ordre de quatre à sept fois (Pusch, 1998 ; Sesti et Goldstein, 1998 ; Yang et Sigworth, 1998).

3. Bases structurales de l'interaction KCNQ1-KCNE1

Plusieurs questions sont aujourd'hui posées quant à l'association entre KCNE1 et KCNQ1. Autant la nature des sites d'interaction que le nombre de sous-unités KCNE1 qui s'assemblent avec chacune des sous-unités KCNQ1 pour former un canal fonctionnel reste à élucider.

En ce qui concerne l'interaction entre la sous-unité KCNE1 et le canal KCNQ1, la question est toujours en suspens puisque certaines études suggèrent que KCNE1 s'étend le long du pore canalaire (Wang et coll., 1996 ; Tai et Goldstein, 1998), alors que d'autres résultats penchent pour une position en dehors de cette voie de conduction ionique (Kurokawa et coll., 2001 ; Tapper et George, Jr., 2001). Les premiers résultats favorisaient l'hypothèse

d'une proximité de KCNE1 avec la voie de conduction, puisque des travaux démontraient que l'interaction entre le segment S6 de KCNQ1 et la sous-unité KCNE1 est indispensable à la modulation du canal KCNQ1 par KCNE1 (Melman et coll., 2004). Mais depuis la cristallisation du canal KcsA, cette interprétation semble erronée. Cette structure cristallographique révèle en effet un filtre de sélectivité étroit, et rend donc improbable le positionnement de KCNE1 au sein de cette région formée par les boucles P des quatre sous-unités KCNQ1 (Williamson et coll., 2003). A ce titre, des travaux plus récents basés sur la capacité du TEA (tétra-ethyl-ammonium), qui se fixe au niveau de l'entrée intracellulaire du pore, à bloquer de manière similaire le canal KCNQ1 et le canal KCNQ1-KCNE1, suggèrent que KCNE1 interagirait avec KCNQ1 au niveau d'une région éloignée du filtre de sélectivité et de la cavité centrale (Kurokawa et coll., 2001). Et dernièrement, l'idée que la sous-unité KCNE1 soit susceptible d'interagir plus ou moins directement avec le segment S4, fut révélée par les résultats d'une étude qui démontre que des charges positives du segment S4 sont indispensables à la modulation par KCNE1 des cinétiques du canal KCNQ1 (Panaghie et Abbott, 2007).

De la même manière que pour l'interaction KCNQ1-KCNE1, la question de la stoechiométrie, c'est-à-dire du nombre de sous-unités KCNE interagissant avec les quatre sous-unités KCNQ1 qui forment le pore, fait encore débat. La présence de deux (Wang et Goldstein, 1995) voire de quatre, ou même plus, sous-unités KCNE (Wang et coll., 1998) au sein du complexe canalaire sont actuellement envisagées sans pouvoir être départagées. En effet, les cinétiques du courant enregistré lors de l'expression de la protéine de fusion KCNQ1-KCNE1 sont accélérées par l'expression supplémentaire de la sous-unité KCNE1. Cette modulation des propriétés biophysiques du canal ne peut être expliquée que par l'interaction de sous-unités KCNE1 supplémentaires avec le complexe canalaire déjà formé de quatre sous-unités KCNQ1 et quatre sous-unités KCNE1. Ces résultats indiquent donc qu'il est possible que plus d'une sous-unité KCNE1 puisse interagir avec une sous-unité KCNQ1.

4. La famille des sous-unités KCNE

La sous-unité KCNE1 (minK) est le membre fondateur de la famille des petites sous-unités régulatrices KCNE. Les quatre sous-unités MiRP (*minK-related proteins*, MiRP1-4) nommées KCNE2-5, sont également capables de s'assembler avec la sous-unité α KCNQ1, et induisent des changements de l'amplitude et des propriétés biophysiques du courant.

Ainsi, l'effet de ces sous-unités KCNE va de la simple accélération des cinétiques d'activation et de désactivation, dans le cas de KCNE3 (Mazhari et coll., 2002 ; Jespersen et coll., 2004), à la genèse d'un courant constitutivement ouvert lors de la co-expression de

KCNQ1 et KCNE2 (Jespersen et coll., 2004), suggérant un rôle des canaux KCNE2-KCNQ1 dans l'établissement du potentiel de repos membranaire des cellules. Quant aux sous-unités KCNE4 et KCNE5, elles ne génèrent un courant qu'au-delà d'un potentiel membranaire de l'ordre de +40 et +50 mV (Grunnet et coll., 2002 et 2005 ; Bendahhou et coll., 2005). Ces canaux ne sont donc pas activables par des potentiels membranaires physiologiques. Malgré tout, les ARNm de KCNE4 et de KCNE5 sont détectés à des niveaux significatifs dans de nombreux tissus exprimant KCNQ1, dont le cœur, ce qui suggère un rôle de ces deux sous-unités KCNE dans la modulation du niveau du courant KCNQ1 (Piccini et coll., 1999 ; Grunnet et coll., 2002 ; Bendahhou et coll., 2005).

Les sous-unités KCNE énumérées ci-dessus régulent donc toutes différemment le canal KCNQ1. Certaines sont capables de maintenir le canal à l'état ouvert (KCNE3), et d'autres de provoquer l'inhibition du courant (KCNE4). Ne connaissant pas encore les bases structurales des modifications des propriétés biophysiques provoquées par ces sous-unités KCNE, il est difficile aujourd'hui d'expliquer cette différence de modulation.

5. Fonction du canal KCNQ1

5.1. Le mécanisme d'activation des canaux Kv

La compréhension du mécanisme d'activation nécessite d'une part de déterminer la localisation de la porte d'activation, et d'autre part d'élucider le mécanisme qui permet le couplage entre le *voltage-sensor* et cette porte d'activation.

Basé sur les propriétés de blocage des canaux Kv par les molécules organiques, Armstrong proposa, dès 1966, l'idée que la porte d'activation puisse être localisée au niveau de l'entrée intracellulaire du pore. En effet, le TEA qui se fixe au niveau du filtre de sélectivité en diffusant à travers le pore, agit uniquement lorsque le canal est à l'état ouvert (Armstrong, 1966 ; Armstrong, 1971). Cette localisation de la porte d'activation fut confirmée par le fait que l'action du réactif méthaneethiosulfonate (MTS) sur certaines cystéines introduites dans le segment S6 longeant le pore, est dépendant de l'état conformationnel du canal. Les cystéines introduites par mutagenèse sont utilisées comme cibles des modifications chimiques induites par la fixation du MTS appliqué sur la face intracellulaire. Or, lorsque le canal est à l'état fermé, seules les cystéines localisées à proximité de l'entrée intracellulaire du pore sont sensibles à l'ajout du réactif, suggérant une localisation de la porte d'activation du côté intracellulaire (Liu et coll., 1997 ; del Camino et Yellen, 2001).

En ce qui concerne le canal KCNQ1, la majorité des mutations responsables de modifications de la dépendance au potentiel du canal KCNQ1 est localisée au niveau du segment S4, dans la boucle S4-S5 ou dans l'extrémité C-terminale du segment S6. Egalement soulignée par les structures cristallographiques des canaux KvAP (Jiang et coll., 2003) et

Kv1.2 (Long et coll., 2005), l'importance de ces différentes parties du canal dans le mécanisme de dépendance au potentiel suggère un rôle de ces trois partenaires dans le couplage entre le *voltage-sensor* et l'activation du canal.

Un modèle structural du canal KCNQ1 révèle qu'il fonctionne de manière similaire au canal KcsA (Smith et coll., 2007). Les différences de conformation entre les états ouvert et fermé du canal KCNQ1 sont définies par la position et la conformation de la partie proximale cytoplasmique du segment S6. A partir de la structure cristallographique du canal Kv1.2 ouvert et de la modélisation de son état fermé par Yarov-Yarovoy et ses collaborateurs (Yarov-Yarovoy et coll., 2006), les auteurs ont pu décrire le mécanisme de transition entre les deux états du canal KCNQ1. Puisqu'il n'existe aucune structure expérimentale de l'état fermé d'un canal K⁺ de mammifères, l'état fermé du tétramère KCNQ1 est modélisé sur la base du canal bactérien KcsA (Doyle et coll., 1998). A l'état fermé le point de jonction entre les quatre segments S6 se produit à proximité de l'interface membrane-cytoplasme et contracte l'entrée intracellulaire du pore de telle manière que les ions K⁺ sont incapables de pénétrer dans le vestibule interne du canal. Les segments S6 se caractérisent par un repliement au niveau de la proline 343 (Pro343) qui disparaît lors du mouvement du *voltage-sensor* médié par l'éloignement de l'hélice S4-S5 de la partie proximale cytoplasmique du segment S6 de la même sous-unité. L'ouverture du canal se produit lors des changements d'orientation et de conformation du *voltage-sensor* éloignant ainsi la boucle S4-S5 du pore pour relâcher la tension sur le segment S6. En conséquence, le segment S6 peut à nouveau se replier au niveau de la Pro343 de telle manière que son extrémité C-terminale se réoriente et s'éloigne de l'axe central du canal, ouvrant *in fine* l'entrée intracellulaire du pore.

Les auteurs suggèrent que le mécanisme d'activation de KCNQ1 est donc similaire au canal bactérien KcsA (Doyle et coll., 1998). Le motif PXP (PAG pour KCNQ1) des canaux Kv qui forme un coude présent à l'état ouvert et à l'état fermé, ne semble donc pas participer à l'activation de KCNQ1. Ainsi, de manière inattendue, KCNQ1 ne fonctionnerait pas comme un canal Kv du type de shaker (Long et coll., 2005). On peut donc se demander si cette ressemblance avec le mécanisme d'activation du canal KcsA ne traduit pas tout simplement un biais dû à la modélisation de l'état fermé de KCNQ1 à partir du modèle de KcsA et non pas d'un canal Kv.

5.2. Le mécanisme d'inactivation des canaux KCNQ1

Le mécanisme moléculaire de l'inactivation du canal KCNQ1 est inexplicé, mais il est d'ores et déjà connu que contrairement à l'inactivation de type C, l'inactivation de KCNQ1 est indépendante des concentrations extracellulaires en K⁺. Et comme souligné plus tôt, les canaux KCNQ1-KCNE1 ne s'inactivent pas. Cependant, comme a pu l'observer Pusch

et ses collaborateurs, il est possible que I_{Ks} s'inactive, mais de manière beaucoup plus lente que le courant généré par l'unique sous-unité *KCNQ1* (Pusch et coll., 1998).

III. Les arythmies cardiaques associées à I_{Ks}

1. Le syndrome LQT1

Etant donné le rôle prépondérant des canaux K^+ dans la repolarisation cardiaque, toute réduction du courant potassique global prolonge la durée du potentiel d'action. Ainsi, une réduction des courants I_{Kr} ou I_{Ks} , conduit à l'allongement de la durée du potentiel d'action ventriculaire, ce qui se caractérise à l'électrocardiogramme de surface par un allongement de l'intervalle QT, puisque cet intervalle est le reflet, au niveau du cœur entier, de la repolarisation des cellules du myocarde ventriculaire (figure 28).

De tous les désordres génétiques cardiaques connus et dus aux canaux ioniques, le syndrome du QT long (LQTS) semble le plus commun (Lupoglazoff, 1998). Il est typiquement associé, lors d'exercices physiques ou de stress émotionnels, à des syncopes ou à des tachycardies ventriculaires polymorphiques (Torsades de Pointe) pouvant dégénérer en fibrillation ventriculaire entraînant la mort subite. Ce syndrome du QT long peut être divisé en deux principaux types : familial et acquis. La forme acquise, qui inclue des maladies cardiaques telles que la cardiomyopathie, l'ischémie cardiaque et la bradycardie, étant la plus commune.

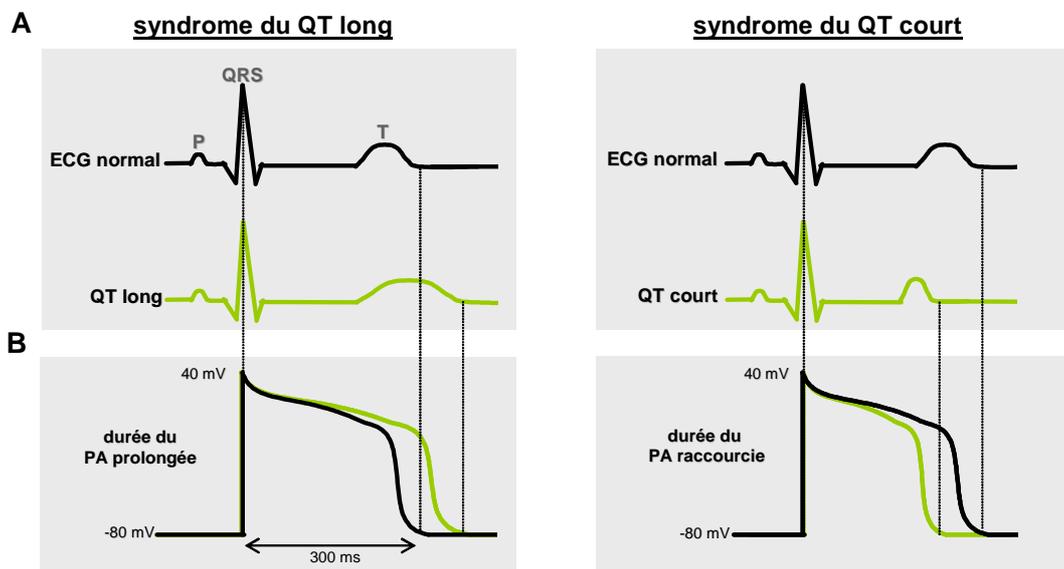


Figure 28 : Syndrome du QT long et syndrome du QT court.

(A) Représentation schématique des ECG. Le tracé vert représente les intervalles QT prolongés et raccourcis comme observé dans les syndromes du QT long ou du QT court. (B) Représentation schématique du potentiel d'action ventriculaire. Le tracé vert illustre la prolongation ou le raccourcissement de la repolarisation, selon qu'il s'agit du syndrome du QT long ou du QT court.

La cause majoritaire de cette forme acquise est le traitement par des antibiotiques, des antihistaminiques et des antiarythmiques, dont on sait désormais qu'ils sont responsables du blocage du canal HERG. Cette caractéristique serait due en partie à la structure du pore du canal HERG, différente de celle des autres canaux K⁺ dépendant du potentiel. En lieu et place de la séquence Pro-X-Pro, le pore du canal HERG exprime la séquence Ile-Phe-Gly, d'où un possible changement conformationnel à l'origine de cette sensibilité pharmacologique (Fernandez et coll., 2004).

De la même manière que la forme acquise, la forme familiale trouve son origine dans les canaux ioniques, puisqu'elle est causée par de nombreuses mutations des gènes codant pour les canaux Na⁺ ou K⁺ (Dumaine et Antzelevitch, 2002). Une forme autosomique dominante (le syndrome de Romano-Ward, RWS), identifiée au début des années 1960 par Ward (Ward, 1964) puis Romano (Romano, 1965), de loin la plus fréquente, et une forme autosomique récessive (le syndrome de Jervell-Lange-Nielsen, JLNS) associée à une surdité (Jervell et Lange-Nielsen, 1957), sont les deux formes cliniques différentes observées.

LQTS	gène	canal ionique
Syndrome de Romano-Ward		
LQT1	<i>KCNQ1</i>	↓ I _{Ks}
LQT2	<i>HERG</i>	↓ I _{Kr}
LQT3	<i>SCN5A</i>	↑ I _{Na}
LQT4	<i>ANK2</i>	défaut d'ancrage
LQT5	<i>KCNE1</i>	↓ I _{Ks}
LQT6	<i>KCNE2</i>	↓ I _{Kr}
LQT7	<i>KCNJ2</i>	↓ I _{K1}
LQT8	<i>CACNA1C</i>	↓ I _{Ca,L}
Syndrome de Jervell-Lange-Nielsen		
JLN1	<i>KCNQ1</i> (homozygote)	↓↓ I _{Ks}
JLN2	<i>KCNE1</i> (homozygote)	↓↓ I _{Ks}

Tableau 1 : Différents types du syndrome du QT long congénital.

Le syndrome du QT long congénital, ou familial, est classé en type selon l'origine du gène défectueux. Une mutation dans le gène *KCNQ1*, cause le syndrome du QT long de type 1 (LQT1), pendant que des mutations dans le gène *HERG* sont à l'origine du syndrome LQT2 (tableau 1). Dans le cadre d'une estimation en 2001, le type LQT1 fut décrit comme étant le plus fréquent désordre congénital, puisque le gène *KCNQ1* est responsable de plus de 50% des cas de LQTS, contre 35% pour le canal *HERG* et 10% pour le gène *SCN5A* (Priori et coll.,

2001). Le gène *ANK2*, responsable du LQT4, ne code pas pour un canal ionique mais pour une protéine membranaire d'ancrage, l'ankyrine B (Mohler et coll., 2003). Des mutations dans l'ankyrine B semblent entraîner une perte de fonction à l'origine d'un défaut d'expression ou de localisation de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, de la pompe Na^+/K^+ ATPase, et du récepteur à l'IP3 (inositol-1,4,5-triphosphate), d'où un dysfonctionnement du cycle du calcium. Ces observations permettent de souligner le fait que les canaux ioniques ne fonctionnent pas de manière isolée, mais bien au sein d'un complexe macromoléculaire constitué du canal lui-même, des sous-unités régulatrices, du cytosquelette et des molécules de signalisation associées, comme peut l'être le PIP_2 pour le canal *KCNQ1* (Loussouarn et coll., 2003).

2. Le syndrome du QT court

Le syndrome du QT court est une entité clinique décrite récemment, caractérisée par un intervalle QT raccourci et un haut risque de mort subite (Gussak et coll., 2000). Au contraire du syndrome du QT long, la repolarisation cardiaque est ainsi accélérée par l'augmentation d'un courant sortant (figure 28). Deux mutations du gène *KCNQ1* (V141M et V307L), à l'origine d'un gain de fonction des courants respectifs, ont été identifiées chez des patients porteurs d'un QT court. En ce qui concerne la mutation V307L, localisée au niveau du pore, le gain de fonction est dû soit à une suppression de l'inactivation soit à une accélération des cinétiques d'activation et à un décalage de la $V_{0,5}$ vers des potentiels plus négatifs, selon que le canal *KCNQ1* est exprimé seul ou en présence de *KCNE1* (Bellocq et coll., 2004). En revanche, dans le cas de la mutation V141M, une perte de la dépendance au potentiel du canal est responsable de ce gain de fonction (Hong et coll., 2005).

3. La fibrillation auriculaire

Des défauts électrophysiologiques peuvent également être à l'origine d'arythmies cardiaque telles que la fibrillation auriculaire. De la même manière que la mutation V141M citée précédemment (Hong et coll., 2005), la mutation S140G, localisée dans le segment transmembranaire S1 du gène *KCNQ1*, génère un canal indépendant du potentiel puisque constitutivement ouvert (Chen et coll., 2003). A l'image du canal sauvage, la densité du courant est fortement augmentée en présence de la sous-unité *KCNE1*, mais le canal reste indépendant du potentiel. Etant donné ce gain de fonction et l'importance du courant I_{K_S} dans la repolarisation des oreillettes humaines, il est raisonnable de penser que ce canal muté est

responsable du raccourcissement du potentiel d'action auriculaire et de la fibrillation auriculaire associée.

De l'étude électrophysiologique des nombreuses mutations décrites dans *KCNQ1*, il en ressort que près de la moitié modifie la dépendance au potentiel du canal *KCNQ1*. Ces mutations qui modifient uniquement les propriétés biophysiques du canal, induisent très fréquemment un décalage de la courbe d'activation vers des potentiels plus positifs, et modifient les cinétiques d'activation et/ou de désactivation. Pour certaines de ces mutations, un mécanisme moléculaire explique ce décalage de la $V_{0,5}$. Malgré tout, la corrélation entre les effets de la mutation sur les propriétés biophysiques du canal et la sévérité du phénotype n'est pas claire. Deux mutations, R243H et R539W, impliquées respectivement dans les syndromes du QT long de type Jervell-Lange-Nielsen et Romano-Ward, illustrent parfaitement cette difficulté. La mutation R243H, à l'origine d'un très important décalage de la $V_{0,5}$ vers des potentiels plus positifs (environ 66 mV), est asymptomatique et n'induit pas de prolongation majeure de l'intervalle QT. A l'opposé, la mutation R539W associée à de plus faibles modifications des propriétés biophysiques du canal *KCNQ1-KCNE1*, est corrélée à des cas de mort subite (Chouabe et coll., 2000).

IV. Régulation du canal *KCNQ1*

Etant donné le rôle primordial de I_{Ks} dans la forme du potentiel d'action, autant que dans la régulation du rythme cardiaque, les canaux *KCNQ1-KCNE1* sont hautement régulés par de multiples régulateurs qui modulent les propriétés cinétiques du complexe canalaire. L'analyse génétique de maladies humaines, des expériences de mutagenèse dirigée et des études électrophysiologiques par la technique de patch-clamp, ont permis de préciser la régulation de ce canal par le système nerveux sympathique, par l'osmolarité et par les phospholipides cellulaires. Les régulations de *KCNQ1* par l'osmolarité et par les phospholipides, qui sont nos sujets d'intérêts, seront développées dans les paragraphes B et C.

1. Régulation du courant I_{Ks} par le système nerveux autonome

L'apparition des tachycardies ventriculaires polymorphes, ou Torsades de Pointe, chez des patients avec un syndrome du QT long, est souvent causée par un stress adrénérgique, soulignant l'importance physiologique de la régulation β -adrénérgique des canaux ioniques responsables de la repolarisation des cardiomyocytes ventriculaires. Depuis de nombreuses années, il est établi que la régulation des potentiels d'action cardiaques par le système

nerveux sympathique se fait via l'activation des récepteurs β -adrénergiques, laquelle augmente l'amplitude du courant I_{Ks} , ralentie ses cinétiques de désactivation et décale sa courbe d'activation vers des potentiels membranaires moins positifs (Terrenoire et coll., 2005).

Cette stimulation β -adrénergique du courant KCNQ1-KCNE1 requiert une augmentation du niveau d'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) à l'origine de la stimulation de la protéine kinase de type A (PKA), laquelle interagit avec le complexe canalaire KCNQ1-KCNE1 grâce à une protéine d'ancrage de la PKA (AKAP, *A-kinase anchoring protein*) (Potet et coll., 2001). Cette régulation des canaux KCNQ1 par l'AMPc nécessite la présence de la sous-unité KCNE1, puisque des formes mutantes des deux sous-unités KCNQ1 et KCNE1 identifiées chez des patients porteurs du syndrome du QT long, ont été décrites comme insensibles à cette régulation adrénérergique par l'AMPc (Marx et coll., 2002 ; Kurokawa et coll., 2004).

Un défaut de la fixation de la PKA et de la PP1 au canal KCNQ1-KCNE1 médiée par la protéine Yotiao, est à l'origine d'un syndrome du QT long original pour lequel l'élément déclencheur est la régulation autonome et non pas un défaut de fonctionnement intrinsèque du canal. En effet, seule, la mutation G589D responsable de ce défaut d'interaction, n'induit pas le syndrome du QT long. Mais couplée à la stimulation β -adrénergique, la forme mutante KCNQ1-G589D est suffisante pour prolonger l'intervalle QT et créer ainsi un substrat pour des arythmies (Saucerman et coll., 2004). Ces conclusions reflètent les observations cliniques chez les patients porteurs de la mutation KCNQ1-G589D particulièrement vulnérables aux arythmies déclenchées lors d'exercices physiques (Piippo et coll., 2001 ; Fodstad et coll., 2004).

Le courant I_{Ks} est également régulé par les récepteurs α -adrénergiques par la voie de la protéine kinase de type C (PKC), comme a permis de le démontrer l'étude ayant révélée l'existence de canaux KCNQ1 endogènes dans les ovocytes de Xénope (Busch et coll., 1992). Mais dans ce modèle de ré-expression, I_{Ks} est réduit par l'activation de la PKC, au contraire de la stimulation du courant dans les cardiomyocytes ventriculaires de cobaye (Suzuki et coll., 2003). D'autres études illustrent cette idée que la régulation de KCNQ1 est dépendante de l'espèce, puisque l'activité du canal KCNQ1 humain exprimé dans les ovocytes de xénope est stimulée par la PKC (Kathöfer et coll., 2003). Cette même étude révèle également un rôle de la PKC dans la voie de transduction entre le récepteur β_3 -adrénergique et le canal KCNQ1-KCNE1. Des expériences de mutagenèse dirigées ont permis de révéler quatre sites potentiels de phosphorylation par la PKC sur l'extrémité C-terminale de la protéine KCNQ1 (S409A, S464A, T513A et S577A). La mutation N102S identifiée au sein de KCNE1, est également critique pour la régulation de I_{Ks} par la PKC, ce qui suggère que de la même manière que la PKA, la PKC régule à la fois KCNQ1 et KCNE1 (Varnum et coll., 1993).

B. Régulation de I_{Ks} par le PI(4,5)P₂

I. Le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate PI(4,5)P₂

1. Synthèse et dégradation du PIP₂

L'échange d'information au travers de la membrane plasmique nécessite des transporteurs, des canaux ioniques mais également des composés membranaires. Parmi les constituants membranaires, se trouve la classe des phospholipides qui dérivent du phosphoinositide (PI) et sont phosphorylés à une ou plusieurs positions sur le groupe inositol (figure 24). Huit phosphoinositides communs sont répertoriés, qui diffèrent uniquement selon les phosphorylations progressives des inositols aux positions hydroxyles 3, 4 ou 5. Toutes les formes peuvent s'interconvertir entre elles grâce à des lipides kinases ou des lipides phosphatases qui ajoutent ou suppriment les phosphates spécifiques (figure 29B). Certaines formes sont hydrolysées par des phospholipases.

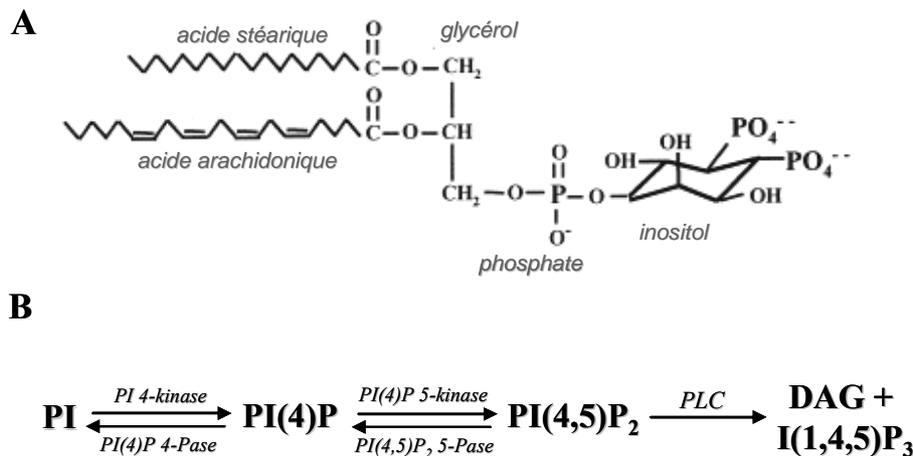


Figure 29 : Structure des phosphoinositides et métabolisme du PI(4,5)P₂.

(A) Le groupe inositol peut être phosphorylé par des kinases en positions hydroxyles 3,4 et 5, donnant naissance au phosphatidylinositol-mono, -bis ou -trisphosphate. Ici est représenté le PI(4,5)P₂. (B) Voie de synthèse et de métabolisme du PI(4,5)P₂ dans les cellules mammifères. Le PI(4,5)P₂ est synthétisé à partir du PI via les phosphorylations successives par la PI 4-kinase et la PI(4)P5-kinase. Le PI(4,5)P₂ est soit métabolisé en PI grâce aux déphosphorylations par la PI(4,5)P₂ 5-phosphatase et la PI(4)P 4-phosphatase, soit hydrolysé en I(1,4,5)P₃ et DAG par la PLC.

Le phosphatidylinositol-bisphosphate (PIP₂) est une molécule de signalisation majeure et un régulateur de nombreux canaux ioniques et transporteurs membranaires (Shyng et coll., 2000 ; Hilgemann et coll., 2001). Le PI(4,5)P₂, composé de trois charges négatives (figure

29A), est l'isomère du PIP₂ le plus commun bien qu'il ne représente que seulement 1 à 3% des lipides membranaires totaux (McLaughlin et coll., 2002). Etant donné la rareté relative des autres isomères, le PI(4,5)P₂ est communément nommé PIP₂ en négligeant les autres isomères. Au début des années 1980, le PIP₂ fut décrit en tant que précurseur des seconds messagers, l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃) qui stimule la libération de Ca²⁺ par le réticulum sarcoplasmique, et le diacylglycérol (DAG) responsable de l'activation de la protéine kinase de type C (PKC). Ceux-ci sont générés grâce à l'hydrolyse du PIP₂ par la phospholipase de type C (PLC) activée par des récepteurs qui lui sont couplées (figure 29B).

2. Les fonctions du PI(4,5)P₂

Les fonctions démontrées du PIP₂ dans les cellules de mammifères sont en constante augmentation. A l'heure actuelle, le PIP₂ est connu en tant que : (1) précurseur des second messagers IP₃ et DAG (Berridge, 1984), (2) « lipide d'ancrage » qui lie le cytosquelette à la membrane plasmique et modèle les processus que requiert la réorganisation membranaire que sont l'endocytose et l'exocytose (Itoh et coll., 2001), et (3) stabilisateur ou activateur de nombreuses protéines membranaires, telles que les canaux ioniques et les transporteurs (Suh et Hille, 2005). Dans ce dernier rôle, le PIP₂ est largement perçu comme une molécule de signalisation intracellulaire. En fait, il ne fut réalisé que récemment que le PIP₂ membranaire pouvait être une molécule de signalisation à proprement dite. Sa relative faible abondance permet une réduction significative lorsque la PLC est activée.

Etant donné les très nombreuses protéines qui possèdent des domaines de fixation spécifiques aux phosphoinositides particuliers, des changements de la population relative de ces lipides affectent profondément les activités cellulaires. La nature de la signalisation médiée par le PIP₂ est ainsi déterminée par de multiples facteurs, tels que la variation de la concentration du PIP₂ via l'action d'un récepteur, la mobilité membranaire du PIP₂, la proximité spatiale entre un récepteur et la molécule cible interagissant avec le PIP₂ ou encore l'affinité de cette molécule cible pour le PIP₂.

2.1. Le PIP₂ régule l'activité de protéines membranaires

Il existe deux classes de protéines que reconnaissent spécifiquement les phosphoinositides. La première classe regroupe les protéines cytoplasmiques que sont les enzymes, les protéines du cytosquelette, les protéines des vésicules de trafic intracellulaire et les facteurs de transcription (Lemmon, 2003). La seconde classe des protéines ciblées par le PIP₂ comprend les protéines membranaires intrinsèques, c'est-à-dire les transporteurs et les

canaux ioniques. Bien avant la démonstration de la régulation du canal KCNQ1 par le PIP₂, les exemples pionniers furent l'échangeur Na⁺/Ca²⁺ (NCX1) et le canal potassique sensible à l'ATP (adénosine triphosphate), K_{ATP} généré par le complexe canalaire Kir6.2/SUR2 (Hilgemann et Ball, 1996). Au même titre que KCNQ1, les quatre autres sous-unités KCNQ ont toutes été caractérisées comme étant inhibées par une déplétion du PIP₂ (Suh et Hille, 2002 ; Zhang et coll., 2003 ; Loussouarn et coll., 2003 ; Li et coll., 2005). Cependant, comme le démontre l'application directe de l'analogue soluble du PIP₂ en configuration *inside-out* de patch-clamp, leurs apparentes affinités pour le PIP₂ sont hautement divergentes. KCNQ2 et KCNQ4, les formes les plus sensibles, possèdent une affinité pour le PIP₂ cent fois plus importante que KCNQ3, la sous-unité la moins sensible (Li et coll., 2005).

La plupart des protéines qui lient le PIP₂ le font via un groupe de résidus aminés chargés positivement avec une relative hydrophobicité, mais ne possède pas de structure particulière commune. En revanche, trois domaines distincts liant ces lipides ont été découverts : les domaines ENTH, ANTH (*API180 N-terminal homology*) et PH (*plekstrin homology*) (Lemmon et Ferguson, 2000 ; Roth, 2004). Le domaine PH de la PLCδ₁ a été très largement étudié. Constitué de cent vingt acides aminés, ce domaine PH de la PLCδ₁ se lie au PIP₂ ainsi qu'à son produit, l'I(1,4,5)P₃, de manière suffisamment forte et sélective pour être utilisé en tant qu'outil de détection de ces composés (Varnai et Balla, 1998 ; Hirose et coll., 1999 ; Young et coll., 2004). Physiologiquement, le rôle de cette interaction est de cibler la PLCδ₁ à la membrane plasmique enrichie en substrats lipidiques. La compétition de l'IP₃ pour ce site de fixation permet d'agir comme un rétrocontrôle négatif sur l'activité de la PLCδ₁ lorsque la concentration en IP₃ est suffisamment importante.

2.2. Le PIP₂ régule le cytosquelette

Au-delà de son interaction avec les protéines membranaires, de nombreux travaux démontrent un rôle du PIP₂ dans la régulation du cytosquelette (Hartwig et coll., 1995 ; Tall et coll., 2000 ; Tolia et coll., 2000). Lassing et Lindberg ont apporté la première preuve de l'influence du PIP₂ sur l'organisation du cytosquelette à travers son interaction avec des protéines liées à l'actine, à savoir la profiline et la gelsoline (Lassing et Lindberg, 1985). Le PIP₂ est capable de dissocier le complexe actine-profiline régulant ainsi la concentration de monomères d'actine libres dans la cellule. De plus, au travers de son interaction avec la gelsoline, le PIP₂ peut décoiffer les filaments d'actine, permettant ainsi l'allongement des filaments préexistants (Schafer et coll., 1996). Récemment, Raucher et ses collaborateurs ont observé que le PIP₂ est également à l'origine d'un contrôle local de l'énergie d'adhésion entre la membrane plasmique et le cytosquelette sous-jacent. Lorsque la concentration locale du PIP₂ diminue, l'énergie d'adhésion diminue également conduisant à la formation

d'invagination de la membrane plasmique (Raucher et coll., 2000). L'idée d'une régulation du cytosquelette par le PIP₂ est également supportée par le fait que de nombreuses protéines d'ancrage au cytosquelette, telles que la vinculine, la taline ou l'eitrine, sont capables d'interagir avec le PIP₂ (Hirao et coll., 1996 ; Barret et coll., 2000). La fonction globale du PIP₂ est donc de favoriser la polymérisation des filaments d'actine, le constituant principal du cytosquelette.

Etant donné les très nombreuses cibles et fonctions du PIP₂, la compartimentation de son métabolisme, ou du moins de sa concentration, apparaît indispensable à la spécificité de l'interaction du PIP₂ avec sa cible présente à proximité. En effet, comment les cellules peuvent utiliser un même médiateur, le PIP₂, pour réguler d'aussi nombreux processus ? Il semble donc évident que la signalisation dépendante du PIP₂ doit être spatialement et/ou temporellement localisée. De la même manière, la notion de sensibilité au PIP₂ des différentes cibles, participe également à la spécificité de la réponse cellulaire (Li et coll., 2005).

3. La compartimentation cellulaire du PI(4,5)P₂

Le PIP₂ est principalement détecté dans la membrane plasmique (Stauffer et coll., 1998 ; Tall et coll., 2000 ; Balla et Varnai, 2002 ; Watt et coll., 2002), et sur la totalité du PIP₂ cellulaire, il semble que la majorité soit liée et ne diffuse pas librement au sein de la membrane (Wang et coll., 2001). De tels pools indépendants de PIP₂ gouvernant différentes fonctions et utilisant des chaînes de synthèse et de dégradation du PIP₂ distinctes, furent en fait suggérés dès la découverte de la signalisation via les phosphoinositides (Berridge, 1984). Mais l'exact mécanisme à l'origine de cet enrichissement en PIP₂ de zones spécialisées n'est pas encore élucidé. Différentes hypothèses sont aujourd'hui avancées pour tenter d'expliquer la formation de ces microdomaines riches en PIP₂: (1) une agrégation spontanée des molécules grâce à des ponts hydrogènes entre les molécules de PIP₂ (Redfern et Gericke, 2005), (2) une participation du PIP₂ aux structures membranaires appelées « rafts lipidiques », des domaines membranaires riches en cholestérol (Pike et Casey, 1996 ; Pike et Miller, 1998), (3) une production localisée des phosphoinositides (Janmey et Lindberg, 2004), (4) une séquestration spatiale du PIP₂ du fait de l'existence de structures membranaires incurvées et locales (Janmey et Lindberg, 2004) et (5) une interaction électrostatique du PIP₂ avec les régions aromatiques ou basiques de certaines protéines telles que les MARCKS (*myristoylated alanine-rich C-kinase substrate*) liées, à l'état basal, à la membrane plasmique (Gambhir et coll., 2004 ; McLaughlin et Murray, 2005).

Tous ces mécanismes avancés pour expliquer une répartition localisée des phosphoinositides, reposent sur la notion de faible mobilité latérale du PIP₂ au sein de la membrane plasmique qui permet de restreindre ses mouvements. Cette faible mobilité du PIP₂

fut récemment vérifiée en utilisant du PIP₂ fluorescent appliqué par une pipette de patch dans des cardiomyocytes auriculaires de souris (Cho et coll., 2005). Et cette étude suggère que le cytosquelette est responsable de cette faible mobilité du PIP₂, puisque le confinement du PIP₂ est détruit après traitement à la cytochalasine D, un bloqueur de la polymérisation des filaments d'actine. Ce même cytosquelette serait également à l'origine d'une production localisée du PIP₂, étant donné l'observation d'une concentration des enzymes impliquées dans la synthèse du PIP₂ au niveau des sites de polymérisation de l'actine (Rozelle et coll., 2000 ; Coppolino et coll., 2002 ; Ling et coll., 2002).

Quelles qu'en soient les raisons, il semble que le PIP₂ soit compartimenté au sein de la membrane plasmique, ce qui permet d'envisager des voies de signalisation également localisées.

4. La sensibilité des canaux ioniques au PIP₂

La régulation de la famille des canaux Kir par le PIP₂ a particulièrement bien été étudiée. Il en ressort que la différence de sensibilité au PIP₂ des différentes sous-unités membranaires est à l'origine des grandes différences de probabilité d'ouverture de ces différents canaux (Rohacs et coll., 2003). En effet, le PIP₂ présente des affinités différentes pour chaque protéine canalaire, et donc un canal avec une grande affinité pour le PIP₂ se caractérise par une haute probabilité d'ouverture et est relativement insensible à la diminution du PIP₂, puisque la concentration en PIP₂ membranaire ne chutera pas en dessous du seuil nécessaire. En revanche, les canaux avec une faible affinité pour le PIP₂ se caractérisent par une faible probabilité d'ouverture et une très forte sensibilité à la moindre déplétion en PIP₂, comme cela peut se produire lors de l'activation de la phospholipase C. L'activité du canal sensible au PIP₂ dépend donc autant de sa relative affinité au PIP₂ que de la concentration du PIP₂.

De récents travaux ont démontré que l'interaction PIP₂-canal pouvait être co-régulée par d'autres facteurs. Il a été observé que la fixation de certains modulateurs des canaux induisait une augmentation de l'affinité pour le PIP₂, conduisant à une augmentation de l'état d'ouverture du canal, comme c'est le cas des protéines G, des ions Na⁺ et de la PKA (Huang et coll., 1998 ; Zeng et coll., 2003). A l'inverse, d'autres modulateurs de canaux, tels que l'ATP ou le pH, voient leur capacité à fermer le canal réduite par la fixation du PIP₂, qui stabilise donc le canal dans un état ouvert (Baukrowitz et coll., 1998 ; Shyng et Nichols, 1998 ; Schulze et coll., 2003). En d'autres termes, le fait que le canal s'ouvre ou se ferme en réponse à des modulateurs spécifiques est dépendant des interactions entre le site de fixation de ces modulateurs et le PIP₂. De la même manière, il a été démontré que la sensibilité des canaux Kir à différents signaux, tels que la variation du pH, l'augmentation du Mg²⁺ intracellulaire et la stimulation des récepteurs muscariniques, est déterminée par la puissance

de l'interaction PIP₂-canal (Du et coll., 2004). Ainsi, les différences de régulation parmi les canaux Kir par un modulateur donné reflètent leur différence d'affinité apparente d'interaction avec le PIP₂, qui apparaît comme un effecteur commun à ces différentes voies de régulation des canaux ioniques.

Bien que les modes d'action des facteurs régulateurs soient divers, ceux-ci semblent tous converger vers des réarrangements identiques de la structure du canal au niveau de la région conductrice des ions. Il est donc raisonnable d'imaginer que le PIP₂ puisse être la molécule qui contrôle ce processus. En effet, puisque le PIP₂ active de très nombreux canaux, et interagit directement avec ces canaux, il est possible que le PIP₂ serve de modérateur commun dans la régulation des canaux par des variations de l'environnement cellulaire.

II. Régulation de I_{Ks} par le PI(4,5)P₂

1. Le PIP₂ stabilise l'état d'ouverture du canal KCNQ1-KCNE1

Au même titre que les canaux HERG et Kir6.2/SUR1 (I_{K,ATP}) (Enkvetchakul et coll., 2000 ; Bian et coll., 2001), la famille des canaux KCNQ est régulée par le PIP₂ (Suh et Hille, 2002 ; Zhang et coll., 2003). Le PIP₂ est notamment un régulateur clé de l'activité du canal KCNQ1-KCNE1 (Loussouarn et coll., 2003).

Lors de l'enregistrement de l'activité des canaux KCNQ1-KCNE1 en configuration de patch-clamp excisé, le courant I_{Ks} décroît spontanément au cours du temps (figure 30). Cette baisse progressive de l'amplitude du courant, nommée *rundown*, est due à la perte des régulateurs du canal. L'étude électrophysiologique du *rundown* associé au courant KCNQ1-KCNE1, en configuration de *patch-clamp* excisé, a permis de révéler que l'activité du canal dépend de deux facteurs intracellulaires distincts, le PIP₂ et le MgATP. En effet, le PIP₂ est nécessaire au maintien de l'activité du canal KCNQ1-KCNE1, mais pas suffisant. Seule l'application conjointe de PIP₂ et de MgATP, permet de stabiliser totalement I_{Ks}. Ces deux voies de régulation impliquent différents mécanismes, puisque seul le *rundown* dépendant du PIP₂ est associé à une accélération de la désactivation.

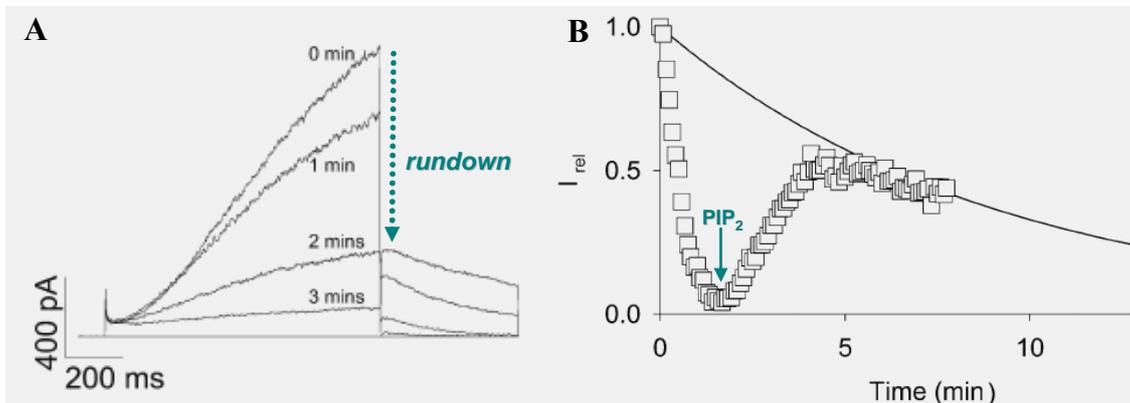


Figure 30 : Le *rundown* du courant généré par le complexe KCNQ1-KCNE1 est ralenti par le PIP₂.

(A) Représentation d'un enregistrement en configuration *inside-out* du courant KCNQ1-KCNE1 à différents temps après excision en condition contrôle. Toutes les 5 s, la membrane est dépolarisée à +40 mV, pendant 1000 ms, à partir d'un potentiel de maintien de -80 mV, puis repolarisée à -40 mV pendant 500 ms. (B) Tracé de l'amplitude d'un courant mesuré à la fin du potentiel de dépolarisation et normalisé par rapport à la valeur maximale mesurée après l'excision. Le PIP₂ appliqué à 2 min, permet de restaurer un niveau de courant qui correspond au décours du *rundown* lent indépendant du PIP₂ (Loussouarn et coll., 2003).

Ces observations ont rendu possible la modélisation de la régulation du courant I_{Ks} par le PIP₂, de manière semblable au modèle de régulation de Kir6.2/SUR1, basé sur l'hypothèse que le PIP₂ agit seulement en stabilisant l'état d'ouverture du canal (Enkvetchakul et coll., 2000). Ce modèle, qui substitue la régulation de KCNQ1-KCNE1 par le potentiel membranaire à la régulation de Kir6.2/SUR1 par l'ATP, reproduit parfaitement l'effet du PIP₂ sur I_{Ks}, à savoir une augmentation de son amplitude, un ralentissement de ses cinétiques de désactivation et un déplacement de la courbe d'activation vers des potentiels membranaires négatifs. En d'autres termes, le PIP₂ régule l'activité du canal KCNQ1-KCNE1 en stabilisant son état d'ouverture (figure 31).

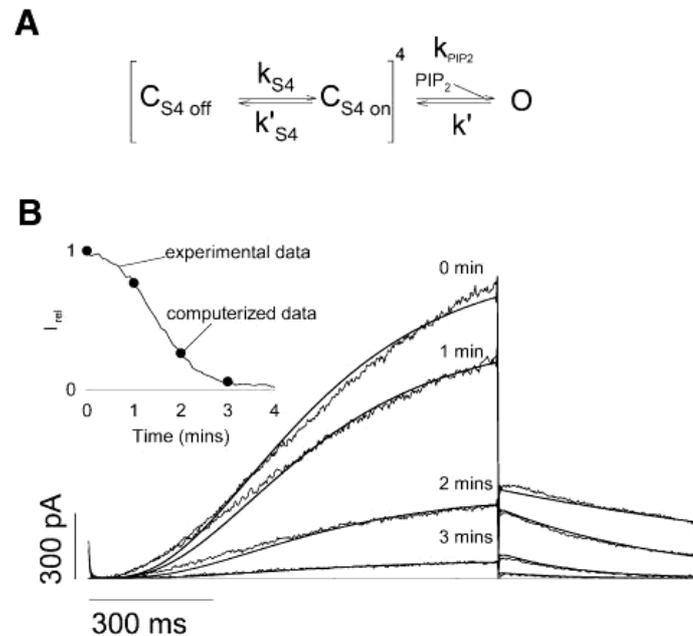


Figure 31 : Modèle basé sur la stabilisation de l'état d'ouverture par le PIP₂, qui reproduit les caractéristiques du courant KCNQ1-KCNE1. (A) Ce modèle est basé sur le fait que le PIP₂ n'affecte pas la dépendance au potentiel (k_{S4} , k'_{S4}), mais seulement une transition d'un état fermé (c) à un état ouvert (o) lorsque les quatre *voltage-sensor* sont dans une position qui le permet. k_{S4} , k'_{S4} et k' décrivent des phénomènes indépendants du PIP₂ et seul k_{PIP_2} varie lors du *rundown*. (B) Tracés des courants de la figure 30, superposés avec le courant simulé par le modèle. En haut, l'insert illustre les amplitudes des courants simulé (cercle) et enregistré (tracé) en fonction du temps après excision. (Loussouarn *et coll.*, 2003)

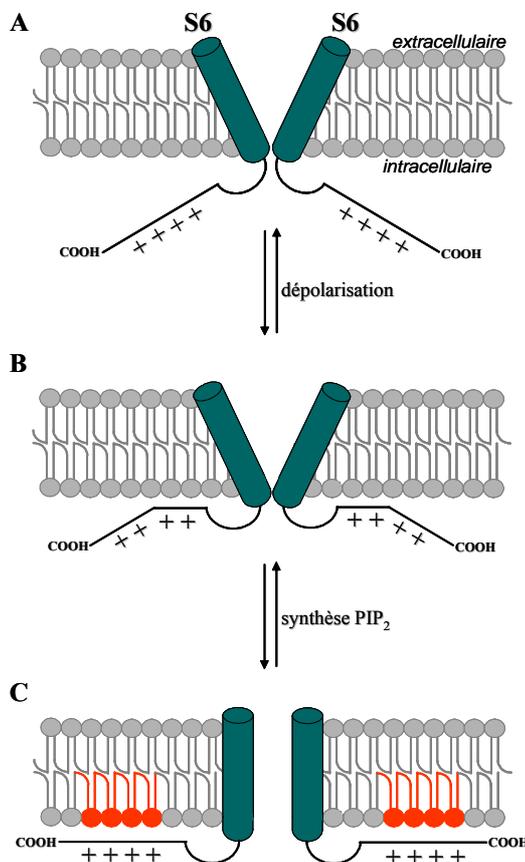
2. L'interaction entre le PIP₂ et le canal KCNQ1-KCNE1

L'interaction directe du PIP₂ avec l'extrémité C-terminale de nombreux canaux K⁺ à rectification entrante, tels que ROMK, GIRK et IRK, a déjà été démontrée (Huang *et coll.*, 1998 ; Liou *et coll.*, 1999 ; Zhang *et coll.*, 1999). Une analyse de la substitution de certains acides aminés de Kir6.2 par des alanines, qui neutralise les charges positives des acides aminés généralement localisés au sein des extrémités N- et C-terminales, modifie la sensibilité du canal au PIP₂, suggérant que les acides aminés ainsi substitués constituent des domaines potentiels de fixation du PIP₂ et stabilisent l'état d'ouverture du canal à travers cette interaction électrostatique avec le PIP₂ membranaire (Shyng *et coll.*, 2000 ; Cukras *et coll.*, 2002).

Un alignement de séquence du pore et des segments S6 et M2 des canaux KCNQ1 et Kir6.2 a révélé un cluster similaire de charges positives à proximité du segment S6, suggérant que le PIP₂ se fixe également à la protéine KCNQ1 au niveau de son extrémité C-terminale

(Lu et coll., 2001 ; Loussouarn et coll., 2003). La mutagenèse (Zhang et coll., 2003) et l'enregistrement de l'activité unitaire des canaux chimériques KCNQ3-KCNQ4 (Li et coll., 2004 ; Gamper et coll., 2005) indiquent que l'ouverture des canaux induites par la fixation du PIP₂ se produit bien au niveau de cette partie proximale de l'extrémité C-terminale.

Le mécanisme par lequel la fixation du PIP₂ permet la stabilisation de l'état d'ouverture du canal n'est pas encore résolu. Cependant, il est possible d'envisager que la transition de l'état fermé vers l'état ouvert du canal, qui correspond à l'éloignement des hélices α des segments S6, soit favorisée par cette liaison du PIP₂ au canal (figure 32). Ce scénario permet une explication à l'indispensable présence du PIP₂ au sein de la membrane plasmique à proximité du canal. En effet, l'interaction entre le PIP₂ et l'extrémité C-terminale pourrait résulter en une force qui permet d'éloigner les hélices α des segments S6 de l'entrée intracellulaire du pore, et donc provoquer l'ouverture du canal ionique. Comme l'indique le modèle cinétique de KCNQ1 (Loussouarn et coll., 2003), chez les canaux KCNQ1, comme chez les autres canaux Kv, l'ouverture du pore se produit après le mouvement du *voltage-sensor*. Le rôle du PIP₂, dont la fixation se produit après le mouvement du *voltage-sensor*, est vraisemblablement d'ancrer le segment S6 à la membrane et donc de stabiliser le canal à l'état ouvert.



Plusieurs mutations de KCNQ1 induisent une neutralisation d'un résidu chargé positivement dans un segment intracellulaire du canal, et se caractérisent dans le même temps par une réduction de l'amplitude, une accélération de la désactivation, ainsi que par un décalage de la dépendance au potentiel vers des valeurs plus positives (figure 33). Puisque le PIP₂ stabilise l'état d'ouverture du canal, l'hypothèse d'un défaut de l'interaction PIP₂-KCNQ1 est donc envisageable. En effet, trois mutants (les deux mutants Romano-Ward R539W et R555C, et le mutant Jervell et Lange-Nielsen R243H) révélés chez des patients atteints du syndrome du QT long et caractérisés par une perte d'une arginine, donc d'une charge positive susceptible d'interagir avec le PIP₂, génèrent des courants dont les cinétiques de désactivation accélérées, l'amplitude réduite et la $V_{0,5}$ significativement plus positive suggèrent un défaut de stabilisation par le PIP₂ membranaire (Chouabe et coll., 1997 ; Chouabe et coll., 2000).

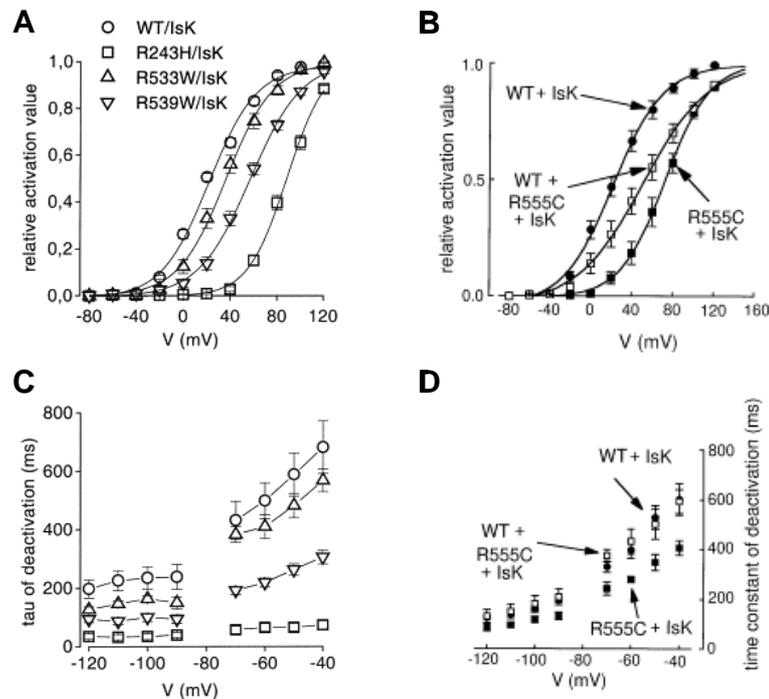


Figure 33 : Propriétés électrophysiologiques des canaux KCNQ1-KCNE1 sauvages et mutants.

(A et B) Courbes d'activation relatives des canaux KCNQ1-KCNE1 sauvages (WT) et des canaux mutants R243H, R533W, R539W et R555C, déterminées au pic du courant de queue, et modélisées par une équation de Boltzmann. (C et D) Constantes de temps de désactivation en fonction du potentiel membranaire des canaux KCNQ1-KCNE1 sauvages et mutants (Chouabe et coll., 1997 et 2000).

C. Mécano-sensibilité des canaux KCNQ1-KCNE1

I. Variations de l'osmolarité au sein de l'organisme

A quelques exceptions près, les membranes des cellules animales sont hautement perméables à l'eau (Greger, 1985). Les membranes plasmiques cellulaires ne peuvent pas tolérer des gradients de pression hydrostatiques significatifs, et le mouvement de l'eau au travers de la membrane plasmique est en grande partie dicté par le gradient de pression osmotique (Sackin, 1989).

Au sein de l'organisme, les cellules baignent dans un milieu extracellulaire caractérisé par une osmolarité quasi constante. Néanmoins, de considérables altérations de l'osmolarité extracellulaire se produisent dans de nombreuses pathologies. Toute perturbation de l'osmolarité du milieu extracellulaire ou de la volémie cellulaire compromet les équilibres osmotiques entre les différents compartiments de l'organisme. Si la concentration des substances dissoutes augmente trop, on parle d'hyperosmolarité ou d'hypertonicité. A l'inverse, si cette concentration diminue, on parle d'hyposmolarité ou d'hypotonicité. Ces perturbations vont engendrer des mouvements d'eau d'un compartiment vers un autre. Ainsi, l'exposition des cellules à des solutions hypotoniques conduit à un gonflement du volume de la cellule, et à l'inverse, les solutions hyperotoniques provoquent un rétrécissement cellulaire.

Or, le maintien d'un volume constant de la cellule est un élément critique de son bon fonctionnement. La cellule possède donc la capacité de répondre au changement de l'osmolarité de son environnement en activant des transporteurs et des canaux ioniques membranaires qui vont permettre le gain ou la perte d'osmolytes et d'eau, et conduire ainsi à une augmentation (RVI, *regulatory cell volume increase*) ou à une diminution de leur volume (RVD, *regulatory cell volume decrease*) (Lang et coll., 1998). Ainsi, le plus important est la capacité des cellules à ajuster l'osmolarité intracellulaire par la dégradation ou l'extrusion de substances organiques et surtout grâce au mouvement des ions au travers de la membrane plasmique. Le transport des ions à travers la membrane plasmique est en effet d'une grande importance pour la régulation du volume cellulaire, puisque les ions qui contribuent à l'établissement de l'osmolarité intracellulaire (principalement les ions K⁺), et extracellulaire (les ions Na⁺ et Cl⁻), sont responsables de presque deux tiers de la régulation du volume cellulaire après une modification rapide de l'osmolarité extracellulaire (Fisher et Spring, 1984 ; Verbalis and Gullans, 1991). Ainsi, lors d'un gonflement cellulaire, les cellules extrudent des ions, majoritairement des ions K⁺, ce qui va donner lieu au phénomène de RVD (figure 34). A l'inverse, lors d'un rétrécissement cellulaire, les ions sont accumulés pour permettre l'établissement du phénomène de RVI.

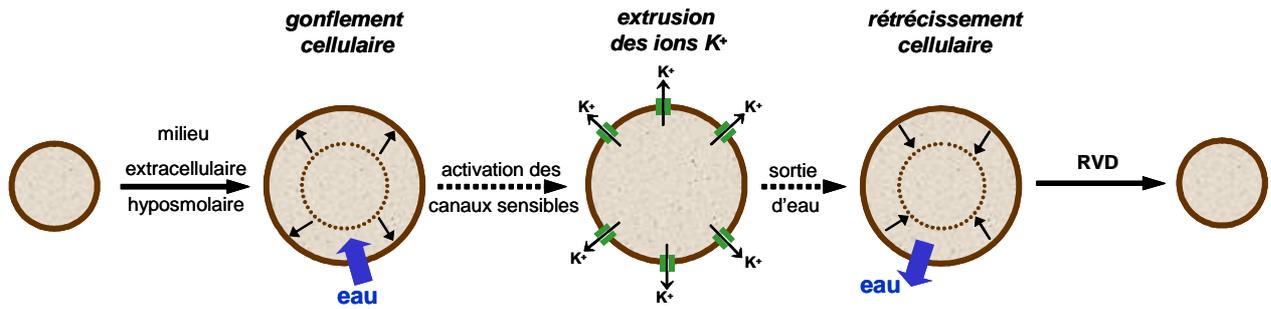


Figure 34 : Le phénomène de RVD, *regulatory cell volume decrease*.

Pour maintenir leurs fonctions métaboliques, les cellules accumulent de nombreuses substances, telles que les protéines, les acides aminés et les métabolites carbohydatés. La concentration de ces substances est plus importante à l'intérieur de la cellule qu'à l'extérieur. La concentration cellulaire excessive de ces substances organiques est compensée par une plus faible concentration ionique intracellulaire. Le transport d'ions à travers la membrane plasmique est le plus rapide et le plus efficace mécanisme de modification de l'osmolarité cellulaire. Lors d'un gonflement cellulaire, la cellule extrude des ions, de préférence des ions K^+ , au travers des canaux sensibles à l'étirement, ce qui provoque ensuite le flux osmotique d'eau à l'origine du retour au volume cellulaire initial.

1. La sensibilité des myocytes cardiaques aux variations de l'osmolarité

Le gonflement cellulaire cause l'étirement et/ou la déformation de la membrane plasmique et du cytosquelette sous-jacent autant que la dilution des contenus intracellulaires (Parker, 1993). Il n'est donc pas surprenant que la plupart des cellules de mammifère, incluant les myocytes cardiaques, répondent au gonflement en modulant l'activité de transporteurs et de canaux ioniques permettant l'efflux d'osmolites intracellulaires afin de restaurer leur volume initial (Hoffmann et Simonsen, 1989 ; Clemo et Baumgarten, 1991 ; Drewnowska et Baumgarten, 1991 ; Sarkadi et Parker, 1991). Cette implication des transporteurs et des canaux ioniques membranaires est d'autant plus importante dans le cœur que leur modulation peut altérer son excitabilité. La modification de l'excitabilité du cœur est probablement accentuée dans le contexte des ischémies cardiaques et des reperfusions lors desquelles le gonflement cellulaire est important (Jennings et coll., 1986) et la survenue d'arythmie plus fréquente (Janse et Wit, 1989). En effet, l'osmolarité des tissus cardiaques augmente lors d'une ischémie du muscle cardiaque, suite à la dégradation des phosphates énergétiques (MgATP) et de macromolécules telles que le glycogène ou les acides gras libres (Tranum-Jensen et coll., 1981). La reperfusion du myocarde ischémique avec une solution extracellulaire « isotonique » lave la solution extracellulaire hypertonique, alors que, dans le même temps, la solution intracellulaire reste hypertonique, provoquant du coup un gradient osmotique entre les compartiments extracellulaire et intracellulaire.

2. La réponse des myocytes cardiaques aux variations de l'osmolarité

Cela fait désormais plusieurs décennies que nous savons que l'osmolarité modifiée des solutions de perfusion altère les propriétés électriques des cellules cardiaques. Dès 1975, Akiyama et Fozzard ont observé que la perfusion de muscles papillaires ventriculaires avec une solution hypertonique entraîne une hyperpolarisation de 4,6 mV du potentiel membranaire de repos, et à l'inverse, une solution hypotonique cause une rapide dépolarisation de l'ordre de 5,7 à 7,6 mV selon la concentration potassique extracellulaire (Akiyama et Fozzard, 1975). Des résultats similaires ont depuis été obtenus et confirmés par d'autres groupes sur des myocytes cardiaques isolés d'embryon de poulet (Zhang et coll., 1993), de lapin (Whalley et coll., 1993) ou de cobaye (Rees et coll., 1995).

De nombreux travaux ont également rapporté que le gonflement ou le rétrécissement des cardiomyocytes altèrent la durée des potentiels d'action. Par exemple, Hermsmeyer et ses collaborateurs ont observé que le rétrécissement des cellules ventriculaires de chat ou de cobaye induit par une solution hypertonique, provoque un raccourcissement de la durée du potentiel d'action (Hermsmeyer et coll., 1972).

Ces résultats sont à priori contraires au raccourcissement du potentiel d'action et à l'hyperpolarisation membranaire attendus lors de l'activation de KCNQ1 en condition hypotonique. Mais l'étude des changements du potentiel membranaire induit par un stress osmotique dans des cellules ventriculaires de cobayes suggère que la dépolarisation membranaire observée en condition hypotonique n'est pas due à l'activation de I_{Ks} (Kocic et coll., 2001). Initialement, la durée du potentiel d'action est raccourcie du fait en partie de l'activation de I_{Ks} par la solution hypotonique. La dépolarisation membranaire ne se produit en réalité que dans un second temps. Les auteurs suggèrent que cette dépolarisation serait due à une dilution des ions K⁺ cytoplasmique et/ou à un changement du ratio de perméabilité pour les ions Na⁺ et K⁺. Etant donné ces résultats et l'importance du courant I_{Ks} dans la phase de repolarisation du potentiel d'action, il apparaît clairement que les canaux KCNQ1 ont un rôle à jouer dans les mécanismes de réponse des cardiomyocytes aux variations de l'osmolarité. D'ailleurs, l'analyse des potentiels d'action et du courant I_{Ks} dans des cellules ventriculaires isolées de cobaye, révèle qu'une solution hypotonique induit un raccourcissement de la durée du potentiel d'action secondaire à l'activation de I_{Ks} (Groh et coll., 1996).

En plus des modulations des propriétés électriques, la réponse des cardiomyocytes se situe également au niveau structural, et plus précisément au niveau du cytosquelette. Ainsi, les deux composants importants de la résistance des cellules cardiaques au gonflement, sont d'une part, le cytosquelette et, d'autre part, les transporteurs et les canaux ioniques impliqués dans le phénomène de régulation du volume cellulaire, RVD.

2.1. Rôle du cytosquelette lors du gonflement des cellules cardiaques

Le cytosquelette, qui joue un rôle important dans la structure et la forme cellulaire, est constitué de polymères biologiques de protéines: les filaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules, organisés en réseaux, faisceaux ou câbles suivant les rôles qu'ils remplissent. Le cytosquelette est un important composant de la résistance des cellules à leur changement de volume. La première preuve indirecte du rôle du cytosquelette dans la réponse de la cellule au gonflement date de l'étude de Steenbergen et de ses collaborateurs (Steenbergen et coll., 1987). Ils ont démontré que le gonflement cellulaire des cardiomyocytes lors d'une ischémie, est associé à des changements de la distribution de la vinculine, une protéine du cytosquelette connue pour être impliquée dans la liaison du sarcolemme aux myofibrilles.

Plus récemment, il a été démontré que la desmine, l'actine et la spectrine, trois éléments constitutifs du cytosquelette, jouent un rôle important dans la stabilisation du plasmalemme et l'intégrité membranaire des myocytes cardiaques de poulet en solution hypotonique (Larsen et coll., 2000). Enfin, dans des cardiomyocytes de rats néonataux, la présence de cytochalasine D, un bloqueur de la polymérisation des filaments d'actine, réduit drastiquement le phénomène de RVD déclenché par l'activation des canaux *KCNQ1*. Ces résultats suggèrent l'implication des filaments d'actine du cytosquelette dans la réponse par le canal *KCNQ1* des cellules aux variations d'osmolarité (Calloe et coll., 2007).

2.2. Rôle de I_{Ks} dans le processus de RVD, *regulatory cell volume decrease*

Une baisse brutale de l'osmolarité extracellulaire entraîne un gonflement cellulaire et l'activation immédiate d'un mécanisme pour restaurer le volume cellulaire initial, le RVD. Le mécanisme cellulaire à l'origine de ce processus de régulation du volume des cellules correspond à une extrusion des ions K^+ et Cl^- , ainsi que des acides aminés et d'autres molécules organiques (Kirk et coll., 1992 ; Jackson et Strange, 1993 ; Strange et Jackson, 1995).

Depuis l'identification dans de nombreux types de cellules cardiaques du courant Cl^- activé par le gonflement de la cellule, $I_{Cl,swell}$, il a été suggéré que ce courant pouvait participer à la régulation du volume cellulaire (Vandenberg et coll., 1996). De nombreuses études ont ensuite permis d'établir le lien entre $I_{Cl,swell}$ et la régulation du volume cellulaire des cellules cardiaques. Des cellules cardiaques d'embryon de poulet, dans lesquelles $I_{Cl,swell}$ est enregistré, sont capables de déclencher un phénomène de RVD significatif lors d'une stimulation hypotonique (Zhang et coll., 1993). Des cellules ventriculaires de rats nouveaux nés capables de réguler leur volume, voient cette capacité atténuée lors de l'inhibition de

$I_{Cl,swell}$ (Taouil et Hannaert, 1999). Dans cette dernière publication, les auteurs ont également démontré qu'en dehors du courant $I_{Cl,swell}$, trois autres transporteurs d'ions sont impliqués dans ce processus de RVD : le co-transporteur $Na^+/K^+/Cl^-$, le co-transporteur K^+/Cl^- , et les canaux K^+ .

Dernièrement, la contribution des canaux KCNQ à la réponse des cellules par le mécanisme de RVD, fut évaluée dans des cellules cardiaques de rats néonataux (Calloe et coll., 2007). Parmi les canaux KCNQ, seules les sous-unités KCNQ1 sont exprimées dans ce type cellulaire, et le blocage pharmacologique de l'activité des canaux KCNQ diminue fortement l'amplitude du RVD en réponse à un stress hyposmotique, démontrant ainsi le rôle des canaux KCNQ1 dans le processus de RVD.

Ce rôle de KCNQ1 dans le phénomène de RVD avait déjà été antérieurement observé dans les cellules épithéliales aériennes (Lock et Valverde, 2000). En conditions extracellulaires hyposmotiques, le courant généré par le canal KCNQ1 était stimulé. De la même manière, dans les ovocytes de xénope co-exprimant les aquaporines, le courant généré par le canal KCNQ1 peut être drastiquement et instantanément modulé en réponse à des changements ténus (± 2 à 8%) du volume cellulaire (Grunnet et coll., 2003). L'hyposmolarité extracellulaire, peut-être par l'étirement membranaire des ovocytes, conduit à une augmentation du courant KCNQ1, et à l'inverse, l'hyperosmolarité, responsable du rétrécissement des ovocytes, diminue l'amplitude de I_{Ks} .

Les canaux K^+ , et plus particulièrement le canal KCNQ1, participent donc clairement au phénomène de RVD. Mais se pose la question de la nature physique de la sensibilité aux variations du volume et de l'étirement membranaire. Le canal KCNQ1, en plus d'être un effecteur, est-il également un récepteur?

3. Rétrocontrôle mécano-électrique, MEF

Au-delà des variations de l'osmolarité qui caractérisent le milieu extracellulaire, les cardiomyocytes subissent également d'énormes stress mécaniques. A ce titre, les myocytes cardiaques, qui génèrent de puissants stress mécaniques pendant le cycle cardiaque, jouent également le rôle de système mécano-sensoriel. En plus de réguler les fonctions cardiaques telles que le couplage de la longueur des fibres et de la force générée, la charge volumique module la fréquence et le rythme cardiaque (Franz, 1996). Ainsi, lors d'un battement cardiaque caractérisé par une surcharge du volume sanguin, un raccourcissement de la durée du potentiel d'action cardiaque est observé. Cet effet des forces mécaniques cardiaques sur l'activité électrique du cœur est nommé rétrocontrôle mécano-électrique (MEF, *mechano-electrial feedback*) (Lab, 1996). Le raccourcissement de la durée du potentiel d'action se caractérise à l'ECG par un raccourcissement de l'intervalle QT, et par l'apparition de troubles

du rythme cardiaque (figure 35). Ce couplage entre l'augmentation de la charge volumique et le raccourcissement des potentiels d'action a pu être décrit chez l'animal, dans les oreillettes (Nazir et Lab, 1996) et les ventricules (Kiseleva et coll., 2000), ainsi que chez l'homme (Taggart et Sutton, 1999).

A l'inverse d'une surcharge du volume sanguin, une diminution de la charge volumique entraîne un allongement de la durée du potentiel d'action dans des muscles papillaires de rat (Kaufmann et coll., 1971) et chez le chien (Franz et coll., 1989). Ces résultats ont été observés dans de nombreuses conditions expérimentales, notamment chez l'homme lorsque la pression sanguine est réduite grâce à l'inhalation d'un composé nitré (Ford et Campbell, 1980).

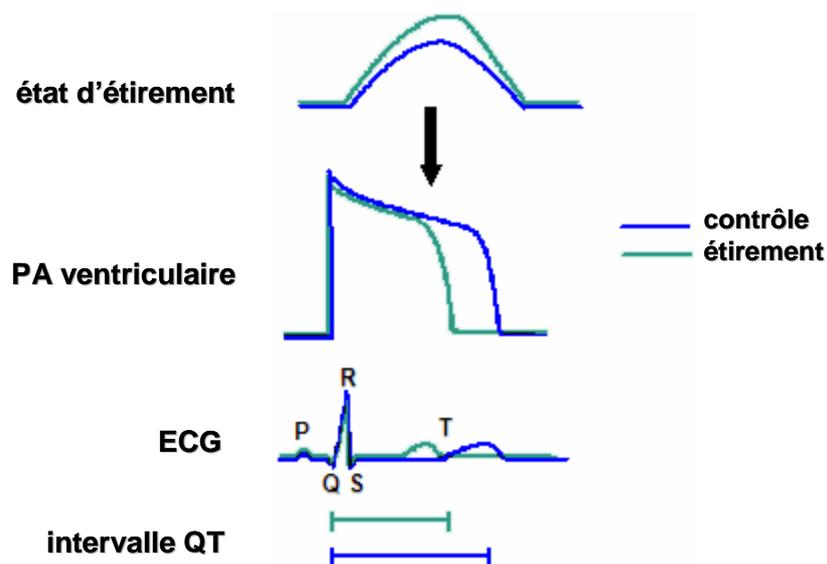


Figure 35 : Diagramme illustrant les changements électrophysiologiques produit par un stress mécanique.

Le rétrocontrôle mécano-électrique est caractérisé par des variations électrophysiologiques suite à des modifications d'ordre mécanique au niveau du myocyte cardiaque. Une augmentation de la force de contraction, de la pression, et de la longueur de la cellule (en vert) entraîne une diminution de la repolarisation du potentiel d'action cardiaque et donc un raccourcissement de l'intervalle QT sur l'ECG. (d'après Lab, 1996)

Bien que le signal de transduction cellulaire responsable du mécanisme de rétrocontrôle mécano-électrique ne soit pas complètement élucidé, les canaux mécano-sensibles activés par l'étirement (SACs, *stretch-activated channels*) semblent être les entités essentielles à la sensibilité et à la signalisation des tensions membranaires. Or, I_{Ks} est augmenté aussi bien par une pression positive appliquée dans la pipette en configuration whole-cell, et par un milieu extracellulaire hyposmolaire, ces deux conditions provoquant un gonflement cellulaire (Sasaki et coll., 1994 ; Wang et coll., 1996). Et étant donné son rôle

prépondérant dans le contrôle de la durée du potentiel d'action, il était aisément envisageable que le canal KCNQ1 participe à ce rétrocontrôle mécano-électrique. Cette hypothèse fut vérifiée en 2001 par Kocic et ses collaborateurs qui ont démontré que le raccourcissement de la durée du potentiel d'action cardiaque des cardiomyocytes ventriculaires de cobayes, secondaire à l'allongement provoqué par des conditions hyposmotiques, était dû autant à l'activation de I_{Ks} qu'à $I_{Cl,swell}$, tout deux différenciés grâce à l'utilisation de bloqueurs spécifiques (Kocic et coll., 2001). A la même époque, il a également été observé que I_{Ks} est activé lors d'une augmentation de la précharge (Lerman et coll., 2001). Bien que les auteurs suggèrent que cette activation se fasse par l'intermédiaire de la voie β -adrénergique, il est possible que la sensibilité du canal à l'étirement de la membrane des myocytes cardiaques participe également à cette modulation du courant.

Etant donné l'implication du canal KCNQ1 à la fois dans le mécanisme de rétrocontrôle mécano-électrique et dans le phénomène de RVD, se pose la question de savoir si les mécanismes de sensibilité à l'étirement et de sensibilité aux variations osmotiques sont identiques. Allant dans le sens d'un mécanisme commun, il a été démontré que l'étirement membranaire et le gonflement cellulaire provoquaient tout deux l'activation de canaux K^+ de cellules rénales d'un amphibien, et ce par un mécanisme commun, initié par la mécano-sensibilité des canaux (Sackin, 1989). L'activation de ces canaux par l'étirement membranaire et le gonflement cellulaire se traduit par les mêmes variations des paramètres biophysiques du canal, comme l'augmentation de la probabilité d'ouverture des canaux K^+ . Malgré ces résultats, en ce qui concerne le canal KCNQ1, la question d'un mécanisme commun ou non à l'étirement membranaire et à l'osmolarité est encore posée.

II. Mécano-sensibilité du canal KCNQ1

1. Réponse de KCNQ1 à l'étirement membranaire

Bien que la sensibilité de KCNQ1 à l'étirement soit établie, le mécanisme sous-jacent reste inconnu. Malgré tout, nous pouvons d'ores et déjà exclure l'implication de certains régulateurs. Il a par exemple été démontré que l'activation de I_{Ks} par l'étirement dans des cardiomyocytes isolés de cobayes est indépendante de la concentration Ca^{2+} intracellulaire (Sasaki et coll., 1994 ; Rees et coll., 1995), et n'est affectée ni par l'inhibition, ni par l'activation de la PKA ou de la PKC (Sasaki et coll., 1994 ; Missan et coll., 2006). De la même manière, le rôle de la tyrosine kinase, d'abord observé dans les cardiomyocytes de cobaye (Missan et coll., 2006), n'est pas vérifié dans un système de ré-expression hétérologue exprimant le canal KCNQ1-KCNE1 (Kubota et coll., 2002).

Le domaine N-terminal semble être un acteur majeur de cette sensibilité à l'étirement. Le traitement des ovocytes de xénope à la cytochalasine D et des expériences avec des canaux KCNQ1 tronqués au niveau de l'extrémité N-terminale, ont suggéré que les canaux KCNQ1 sont sensibles aux changements du volume cellulaire à travers l'interaction entre le cytosquelette et l'extrémité N-terminale de la protéine (Grunnet et coll., 2003). Cependant dans les cellules ventriculaires de cobayes, le même traitement à la cytochalasine D ne bloque aucunement l'activation de I_{Ks} en condition hypotonique, suggérant que le cytosquelette ne participe pas à la sensibilité de KCNQ1 à l'étirement (Wang et coll., 1996).

Au-delà de cette différence, une mutation localisée dans l'extrémité N-terminale de la protéine KCNQ1 fut récemment identifiée au sein d'une famille déclarant des cas de fibrillation auriculaire avec une haute prévalence de l'hypertension (Otway et coll., 2007). Cette mutation R14C n'altère aucunement les propriétés du courant I_{Ks} en condition isosmotique, mais présente un gain de fonction par rapport au canal sauvage en condition hypoosmotique. L'hypoosmolarité provoque une augmentation du courant I_{Ks} , un décalage de la courbe d'activation vers des potentiels moins positifs, une accélération de l'activation et un ralentissement de la désactivation. Ces effets sont accentués avec la forme mutante R14C. A l'aide de deux modèles informatiques de cardiomyocytes atriaux humains, les auteurs ont observé que la mutation R14C ne modifie pas les caractéristiques des potentiels d'action atriaux. Cependant, l'étirement cellulaire cause une plus importante réduction de la durée du potentiel d'action dans des myocytes exprimant des canaux KCNQ1 mutants R14C. Ces résultats suggèrent que cette mutation sensible à l'étirement du canal KCNQ1 est insuffisante pour causer une fibrillation auriculaire, mais que la combinaison de la mutation et de la dilatation auriculaire, associée à l'hypertension, pourrait permettre le développement de la fibrillation auriculaire.

2. Implication des phospholipides dans la régulation de l'osmolarité

Il reste donc à découvrir le régulateur principal de la sensibilité de KCNQ1 à l'étirement membranaire et aux variations de l'osmolarité. Or, dernièrement, il a été suggéré que le niveau variable de PIP₂, lors du gonflement des hépatocytes de rat, pouvait activer indirectement les canaux KCNE3-KCNQ1 via le réarrangement du cytosquelette par l'activation de la PKC (Lan et coll., 2006). Et une étude antérieure avait démontré le rôle central du PIP₂ dans la mécano-sensibilité de $I_{K,Ach}$, que ce soit dans un système de ré-expression hétérologue ou dans des myocytes auriculaires de lapin (Zhang et coll., 2004). L'action du PIP₂ étant bien entendu directe étant donné l'interaction du PIP₂ avec l'extrémité C-terminale de la protéine GIRK constitutive des canaux $I_{K,Ach}$ (Huang et coll., 1998).

Au vu de ces résultats récents, il semble donc envisageable que le PIP₂ soit impliqué dans la sensibilité des canaux KCNQ1 à l'étirement de la membrane plasmique lors de stress osmotiques.

Matériels
&
Méthodes
KCNQ1 - PIP₂

MATERIELS ET METHODES - KCNQ1-PIP₂

A. Etude du courant I_{Ks}

I. Ré-expression hétérologue dans des cellules de mammifère

1. Modèle cellulaire

L'étude du courant I_{Ks} a été réalisée par ré-expression dans des lignées cellulaires d'origine tumorale. Il s'agit des cellules COS-7 issues des fibroblastes de rein de singe (Gluzman, 1981). Ces cellules constituent des modèles d'études simples, faciles à cultiver et dont les courants K⁺ endogènes et autres canaux dépendant du potentiel sont très faiblement exprimés.

2. Méthodes de culture

2.1. Conservation des cellules et mise en culture

Les cellules sont conservées dans des tubes cryogéniques stériles placés dans l'azote liquide. Pour la congélation, les cellules sont dissociées et diluées à 2.10⁶ cellules/1,5 ml de milieu de culture contenant 13% de DMSO et 20% de sérum, et sont réparties dans des tubes cryogéniques (2,5.10⁶ cellules/tube). Les cellules sont refroidies 1h à 4°C puis pré-congelées 24h à 48h à -80°C et enfin conservées dans l'azote liquide.

Pour remettre les cellules en culture après conservation dans l'azote liquide, une décongélation rapide par immersion du tube à 37°C est réalisée. Les cellules sont ensuite centrifugées à 900 tours/minute dans 5 ml de milieu de culture afin d'éliminer le DMSO. Le culot est repris dans 10 ml de milieu de culture DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Sigma, St-Louis, MI, USA) complété par 10% de sérum de veau fœtal, 2 mM de L-glutamine, 100 UI/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. Les cellules sont enfin réparties dans deux flasques de culture (25 cm²).

2.2. Repiquage

Les cellules adhérentes sont repiquées tous les trois ou quatre jours et les cultures sont maintenues à 37°C dans un incubateur humidifié en présence de 5% de CO₂. Ce repiquage est réalisé en quatre étapes :

- Le milieu de culture est remplacé par 2 ml de tampon phosphate PBS contenant 0,1% d'EDTA pendant 2 à 3 minutes.
- Afin de les détacher de leur support, les cellules sont traitées avec 1 ml d'une solution à 0,25% de trypsine, solubilisée dans du PBS/EDTA, pendant 2 minutes à 37°C. L'action enzymatique est stoppée par addition de 4 ml de milieu de culture.
- Les cellules sont mécaniquement individualisées avec une pipette Pasteur pendant 2 minutes jusqu'à obtention d'une suspension de cellules isolées.
- La concentration en cellules de cette suspension est estimée sur lame de Malassez après coloration au bleu de trypan 0,05%. Le taux d'ensemencement standard est de 2.10^4 cellules/cm², soit 5.10^5 cellules par flasque de 25 cm². Cette quantité est atteinte par dilution avec du milieu de culture. Le taux d'ensemencement est ensuite adapté au type d'expérience et au support.

3. Transfection des cellules COS-7

3.1. Transfection

Dans le cas des expériences menées en configuration patch-perméabilisé ou cellule-entière, la transfection des cellules COS-7 est réalisée grâce au vecteur JetPEI (*Polyplus Transfection Co*, Strasbourg, France). Il s'agit d'un mélange de lipides cationiques qui compacte l'ADN en particules chargées positivement capables d'interagir avec les protéoglycanes anioniques situés à la surface de la cellule puis de pénétrer dans la cellule par endocytose. Dans un premier temps, 4 µl de JetPEI sont mélangés à 46 µl de NaCl (150 mM). Cette solution est ensuite ajoutée à 50 µl de mélange plasmidique contenant l'ADNc des canaux sauvage ou mutant et de plasmides exprimant l'eGFP (*enhanced green fluorescent protein*) (tableau 2). En configuration *giant-patch*, dans l'optique d'augmenter le niveau d'expression des gènes d'intérêt, le Fugène 6 (Roche Molecular Biochemical, Suisse) est substitué au JetPEI. Six µl de Fugène 6 sont mélangés à 100 µl de DMEM. Cette solution est ensuite ajoutée à 10 µl de mélange plasmidique (tableau 2).

Les cellules transfectées seront identifiées par détection de la fluorescence de l'eGFP (excitation à 488 nm, émission à 503 nm) au moment des enregistrements électrophysiologiques.

Puis après 30 minutes, temps nécessaire à la compaction de l'ADN, les complexes vecteur-ADN sont déposés sur les cellules préalablement ensemencées dans une boîte de Pétri de 35 mm de diamètre. Les cellules sont finalement incubées à 37°C pendant 8 heures.

plasmide	promoteur	insert	quantité pour une boîte (µg)	
			giant-patch	perméabilisé et cellule entière
pcDNA 3.1	CMV	KCNE1-KCNQ1 (sauvage et mutants)	1,6	0,8
pEGFP	CMV	Green Fluorescence Protein (GFP)	0,4	1,2

Tableau 2 : Caractéristiques et concentrations des plasmides utilisés.

3.2 Repiquage des cellules transfectées

En vue de l'étude électrophysiologique, les cellules transfectées sont ensuite repiquées. Ce repiquage est réalisé en quatre étapes :

- Le milieu de culture est éliminé, puis les cellules sont rincées avec 0,7 ml de PBS.
- Afin de les détacher du fond de la boîte de Pétri, les cellules sont traitées avec 0,3 ml d'une solution à 0,25% de trypsine, solubilisée dans du PBS/EDTA, pendant 2 minutes. L'action enzymatique est stoppée par addition de 1,7 ml de milieu de culture.
- Les cellules sont isolées mécaniquement avec une pipette Pasteur.
- La suspension cellulaire est diluée avec du milieu de culture de façon à obtenir des cellules isolées. Le facteur de dilution dépend de la confluence de départ estimée au microscope optique et du délai d'utilisation des cellules. En vue des expériences, 2 ml de suspension cellulaire sont déposés dans une boîte de Pétri de 35 mm de diamètre.

4. Vecteurs d'expression eucaryotes utilisés

Les vecteurs d'expression utilisés dans cette étude sont des plasmides circulaires contenant l'ADNc du gène d'intérêt sous le contrôle du promoteur viral CMV (CytoMégalo Virus). La nature des ADNc et la concentration des plasmides sont répertoriées dans le tableau 2. Les solutions plasmidiques utilisées ont une concentration finale de plasmide de 2 µg/ml. Lors du test de la régulation positive du canal par la PKA, la composition en ADN est de 20% de pCDNA3.1-KCNQ1-KCNE1, 40% de pCDNA3-yotiao et 40% de pEGFP.

Le plasmide pcDNA3.1 code pour un concatémère, c'est-à-dire une protéine de fusion entre le canal KCNQ1, sauvage ou muté, et sa sous-unité régulatrice KCNE1 (Wang et coll., 1998) (la sous-unité KCNE1 humaine est liée à l'extrémité N-terminale du KCNQ1 humain) (tableau 2). Les mutations R243H, R539W, R539A, R539F et R555C sont sous-clonées à partir du plasmide pCI-KCNQ1 (un don du Dr Jacques Barhanin, Institut de pharmacologie moléculaire et cellulaire, Valbonne, France) dans le concatémère humain pCDNA3.1-KCNQ1-KCNE1. pCDNA3.1-KCNQ1-KCNE1 et pCDNA3-yotiao sont des dons du Dr

Robert Kass (*Department of Pharmacology, College of Physicians & surgeons, Columbia University, New York, USA*). Le plasmide codant pour la GFP (*green fluorescent protein*) que nous utilisons pour identifier les cellules transfectées est fourni par Clontech.

II. Technique électrophysiologique de patch-clamp

1. Principe de la technique

Le patch-clamp est une technique d'électrophysiologie ayant pour but de mesurer les courants traversant la membrane d'une cellule ou un fragment de cette membrane généré par le passage d'ions au travers de leurs canaux spécifiques (Hamill et coll., 1981). Cette technique de patch-clamp consiste à isoler électriquement une portion de la membrane plasmique en appuyant sur la surface de la cellule une pipette de verre (figure 36). L'application d'une pression négative à l'intérieur de cette pipette permet d'obtenir une zone de contact, encore appelée scellement, entre le verre et la surface de la membrane, dont la résistance électrique atteint plusieurs giga-ohms. L'établissement de ce scellement permet l'isolation électrique parfaite du morceau de membrane plasmique et ainsi d'enregistrer des courants ioniques de l'ordre du picoampère à travers les canaux présents à la surface de la surface membranaire concernée.

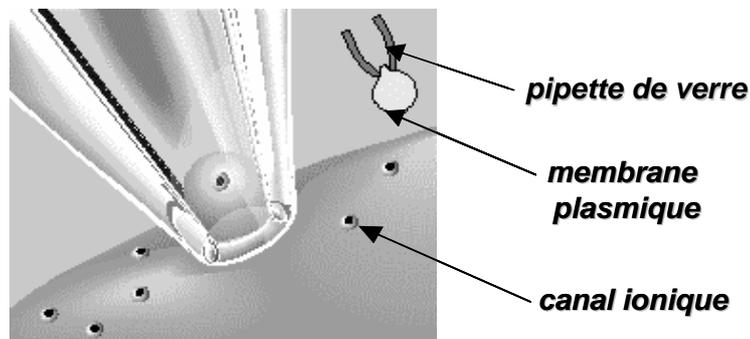


Figure 36 : Représentation schématique de la configuration d'enregistrement cellule attachée de la technique de patch-clamp.

La configuration de patch-clamp cellule entière s'obtient en partant de cette configuration attachée. La partie de membrane contenue sous la pipette est rompue en exerçant une aspiration supplémentaire, la solution de pipette entre alors en contact avec le milieu intracellulaire. Dans cette condition, la pipette enregistre le courant traversant la surface membranaire totale. Un avantage de cette configuration cellule-entière est que la large

ouverture à la pointe de la pipette induit une faible résistance électrique et permet ainsi un meilleur accès physique à l'intérieur de la cellule. En revanche, l'inconvénient est que le volume de la pipette est très supérieur à celui de la cellule, ce qui provoque une dilution progressive du milieu intracellulaire au fur et à mesure de la diffusion de la solution intrapipette.

A partir de la configuration cellule attachée, il est également possible d'obtenir les configurations de patch perméabilisé ou de *giant-patch* (figure 37) :

Le patch perméabilisé consiste à enregistrer la totalité du courant traversant la membrane de la cellule dont le milieu cytosolique est préservé. La présence d'un antibiotique tel que l'amphotéricine B dans le milieu intrapipette permet de perforer la membrane cellulaire invaginée dans la pipette. Cet antibiotique s'insère dans la membrane et forme des pores induisant une continuité électrique entre les deux milieux cytosolique et intrapipette, ce qui permet de contrôler le potentiel de membrane.

Le *giant-patch* permet d'enregistrer le courant traversant un morceau de membrane isolé de grande taille (environ 10 µm de diamètre). La face externe de la membrane est ici en contact avec le milieu intrapipette. Pour obtenir cette configuration, il est nécessaire, une fois obtenue la configuration cellule-attachée, d'exciser le morceau de membrane non en contact avec la pipette. A l'aide d'une seconde pipette d'excision, la cellule est aspirée pour ne conserver que le morceau de membrane présent sous la pipette de patch. Cette configuration permet d'isoler les canaux ioniques de leurs régulateurs intracellulaires et ainsi d'observer leur réponse à diverses solutions appliquées sur la face intracellulaire de la membrane.

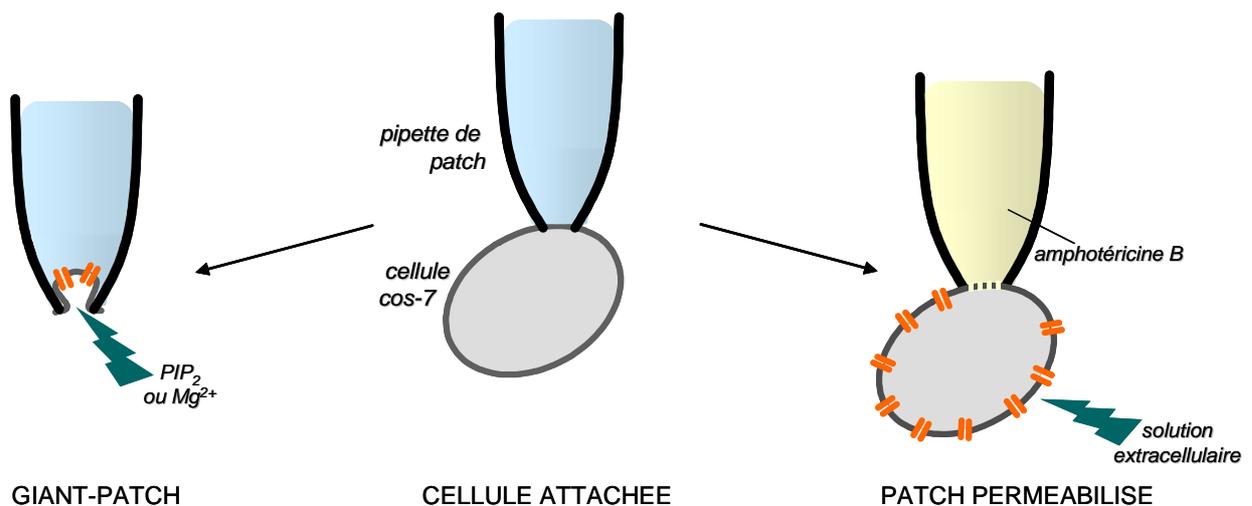


Figure 37 : Schéma représentatif du passage de la configuration cellule attachée aux configurations de *giant-patch* et de patch perméabilisé. En *giant-patch*, la face interne de la membrane, en contact avec le milieu du bain, peut être exposée à différentes solutions. Dans la configuration de patch perméabilisé, l'amphotéricine B est utilisée pour perforer la membrane de la cellule.

2. Dispositif expérimental

Une lamelle de verre contenant les cellules est placée sur la platine d'un microscope inversé qui repose sur une table anti-vibratoire. Les cellules sont perfusées en continu avec une solution dont la composition diffère selon la configuration de patch-clamp utilisée (§ 3). Un système de microperfusion multivoies, constitué de tubes en TYGON accolés les uns aux autres (diamètre interne de 0,25 mm), rattaché à un micromanipulateur tridimensionnel à commande hydraulique, permet d'irriguer localement la cellule avec le milieu extracellulaire, et de changer rapidement la solution de perfusion au cours de l'expérimentation. Lors des expériences en patch perméabilisé, la température des cellules et des perfusions est maintenue à 35°C par un chauffage thermostaté (*Polystat 22, Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France*). Les expériences de « giant-patch » sont réalisées à température ambiante (20-22°C).

Les pipettes sont réalisées à partir de capillaires en verre, soit silico-calco-sodique pour le patch perméabilisé et en cellule-entière (Kimble Kontes, New-Jersey, USA), soit en borosilicate pour le *giant-patch* (glass type 8250, Garner Glass). Le capillaire est chauffé en son milieu à l'aide d'une résistance pour l'étirer et réduire ainsi son diamètre. L'étirement à une deuxième température combiné à la traction du capillaire permettra sa scission, formant deux pipettes dont les résistances seront comprises entre 2 et 3,5 mégOhms. Pour les expériences de *giant-patch*, ces pipettes sont ensuite forgées de manière plus précise à l'aide d'une microforge (MF-83, Narishige) pour atteindre, à son extrémité, un diamètre d'environ 3 à 6 µm. Ainsi, la résistance finale d'une telle pipette se situera entre 0.8 et 1 mégOhm. Le diamètre de la pipette d'excision est, lui, de 15 µm de manière à pouvoir aspirer la cellule. Remplie avec la solution standard, la pipette d'excision est connectée à une seringue de 20 ml pour appliquer la succion nécessaire à l'excision

Chaque pipette est remplie avec une solution intrapipette (tableau 3). La pipette est fixée sur un porte-électrode relié à un micromanipulateur électrique permettant de la placer avec précision sur la cellule. Cette partie mobile est connectée à un amplificateur de patch-clamp (RK-300, Bio-logic SA, Claix, France) qui permettra d'imposer un potentiel à la cellule ou au morceau de membrane et d'enregistrer le courant généré par l'activation des canaux à ce potentiel (figure 38). L'acquisition des données et l'analyse sont réalisées à l'aide du logiciel Acquis1, version 4.0 (Bio-logic SA).

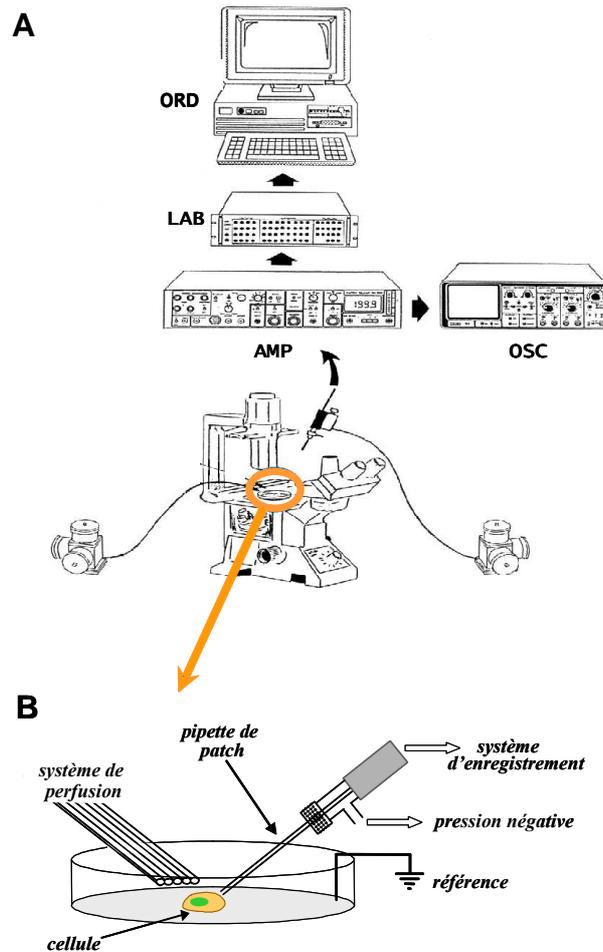


Figure 38 : Représentation schématique du dispositif expérimental utilisé pour la technique de patch-clamp. (A) Vue d'ensemble du dispositif expérimental. AMP: amplificateur, OSC: oscilloscope, LAB: interface Labmaster et ORD: ordinateur. (B) Représentation du dispositif expérimental au voisinage de la cellule.

3. Composition des solutions utilisées

Dans les expériences de patch perméabilisé et de cellule entière, les cellules sont perfusées par une solution de Tyrode dont la composition en ions s'approche au mieux du milieu extracellulaire physiologique (tableau 3). De la même façon, la composition en ions du milieu intrapipette, en contact avec le cytosol, doit s'approcher le plus possible du milieu intracellulaire. L'amphotéricine B, qui permet la perméabilisation de la membrane, est contenue dans la solution intrapipette à une concentration de 0,85 µg/ml.

Pour l'étude de la réponse du canal KCNQ1-KCNE1 à l'osmolarité, trois solutions isotonique, hypotonique (70 % de l'osmolarité de la solution contrôle isotonique) et hypertonique (130 % de l'osmolarité contrôle) sont perfusées localement par le système de

microperfusion multivoies (tableau 3). La variation de la composition de ces solutions en NaCl permet de modifier leur osmolarité. L'utilisation de mannitol à diverses concentrations permet de conserver une densité identique pour ces trois solutions.

Pour les expériences de *giant-patch*, les enregistrements sont réalisés en conditions symétriques. Le milieu intrapipette (en contact avec la face externe de la membrane) et le bain (en contact avec la face interne) sont de compositions identiques (Kgluconate 145mM, HEPES 10 mM, EGTA 1mM, pH 7,3 ajusté avec du KOH).

	Perfusion générale		Microperfusion		
	Intrapipette (mM)	Tyrode (mM)	Hypotonique (70 %) (mM)	Isotonique (mM)	Hypertonique (130 %) (mM)
HEPES	10	5	5	5	5
NaCl	-	145	85,45	145	204,54
KCl	145	4	4	4	4
MgCl₂	-	1	1	1	1
CaCl₂	-	1	1	1	1
Glucose	-	5	5	5	5
Mannitol	-	-	39,1	20	0,9
EGTA	1	-	-	-	-
pH ajusté avec	7,2 KOH	7,4 NaOH	7,4 NaOH	7,4 NaOH	7,4 NaOH

Tableau 3 : Composition des solutions ioniques utilisées en configuration de patch-clamp perméabilisée.

Les variations de concentrations en NaCl permettent de faire varier l'osmolarité des trois solutions isotonique, hypotonique (70 % de l'osmolarité de la solution isotonique) et hypertoniques (130 % de l'osmolarité de la solution isotonique). L'utilisation du mannitol à différentes concentrations permet le maintien d'une densité identique pour ces trois solutions.

Pour les expériences de phosphorylation du canal dépendante de la PKA, les cellules sont exposées à une solution contenant (en $\mu\text{mol/l}$) 400 cpt-AMPC, 10 forskoline et 0,2 acide okadaïque.

Les activités libres sont calculées en utilisant un logiciel élaboré par G.L. Smith (University of Glasgow, Scotland). Le PIP₂ (Roche Molecular Biochemical, USA) est soniqué à froid pendant 30 min avant application en *giant-patch*. Le diC8-PIP₂ (Cayman) est directement dissout dans la solution de microperfusion. Tous les autres produits sont fournis par Sigma (St Louis, USA).

4. Etirement des cellules

Dans les expériences d'étirement de la membrane des cellules, une dépression est appliquée, à l'aide d'une seringue, à l'intérieur de la pipette de giant-patch sous le contrôle d'un manomètre à eau. Différentes dépressions, de 0 à -20 cm d'H₂O (1cm H₂O = 98 Pa), ont ainsi pu être appliquées à la cellule.

5. Protocole de stimulation

Afin d'analyser les paramètres biophysiques du courant I_{Ks} lors des variations de l'osmolarité, des sauts de potentiels variables sont imposés à la cellule à l'aide d'un programme de dépolarisations successives (figure 39A). Ces paramètres sont l'amplitude du courant, le potentiel de demi-activation et la cinétique de désactivation. Un potentiel de repos est d'abord imposé à -80 mV avant un « prépulse » d'une durée de quatre secondes permettant l'activation lente de la proportion des canaux activables à ce potentiel. Ce potentiel d'activation est suivi d'un « pulse » d'une seconde induisant la désactivation du courant. Cette séquence prépulse/pulse est répétée 6 fois, à la fréquence d'une séquence toutes les sept secondes, en augmentant le potentiel du prépulse de 20 mV à chaque séquence à partir d'un potentiel de -20 mV. Le potentiel de pulse est maintenue à -40 mV. L'intensité du courant à l'équilibre aux différents potentiels est obtenue en fin de prépulse. Cette intensité dépend non seulement de la proportion de canaux activés, mais aussi de la force électromotrice (f.é.m.). C'est pourquoi l'intensité du courant permettant de tracer la courbe d'activation (figure 39 B et C) est mesurée au début du pulse à -40 mV afin de ne prendre en compte que la proportion de canaux activés (P_o), la f.é.m. restant constante. Cette proportion est identique en fin de prépulse et en début de pulse.

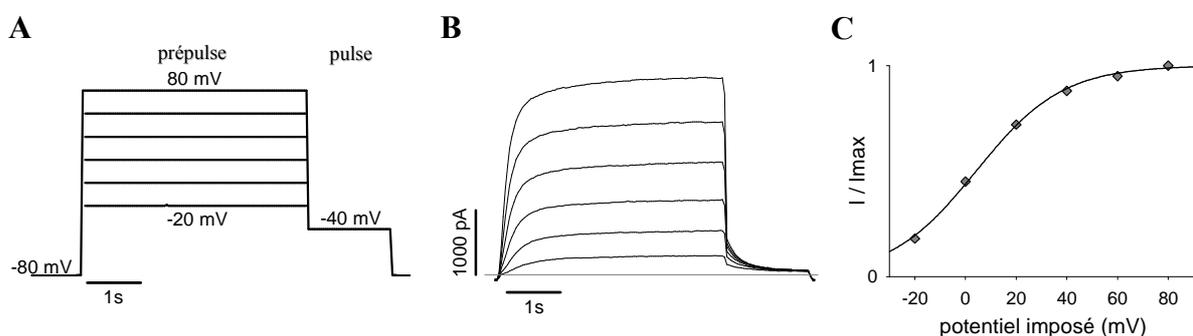


Figure 39 : Détermination des paramètres biophysiques du canal KCNQ1-KCNE1. (A) Protocole de stimulation du canal par dépolarisations successives imposées à la cellule. (B) Superposition des courants résultants de ces dépolarisations. (C) Courbe d'activation représentant la proportion de canaux activés en fonction du potentiel imposé. I_{max} correspond au courant enregistré au début du pulse à -40 mV suite à la dépolarisation à +80 mV, et I le courant enregistré au début de chaque pulse.

6. Modélisation moléculaire

La structure du tripeptide Gly-Trp-Gly est calculée via le logiciel Peplook (Bisosiris S.A ; Thomas et coll., 2006). Le modèle tridimensionnel (3D) est fixé à sa localisation optimale dans la membrane plasmique en utilisant le logiciel IMPALA (Ducarne et coll., 1998). En accord avec sa caractéristique amphiphile, le tripeptide est stabilisé à l'interface membranaire. Les complexes formés entre le tryptophane et le cholestérol sont calculés via une procédure HYPERMATRIX parmi plus de 10⁷ positions moléculaires possibles (Decaffmeyer et coll., 2006) en minimisant les énergies intermoléculaires. Le dimère est constitué à partir du complexe le plus stable et est ensuite optimisé via une procédure de Monte-carlo couplée à Angular Dynamics (Lins et coll., 2006).

7. Analyse statistique

Une courbe monoexponentielle est utilisée pour définir les cinétiques de désactivation enregistrées lors du pulse. Les cinétiques d'activation enregistrées lors du prépulse sont calculées grâce à une équation monoexponentielle à la puissance quatre. La relation de Boltzmann utilisée pour lisser les courbes d'activation est la suivante : $y = 1/\{1+\exp[(V-V_{1/2})/k]\}$.

Les résultats sont exprimés sous la forme de la moyenne des résultats \pm l'erreur standard de la moyenne. Deux tests statistiques ont été utilisés pour vérifier la significativité des résultats : le test d'analyse de la variance (ANOVA) à deux voies complétée par un test de Tukey si nécessaire et le test *t* de Student pour les expériences de variations de l'osmolarité.

Résultats

KCNQ1 - PIP₂

RESULTATS - KCNQ1-PIP₂

Article 1 : Impaired KCNQ1-KCNE1 and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate interaction underlies the long QT syndrome.

I. Introduction

Le PIP₂ (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate), un régulateur intracellulaire important de nombreux canaux ioniques et transporteurs régule l'activité du canal potassique KCNQ1-KCNE1, responsable du courant K⁺ sortant à composante lente, I_{Ks}. Plus précisément, le PIP₂ stabilise l'état d'ouverture du canal KCNQ1-KCNE1, induisant une augmentation de l'amplitude du courant et un ralentissement des cinétiques de désactivation (Loussouarn et coll., 2003). I_{Ks} est un courant K⁺ clé de la phase de repolarisation du potentiel d'action ventriculaire cardiaque. Preuve en est l'existence de très nombreuses mutations du canal KCNQ1 responsables du syndrome du QT long qui se caractérise par un allongement de la durée de la repolarisation cardiaque pouvant conduire à des arythmies ventriculaires et à des morts subites.

Trois mutants (les deux mutants Romano-Ward R539W et R555C, et le mutant Jervell et Lange-Nielsen R243H) révélés chez des patients atteints du syndrome du QT long et caractérisés par une perte d'une arginine, donc d'une charge positive susceptible d'interagir avec le PIP₂, génèrent des courants dont les cinétiques de désactivation accélérées, l'amplitude réduite et la V_{0,5} plus positive suggéraient un défaut de stabilisation par le PIP₂ membranaire (Chouabe et coll., 1997 ; Chouabe et coll., 2000).

Grâce à des expériences de patch-clamp en configuration *giant-patch* ou cellule-entière, nous avons confirmé que ces trois formes mutantes de KCNQ1 (R243H, R539W et R555C) présentent une diminution de l'affinité de la protéine KCNQ1 pour le PIP₂ membranaire.

Cette étude a fait l'objet d'un article dans la revue *Circulation Research* (Impaired KCNQ1-KCNE1 and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate interaction underlies the long QT syndrome. *Circulation Research* 2005;96:730-739).

II. Résultats

Lors de l'expression dans un système de réexpression hétérologue des sous-unités séparées KCNQ1 et KCNE1, les courants enregistrés présentent une grande variabilité tant au niveau des amplitudes que des cinétiques. Cette disparité entre les courants s'explique par une différence des ratios d'expression des deux sous-unités. Dans le but de minimiser cette variabilité, nous avons utilisé un plasmide codant la protéine de fusion KCNQ1-KCNE1 (KCNQ1 sauvage et muté R243H, R539W et R555C). L'analyse des cinétiques de désactivation et de la dépendance au potentiel membranaire démontre que la fusion des deux sous-unités ne modifie pas les propriétés des canaux sauvages et mutants. Les courants générés par ces construits sauvages et mutants sont similaires à ceux obtenus par Chouabe et ses collaborateurs lors de l'expression des sous-unités séparées (Figure 1, article 2, page 119).

La seconde expérience visait à vérifier l'hypothèse qu'une baisse de la sensibilité au PIP₂ des canaux mutants est responsable de leur perte de fonction. En configuration *giant-patch*, au moment de l'excision, les canaux mutants génèrent des courants dont l'amplitude est significativement plus faible que celle du canal sauvage. Après application du PIP₂ au niveau de la face cytoplasmique de la membrane cellulaire, les amplitudes de courant sont toutes significativement augmentées de telle manière que les courants des canaux mutants après application de PIP₂ sont comparables au courant généré par le canal sauvage avant application de PIP₂ (Figure 2, article 2, page 119). L'application du PIP₂ restaure en partie la perte de fonction des canaux mutants, ce qui suggère une baisse d'affinité de ces canaux mutants au PIP₂.

Etant donné la charge positive des arginines substituées chez les mutants, il est possible que la baisse d'affinité des mutants pour le PIP₂ soit directement liée à l'absence de cette charge positive susceptible d'interagir avec le PIP₂. Cependant, nos expériences ne nous permettent pas de distinguer les effets allostériques des altérations directes au niveau du site de fixation du PIP₂. Dans le cas du mutant R555C, une application cytosolique de réactif MTSEA, un réactif sulfhydryrique chargé positivement, apporte une charge positive au résidu cystéine et restaure l'activité du canal. En présence de MTSEA, l'amplitude du courant généré par le mutant R555C est multipliée par un facteur six et ses cinétiques de désactivation sont significativement ralenties (Figure 3, article 2, page 119), ce qui suggère, qu'au moins dans le cas du mutant R555C, la mutation est directement responsable d'un défaut d'interaction électrostatique avec le PIP₂.

L'étude de l'activité des canaux en fonction de la quantité de PIP₂ nous a permis de confirmer la baisse d'affinité des canaux mutants pour le PIP₂. La faible solubilité du PIP₂ étant incompatible avec une étude dose-réponse, nous avons utilisé un analogue soluble à

courte chaîne carbonée du PIP₂, le diC8-PIP₂. L'application, en *giant-patch*, des doses croissantes de diC8-PIP₂ (de 3 µM à 100 µM), après le *rundown* total des courants, a révélé des EC₅₀ plus élevés pour les trois canaux KCNQ1-KCNE1 mutants (Figure 4, article 2, page 119). L'affinité au PIP₂ est donc bien réduite chez ces mutants. Comme suggéré lors de la restauration du courant sauvage en présence de PIP₂ (figure 2, article 2, page 119), le mutant R243H se caractérise par une réduction de la sensibilité au PIP₂ moins importante que pour les deux autres mutants R539W et R555C.

La diminution du coefficient de Hill chez les canaux KCNQ1-KCNE1 mutants suggère que la coopérativité observée pour le canal sauvage entre les différents sites de fixation du PIP₂ est réduite chez les canaux mutants.

Puisque l'affinité mesurée du canal pour le diC8-PIP₂ est vraisemblablement différente de celle du canal pour le PIP₂ endogène, nous avons tenté de trouver un outil de comparaison des affinités des canaux KCNQ1-KCNE1 sauvages et mutants pour le PIP₂ endogène. Pour ce faire, nous avons utilisé le phénomène de *runup* des courants qui se produit dans les premiers instants après obtention de la configuration cellule-entière, (Figures 5 et 6, article 2, page 119). Le Mg²⁺ inhibe l'activité des canaux KCNQ en interagissant directement avec le PIP₂ via une liaison électrostatique (Suh et Hille, 2007). Ainsi, en configuration cellule-entière, l'absence de Mg²⁺ dans le milieu intrapipette induit une augmentation de la disponibilité du PIP₂ au cours du temps, qui se traduit progressivement par une augmentation de l'amplitude du courant et un ralentissement des cinétiques de désactivation (figure 5, article 2, page 119). Cette potentialisation du courant en fonction du temps n'est pas observée en présence de Mg²⁺, ce qui démontre que l'augmentation de l'amplitude des courants enregistrés et le ralentissement de leurs cinétiques de désactivation sont dus à la libération du PIP₂ lors de la diffusion du Mg²⁺.

Le modèle cinétique de KCNQ1 prédit que lors d'une augmentation de la concentration de PIP₂, l'amplitude du courant est augmentée et les cinétiques de désactivation sont ralenties. Sur la base de ce modèle cinétique, nous avons souhaité vérifier si l'évolution du courant au cours du *runup* confirme que le PIP₂ endogène stabilise moins l'ouverture des canaux mutants. L'augmentation du courant étant due uniquement à l'augmentation de la disponibilité du PIP₂ endogène, le modèle cinétique montre que les cinétiques de désactivation et les amplitudes de courant permettent de déterminer la constante d'équilibre $k_{\text{PIP}_2}/k'_{\text{PIP}_2}$ des canaux sauvage et mutants.

A partir de la représentation des constantes de désactivation en fonction de l'amplitude du courant, les asymptotes horizontale et verticale nous ont permis de déterminer l'amplitude maximale du courant sauvage (I_{max}) et la constante de dissociation de l'interaction canal-PIP₂ (k'_{PIP_2}) (figure 6A, article 2, page 119). Une fois l'amplitude maximale et la constante de dissociation connues, l'évolution de la constante d'association canal-PIP₂ en fonction du temps, c'est-à-dire durant le *runup*, peut à son tour être déterminée (figure 6C, article 2, page

119). Les mêmes expériences furent ensuite réalisées sur les trois canaux KCNQ1-KCNE1 mutants (figure 7, article 2, page 119). De manière identique au canal sauvage, les constantes de temps de désactivation et les amplitudes de courant augmentent durant le *runup*, suggérant que l'interaction PIP₂-canal muté augmente également du fait de la diffusion du Mg²⁺. Comme pour le canal sauvage, nous avons pu calculer la constante d'équilibre k_{PIP_2}/k'_{PIP_2} . En absence de Mg²⁺, la constante d'équilibre k_{PIP_2}/k'_{PIP_2} est significativement plus faible pour chacun des trois mutants en comparaison du sauvage, ce qui confirme la réduction de l'affinité pour le PIP₂ des canaux KCNQ1-KCNE1 mutants.

Enfin, à l'exception du mutant R243H, la constante k'_{S4} ne change pas, ce qui suggère que la sensibilité au potentiel des canaux KCNQ1-KCNE1 mutants est conservée (figure 7, article 2, page 119). Cette modification du comportement du *voltage-sensor* du mutant R243H est compatible avec la localisation de la mutation au sein même du segment S4. Et cette altération de la sensibilité au potentiel du mutant R243H n'est pas attribuable à la réduction de l'affinité pour le PIP₂, puisque les deux autres mutants R539W et R555C eux aussi caractérisés par une réduction de leur affinité au PIP₂, ne présentent aucune altération de leur sensibilité au potentiel.

III. Conclusion – Discussion

Au travers d'expériences de *patch-clamp* conjuguées à l'utilisation du modèle cinétique du canal KCNQ1, cette étude permet de démontrer que des mutations du canal KCNQ1, associées au syndrome du QT long, sont responsables d'une baisse de l'affinité du canal KCNQ1-KCNE1 pour le PIP₂. Les deux mutants R539W et R555C identifiés chez des patients porteurs d'un syndrome du QT long de type Romano-Ward, se caractérisent uniquement par une altération de l'affinité au PIP₂. Pour le troisième mutant R243H, associé à un syndrome du QT long de type Jervell et Lange-Nielsen, une altération du *voltage-sensor* est également observée.

Cette étude qui confirme au niveau physiologique le rôle prépondérant du PIP₂ dans la régulation du canal KCNQ1-KCNE1, décrit un nouveau mécanisme moléculaire responsable du syndrome du QT long. Nous avons pu ainsi identifier le partenaire en cause (le PIP₂), la nature de la liaison (une liaison électrostatique) ainsi que les conséquences fonctionnelles à l'échelle du canal ionique (une diminution de la probabilité d'ouverture).

L'identité du partenaire mis en cause dans ce mécanisme moléculaire fut d'abord vérifiée par la quasi restauration de l'amplitude du courant sauvage lors de l'application de PIP₂ au voisinage intracellulaire des canaux mutants. En ce qui concerne le canal mutant R243H, le fait que le courant enregistré en présence de PIP₂ soit supérieur à celui du courant

sauvage en condition contrôle supposait déjà une sensibilité au PIP₂ intermédiaire. Cette graduation de la sensibilité au PIP₂ est vérifiée par les valeurs d'EC₅₀ pour le diC8-PIP₂. L'EC₅₀ du mutant R243H se situe entre celle du canal sauvage et celles, deux fois et demi plus importantes, des deux autres mutants. Ces défauts de sensibilité encore plus marqués pour les deux canaux mutants R539W et R555C, vont tout à fait dans le sens d'une participation de ces mutants au syndrome du QT long de type Romano-Ward, c'est-à-dire la forme dominante négative (Chouabe et coll., 1997 et 2000). De la même manière, l'association du mutant R243H à la forme récessive du syndrome du QT long, concorde avec la baisse moins marquée de son affinité pour le PIP₂ (Chouabe et coll., 2000).

Le modèle cinétique est basé sur l'hypothèse que le PIP₂ n'affecte pas le *voltage-sensor* mais uniquement la transition finale de l'état fermé vers l'état ouvert, après que les quatre segments S4 aient transité vers cette conformation qui permet l'ouverture du pore. A partir de ce modèle cinétique, nous avons pu vérifier que la constante d'équilibre (k_{PIP_2}/k'_{PIP_2}) des canaux mutants est inférieure à la constante d'équilibre du canal KCNQ1-KCNE1 sauvage. Au même titre que la diminution de la sensibilité à l'analogue du PIP₂, cette observation indique que les trois canaux mutants se caractérisent par une nette réduction de leur affinité au PIP₂.

Puisqu'il n'existe pas de manière simple de mesurer les courants unitaires de très petite taille générés par le canal KCNQ1, nous nous sommes appuyés sur le modèle cinétique du canal KCNQ1, pour attribuer les conséquences fonctionnelles des mutations R243H, R539W et R555C à une diminution de la probabilité d'ouverture des canaux, conséquence de la faible affinité au PIP₂. D'ailleurs, de manière similaire aux canaux Kir (Enkvetchacul et coll., 2000) et aux canaux KCNQ2/KCNQ4 (Li et coll., 2005), le PIP₂ agit sur le canal KCNQ1-KCNE1 en stabilisant son ouverture. Cette ouverture du canal, initiée par le mouvement du *voltage-sensor*, étant directement couplée à la présence de PIP₂, la plus faible capacité des canaux mutants à fixer le PIP₂ est responsable de la réduction de leur probabilité d'ouverture à l'origine de cette perte de fonction.

En ce qui concerne la nature électrostatique de l'interaction mise en cause, celle-ci est confirmée par la restauration de l'activité du canal mutant R555C en présence de MTSEA. Le fait que les cinétiques de désactivation sont ralenties par le simple fait d'ajouter le MTSEA confirme l'importance de l'interaction électrostatique canal-PIP₂. A l'image des canaux Kir (Lopes et coll., 2002), l'absence d'une charge positive est donc bien responsable du défaut de fonctionnement des canaux mutants. Ayant perdus au moins un site de fixation du PIP₂, ces mutants KCNQ1-KCNE1 voient leur capacité à générer un courant diminuée. Néanmoins, nos expériences ne nous ont pas permis de distinguer les effets allostériques des altérations directes du site de fixation du PIP₂. Cependant, des travaux comparatifs des structures tridimensionnelles des différents canaux Kir ont montré que les sites de fixation du PIP₂ au niveau de la partie proximale de l'extrémité C-terminale, sont regroupés au sein d'une structure faisant face au feuillet interne de la membrane plasmique et donc aux groupes

inositols des phospholipides insérés dans la membrane (Logothetis et coll., 2007). Des travaux présentés cette année au congrès de la *Biophysical Society* ont permis, par homologie avec les canaux Kir, de déterminer une région clé de la régulation des canaux KCNQ par le PIP₂. Les auteurs ont ainsi révélé une région de 71 acides aminés, au sein de l'extrémité C-terminale, susceptible d'interagir avec le PIP₂ membranaire (Hernandez et coll., 2008)

Le fait que seul le mutant R243H se caractérise par une altération du *voltage-sensor*, n'est pas étonnant étant donné la position de la mutation au sein de ce segment S4. Cette altération du fonctionnement du *voltage-sensor* était d'ailleurs prévisible au vue de la modification de la pente de la courbe d'activation. Et la conservation de cette pente chez les deux autres mutants malgré une baisse d'affinité au PIP₂, au demeurant plus importante, démontre que cette altération de la sensibilité au potentiel n'est en rien causée par la baisse d'affinité au PIP₂. Soit la charge manquante qui sert à la fixation du PIP₂ participe directement au *voltage-sensor*, soit cette mutation induit un changement de conformation du *voltage-sensor*. La première hypothèse semble la plus vraisemblable dans la mesure où l'arginine 243 fait partie du cluster de charges positives du segment S4 (Panaghie et Abbott, 2007). Quelle qu'en soit la raison, cette altération n'est donc pas due à la baisse d'affinité au PIP₂ mais seulement à une perte d'une entité importante dans le mécanisme de sensibilité au potentiel. Et le fait que cette unique mutation R243H altère à la fois la sensibilité au PIP₂ et la dépendance au potentiel est un argument en faveur de l'idée que le *voltage-sensor* régule la fixation du PIP₂ sur la porte d'activation, c'est-à-dire que le PIP₂ permettrait le couplage entre le *voltage-sensor* et l'activation du canal (§ Discussion et perspectives).

Une seconde particularité observée chez un canal mutant est la sensibilité plus faible du canal mutant R539W à l'augmentation du PIP₂ disponible lors de la dilution du Mg²⁺ cytosolique dans la pipette, ce qui se traduit par un *runup* plus faible. D'après le modèle cinétique, la diffusion du Mg²⁺ cause une variation de la probabilité d'ouverture du mutant R539W plus faible (Figure 7B (▲), article 2, page 119). Cette faible variation est surprenante, puisque normalement, une affinité réduite se traduit par une réponse plus importante. Par exemple, une affinité réduite au PIP₂ se traduit par une capacité supérieure des canaux Kir au *rundown* induit par le Mg²⁺ (Lopes et coll., 2002). Cette particularité suggère que l'accessibilité du Mg²⁺ au PIP₂ est en quelque sorte empêchée par la mutation. D'ailleurs, dans l'article suivant, le mutant R539W se révèle être très peu sensible à la diminution du PIP₂ provoquée par l'application de wortmanine ou de Mg²⁺. Une seconde hypothèse, abordée dans l'article suivant, est que le tryptophane substitué à l'arginine permette de stabiliser le canal dans un état conformationnel ouvert via une interaction avec la membrane plasmique.

Dans les systèmes de réexpression du type des cellules cos-7, les deux canaux mutants R539W et R555C génèrent des courants de même amplitude, et se caractérisent par une

affinité apparente au PIP₂ similaire. Or curieusement, à la différence du mutant R555C, caractérisé de « forme frustrée » (Donger et coll., 1997), plusieurs porteurs de la mutation R539W sont symptomatiques et deux d'entre eux sont morts subitement (Chouabe et coll., 2000). La stabilité observée du canal mutant R539W est peut être une explication à son implication dans des phénotypes marqués du syndrome du QT long. Comme nous le verrons dans l'article consacré à l'osmorégulation de KCNQ1, cette stabilisation de l'activité du canal R539W se traduit également par une insensibilité aux variations de l'osmolarité. Les deux autres mutants R555C et R243H étant autant sensibles que le canal sauvage, cette stabilisation de l'activité du canal R539W est peut-être responsable du phénotype marqué caractéristique des porteurs de la mutation. Dans des conditions physiopathologiques, la stabilité du canal R539W serait délétère pour les porteurs de cette mutation.

Au-delà de l'identification de ce nouveau mécanisme moléculaire, cette étude a donc permis de confirmer l'importance de la régulation physiologique du canal KCNQ1 par le PIP₂. Et comme nous le verrons dans l'étude suivante, ces canaux KCNQ1-KCNE1 mutants caractérisés par une faible sensibilité au PIP₂, peuvent être d'intéressants modèles d'études du rôle du PIP₂ dans les différentes voies de régulation des canaux KCNQ par les phospholipides.

Circulation Research

JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION



Impaired KCNQ1–KCNE1 and Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate Interaction Underlies the Long QT Syndrome

Kyu-Ho Park, Julien Piron, Shehrazade Dahimene, Jean Mérot, Isabelle Baró, Denis
Escande and Gildas Loussouarn

Circ. Res. 2005;96;730-739; originally published online Mar 3, 2005;

DOI: 10.1161/01.RES.0000161451.04649.a8

Circulation Research is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas,
TX 75214

Copyright © 2005 American Heart Association. All rights reserved. Print ISSN: 0009-7330. Online
ISSN: 1524-4571

The online version of this article, along with updated information and services, is
located on the World Wide Web at:

<http://circres.ahajournals.org/cgi/content/full/96/7/730>

Subscriptions: Information about subscribing to Circulation Research is online at
<http://circres.ahajournals.org/subscriptions/>

Permissions: Permissions & Rights Desk, Lippincott Williams & Wilkins, a division of Wolters
Kluwer Health, 351 West Camden Street, Baltimore, MD 21202-2436. Phone: 410-528-4050. Fax:
410-528-8550. E-mail:
journalpermissions@lww.com

Reprints: Information about reprints can be found online at
<http://www.lww.com/reprints>

Impaired KCNQ1–KCNE1 and Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate Interaction Underlies the Long QT Syndrome

Kyu-Ho Park, Julien Piron, Shehrazade Dahimene, Jean Mérot, Isabelle Baró,
Denis Escande, Gildas Loussouarn

Abstract—Nearly a hundred different KCNQ1 mutations have been reported as leading to the cardiac long QT syndrome, characterized by prolonged QT interval, syncope, and sudden death. We have previously shown that phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) regulates the KCNQ1–KCNE1 complex. In the present study, we show that PIP₂ affinity is reduced in three KCNQ1 mutant channels (R243H, R539W, and R555C) associated with the long QT syndrome. In giant excised patches, direct application of PIP₂ on the cytoplasmic face of the three mutant channels counterbalances the loss of function. Reintroduction of a positive charge by application of methanethiosulfonate ethylammonium on the cytoplasmic face of R555C mutant channels also restores channel activity. The channel affinity for a soluble analog of PIP₂ is decreased in the three mutant channels. By using a model that describes the KCNQ1–KCNE1 channel behavior and by fitting the relationship between the kinetics of deactivation and the current amplitude obtained in whole-cell experiments, we estimated the PIP₂ binding and dissociation rates on wild-type and mutant channels. The dissociation rate of the three mutants was higher than for the wild-type channel, suggesting a decreased affinity for PIP₂. PIP₂ binding was magnesium-dependent, and the PIP₂-dependent equilibrium constant in the absence of magnesium was higher with the wild-type than with the mutant channels. Altogether, our data suggest that a reduced PIP₂ affinity of KCNQ1 mutants can lead to the long QT syndrome. (*Circ Res.* 2005;96:730-739.)

Key Words: KCNQ1 ■ KCNE1 ■ phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ■ long QT syndrome

KCNQ1 is the pore-forming subunit of the channel complex (composed of KCNQ1 and its regulator KCNE1) underlying the delayed rectifier potassium current I_{Ks}, a key modulator of the action potential duration in the human heart.^{1,2} Nearly 100 KCNQ1 mutations have been reported to cause the long QT syndrome, a genetic disease characterized by prolonged cardiac repolarization, cardiac arrhythmias, and a high risk of sudden death.^{3,4}

Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) is an important intracellular regulator of many ion channels and transporters.^{5–8} We showed recently that intracellular PIP₂ regulates KCNQ1–KCNE1 channel activity in such a way that PIP₂ stabilizes the open state of the channels, leading to an increased current amplitude, slowed deactivation kinetics, and a shift in the activation curve toward negative potentials.⁹ In general, it is known that positively charged amino acids are implicated in channel–PIP₂ interactions.^{10–13} Because various KCNQ1 mutations producing neutralization of a residue in an intracellular segment of the channel protein lead to reduced current amplitude, accelerated deactivation, and shift in the activation curve toward positive potentials,^{14,15} we hypothesized that mutations neutralizing a positive charge (eg, R243H, R539W, and R555C) may act through an impaired

channel–PIP₂ interaction. We thus compared the effects of PIP₂ on wild-type and mutant KCNQ1 channel behavior using the patch-clamp technique. We observed that intracellular PIP₂ rescued the mutated channel abnormal activity. Moreover, application to the R555C mutant of methanethiosulfonate ethylammonium (MTSEA), which mimics a positive charge by its association with cysteine 555, reverses the loss of function phenotype, suggesting that a positive charge at this position is critical for normal KCNQ1 activity. This is consistent with the electrostatic nature of the channel–PIP₂ interactions.^{6,12,16} We also show that the channel affinity for a soluble analog of PIP₂ is decreased in the three mutant channels. Finally, we used our previously developed computer model of KCNQ1–KCNE1 channel activity⁹ to further characterize the mutant channel behavior. We found that an alteration in PIP₂ binding in mutants R539W and R555C fully explains the channel dysfunction. For mutant R243H, the data suggested an effect of the mutation not only on PIP₂ binding but also on voltage sensing.

Materials and Methods

Cell Culture and Transfection

The African green monkey kidney–derived cell line COS-7 was obtained from the American Type Culture Collection and cultured in

Original received September 3, 2004; revision received January 11, 2005; accepted February 24, 2005.

From the L'Institut du Thorax, INSERM U533, Faculté de Médecine, Nantes, France. Kyu-Ho Park's present address is UMR7099, Institut de Biologie Physico-Chimique, 75005 Paris, France.

Reprint requests to Gildas Loussouarn, L'Institut du Thorax, INSERM U533, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, BP 53508, 44035 Nantes, France. E-mail gildas.loussouarn@nantes.inserm.fr

© 2005 American Heart Association, Inc.

Circulation Research is available at <http://www.circresaha.org>

DOI: 10.1161/01.RES.0000161451.04649.a8

DMEM (GIBCO). Cells were transfected with the plasmids complexed with Fugene-6 (Roche Molecular Biochemical) according to the standard protocol recommended by the manufacturer. The R243H, R539W, and R555C mutations were subcloned from pCI KCNQ1 plasmids (a kind gift of Dr Jacques Barhanin, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Valbonne, France) into the human pCDNA3.1 KCNQ1-KCNE1 concatemer¹⁷ (human KCNE1 linked to the N terminus of the human KCNQ1; a kind gift of Dr Robert S. Kass, Department of Pharmacology, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York, NY). The plasmid coding for the green fluorescent protein (pEGFP) that we used to identify transfected cells was purchased from Clontech. For giant patch experiments, relative DNA composition was 80% pCDNA3.1 KCNQ1-KCNE1 and 20% pEGFP (of a total of 2 μg of DNA). For whole-cell experiments, relative DNA composition was 40% pCDNA3.1 KCNQ1-KCNE1 and 60% pEGFP (of a total of 2 μg of DNA).

Electrophysiology

Twenty-four to 72 hours after transfection, COS-7 cells were mounted on the stage of an inverted microscope and constantly perfused at a rate of 2 mL/min. The bath temperature was maintained at 22.0±1.0°C. Stimulation, data recording, and analysis were performed by Acquis1, a software made by Gérard Sadoc (distributed by Bio-logic Science Instruments) through an analog-to-digital converter (Tecmar TM100 Labmaster; Scientific Solution). Electrodes were connected to a patch-clamp amplifier (RK-300; Biologic Science Instruments). For giant patch experiments, the procedure described by Couey et al¹⁸ was adapted to realize giant patches from COS-7 cells as follows. An “excision” pipette, filled with the standard solution, was connected to a 20-mL syringe to apply suction for excision. Pipettes were pulled from borosilicate glass capillaries (glass type 8250; Garner Glass) on a vertical puller (P30; Sutter Instruments) and fire-polished using a microforge (MF-83; Narishige) to reach 9- to 15-μm tip diameters for patch pipettes and 20 μm

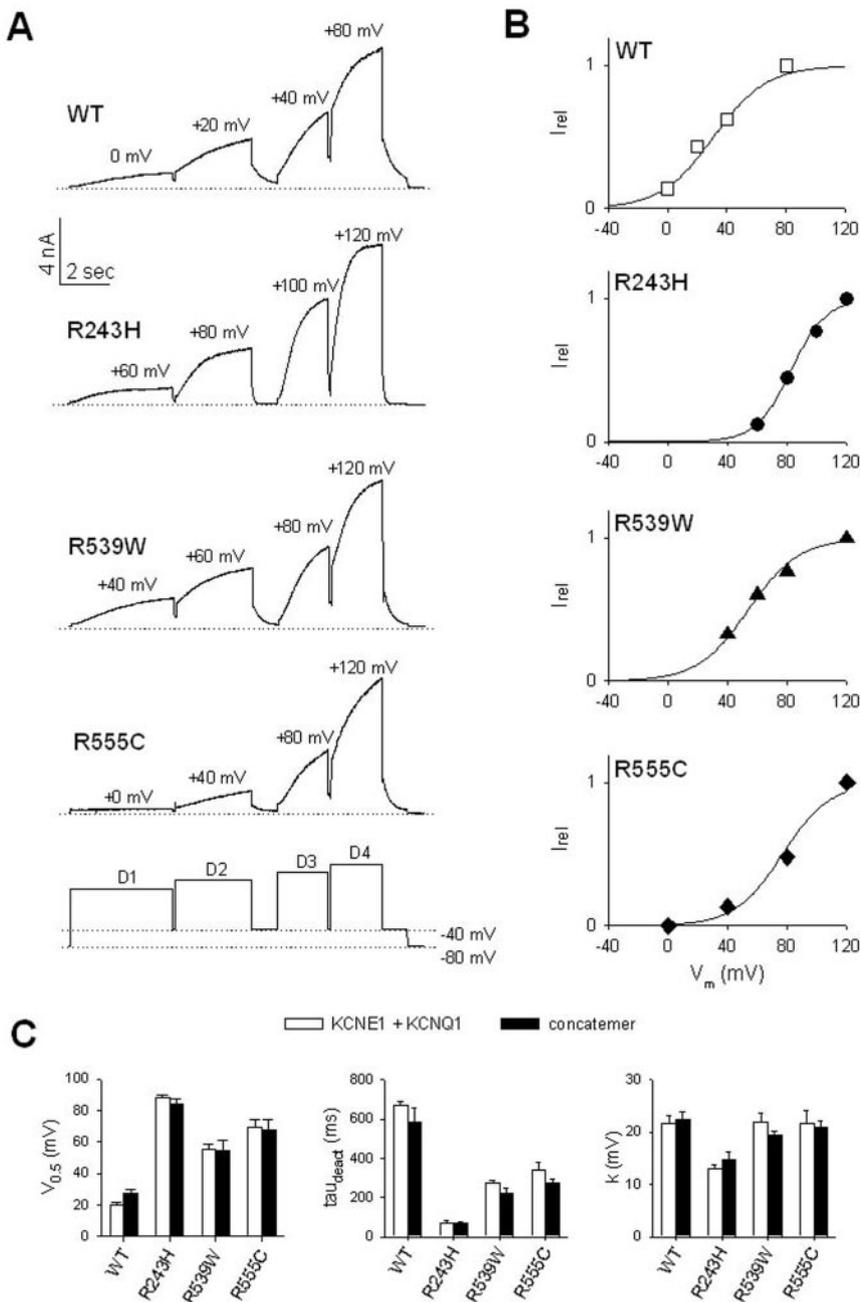


Figure 1. KCNQ1-KCNE1 concatemer channels behave like independent subunits. A, Representative whole-cell recordings of wild-type (WT) or mutant KCNQ1-KCNE1 concatemers. A step protocol of four depolarizations was applied every 14 s. D1 to D4 are as indicated above each current trace and were adapted to the voltage sensitivity of the channel. B, Activation curves of wild-type and mutant KCNQ1-KCNE1 concatemers calculated from the tail current measured after each depolarization on recordings shown in A. Data are fitted by a Boltzmann equation. C, Left, White bars are wild-type or mutant channel V_{0.5} obtained from the coexpression of independent subunits.^{14,15} Black bars are V_{0.5} for wild-type or mutant KCNQ1-KCNE1 concatemers (n=7 to 18). Middle, White bars are deactivation time constant (τ_{deact}) of wild-type or mutant current obtained from the expression of independent subunits.^{14,15} Black bars are wild-type or mutant KCNQ1-KCNE1 concatemer current τ_{deact} measured after the last depolarization step to D4 (n=7 to 20). Right, White bars are k of wild-type or mutant activation curve obtained from the expression of independent subunits.^{14,15} Black bars are k of wild-type or mutant KCNQ1-KCNE1 concatemer activation curve (n=6 to 18).

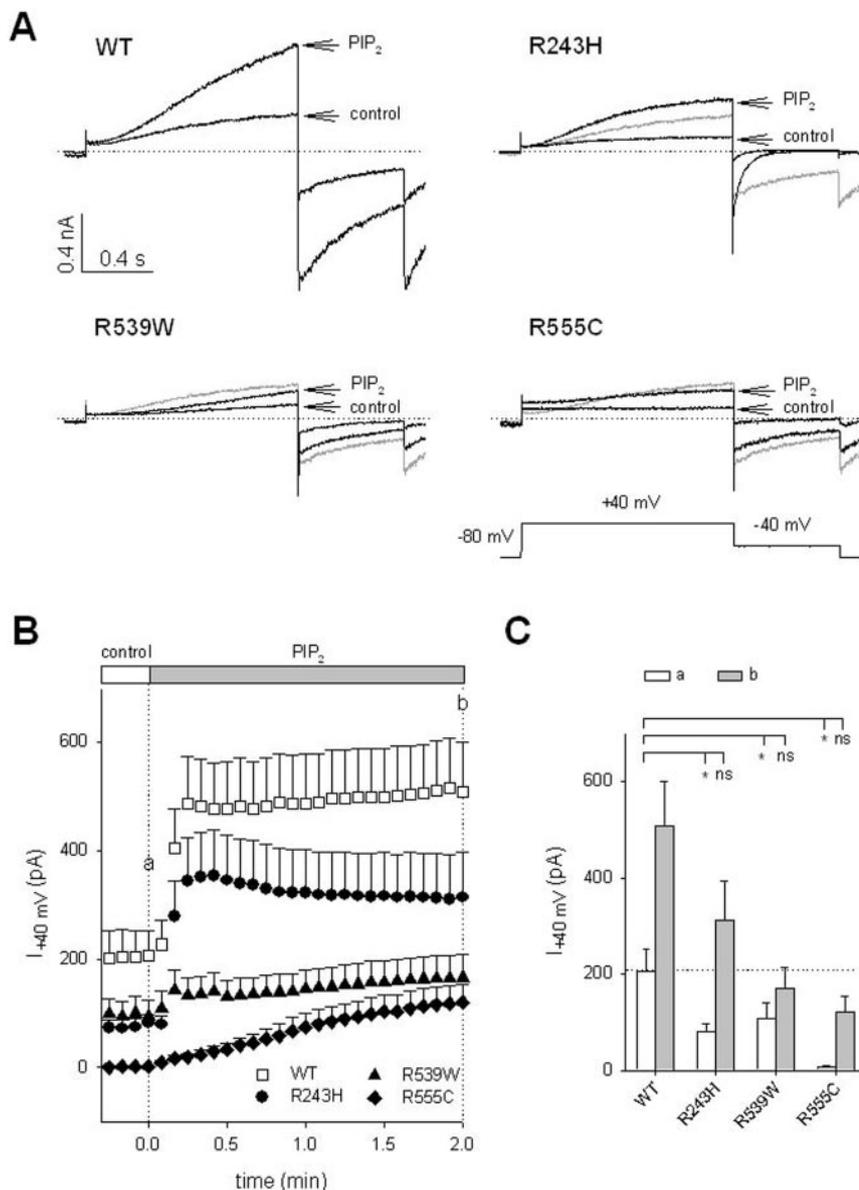


Figure 2. PIP₂ partially corrects the loss of function related to R243H, R539W, and R555C mutations. **A**, Representative giant inside-out patch recordings of wild-type (WT) or mutant KCNQ1–KCNE1 currents in symmetrical potassium before (control) and 2 minutes after patch excision in the presence of 1.4 mmol/L MgATP (0.6 mmol/L free Mg²⁺) and 5 μmol/L PIP₂. For comparison, the wild-type current in control condition is shown in gray. The voltage protocol as shown was applied every 5 s. **B**, Current amplitude of wild-type or mutant channels measured at the end of the depolarizing step (I_{+40 mV}) plotted against time. Excision was conducted at time zero. Current amplitudes in control conditions (a) and 2 minutes after patch excision (b) are indicated by vertical dotted lines (WT n=19; R243H n=19; R539W n=22; R555C n=16). **C**, Wild-type or mutant channel current amplitude in conditions a and b from **B**. *P<0.05 vs wild-type.

for excision pipettes. Cells were continuously perfused with the standard solution. A microperfusion system allowed local application and rapid change of the different experimental solutions. KCNQ1–KCNE1 currents were investigated with a protocol consisting of depolarized voltage steps of 1 s from a holding potential of –80 mV to +40 mV and then to –40 mV for 500 ms, every 5 s. Because it was difficult to maintain isolated patch at potential more positive than 80 mV, step protocols were performed in the whole-cell configuration. Channel deactivation kinetics were obtained by using a monoexponential fit.

For whole-cell experiments, micropipettes (tip resistance 2 to 3 MΩ) were pulled from thin-walled glass (Kimble). For the half-maximal activation potential (V_{0.5}), currents, and deactivation measurements, the membrane potential was stepped, from a holding potential (–80 mV) to four voltage steps adapted to V_{0.5} of the wild-type and mutant channels (Figure 1) and then stepped back to –40 mV, where tail currents are visible. The activation curve was fitted to a Boltzmann distribution. KCNQ1–KCNE1 deactivation kinetics were obtained by a monoexponential fit. Patch-clamp data are presented as mean ± SEM. Statistical significance of the observed effects was assessed by Student's *t* tests. Off-line analysis was performed using Acquis1 and Microsoft Excel programs. Microsoft Solver was used to fit data by a least-square algorithm.

Kinetic Model of PIP₂ Regulation of KCNQ1–KCNE1

Fits of tau_{deact} versus maximum open probability (P_o; or the maximal tail current amplitude in Figure 6A) were generated from the model presented in Figure 6B. In the following model, P_o max is the maximal P_o for a given membrane PIP₂ level (P_o max tends toward 1 when PIP₂ increases). Only PIP₂ binding rate constant (k_{PIP₂}) is PIP₂ dependent.

$$(1) \tau_{\text{deact}} =$$

$$-2 / [(\{k_{\text{PIP}_2} + k'_{\text{PIP}_2} + k'_s\}^2 - 4 \times k'_s \times k'_{\text{PIP}_2})^{0.5} - k_{\text{PIP}_2} - k'_{\text{PIP}_2} - k'_s]$$

and

$$(2) k_{\text{PIP}_2} = k'_{\text{PIP}_2} \times P_o \text{ max} / (1 - P_o \text{ max})$$

Solutions and Drugs

For giant patch experiments, cells were perfused with a standard solution containing (in mmol/L): 140 KCl, 10 HEPES, and 1 EGTA, pH 7.3 with KOH. The following solution (in mmol/L): 145 K-gluconate, 10 HEPES, and 1 EGTA, pH 7.3 with KOH, was used to perfuse the cell during K⁺ currents measurement and to fill the

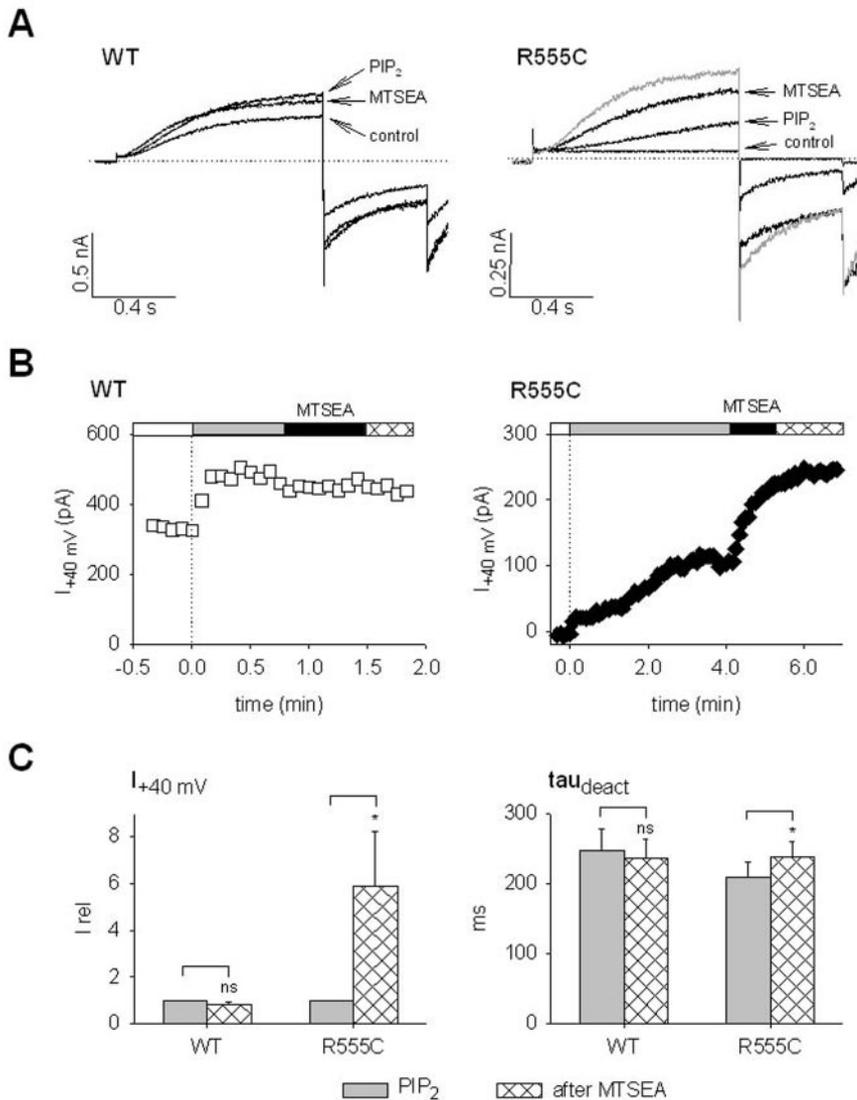


Figure 3. The loss of function associated with R555C is partially corrected by 1 mmol/L MTSEA. **A**, Representative inside-out recordings of wild-type (WT) or R555C mutant KCNQ1-KCNE1 currents before (control) and after excision and before MTSEA (PIP₂) and after 1 mmol/L MTSEA application. For comparison, the wild-type current trace in control condition is represented in gray; same voltage protocol as in Figure 2. **B**, Wild-type or mutant channel $I_{+40 \text{ mV}}$ plotted against time (gray box, before; black box, during; hatched box, after 1 mmol/L MTSEA application). **C**, Normalized activating current amplitude and deactivation time constant (τ_{deact}) of wild-type ($n=8$) and R555C mutant ($n=8$) channels before and after MTSEA application. * $P < 0.05$ vs PIP₂ condition values.

patch pipette. For whole-cell experiments, the pipette (intracellular) solution used had the following composition (in mmol/L): 150 KCl, 10 HEPES, and 5 EGTA, pH 7.2 with KOH. The standard Tyrode perfusion solution contained (in mmol/L): 145 NaCl, 4 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, and 5 HEPES, pH 7.4 with NaOH. Free activities were calculated using a software designed by G.L. Smith (University of Glasgow, Scotland). PIP₂ (Roche Molecular Biochemical) was sonicated on ice for 30 minutes before application to inside-out patches. 1,2-dioctanoyl (diC₈)-PIP₂ was purchased from Cayman Chemicals. MTSEA was purchased from TRC. All other products were purchased from Sigma.

Results

KCNQ1-KCNE1 Concatemers Behave Like the Independent Subunits

In our previous study,⁹ we investigated the regulation of the KCNQ1-KCNE1 complex by making use of the inside-out configuration of the patch-clamp technique. Sizable currents were recorded in only 15% of the patches. To improve the success rate of inside-out recordings, we increased the size of the patches and adopted the giant patch configuration.¹⁸ Using large pipettes, we achieved gigaOhm seals in 87% of total attempts and obtained 73.5% of giant patches with

sizable currents (on a total of 238 attempts). We also used a construct of hKCNQ1 fused to hKCNE1¹⁷ (KCNQ1-KCNE1) to prevent variability caused by variable KCNQ1-KCNE1 expression ratio.

We validated the use of the KCNQ1-KCNE1 concatemer by checking that the fusion did not interfere with the wild-type or mutant channel properties. Using the whole-cell configuration, we obtained values for $V_{0.5}$, slope factor (k), and deactivation kinetics for the concatemer similar to those previously obtained by Chouabe et al^{14,15} for the independent subunits (Figure 1).

PIP₂ Partially Corrects the Loss of Function Related to R243H, R539W, and R555C Mutations

We hypothesized that if the loss of function associated with R243H, R539W, and R555C was caused by a lower PIP₂ sensitivity, application of PIP₂ in excess to the intracellular side of the mutant channel should counterbalance the deficit in sensitivity. A total of 5 $\mu\text{mol/L}$ PIP₂ is beyond physiological levels because this concentration increases the open stability of ATP-sensitive potassium channels (K_{ATP}) and

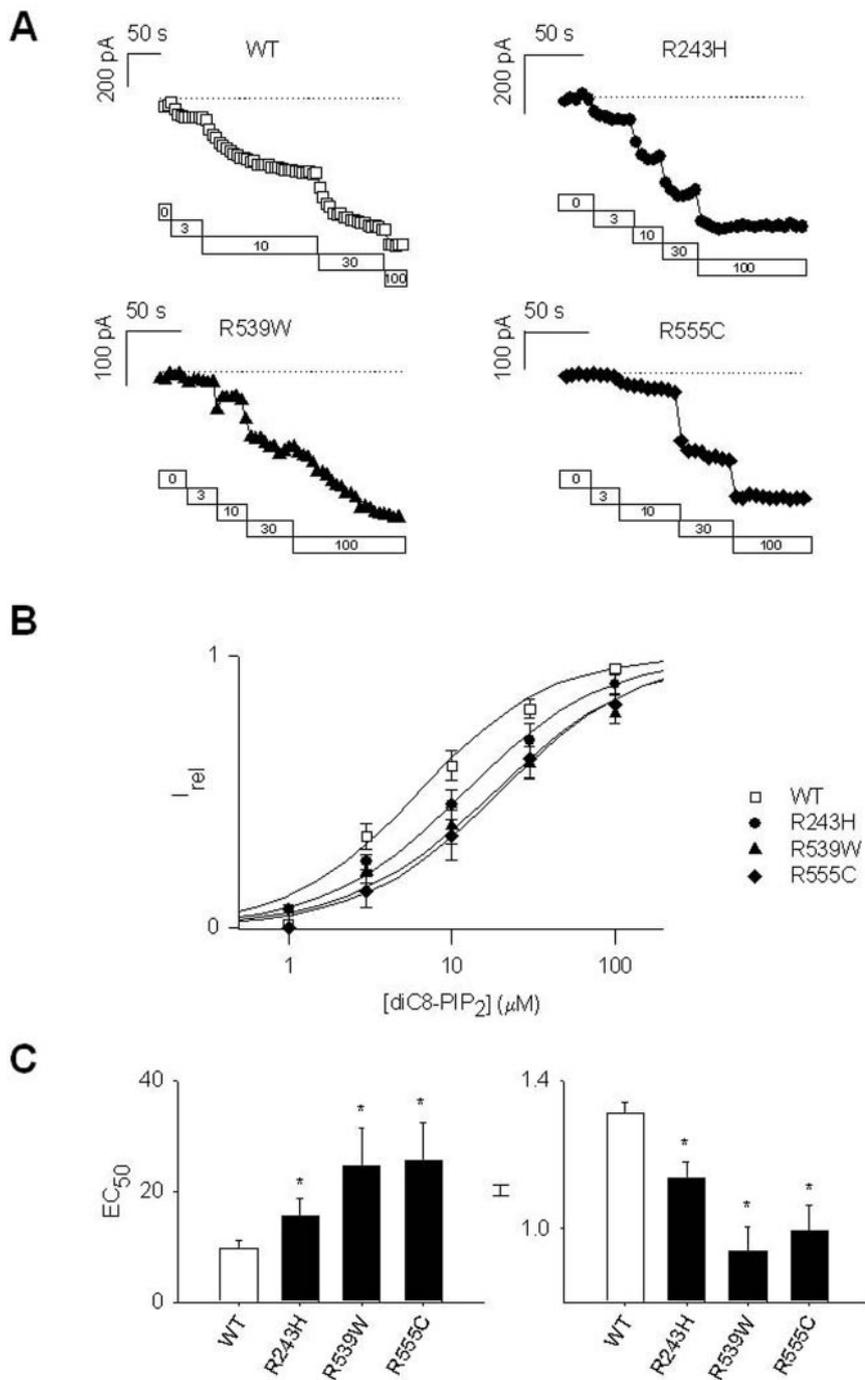


Figure 4. R243H, R539W, and R555C mutants present a lower diC₈-PIP₂ affinity than wild-type channels. **A**, Tail current amplitude (−40 mV) after a 1-s depolarization step (+80mV) of wild-type (WT) and mutant KCNQ1-KCNE1 channels plotted against time. Boxed numbers indicate application of increasing concentration of diC₈-PIP₂ (in μmol/L). **B**, Dose-response relationship of the PIP₂ effects on wild-type and mutant KCNQ1-KCNE1 channels. Relative currents are calculated so that the Hill fit (line) tends to 1 for increasing PIP₂ analog concentrations. **C**, Bar graphs representing the average EC₅₀ and Hill coefficient for the WT and mutant channels (n=9 to 13). *P<0.05 vs wild-type.

KCNQ1-KCNE1 channels.^{6,9} In giant patches, we monitored the activity of wild-type and mutant channels during application of 5 μmol/L PIP₂ plus 1.4 mmol/L MgATP (MgATP was required to prevent the PIP₂-independent rundown⁹). Before excision, R243H, R539W, and R555C channels generated current amplitudes significantly smaller than wild-type channels (Figure 2). In particular, it was difficult to obtain sizable currents from R555C mutant channels. On excision in high PIP₂ plus MgATP, wild-type and mutant KCNQ1-KCNE1 channel currents increased. For each construct, current amplitudes before and 2 minutes after excision statistically differed. Most importantly, PIP₂ application re-

stored the current amplitude of the mutant channels to values similar to the wild-type control (Figure 2B and 2C).

Loss of Function Associated With R555C Is Partially Corrected by 1 mmol/L MTSEA

The latter experiments cannot discriminate the effects related to charge neutralization from the effects related to other changes in the amino acid chain (length, addition of an aromatic ring). With mutation R555C, the cysteine residue can be modified by sulfhydryl reagents, some of which are positively charged. Such a reagent, MTSEA applied to Kir2.1 cysteine mutants restored their PIP₂ sensitivity.¹² In giant

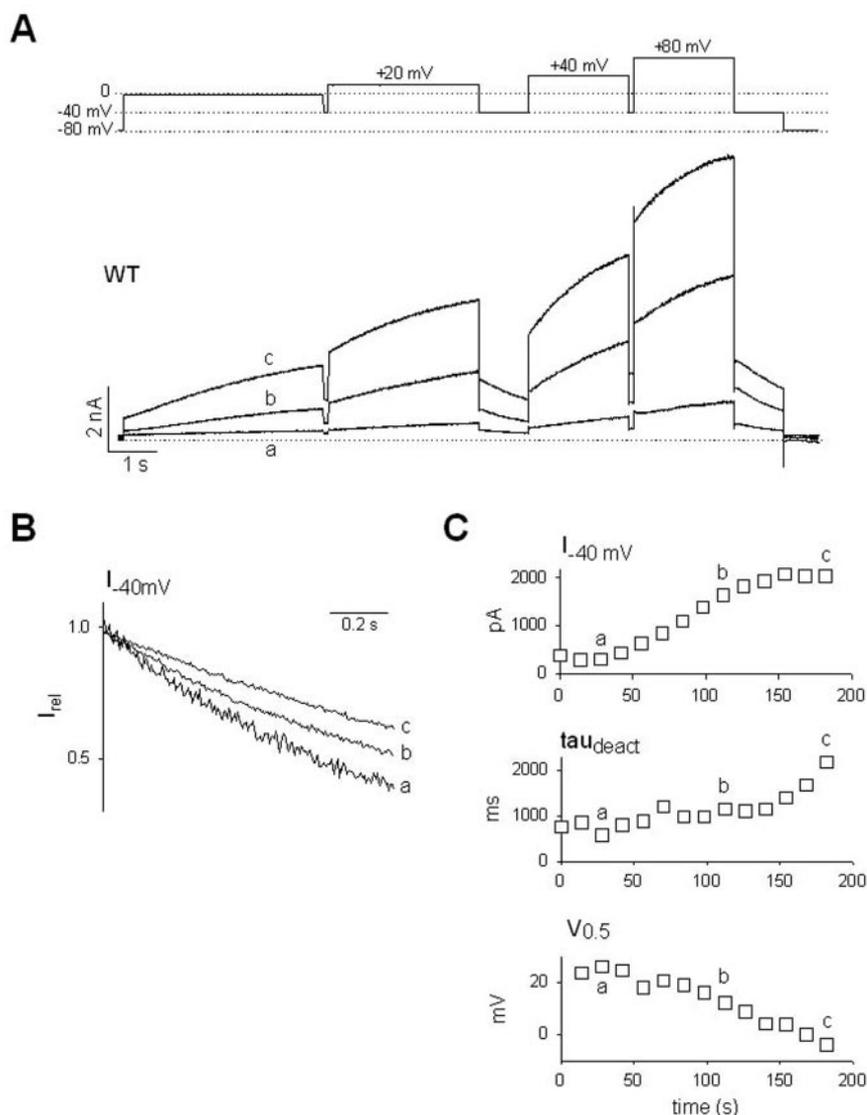


Figure 5. Unmasking of PIP₂ charges by magnesium dilution leads to an increase in wild-type current amplitude and a slowing in deactivation. A, Top, Voltage protocol. Four depolarization steps were applied every 14 s to monitor the $V_{0.5}$. Bottom, Representative whole-cell recording of wild-type (WT) KCNQ1-KCNE1 concatamer currents 28 (a), 112 (b), and 198 s (c) after patch rupture, with a magnesium-free pipette solution. B, Normalized tail currents recorded after the last depolarization step showing the slower deactivation after patch rupture. C, Plot of the tail current at -40 mV, τ_{deact} , and $V_{0.5}$ as a function of time after patch rupture.

excised patches, application of MTSEA had no effect on the wild-type KCNQ1-KCNE1 current amplitude but increased the R555C current 5.9 ± 2.4 -fold (Figure 3; $n=8$). This effect was irreversible, remaining after washing out MTSEA. Application of MTSEA had no significant effect on wild-type current kinetics but significantly decelerated R555C deactivation (Figure 3C). This suggests that as in Kir1.1 and Kir2.1 channels,¹² a neutralization of an amino acid side chain in KCNQ1 channels is responsible for the decreased electrostatic interaction with PIP₂.

R243H, R539W, and R555C Mutants Have a Lower Affinity for diC₈-PIP₂ Than Wild-Type Channels

The weak water solubility of PIP₂ prevents the investigation of its dose-dependent effects on KCNQ1 channels and therefore characterization of the channel affinity for PIP₂. To circumvent this difficulty, previous studies used a water-soluble PIP₂ analog with short acyl chains.¹⁹ Using the same approach, we tested the application of 1 to 100 $\mu\text{mol/L}$ of a short chain PIP₂ analog, diC₈-PIP₂ on wild-type and mutant

KCNQ1-KCNE1 channels in the giant patch configuration. The PIP₂ analog was applied after the spontaneous PIP₂-dependent rundown.⁹ The EC₅₀ for diC₈-PIP₂ activation was increased in the three mutants compared with wild-type (Figure 4), further suggesting a decreased PIP₂ affinity. The Hill coefficient was >1 (1.3) for wild-type channels and close to 1 for the three mutants, suggesting that several PIP₂-binding sites act cooperatively and that cooperativeness decreases in the three mutant channels.

Unmasking PIP₂ Charges by Magnesium Dilution Leads to an Increased Current Amplitude and a Slowing in Deactivation

Giant patch experiments suggested a decreased affinity for PIP₂ of the mutants. However, alternate hypotheses cannot be excluded: (1) mutations may decrease the channel activity independently of the PIP₂ regulation (ie, PIP₂ binding site is not altered but channel PIP₂ affinity is indirectly modified). Such an allosteric effect has been reported previously for regulation by ATP of K_{ATP} channels²⁰; (2) in the giant patch configuration, we used MgATP because the KCNQ1-

KCNE1 activity required PIP₂ and MgATP.⁹ It is possible that the presence of free Mg²⁺ in the solution may screen the negative charges of PIP₂ and limit PIP₂ effect on channel activity;⁶ and (3) the current density cannot be accurately measured in giant patches because the capacitance of the patch is too small. This prevented investigation of the consequence of the mutations on the functional channel density.

We therefore used the whole-cell configuration and omitted Mg²⁺ in the pipette. This led to an increased availability of PIP₂ because of gradual intracellular Mg²⁺ dilution with the pipette milieu. A representative recording of wild-type KCNQ1–KCNE1 is shown in Figure 5. A four-depolarization step protocol was used to estimate maximum activation (P_o max) as a function of time after patch rupture. Deactivation kinetics were measured during repolarization to –40 mV. As shown in Figure 5A and 5C, the maximal tail current measured during repolarization (I_{-40 mV}) increased after rupture of the patch (a to b). After a delay, the deactivation time constant also increased dramatically (c; from 583±74 to 1911±653 ms; n=20). This was not observed in the presence of Mg²⁺ in the pipette (when measured 150 s after the patch rupture, tau_{deact} evolved from 430±46 to 381±70 ms; n=5; data not illustrated).

Fitting the relationship between tau_{deact} and maximal tail current amplitude (I_{-40 mV}; shown for 3 representative cells in Figure 6A) by using the equation obtained from the kinetic model presented in Figure 6B provided additional information. As shown in Figure 6A, the PIP₂ dissociation rate can be calculated (k'_{PIP2}=1/tau_{deact} at 0 current amplitude), as well as the maximum current amplitude (I_{max}), which corresponds to the current when available PIP₂ is maximal and is proportional to the number of channels present in the membrane patch. The PIP₂ binding rate can also be calculated, which varied during Mg²⁺ dilution: k_{PIP2}=k'_{PIP2}×(I_{-40 mV}/I_{max})/(1–I_{-40 mV}/I_{max}). The inferred k_{PIP2} variation (Figure 6C) suggested that the observed modification of the current amplitude and deactivation were attributable to an increase in the channel–PIP₂ interaction, which was reduced by intracellular magnesium before the patch rupture.⁹

Molecular Dissection of the Effect of R243H, R539W, and R555C on KCNQ1–KCNE1 Channel Activity

The same experiments were repeated using mutants R243H, R539W, and R555C. A four-step protocol was applied with voltages adapted to the mutant channel V_{0.5} (Figure 1, legend). To compare the different mutants, I_{-40 mV} was normalized using its maximum value calculated as in Figure 6A (I_{-40 mV}/I_{max}=P_o max). Plotting tau_{deact} as a function of P_o max (Figure 7A and 7B) indicated that k'_{PIP2} was greater with the three mutants.

Because the maximal current density (I_{max}) was not significantly different between wild-type and mutant channels (Figure 7D), we deduced that trafficking of mutant channel was not altered in our cells. A further analysis of the tau_{deact} relation to P_o max brought additional information on the mutant channel characteristics. We calculated the PIP₂ binding rate (k_{PIP2}) from the tau_{deact} versus P_o max relationship

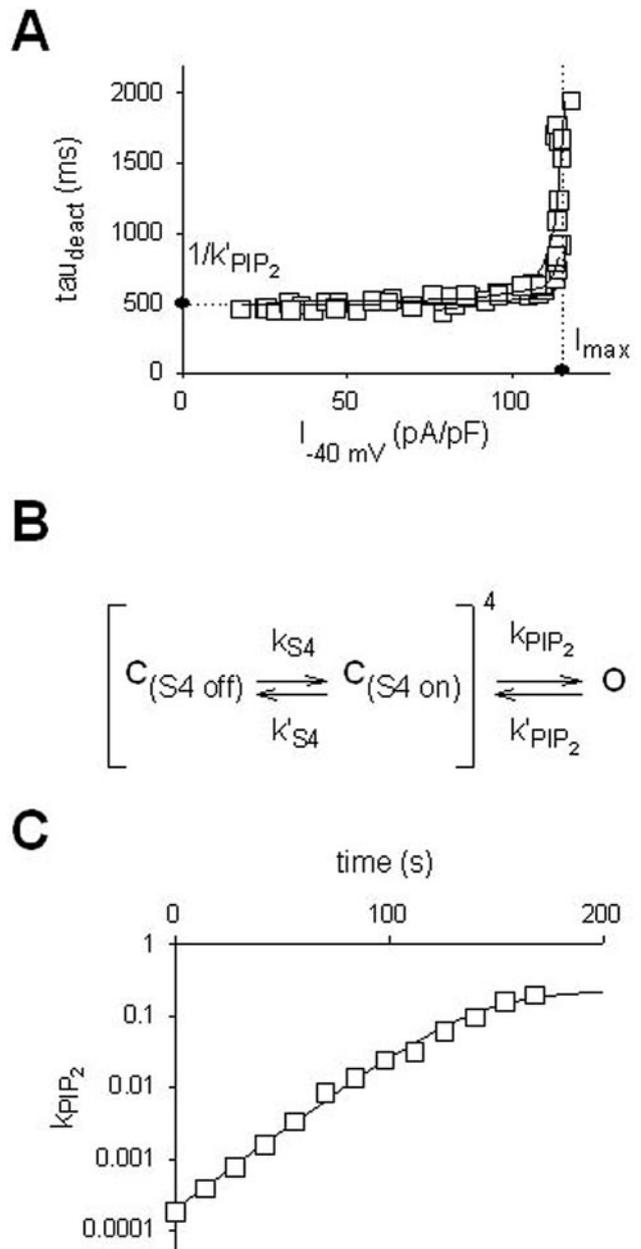


Figure 6. Calculation of PIP₂ binding and dissociation rates and maximum macroscopic conductance of wild-type channels. A, Calculation of the PIP₂ dissociation rate (k'_{PIP2}) and maximum macroscopic conductance from the plot of tau_{deact} vs tail current at –40 mV (I_{-40 mV} calculated as in Figure 5C and tau_{deact}, its time constant of deactivation). Equation 1 has been used to fit (lines) each experimental data obtained from three representative cells expressing wild-type (WT) channels. k'_{PIP2}=1/tau_{deact} when I_{-40 mV} is null. I_{max} is given by the fit vertical asymptote (dotted line). B, Kinetic scheme of KCNQ1–KCNE1 regulation.⁹ This simple model is based on the assumption that PIP₂ does not affect the voltage sensor (k_{S4}, k'_{S4}) but only the final closed state (C_{S4 on}) to the open state (O) transition when the four voltage sensors of the tetramer are in the permissive state. Hence, k_{S4}, k'_{S4}, and k'_{PIP2} are PIP₂ independent, and only k_{PIP2} varies during magnesium dilution. C, Calculated k_{PIP2} as a function of time after patch rupture in a representative cell.

(Figure 7C). As with the wild-type channels, the mutant k_{PIP2} increased as a function of time after patch rupture, suggesting an unmasking of PIP₂-negative charges during Mg²⁺ dilution. The equilibrium constant (k_{PIP2}/k'_{PIP2}) in the absence of

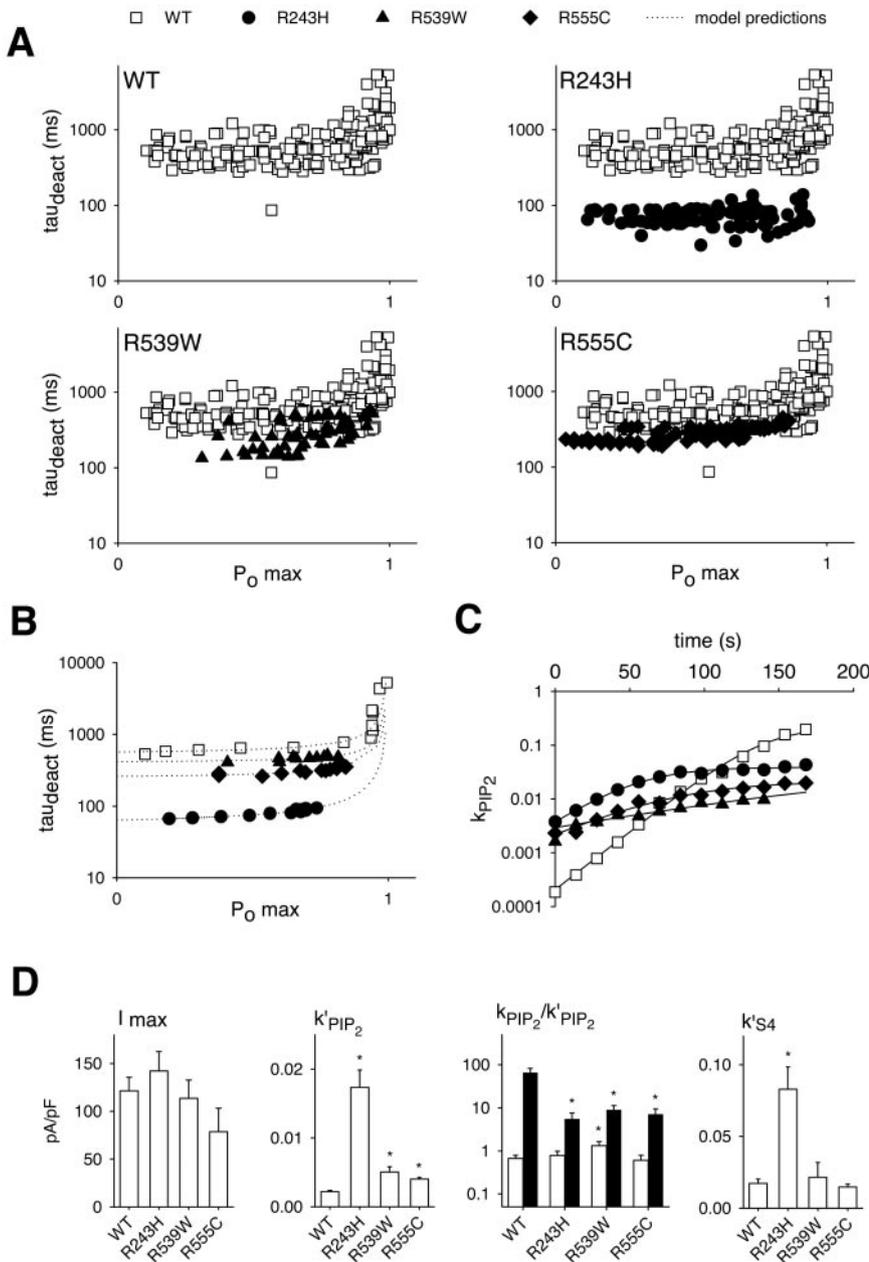


Figure 7. A molecular dissection of the effect of mutations R243H, R539W, and R555C on the KCNQ1-KCNE1 channel complex activity. **A**, Superimposed plots of τ_{deact} vs normalized $I_{-40\text{ mV}}$ ($P_o \text{ max} = I_{-40\text{ mV}}/I_{\text{max}}$) (wild-type [WT] $n=19$; R243H $n=11$; R539W $n=7$; R555C $n=7$). **B**, Representative plots of τ_{deact} vs $P_o \text{ max}$ for wild-type and mutant channels. **C**, Calculated k_{PIP_2} as a function of time after patch rupture (same cells as in **B**). Lines, Single exponential fit of k_{PIP_2} . **D**, Bar graphs summarizing all the parameters obtained from the above experiments. I_{max} (corresponding to the current when available PIP₂ is maximal) and k'_{PIP_2} calculated as in Figure 6A. $k_{\text{PIP}_2}/k'_{\text{PIP}_2}$ at the patch rupture (white bars) and extrapolated at time = ∞ from fit in **C** (black bars). k'_{S4} calculated from equation 1. * $P < 0.05$ compared with wild-type.

magnesium was smaller for every mutant compared with wild-type, suggesting a net decrease in the PIP₂ affinity for R243H, R539W, and R555C (Figure 7D).

Using the model, we calculated k'_{S4} for wild-type and mutant channels from the equation linking τ_{deact} to k_{PIP_2} , k'_{PIP_2} , and k'_{S4} (see Materials and Methods). Only R243H k'_{S4} differed from wild-type k'_{S4} (Figure 7D). This alteration in S4 properties is consistent with the position of the mutation (next to S4) and the change in the slope factor (k) of the activation curve.¹⁴ The change in k observed with R243H cannot be attributed to the decreased PIP₂ affinity because the R539W and R555C mutants showed a similar decrease in PIP₂ affinity as R243H (Figure 4) but no change in k . We conclude that the R243H mutation induces a decreased PIP₂ affinity and a modification of the movement of the S4 segments, the latter inducing a more pronounced loss of function through faster transitions of S4 from permissive to nonpermissive states.

Discussion

The present work shows that several long QT mutations are associated with a decreased PIP₂ sensitivity of the KCNQ1-KCNE1 channel complex. For R243H, an alteration in the voltage sensor was also detected. The R243H mutation has been identified in a proband that displayed a typical Jervell and Lange-Nielsen syndrome, a recessive syndrome that associates deafness and a long QT phenotype.¹⁵ The R539W and R555C mutations were identified in patients with a dominantly inherited classical long QT (Romano-Ward) syndrome.

We used a combination of patch-clamp experiments and modeling to dissect the effects of the three mutations on the channel activity. The τ_{deact} versus $P_o \text{ max}$ plots provided estimation of three major parameters of the channel activity: the channel density represented by I_{max} ,

the PIP₂ affinity ($k_{\text{PIP}_2}/k'_{\text{PIP}_2}$), and the voltage sensor integrity (k'_{S4}). Such an approach prevents misinterpretation that may have been caused by allosteric effects of the mutations on the channel activity. An alternative method to measure more directly the channel affinity for PIP₂ would be a binding assay. However, such assays are usually made on segments of the channel (eg, the N or C termini). Truncation may modify dramatically the structure of the channel domains and their affinity for PIP₂. For example, a recent attempt to establish a PIP₂-binding assay was unable to reveal PIP₂ binding to K_{ATP} channel N or C termini,²¹ although PIP₂ interaction with several residues of the N and C termini was clearly demonstrated by mutagenesis.^{10,11}

A recent article²² suggests a downregulation by PIP₂ of I_{Ks} (generated by KCNQ1–KCNE1) in guinea pig cardiac myocytes. This is apparently inconsistent with several studies, including ours,^{9,19} that suggest an activation of KCNQ1 channel by PIP₂. The study by Ding et al is also apparently inconsistent with the fact that the mutants studied here present a decreased PIP₂ affinity and provoke a loss-of-function phenotype in humans (long QT syndrome). One explanation to resolve this discrepancy is that in native tissues, direct PIP₂ activation of the channel may be present but masked by a stronger PIP₂ downregulation via as yet unidentified regulatory pathways. This hypothesis should be further tested in the future.

It was shown previously that intracellular application of polyvalent cations, including Mg²⁺, Ca²⁺, poly-L-lysine, and La³⁺, decreases the activity of PIP₂-regulated ion channels (K_{ATP}, Kir2.1, and Human Ether-a-gogo–Related Gene) by screening the PIP₂-negative charges and preventing the phosphoinositide interaction with positive residues of the channel.^{6,12,23} Similarly, KCNQ1 activity is decreased by poly-L-lysine, Ca²⁺, or Mg²⁺ application to the cytosolic face of the channel.^{9,19} Here we showed that Mg²⁺ is less potent to decrease the activity of mutant R539W because the equilibrium constant ($k_{\text{PIP}_2}/k'_{\text{PIP}_2}$) for R539W was significantly greater than for wild-type and other mutants measured in the presence of Mg²⁺ (Figure 7D). This observation suggests that the access of Mg²⁺ to PIP₂ is somehow impaired by the R539W mutation affecting the equilibrium constant.

The present work supports further similarities between inward rectifying channels and voltage-dependent potassium channels.^{9,24} In both categories, an alteration in channel–PIP₂ interaction could lead to hereditary disorders: Andersen's and Bartter's syndromes for Kir1.1 and Kir2.1 and long QT syndrome for KCNQ1. In inward rectifier channels (2 transmembrane domains), the residues supporting PIP₂ interaction are located in the N terminus and the C terminus. In voltage-dependent Kv channels (6 transmembrane domains), the residues supporting PIP₂ interaction are likely located in the S4–S5 linker (R243) and the C terminus (R539 and R555). The S4–S5 linker in Kv channels may correspond to the N terminus of inward rectifying channels, whereas the C terminus in Kv channels may correspond to the C terminus in inward rectifiers. This comparison provides new insight on the functional relationship between the voltage sensor and the gate in Kv

channels. Because the S5–S6 segment of Kv channels corresponds to the functional entity of an inward rectifier (M1–M2) with similar PIP₂ binding, and because PIP₂ binding controls the gate in inward rectifiers,²⁵ it is possible that the voltage sensor modulates PIP₂ binding of the channel gate (ie, that the PIP₂–channel interaction would link the voltage sensor and the gate). Our observation that R243H mutation affects PIP₂ binding and the voltage sensor supports this hypothesis.

The present study further confirms the physiological relevance of KCNQ1–PIP₂ interaction as suggested previously.⁹ Among the 100 KCNQ1 mutations reported so far, only a few have been linked to a dysfunction of KCNQ1 at the molecular level, including defective trafficking²⁶ and a dominant-negative effect.²⁷ This study describes a novel molecular mechanism leading to the long QT syndrome and identifies its nature (electrostatic), the partner (a phospholipid), and the functional consequence of the altered interaction (a decrease in the channel open state).

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM). G.L., J.M., and I.B. are recipients of a tenure position supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). We thank Karine Haurigné, Béatrice Leray, and Marie-Joseph Louerat for expert technical assistance.

References

- Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M, Romey G. K(V)LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature*. 1996;384:78–80.
- Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A, Shen J, Spector PS, Atkinson DL, Keating MT. Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature*. 1996;384:80–83.
- Roden DM, Lazzara R, Rosen M, Schwartz PJ, Towbin J, Vincent GM. Multiple mechanisms in the long-QT syndrome. Current knowledge, gaps, and future directions. The SADS Foundation Task Force on LQTS. *Circulation*. 1996;94:1996–2012.
- Li H, Chen Q, Moss AJ, Robinson J, Goytia V, Perry JC, Vincent GM, Priori SG, Lehmann MH, Denfield SW, Duff D, Kaine S, Shimizu W, Schwartz PJ, Wang Q, Towbin JA. New mutations in the KVLQT1 potassium channel that cause long-QT syndrome. *Circulation*. 1998;97:1264–1269.
- Hilgemann DW, Ball R. Regulation of cardiac Na⁺,Ca²⁺ exchange and KATP potassium channels by PIP₂. *Science*. 1996;273:956–959.
- Shyng SL, Nichols CG. Membrane phospholipid control of nucleotide sensitivity of KATP channels. *Science*. 1998;282:1138–1141.
- Hilgemann DW, Feng S, Nasuhoglu C. The complex and intriguing lives of PIP₂ with ion channels and transporters. *Sci STKE*. 2001;111:RE19.
- Hardie RC. Regulation of TRP channels via lipid second messengers. *Annu Rev Physiol*. 2003;65:735–759.
- Loussouarn G, Park KH, Bellocq C, Baro I, Charpentier F, Escande D. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PIP₂, controls KCNQ1/KCNE1 voltage-gated potassium channels: a functional homology between voltage-gated and inward rectifier K⁺ channels. *EMBO J*. 2003;22:5412–5421.
- Shyng SL, Cukras CA, Harwood J, and Nichols CG. Structural determinants of PIP₂ regulation of inward rectifier KATP channels. *J Gen Physiol*. 2000;116:599–607.
- Cukras CA, Jeliaskova I, Nichols CG. Structural and functional determinants of conserved lipid interaction domains of inward rectifying Kir6.2 channels. *J Gen Physiol*. 2002;119:581–591.
- Lopes CM, Zhang H, Rohacs T, Jin T, Yang J, Logothetis DE. Alterations in conserved Kir channel-PIP₂ interactions underlie channelopathies. *Neuron*. 2002;34:933–944.

13. Bian JS, Kagan A, McDonald TV. Molecular analysis of phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate regulation of HERG/IKr. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;287:H2154–H2163.
14. Chouabe C, Neyroud N, Guicheney P, Lazdunski M, Romey G, Barhanin J. Properties of KvLQT1 K⁺ channel mutations in Romano-Ward and Jervell and Lange-Nielsen inherited cardiac arrhythmias. *EMBO J.* 1997; 16:5472–5479.
15. Chouabe C, Neyroud N, Richard P, Denjoy I, Hainque B, Romey G, Drici MD, Guicheney P, Barhanin J. Novel mutations in KvLQT1 that affect I_{Ks} activation through interactions with Isk. *Cardiovasc Res.* 2000;45:971–980.
16. Schulze D, Krauter T, Fritzenschaft H, Soom M, Baukrowitz T. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) modulation of ATP and pH sensitivity in Kir channels. A tale of an active and a silent PIP₂ site in the N terminus. *J Biol Chem.* 2003;278:10500–10505.
17. Wang W, Xia J, Kass RS. MinK-KvLQT1 fusion proteins, evidence for multiple stoichiometries of the assembled I_{Ks} channel. *J Biol Chem.* 1998;273:34069–34074.
18. Couey JJ, Ryan DP, Glover JT, Dreixler JC, Young JB, Houamed KM. Giant excised patch recordings of recombinant ion channel currents expressed in mammalian cells. *Neurosci Lett.* 2002;329:17–20.
19. Zhang H, Craciun LC, Mirshahi T, Rohacs T, Lopes CM, Jin T, Logothetis DE. PIP₂ activates KCNQ channels, and its hydrolysis underlies receptor-mediated inhibition of M currents. *Neuron.* 2003;37:963–975.
20. Enkvetchakul D, Loussouarn G, Makhina E, Shyng SL, Nichols CG. The kinetic and physical basis of K(ATP) channel gating: toward a unified molecular understanding. *Biophys J.* 2000;78:2334–2348.
21. Thomas AM, Giblin JP, Wilson A, Tinker A. A biochemical approach to studying the interaction of anionic phospholipids with potassium channels domains. *J Physiol.* 2004;555P PC4. Abstract.
22. Ding WG, Toyoda F, Matsuura H. Regulation of cardiac I_{Ks} potassium current by membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem.* 2004;279:50726–50734.
23. Bian J, Cui J, McDonald TV. HERG K(+) channel activity is regulated by changes in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Circ Res.* 2001;89: 1168–1176.
24. Loussouarn G, Rose T, Nichols CG. Structural basis of inward rectifying potassium channel gating. *Trends Cardiovasc Med.* 2002;12:253–258.
25. Xiao J, Zhen XG, Yang J. Localization of PIP₂ activation gate in inward rectifier K⁺ channels. *Nat Neurosci.* 2003;6:811–818.
26. Gouas L, Bellocq C, Berthet M, Potet F, Demolombe S, Forhan A, Lescasse R, Simon F, Balkau B, Denjoy I, Hainque B, Baro I, Guicheney P; The D.E.S.I.R. Study Group. New KCNQ1 mutations leading to haploinsufficiency in a general population; Defective trafficking of a KvLQT1 mutant. *Cardiovasc Res.* 2004;63:60–68.
27. Shalaby FY, Levesque PC, Yang WP, Little WA, Conder ML, Jenkins-West T, Blannar MA. Dominant-negative KvLQT1 mutations underlie the LQT1 form of long QT syndrome. *Circulation.* 1997;96: 1733–1736.

Article 2 : Régulation de l'activité de KCNQ1 par la variation de l'interaction PIP₂-Mg²⁺ lors de stress osmotiques.

I. Introduction

De nombreux canaux ioniques sont osmosensibles, une propriété essentielle pour permettre à la cellule de survivre aux changements drastiques de l'osmolarité extracellulaire. Ce mécanisme adaptatif est nécessaire à la bactérie (Perozo, 2006), mais aussi aux cellules eucaryotes pour lesquelles ce phénomène est appelé *regulatory volume decrease* (RVD ; Hoffmann et Simonsen, 1989).

Décrit chez les procaryotes, un mécanisme majeur de l'osmosensibilité semble être un couplage entre la tension de la membrane et l'ouverture du canal (Perozo et coll., 2002). Pour les cellules eucaryotes, plusieurs mécanismes existent, dont principalement : (1) un couplage direct entre la tension membranaire et l'ouverture du canal à l'image des procaryotes (Kloda et coll., 2007) ; (2) une interaction avec le cytosquelette de telle manière que le canal s'ouvre lors du gonflement de la cellule (Hamill, 2006), (3) le recrutement de canaux au niveau de la membrane étirée (Lan et coll., 2006 ; Lim et coll., 2006) ou (4) une régulation de l'activité du canal par un facteur sensible à l'osmolarité (Zhang et coll., 2004).

Les canaux KCNQ1 sont activés par les solutions extracellulaires hypotoniques (Kubota et coll., 2002). De manière intéressante, cette osmorégulation est reliée à des processus physiologiques et pathologiques. Par exemple, dans les hépatocytes et les cellules épithéliales mammaires, KCNQ1 est impliqué dans le phénomène de régulation du RVD (Lan et coll., 2006 ; vanTol et coll., 2007). Sans doute en rapport avec son osmosensibilité, le courant cardiaque I_{Ks} généré par la co-expression de KCNE1 et KCNQ1 semble être également mécanosensible (sensible à l'étirement membranaire) puisqu'il serait impliqué dans le mécanisme de rétrocontrôle mécano-électrique (Lerman et coll., 2001), une modulation des propriétés électrophysiologiques lors de la charge des cavités du cœur. Très récemment, une mutation de KCNQ1 fut associée à la fibrillation auriculaire : le mutant KCNQ1 R14C présente une augmentation de sa sensibilité à la stimulation hypotonique (Otway et coll., 2007). Combinée à l'hypertension, connue pour provoquer un étirement des oreillettes, cette altération de la fonction de KCNQ1 induit des épisodes de fibrillation auriculaire. Le mécanisme suggéré est que l'augmentation anormale de l'activité de KCNQ1 est induite par la combinaison d'un étirement anormal de la paroi des oreillettes et par l'augmentation de la sensibilité à l'étirement de KCNQ1. Ce gain de fonction de KCNQ1 serait à l'origine des troubles du rythme cardiaque.

Premièrement, malgré ces résultats, aucune étude ne permet d'affirmer que la mécanosensibilité de KCNQ1 participe à son osmosensibilité. Et deuxièmement, le mécanisme de sensibilité de KCNQ1 à l'osmolarité n'est pas encore connu. Trois mécanismes ont été suggérés pour expliquer l'osmosensibilité de KCNQ1 : une interaction de l'extrémité N-terminale avec le cytosquelette (Grunnet et coll., 2003), le recrutement de nouveaux canaux via l'activation de la PLC (Lan et coll., 2006), et l'osmorégulation via une voie de signalisation, impliquant une tyrosine kinase (Missan et coll., 2006). Mais chacune de ces observations dépend finalement du modèle utilisé. L'implication du cytosquelette décrit dans les ovocytes de xénope n'est pas observée dans les cellules cardiaques (Wang et coll., 1996 ; Kubota et coll., 2002). Le prétraitement avec un inhibiteur de la tyrosine kinase réduit partiellement l'osmorégulation de I_{Ks} dans les myocytes ventriculaires de chien (Zhou et coll., 1997) et l'osmorégulation du courant KCNQ1/KCNE1 dans les cellules BHK (Missan et coll., 2006) mais pas dans les cellules Cos-7 (Kubota et coll., 2002). Cette apparente disparité suggère que l'élément clé pour comprendre l'osmorégulation de KCNQ1 est encore inconnu. Puisque KCNQ1 est sensible au PIP₂ et que ce phospholipide a déjà été démontré comme pouvant être impliqué dans l'osmorégulation des canaux GIRK (Zhang et coll., 2004) il est possible que le PIP₂ participe à l'osmorégulation de KCNQ1.

Un modèle d'étude des mécanismes d'osmorégulation se rapprochant de KCNQ1 est celui des canaux TRPM7 (*transient-receptor-potential melastatin 7*), des canaux ubiquitaires dans les cellules de mammifères, sélectifs aux ions divalents, et régulés par de nombreux seconds messagers activés par des récepteurs, dont le Mg²⁺ (Nadler et coll., 2001). Au même titre que les canaux KCNQ1, l'activité de ces canaux TRPM7 est dépendante du PIP₂ (Runnels et coll., 2002). Une étude suggère d'ailleurs que le Mg²⁺ régule l'activité du canal TRPM7 en interagissant de manière électrostatique avec les molécules de PIP₂ (Kozak et coll., 2005). De manière identique à KCNQ1, l'activité du canal TRPM7 est stimulée en condition hypotonique et réduite en condition hypertonique. Dans des cellules humaines de rein, il a été envisagé que cette osmosensibilité du canal TRPM7 soit due à la variation de la concentration cytosolique du Mg²⁺ libre lors des changements du volume cellulaire (Bessac et Fleig, 2007). Dans les cardiomyocytes de rat, la concentration du Mg²⁺ intracellulaire varie également en fonction de la morphologie de la cellule (Silverman et coll., 1994). Déjà suggéré par l'article 1, et confirmé par Suh et Hille (Suh et Hille, 2007), le Mg²⁺ régule l'activité des canaux KCNQ en interagissant de manière électrostatique avec le PIP₂. Le PIP₂ disponible est ainsi fonction de la concentration du Mg²⁺ intracellulaire.

Nous avons donc émis l'hypothèse que l'osmosensibilité du canal KCNQ1 puisse être due à une régulation de la disponibilité du PIP₂ membranaire liée à la variation du Mg²⁺ libre cytosolique induit par les changements de volume cellulaire.

II. Résultats

Une diminution de l'osmolarité stabilise l'état d'ouverture du canal KCNQ1-KCNE1.

Premièrement, nous avons voulu vérifier si le PIP₂ pouvait être impliqué dans l'osmorégulation de KCNQ1. Pour cela, nous avons testé si l'effet des variations de l'osmolarité sur les paramètres biophysiques du canal KCNQ1-KCNE1 est compatible avec un rôle du PIP₂ dans l'osmorégulation. De la même manière que dans l'article précédent (Park et coll., 2005), le concatémère est préféré aux sous-unités indépendantes afin de minimiser la variabilité des paramètres biophysiques présente avec les sous-unités indépendantes. La comparaison des courants en conditions hypotonique (70% de l'osmolarité de la solution contrôle) et hypertoniques (130% de l'osmolarité contrôle), révèle une augmentation significative de la densité de courant, un décalage vers des potentiels négatifs du potentiel de demi-activation ($V_{0,5}$) et un ralentissement des cinétiques de désactivation en condition hypotonique (figure 40). Les mêmes changements de l'amplitude et des caractéristiques biophysiques du courant KCNQ1-KCNE1 ont été décrits lors d'une augmentation du PIP₂ intracellulaire qui stabilise l'état d'ouverture du canal (Loussouarn et coll., 2003).

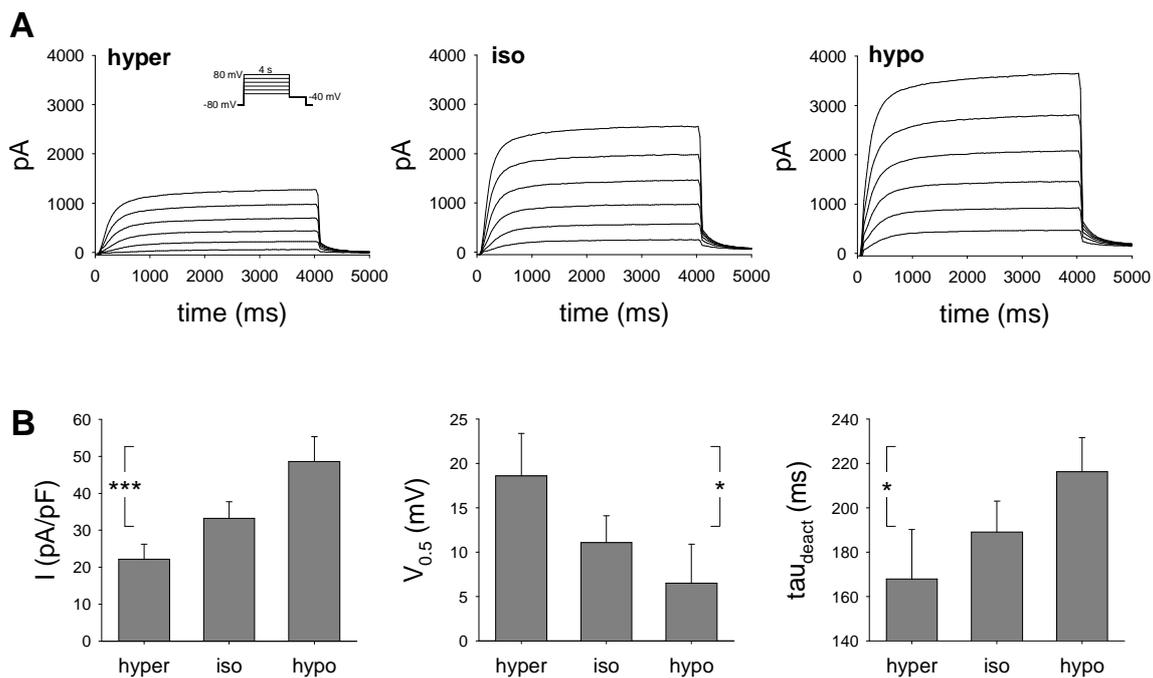


Figure 40 : Une diminution de l'osmolarité stabilise l'état d'ouverture du canal KCNQ1-KCNE1.

A. Représentation d'un courant KCNQ1-KCNE1 sauvage enregistré en configuration patch perméabilisé, en condition hypertonique (hyper), isotonique (iso) et hypotonique (hypo). Le protocole de stimulation est inséré en condition hypertonique. **B.** Moyennes des densités de courant de queue (I en pA/pF), de la $V_{0,5}$ (en mV) et des constantes de temps de désactivation (τ_{deact} en ms) du canal sauvage en conditions hyper-, iso- et hypotonique ($n = 11$). * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ (ANOVA une voie sur mesures répétées)

Ces résultats sont donc compatibles avec l'hypothèse d'une implication du PIP₂ dans l'osmorégulation du canal KCNQ1-KCNE1, et suggère une augmentation de la concentration de PIP₂ en condition hypotonique.

Le PIP₂ est impliqué dans l'osmorégulation du canal KCNQ1-KCNE1.

La deuxième expérience consiste à vérifier si la concentration du PIP₂ est modifiée lors des variations de l'osmolarité. Selon le modèle cinétique de KCNQ1 (Loussouarn et coll., 2003), l'activité du canal dépend de la quantité de PIP₂, le canal restant fermé en absence de PIP₂. Si l'osmorégulation de KCNQ1 fait intervenir une variation de la concentration du PIP₂, le fait d'imposer une concentration intracellulaire en diC8-PIP₂ en configuration cellule-entière doit bloquer toute réponse aux variations de l'osmolarité. L'augmentation de la concentration intrapipette en diC8-PIP₂ modifie l'amplitude des courants KCNQ1-KCNE1 enregistrés en condition contrôle, suggérant que le diC8-PIP₂ appliqué diffuse correctement jusqu'à ses sites de fixation sur les canaux exprimés (figure 41A).

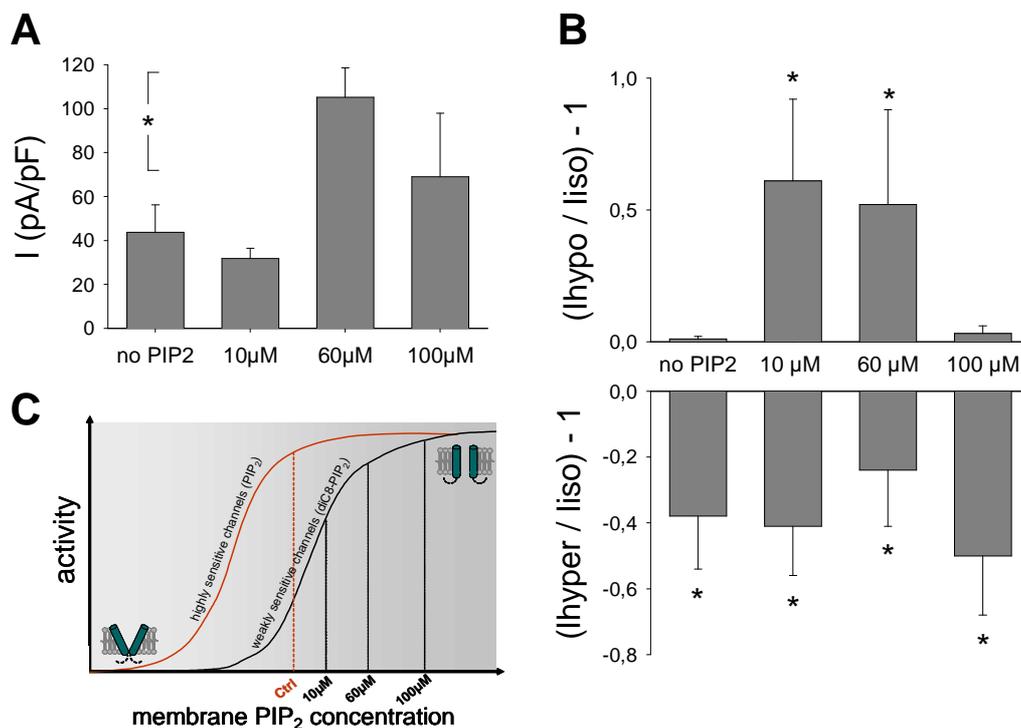


Figure 41 : Variation de la réponse à l'osmolarité de KCNQ1-KCNE1 en fonction de la concentration de PIP₂. **A.** Densités des courants de queue (-40 mV) en condition isotonique enregistrés 75 s après obtention de la configuration cellule-entière et mesurés après une dépolarisation de 1 s à +40 mV, en fonction de la concentration intrapipette de diC8-PIP₂ (n = 6). *P<0,05 (ANOVA 1 voie) **B.** Moyennes des réponses relatives des courants de queue du canal KCNQ1-KCNE1 aux conditions hypotonique et hypertonique en fonction de la concentration de diC8-PIP₂ (n = 6). *P<0,05 versus condition isotonique (Test de Tukey). **C.** Courbes théoriques de la manière dont l'affinité apparente des canaux ioniques pour le PIP₂ peut affecter leur sensibilité au changement du niveau de PIP₂.

A la concentration maximale de diC8-PIP₂ (100 µM), la réponse du canal KCNQ1-KCNE1 à l'hypotonie est entièrement inhibée. Seule la réponse à l'hyperosmolarité est conservée (figure 41B). Ceci suggère que la dose maximale de diC8-PIP₂ permet d'atteindre la probabilité d'ouverture maximale des canaux. Lors d'une diminution de l'osmolarité, les canaux sont donc déjà ouverts et ne peuvent atteindre un état d'ouverture supérieur (figure 41C). En revanche, pour des doses intermédiaires de diC8-PIP₂ (10 et 60 µM), proches de l'EC₅₀ du canal (EC₅₀ = 9,6 µM, Park et coll., 2005), l'osmorégulation du canal KCNQ1-KCNE1 est conservée (figure 41B). Malgré une concentration de PIP₂ constante, l'osmorégulation est conservée. Deux hypothèses peuvent être émises : (1) l'osmorégulation est indépendante du PIP₂, (2) la disponibilité du PIP₂ ou la sensibilité du canal au PIP₂ est modifiée par les changements osmotiques.

En marge de ces résultats, de manière étonnante, en condition contrôle (sans diC8-PIP₂), aucune activation du courant n'est enregistrée en condition hypotonique. Une explication possible à cette absence de réponse est que la sensibilité apparente au diC8-PIP₂ du canal KCNQ1-KCNE1 est différente de sa sensibilité au PIP₂ endogène à chaînes plus longues (figure 41C). Ainsi, si la sensibilité au PIP₂ endogène est supérieure à celle mesurée pour le diC8-PIP₂, la condition contrôle correspond finalement à une probabilité d'ouverture élevée du canal, d'où l'absence d'activation du canal en condition hypotonique. Ensuite, l'application de diC8-PIP₂ permet un échange des molécules de PIP₂ interagissant avec les canaux en faveur du diC8-PIP₂. En d'autres termes, aux doses intermédiaires de diC8-PIP₂ (10 µM et 60 µM), les canaux se caractérisent par une probabilité d'ouverture inférieure à la condition sans diC8-PIP₂.

Le canal mutant R539W ne répond pas à l'osmolarité.

Afin de vérifier le rôle potentiel du PIP₂ dans l'osmorégulation du canal KCNQ1-KCNE1, nous avons exploité la particularité de canaux KCNQ1 mutants moins affins au PIP₂ (R243H, R539W et R555C). L'hypothèse est que si le PIP₂ participe effectivement à l'osmorégulation du canal, la sensibilité des canaux à l'osmolarité doit être corrélée à leur affinité au PIP₂. Étant donné leur faible affinité au PIP₂, les canaux mutants doivent répondre différemment aux variations de l'osmolarité.

L'analyse des effets de l'osmolarité sur l'activité des canaux mutants, produit des résultats intrigants. Deux des trois mutants, R243H et R555C, avec une affinité au PIP₂ réduite répondent de la même manière que le canal sauvage aux variations de l'osmolarité. En revanche, le troisième canal mutant, R539W, présente la particularité de ne pas répondre aux changements d'osmolarité (figure 42A). Les comportements opposés des mutants R555C et R539W sont particulièrement difficiles à expliquer étant donné leur sensibilité au PIP₂ similaire (figure 42B). Néanmoins, la différence marquée entre les réponses à l'osmolarité du

canal sauvage et du canal mutant R539W, est un outil intéressant pour vérifier la participation du PIP₂ dans l'osmorégulation du canal KCNQ1-KCNE1.

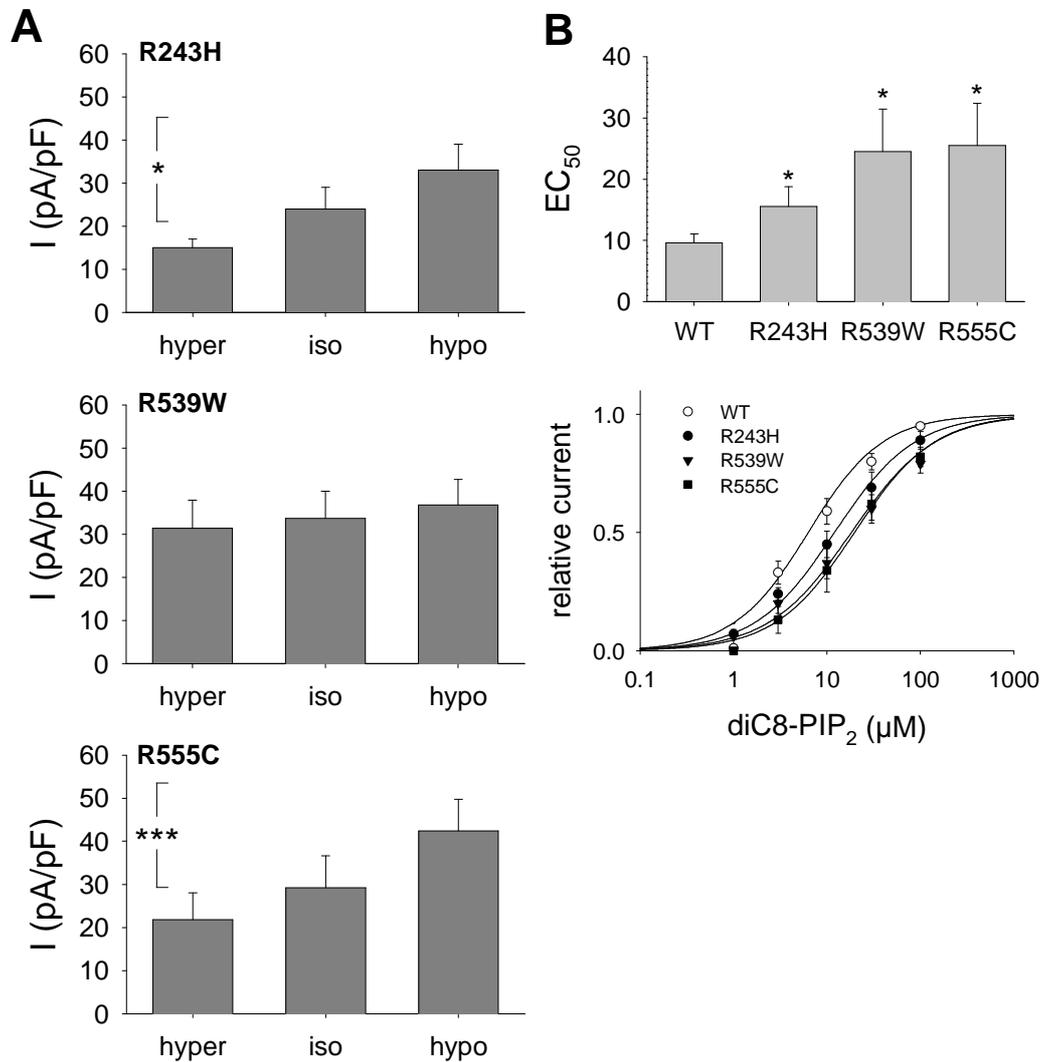


Figure 42 : R539W et R555C : des sensibilités différentes à l'osmolarité malgré une même affinité au PIP₂.

A. Effet des variations de l'osmolarité sur la densité des courants de queue (-40 mV) des canaux mutants après une activation complète du courant (+120 mV). *P<0,05 et ***P<0,001 (ANOVA une voie). **B.** Affinité apparente (EC₅₀) au diC8-PIP₂ et courbes dose-réponse de l'activité en fonction de la quantité de diC8-PIP₂ des canaux sauvage et mutants déterminées en configuration *giant-patch* (n = 8-10) (d'après Park et coll., 2005). *P<0,05 versus WT (test *t* de Student)

Les courbes d'activité des canaux mutants R243H et R555C en fonction de la quantité de PIP₂ sont compatibles avec une sensibilité à l'osmolarité identique au canal sauvage.

Connaissant la courbe dose-réponse de l'activité des canaux en fonction de la quantité de PIP₂, nous avons élaboré un modèle pour vérifier si finalement les sensibilités des canaux mutants à l'osmolarité devaient être différentes de celle du canal sauvage (figure 43). Sur la

base de l'affinité au diC8-PIP₂ mesurée dans la précédente étude (Park et coll., 2005), nous avons pu calculer le pourcentage de variation de la concentration en PIP₂ qui reproduit les variations de l'activité du canal sauvage en conditions iso-, hypo- et hypertonique. La diminution de la concentration de PIP₂ de 10 μ M à 4,5 μ M explique la diminution de l'activité du canal sauvage en condition hypertonique. De la même manière, l'augmentation du PIP₂ de 10 μ M à 22,5 μ M explique l'augmentation du courant en condition hypotonique. Une fois évalué cette variation théorique de la concentration en PIP₂, nous avons modélisé la réponse théorique des canaux mutants aux variations de PIP₂ estimées lors des changements d'osmolarité.

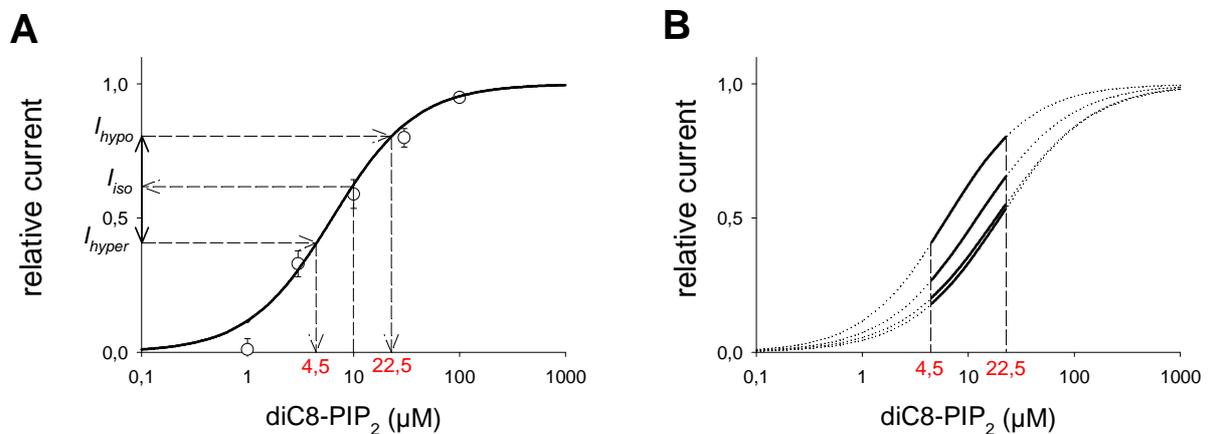


Figure 43 : Schéma explicatif de la modélisation des variations du PIP₂ en condition hypertonique et hypotonique. **A.** Sur la base de la courbe d'activité du canal sauvage en fonction de la quantité de PIP₂ (Park et coll., 2005), nous avons pu déterminer le pourcentage de variation de la concentration en PIP₂ en conditions hypotonique et hypertonique. La probabilité d'ouverture (P_o) théorique du canal sauvage en condition isotonique est déterminée pour une concentration de PIP₂ physiologique de 10 μ M. A partir des pourcentages d'augmentation et de diminution du courant en condition hypotonique et hypertonique, nous calculons les P_o théoriques dans ces deux conditions. Ainsi, les variations théoriques de la concentration de PIP₂ lors des changements d'osmolarité peuvent être déterminées. **B.** Courbes dose-réponse de l'activité des canaux sauvage et mutants (cf figure 37B). La partie continue des courbes désigne la zone de variation de l'activité des canaux lors des variations théoriques de la concentration de PIP₂ en conditions hypertonique et hypotonique.

Malgré leur affinité au PIP₂ réduite, la modélisation du comportement des deux canaux mutants R243H et R555C, révèle que leur réponse identique à celle du canal sauvage était prévisible (figure 44). Seule l'absence de réponse du mutant R539W n'est pas reproduite par ce modèle. La figure 38B illustre bien pourquoi les canaux mutants répondent de la même manière que le canal sauvage aux variations de l'osmolarité. Dans la zone de variation de la

concentration du PIP₂ membranaire, les pentes des courbes d'activité des canaux mutants en fonction de la concentration en PIP₂ sont similaires à la pente du canal sauvage. Les pourcentages de variation de l'activité du canal pour une même variation de la concentration membranaire en PIP₂ sont ainsi similaires quelque soit les canaux. Au contraire du canal mutant R539W, les réponses des canaux mutants R243H et R555C sont donc compatibles avec le modèle qui repose sur l'hypothèse d'une variation du PIP₂ lors des variations osmotiques.

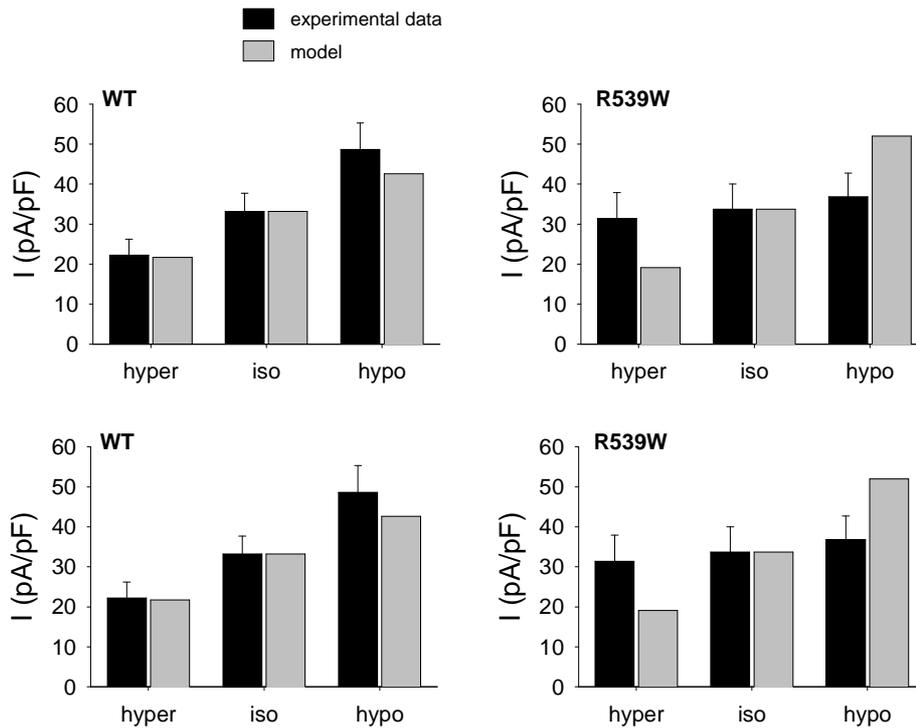


Figure 44 : Modélisation de la sensibilité à l'osmolarité des canaux KCNQ1-KCNE1 sauvage et mutants.

Amplitudes des courants des canaux sauvage et mutants mesurés expérimentalement ou modélisés en condition hyper-, iso- et hypotonique. Les données expérimentales sont celles illustrées en figure 35 (canal sauvage) et en figure 37 (canaux mutants).

Les mutants R243H et R555C n'infirment pas l'hypothèse d'une variation de PIP₂ disponible lors des changements d'osmolarité.

Pour vérifier si le modèle qui reproduit les variations de courant lors des variations de l'osmolarité est fidèle à la réalité, nous l'avons comparé à d'autres conditions de variation de la concentration de PIP₂. Une autre manière d'évaluer la sensibilité au PIP₂ des canaux est de diminuer la concentration du PIP₂ par l'application soit de wortmaninne, soit de Mg²⁺. L'application extracellulaire de wortmaninne en configuration de patch perméabilisé (Loussouarn et coll., 2001 ; Zhang et coll., 2003 ; Yasuda et coll., 2005) ou de Mg²⁺ sur la face intracellulaire en configuration *giant-patch* (Du et coll., 2004 ; Loussouarn et coll., 2003)

diminue le niveau du PIP₂ membranaire. En utilisant le même procédé de modélisation, il a été possible de modéliser les *rundowns* attendus des courants KCNQ1-KCNE1 en présence de Mg²⁺ ou de wortmaninne.

Partant de la concentration physiologique du PIP₂ membranaire correspondant à une probabilité d'ouverture intermédiaire du canal (10 μM, figure 43), la diminution du PIP₂ disponible en présence de wortmaninne se produit dans les mêmes zones que lors de l'augmentation de l'osmolarité, c'est-à-dire où les pentes des courbes d'activité en fonction de la quantité de PIP₂ sont équivalentes chez le canal sauvage et les canaux mutants (figure 45A).

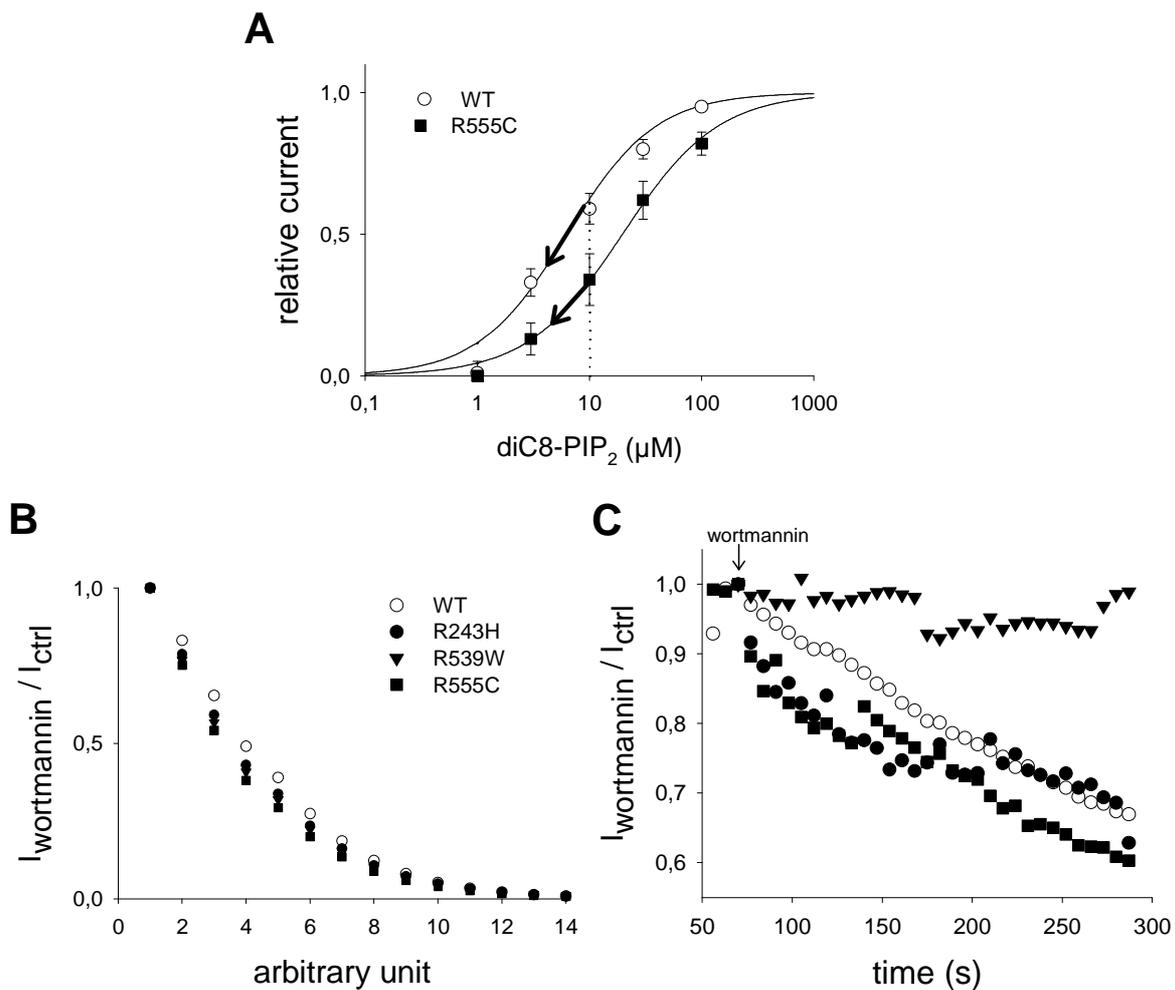


Figure 45 : Corrélation entre les réponses modélisées et expérimentales lors de la diminution du PIP₂ par l'action de la wortmaninne. **A.** Relation dose-réponse de l'effet du diC8-PIP₂ (en μM) sur l'activité du canal. Les flèches illustrent la réduction du courant causée par une diminution de la concentration de PIP₂. **B.** Modélisation de l'amplitude relative en fonction du temps des courants des canaux sauvage et mutants lors de l'application de wortmaninne. **C.** Moyennes des amplitudes relatives des courants des canaux sauvage et mutants mesurés à la fin de la dépolarisation à +80 mV, en fonction du temps durant l'application de la wortmaninne (10 μM) en configuration de patch perméabilisé. Pour plus de clarté les s.e.m ne sont pas représentées.

L'application de la wortmanine est donc susceptible de mimer la diminution du PIP₂ suggérée en condition hypertonique. La modélisation indique que les canaux mutants répondent à la wortmanine dans les mêmes proportions que le canal sauvage (figure 45B). Expérimentalement, l'application de wortmanine réduit progressivement l'activité des canaux KCNQ1-KCNE1 sauvages (figure 45C). De manière identique à la modélisation, les courants générés par le canal sauvage et les canaux mutants R243H et R555C diminuent en présence de wortmanine. A l'exception une nouvelle fois du canal mutant R539W, les réponses expérimentales des canaux mutants à la réduction du PIP₂ membranaire sont en accord avec la modélisation.

Nous venons de voir qu'en présence de wortmanine, les réponses des canaux mutants R243H et R555C et du canal sauvage sont identiques. Ceci est dû au fait que la probabilité d'ouverture des canaux avant l'application de la wortmanine se situe à un niveau intermédiaire défini par la concentration du PIP₂ (figure 45A). En revanche, si nous nous situons à une probabilité d'ouverture maximale (figure 46A), les différences entre les pentes des courbes dose-réponse des canaux sauvage et mutants laissent supposer des réponses différentes des canaux sauvage et mutants à la diminution du PIP₂ (figure 46B). Pour obtenir cette probabilité d'ouverture maximale puis diminuer la concentration du PIP₂, la configuration *giant-patch* est obtenue en absence de Mg²⁺, puis nous appliquons du Mg²⁺ sur la face cytoplasmique de la membrane plasmique. Dès l'obtention de la configuration *giant-patch*, le *runup* induit par la disparition du Mg²⁺ intracellulaire et donc par l'augmentation de la disponibilité du PIP₂ permet d'atteindre une probabilité d'ouverture maximale des canaux. Ensuite, l'application du Mg²⁺ sur la face cytoplasmique permet de diminuer la concentration du PIP₂. Expérimentalement, l'application intracellulaire de Mg²⁺ sur les membranes contenant les canaux KCNQ1-KCNE1 sauvages induit un *rundown* compatible avec une régulation du PIP₂. Au contraire du *rundown* induit par la wortmanine, le *rundown* induit par le Mg²⁺ est plus rapide pour les canaux mutants R243H et R555C que pour le canal sauvage (figure 46B et 46C).

A l'exception du canal mutant R539W, les réponses expérimentales des canaux mutants à la baisse de PIP₂ correspondent aux réponses modélisées. Le fait que les deux canaux mutants R243H et R555C conservent une sensibilité aux variations de l'osmolarité, malgré une affinité réduite au PIP₂, ne remet donc pas en cause la participation du PIP₂ membranaire à l'osmosensibilité du canal KCNQ1-KCNE1.

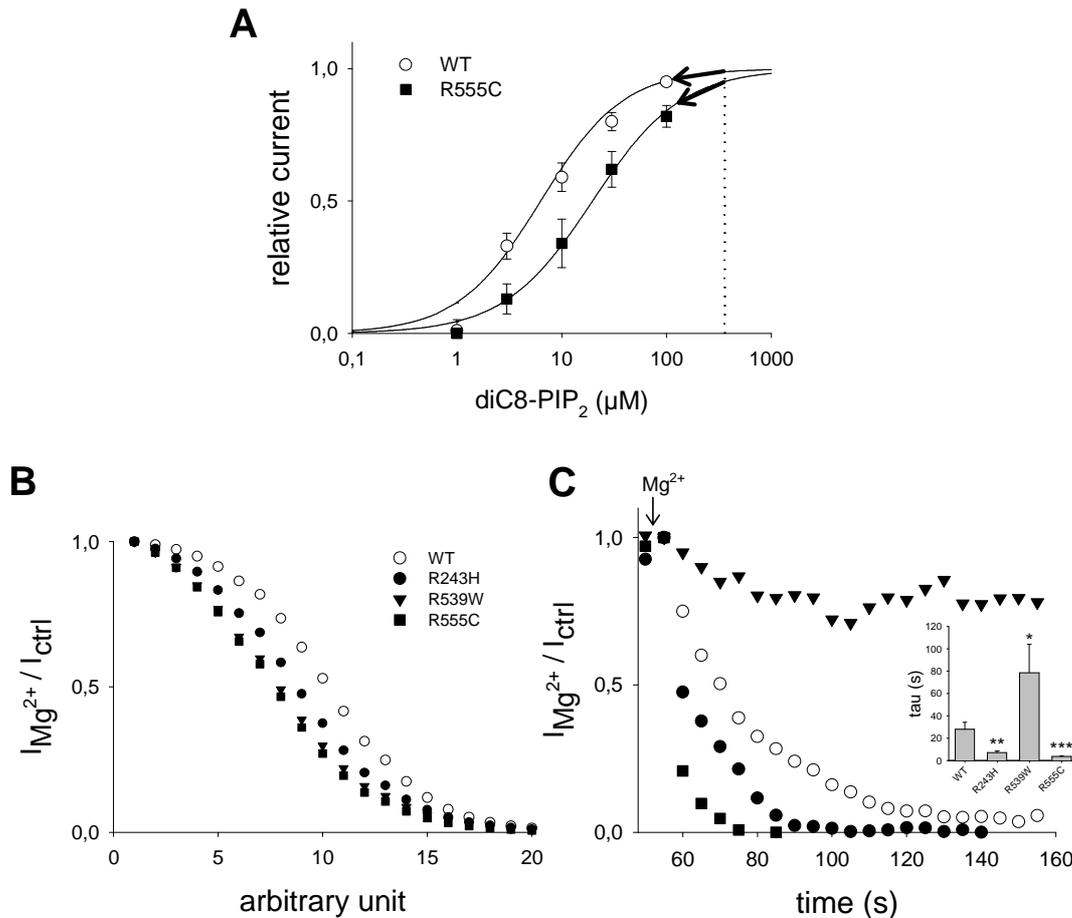


Figure 46 : Corrélation entre les réponses modélisées et expérimentales lors de la diminution du PIP₂ par l'application du Mg²⁺. **A.** Relation dose-réponse de l'effet du diC8-PIP₂ (en μM) sur l'activité du canal. Les flèches illustrent la réduction du courant causée par une diminution de la concentration de PIP₂. **B.** Modélisation de l'amplitude relative en fonction du temps des courants des canaux sauvage et mutants en présence de Mg²⁺. **C.** Amplitude relative des courants de queue (-40 mV) des canaux sauvage et mutants après une dépolarisation à +40 mV, en fonction du temps après application du Mg²⁺ (Mg²⁺) à la concentration libre calculée de 1,1 mM en configuration *giant-patch*. En insert, représentation des constantes de temps du *rundown* (tau en s) des canaux sauvage et mutants en présence de Mg²⁺. *P<0,05, **P<0,01 et ***P<0,001 versus WT (test *t* de Student).

Le mutant R539W est insensible à l'osmolarité, à la wortmaninne et au Mg²⁺.

A l'image de l'absence d'effet des variations d'osmolarité sur le canal R539W, l'application de wortmaninne, qui provoque la diminution du PIP₂, n'entraîne aucun effet sur l'activité de ce canal mutant (figure 45C), et le *rundown* induit par l'application de Mg²⁺ est presque inexistant pour le canal R539W (figure 46C). Le fait que ce mutant soit insensible à l'osmolarité et aux variations de PIP₂ disponible suggère un rôle du PIP₂ disponible dans l'osmorégulation du canal. Si ce mutant nous est utile pour faire le lien entre osmorégulation

et PIP₂, le mécanisme moléculaire qui rend ce canal insensible aux variations du PIP₂ reste inexpliqué. Nous donnerons des hypothèses sur ce mécanisme plus loin (§ Discussion – conclusion).

L'osmorégulation du canal KCNQ1-KCNE1 ne met pas en jeu sa mécanosensibilité.

Bien que la régulation du courant KCNQ1-KCNE1 et de I_{Ks} natif soit correctement documentée, l'activation du canal par l'étirement n'est pas caractérisée. Des études réalisées sur des cardiomyocytes de cobaye suggèrent que la mécanosensibilité est un mécanisme parallèle à l'osmosensibilité (Sasaki et coll., 1994 ; Wang et coll., 1996). Nous avons donc voulu vérifier si, dans notre modèle d'étude, la mécanosensibilité met en jeu les mêmes mécanismes de régulation de KCNQ1 que l'osmosensibilité.

En configuration cellule-attachée, l'activité du canal est augmentée par une pression négative appliquée à travers la pipette de patch (figure 47). De plus, la sensibilité à l'étirement est similaire en configuration cellule-attachée, et en configuration de *giant-patch*, que ce soit avant le *rundown* et après compensation du *rundown* par ajout de PIP₂ et MgATP (Loussouarn et coll., 2003). Ces résultats signifient que la mécanosensibilité du canal KCNQ1-KCNE1 est indépendante d'un quelconque élément cytosolique participant à une voie de signalisation, puisque cet élément en question est absent en configuration *giant-patch*.

L'étude de l'évolution des paramètres biophysiques en fonction de l'augmentation de la pression, indique que seules les cinétiques d'activation sont modifiées en réponse à l'étirement membranaire (figure 47C). Contrairement aux réponses à l'osmolarité, les constantes de désactivation ne sont pas modifiées en réponse à l'étirement membranaire (Figure 47D). La potentialisation du courant KCNQ1-KCNE1 observée que ce soit en réponse à l'étirement ou en réponse aux variations de l'osmolarité ne met donc probablement pas en jeu les mêmes propriétés du canal.

L'étude de la réponse du canal mutant R539W à l'étirement membranaire confirme cette hypothèse. A l'image du canal sauvage, l'étirement membranaire active le canal et accélère ses cinétiques d'activation ($\tau_{act} = 367 \pm 56$ ms à 0 cm H₂O contre 274 ± 41 à -20 cm H₂O, n = 6 ; p<0,01). Le canal R539W, pourtant insensible aux variations de l'osmolarité, est donc sensible à l'étirement membranaire. Ces résultats suggèrent que l'osmorégulation du canal KCNQ1-KCNE1 ne met pas en jeu la mécanosensibilité du canal. La sensibilité à l'étirement et la sensibilité aux variations de l'osmolarité sont donc deux phénomènes distincts.

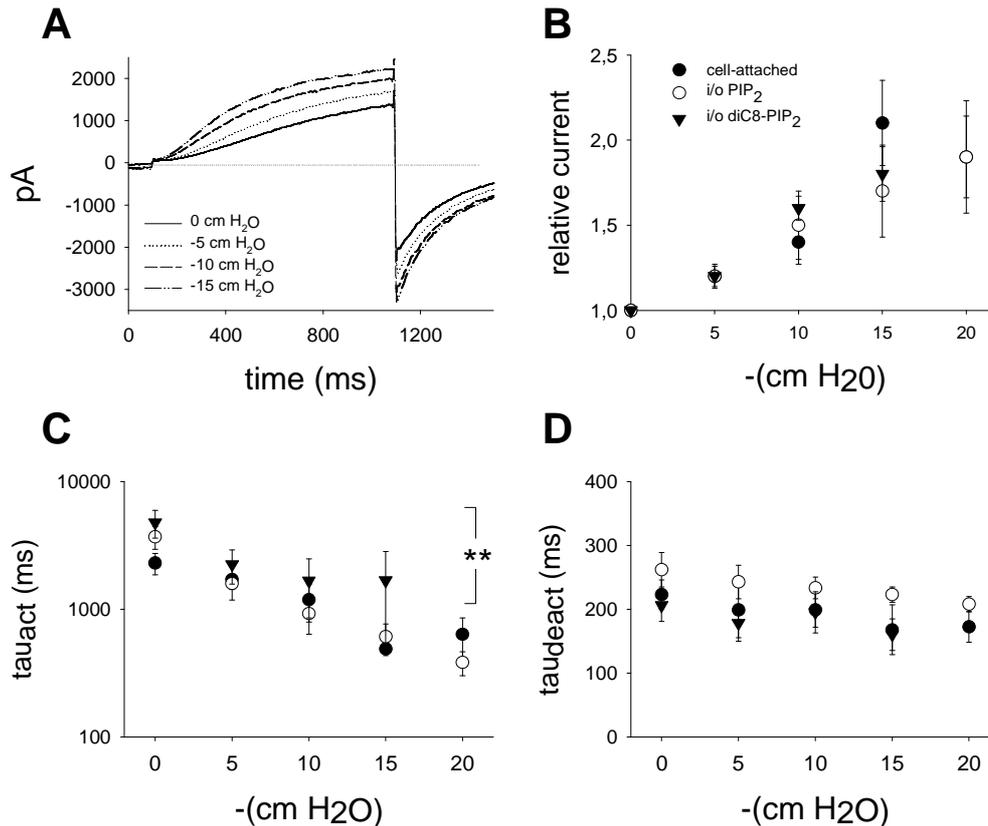


Figure 47 : L'étirement membranaire active le canal KCNQ1-KCNE1 par une voie différente de l'osmorégulation. **A.** Enregistrements représentatifs de la réponse du courant KCNQ1-KCNE1 à l'étirement membranaire en configuration *giant-patch* en présence de 10 μ M de diC8-PIP₂ + 1,4 mM MgATP (n = 5–12). **B.** Courants relatifs de KCNQ1-KCNE1 en réponse aux pressions négatives en configuration cellule-attachée (cell-attached), et en configuration *giant-patch* soit avant le *rundown* (i/o PIP₂) soit après compensation du *rundown* par du diC8-PIP₂ et du MgATP (i/o diC8-PIP₂) (n = 4-12). **C et D.** Moyennes des constantes de temps d'activation (τ_{act} en ms, n = 3-10) et de désactivation (τ_{deact} en ms, n = 3-12). **P<0,05 (ANOVA 2 voies sur mesures répétées)

Le cytosquelette ne participe pas à l'osmosensibilité de KCNQ1-KCNE1

Puisque la mécanosensibilité du canal KCNQ1-KCNE1 n'est pas mise en jeu lors de son osmorégulation, nous pouvons formuler l'hypothèse que c'est la variation du volume cellulaire qui contrôle l'osmosensibilité du canal KCNQ1-KCNE1.

Si la régulation du volume cellulaire est réellement mise en jeu dans l'osmosensibilité du canal KCNQ1-KCNE1, le cytosquelette, qui joue un rôle important dans la structure et la morphologie cellulaire, est la première entité susceptible de participer à cette régulation. La cytochalasine D est un agent bloqueur de la polymérisation des filaments d'actine qui sont un acteur majeur du cytosquelette cellulaire. La réponse aux variations de l'osmolarité des cellules préalablement traitées à la cytochalasine D (1mM) est identique à celle des cellules

contrôles, suggérant que l'actine ne participe pas à l'osmorégulation du canal KCNQ1-KCNE1 médiée par la variation du volume cellulaire (figure 48A).

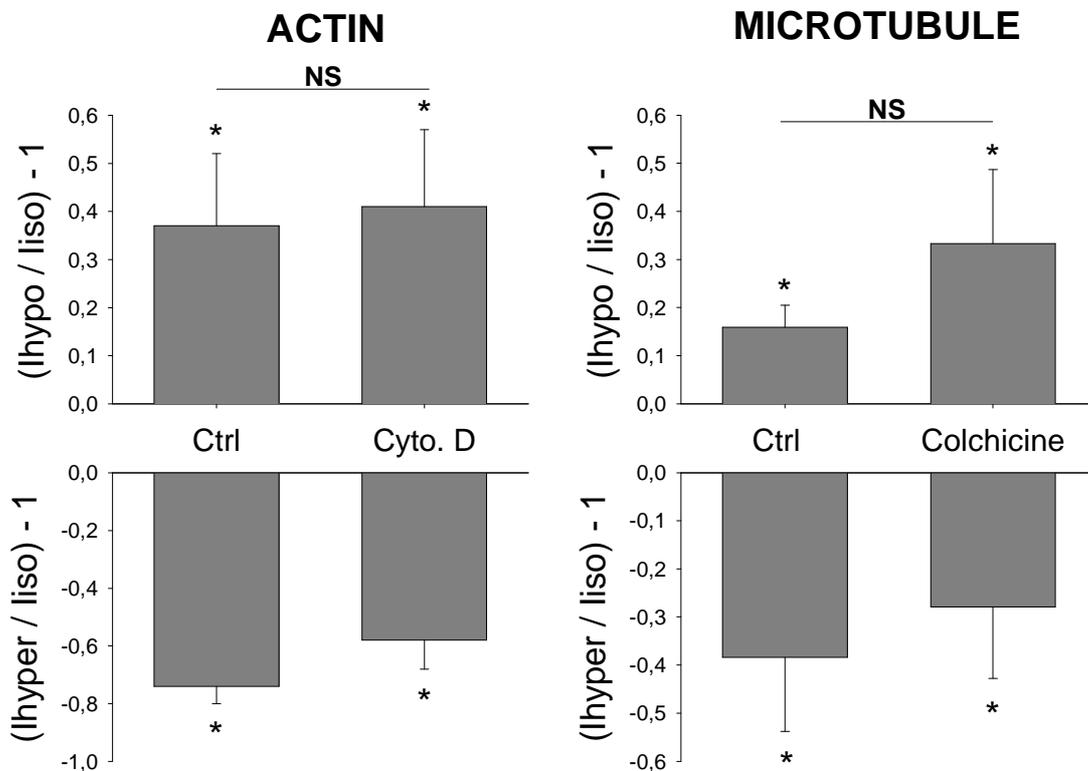


Figure 48 : Le cytosquelette ne participe pas à l'osmorégulation de KCNQ1-KCNE1

A. Moyennes des réponses relatives des courants de queue du canal KCNQ1-KCNE1 aux conditions hypo et hyperosmolaire en absence (Ctrl) ou en présence (Cyto. D) de traitement à la cytochalasine D (1mM, prétraitement 1 h à 37°C) (n = 6-7). *P<0,05 versus condition isotonique (Test de Tukey). **B.** Moyennes des réponses relatives des courants de queue du canal KCNQ1-KCNE1 aux conditions hypo et hyperosmolaire en absence (Ctrl) ou en présence (Colchicine) de traitement à la colchicine (n = 7-9). *P<0,05 versus condition isotonique (Test de Tukey) (Nicolas et coll.).

Une autre étude réalisée dans notre laboratoire et qui concerne l'interaction directe entre le canal KCNQ1/KCNE1 et les microtubules nous a permis de démontrer que les microtubules ne sont pas non plus impliqués dans l'osmorégulation de KCNQ1/KCNE1 (Nicolas et coll., en préparation). Après traitement à la colchicine, un activateur de la dépolymérisation des microtubules, la réponse du courant KCNQ1/KCNE1 en condition hypotonique et hypertonique est identique à celle des cellules Cos-7 non traitées (figure 48B). Puisque après dépolymérisation des microtubules, la réponse de KCNQ1/KCNE1 aux variations de l'osmolarité est conservée, les microtubules, au même titre que l'actine, ne sont pas impliqués dans la sensibilité du canal KCNQ1-KCNE1 aux variations de l'osmolarité.

Cette sensibilité du canal, apparemment médiée par la variation du volume cellulaire, ne semble donc pas être régulée par le cytosquelette intracellulaire.

Le Mg²⁺ intracellulaire participe à l'osmorégulation de KCNQ1-KCNE1

Etant donné que le cytosquelette n'est pas impliqué dans l'osmorégulation, il est possible d'imaginer que ce soit la variation de la concentration d'une molécule intracellulaire qui soit impliquée dans l'osmorégulation du canal KCNQ1-KCNE1 suite à la variation du volume cellulaire. Les changements de volume qui se produisent lors de stress osmotiques conduisent à la dilution ou à la concentration de polycations ou d'ions divalents, dont le Mg²⁺ (Nadler et coll., 2001 ; Kozak et coll., 2005 ; Hermosura et coll., 2002 ; Demeuse et coll., 2006). Dernièrement, il a été démontré que le Mg²⁺ interagit directement de manière électrostatique avec le PIP₂ membranaire en contact avec les canaux KCNQ (Suh et Hille, 2007). Il est donc possible que l'augmentation du volume cellulaire en condition hypotonique induise une dilution du Mg²⁺ intracellulaire et par voie de conséquence une augmentation du PIP₂ disponible, à l'origine de l'augmentation de l'activité du canal KCNQ1-KCNE1.

En configuration cellule-entière, nous avons comparé la réponse des canaux KCNQ1-KCNE1 aux variations de l'osmolarité en présence de Mg²⁺ (1 mM dans le milieu intrapipette) et en absence de Mg²⁺ (zéro Mg²⁺ + EDTA 3 mM) (figure 49A). La régulation du courant KCNQ1-KCNE1 observée en présence de Mg²⁺ est fortement inhibée en absence de Mg²⁺ intracellulaire (EDTA). La différence significative des réponses du courant entre les deux conditions suggère une participation du Mg²⁺ intracellulaire dans l'osmorégulation du canal KCNQ1-KCNE1.

Dans le but de vérifier si des variations physiologiques supposées du niveau du Mg²⁺ intracellulaire peuvent avoir une conséquence significative sur l'activité du canal KCNQ1-KCNE1, une courbe dose-réponse du Mg²⁺ sur l'activité du canal fut réalisée en configuration *giant-patch* (figure 49B). L'IC₅₀ et la constante de la pente H (IC₅₀ = 1,43 ± 0,18 et H = 3,56 ± 0,59, n = 7) déterminés révèlent que la sensibilité du canal KCNQ1-KCNE1 au Mg²⁺ intracellulaire laisse supposer une possible régulation significative de l'activité du canal par la variation de la concentration intracellulaire du Mg²⁺ libre. L'EC₅₀ mesurée étant très proche de la concentration cytosolique du Mg²⁺ d'environ 1 mM (Gupta et coll., 1984 ; White et Hartzell, 1989 ; London, 1991 ; Romani et coll., 2000), toute modification de la concentration du Mg²⁺ est susceptible de réguler positivement ou négativement l'activité de KCNQ1 (figure 49C).

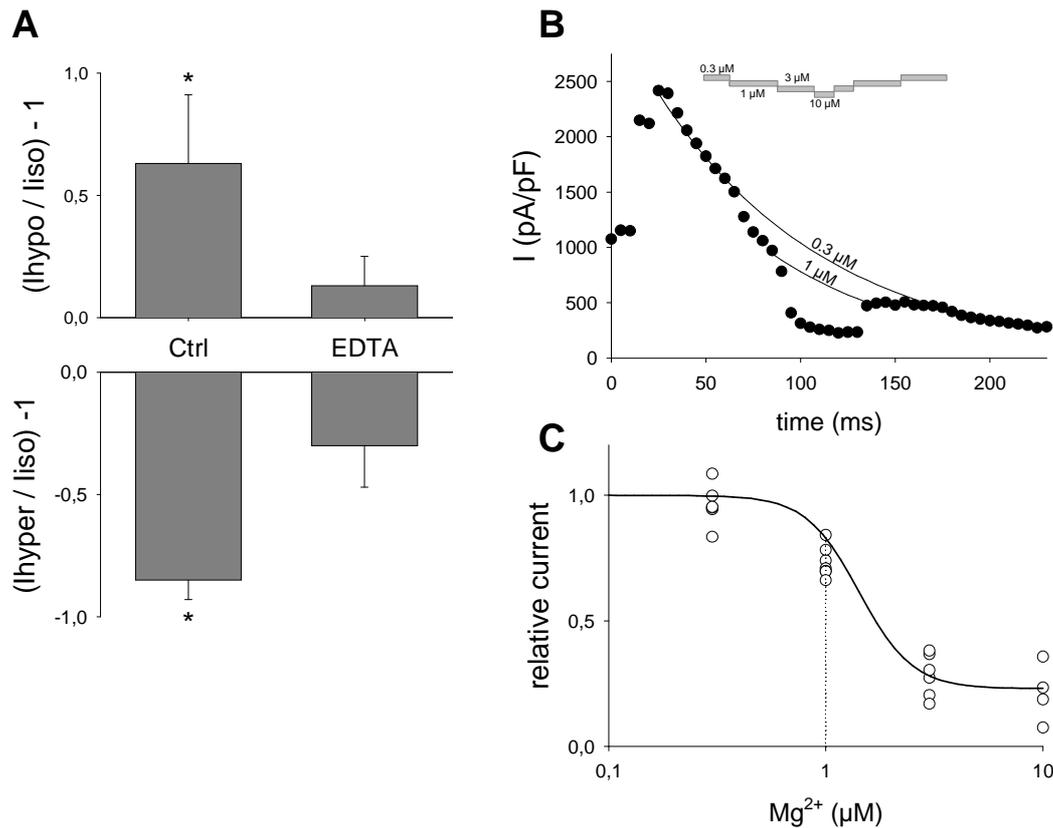


Figure 49 : Le Mg²⁺ intracellulaire participe à l'osmorégulation de KCNQ1-KCNE1

A. Moyenne des réponses relatives des courants de queue du canal KCNQ1-KCNE1 aux conditions hypotonique et hypertonique en présence (Ctrl, n = 5) ou en absence de Mg²⁺ (EDTA 3 mM, n = 7). *P<0,05 versus condition isotonique (Test de Tukey). **B.** Représentation en fonction du temps d'un enregistrement en *giant-patch* de l'amplitude d'un courant KCNQ1-KCNE1 sauvage mesuré à +40 mV durant l'application des différentes doses de Mg²⁺. Noter le *rundown* dû à l'absence de PIP₂ et de Mg_{ATP}. **C.** Effet du Mg²⁺ intracellulaire sur l'activité relative du canal KCNQ1-KCNE1 sauvage en *giant-patch*. Les données expérimentales sont représentées sous forme de points (n = 4-6). La courbe correspond à l'équation de type Hill qui permet de déterminer l'IC₅₀ et la constante de la pente. Les pointillées indiquent la probabilité d'ouverture théorique pour une concentration physiologique de Mg²⁺ (1 μM).

Pour confirmer l'implication du Mg²⁺ dans l'osmorégulation de KCNQ1, nous devons mesurer la variation de concentration de Mg²⁺ intracellulaire dans les cellules Cos lors de stress osmotiques. L'utilisation d'une sonde spécifique du Mg²⁺, mag-indo-1, permettra de quantifier les variations de la concentration cytosolique du Mg²⁺ en condition isotonique, hypertonique et hypotonique. Connaissant la courbe dose-réponse du courant vis à vis du Mg²⁺, nous vérifierons si cette variation de Mg²⁺ explique la variation de courant.

III. Discussion - conclusion

Notre étude suggère le Mg²⁺ en tant que médiateur de l'osmorégulation du canal KCNQ1-KCNE1 via la modulation du PIP₂ disponible. Trois observations supportent l'idée que le niveau de PIP₂ disponible varie pour adapter l'activité du canal aux conditions osmotiques. Premièrement, la diminution de l'osmolarité, en passant de la condition hypertonique à la condition hypotonique, conduit à une augmentation de l'activité du canal, à un décalage de la courbe d'activation vers des potentiels négatifs et à un ralentissement des cinétiques de désactivation. L'augmentation du PIP₂ membranaire a strictement les mêmes effets. Deuxièmement, le canal mutant R539W est insensible aux variations du PIP₂ et aux variations de l'osmolarité. Et troisièmement, l'augmentation du courant KCNQ1-KCNE1 lors de l'augmentation du PIP₂ bloque toute stimulation du courant par l'hypotonie.

Quant à l'implication du Mg²⁺, d'une part, en absence de tout Mg²⁺ intracellulaire l'osmorégulation du canal KCNQ1-KCNE1 est quasi nulle, et d'autre part, la sensibilité du canal KCNQ1-KCNE1 au Mg²⁺ intracellulaire est compatible avec une régulation physiologique du canal lors des variations du niveau de Mg²⁺ libre. Puisque la régulation des canaux KCNQ par le Mg²⁺ se fait par l'intermédiaire de l'interaction Mg²⁺-PIP₂ (Suh et Hille, 2007), nous pouvons envisager que la variation du Mg²⁺ intracellulaire lors des variations osmotiques permet de réguler la quantité de PIP₂ disponible et donc de moduler l'activité du canal KCNQ1-KCNE1.

Un mécanisme alternatif pourrait être que l'interaction canal-PIP₂ permette un lien physique entre la membrane plasmique et le canal nécessaire à la mécanosensibilité. Or, nous avons démontré que les réponses de KCNQ1 à l'étirement membranaire et aux variations de l'osmolarité mettent en jeu deux mécanismes différents. Lors de la diminution de l'osmolarité, l'activation de KCNQ1 se traduit par un décalage de la dépendance au potentiel vers des potentiels négatifs et un ralentissement de la désactivation. En revanche, en réponse à l'étirement membranaire, seule l'accélération des cinétiques d'activation participe à l'activation du canal sauvage. De plus, le canal mutant R539W pourtant insensible aux variations de l'osmolarité, répond à l'étirement membranaire de manière similaire au canal sauvage.

D'autres observations viennent confirmer l'hypothèse que la mécanosensibilité de KCNQ1-KCNE1 ne participe pas à son osmorégulation. Que ce soit en configuration cellule-attachée ou en *giant-patch*, l'activité de KCNQ1-KCNE1 est stimulée de la même manière par l'étirement membranaire, tant au niveau de l'amplitude que des cinétiques d'activation. Contrairement à l'osmorégulation, la mécanosensibilité est donc indépendante du contenu intracellulaire. En absence de Mg²⁺ intracellulaire (+ EDTA), la régulation de l'activité de KCNQ1-KCNE1 par les variations de l'osmolarité est quasi nulle, ce qui démontre l'absence

ou du moins le faible rôle de la mécanosensibilité du canal. Enfin, l'interférence du cytosquelette dans la mécanosensibilité a été reportée pour de nombreux canaux activés par l'étirement tels que les canaux BK et les canaux Cl (Sakai et coll., 1999 ; Piao et coll., 2003). Or, nos expériences réalisées après traitement à la cytochalasine D ou à la colchicine indiquent que le cytosquelette cellulaire ne participe pas à l'osmorégulation de KCNQ1-KCNE1. Il s'agit d'un argument supplémentaire en faveur de la non implication de la mécanosensibilité du canal lors de son osmorégulation. Il faut tout de même noter que, sans que l'on puisse expliquer cette disparité, dans des ovocytes de xénope, le traitement à la cytochalasine D bloque la réponse du canal KCNQ1-KCNE1 à l'hypotonie (Grunnett et coll., 2003), suggérant une implication du cytosquelette dans l'osmosensibilité du canal dans ce modèle. Mais à l'inverse, l'étude de l'osmosensibilité de I_{Ks} dans les cellules ventriculaires de cobayes révèle, comme notre étude, l'absence de rôle du cytosquelette (Wang et coll., 1996).

Le cas particulier du canal mutant R539W, insensible au PIP₂ et au stress osmotique, est un argument majeur en faveur du rôle du PIP₂ dans l'osmorégulation du canal sauvage. Les mutants R555C et R539W ont des courants maximums identiques au canal sauvage, ce qui suggère qu'ils sont correctement exprimés et exportés à la membrane. Bien que possédant des sensibilités au PIP₂ similaires (figure 42B), leurs sensibilités aux variations de l'osmolarité sont différentes. De plus, l'activité du mutant R539W est insensible aux variations du PIP₂ en présence de wortmannine et de Mg²⁺, alors que typiquement, les canaux moins affins au PIP₂ présentent une réduction plus rapide de leur activité en comparaison du canal sauvage (R243H et R555C dans cette étude et Du et coll., 2004).

Afin de vérifier si l'insensibilité du canal mutant R539W est bien spécifiquement liée à son insensibilité aux variations du PIP₂, nous avons testé l'éventualité que l'absence de réponse du canal mutant R539W soit due à la perte d'une autre voie de régulation du canal KCNQ1 : la phosphorylation du canal dépendante de la PKA. En présence d'AMPC en configuration de patch perméabilisé, nous observons une réponse similaire des canaux sauvage et mutant (WT, de 31,6 ± 6,4 pA/pF à 46,4 ± 5,1 pA/pF et R539W, de 20,8 ± 4,5 pA/pF à 28 ± 4 pA/pF, n = 8-9). Le canal mutant R539W conserve donc une dépendance au potentiel et une régulation par la PKA. Ces résultats confortent l'hypothèse d'une insensibilité du canal mutant R539W spécifique au PIP₂ et à l'osmolarité.

Pour tenter de mieux comprendre cette particularité du mutant R539W, nous avons collaboré avec Annick Thomas et Robert Brasseur, qui suggèrent par une modélisation structurale, une interaction tryptophane-cholestérol. Puisque le tryptophane, substitué à l'arginine, est capable d'interagir avec le cholestérol, nous avons envisagé que l'insensibilité au variation du niveau de PIP₂ soit liée à une substitution de l'interaction électrostatique entre l'arginine et le PIP₂ par une interaction entre le tryptophane et d'autres lipides du type du cholestérol. La structure cyclique du cholestérol rend la molécule plus rigide que les lipides à

chaînes aliphatiques et la tête polaire hydroxyle du cholestérol est courte en comparaison de la tête polaire des autres lipides. Enfin, le cholestérol possède des propriétés particulières, telles que celle de participer à la structure des rafts lipidiques, et est connu pour être un ligand des motifs CRAC (Epanand et coll., 2006), où l'arginine très polaire interagit avec les têtes polaires des lipides à l'extérieur de la membrane plasmique. Comme l'illustre la figure 10, le tryptophane et le cholestérol reposent au même niveau de la membrane et interagissent. Le tryptophane peut interagir spécifiquement avec le cholestérol sous la forme d'une structure rigide stabilisée par des interactions CH- π entre les différents cycles (figure 50).

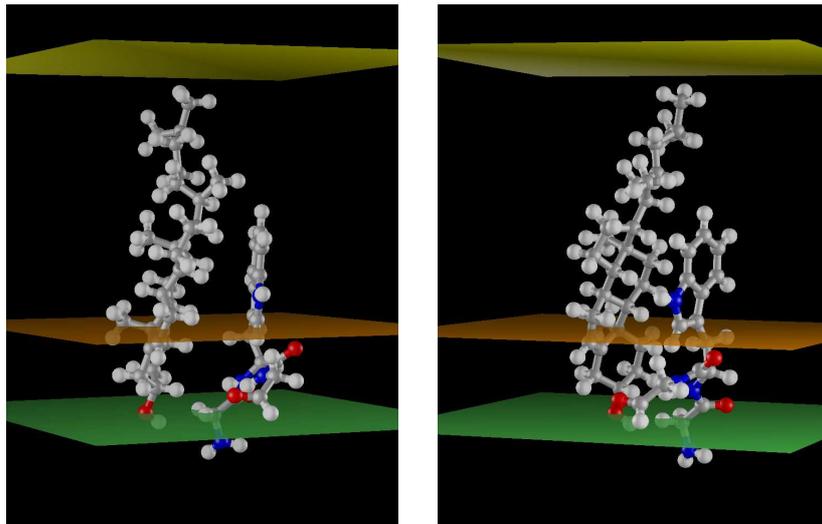


Figure 50 : Vues latérales du complexe tryptophane-cholestérol dans la membrane plasmique.

La membrane IMPALA est modélisée par plans, le plan vert est l'interface eau-tête polaire des lipides, le plan marron est l'interface tête polaire-chaîne carbonée et le plan jaune est l'interface entre les deux feuillettes membranaires. Les principales interactions du tryptophane avec le cholestérol sont les interactions CH- π .

Pour vérifier l'hypothèse de cette interaction tryptophane-cholestérol, nous avons étudiés les effets de deux autres acides aminés à la position 539, une alanine et une phénylalanine. L'alanine est moins hydrophobe que le tryptophane, et la phénylalanine fut choisie du fait de sa plus faible préférence pour le cholestérol que le tryptophane. En accord avec cette hypothèse, le mutant R539A est rendu sensible au Mg²⁺, suggérant une restauration significative de la sensibilité au PIP₂. Les cinétiques de *rundown* similaires au canal sauvage, indiquent qu'une interaction avec la membrane persiste. Le mutant R539F exhibe un *rundown* induit par le Mg²⁺ plus rapide que celui du sauvage (figure 51), à l'image des deux autres mutants étudiés précédemment (figure 46C).

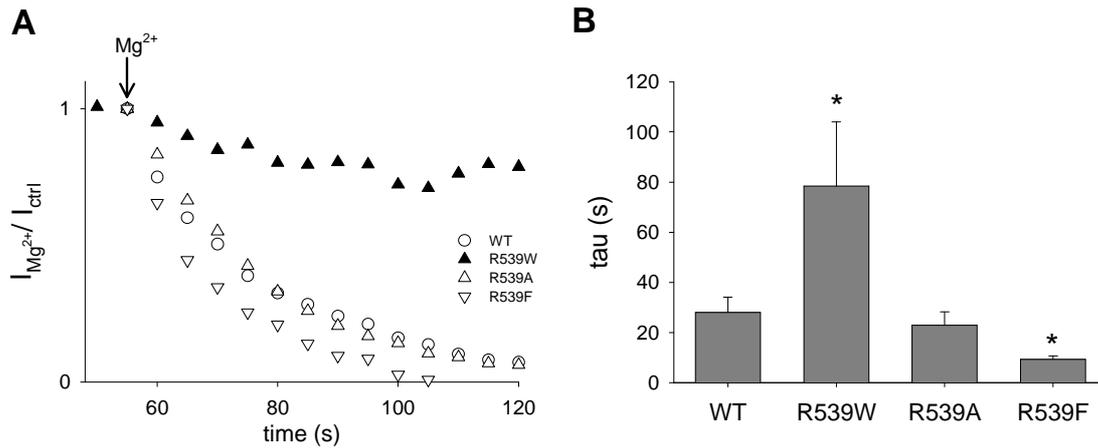


Figure 51 : Insensibilité de R539W liée à une interaction électrostatique entre le tryptophane et le cholestérol membranaire.

A. Amplitude relative des courants de queue (à -40 mV) des canaux sauvages et mutants mesurés après une dépolarisation de 1 s à +40 mV, en fonction du temps durant l'application de Mg²⁺ (1,1 mM, concentration du Mg²⁺ libre) en configuration de *giant-patch* (n = 8-12). **B.** Constantes de temps du *rundown* induit par le Mg²⁺ (tau en s) des canaux sauvages et mutants. *P<0,05 (test t de Student).

Comme l'indique la modélisation de l'interaction, la liaison tryptophane-cholestérol est envisageable. Les mutants R539A et R539F qui permettent de restaurer la sensibilité au PIP₂, suggèrent également une interaction du tryptophane du mutant R539W avec le cholestérol. Pour vérifier cette interaction tryptophane-cholestérol, des expériences de déplétion du cholestérol membranaire ont été réalisées. En présence de 2-hydroxypropyl-béta-cyclodextrine (20hβCD), une molécule capable de dépléter le cholestérol membranaire (Atger et coll., 1997), le courant basal n'est pas modifié et le *rundown* normalement observé en *giant-patch* en présence de Mg²⁺ n'est pas restauré. A première vue, ces résultats suggèrent que le cholestérol n'est pas impliqué dans cette interaction avec le cholestérol. Mais des mesures de flux du cholestérol membranaire en présence de 20hβCD, montre une déplétion uniquement partielle, de l'ordre de 70%, du cholestérol contenu dans la membrane plasmique (Atger et coll., 1997 ; Rothblat et coll., 1999). Il est donc possible que le cholestérol interagissant avec le tryptophane du canal mutant R539W ne soit pas extrudé lors du traitement à la cyclodextrine. Deux autres hypothèses sont également envisageables, soit le tryptophane interagit non pas avec le cholestérol mais avec un autre lipide membranaire, soit la présence du tryptophane suffit à stabiliser le canal en raison d'un encombrement stérique.

Pour expliquer l'osmosensibilité de KCNQ1, la participation du cytosquelette ou d'une voie de phosphorylation du canal avait été suggérée (Grunnet et coll., 2003 ; Missan et coll., 2006). Premièrement, nous avons démontré que, dans notre modèle d'étude, les filaments d'actine et les microtubules, deux éléments constitutifs du cytosquelette, ne sont pas

impliqués dans l'osmorégulation. Ces résultats sont conformes à l'absence de rôle du cytosquelette dans l'osmorégulation de I_{Ks} déjà observée dans les cardiomyocytes de cobayes (Wang et coll., 1996). Deuxièmement, le canal mutant R539W est insensible à l'osmolarité malgré une régulation par la PKA fonctionnelle, ce qui indique que la voie de phosphorylation dépendante de la PKA et de l'AMPC n'est pas impliquée dans l'osmorégulation du canal KCNQ1-KCNE1. Le fait que l'état de phosphorylation du canal KCNQ1 ne soit pas impliqué dans son osmosensibilité avait déjà été suggéré dans des cellules Cos (Kubota et coll., 2002). Puisque la PKA ne participe pas à l'osmorégulation, ces résultats suggèrent que le Mg^{2+} , un cofacteur de la PKA (Cheng et coll., 2005), est impliqué uniquement au travers de son interaction avec le PIP_2 et non pas via la PKA.

Nous pouvons donc envisager qu'en condition physiologique, le stress osmotique cause une variation du volume cellulaire qui dilue ou concentre le Mg^{2+} libre, lequel régule dans un second temps l'activité du canal KCNQ1-KCNE1 par une variation du PIP_2 membranaire disponible. L'augmentation ou la diminution du flux K^+ au travers des canaux KCNQ1-KCNE1 permet de réguler les processus de régulation du volume cellulaire. Pour confirmer cette voie de régulation, il nous reste à mesurer les variations du Mg^{2+} intracellulaire lors des changements de condition osmotique. Pour ce faire, nous utiliserons une sonde fluorescente spécifique du Mg^{2+} , mag-indo 1 (Silverman et coll., 1994). Dans la cellule, la sonde fluorescente se présente sous deux formes, une forme déprotonée et une forme protonée résultat de la liaison sonde- Mg^{2+} . La sonde mag-indo 1 est une sonde ratiométrique. La fluorescence mesurée est donc indépendante de la concentration de la sonde. L'utilisation de cette sonde nous permettra de quantifier la forme liée au Mg^{2+} , révélatrice de la quantité de Mg^{2+} libre, lors des différentes conditions osmotiques.

Conclusion et Perspectives

KCNQ1 - PIP₂

CONCLUSION ET PERSPECTIVES - KCNQ1-PIP₂

Nous avons montré que le PIP₂ est indispensable au fonctionnement du canal KCNQ1, et plus précisément que le PIP₂ régule de manière positive l'activité des canaux KCNQ1-KCNE1. La plupart des canaux ioniques régulés par le PIP₂, le sont de manière identique (Suh et Hille, 2005). Par exemple, que ce soit pour le canal K_{ATP}, le canal KIR2.1 ou encore le canal HERG, la déplétion du PIP₂ intracellulaire provoque la diminution de l'activité du canal (Shyng et coll., 1998 ; Bian et coll., 2001 ; Lopes et coll., 2002).

Dans les canaux Kir à deux segments transmembranaires, le PIP₂ se fixe au niveau des extrémités N- et C-terminales. Et comme nous l'avons démontré, les sites de fixation du PIP₂ au sein des canaux Kv à six segments transmembranaires, se situent au niveau de la boucle S4-S5 (R243) et au niveau de l'extrémité C-terminale (R539 et R555). Le segment S5-S6 des canaux Kv étant équivalent aux segments M1-M2 des canaux Kir, on peut comparer la boucle S4-S5 et l'extrémité C-terminale des canaux Kv aux extrémités N-terminale et C-terminale des canaux Kir, respectivement. Etant donné que les sites de fixation sont placés dans des régions comparables d'un canal à l'autre et que cette fixation du PIP₂ contrôle la stabilisation de l'ouverture du pore des canaux Kir et de KCNQ1, il est possible que le PIP₂ joue un rôle strictement équivalent sur ces deux familles de canaux, en aval de la régulation de l'ATP pour le canal K_{ATP} et de la régulation par le potentiel membranaire pour les canaux KCNQ1.

Or, la régulation positive de KCNQ1 par le PIP₂ n'est pas générale à tous les modèles. Il existe un modèle où une régulation négative par le PIP₂ de I_{Ks} a lieu : les myocytes de cobaye (Ding et coll., 2004). En configuration cellule-entière, l'application de wortmanine ou d'anticorps anti-PIP₂ augmente l'amplitude de I_{Ks}. À l'inverse, I_{Ks} est réduit en présence de concentrations élevées de PIP₂ exogène. Ces résultats sont donc en contradiction avec les autres études qui démontrent une activation du canal KCNQ1 par le PIP₂ (Suh et Hille, 2002 ; Zhang et coll., 2003 ; Loussouarn et coll., 2003 ; Suh et Hille, 2007). Cette inhibition de I_{Ks} est également incompatible avec le fait que les trois canaux KCNQ1 mutants R243H, R539W et R555C présentent une affinité réduite pour le PIP₂ et provoque une perte de fonction phénotypique (syndrome du QT long). Une explication envisageable est qu'au sein des tissus natifs, le canal appartient à un complexe protéique dont certains éléments régulateurs (peut-être l'AKAP yotiao) sont régulés de façon inverse par le PIP₂. L'existence de deux pools distincts de PIP₂ associés à ce complexe permettrait d'expliquer cette double régulation. Un premier pool associé directement à KCNQ1 serait responsable de l'activation de KCNQ1. Ce pool de PIP₂ expliquerait les effets des mutants et la régulation du Mg²⁺ sur I_{Ks}. Ce pool placé au cœur du complexe canalaire serait moins affecté par des grosses molécules comme l'anticorps anti-PIP₂, les micelles exogènes de PIP₂ et la wortmanine.

Et un second pool de PIP₂, plus à la périphérie du complexe canalaire et associé à d'autres protéines constitutives du complexe canalaire, telles que la protéine d'ancrage yotiao, expliquerait la régulation inverse du canal.

Le rôle prépondérant du PIP₂ dans l'activité de canaux dépendants du potentiel (HERG, KCNQ1, Bian et coll., 2001 ; Suh et Hille, 2002) et la position de ses sites de fixation notamment sur KCNQ1, permettent d'envisager une hypothèse quant au couplage entre le *voltage-sensor* et l'activation des canaux Kv. Il est en effet probable que le *voltage-sensor* module la fixation du PIP₂ sur la porte d'activation du canal. Par exemple, le mouvement du *voltage-sensor* en réponse à une dépolarisation membranaire, induirait un changement conformationnel qui permet de démasquer les sites de fixation du PIP₂.

La mutation R243H est un argument en faveur de cette hypothèse. L'arginine 243 est localisée du côté C-terminal du segment S4 (Panaghie et Abbott, 2007), c'est-à-dire juste au début de la boucle S4-S5 dont on suppose que son interaction avec le segment S6 est cruciale au couplage entre le *voltage-sensor* et l'activation des canaux Kv (Long et coll., 2005). Le fait que la mutation de cette arginine altère à la fois la sensibilité au potentiel du canal muté et son affinité au PIP₂, est un argument en faveur d'une transduction du *voltage-sensor* vers le segment S6 via une interaction entre cette boucle S4-S5 et l'extrémité C-terminale de S6. La localisation de l'arginine 243 sur le segment S4, donc probablement enfoui dans la membrane plasmique lors d'une dépolarisation, pose la question de la réalité d'une interaction de cette arginine avec le PIP₂. Le modèle structural de KCNQ1 déduit par Smith et ses collaborateurs permet de révéler des fentes entre les domaines *voltage-sensor* au travers desquelles des lipides pourraient s'insérer et approcher le pore (Smith et coll., 2007). Il n'est donc pas inconcevable que les molécules de PIP₂ puissent se fixer à l'arginine 243 localisée sur le segment S4 dans la membrane plasmique. Cela est compatible avec des travaux de cristallisation du canal Kv1.2 en présence de phospholipides, qui révèle un phospholipide entre le segment S4 et la boucle S4-S5 (Long et coll., 2007).

La partie C-terminale semble être la zone clé de la fixation du PIP₂ et du mécanisme d'activation des canaux Kv. L'identification d'une histidine dans la partie proximale de l'extrémité C-terminale, dont la mutation rend le canal KCNQ2/KCNQ3 moins sensible au PIP₂, suggérait déjà que le PIP₂ régule l'activité des canaux KCNQ en se fixant au niveau de cette partie proximale de l'extrémité C-terminale (Zhang et coll., 2003). Cette étude indique que c'est au niveau de cette région que le PIP₂ interagit. On peut penser que l'interaction du PIP₂ avec l'extrémité C-terminale permet d'éloigner les segments S6 de l'axe du pore et donc l'ouverture du canal. La partie hydrophobe des molécules de PIP₂ nécessite que la molécule soit dans un environnement lipidique, ce qui ancre l'extrémité C-terminale à la membrane, et stabilise le pore à l'état ouvert. La récente étude de Smith et de ses collaborateurs vient d'ailleurs conforter cette hypothèse (Smith et coll., 2007). Cette modélisation de KCNQ1 par

homologie de structure indique que la transition de l'état fermé vers l'état ouvert se produit de la même manière que le canal KcsA (Doyle et coll., 1998), c'est-à-dire grâce à un mouvement de bascule de l'extrémité C-terminale. Suite à ce repliement, la partie proximale de l'extrémité C-terminale fait face à la membrane plasmique, ce qui suggère une possible interaction avec les phospholipides membranaires.

Des travaux futurs seront nécessaires pour valider ce modèle et pour identifier les changements conformationnels de la porte d'activation et la façon dont le PIP₂ contrôle ce changement de conformation. Un travail présenté au congrès de la *Biophysical Society* montrant un modèle par homologie avec Kir2.1 confirme les travaux de Zhang et de ses collaborateurs cités ci-dessus (Zhang et coll., 2003), puisqu'il suggère que le site de fixation au PIP₂ de KCNQ2 est similaire de celui de Kir2.1 (Hernandez et coll., 2008). Cependant, la connaissance de la structure complète des canaux KCNQ semble nécessaire pour déterminer exactement les mécanismes moléculaires en jeu.

Dans un contexte plus physiologique, les trois canaux KCNQ1-KCNE1 mutants se caractérisent tous par une réduction de leur sensibilité au PIP₂ se traduisant au niveau biophysique par un décalage vers des potentiels plus positifs de la $V_{0.5}$. Mais le degré de cette modification de la dépendance au potentiel n'est pas corrélé aux phénotypes observés. Par exemple, le plus important décalage de la courbe courant-potentiel est associé au mutant R243H, alors que les porteurs hétérozygotes de cette mutation sont asymptomatiques avec aucune prolongation majeure de l'intervalle QT. A l'inverse, plusieurs porteurs de la mutation R539W, sont symptomatiques et deux d'entre eux sont morts subitement. Comme nous l'avons suggéré, une caractéristique particulière du canal mutant R539W, son insensibilité aux variations du PIP₂ et de l'osmolarité, est peut-être responsable du caractère délétère de cette mutation. D'autres facteurs épigénétiques et/ou génétiques sont aussi à prendre en considération. Une plus grande connaissance de la nature et des rôles des multiples partenaires qui composent le complexe canalaire est donc indispensable à une meilleure compréhension aussi bien de la physiologie de la repolarisation cardiaque que de la pathophysiologie du gène *KCNQ1*. Malgré l'absence de corrélation simple entre le génotype et le phénotype, il est certain que des mutations qui modifient uniquement les propriétés biophysiques du canal KCNQ1-KCNE1 peuvent être parfois associées à un phénotype cardiaque sévère.

Au-delà de son rôle dans la structure du cytosquelette (Hartwig et coll., 1995 ; Tall et coll., 2000 ; Tolia et coll., 2000) et dans le trafic des vésicules d'exocytose (Liu et coll., 2007), le PIP₂ est un régulateur de nombreux canaux ioniques et transporteurs impliqués dans l'activité électrique cardiaque. Le PIP₂ régule ainsi l'activité des canaux GIRK, responsables du courant $I_{K_{Ach}}$ impliqué dans la régulation parasymphatique (Huang et coll., 1998). La

repolarisation cardiaque est également contrôlée par le PIP₂ qui participe directement à l'activité des canaux Kir2.1, K_{ATP} et KCNQ1 (Liou et coll., 1999 ; Zhang et coll., 1999 ; Loussouarn et coll., 2003).

Un autre rôle physiologique du PIP₂ est son implication dans l'osmorégulation des canaux ioniques. Par exemple, l'osmorégulation des canaux GIRK exprimés dans des ovocytes de Xénope implique le PIP₂ membranaire (Zhang et coll., 2004). Mais l'activité des canaux GIRK en condition hypotonique est réduite, et non pas augmentée comme le canal KCNQ1-KCNE1. Les canaux GIRK étant activés par le PIP₂, cela signifie que la concentration de PIP₂ est diminuée en condition hypotonique. Les mêmes travaux révèlent que les conditions hypotoniques provoquent une réduction du niveau global du PIP₂ membranaire dans les ovocytes de xénope et les cellules CHO. Ceci est contraire à notre étude qui suggère une augmentation du PIP₂ disponible en condition hypotonique. Pour tenter d'expliquer cette disparité de réponses, nous pouvons avancer l'idée d'une régulation compartimentée du PIP₂. Nous avons démontré que l'osmorégulation de KCNQ1 est médiée par la variation de la concentration de Mg²⁺ cytosolique, laquelle régule la concentration de PIP₂ disponible. On peut envisager que même si la quantité de PIP₂ membranaire diminue globalement en condition hypotonique, la dilution du Mg²⁺ démasque un grand nombre de molécule de PIP₂, en particulier au voisinage de KCNQ1, le résultat net étant alors une augmentation du PIP₂ disponible pour ce canal. Une autre explication serait l'existence de pools de PIP₂ régulés de façon opposée. Ainsi, les observations faites dans les cardiomyocytes suggèrent que des pools de PIP₂ à proximité des complexes KCNQ1-KCNE1 sont augmentés en réponse à l'hypotonicité. Cette augmentation est supposée locale car les mesures par HPLC (*High performance liquid chromatography*) dans les cellules cardiaques de cobaye montre une diminution globale du PIP₂ en condition hypotonique (Nasuhoglu et coll., 2002). Un autre canal K⁺, le canal K_{ATP}, est également activé par le PIP₂ (Shyng et Nichols, 1998) et par l'hypotonicité (Van Wagoner, 1993), à l'image de KCNQ1. Il serait donc intéressant de vérifier si des pools de PIP₂ sont également impliqués dans l'osmorégulation de ces canaux. Une autre étude de l'osmorégulation des canaux GIRK fournit un argument en faveur de l'implication des pools de PIP₂ dans cette osmorégulation des canaux. Les canaux GIRK sont inhibés par l'hypotonicité dans les cellules CHO ou dans les ovocytes de xénope, mais sont acités par l'hypotonicité dans les cardiomyocytes de rat (Pleumsamran et Kim, 1995), suggérant que ce n'est pas les canaux eux-mêmes mais leur environnement membranaire qui détermine le sens de leur osmosensibilité..

Si l'ensemble de ces résultats fournit des arguments en faveur de l'existence de pools indépendants de PIP₂, des mesures plus directes seront nécessaires pour valider cette hypothèse qui reste largement débattue. Par exemple, l'observation de l'enrichissement du PIP₂ dans des microdomaines tels que les rafts lipidiques étant basée sur des études de déplétion du cholestérol ou d'extraction par des détergents, il a été suggéré que cette

compartimentation des molécules de PIP₂ est en réalité provoquée par l'utilisation des détergents ou par la déplétion du cholestérol (Van Rheenen et coll., 2005).

Après ces perspectives plus lointaines, il est évident que la priorité est bien évidemment de vérifier la variation de la concentration de Mg²⁺ cytosolique lors des stress osmotiques. Le choix de la sonde mag-indo 1, spécifique du Mg²⁺, est légitimé par de nombreux travaux de quantification du Mg²⁺ intracellulaire dans des cellules cardiaques ou des fibres de muscles squelettiques (Silverman et coll., 1994 ; Morelle et coll., 1994 ; Csernoch et coll., 1998). Sa constante de dissociation et son caractère ratiométrique font de mag-indo 1 une sonde parfaitement adaptée à la mesure des variations de la concentration de Mg²⁺ cytosolique. La constante de dissociation (K_d = 2,7 mM) très proche de la concentration cytosolique du Mg²⁺ (1 mM) permet la mesure fine d'une augmentation de la concentration ou d'une dilution du Mg²⁺. Et du fait de son caractère ratiométrique, la fluorescence mesurée est indépendante de la concentration de la sonde.

Autres articles

AUTRES ARTICLES

Expression of human ERG K⁺ channels in the mouse heart exerts anti-arrhythmic activity

Anne Royer^{a,1}, Sophie Demolombe^{a,1}, Aziza El Harchi^a, Khai Le Quang^a, Julien Piron^a, Gilles Toumaniantz^a, David Mazurais^a, Chloé Bellocq^a, Gilles Lande^a, Cécile Terrenoire^b, Howard K. Motoike^b, Jean-Christophe Chevallier^a, Gildas Loussouarn^a, Colleen E. Clancy^c, Denis Escande^a, Flavien Charpentier^{a,*}

^aINSERM U533, Institut du Thorax, Faculté de Médecine, 1 rue G. Veil, 44035 Nantes Cedex, France

^bDepartment of Pharmacology, College of Physicians and Surgeons of Columbia University, New York, NY 10032, USA

^cDepartment of Physiology and Biophysics, Institute for Computational Biomedicine, Weill Medical College of Cornell University, New York, NY 10021, USA

Received 7 May 2004; received in revised form 13 September 2004; accepted 29 September 2004

Available online 22 October 2004

Time for primary review 17 days

Abstract

Objective: The K⁺ channel encoded by the human *ether-à-go-go*-related gene (*HERG*) is crucial for repolarization in the human heart. In order to investigate the impact of HERG current (I_{Kr}) on the incidence of cardiac arrhythmias, we generated a transgenic mouse expressing HERG specifically in the heart.

Methods and results: ECG recordings at baseline showed no obvious difference between transgenic and wild-type (WT) mice with the exception of the T wave, which was more negative in transgenic mice than in WT mice. E4031 (20 mg/kg) prolonged the QTc interval and flattened the T wave in transgenic mice, but not in WT mice. Injection of BaCl₂ (25 mg/kg) induced short runs of ventricular tachycardia in 9/10 WT mice, but not in transgenic animals. Atrial pacing reproducibly induced atrial tachyarrhythmias in 11/15 WT mice. In contrast, atrial arrhythmia was inducible in only 2/11 transgenic mice. When pretreated with dofetilide (10 mg/kg), transgenic mice were as sensitive to experimental arrhythmias as WT mice. Microelectrode studies showed that atrial action potentials have a steeper slope of duration-rate adaptation in WT than in transgenic mice. Transgenic mice were also characterized by a post-repolarization refractoriness, which could result from the substantial amount of I_{Kr} subsisting after repolarization as assessed with action potential-clamp experiments and simulations with a model of the transgenic mouse action potential.

Conclusion: HERG expression in the mouse heart can protect against experimental induction of arrhythmias. This is the first report of such a protective effect of HERG in vivo.

© 2004 European Society of Cardiology. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Arrhythmia; Repolarization; K⁺ channel; Transgenic animal models

1. Introduction

The K⁺ channel encoded by the human *ether-à-go-go*-related gene (*HERG*, or *KCNH2*) is crucial for normal action potential repolarization in the human heart. *HERG* encodes the pore-forming subunit of the rapidly activating

cardiac delayed K⁺ current (I_{Kr}) channel. The classical paradigm regarding I_{Kr} and arrhythmias is that blocking I_{Kr} should be anti-arrhythmic, secondary to prolongation of repolarization and refractoriness. However, this approach has been unsuccessful in reducing mortality in patients with left ventricular dysfunction and inversely has been associated with proarrhythmia [1]. Prolongation of repolarization is a typical characteristic of the congenital long QT syndrome, a rare disease implicating many ion channels, including HERG [2,3]. In this disease, mutations

* Corresponding author. Tel.: +33 240 41 28 44; fax: +33 240 41 29 50.

E-mail address: flavien.charpentier@nantes.inserm.fr (F. Charpentier).

¹ Contributed equally to this work.

in the *HERG* gene lead to a reduced I_{Kr} and increased incidence of lethal ventricular arrhythmias. Finally, blocking *HERG* channels by many non-cardiac pharmaceutical agents may produce arrhythmias and unexpected sudden cardiac death [4].

More recently, several studies suggested that increasing *HERG* could actually be a better approach to prevent arrhythmias [5–7]. Understanding how *HERG* K^+ channels normally provide protection against arrhythmias is therefore of considerable interest. In the present work, we generated a transgenic mouse expressing *HERG* specifically in the heart. Our objective was to investigate the functional consequences of *HERG* expression on cardiac repolarization and on the initiation of cardiac arrhythmias. Our results show that *HERG* expression can protect against experimental induction of arrhythmias at both atrial and ventricular levels, an effect that could be secondary to increased repolarization reserve [8]. Together with the recent observation that gain-of-function mutations of *HERG* can lead to short QT syndrome and sudden cardiac death [9], our findings suggest that increasing *HERG* current could exert both antiarrhythmic and proarrhythmic activities.

2. Materials and methods

2.1. Generation of transgenic mice

The human ERG was subcloned into the α -MHC vector (a kind gift of Dr. Jeffrey Robbins, University of Cincinnati, USA). The transgene fragment included the mouse α MHC promoter, introns and the three non-coding exons of the mouse α MHC gene, the *HERG* coding sequence and the human growth hormone polyadenylation signal sequences. It was microinjected into FVB mouse oocytes. A total of 83 offspring was obtained and screened for the presence of the transgene by PCR analysis of genomic DNA. Sixteen founders were positive and were backcrossed to wild-type (WT) FVB to produce heterozygous F1 offspring. Ten founders transmitted the transgene to their lineage. Three transgenic lines were selected based on Western blots. Finally, only one line (#52) was selected based on ECG data.

All experiments were performed on adult sex- and age-matched transgenic and non-transgenic mice from the same litters (as controls). The investigation conforms with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH publication No. 85-23, revised 1996).

2.2. Electrocardiography

Three-lead ECGs were recorded with 25-gauge subcutaneous electrodes on a computer through an analog–digital converter (IOX 1.585, EMKA Technologies,

France) for monitoring and later analysis (ECG Auto 1.5.7, EMKA Technologies). ECG channels were filtered between 0.5 and 250 Hz. For phenotypic characterization, mice were anesthetized with intra-peritoneal (i.p.) injection of etomidate (15 mg/kg). ECGs were first recorded under baseline conditions, then 10 min after atropine sulfate (0.5 mg/kg, i.p.) and propranolol (1 mg/kg, i.p.) and finally 10 min after E4031 (20 mg/kg, i.p.), an inhibitor of I_{Kr} [10]. Reported measurements were averaged from five consecutive PQRST complexes in lead I. Standard criteria were used for interval measurements. On lead I, repolarization is biphasic with an initial rapid positive J wave and a slower negative T wave. The end of the T wave was defined as the point at which the slow component returned to the isoelectric line. QT intervals were corrected for heart rate using the formula, $QTc=QT/(RR/100)^{1/2}$ with QT and RR measured in ms [11].

In a subgroup of mice, tedisamil (5 mg/kg, i.p.), an inhibitor of the transient outward (I_{to}) and delayed rectifier K^+ currents [12], was injected with atropine sulfate and propranolol. ECGs were recorded 15 min later. Mice were then injected with E4031 (20 mg/kg, i.p.) and ECGs recorded 10 min after injection.

2.3. Barium-induced ventricular arrhythmias

Ten transgenic mice and 10 WT littermates were included in a blind study of barium effects on cardiac electrical activity. Under anesthesia (etomidate 15 mg/kg, i.p.), a bolus of $BaCl_2$ (25 mg/kg) was injected into the tail vein. The effect of $BaCl_2$ was assessed by continuous ECG monitoring and recording. In an additional subgroup of mice, dofetilide (10 mg/kg, i.p.), a blocker of the I_{Kr} potassium current [13], was injected 20 min before $BaCl_2$ challenge.

2.4. Endocavity recording and pacing

Eleven transgenic mice and 15 WT littermates were included in a blind study of pacing-induced atrial arrhythmias. Under anesthesia with etomidate (8 mg/kg) and pentobarbital (30 mg/kg), an intubation was achieved with a cannula for continuous mechanical ventilation (respiratory rate, 140 ml/min; tidal volume, 200 μ l; Minivent Type 845, Hugo Sachs Elektronik, Germany). An octopolar 2 F electrode catheter with an electrode spacing of 0.5 mm (Cordis Webster®, USA) was introduced into the right atrium and ventricle through the right internal jugular vein and used for simultaneous atrial and ventricular pacing and recording. Intracardiac electrograms were filtered between 30 and 500 Hz. Surface ECG (lead I) and intracardiac electrograms were recorded to computer for monitoring and later analysis. Intracardiac pacing was performed with a Biotronik® UHS20 stimulator (Germany), modified by the manufacturer to pace at short coupling intervals. Atrial arrhythmias were induced

with a protocol derived from the one described by Wakimoto et al. [14]. Briefly, mice received an i.p. injection of the muscarinic agonist carbamylcholine (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Although atrial tachyarrhythmias can be induced with burst pacing in mouse without vagal stimulation [15], carbamylcholine through its activation of the acetylcholine-activated K^+ current, $I_{\text{K}_{\text{ACh}}}$, predisposes to atrial fibrillation [16]. Ten minutes later, programmed right atrial single, double and triple extrastimuli were applied at 100-ms drive cycle length. Right atrial burst pacing was also performed as 1- to 2-s train episodes at cycle lengths ranging from 10 to 30 ms separated by 5-s intervals (unless arrhythmias were induced). In an additional subgroup of mice, dofetilide (10 mg/kg, i.p.) was injected 20 min before starting atrial pacing.

2.5. Patch-clamp studies

The methods and equipment used to dissociate adult ventricular myocytes and to record whole-cell currents have been described elsewhere [17]. Patch pipettes had tip resistances of 1.8–3.0 M Ω . They were filled with a solution containing (in mmol/l): KCl, 20; K-aspartate, 110; HEPES, 5; EGTA, 5; MgCl_2 , 2; K_2ATP , 5; Phosphocreatine- Na_2 , 5; pH 7.2 with KOH. The extracellular medium contained (in mmol/l): *N*-methyl-D-glucamine, 130; KCl, 5.4; MgSO_4 , 1.2; HEPES, 10; glucose, 10; pH adjusted to 7.4 with HCl. Nifedipine ($3 \cdot 10^{-6}$ mol/l) was used to block the L-type Ca^{2+} current. Experiments were performed at 35 °C. The $I_{\text{K}_{\text{r}}}$ current was elicited by applying 500-ms depolarizations in 10-mV increments at 3-s intervals from -40 mV up to $+60$ mV. Holding potential was -50 mV.

Cos7 cells were transfected with pSI-HERG or pCDNA3-KCNQ1-KCNE1 plasmids together with pTR-GFP plasmid (to tag transfected cells) complexed with JetPEI (Polyplus-transfection, France), according to the protocol recommended by the manufacturer. Patch-clamp recordings were obtained 24–48 h after transfection as previously described [18]. Atrial action potentials used to clamp the cells were obtained during transmembrane microelectrodes studies.

In patch-clamp experiments, E4031 and HMR 1556 were used to block respectively $I_{\text{K}_{\text{r}}}$ [10] (or HERG current) and $I_{\text{K}_{\text{s}}}$ [19].

2.6. Microelectrode studies

Six transgenic and 7 WT adult mice of either sex were killed by cervical dislocation. The hearts were quickly removed and immersed in a cool modified Tyrode solution containing (in mmol/l): NaCl, 108; NaHCO_3 , 25; NaH_2PO_4 , 1.8; KCl, 27; MgCl_2 , 1; CaCl_2 , 0.6; glucose, 55 and previously saturated with a 95% O_2 –5% CO_2 gas mixture (pH 7.3). Left atria were mounted in a tissue bath chamber, the endocardial surface facing up. Preparations were superfused with an oxygenated (95% O_2 –5% CO_2)

Tyrode solution warmed to 37 ± 0.5 °C and containing (in mmol/l): NaCl, 120; NaHCO_3 , 27; NaH_2PO_4 , 1.2; KCl, 5.4; MgCl_2 , 1.2; CaCl_2 , 1.8; glucose, 10 (pH 7.4). Transmembrane recordings were obtained using standard methods. The tissues were allowed to recover for at least 1 h before the experiments started. During this period, they were paced at a cycle length of 300 ms by bipolar stimulation through Teflon-coated silver wire electrodes. Stimulus pulse width was 1 ms and amplitude was twice diastolic threshold. The preparations were then paced at cycle lengths decreasing from 500 to 75 ms. Action potentials characteristics were measured at steady-state for each pacing cycle length (PCL). Effective refractory period was determined using extra-stimulus pacing at a PCL of 200 ms.

2.7. Simulation studies

The model was generated by adding the equation for HERG [20] to the previously described mouse action potential model [21]. This resulted in a set of 45 ordinary differential equations solved by a fourth-order Runge–Kutta method. Some modifications were applied on the original mouse model: to gain accuracy in the action potential calculation, the Runge–Kutta algorithm used a variable time step with a minimal time step set to 0.0001 ms and an error tolerance set to 10^{-4} . If the error tolerance is reached, the time step is divided by two. For HERG, the macroscopic conductance was adapted to correspond to the transgenic mouse HERG current amplitude: $G_{\text{K}_{\text{r}}}=0.12324418$. $[\text{K}^+]_{\text{out}}^{0.59}$ mS/ μF , with $[\text{K}^+]_{\text{out}}$ in mmol/l. The background Na^+ current was modified to fit more accurately the resting potential observed in APs used for action potential-clamp studies ($G_{\text{Na}}=0.0078$ mS/ μF).

2.8. Western blots and immunochemistry

Protein extracts from cardiac samples were prepared in RIPA buffer as described previously [22]. After centrifugation, total cell lysates were denatured with electrophoresis sample buffer, separated on 10% SDS-PAGE and transferred to Hybond C super membrane (Amersham, France). Membranes were incubated with the rabbit anti-erg1 polyclonal antibody (kindly provided by Dr. Eckhard Ficker, Case Western Reserve University, Cleveland, USA), followed by a peroxidase conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (Sigma, USA). The antibody complexes were detected using a commercial enhanced chemiluminescence kit (Amersham ECL plus).

For immunohistochemistry analysis, transgenic and WT mouse hearts were frozen in isopentane. The frozen preparations were then mounted on a cryostat tissue holder using Tissue-Tek® (Sakura, Japan) and cut into 8- μm thick sections. The sections were mounted onto slides, air-dried, fixed in cold acetone and blocked with bovine serum albumin. They were then incubated overnight at 4 °C with

the same primary antibody used for Western blot (rabbit anti-erg1, 1:100). The sections were then incubated with biotinylated anti-rabbit secondary antibody (1:300, Santa Cruz Biotechnology). After washing in PBS, they were incubated with Alexa 488 conjugated streptavidin (1:100), washed and finally mounted using Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, USA). Control slides were performed by omission of the primary antibody. Slides were analyzed using a laser scanning microscope (Leica Microsystems, Germany).

2.9. Statistical analysis

All data are expressed as means ± S.E.M. Statistical analysis was performed with Fisher exact test, Student *t*-test and one- or two-way analysis of variance completed by a Tukey test when appropriate. A value of *p* < 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. HERG-expressing mice

Western blotting showed that 3 different mouse lines strongly expressed HERG in the heart (Fig. 1A). Based on ECG recordings associated with E4031 challenges, line #52 was selected for further studies. Immunohistochemistry showed that erg-1 antibody strongly reacted with HERG protein (Fig. 1B). A background staining was observed in WT heart and probably represented cross-reactivity of erg-1 antibody with endogenous m-erg. The pattern of staining in heart sections suggested that HERG transgene was expressed uniformly across all regions of mouse atrial and ventricular myocardium.

Histopathological examination of transgenic mouse hearts indicated no structural abnormalities compared with WT controls (data not shown). There was no

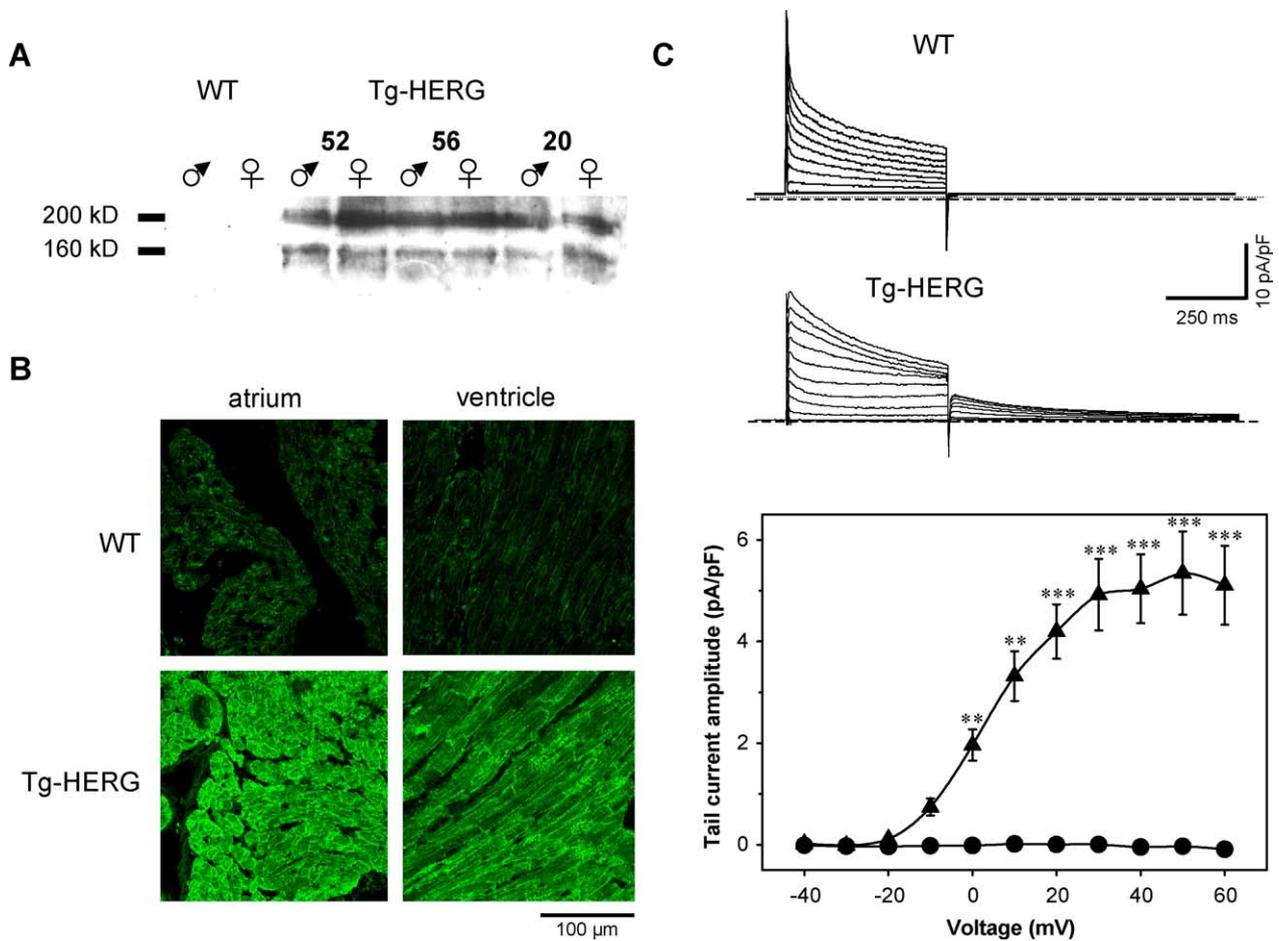


Fig. 1. Transgene expression. (A) Transgene expression detected by Western blot in wild-type (WT) and in HERG lines 52, 56 and 20 (Tg-HERG) mice. (B) Immunohistochemical analysis of HERG in frozen atrial and ventricular sections from WT and line 52 transgenic mice. The staining in WT mice was due to a cross-reactivity of the antibody with the endogenous m-erg. M-erg was not detected in Western blot because the time of exposure to the antibody was not long enough. (C) Top: Voltage-gated outward K⁺ currents from ventricular myocytes isolated from wild-type (WT) and transgenic (line 52) mice. From a holding potential of -50 mV, currents were elicited using 500-ms depolarizing pulses to potentials between -40 and +60 mV at 3-s intervals. Bottom: Current-voltage relationships for the tail current in wild-type (circles; six cells from three mice) and transgenic (triangles; seven cells from four animals) mice. **, ***, *p* < 0.01 and *p* < 0.001 vs. corresponding value in WT mice.

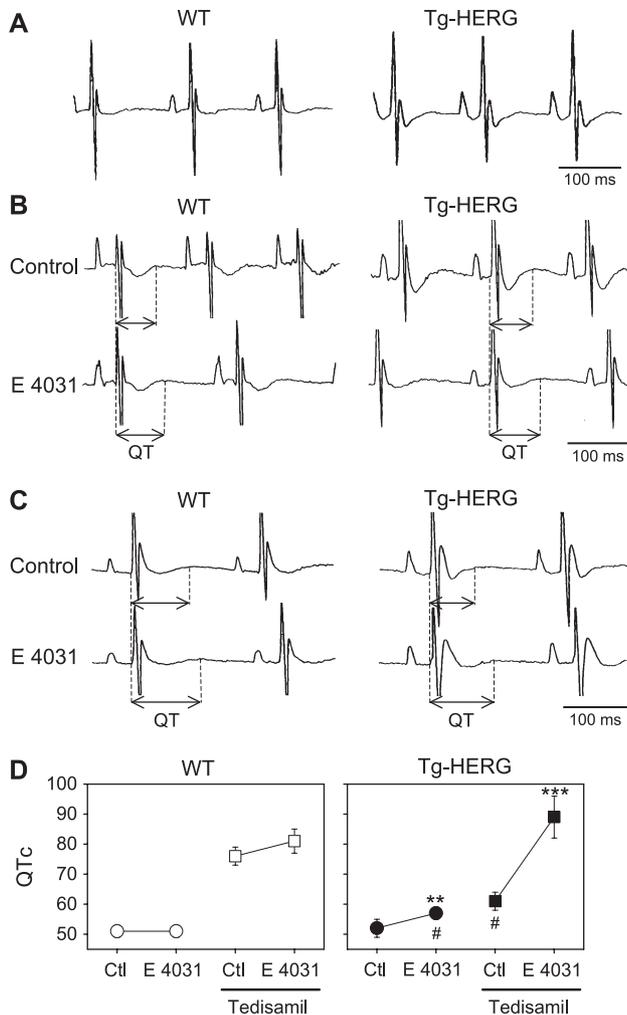


Fig. 2. Surface electrocardiograms in wild-type (WT) and transgenic (Tg-HERG) mice. Representative ECG recordings (lead I) obtained in WT and transgenic mice (A) under baseline conditions, (B) after i.p. injection of propranolol (1 mg/kg) and atropine sulfate (0.5 mg/kg), and (C) after i.p. injection of propranolol (1 mg/kg), atropine sulfate (0.5 mg/kg) and tedisamil (5 mg/kg), before (Control) and after i.p. injection of E 4031 (20 mg/kg). For clarity, QRS peaks have been erased. (D) Effects of E4031 (20 mg/kg) in absence or in presence of tedisamil (5 mg/kg) on the corrected QT interval (QTc; Y-axis) in WT and transgenic mice. Ctl, control. **, ***, $p < 0.01$ and $p < 0.001$ vs. corresponding control value. #, $p < 0.05$ vs. corresponding value in WT mice. The number of mice was 16 WT and 10 Tg-HERG in the absence of tedisamil, 16 WT and 12 Tg-HERG in the presence of tedisamil.

evidence of inflammation or increased interstitial fibrosis within the heart. Body weight, heart weight and heart-to-body weight ratios were similar in both WT and transgenic mice. The cell capacitance of isolated ventricular myocytes in both groups was unchanged, averaging 169 ± 9 and 152 ± 6 pF in WT ($n=10$) and transgenic ($n=19$) myocytes, respectively.

Fig. 1C displays typical currents from WT and HERG-expressing ventricular myocytes. Myocytes from transgenic animals exhibited a tail current with maximal amplitude averaging 5.4 ± 0.8 pA/pF after a step to +50 mV. The HERG channel blocker E4031 at 10^{-7} mol/l

reduced the amplitude of this tail current from 2.8 ± 0.2 to 1.6 ± 0.2 pA/pF (step to +10 mV; $p < 0.05$; $n=4$). Myocytes from WT mice had no sizeable I_{Kr} tail under our experimental conditions. Thus patch-clamp experiments demonstrated that transgene expression led to functional channels.

3.2. Electrocardiographic studies

In order to determine the consequences of transgene expression on cardiac electrical activity, 3-lead ECGs were obtained from 8- to 10-week-old transgenic and WT littermates. As illustrated in Fig. 2A, there was no obvious difference between transgenic and WT mouse recordings with the clear exception of the T wave which was constantly more negative in transgenic mice than in WT mice (lead I). No significant differences were observed between WT ($n=50$) and transgenic ($n=37$) mice in terms of RR interval (149 ± 4 ms in WT vs. 155 ± 5 ms in transgenic mice, respectively), PR interval (29 ± 1 vs. 28 ± 1 ms) and QRS interval (15 ± 1 ms in both groups). The QTc interval was slightly, albeit not significantly ($p=0.051$), shorter in transgenic mice than in WT mice (51 ± 2 vs. 54 ± 1 ms).

Fig. 2B and Table 1 summarize the effects of the I_{Kr} blocker E4031 in WT and transgenic mice recorded under blockade of the autonomic nervous system. E4031 slowed the sinus rate similarly in both groups of mice. In contrast, the effects of E4031 on ventricular repolarization differed between the groups. As previously observed [23], E4031 had no effect on repolarization of WT mice, the prolongation of the QT interval resulting essentially from bradycardia (unchanged QTc). In contrast, in transgenic mice, E4031 induced a consistent prolongation of the QTc interval, suggesting that the transgene-induced I_{Kr} contributes to the late phase of ventricular repolarization (Fig. 2D). Of interest, E4031 flattened the T wave in transgenic mice making the wave shape very similar to that of WT animals (Fig. 2B).

Table 1

Lead I ECG parameters in WT ($n=16$) and HERG-expressing mice (Tg-HERG; $n=10$) pretreated with propranolol (1 mg/kg) and atropine sulfate (0.5 mg/kg) before (control) and after injection of E4031 (20 mg/kg)

	RR (ms)	P wave (ms)	PR (ms)	QRS (ms)	QT (ms)	QTc (ms)
<i>WT</i>						
Control	137±5	18±1	34±1	15±1	61±2	51±2
E4031	172±6***	17±1	33±1	15±1	68±3**	51±2
<i>Tg-HERG</i>						
Control	153±8	18±1	33±2	16±1	62±3	51±3
E4031	194±14***	18±1	33±1	15±1	78±4***	56±2**

Abbreviations: RR, RR interval duration; P wave, P wave duration; PR, PR interval duration; QRS, QRS interval duration; QT, QT interval duration; QTc, corrected QT interval.

, *, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively, vs. control.

Table 2

Lead I ECG parameters in WT ($n=16$) and HERG-expressing mice (Tg-HERG; $n=12$) pretreated with tedisamil (5 mg/kg), propranolol (1 mg/kg) and atropine sulfate (0.5 mg/kg) before (control) and after injection of E4031 (20 mg/kg)

	RR (ms)	P wave (ms)	PR (ms)	QRS (ms)	QT (ms)	QTc
<i>WT</i>						
Control	191±7	17±1	37±1	16±1	105±6	76±3
E4031	243±10***	19±1	38±1	16±1	127±7**	81±4
<i>Tg-HERG</i>						
Control	193±7	19±1	39±1	17±1	85±5	61±3
E4031	238±17***	19±1	39±2	18±1	139±13***	89±7***

Same abbreviations as in Table 1.

, *, $p<0.01$ and $p<0.001$, respectively, vs. control.

In the mouse heart, the main repolarizing currents are the transient outward current I_{to} , generated mainly by Kv4.2 channels and the slow K^+ currents $I_{K,slow1}$ and $I_{K,slow2}$ generated respectively by Kv1.5 and Kv2.1 channels [24]. In order to potentiate the relative contribution of I_{Kr} to ventricular repolarization, I_{to} and $I_{K,slow}$ were partially inhibited using tedisamil. Fig. 2C and Table 2 shows the effects of E4031 on ECG characteristics in animals pretreated with tedisamil. As expected, the RR and QTc intervals were longer under tedisamil both in the transgenic and control groups (compare with Table 1). In addition, the J wave was prolonged by tedisamil similarly in WT and transgenic mice. Inversely, the QTc interval was significantly more prolonged in WT mice than in transgenic mice (see Fig. 2D) suggesting that the transgene-induced I_{Kr} partially compensated for the decrease in I_{to} and $I_{K,slow}$ currents. Confirming this hypothesis, injection of E4031 abolished the differences between WT and transgenic mice (Table 2). Fig. 2D clearly illustrates that pretreatment with tedisamil magnified the effects of E4031 on QTc in transgenic mice.

3.3. Cardiac arrhythmias

3.3.1. Barium-induced ventricular tachycardia

Fig. 3 shows typical ECGs recorded in WT and transgenic mice immediately after challenge with BaCl₂ (25 mg/kg, i.v.). In 9/10 WT mice, BaCl₂ induced short runs of fast ventricular tachycardia (upper panels). These arrhythmias were preceded and followed by an increase in T wave amplitude and duration. In striking contrast, in 9/10 transgenic animals, BaCl₂ altered ventricular repolarization but did not provoke ventricular tachycardia (middle panels). In the remaining transgenic mouse, injection of BaCl₂ produced an accelerated idio-ventricular escape rhythm. To further confirm that protection against ventricular arrhythmia was related to the expression of HERG, transgenic mice were pretreated with dofetilide (10 mg/kg, i.p.) and then challenged with BaCl₂ (rescue experiments). When pretreated with dofetilide, 8/10 transgenic mice developed short

runs of ventricular tachycardia under the action of BaCl₂ (see lower panels) similarly to WT mice. Pre-treating WT mice with dofetilide did not modify their response to BaCl₂ (data not shown). These results strongly suggest that expression of HERG protected against the proarrhythmic effects of BaCl₂.

3.3.2. Pacing-induced atrial arrhythmias

Fig. 4 shows representative surface ECGs and intracavity recordings obtained in WT and transgenic mice submitted to a burst of rapid atrial pacing (cycle length of 15 ms; 2-s duration). In 11/15 WT mice, atrial pacing reproducibly induced non-sustained atrial tachycardia and/or atrial fibrillation. The duration of atrial arrhythmias ranged from 200 ms to 146 s with an minimal cycle length of $22±2$ ms and a maximal cycle length (before spontaneous cessation) of $30±1$ ms. In contrast, atrial arrhythmia was inducible in only 2/11 transgenic mice ($p<0.05$ vs. WT) with durations of the salvoes ranging from 170 ms to 74 s and a cycle length ranging from 21 to 25 ms. Therefore, expression of

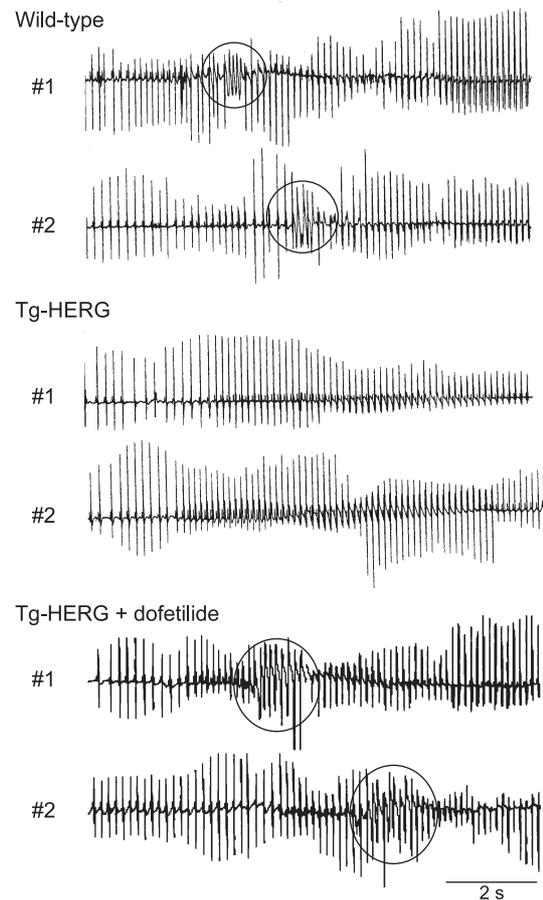


Fig. 3. Representative ECG tracings (lead I) showing the effects of BaCl₂ injection (25 mg/kg) in two wild-type and two transgenic (Tg-HERG) mice under baseline conditions (top and middle panels) and in Tg-HERG mice pretreated with dofetilide (10 mg/kg; bottom). Note the short runs of ventricular tachycardia induced by BaCl₂ in wild-type mice and Tg-HERG mice pretreated with dofetilide (circles).

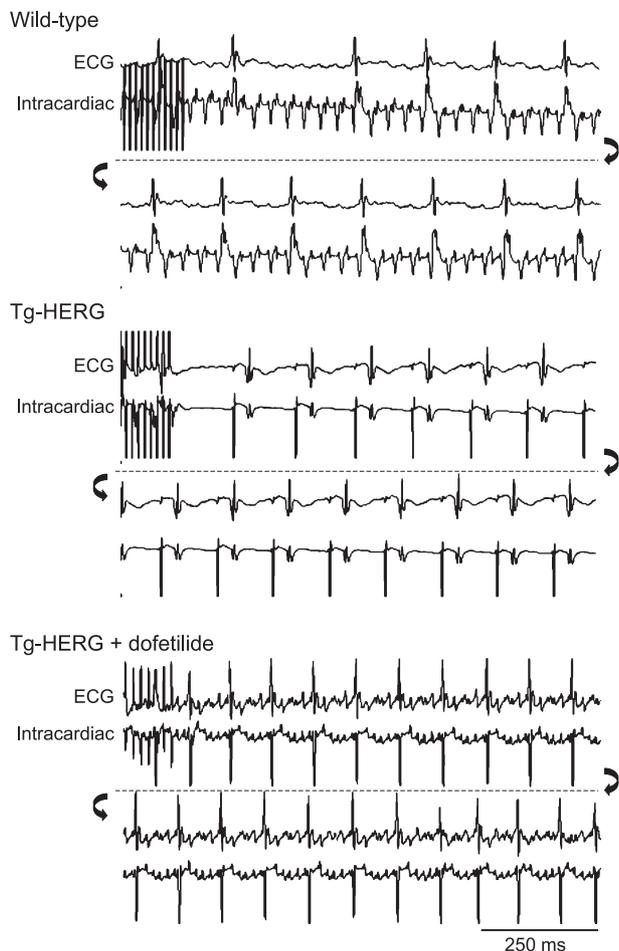


Fig. 4. Representative ECG and intracardiac recordings showing the effects of 2-s right atrial pacing at a cycle length of 15 ms following carbamylcholine injection (50 µg/kg) in wild-type and HERG-expressing (Tg-HERG) mice under baseline conditions (top and middle panels) and in a Tg-HERG mouse pretreated with dofetilide (10 mg/kg; bottom).

HERG in the mouse atria prevented the initiation of atrial arrhythmias. However, when induced, atrial arrhythmias in transgenic mice were comparable to those in WT animals. Again, rescue experiments were conducted in transgenic mice. Transgenic mice pretreated with dofetilide were as sensitive to atrial arrhythmias as WT mice (6/8 mice had arrhythmias; $p < 0.05$ vs. transgenic mice not receiving dofetilide; NS vs. WT mice), further demonstrating the role of HERG expression in the protection against cardiac arrhythmias.

In order to determine whether the protection against arrhythmias produced by HERG expression could eventually be reproduced by another human delayed rectifier K^+ current, similar protocols were conducted in transgenic mice expressing a hKCNQ1–hKCNE1 fusion protein (human KvLQT1 and its regulator mink) [25]. Fig. 5 shows representative surface ECGs and intracavity recordings obtained in WT and transgenic littermates. Both groups of mice were equally responsive to pacing. Indeed, atrial arrhythmias were reproducibly induced in 4/6 WT and 5/6 transgenic mice.

3.4. Atrial action potential recording and action potential-clamp

To gain further information into the mechanisms by which HERG prevents induction of arrhythmias, transmembrane action potentials (APs) were recorded in left atrial tissue from WT and HERG-expressing mice. Action potential-clamp studies were also conducted in cells expressing HERG. Finally, simulations were performed using a mathematical model of mouse ventricular AP [21] modified to incorporate the expression of human ERG [20]. As shown in Fig. 6A, the slope of adaptation of atrial action potential duration (APD) over a range of diastolic intervals was steeper in WT animals (0.130 ± 0.008 ; $n=5$) than in transgenic mice (0.051 ± 0.007 ; $n=6$; $p < 0.001$). We also observed that HERG expression in transgenic mice led to post-repolarization refractoriness: at a PCL of 200 ms, the ratio “effective refractory period/APD₉₀” was prolonged from 0.9 ± 0.1 in WT left atria ($n=7$) to 1.3 ± 0.1 in transgenic atria ($n=6$; $p < 0.05$). In cells expressing HERG, human-type action potentials induced an outward current with a characteristic waveform (Fig. 6B) [6]. Fig. 6C shows typical recordings in the same cell clamped with mouse atrial APs at physiological (100 ms) and long PCL (600 ms). At both PCL, a consistent I_{Kr} could be recorded during a mouse atrial AP. At PCL=100 ms, I_{Kr} was not entirely deactivated before the occurrence of the next AP (in Fig. 6C, the current is still outward at the end of the action potential). The time constants of deactivation (at -50 mV) of the HERG current expressed in Cos7 cells ($n=5$) were 54 ± 12 ms for the first one and 222 ± 32 ms for the second one. These values were similar to those obtained in isolated myocytes from transgenic mice, i.e. 44 ± 5 and 249 ± 66 ms ($n=6$). As a consequence, a portion of HERG channels were still open at the time of the upstroke, leading to the genesis

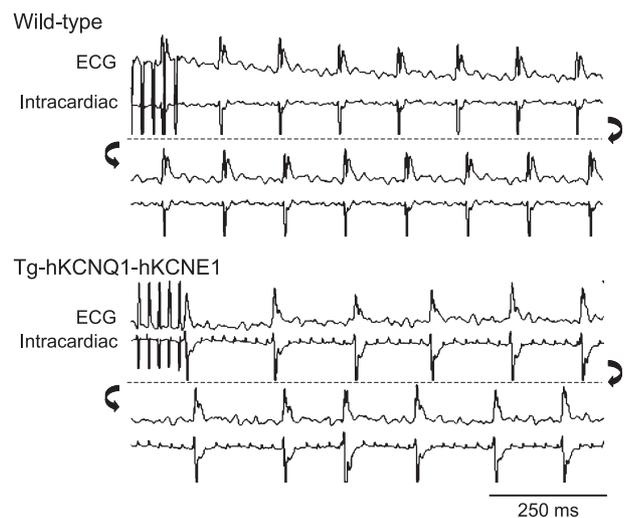


Fig. 5. Representative ECG and intracardiac recordings showing the effects of 1.5-s right atrial pacing at a cycle length of 20 ms following carbamylcholine injection (50 µg/kg) in wild-type and hKCNQ1–hKCNE1 expressing mice.

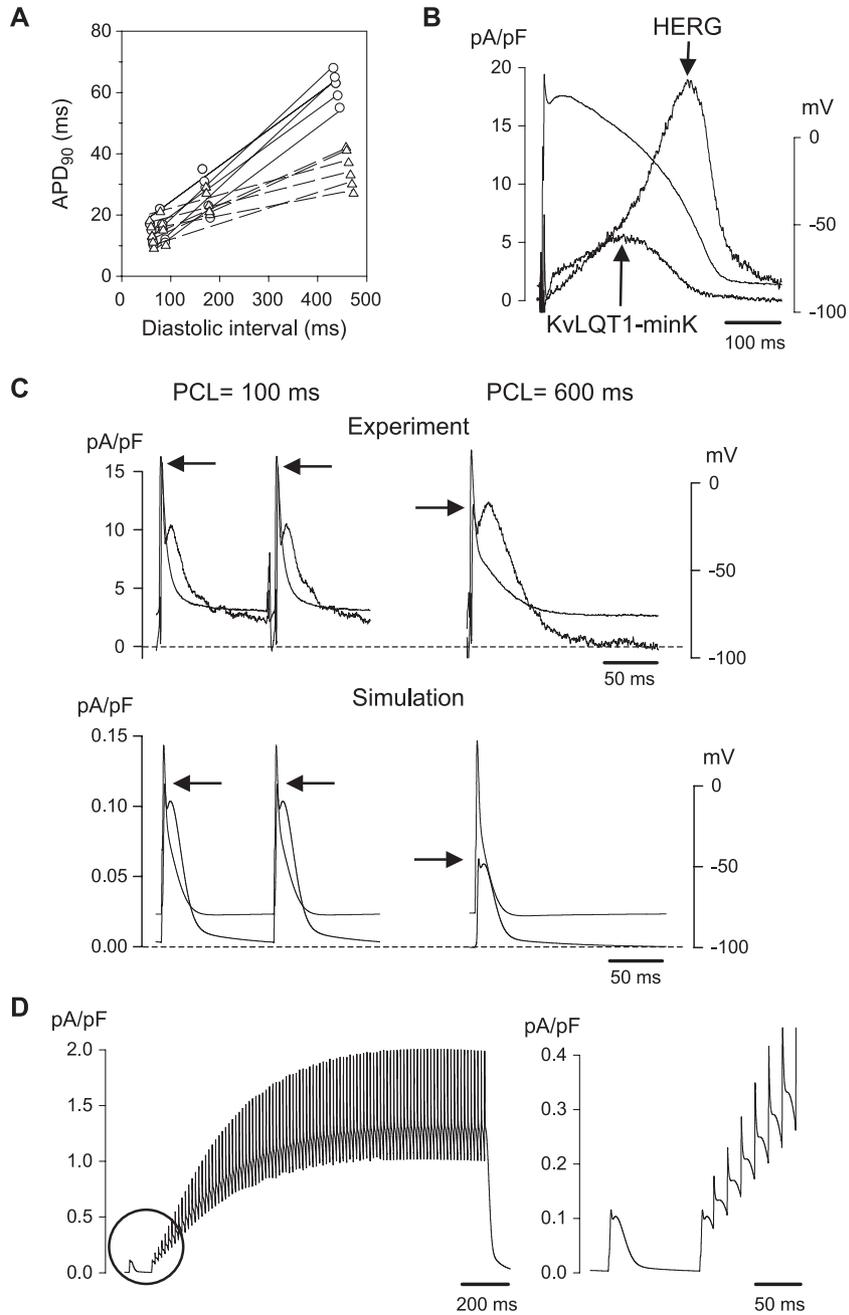


Fig. 6. (A) Relationship between the diastolic interval (*X*-axis) and the action potential duration at 90% of full repolarization (APD₉₀; *Y*-axis) in left atrial preparations from wild-type (open circles) and HERG-expressing (open triangles) mice. (B) Representative E4031- and HMR 1556-sensitive currents (thick lines; respectively HERG and KvLQT1-minK) induced by human ventricular action potential-clamp (thin lines; PCL=1000 ms) in Cos-7 cells transfected with HERG or hKCNQ1-hKCNE1. (C) Representative E4031-sensitive currents (thick lines) induced by mouse atrial action potential-clamp (thin lines) in a Cos-7 cell transfected with HERG (top panel) and action potentials (APs; thin lines) and HERG current (thick lines) simulated using the mouse ventricular myocyte model from Bondarenko et al. [21] with Markov human ERG [20] (bottom panel) at pacing cycle lengths (PCL) of 100 ms and 600 ms. The dotted lines indicates the 0 current level. Arrows indicate the peak outward currents. (D) Simulated HERG current of the mouse ventricular myocyte model induced during a burst of 100 APs with coupling intervals of 15 ms after the last AP of a series of 100 APs at PCL=100 ms. The trace within the circle is enlarged in the right panel.

of a transient outward current caused by a large instantaneous driving force. This was not seen at PCL=600 ms (the current at the diastole approximated zero). At the long PCL, more current was activated during the repolarization phase. This may explain the reduced slope of APD-rate adaptation observed in HERG-expressing mice. Cells transfected with

hKCNQ1-hKCNE1 fusion protein did not have any measurable HMR 1556-sensitive current when paced with mouse atrial APs (data not shown) although they presented a typical current when paced with human APs (Fig. 6B). Simulation studies with the mouse model [21] predicted a comparable HERG current during the time course of a

mouse action potential (Fig. 6C, bottom panels). It also predicted that at PCL=100 ms, I_{Kr} will not be entirely deactivated before the occurrence of the next AP, leading to an increasing transient outward current, as in HERG expressing cells. One difference between tissue preparations and the single cell model is the absence of action potential lengthening at long pacing cycle lengths in simulated mouse APs. As a consequence, at PCL=600 ms, the HERG current in the model was smaller than at PCL=100 ms. The mouse model also offered the opportunity to investigate further the transgene-induced current during protocols used to induce atrial arrhythmias experimentally. As shown in Fig. 6D, because of its slow deactivation kinetics, the HERG current was potentiated by short coupled extrasystoles and episodes of fast stimulation.

4. Discussion

Our study shows that expression of HERG in the mouse heart can exert anti-arrhythmic effects at both atrial and ventricular levels. To our knowledge, this is the first report of such a protective effect of HERG *in vivo*. Under baseline conditions, the ECG of HERG-expressing mice is almost undistinguishable from WT littermates with the exception of a slight shortening of the QT interval and of a more negative T wave aspect. In the mouse as in other larger animals, the polarity of the T wave is determined predominantly by the transmural gradient that occurs as a consequence of differences in APD [26]. A negative T wave is seen when the epicardium to endocardium repolarization gradient is small; i.e. in the order of 5 ms. Because mouse endocardial APs are longer than epicardial APs, one can speculate that more time is allocated for HERG channels to activate in the endocardium than in the epicardium. Thus, overexpression of HERG should have a greater effect on the endocardial than on the epicardial repolarization thereby reducing the transmural gradient. This likely explains the E4031-sensitive negative T wave in transgenic mice. Under basal conditions, other ECG parameters were normal including duration of repolarization. The role of HERG in transgenic ventricular repolarization was unmasked under the effects of E4031 and even more dramatically when transgenic mice had a reduced I_{to} current under tedisamil. These data strongly suggest that HERG channels participated to cardiac repolarization in transgenic animals even if their ECGs were close to normal.

Antiarrhythmic effects of HERG expression has already been described in a model of adult rabbit ventricular myocytes maintained in primary culture [5]. Adenoviral delivery of *HERG* gene to cultured myocytes (which normally develop prolongation of repolarization and early afterdepolarizations after a few days in culture) resulted in significant shortening of APD, increase in refractory period and decreased incidence of early afterdepolarizations (EAD). It is conceivable that overexpressing a voltage-dependent delayed rectifier K^+ channel, by increasing repolarization

reserve, could compensate for a loss of repolarizing current [8]. This mechanism may very well explain the prevention of barium-induced ventricular tachycardia in our mice. Barium is a well-known blocker of the inwardly rectifying I_{K1} current that was shown to depolarize the myocytes and generate abnormal automaticity in atria, ventricles and Purkinje fibers of different species [27–29], a mechanism that we also observed in mouse ventricular preparations with concentrations of $BaCl_2$ as low as 50–100 μ M (unpublished observations). Although it is difficult to predict the level of I_{K1} inhibition *in vivo*, this mechanism might be responsible for cardiac arrhythmias.

Protection against pacing-induced atrial arrhythmias is more difficult to understand. Based on the “leading circle” hypothesis of Allesie et al. [30], it is hard to conceive that increasing a repolarizing current could in fact protect against reentrant mechanisms. However, recent studies suggest that APD alternans are key elements in the genesis of reentry [31,32]. More recent studies demonstrate that overexpression of HERG suppresses electrical alternans in cardiac myocytes *in vitro* [33]. In our study, the slope of atrial APD adaptation to the rate was lower in transgenic animals than in wild-type mice, a phenomenon thought to prevent repolarization alternans and occurrence of arrhythmias [7]. In addition, as in cultured rabbit myocytes [5], expression of HERG in mice prolonged the refractory period in atrial myocytes and led to post-repolarization refractoriness that should again prevent arrhythmia genesis. Moreover, simulation studies show that fast pacing leads to an accumulation of HERG current. Since repolarization is governed by a fine balance between inward and outward currents, this abrupt increase in repolarizing capacity may account for the lower excitability of transgenic mice cardiac myocytes during initiation of tachyarrhythmias.

Mice have become an increasingly important model for studying cardiac channelopathies and arrhythmias, largely because of the development of technologies allowing manipulation of the mouse genome [34]. Although cardiac electrophysiology in mouse clearly differs from that in human, several mouse models of channelopathies convincingly recapitulate the clinical phenotype in patients. Some mouse models have spontaneous cardiac arrhythmias, despite their small heart size and rapid heart rate, previously thought as limiting factors for triggering arrhythmias. Although species differences must be kept in mind when analyzing the results, the mouse heart, presents the advantage of allowing both molecular and integrated investigations of cardiac arrhythmias physiopathological mechanisms.

In conclusion, the present study shows that HERG expression can protect against experimental induction of arrhythmias at both atrial and ventricular levels. Inversely, it was recently shown that gain-of-function mutations of HERG can lead to short QT syndrome and sudden cardiac death [9]. Therefore it appears that increasing HERG current could have both antiarrhythmic and proarrhythmic activities, as also the case when HERG is reduced. However, evaluating further the antiarrhythmic potential of increasing

I_{Kr} could be of interest in patients with left ventricular dysfunction, for which class III antiarrhythmic drugs are useless in preventing sudden death, and also in patients with the long QT syndrome.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Ministère de la Recherche (ACI “Biologie du Développement et Physiologie Intégrative” 2001) and the Fondation de France. The authors wish to thank Béatrice Le Ray and Marie-Jo Louérat (INSERM U533) for expert technical assistance.

References

- [1] Waldo AL, Camm AJ, deRuiter H, Friedman PL, MacNeil DJ, Pauls JF, et al. Effect of d-sotalol on mortality in patients with left ventricular dysfunction after recent and remote myocardial infarction. The SWORD Investigators. Survival with oral d-Sotalol. *Lancet* 1996;348:7–12.
- [2] Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Green ED, Keating MT. A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* 1995;80:795–803.
- [3] Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME, Keating MT. A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the I_{Kr} potassium channel. *Cell* 1995;81:299–307.
- [4] Haverkamp W, Breithardt G, Camm AJ, Janse MJ, Rosen MR, Antzelevitch C, et al. The potential for QT prolongation and proarrhythmia by non-anti-arrhythmic drugs: clinical and regulatory implications. Report on a Policy Conference of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res* 2000;47:219–33.
- [5] Nuss HB, Marban E, Johns DC. Overexpression of a human potassium channel suppresses cardiac hyperexcitability in rabbit ventricular myocytes. *J Clin Invest* 1999;103:889–96.
- [6] Lu Y, Mahaut-Smith MP, Varghese A, Huang CL, Kemp PR, Vandenberg JJ. Effects of premature stimulation on HERG K⁺ channels. *J Physiol* 2001;537:843–51.
- [7] Gilmour Jr RF. A novel approach to identifying antiarrhythmic drug targets. *Drug Discov Today* 2003;8:162–7.
- [8] Biliczki P, Virag L, Iost N, Papp JG, Varró A. Interaction of different potassium channels in cardiac repolarization in dog ventricular preparations: role of repolarization reserve. *Br J Pharmacol* 2002;137:361–8.
- [9] Brugada R, Hong K, Dumaine R, Cordeiro J, Gaita F, Borggreffe M, et al. Sudden death associated with short-QT syndrome linked to mutations in HERG. *Circulation* 2004;109:30–5.
- [10] Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK. Two components of cardiac delayed rectifier K⁺ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J Gen Physiol* 1990;96:195–215.
- [11] Mitchell GF, Jeron A, Koren G. Measurement of heart rate and Q–T interval in the conscious mouse. *Am J Physiol* 1998;274:H747–51.
- [12] Dukes ID, Cleemann L, Morad M. Tedisamil blocks the transient and delayed rectifier K⁺ currents in mammalian cardiac and glial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;254:560–9.
- [13] Jurkiewicz NK, Sanguinetti MC. Rate-dependent prolongation of cardiac action potentials by a methanesulfonanilide class III antiarrhythmic agent. Specific block of rapidly activating delayed rectifier K⁺ current by dofetilide. *Circ Res* 1993;72:75–83.
- [14] Wakimoto H, Maguire CT, Kovoov P, Hammer PE, Gehrman J, Triedman JK, et al. Induction of atrial tachycardia and fibrillation in the mouse heart. *Cardiovasc Res* 2001;50:463–73.
- [15] Schrickel JW, Bielik H, Yang A, Schimpf R, Shlevkov N, Burkhardt D, et al. Induction of atrial fibrillation in mice by rapid transesophageal atrial pacing. *Basic Res Cardiol* 2002;97:452–60.
- [16] Kovoov P, Wickman K, Maguire CT, Pu W, Gehrman J, Berul CI, et al. Evaluation of the role of I(KACh) in atrial fibrillation using a mouse knockout model. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:2136–43.
- [17] Le Bouter S, Demolombe S, Chambellan A, Bellocq C, Aimond F, Toumaniantz G, et al. Microarray analysis reveals complex remodeling of cardiac ion channel expression with altered thyroid status: relation to cellular and integrated electrophysiology. *Circ Res* 2003;92:234–42.
- [18] Mohammad-Panah R, Demolombe S, Riochet D, Leblais V, Lousouarn G, Pollard H, et al. Hyperexpression of recombinant CFTR in heterologous cells alters its physiological properties. *Am J Physiol* 1998;274:C310–8.
- [19] Lerche C, Seebohm G, Wagner CI, Scherer CR, Dehmelt L, Abitbol I, et al. Molecular impact of MinK on the enantiospecific block of I(Ks) by chromanols. *Br J Pharmacol* 2000;131:1503–6.
- [20] Clancy CE, Rudy Y. Cellular consequences of HERG mutations in the long QT syndrome: precursors to sudden cardiac death. *Cardiovasc Res* 2001;50:301–13.
- [21] Bondarenko VE, Szigeti GP, Bett GC, Kim SJ, Rasmusson RL. Computer model of action potential of mouse ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:H1378–403.
- [22] Demolombe S, Lande G, Charpentier F, an Roon MA, van den Hoff MJ, Toumaniantz G, et al. Transgenic mice overexpressing human KvLQT1 dominant-negative isoform. Part I: Phenotypic characterisation. *Cardiovasc Res* 2001;50:314–27.
- [23] 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;50:328–34.
- [24] 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;89:944–56.
- [25] Marx SO, Kurokawa J, Reiken S, Motoike H, D’Armiento J, Marks AR, et al. Requirement of a macromolecular signaling complex for beta adrenergic receptor modulation of the KCNQ1–KCNE1 potassium channel. *Science* 2002;295:496–9.
- [26] 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* 2003;555:276–9.
- [27] Reid JA, Hecht HH. Barium-induced automaticity in the right ventricular muscle of the dog. *Circ Res* 1967;21:849–56.
- [28] Toda N. Barium-induced automaticity in relation to calcium ions and norepinephrine in the rabbit left atrium. *Circ Res* 1970;27:45–57.
- [29] Anyukhovskiy EP, Rosen MR. Electrophysiologic effects of alprafenone on canine cardiac tissue. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994;24:411–9.
- [30] Allesie MA, Bonke FI, Schopman FJ. Circus movement in rabbit atrial muscle as a mechanism of tachycardia: III. The “leading circle” concept: a new model of circus movement in cardiac tissue without the involvement of an anatomical obstacle. *Circ Res* 1977;41:9–18.
- [31] 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;86:396–407.
- [32] Kim BS, Kim YH, Hwang GS, Pak HN, Lee SC, Shim WJ, et al. Action potential duration restitution kinetics in human atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:1329–36.
- [33] Hua F, Gilmour Jr RF. Contribution of I_{Kr} to rate-dependent action potential dynamics in canine endocardium. *Circ Res* 2004;94:810–9.
- [34] Nerbonne JM. Studying cardiac arrhythmias in the mouse—a reasonable model for probing mechanisms? *Trends Cardiovasc Med* 2004;14:83–93.

Molecular description of KCNE1/KCNQ1 cardiopathies

Céline S Nicolas^{*#}, Julien Piron^{*#}, Nicolas Rodriguez^{*#}, Frank Choveau^{*#}, Shehrazade Dahimène^{*#}, David Pérez^{*#}, Jean Mérot^{*#}, Isabelle Baró^{*#} and Gildas Loussouarn^{*#}.

From INSERM^{*}, U533, Nantes, F-44000, France and the Université de Nantes[#], Faculté de Médecine, l'institut du thorax, Nantes, F-44000, France;

ABSTRACT

In the heart, KCNQ1 generates the slow component of the delayed rectifier K⁺ current, I_{Ks}. Since KCNQ1 and its cardiac regulatory protein KCNE1 have been cloned, around 300 pathological mutations were identified on KCNQ1, and more than 20 in KCNE1. The majority of these mutations are loss-of-function mutations, associated to the Long QT syndrome (LQTS), but recently, some gain-of-function mutations have been linked to other cardiopathies: atrial fibrillation (AF), short QT syndrome (SQTS) and the list of pathological mutations is still growing.

This chapter reviews what pathological (and sometimes artificial) mutations brought to the knowledge of structure-function relationship. We illustrate the variety of functional effects throughout this chapter, as a demonstration of the complexity of ion channel macrostructures. We also show that the level of understanding of the mechanism underlying each mutation effect is very variable: in some cases it is limited to the absence/decrease of the I_{Ks} current, most frequently the macroscopic mechanism (assembly, trafficking, gating...) is delineated, but in recent studies molecular events are more detailed (PIP₂ regulation, assembly domain interaction...)

CONTENT

1. Introduction : KCNQ1 associated channelopathies	2
2. Molecular mechanisms impaired by KCNQ1 or its partners mutations	2
2.1. Assembly and trafficking	3
2.1.1. Channel assembly.....	3
2.1.2. Channel trafficking.....	3
2.2. Conductance/selectivity	4
2.2.1. Single channel conductance	4
2.2.2. Selectivity.....	5
2.3. Voltage-dependent gating	6
2.4. Regulators (PKA, PKC, PIP ₂ , stretch)	8
2.4.1. Sympathetic stimulation.....	8
2.4.2. Stretch.....	9
2.4.3. phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP ₂).....	9
2.5. Partners association	10
2.5.1. KCNE1	10
2.5.2. Other members of the KCNE family.....	11
2.5.3. Isoform 2	12
2.5.4. Calmodulin (CaM)	12

2.5.5.	AKAP	13
2.5.6.	Nedd4/Nedd4-like ubiquitin protein ligases	13
2.5.7.	fhl2	13
2.6.	Mutated partners	14
2.6.1.	KCNE1	14
2.6.2.	KCNE-related family	14
2.6.3.	AKAP	15
2.6.4.	Nedd4/Nedd4-like ubiquitin protein ligases	15
3.	Conclusion	15
4.	References	17

1. INTRODUCTION : KCNQ1 ASSOCIATED CHANNELOPATHIES

KCNQ1 is the α -subunit (figure 1) of a voltage-activated potassium channel expressed in various cell types including cardiac myocytes and epithelial cells. KCNQ1 associates with different β -subunits of the KCNE protein family. In the human heart, KCNQ1 associates with KCNE1 to generate the I_{Ks} current characterized by its slow activation and deactivation kinetics [1,2]. KCNQ1 and KCNE1 loss-of-function mutations have been reported as responsible for the cardiac long QT syndrome (LQTS), characterized by prolonged QT interval on the electrocardiogram, syncope and sudden death. Until now, nearly three hundred different KCNQ1 mutations have been associated with the type 1 LQTS whereas more than twenty KCNE1 mutations are associated with the type 5 LQTS. Only a few KCNQ1 gain-of-function mutations have been reported and linked to atrial fibrillation (AF, a cardiac arrhythmia characterized by rapid and irregular activation of the atrium) or the short QT syndrome (shortened QT interval which may lead to syncope and sudden death). Patch-clamp and immunofluorescence techniques are instrumental to characterize the molecular mechanisms responsible for the altered function of KCNQ1 and its partners [3].

The current generated by KCNQ1 (as any other ion channel) depends on 4 parameters: number of channels N , the channels open probability (P_o), single channel conductance (γ) and electromotive force. The electromotive force is the difference between the membrane potential E and the reversal potential E_{rev} at which no current crosses the channel. The current I crossing the whole membrane is thus given by:

$$I = N \cdot P_o \cdot \gamma \cdot (E - E_{rev}) \quad \text{Equation 1}$$

Channel mutation can affect N (through trafficking, cf. §2-1), but also γ (§2-2) and P_o (§2-3). But it can also affect the channel through its regulation sites (phosphorylation sites for instance, §2-4) and partner docking sites (§2-5). Moreover partners can also be mutated (§2-6). This means that identifying the partners belonging to the complex would be a way to track new mutations implicated in the pathogenesis. For that reason, the partners identification has been a major challenge for KCNQ1 (and any protein implicated in congenital pathologies) in the last decade.

Figure 1 represents some particularly relevant mutations which will be discussed in this chapter. Mutations are distributed thorough the whole protein, some hot spots have a specific functional impact, suggesting specific role for these regions.

2. MOLECULAR MECHANISMS IMPAIRED BY KCNQ1 OR ITS PARTNERS MUTATIONS

2.1.ASSEMBLY AND TRAFFICKING

It is now clear that processing defect of ion channel proteins is a major mechanism in the pathogenesis of a number of inherited channelopathies and a well-known example is cystic fibrosis. Since KCNQ1 gene was cloned, many LQTS mutations have been shown to induce trafficking defects that generally determine endoplasmic reticulum (ER) retention of mutant channels. Moreover, depending on the functional region targeted by the mutations, mutant subunit can assemble or not with WT subunits and exhibits a dominant negative effect on the trafficking of heteromultimeric (WT and mutant) channel and thus partially explains the phenotypic distinction between the dominant Romano Ward and recessive Jervell and Lange-Nielsen (JLNS) syndromes.

2.1.1. CHANNEL ASSEMBLY

Most of the mutations known to interfere with channel assembly are localized in the cytoplasmic carboxy-terminal domain of the protein. For example, Schmitt and colleagues highlighted a small domain (between the amino-acids 589 and 620) and showed that a JLNS mutation removing this region, impedes KCNQ1 tetramerization [4]. Even though it was not specifically analyzed in this study, one can reasonably speculate these mutations altered KCNQ1 trafficking. In another study [5], three probands were identified with a heterozygous single nucleotide mutation in the same region resulting in the substitution of threonine 587 by a methionine (T587M). In both studies, functional patch-clamp analysis revealed these JLNS mutants were non-functional and did not exert a dominant negative effect on the WT channel as a result of impaired assembly properties with WT subunits. Mistrafficking of KCNQ1-T587M was demonstrated using GFP-tagged channels. Together these studies corroborate the idea that mutations in the assembly domain impair the trafficking of the mutant channel protein but do not reduce the trafficking of the channel protein produced by the WT allele because it cannot associate with it. This was the first KCNQ1 mutation described in the assembly domain that induced an abnormal processing of the mutant channel. But recent biochemical data on the assembly domain suggest that mutations like T587M do not prevent tetramerization of the assembly domain [6]. The authors suppose that tetramers are made, but they don't pass the cell quality control because of their inability to interact with partners like yotiao which binds the same region (cf. §2-5). More importantly, this work brings some insights on the molecular determinants in the assembly domain restricting to specific combination between the 5 different KCNQ subunits (for instance KCNQ1 exclusively forms homotetramer, and KCNQ3 can barely form homotetramer).

The picture of KCNQ1 subunits assembly might be more complicated and studies from Aizawa and colleagues suggested the existence of another assembly domain [7]. They identified a frameshift mutation in a Romano-Ward family in which a cytosine was replaced by a doublet of guanine. The resulting mutant KCNQ1 (KCNQ1 178fs) lacks the S3 to S6 and the C-terminal domains that are replaced by 105 new amino acids. Aizawa and colleagues showed this mutant was not transported to the plasma membrane and, puzzling enough, it exerted a dominant negative effect on the wild type despite the absence of the C-terminal assembly domain. This finding suggests the presence of another assembly domain in the N-terminal region of the protein that remains to be characterized.

2.1.2. CHANNEL TRAFFICKING

Previous studies highlighted the role of KCNQ1 N-terminus in the channel trafficking. A splice variant of KCNQ1, isoform 2, lacking the N-terminus has been identified. This truncated protein is not expressed at the plasma membrane but is retained in the endoplasmic reticulum suggesting that KCNQ1 N-terminus has a critical role in channel trafficking [8]. Furthermore, three mutations (Y111C, L114P, P117L) within this domain have been implicated in inherited Romano-Ward syndrome [9,10,11]. The expression of these mutants in COS-7 and cardiomyocytes showed that the mutant proteins failed to exit the ER and exert a dominant negative effect on the wild type channel by preventing plasma membrane trafficking of heteromultimeric channels [12,13].

KCNQ1 α -subunit is part of a large multimolecular complex with a number of partners. Trafficking defects of the KCNQ1 complex may arise from mutations on KCNQ1 itself or one of its partners. For example, a calmodulin-binding motif was characterized by the yeast two-hybrid system in KCNQ1 C-terminus [14]. Two studies showed that LQTS mutations in or near, the calmodulin binding domain on KCNQ1 (the IQ domain) disturb the KCNQ1 α -subunit assembly and its trafficking. [15,16]. Mutations targeting protein partners can affect KCNQ1 function (detailed in §2-6) but also its trafficking: Krumer and colleagues showed that the L51H substitution on the ancillary subunit KCNE1 is responsible for LQTS. This mutation impedes KCNE1 trafficking to the plasma membrane and surprisingly induced the retention of KCNQ1 in the ER. This result indicates that the physical interaction between KCNQ1 and its ancillary subunit occurs early in the ER before trafficking to the Golgi and plasma membrane [17].

In the literature there are many examples for pharmacological rescue of defective channels trafficking like HERG [18,19,20]. But, no study highlights this effect on KCNQ1 trafficking defects. For example Wilson and colleagues, who studied a number of KCNQ1 mutants, found that these mutants are retained in the ER but didn't observe any effect of the temperature, chromanol 293B and HMR1556 specific inhibitors of the channel, on the trafficking of these mutants [21]. Thus, a better comprehension of the mechanisms implicated in the KCNQ1 assembly, folding and of the key points in the retention in the ER may offer the tools to rescue the trafficking of KCNQ1 mutants.

2.2.CONDUCTANCE/SELECTIVITY

2.2.1. SINGLE CHANNEL CONDUCTANCE

The single channel conductance γ multiplied by the electromotive force is the unitary current passing through a single open channel (i_{single}). The straightest way to measure the single channel conductance in a controlled ionic environment is the detection of i_{single} using patch clamp in the inside-out configuration. However attempts to apply this method to KCNQ1 were not successful because of a very rapid flickering of the channel current that precludes the clear observation of gating transitions and maximal single channel current [22,23]. An alternative approach is the recording of current fluctuations in a patch integrating many channels. Mean total current I , its variance σ_I^2 , channels number N and i_{single} are simply related by:

$$\sigma_I^2 = i_{\text{single}} \cdot I - I^2 / N \quad \text{Equation 2}$$

Thus recording the current and its variance enables the determination of i_{single} . Flickering remains problematic. It results in an acquisition frequency dependent estimation of the current variance, which is underestimated when acquisition frequency is too low. Nevertheless I_{Ks} single channel conductance was determined to be 8 to 16 pS in 100 mM outer potassium (inward current) or 100mM inner potassium (outward current) at acquisition frequencies

above 5 kHz [23,22,24]. It is noteworthy that these studies report a 4 to 6-fold increase in single channel conductance when KCNQ1 is co-expressed with its subunit KCNE1 (giving the I_{Ks} current). This strong effect can be explained by the vicinity of the β -subunit with the pore: KCNE1 interacts with the S6 KCNQ1 segment lining the pore (cf §2-6) and has even been controversially suggested to be exposed to the aqueous ion pathway [25,26,27].

To date a minority of pathological mutations of KCNQ1 has been characterized by electrophysiological means. Current amplitude and voltage dependence of channels in a membrane patch are then consistently measured. But single channel conductance is never determined, certainly because the reliability of this determination remains debatable.

However, the effects of two mutations on single channel conductance of I_{Ks} have been determined. Both are located on the KCNE1 subunit: S74L and D76N [23]. They are responsible for a Romano-Ward form of the long QT syndrome [28] and located in the C-terminal part near the transmembrane domain. S74L and D76N KCNE1 expressed with KCNQ1 reduce the single channel conductance of I_{Ks} by 40% and 70% respectively. Cells mimicking heterozygotes (equal amount of WT and mutant KCNE1 cDNA) have intermediate phenotypes. This single channel study usefully completed a previous one that evidenced the effect of the mutations on voltage gating alteration (positive shift of the voltage dependence of activation and accelerated deactivation) [28]. A discrepancy remains in the case of D76N that was non functional in their case which has been observed again by another group [29] still in *Xenopus* oocytes.

2.2.2. SELECTIVITY

Selectivity is the ability for a channel to favor the crossing of certain ions species. Potassium channels are highly selective channels that are able to distinguish accurately monovalent cations notably excluding sodium [30]. A highly conserved amino-acid sequence in the pore loop (-TxxTxGYGD-), called selectivity filter, plays a crucial role [31]. Mutations in this region, and possibly in residues accessible to the aqueous ion pathway, are particularly expected to affect the channel selectivity. The causes of the selectivity of potassium channels have been firmly established after the determination of the crystal structure of the bacterial channel KcsA [32]. The main features are a short and narrow selectivity filter flanked by neutral residues pointing carbonyl oxygen dipoles toward the pore thus stabilizing cations, nearby acidic residues on both sides of the filter, a large cavity in the center of the membrane accommodating solvated ions and the four dipolar pore helices pointing to the center of the cavity stabilizing a central cation. This picture is supposed to apply to I_{Ks} even if the place of KCNE1 remains to be determined. Regarding the conduction mechanism, potassium channels have been shown to be multi-ions channels (2 potassium ions interacting with each other in the selectivity filter during the flow) [33]. Hence potassium flow in KcsA is a non-linear function of the potassium concentration [30].

A channel is selective provided that it is more permeable to certain ions than to others. The relative permeability of a channel to two ions is generally determined by measuring the change of reversal potential that occurs when an ion in the outer medium of a cell is replaced by the other. From reversal potential measurements, permeabilities of cations through I_{Ks} channels are sorted in the order: K^+ , Rb^+ > Cs^+ , NH_4^+ > Na^+ , Li^+ [23]. This sequence is common among potassium channels. KCNQ1 alone obeys the same selectivity sequence but the β -subunit has a slight influence lowering Cs^+ and NH_4^+ relative permeabilities [23,34]. This is consistent again with the supposed interaction of KCNE1 with the pore.

Without scanning each ion, a difference of selectivity between a WT channel and a mutated form can also be revealed by a difference of reversal potential in the same ionic environment. Such method has been used in several studies on pathological mutations affecting the pore

domain (S5-S6) of KCNQ1. No significant shift of the reversal potential has been detected for the following mutants co-expressed with WT KCNQ1 and KCNE1: G269D, W305S, G314S, Y315S, L342F [35], Y281C, A300T, Y315C [36], L272F, T311I [37], G307R, T312I, G314S, D317N (studied in a splice variant of KCNQ1 [34]). In the last study, permeability ratios of different ions were measured. Simple equality of reversal potentials between WT and mutated channels was checked in the other studies and only a potassium or sodium permeability change was thus detectable.

In other channels mutations in the pore domain alter the channel selectivity. For instance, the Shaker G6S mutation analogous to the KCNQ1 mutation G314S has been shown to strongly favor sodium permeation [31]. Why in KCNQ1, coexpression of pore domain mutant subunits does not affect heteromultimeric (WT and mutant) channel function? All these mutations except A300T and L272F do not yield functional channels when expressed alone. They all have a dominant negative effect on WT channels except A300T. This indicates that heteromultimeric channels are most likely to be non functional and the absence of effect on the reversal potential does not imply that these mutations do not affect an amino-acid implicated in the selectivity of the channel. In fact, the measured current may be generated by tetramers of WT subunits. This is thus not surprising that most of these mutations are associated with the dominant form of the Long QT syndrome (Romano-Ward). Only W305S is associated with the Jervell Lang Nielsen syndrome (recessive form of LQTS with deafness) [38] and Y281C and A300T which are associated with a mild Romano-Ward syndrome with low penetrance [39,40].

I_{Ks} channel selectivity may be affected by mutations in KCNE1 also. Though they modify the single channel conductance, S74L and D76N mutated KCNE1 expressed with WT KCNQ1 do not change permeabilities of several cations [23]. V47F alters channels gating but entails no change in reversal potential [29]. One mutation has however been shown to affect the selectivity: G56C slightly increases sodium permeability [25]. An increase in reversal potential has also been measured in the case of the Romano-Ward KCNE1 mutation W87R but may be due to leak contamination according to the authors of the study [29].

2.3.VOLTAGE-DEPENDENT GATING

Approximately 300 different pathological mutations have been described in KCNQ1, but only forty have been studied by the patch-clamp technique. On these forty mutations, about half modifies the voltage-dependent gating of KCNQ1. Mutations that only modify the KCNQ1 gating properties most frequently induce a shift of the voltage dependence towards more positive potentials and change the time constant of activation or deactivation. For some of these mutations, a molecular mechanism may explain the shift in the voltage dependence (cf §2-4).

The correlation between the effect of the mutation on the current biophysics and the severity of the associated disease (Long QT syndrome) is not crystal clear. The R243H mutation has a profound impact on the channel voltage dependence, the half activation potential ($V_{0.5}$) being shifted by 66 mV compared with KCNE1-KCNQ1 but heterozygous carriers of that mutation are asymptomatic with no major QTc prolongation. On the other hand, another mutation associated with a smaller change in the channel biophysics (34 mV shift for R539W) may lead to sudden death [41].

Most of the pathologic mutations lead to channel loss of function. Only three mutations lead to a gain of function, through an alteration of the channel voltage dependence: S140G [42], V141M [43] and V307L [44]. The S140G mutation is associated to atrial fibrillation (AF), V307L to short QT syndrome (SQTS) and V141M to both. AF is a cardiac arrhythmia

characterized by a rapid and irregular activation of the atrium. Loss of coordinated atrial contraction results in blood stasis and reduced ventricular filling. Epidemiologic studies have shown that age, hypertension and left atrial dilatation, a marker of atrial stretch, are risk factors for AF [45,46]. Electrophysiological defects could also be an important risk factor. S140G is located in the S1 transmembrane segment of KCNQ1 in a position close to the extracellular surface of the plasma membrane. Expression of the S140G mutant alone leads to a voltage-independent channel which is then constitutively open. As with the WT channel, the current density is markedly increased by KCNE1 coexpression, but the channel is still voltage-independent. Given the likely importance of I_{Ks} in repolarization of the human atria, it is reasonable to expect that the S140G mutation shortens atrial action potentials and cause atrial fibrillation.

The electrophysiological phenotype of V141M is the same one that S140G: a gain of function by a loss of voltage-dependent KCNQ1 gating. It is unclear how the S140G and V141M abolish the voltage-dependent gating of KCNQ1 channel. Unlike KCNE1, channels formed by coassembly of KCNQ1 and KCNE2 [47] or KCNE3 [48] subunits are constitutively open, similar to the behavior caused by the V141M and S140G mutations in KCNQ1. The finding that two adjacent mutations in KCNQ1 can convert slowly activating KCNE1-KCNQ1 channels into constitutively open channels suggest that a previously unrecognized interaction between KCNE subunits and the extracellular end of the KCNQ1 S1 domain mediates the gating of these heteromultimeric channels. Another hypothesis is that S140G and V141M mutations prevent the S4 domains movement across the membrane, blocking them in a permissive conformation, leaving KCNE1-KCNQ1 channel in the open state. To verify this hypothesis, it would be necessary to measure the gating current (generated by S4 movements) in the S140G and V141M mutant channels.

The last mutation which lead to a gain of KCNQ1 function, V307L [44], is associated with a short QT syndrome. This mutation is localized in the pore region. Previously, the V307L mutation has been investigated on *Xenopus* oocytes, in the absence of KCNE1 [49]. V307L led to suppression of KCNQ1 inactivation, a characteristic that is exclusively observed in the absence of KCNE1 [50]. In the presence of KCNE1, the effects of V307L mutation are an acceleration of the activation kinetics and a shift of the $V_{0.5}$ of 14.7 mV to potentials more negative. How a mutation localized in the pore can modify the voltage-dependent gating of channel? Would it mean that the voltage-dependent gate is in the pore region?

The location of this gate remains unclear. Based on properties of block of a voltage-gated potassium channel (K_v) by organic molecules, Armstrong first proposed that the activation gate of these channels was located at the intracellular entrance to the pore: the tetraethylammonium and its long chain derivatives block the squid axon delayed rectifier K^+ channel only after it has been opened [51,52], suggesting that the gate is below the TEA binding site, on the intracellular side of the channel. More recent work confirm the position the gate at this intracellular entrance, which corresponds to the S6 bundle crossing in the $K_v1.2$ channel structure [53]. The rate of chemical modification of cysteines engineered on the cytosolic side of the bundle crossing is much less state dependent than on the other side, providing strong support for the intracellular location of the activation gate in K_v channels [54,55]. This seems to be also applicable to hyperpolarization-activated cation channels [56]. But several studies suggest that one activation gate exists at the selectivity filter, at least for some channels. First, it has been shown that permeant ion slows deactivation gating of squid axon voltage-dependent potassium current [57]. Another argument is that channel gating can produce subconductance levels with various selectivity in Shaker channels [58], leading to a model with two coupled activation gates, one in the pore region (selectivity filter), one at the bundle crossing, hypothesis further supported by thermodynamics consideration [59]. An

argument that is very convincing at first, but may be in fact taken with more caution [60], is that in some channel, like the cyclic nucleotide-gated channels, the bundle crossing does not effectively restrict access to cysteines located in the channel large cavity, leading to the conclusion that these channels are indeed gated at the selectivity filter [61]. The effects of the pore region mutation V307L would be another argument in favor of the presence of an activation gate at the selectivity filter.

Of forty mutations altering the KCNQ1 voltage-dependent gating, thirty two are located in the voltage-sensor (S4), in the linker S4-S5 and in the C-terminal part of S6. This localization of mutations suggests an important role for the linker S4-S5 and the C-terminal part of S6 in the potassium channel gating, as confirmed by the $K_v2.1$ structure [53].

2.4. REGULATORS (PKA, PKC, PIP₂, STRETCH)

In respect to the crucial role of I_{Ks} in shaping the cardiac action potential as well as in controlling heart rhythm, KCNE1/KCNQ1 channels are tightly regulated by several regulators that modulate the properties of the channel complexes. With the combination of molecular genetic analysis of human disease, site directed mutagenesis and patch clamp electrophysiological analysis, we have learned a great deal about the molecular determinants of the regulation of this channel by sympathetic nervous activity, membrane stretch, and phospholipids.

2.4.1. SYMPATHETIC STIMULATION

The onset of polymorphic ventricular tachycardia in patients with LQTS is often triggered by adrenergic stress, suggesting the physiological importance of β -adrenergic regulation of ion channels responsible for ventricular repolarization.

It has been known for many years that sympathetic nervous system regulation of cardiac action potential duration is mediated by β -adrenergic receptor activation, which increases I_{Ks} current amplitude, slows down the deactivation kinetics and shift the activation curve to more negative potential range [62]. This upregulation of the KCNE1/KCNQ1 current mediated by β -adrenergic receptor activation requires an increased level of 3',5'-monophosphate (cAMP) and thereby protein kinase A (PKA) stimulation, which interacts with the I_{Ks} complex through the AKAP Yotiao, as discussed in §2-5.

PKA phosphorylation of S27, S468 and T470, respectively in the KCNQ1 N-terminus and C-terminus, accounts for the functional modulation of I_{Ks} by the sympathetic nervous system. The serine to alanine substitution in position 27 (S27A) in KCNQ1, which is phosphorylated in response to cAMP, eliminated cAMP-dependent enhancement of I_{Ks} channel [63]. According to another group, S468 and T470 also play a role in PKA stimulation [64]. The cAMP-mediated regulation of KCNQ1 channels in mammalian expression systems is dependent on coexpression of KCNE1 since mutations described in both KCNQ1 and KCNE1 identified in long QT syndrome patients have been found to disrupt this regulation [65,63].

I_{Ks} is also regulated by α -adrenergic receptors via the PKC pathway, as originally suggested by a study on the endogenous *Xenopus* KCNQ1 revealed by KCNE1 expression [66]. However, in this model, I_{Ks} was downregulated by PKC, as opposed to a study in ventricular myocytes from guinea pigs [67]. Other studies illustrate that KCNQ1 regulation is species dependent. For example, human KCNQ1 expressed in *Xenopus* oocytes is upregulated by PKC [68], as opposed to the endogenous *Xenopus* KCNQ1. The same study suggested that PKC is also implicated in the signal transduction pathway between β_3 -adrenoreceptors and I_{Ks} . Also in this work, site directed mutagenesis experiments elucidated that four putative C-terminal PKC phosphorylation sites on KCNQ1 (S409A, S464A, T513A

and S577A) have functional significance. In presence of these mutations, the increase of I_{Ks} after maximal stimulation by the β -adrenergic agonist isoproterenol was considerably reduced. Also in KCNE1, asparagine at position 102 (N102) was identified as critical for the regulation of I_{Ks} by PKC [69]. This shows that similarly to PKA, PKC regulation implicates both KCNE1 and KCNQ1.

2.4.2. STRETCH

Under physiological conditions, such as absorption and secretion, as well as in pathophysiological situations, cell volume and pH may undergo considerable changes. The KCNQ1 current has been shown to be increased upon cell swelling (due to extracellular hypoosmolarity) and may participate in regulatory volume decrease in airway epithelial cells [70]. In *Xenopus* oocytes coexpressing KCNQ1 and aquaporins, the KCNQ1 current generated can be drastically and instantaneously changed upon minor changes ($\pm 2-8\%$) in the cell volume [71]. Extracellular hypoosmolarity induced oocyte swelling results in an increase in the KCNQ1 current level, whereas hyperosmolarity leads to oocyte shrinkage, providing a decrease in current activity. In cardiac myocytes, the I_{Ks} channel activation was shown to be stretch responsive, whether stretch is elicited by positive pressure or hypotonic cell swelling [72,73]. KCNQ1 N-terminal domain seems involved in cellular responses to mechanical stretch, through an interaction with the actin cytoskeleton [71].

After the first link was made between atrial fibrillation (AF) and a mutation in KCNQ1, S140G (cf §2-3), another missense mutation in KCNQ1, R14C, was recently identified in one familial atrial fibrillation with high prevalence of hypertension [74]. In contrary to KCNQ1-S140G mutant channel, which is highly altered when re-expressed, functional studies indicate that R14C mutation, located within the cytoplasmic N-terminus of the KCNQ1 protein, does not alter I_{Ks} current properties. A gain of the channel function only occurs in a condition promoting cell swelling. The effect of cell swelling (current increase, leftward shift in the voltage dependence of activation, acceleration of activation and slowing of deactivation) were accentuated in R14C I_{Ks} channel. In two computer models of human atrial action potential, the R14C KCNQ1 mutation does not modify by itself the atrial action potential characteristics. However, cell swelling caused a greater reduction in the action potential duration for R14C I_{Ks} channels. Given that stretch enhances I_{Ks} through the KCNQ1 N-terminal domain which acts as a sensor of cellular stretch, one may hypothesize that arginine at position 14 is a key residue in the KCNQ1 stretch sensitivity.

This results suggest that this stretch-sensitive KCNQ1 mutation is insufficient to cause AF, but the combination of this mutation together with a second factor, such as atrial dilatation, could promotes AF development. Therefore, it is an interesting and significant model of an interaction between genetic and environmental factors in the pathogenesis of AF.

2.4.3. PHOSPHATIDYLINOSITOL-4,5-BISPHOSPHATE (PIP₂)

The phospholipid phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) is a major signalling molecule and a regulator of several ion channels and transporters [75,76]. In excised patch-clamp recordings, the KCNE1/KCNQ1 current decreased spontaneously with time. This progressive decrease of I_{Ks} is called rundown. This rundown is markedly slowed by cytosolic application of PIP₂ and fully prevented by application of both PIP₂ and MgATP [77]. Therefore, PIP₂ is a key membrane regulator of the KCNE1/KCNQ1 channel activity, and kinetic models suggested that it stabilizes the channel open state leading to the observed increased current

amplitudes, slowed deactivation kinetics and a shift of the activation curve towards negative potentials.

Direct interaction of PIP₂ with the C-terminus of several inwardly rectifying K channels, such as ROMK, GIRK and IRK, has already been shown [78]. In an alanine scan of Kir6.2, neutralization of positively charged amino acids localized in the near C- and N-termini, decreased the PIP₂ sensitivity of the channel, suggesting that these amino acids belong to a potential PIP₂-binding domain and may stabilize the channel open state through electrostatic interactions with membrane PIP₂ [79,80]. The Romano-Ward KCNQ1 mutations, R539W and R555C, and the Jervell-lange-Nielsen mutation, R243H, are mutations neutralizing arginine residues and leading to an alteration of channel voltage-dependent gating (§2-3). The shift of the activation curve toward positive potentials results in a smaller I_{Ks} [35,41]. More recently, we brought evidences that an alteration in PIP₂ binding in these mutants fully recapitulates the channel dysfunction [81]. The mutations neutralize a positive charge, consistent with an electrostatic channel-PIP₂ interaction. Therefore, the importance of the PIP₂-KCNQ1 interaction is emphasized by the fact that reduced PIP₂ affinity of three KCNQ1 mutants may underlie the syndrome observed in Long QT patients.

2.5.PARTNERS ASSOCIATION

KCNQ1 is expressed at the cell surface in a channel complex that comprises several proteins able to regulate I_{Ks} current. Proteins from KCNE family and particularly KCNE1, are essential to the K⁺ current formation. Other proteins such as calmodulin, A-kinase-anchoring-proteins (AKAPs) or fhl2 can also bind the complex and play an important role in the current regulation. KCNQ1 mutations localized in the binding site of one of these proteins or in the site regulated by these proteins can lead to cardiac pathologies as LQTS. In the same way, mutation in one of the KCNQ1 partners can be deleterious as well.

2.5.1. KCNE1

I_{Ks} current in cardiomyocytes results in the association of KCNQ1 channel with its main regulatory protein KCNE1 (or MinK) [1,2]. This associated protein increases the macroscopic K⁺ current, slows the activation kinetics and modifies its voltage dependence. KCNQ1 conductance is also modified by KCNE1 (cf §2-2) and the current inactivation is eliminated or greatly slowed by KCNE1 co-expression [50].

Using chimeras from different channels, Melman et al. could identify the KCNQ1 domains able to co-immunoprecipitate KCNE1 (and KCNE3) [82]. These domains are localized in the pore loop, the S6 segment and the C-terminus domain. All those regions as well as the S5 segment and the S4-S5 linker must be intact for KCNE1 full regulation[83]. More precisely, using a cysteine or tryptophan scanning approach, the amino acids 338 to 340 of KCNQ1 S6 domain were identified as the interacting site for specific gating regulation by KCNE1 and KCNE3 [82,84]. A mutation in one of these sites could impair KCNE1 binding or regulation.

Very few of the numerous pathological KCNQ1 mutations located near the pore have been functionally studied. In none of these studies, the interaction between KCNQ1 and KCNE1 was checked, mainly because of the difficulty to co-immunoprecipitate both partners.

Interestingly, some of the mutations localized in these domains do not greatly modify KCNQ1 channel properties while, when expressed with KCNE1, an important loss-of-function phenotype can be observed. This is the case for KCNQ1 mutations localized in the S4-S5 domain as R243C, R243H and W248R or in the C-terminal domain as R533W and R539W. When expressed alone in *Xenopus* oocytes, R243C and W248R mutant subunits can form a

functional channel with modified properties (activation gating and voltage dependence) whereas no current was observed when expressed with KCNE1 [83]. To summarize, it seems that the impact of those mutations is greater in the presence of KCNE1.

As reported above (§2-4), R243H, R555C and R539W mutants affinity for PIP₂ is reduced [81]. It is then surprising that the phenotype observed for KCNQ1 mutants expressed alone is not significantly modified compared to WT KCNQ1. However, the evaluation of the channel affinity for PIP₂ was performed on cells transfected with a KCNE1-KCNQ1 fusion protein and the affinity of KCNQ1 expressed alone was not assessed. The fact that the mutations lead to a modified phenotype only in the presence of KCNE1 raises the question of KCNE1 implication in KCNQ1-PIP₂ interaction.

For another kind of mutations, KCNQ1 current is modified by the mutation and co-expression of KCNE1 does not greatly modify the current. For example, the deletion mutation delta-F339 in the S6 segment is located in the interacting site supposed to regulate activation gating. When expressed alone in *Xenopus* oocytes, the mutated KCNQ1 current is reduced compared with WT KCNQ1 current and it is not modified by co-expression of KCNE1. This suggests an inability of KCNE1 to regulate the mutated channel to form an I_{Ks} current [85]. In the same way, KCNQ1-A300T mutation is a non dominant-negative mutation, located in the pore region, involved in the Romano-Ward syndrome [39]. The current carried by this mutant expressed alone has not been explored. But, when expressed with KCNE1 in *Xenopus* oocytes, this mutant, present at the cell surface, leads to a phenotype resembling KCNQ1 alone (small current, fast activation, shift of the activation curve to hyperpolarized potentials). This phenotype was observed whatever the level of KCNE1 cRNA injected, indicating that this subunit is unable to regulate the mutated channel [39,36].

Contrarily to the assembly domain (§2-1) and the channel PIP₂-interaction (§2-4) the molecular mechanisms are still lacking to describe the effect of these mutations on the channel complex. We can just suppose from the experiments described above that various KCNQ1 sites contribute to KCNE1 modulation.

2.5.2. OTHER MEMBERS OF THE KCNE FAMILY

It has been shown in 2000 that KCNE2 (or MiRP1) can interact with KCNQ1 channel, decrease KCNQ1-induced current and modify its voltage dependence [47]. KCNE2 is poorly expressed in the heart [86,87] and its role on I_{Ks} current is still controversial. For some authors, expressing KCNE2 in CHO cells stably expressing KCNQ1 and KCNE1 does not significantly modify I_{Ks} current [87]. For others, however, KCNE2 can associate with the complex and act as a dynamic negative modulator by decreasing I_{Ks} current and shifting the activation curve to more depolarized potentials, as shown in COS-7 cells [88,89]. The fact that KCNE2 co-immunoprecipitates and colocalizes with the KCNQ1-KCNE1 complex in rat cardiac myocytes is in favor of a tripartite complex hypothesis [89]. Furthermore, KCNE2 mutations can modify KCNQ1 current and inversely, KCNE2 can regulate kinetics of the R243H KCNQ1 mutant, confirming an active interaction between these two proteins [47]. Unfortunately, the authors did not study KCNE2 effects on R243H KCNQ1 co-expressed with KCNE1.

KCNE3 can also regulate KCNQ1, particularly in secretory epithelial cells [48]. The current formed by those two subunits is of great density, nearly instantaneous and voltage-independent [86,48]. Co-expression of KCNE3, in CHO cells stably expressing KCNQ1-KCNE1 complex, strongly accelerates I_{Ks} kinetics and modifies its voltage dependence [87]. KCNE1 and KCNE3 interact with the same amino acids on KCNQ1 (aa 338-340) to regulate channel gating [82,84]. As cardiac I_{Ks} resemble more to KCNQ1-KCNE1 than to KCNQ1-

KCNE3 current, it has been suggested that I_{Ks} regulation by KCNE3 in heart is irrelevant. Indeed, KCNE3 is two-fold less expressed than KCNE1 in heart [87,86]. It can be suspected that an increase in its expression level can lead to cardiac arrhythmias by modifying I_{Ks} properties [90].

More recently, KCNE4 was found to inhibit KCNQ1 channel when expressed in *Xenopus* oocytes [91]. Lundquist et al. also observed the inhibition of the I_{Ks} current in a stable I_{Ks} -expressing CHO cell line by the transient expression of KCNE4 [87]. Nevertheless, its role on I_{Ks} current is discussed [92] and likely depends on the cell expression model. Bendahhou et al. found no significant difference on I_{Ks} current when KCNQ1, KCNE1 and KCNE4 were transiently co-expressed in COS-7 cells, suggesting that KCNQ1 is more likely to form a functional complex with KCNE1 over KCNE4 [86]. S140G-KCNQ1 mutation causes atrial fibrillation (cf §2-3). Interestingly, in COS-7 cells, S140G-KCNQ1 leads to a large and instantaneous K^+ current when expressed with KCNE1 and to an I_{Ks} -like current when expressed with KCNE4 [86]. These observations suggest a potential effect of KCNE4 on KCNQ1-related current. Highlighting the role of KCNE4 on I_{Ks} current is of great interest since this protein is as much expressed as KCNE1 in the human heart [87,86] and may represent an aggravating factor when KCNE1 expression is decreased. Further investigations in cardiac myocytes are needed to confirm the KCNE4 interaction with KCNQ1 channel and clarify its physiological effects.

2.5.3. ISOFORM 2

An alternative splicing isoform of KCNQ1 (isoform 2), shorter than the channel isoform (isoform 1), was highlighted in the human heart by Demolombe and coworkers in 1998 [8]. This isoform was shown to have a dominant-negative effect on the isoform 1, decreasing KCNQ1-induced current and I_{Ks} density when both isoforms were co-expressed.

In the heart, isoform 2 represents about 25 to 31 % of the total expressed KCNQ1. This isoform is more expressed in mid-myocardium than endo- or epi-myocardium and could then contribute to the regional action potential heterogeneity observed across the ventricular wall [93]. The KCNQ1-deltaF339 mutation has been associated to LQTS. The slight dominant-negative effect of this mutation on KCNQ1 isoform 1 can not explain by itself the pathology. The dominant-negative effect of the mutation associated to the isoform 2 expression have permitted to reconstitute the pathologic phenotype observed [85].

2.5.4. CALMODULIN (CAM)

Initially, two calmodulin interaction sites were identified in KCNQ1 and located in the first two α -helices of the cytoplasmic C-terminus. The first helix (helix A) comprises an IQ-like CaM-binding motif and the second one (helix B), two overlapping consensus 1-5-10 CaM-binding motifs [14]. Helix D may also be of importance for CaM interaction with the channel [16]. Calcium and CaM roles on I_{Ks} current are still under discussion. Electrophysiological studies on *Xenopus* oocytes showed that inhibiting CaM with its antagonist W7 significantly decreased I_{Ks} . Increasing intracellular calcium concentration with ionomycin led to an increase of I_{Ks} , shifted KCNQ1 current activation curve to more hyperpolarized potentials and modified its inactivation [16,15]. However, when the experiments were performed in CHO cells transiently expressing CaM and KCNQ1, no modifications of KCNQ1 current were seen. Furthermore, increasing calcium concentration did not lead to any increase of I_{Ks} current in the same cells co-expressing KCNE1 [94].

Some identified LQTS-associated KCNQ1 mutations are located near the IQ motif. Four of these mutants (R366W, A371T, S373P and W392R) fail to associate with CaM. When transiently expressed in CHO cells with KCNE1, these mutants generated a current with a decreased density and a right shift of the activation curve compared to the WT current. Moreover, the mutated channels were less expressed (at the membrane and in total) than the WT channel, suggesting a potential role of CaM in the channel expression, as it has been explained in §2-1 [16,15].

2.5.5. AKAP

KCNQ1 is phosphorylated by PKA during β -adrenergic stimulation (§2-4). This leads to I_{Ks} increase through a stabilization of the open state. KCNQ1 phosphorylation requires the presence of a PKA anchoring protein (yotiao or other AKAPs) which keeps PKA and the phosphatase PP1 in the vicinity of their target [63,95]. Yotiao not only anchors PKA and PP1 close to the channel but also permits the channel activation once it is phosphorylated [96]. Yotiao interacts with the channel by a leucine-zipper motif (aa 588 to 616) in the KCNQ1 C-terminus. The targeting of PKA and PP1 to the channel by yotiao has been shown to be disrupted by the KCNQ1 G589D mutation [97]. This mutation alone does not induce LQTS. However, when coupled with β -adrenergic stimulation, KCNQ1 G589D mutant is sufficient to prolong the QT interval and create cellular substrate for arrhythmia. Sympathetic stimulation increases I_{Ca} , which is normally compensated by increased I_{Ks} . In the case of this mutation, the sympathetic-stimulated increase in I_{Ca} is uncompensated by increased I_{Ks} , leading to QT prolongation.

These conclusions support the clinical observation that patients with the KCNQ1-G589D mutation are particularly vulnerable to exercise-induced arrhythmias [98,99]. Indeed, sudden cardiac death (SCD) is associated with sympathetic stimulation in 81% of individuals with the KCNQ1-G589D mutation, in contrast to other K^+ channel mutations in which only ~10% of SCD are triggered by sympathetic nervous system activation [100]. Thus, the KCNQ1-G589D mutation causes an unusual LQTS in which the primary defect occurs in autonomic regulation rather than channel gating *per se*.

2.5.6. NEDD4/NEDD4-LIKE UBIQUITIN PROTEIN LIGASES

Very recently, it has been shown that KCNQ1 channel interacts with the Nedd4/Nedd4-like ubiquitin-protein ligases Nedd4-2, Nedd4-1 and WWP2 [101]. Ubiquitin-protein ligases are involved in the protein proteasome-related degradation. Those ubiquitin-protein ligases are associated to the channel through KCNQ1 PY motif located in the C-terminus (aa 659 to 665). A mutation in this domain, as Y662A, prevented the association and lead, when expressed with KCNE1, to a higher current compared with WT I_{Ks} current [101]. Until now, no KCNQ1 mutation located in this motif has been found to be associated to any cardiac pathology.

2.5.7. FHL2

In 2002, Kupersmidt et al. identified fhl2 (four-and-a-half LIM domain-containing protein) as a protein associated to the KCNE1 C-terminus, using a yeast-two-hybrid screen. In cell lines that do not express this protein endogenously, no I_{Ks} current could be observed despite KCNQ1 and KCNE1 co-transfection while it was observed when fhl2 was added [102]. It is suggested that fhl2 links the complex to the cytoskeleton (fhl2 co-localizes with α -actinin in

human cardiac myocytes), stabilizing it at the cell surface and/or facilitating current regulation by intracellular pathways. These data reveal the importance of this protein in I_{Ks} formation and could explain some of the LQTS-associated mutation localized in KCNE1 C-terminus.

2.6.MUTATED PARTNERS

2.6.1. KCNE1

It is now well established that mutations of KCNE1 gene can lead to the type 5 LQTS. Up to now, more than 20 KCNE1 mutations have been found [11,103,104,22,105,106]. They are located in different sites of the protein, showing that the whole protein is essential for KCNQ1 regulation.

According to several studies, the KCNE1 cytoplasmic C-terminus plays a great role in I_{Ks} regulation and particularly the portion immediately following the transmembrane domain [107,108,109]. The C-terminal domain interacts with the internal vestibule of KCNQ1 channel and slows the activation kinetics. Thus, mutations in this domain could favor the channel closed state [108,110]. It might be the case for mutations as S74L, D76N, Y81C and R98W which, when expressed with KCNQ1, lead to smaller currents than with WT KCNE1 by shifting the activation curve to more positive voltages and accelerating the current deactivation [28,23,29,106]. It was less pronounced, though, for the V109I mutant for which the current was less decreased and its biophysical properties maintained [111].

Two of the KCNE1 mutations located in the transmembrane (TM) domain, V47F and G52H, were expressed *in vitro* [29,105]. When co-expressed with KCNQ1 in *Xenopus* oocytes, these two mutated subunits lead to a current resembling KCNQ1 current in the absence of KCNE1. Nevertheless and contrarily to L51H-KCNE1 (§2-1), those two mutants were expressed at the cell membrane. These data highlight the role of KCNE1 transmembrane domain in the regulation of channel gating. Indeed, three amino acids in the TM domain can confer the I_{Ks} -like activation kinetics. KCNE1 and KCNE3 are structurally similar but their effects on KCNQ1 current are very different (§2-5). Based on those differences, the use of KCNE1-KCNE3 chimeras permitted to establish that amino acids 57 to 59 in KCNE1 and 71 to 73 in KCNE3, that interact with amino acids 338-340 of KCNQ1, confer the specificity of current activation kinetics [112,84,113].

None of the LQTS mutations localized in the KCNE1 extracellular N-terminus were studied *in vitro*. Nevertheless, two studies showed that deletion of amino acids 4 to 10 suppresses the K^+ current and that amino acids 11 to 39 contribute to the voltage-dependency. Particularly, amino acid 43 (near the TM domain) may play a role in I_{Ks} activation kinetics and inactivation loss [107,108].

2.6.2. KCNE-RELATED FAMILY

Some KCNE2 mutations are responsible for type 6 LQTS and are, for most of them, associated with a modification of the rapid delayed rectifier current, I_{Kr} generated by HERG [114,104]. However, some of them as KCNE2-I57T or Q9E decreased KCNQ1 current in COS-7 cells [47]. Conversely, another KCNE2 mutation (R27C) is associated to atrial fibrillation. This mutant induced an increase of the KCNQ1-dependent current when expressed in COS-7 cells, but did not alter HERG-dependent current [115].

Although no KCNE4 mutation was found to be responsible for cardiac arrhythmias, one polymorphism (145E/D) is linked to atrial fibrillation. When expressed with KCNQ1 in CHO cells, the KCNE4-145D generated a higher KCNQ1 current than KCNE4-145E [116,117].

2.6.3. AKAP

Yotiao can be phosphorylated by PKA and this phosphorylation seems to be essential to I_{Ks} regulation. Ser-43 of Yotiao N-terminal tail was identified as a residue PKA-phosphorylated in response to β -adrenergic receptor stimulation [96]. When Ser-43 was replaced by an alanine, the functional response of I_{Ks} to PKA stimulation was diminished while the KCNQ1 phosphorylation and its binding to Yotiao were maintained. These results suggest the critical role of Yotiao for the PKA phosphorylation in the functional regulation and also for the post-phosphorylation allosteric modulation of the I_{Ks} channel by Yotiao. This kind of mutation in an AKAP protein, such as Yotiao, could lead to cardiac arrhythmias, in particular at the time of sympathetic nervous system stimulation.

2.6.4. NEDD4/NEDD4-LIKE UBIQUITIN PROTEIN LIGASES

Nedd4-2-C801S is a catalytically inactive form of the Nedd4-2 protein, able to antagonize Nedd4-2 WT form. In HEK293 cells or COS-7 cells transfected with KCNQ1, KCNE1 and Nedd4-2, an increased I_{Ks} current was observed when Nedd4-2 mutant was co-expressed. This effect was confirmed in guinea pig cardiac myocytes transfected in vivo with the mutant [101]. The effects of this mutation on cardiac activity were not evaluated but, as this mutation leads to an I_{Ks} increase, cardiac arrhythmias like atrial fibrillation or short QT syndrome could arise from Nedd4-2 loss-of-function mutations [118].

3. CONCLUSION

It appears that the spectrum of KCNQ1 mutations is wide with respect to location, type, and functional effect. However, because of the fatal threat of the channelopathies associated to KCNQ1, a better knowledge of the genetically determined risk factors are urgently needed to improve risk stratification and higher-risk patients management. Altogether, KCNQ1 mutations leading to a loss of K^+ channel function may be divided in categories regarding their impaired function: leading to haploinsufficiency (resulting $I_{Ks} \geq 50\%$) or negative dominance ($< 50\%$). A recent large-scale study including 600 type 1 LQTS patients from 3 continents attempted to characterize a genotype-phenotype relationship [119]. This study unveiled the increased risk for cardiac arrest in carriers of dominant-negative-type mutation. Furthermore, it appears that mutations located in the transmembrane regions are also more threatening than those localized in the C-terminus.

On the other hand, there are too few gain-of-function KCNQ1 mutations described today to draw such stratification for atrial fibrillation and short QT syndrome. One could suspect that mutations of KCNQ1 [42] or KCNE2 [115] leading to K^+ currents activated at negative potentials are associated to atrial fibrillation rather than to short QT syndrome. Conversely, the gain-of-function KCNQ1 mutant that does not generate any current at resting potentials is associated with SQTs [44]. However, other cardiac K^+ channels are also involved in AF and SQTs. For example, KCNJ2 is a K^+ channel responsible for the resting potential in atrial and ventricular cardiomyocytes. A gain-of-function mutation leading to a larger K^+ current at negative potential has been characterized in SQTs, ruling out this hypothesis. Furthermore, the gain-of-function mutation N588K of a third cardiac K^+ channel, KCNH2, responsible for the delayed rectifier K^+ current rapid component (I_{Kr}) was described in AF and SQTs patients [120,121].

In fact, Borggreffe and colleagues [120], observed that the incidence of atrial fibrillation is high in patients with a short QT syndrome and they suggested that the first symptom of the

short QT syndrome is atrial fibrillation. Gain-of-function of K⁺ channels involved in repolarization may be responsible for extremely short atrial and ventricular effective refractory periods observed in all patients, that potentially lead to AF and/or malignant ventricular tachyarrhythmia and sudden death. Search for KCNQ1 mutations in familial forms of AF and SQTs being relatively new, more information is soon expected to understand which events may favor atrial or ventricular phenotype.

Finally, similar phenotypes are observed in patients carriers of KCNQ1 mutations as well as mutations of KCNQ1 auxiliary subunits. Therefore, further knowledge on the channel-complex composition and behavior will potentially help to improve patient management.

In conclusion, recent electrophysiological studies of KCNQ1 mutations have been incredibly fruitful to better understand the pathophysiology of the different channelopathies associated to this gene as well as the physiology of cardiac repolarization. Even if, in most cases, SCD occurs in patients with structural heart abnormalities, it can be reasonably expected that the improvement in KCNQ1-related patient management will also benefit to patients suffering of repolarization abnormalities of various origins, that constitute the vast majority of the 300.000-350.000 cases of sudden death in northern America [122].

Acknowledgements. This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), from the Agence Nationale de Recherche to IB (ANR COD/A05045GS) and GL (ANR-05-JCJC-0160-01) and from Vaincre La Mucoviscidose to JM. IB, JM and GL are recipients of a tenure position supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). FC is supported by the Génavie Foundation. SD is the recipient of a grant from the French Ministère de la Recherche. DP is the recipient of a grant from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm).

4. REFERENCES

1. Barhanin, J., Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Lazdunski, M., and Romey, G. 1996, *Nature*, 384, 78
2. Sanguinetti, M. C., Curran, M. E., Zou, A., Shen, J., Spector, P. S., Atkinson, D. L., and Keating, M. T. 1996, *Nature*, 384, 80
3. Loussouarn, G., Baro, I., and Escande, D. 2006, *Methods Mol. Biol.*, 337, 167
4. Schmitt, N., Schwarz, M., Peretz, A., Abitbol, I., Attali, B., and Pongs, O. 2000, *EMBO J.*, 19, 332
5. Yamashita, F., Horie, M., Kubota, T., Yoshida, H., Yumoto, Y., Kobori, A., Ninomiya, T., Kono, Y., Haruna, T., Tsuji, K., Washizuka, T., Takano, M., Otani, H., Sasayama, S., and Aizawa, Y. 2001, *J. Mol. Cell Cardiol.*, 33, 197
6. Howard, R. J., Clark, K. A., Holton, J. M., and Minor, D. L., Jr. 2007, *Neuron*, 53, 663
7. Aizawa, Y., Ueda, K., Wu, L. M., Inagaki, N., Hayashi, T., Takahashi, M., Ohta, M., Kawano, S., Hirano, Y., Yasunami, M., Aizawa, Y., Kimura, A., and Hiraoka, M. 2004, *FEBS Lett.*, 574, 145
8. Demolombe, S., Baro, I., Pereon, Y., Bliet, J., Mohammad-Panah, R., Pollard, H., Morid, S., Mannens, M., Wilde, A., Barhanin, J., Charpentier, F., and Escande, D. 1998, *J. Biol. Chem.*, 273, 6837
9. Jongbloed, R., Marcelis, C., Velter, C., Doevendans, P., Geraedts, J., and Smeets, H. 2002, *Hum. Mutat.*, 20, 382
10. Schwartz, P. J., Priori, S. G., Bloise, R., Napolitano, C., Ronchetti, E., Piccinini, A., Goj, C., Breithardt, G., Schulze-Bahr, E., Wedekind, H., and Nastoli, J. 2001, *Lancet*, 358, 1342
11. Splawski, I., Shen, J., Timothy, K. W., Lehmann, M. H., Priori, S., Robinson, J. L., Moss, A. J., Schwartz, P. J., Towbin, J. A., Vincent, G. M., and Keating, M. T. 2000, *Circulation*, 102, 1178
12. Dahimene, S., Alcolea, S., Naud, P., Jourdon, P., Escande, D., Bresseur, R., Thomas, A., Baro, I., and Merot, J. 2006, *Circ. Res.*, 99, 1076
13. Jespersen, T., Rasmussen, H. B., Grunnet, M., Jensen, H. S., Angelo, K., Dupuis, D. S., Vogel, L. K., Jorgensen, N. K., Klaerke, D. A., and Olesen, S. P. 2004, *J. Cell Sci.*, 117, 4517
14. Yus-Najera, E., Santana-Castro, I., and Villarroel, A. 2002, *J. Biol. Chem.*, 277, 28545
15. Ghosh, S., Nunziato, D. A., and Pitt, G. S. 2006, *Circ. Res.*, 98, 1048
16. Shamgar, L., Ma, L., Schmitt, N., Haitin, Y., Peretz, A., Wiener, R., Hirsch, J., Pongs, O., and Attali, B. 2006, *Circ. Res.*, 98, 1055
17. Krumerman, A., Gao, X., Bian, J. S., Melman, Y. F., Kagan, A., and McDonald, T. V. 2004, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 286, C1453
18. Gong, Q., Anderson, C. L., January, C. T., and Zhou, Z. 2004, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 287, H652
19. Rajamani, S., Anderson, C. L., Anson, B. D., and January, C. T. 2002, *Circulation*, 105, 2830
20. Gong, Q., Jones, M. A., and Zhou, Z. 2006, *J. Biol. Chem.*, 281, 4069
21. Wilson, A. J., Quinn, K. V., Graves, F. M., Bitner-Glindzic, M., and Tinker, A. 2005, *Cardiovasc. Res.*, 67, 476
22. Yang, Y. and Sigworth, F. J. 1998, *J. Gen. Physiol.*, 112, 665
23. Sesti, F. and Goldstein, S. A. 1998, *J. Gen. Physiol.*, 112, 651
24. Pusch, M., Bertorello, L., and Conti, F. 2000, *Biophys. J.*, 78, 211
25. Tai, K. K. and Goldstein, S. A. 1998, *Nature*, 391, 605
26. Tapper, A. R. and George, A. L., Jr. 2000, *J. Gen. Physiol.*, 116, 379
27. Chen, H., Sesti, F., and Goldstein, S. A. 2003, *Biophys. J.*, 84, 3679
28. Splawski, I., Tristani-Firouzi, M., Lehmann, M. H., Sanguinetti, M. C., and Keating, M. T. 1997, *Nat. Genet.*, 17, 338
29. Bianchi, L., Shen, Z., Dennis, A. T., Priori, S. G., Napolitano, C., Ronchetti, E., Bryskin, R., Schwartz, P. J., and Brown, A. M. 1999, *Hum. Mol. Genet.*, 8, 1499
30. LeMasurier, M., Heginbotham, L., and Miller, C. 2001, *J. Gen. Physiol.*, 118, 303
31. Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T., and MacKinnon, R. 1994, *Biophys. J.*, 66, 1061
32. Doyle, D. A., Morais, C. J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., and MacKinnon, R. 1998, *Science*, 280, 69
33. Morais-Cabral, J. H., Zhou, Y., and MacKinnon, R. 2001, *Nature*, 414, 37
34. Wollnik, B., Schroeder, B. C., Kubisch, C., Esperer, H. D., Wieacker, P., and Jentsch, T. J. 1997, *Hum. Mol. Genet.*, 6, 1943
35. Chouabe, C., Neyroud, N., Guicheney, P., Lazdunski, M., Romey, G., and Barhanin, J. 1997, *EMBO J.*, 16, 5472
36. Bianchi, L., Priori, S. G., Napolitano, C., Surewicz, K. A., Dennis, A. T., Memmi, M., Schwartz, P. J., and Brown, A. M. 2000, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 279, H3003
37. Shalaby, F. Y., Levesque, P. C., Yang, W. P., Little, W. A., Conder, M. L., Jenkins-West, T., and Blannar, M. A. 1997, *Circulation*, 96, 1733
38. Neyroud, N., Denjoy, I., Donger, C., Gary, F., Villain, E., Leenhardt, A., Benali, K., Schwartz, K., Coumel, P., and Guicheney, P. 1998, *Eur. J. Hum. Genet.*, 6, 129
39. Priori, S. G., Schwartz, P. J., Napolitano, C., Bianchi, L., Dennis, A., De Fusco, M., Brown, A. M., and Casari, G. 1998, *Circulation*, 97, 2420
40. Priori, S. G., Napolitano, C., and Schwartz, P. J. 1999, *Circulation*, 99, 529
41. Chouabe, C., Neyroud, N., Richard, P., Denjoy, I., Hainque, B., Romey, G., Drici, M. D., Guicheney, P., and Barhanin, J. 2000, *Cardiovasc. Res.*, 45, 971
42. Chen, Y. H., Xu, S. J., Bendahhou, S., Wang, X. L., Wang, Y., Xu, W. Y., Jin, H. W., Sun, H., Su, X. Y., Zhuang, Q. N., Yang, Y. Q., Li, Y. B., Liu, Y., Xu, H. J., Li, X. F., Ma, N., Mou, C. P., Chen, Z., Barhanin, J., and Huang, W. 2003, *Science*, 299, 251
43. Hong, K., Piper, D. R., Diaz-Valdecantos, A., Brugada, J., Oliva, A., Burashnikov, E., Santos-de-Soto, J., Gueso-Montero, J., Diaz-Enfante, E., Brugada, P., Sachse, F., Sanguinetti, M. C., and Brugada, R. 2005, *Cardiovasc. Res.*, 68, 433
44. Bellocq, C., van Ginneken, A. C., Bezzina, C. R., Alders, M., Escande, D., Mannens, M. M., Baro, I., and Wilde, A. A. 2004, *Circulation*, 109, 2394
45. Kannel, W. B., Wolf, P. A., Benjamin, E. J., and Levy, D. 1998, *Am. J. Cardiol.*, 82, 2N
46. Wijffels, M. C., Kirchhof, C. J., Dorland, R., and Allessie, M. A. 1995, *Circulation*, 92, 1954
47. Tinel, N., Diocot, S., Borsotto, M., Lazdunski, M., and Barhanin, J. 2000, *EMBO J.*, 19, 6326
48. Schroeder, B. C., Waldegger, S., Fehr, S., Bleich, M., Warth, R., Greger, R., and Jentsch, T. J. 2000, *Nature*, 403, 196
49. Seeböhm, G., Scherer, C. R., Busch, A. E., and Lerche, C. 2001, *J. Biol. Chem.*, 276, 13600

50. Tristani-Firouzi, M. and Sanguinetti, M. C. 1998,*J.Physiol*,510 (Pt 1),37
51. Armstrong, C. M. 1966,*J.Gen.Physiol*,50,491
52. Armstrong, C. M. 1971,*J.Gen.Physiol*,58,413
53. Long, S. B., Campbell, E. B., and MacKinnon, R. 2005,*Science*,309,897
54. Liu, Y., Holmgren, M., Jurman, M. E., and Yellen, G. 1997,*Neuron*,19,175
55. del Camino, D. and Yellen, G. 2001,*Neuron*,32,649
56. Rothberg, B. S., Shin, K. S., Phale, P. S., and Yellen, G. 2002,*J.Gen.Physiol*,119,83
57. Swenson, R. P., Jr. and Armstrong, C. M. 1981,*Nature*,291,427
58. Zheng, J. and Sigworth, F. J. 1998,*J.Gen.Physiol*,112,457
59. Soler-Llavina, G. J., Holmgren, M., and Swartz, K. J. 2003,*Neuron*,38,61
60. Phillips, L. R., Enkvetchakul, D., and Nichols, C. G. 2003,*Neuron*,37,953
61. Flynn, G. E. and Zagotta, W. N. 2001,*Neuron*,30,689
62. Terrenoire, C., Clancy, C. E., Cormier, J. W., Sampson, K. J., and Kass, R. S. 2005,*Circ.Res.*,96,e25
63. Marx, S. O., Kurokawa, J., Reiken, S., Motoike, H., D'Armiento, J., Marks, A. R., and Kass, R. S. 2002,*Science*,295,496
64. Yang, T., Kanki, H., and Roden, D. M. 2003,*Circulation*,108,132
65. Kurokawa, J., Chen, L., and Kass, R. S. 2003,*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*,100,2122
66. Busch, A. E., Kavanaugh, M. P., Varnum, M. D., Adelman, J. P., and North, R. A. 1992,*J.Physiol*,450,491
67. Suzuki, A., Bosnjak, Z. J., and Kwok, W. M. 2003,*Anesth.Analg.*,96,1308
68. Kathofer, S., Rockl, K., Zhang, W., Thomas, D., Katus, H., Kiehn, J., Kreye, V., Schoels, W., and Karle, C. 2003,*Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.*,368,119
69. Varnum, M. D., Busch, A. E., Bond, C. T., Maylie, J., and Adelman, J. P. 1993,*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*,90,11528
70. Lock, H. and Valverde, M. A. 2000,*J.Biol.Chem.*,275,34849
71. Grunnet, M., Jespersen, T., MacAulay, N., Jorgensen, N. K., Schmitt, N., Pongs, O., Olesen, S. P., and Klaerke, D. A. 2003,*J.Physiol*,549,419
72. Sasaki, N., Mitsuiye, T., Wang, Z., and Noma, A. 1994,*Circ.Res.*,75,887
73. Wang, Z., Mitsuiye, T., and Noma, A. 1996,*Circ.Res.*,78,466
74. Otway, R., Vandenberg, J. I., Guo, G., Varghese, A., Castro, M. L., Liu, J., Zhao, J., Bursill, J. A., Wyse, K. R., Crotty, H., Baddeley, O., Walker, B., Kuchar, D., Thorburn, C., and Fatkin, D. 2007,*J.Am.Coll.Cardiol.*,49,578
75. Shyng, S. L. and Nichols, C. G. 1998,*Science*,282,1138
76. Hilgemann, D. W., Feng, S., and Nasuhoglu, C. 2001,*Sci.STKE*,2001,RE19
77. Loussouarn, G., Park, K. H., Bellocq, C., Baro, I., Charpentier, F., and Escande, D. 2003,*EMBO J.*,22,5412
78. Huang, C. L., Feng, S., and Hilgemann, D. W. 1998,*Nature*,391,803
79. Shyng, S. L., Cukras, C. A., Harwood, J., and Nichols, C. G. 2000,*J.Gen.Physiol*,116,599
80. Cukras, C. A., Jeliazkova, I., and Nichols, C. G. 2002,*J.Gen.Physiol*,120,437
81. Park, K. H., Piron, J., Dahimene, S., Merot, J., Baro, I., Escande, D., and Loussouarn, G. 2005,*Circ.Res.*,96,730
82. Melman, Y. F., Um, S. Y., Krumerman, A., Kagan, A., and McDonald, T. V. 2004,*Neuron*,42,927
83. Franqueza, L., Lin, M., Shen, J., Splawski, I., Keating, M. T., and Sanguinetti, M. C. 1999,*J.Biol.Chem.*,274,21063
84. Panaghie, G., Tai, K. K., and Abbott, G. W. 2006,*J.Physiol*,570,455
85. Thomas, D., Wimmer, A. B., Karle, C. A., Licka, M., Alter, M., Khalil, M., Ulmer, H. E., Kathofer, S., Kiehn, J., Katus, H. A., Schoels, W., Koenen, M., and Zehelein, J. 2005,*Cardiovasc.Res.*,67,487
86. Bendahhou, S., Marionneau, C., Haurogne, K., Larroque, M. M., Derand, R., Szuts, V., Escande, D., Demolombe, S., and Barhanin, J. 2005,*Cardiovasc.Res.*,67,529
87. Lundquist, A. L., Manderfield, L. J., Vanoye, C. G., Rogers, C. S., Donahue, B. S., Chang, P. A., Drinkwater, D. C., Murray, K. T., and George, A. L., Jr. 2005,*J.Mol.Cell Cardiol.*,38,277
88. Toyoda, F., Ueyama, H., Ding, W. G., and Matsuura, H. 2006,*Biochem.Biophys.Res.Comm.*,344,814
89. Wu, D. M., Jiang, M., Zhang, M., Liu, X. S., Korolkova, Y. V., and Tseng, G. N. 2006,*Heart Rhythm.*,3,1469
90. Mazhari, R., Nuss, H. B., Armoundas, A. A., Winslow, R. L., and Marban, E. 2002,*J.Clin.Invest*,109,1083
91. Grunnet, M., Jespersen, T., Rasmussen, H. B., Ljungstrom, T., Jorgensen, N. K., Olesen, S. P., and Klaerke, D. A. 2002,*J.Physiol*,542,119
92. Grunnet, M., Olesen, S. P., Klaerke, D. A., and Jespersen, T. 2005,*Biochem.Biophys.Res.Comm.*,328,1146
93. Perea, Y., Demolombe, S., Baro, I., Drouin, E., Charpentier, F., and Escande, D. 2000,*Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol*,278,H1908
94. Gamper, N., Li, Y., and Shapiro, M. S. 2005,*Mol.Biol.Cell*,16,3538
95. Potet, F., Scott, J. D., Mohammad-Panah, R., Escande, D., and Baro, I. 2001,*Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol*,280,H2038
96. Chen, L., Kurokawa, J., and Kass, R. S. 2005,*J.Biol.Chem.*,280,31347
97. Saucerman, J. J., Healy, S. N., Belik, M. E., Puglisi, J. L., and McCulloch, A. D. 2004,*Circ.Res.*,95,1216
98. Piippo, K., Swan, H., Pasternack, M., Chapman, H., Paavonen, K., Viitasalo, M., Toivonen, L., and Kontula, K. 2001,*J.Am.Coll.Cardiol.*,37,562
99. Fodstad, H., Swan, H., Laitinen, P., Piippo, K., Paavonen, K., Viitasalo, M., Toivonen, L., and Kontula, K. 2004,*Ann.Med.*,36 Suppl 1,53
100. Schwartz, P. J., Priori, S. G., Spazzolini, C., Moss, A. J., Vincent, G. M., Napolitano, C., Denjoy, I., Guicheney, P., Breithardt, G., Keating, M. T., Towbin, J. A., Beggs, A. H., Brink, P., Wilde, A. A., Toivonen, L., Zareba, W., Robinson, J. L., Timothy, K. W., Corfield, V., Wattanasirichaigoon, D., Corbett, C., Haverkamp, W., Schulze-Bahr, E., Lehmann, M. H., Schwartz, K., Coumel, P., and Bloise, R. 2001,*Circulation*,103,89
101. Jespersen, T., Membrez, M., Nicolas, C. S., Pitard, B., Staub, O., Olesen, S. P., Baro, I., and Abriel, H. 2007,*Cardiovasc.Res.*,74,64
102. Kupershmidt, S., Yang, I. C., Sutherland, M., Wells, K. S., Yang, T., Yang, P., Balsler, J. R., and Roden, D. M. 2002,*Cardiovasc.Res.*,56,93
103. Lai, L. P., Su, Y. N., Hsieh, F. J., Chiang, F. T., Juang, J. M., Liu, Y. B., Ho, Y. L., Chen, W. J., Yeh, S. J., Wang, C. C., Ko, Y. L., Wu, T. J., Ueng, K. C., Lei, M. H., Tsao, H. M., Chen, S. A., Lin, T. K., Wu, M. H., Lo, H. M., Huang, S. K., and Lin, J. L. 2005,*J.Hum.Genet.*,50,490
104. Napolitano, C., Priori, S. G., Schwartz, P. J., Bloise, R., Ronchetti, E., Nastoli, J., Bottelli, G., Cerrone, M., and Leonardi, S. 2005,*JAMA*,294,2975
105. Ma, L., Lin, C., Teng, S., Chai, Y., Bahring, R., Vardanyan, V., Li, L., Pongs, O., and Hui, R. 2003,*Cardiovasc.Res.*,59,612

106. Ohno, S., Zankov, D. P., Yoshida, H., Tsuji, K., Makiyama, T., Itoh, H., Akao, M., Hancox, J. C., Kita, T., and Horie, M. 2007,*Heart Rhythm*,4,332
107. Takumi, T., Moriyoshi, K., Aramori, I., Ishii, T., Oiki, S., Okada, Y., Ohkubo, H., and Nakanishi, S. 1991,*J.Biol.Chem.*,266,22192
108. Abitbol, I., Peretz, A., Lerche, C., Busch, A. E., and Attali, B. 1999,*EMBO J.*,18,4137
109. Attali, B., Guillemare, E., Lesage, F., Honore, E., Romey, G., Lazdunski, M., and Barhanin, J. 1993,*Nature*,365,850
110. Romey, G., Attali, B., Chouabe, C., Abitbol, I., Guillemare, E., Barhanin, J., and Lazdunski, M. 1997,*J.Biol.Chem.*,272,16713
111. Schulze-Bahr, E., Schwarz, M., Hauenschild, S., Wedekind, H., Funke, H., Haverkamp, W., Breithardt, G., Pongs, O., and Isbrandt, D. 2001,*J.Mol.Med.*,79,504
112. Melman, Y. F., Domenech, A., de la, L. S., and McDonald, T. V. 2001,*J.Biol.Chem.*,276,6439
113. Melman, Y. F., Krumerman, A., and McDonald, T. V. 2002,*J.Biol.Chem.*,277,25187
114. Abbott, G. W., Sesti, F., Splawski, I., Buck, M. E., Lehmann, M. H., Timothy, K. W., Keating, M. T., and Goldstein, S. A. 1999,*Cell*,97,175
115. Yang, Y., Xia, M., Jin, Q., Bendahhou, S., Shi, J., Chen, Y., Liang, B., Lin, J., Liu, Y., Liu, B., Zhou, Q., Zhang, D., Wang, R., Ma, N., Su, X., Niu, K., Pei, Y., Xu, W., Chen, Z., Wan, H., Cui, J., Barhanin, J., and Chen, Y. 2004,*Am.J.Hum.Genet.*,75,899
116. Ma, K. J., Li, N., Teng, S. Y., Zhang, Y. H., Sun, Q., Gu, D. F., and Pu, J. L. 2007,*Chin Med.J.(Engl.)*,120,150
117. Zeng, Z., Tan, C., Teng, S., Chen, J., Su, S., Zhou, X., Wang, F., Zhang, S., Gu, D., Makielski, J. C., and Pu, J. 2006,*Cardiology*,108,97
118. Ehrlich, J. R. 2007,*Cardiovasc.Res.*,74,6
119. Moss, A. J., Shimizu, W., Wilde, A. A., Towbin, J. A., Zareba, W., Robinson, J. L., Qi, M., Vincent, G. M., Ackerman, M. J., Kaufman, E. S., Hofman, N., Seth, R., Kamakura, S., Miyamoto, Y., Goldenberg, I., Andrews, M. L., and McNitt, S. 2007,*Circulation*,115,2481
120. Brugada, R., Hong, K., Dumaine, R., Cordeiro, J., Gaita, F., Borggrefe, M., Menendez, T. M., Brugada, J., Pollevick, G. D., Wolpert, C., Burashnikov, E., Matsuo, K., Wu, Y. S., Guerchicoff, A., Bianchi, F., Giustetto, C., Schimpf, R., Brugada, P., and Antzelevitch, C. 2004,*Circulation*,109,30
121. Hong, K., Bjerregaard, P., Gussak, I., and Brugada, R. 2005,*J.Cardiovasc.Electrophysiol.*,16,394
122. Zipes, D. P., Camm, A. J., Borggrefe, M., Buxton, A. E., Chaitman, B., Fromer, M., Gregoratos, G., Klein, G., Moss, A. J., Myerburg, R. J., Priori, S. G., Quinones, M. A., Roden, D. M., Silka, M. J., Tracy, C., Smith, S. C., Jr., Jacobs, A. K., Adams, C. D., Antman, E. M., Anderson, J. L., Hunt, S. A., Halperin, J. L., Nishimura, R., Ornato, J. P., Page, R. L., Riegel, B., Priori, S. G., Blanc, J. J., Budaj, A., Camm, A. J., Dean, V., Deckers, J. W., Despres, C., Dickstein, K., Lekakis, J., McGregor, K., Metra, M., Morais, J., Osterspey, A., Tamargo, J. L., and Zamorano, J. L. 2006,*J.Am.Coll.Cardiol.*,48,e247

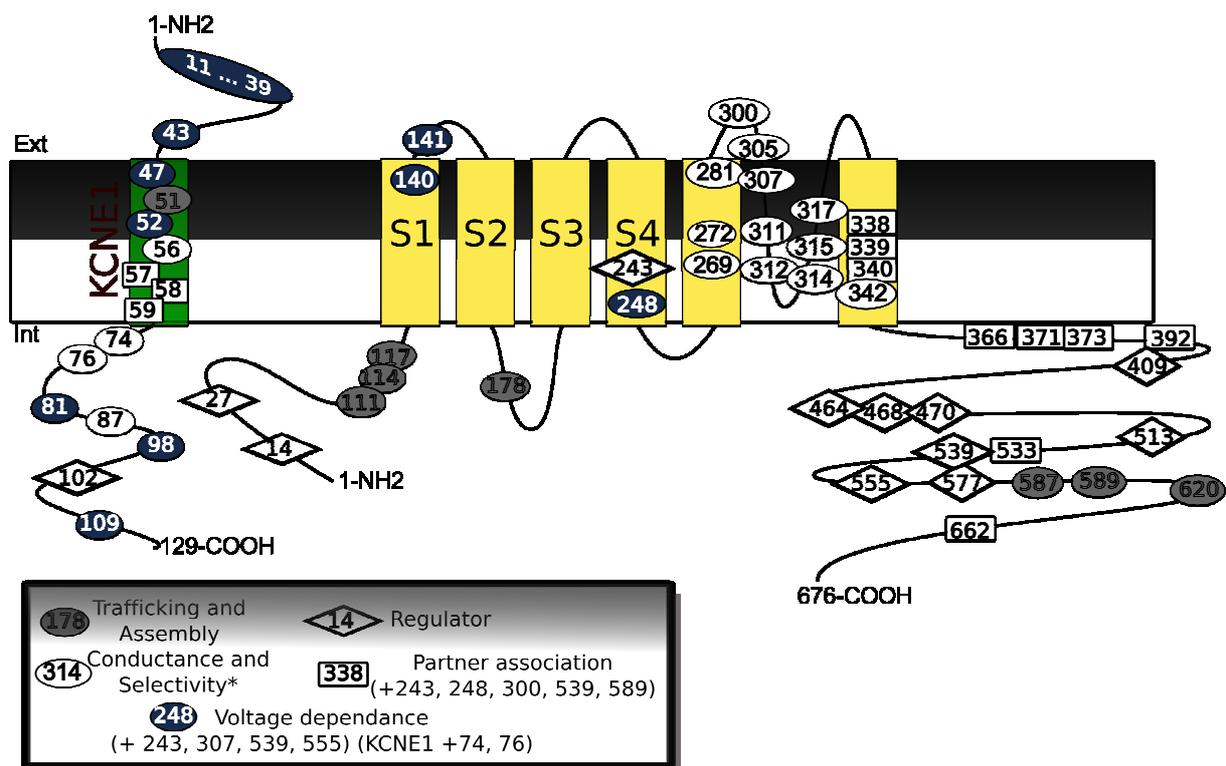


Figure 1: Schematic representation of KCNQ1 potassium channel and KCNE1 subunit showing mutations disturbing channel function.

Numbers indicate amino-acids given in text as representative examples of mutations (most of them have been observed in patients). These mutations are classified by the molecular mechanism impaired (symbols). The mutations appearing in different categories are indicated between parentheses.

*Most mutations classified in conductance and selectivity lead to non functional channel when expressed alone and most probably in heterotetramer, their effect on conductance and selectivity is only hypothetical.

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

Olivier BIGNOLAIS¹, Khai LE QUANG^{1*}, Aziza EL HARCHI¹, Julien PIRON¹,
Anne-Laure LEONI¹, Denis ESCANDE^{1,2}, Sophie DEMOLOMBE^{1,2},
Flavien CHARPENTIER^{1,2}

¹ Inserm, U533, *l'institut du thorax*, Nantes, F-44000 France

² Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F-44000 France

* present address: Cardiology Institute, Montreal, CN

Running title: ionic remodeling and arrhythmias in AV block

Correspondence to Flavien CHARPENTIER, PhD

Inserm U533

Institut du Thorax

UFR de Médecine, 1 rue G. Veil

44035 Nantes cedex, France

E-mail: flavien.charpentier@nantes.inserm.fr

Tel. +33 240 41 28 44, Fax. +33 240 41 29 50

Abstract

Complete atrioventricular block (CAVB) and related ventricular bradycardia are known to induce ventricular hypertrophy and arrhythmias. We investigated ion channel remodeling and its functional consequences in relation to time after CAVB in a mouse model of radiofrequency-mediated His bundle ablation. Using high-throughput real-time RT-PCR, left ventricular expression of 96 genes encoding ion channel subunits, transcription factors and contractile proteins was evaluated before and 12 h, 1, 2 and 5 days after CAVB. ECG, left ventricular pressure recordings and patch-clamp were used for the functional characterization. CAVB was associated to a lengthening of the QT interval. Polymorphic ventricular tachycardia was recorded in 6/9 freely-moving mice during the first 24 h post-ablation. Myocardial hypertrophy was evident only at day 2 with increased heart weight and altered expression of contractile proteins (up-regulation of β -MHC and skeletal α -actin; down-regulation of troponin C and MLC2V). During the first 24 hours (as early as 12 h), genes encoding ion channel subunits were either up-regulated (such as Nav1.5, +55%) or down-regulated (Kv4.2, -41%; KChIP2, -46%; Cnx43, -29%). Altered expression of these genes was either transient (Nav1.5, Kv4.2, Cnx43) or maintained (KChIP2). Expression of 10 other ion channels was altered only at day 2 (KvLQT1, Kir6.2) or 5 (Cav1.2, Kir6.1). Consistent with the transient alteration of Kv4.2, I_{to} was reduced at day 1 and restored to control at day 5. In conclusion, CAVB induces two phases of molecular remodeling: one early phase (<24 h) is related to electrical remodeling and arrhythmias, the second one to the hypertrophy process.

Key words:

arrhythmia, bradycardia, gene expression, hypertrophy, ion channels

Introduction

Acute complete atrioventricular block (CAVB) is a well-recognized cause of sudden cardiac death. Disruption of the electrical conduction at the atrioventricular junction leads to a shift of the main pacemaker toward the ventricle, which abruptly paces the heart at a low idioventricular rate. There are at least 3 consequences associated with CAVB and low escape rhythm: i) acquired long QT syndrome and electrical remodeling, leading to a risk of torsade de pointes arrhythmias, syncope and sudden death; (ii) biventricular hypertrophy resulting from volume overload also aggravated by atrioventricular desynchronization; (iii) heart failure as the ultimate consequence of decompensate hypertrophy, especially when CAVB occurs in a diseased heart.

Different animal models of CAVB have been established with the most common being the dog model.¹⁻⁹ Dogs tolerate well CAVB and do not exhibit spontaneous arrhythmias but enhanced susceptibility to torsade de pointes when challenged with a QT-prolonging drug.^{1,2,3,4} In dogs, electrical remodeling precedes ventricular hypertrophy⁵ and encompasses decreased delayed rectifier currents I_{Kr} and I_{Ks} ⁶ and up-regulated Na/Ca exchanger.⁷ Neither the transient outward current I_{to} nor the inward rectifier I_{K1} is affected by electrical remodeling.⁶ More recently, a rabbit model has been documented.^{8,9} In contrast to dogs, rabbits do not tolerate CAVB and show a high incidence of spontaneous torsades de pointes and sudden death.⁸ In rabbits like in dogs, electrical remodeling processes from decreased I_{Kr} and I_{Ks} currents, is dissociated from ventricular hypertrophy and is determined by the magnitude of bradycardia.⁹

In the present study we have developed a novel model of CAVB in the mouse

by interrupting conduction at the AV junction using a radiofrequency-mediated ablation procedure. We thought that the mouse has several advantages over dogs and rabbits. In contrast to the rabbit, the mouse genome has been entirely sequenced thus allowing investigation of molecular remodeling at a genome scale. In addition, various genetically invalidated or overexpressing mouse models with altered ion channel¹⁰ or transcription factor expression are available and may prove their value to dissect further the mechanisms responsible for electrical remodeling and arrhythmias. Finally, the mouse has a high reproduction rate and is most suitable when large numbers of animals are needed such as in time-course experiments. The mouse model has also several disadvantages in comparison with competing models including the small size of the heart (about 100 mg), which is technically challenging, a high cardiac beating rate (about 600 cycles/min) and cardiac electrophysiology characteristics different from those of the human heart.¹⁰ In spite of these differences, mice in CAVB spontaneously exhibited soon (<24 hours) after AV ablation repetitive episodes of polymorphic ventricular tachycardia, strongly resembling torsades de pointes in human. These episodes occurred before molecular markers for hypertrophy were detectable (>48 hours). Torsades de pointes occurred concomitantly with a dramatic rearrangement of cardiac molecular ion channel and transcription factor expression. Our data show that the mouse in CAVB is a powerful model to investigate molecular mechanisms governing the early electrical remodeling that creates an arrhythmogenic substrate in the absence of structural remodeling.

Materials and Methods

After a 2-week acclimatization period, 10-week old male CD1[®] mice (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) were randomized into 6 groups. One group was a control group. Four other groups of mice underwent ablation of the His bundle and were studied at 12 hours (CAVB H12 group), 1 day (CAVB D1), 2 days (CAVB D2) and 5 days (CAVB D5) after CAVB induction. The sixth group was composed of mice that underwent the same surgical procedure without ablation (sham group). The number of mice *per* group for each type of experiment will be given in the results section or in the figure legends.

Induction of atrioventricular block.

After anesthesia and analgesia with intraperitoneal (i.p.) injection of etomidate (25 mg/kg; Hypnomidate[®], Janssen-Cilag, Belgium) and nalbuphine (3 µg/kg; Nubin[®], CERB, France), mice were heparinized (5 units intravenously; Sanofi, France). After local anesthesia with a subcutaneous injection of lidocaine (Xylocaine 1%, Astra-Zeneca, UK), a 2F quadripolar catheter for radiofrequency ablation specially designed by Biosense[®] (Johnson & Johnson, USA) was introduced into the right atrium and ventricle through the right internal jugular vein. Surface ECG (lead I) and intracardiac electrograms were recorded on a computer through an analog-digital converter (IOX 1.585, EMKA Technologies, France) for monitoring and later analysis and measurements. After detection of the His bundle activity, radiofrequency ablation was performed using a H200S pulse generator (Osypka Hat 200S, Germany). Pulses were 15 sec long at a power of 2-2.5 W.

ECG recording

In conscious mice. Under general anesthesia with etomidate (35 mg/kg i.p.) and local anesthesia with lidocaine, mice were implanted with a telemetric device. A midline incision was made on the back along the spine to insert a telemetric transmitter (TA10EA-F20; Data Sciences International, USA) into a subcutaneous pocket with paired wire electrodes placed over the thorax. Telemetric ECG signals were computer-recorded with a telemetry receiver and an analog-digital conversion data acquisition system for analysis with ECG auto 1.5.11.26 (EMKA Technologies) software. Mice were implanted prior to the His bundle ablation procedure.

In anesthetized mice. Six-lead ECGs were recorded with 25-gauge subcutaneous electrodes on a computer through an analog-digital converter (IOX 1.585) for monitoring and later analysis (ECG Auto 1.5.7). Recordings were filtered between 0.5 and 250 Hz. Mice were anesthetized with etomidate (15 mg/kg i.p.). Body temperature was maintained at 37°C using a thermally controlled heating pad (Harvard Apparatus, USA). Criteria used for measuring RR, PR and QT intervals, as well as P wave duration can be found elsewhere.¹¹

Hemodynamics in anesthetized mice

Five days after His bundle ablation, animals were anesthetized with etomidate (35 mg/kg i.p.). Lidocaine was injected at the incision site along the trachea. Body temperature was maintained at 37°C. The right carotid artery was isolated. A catheter tip pressure transducer (Mikrotip 1.4F, Millar Instruments, USA) was inserted into the right carotid artery and advanced to the left ventricle under guidance of the pressure signal. Blood pressure and left ventricular pressure (LVP), maximal positive (+dP/dt)

and maximal negative (-dP/dt) rates of pressure development were recorded after a minimum 10-minute stabilization period using a PowerLab data acquisition system (AD Instruments, USA).

TaqMan real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction

Mice were killed by cervical dislocation under general anesthesia with etomidate (30 mg/kg i.p.) and the hearts quickly excised. Left ventricular free wall was carefully dissected and flash-frozen in liquid nitrogen. Total RNA from individual ventricular preparations was isolated and treated with DNase 1 (Sigma, USA). The quality of total RNA was assessed with polyacrylamide-gel micro-electrophoresis (Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, USA). Lack of genomic DNA-contamination was verified by PCR.

TaqMan low-density arrays (Applied Biosystems, USA) were used in a two-step RT-PCR process, as previously reported.¹² Briefly first-strand cDNA was synthesized from 2 µg of total RNA using the High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). PCR reactions were then performed on TaqMan low-density arrays using the ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). The 384 wells of each card were pre-loaded with 96 x 4 pre-designed fluorogenic TaqMan probes and primers. The genes selected for their cardiac expression (listed in the supplementary Table 1) encode 62 ion channel α - and auxiliary subunits, 6 proteins involved in calcium homeostasis, 9 transcription factors, 3 Na⁺/K⁺ ATPase subunits, 2 cytoskeletal proteins, 10 specific markers of cardiac regions, vessels, neuronal tissue, fibroblasts, inflammation and hypertrophy, and 4 endogenous control genes used for normalization. Data were collected with instrument spectral compensation by the Applied Biosystems SDS 2.1 software and

analyzed using the threshold cycle (Ct) relative-quantification method.¹³ Seven genes (Nav1.1, Nav1.7, TWIK1, TREK1, TASK2, MIRP4 and KChIP1) were eliminated for lack of detection (> 50% of undetermined data). The remaining genes (89) exhibited no undetermined data point. We selected the hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) gene for data normalization, as the most uniformly distributed gene. The relative expression of each gene *versus* HPRT was calculated for each sample (Δ Ct indicates normalized data). The outliers (a maximum of one value per group) were excluded using a robust statistical method based on tabularized Dixon distribution.¹⁴ Data were analyzed independently using two distinct procedures. The first one, two-way hierarchical agglomerative clustering, was applied to the gene-expression matrix consisting of 40 tissue samples and the 64 genes involved in electrical signaling. The input consisted of the Δ Ct for each gene and sample. We applied average linkage clustering with Pearson correlation using the Cluster software.¹⁵ Clusters were visualized using the Treeview software. The second procedure consisted in calculating means \pm SEM of the $2^{-\Delta$ Ct for each gene and each group. Since all fluorescent probes had 100% PCR efficiency (Applied Biosystems application note), expression levels among ventricular samples and among genes were compared.

Western blots

Protein samples were prepared from apex of control, CAVB H12, CAVB D1, CAVB D2 and CAVB D5 mice (n = 4 per group) using previously described method.¹⁶ Proteins were fractionated on either 10% SDS-polyacrylamide gels (for KChIP2) or 4-12% NuPAGE[®] Novex Bis-Tris gels from Invitrogen[™] (Kv4.2) and transferred on Nitrocellulose membranes (Hybond[™] ECL[™], Amersham Pharmacia Biotech, USA).

Membranes were blocked and incubated with polyclonal or monoclonal antibodies targeted against Kv4.2 (Alomone Labs, Israel) and KChIP2 (a kind gift from James S Trimmer, University of California, Davis, USA).¹⁷ In addition, a polyclonal anti-GAPDH antibody (Alomone Labs) was used as an external/internal control. After washing, membranes were incubated with goat peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit IgG secondary antibody (Alomone Labs). Membranes were then washed and signals from immunoreactive bands were detected by ECL (Perkin Elmer, USA) and quantified using QuantityOne program (Bio-Rad, USA). The densities of individual bands were quantified by summing the pixel values above background within a defined area surrounding each band and expressed relative to the value for the corresponding GAPDH band. To compare the Kv subunit expression levels between CAVB mouse ventricles and control mouse ventricles, these values were then expressed relative to the values for the control mouse value measured from the analysis of the same film.

Patch-clamp experiments

Isolation of myocytes. The procedure for isolating myocytes has been described elsewhere.¹⁸ Briefly, control, CAVB D1 and CAVB D5 mice were heparinized (600 IU/kg i.p.) and killed under anesthesia (etomidate 35 mg/kg i.p.). The hearts were quickly excised and retrogradely perfused through the aorta. Single myocytes were isolated enzymatically (type 2 collagenase, Worthington, USA; protease XIV, Sigma, USA) from the left ventricles.

Electrophysiological recording. Whole-cell voltage-clamp technique was used for recording membrane currents. Cells were superfused at room temperature with an extracellular solution containing (in mmol/L): N-Methyl-D-Glucamine, 130;

KCl, 5.4; MgSO₄, 1.2; HEPES, 10; glucose, 10; mannitol, 10; pH adjusted to 7.4 with HCl. Substitution of NaCl by N-Methyl-D-Glucamine suppressed the Na⁺ current. The addition of 3 μmol/L nifedipine blocked the L-type Ca²⁺ current. Patch pipettes had tip resistances of 2.0-3.0 MΩ. They were filled with a solution containing (in mmol/L): KCl, 20; K-aspartate, 110; HEPES, 5; MgCl₂, 2 (free-Mg²⁺: 0.6); K₂ATP, 5; CaCl₂, 1; pH 7.2 with KOH. K⁺ currents were elicited by applying at 3-s intervals a 500-ms voltage step to +30 mV from a holding potential (HP) of -80 mV. The transient outward current, I_{to}, was obtained by subtracting the current recorded after a 100-ms inactivating prepulse to -40 mV to the currents obtained from a HP of -80 mV.¹⁹

Statistics

Results are expressed as mean ± SEM. In real-time RT-PCR experiments, groups were compared for every gene and statistical differences were identified using one-way analysis of variance completed by a Tukey test. For functional studies and western blots statistical analysis was performed with Student *t*-test, Kruskal-Wallis analysis of variance on ranks and one-way analysis of variance completed by a Tukey test when appropriate. A value of *p* < 0.05 was considered significant.

Results

Complete atrioventricular block and early arrhythmias in the mouse

Figure 1 shows a representative induction of complete (third degree) AVB in a mouse. CAVB was induced successfully in 52/109 mice (47.7%) after 1 (34/109), 2 (11/109) or 3 (7/109) shoots. Increasing further the number of shoots did not improve

the success rate. Our preliminary investigations showed that increasing the energy power above 2.5 W or increasing the shoot duration above 15 s was detrimental to the heart. Among the 52 mice with successful ablation of the His bundle, 9 (17.3%) partially recovered from CAVB during follow-up and showed 2:1 or 3:1 AVB. These mice were excluded from the present study. In freely moving animals, the mouse heart rate was about 600 cycles/min in sinus rhythm and 94 ± 5 cycles/min 6 hours after CAVB. Later on, the escape rhythm progressively accelerated being 110 ± 9 cycles/min at H12, 122 ± 23 cycles/min at D1 and 125 ± 9 cycles/min at D2. Thus the period with more severe bradycardia was the first 24 hours.

Per operative mortality was high particularly during the first 24 hours. Thirty-three % of the mice in CAVB died before 24 h, 9% before 48 h and 2% before day 5. Thus, only 56% survived up to day 5. Upon follow-up, secondary mortality was observed 2.5-3 months after the procedure and was attributed to end-stage heart failure.

As shown in Table 1, ablation of the His bundle induced a marked prolongation of the RR interval which, as expected, associated with a dramatic lengthening of the QT interval. QRS interval was also prolonged, though not significantly. These two parameters progressively increased with time after CAVB, suggesting that both ventricular conduction and repolarization were progressively impaired. Interestingly, the PP interval after CAVB was significantly shortened suggesting an increased β -adrenergic input. This was particularly evident during the first 24 hours after His bundle ablation.

Seventeen mice were implanted with a telemetric device before His bundle ablation. CAVB was successfully induced in 9/17. During the first 24 hours (and in most cases during the first 12 hours) 6/9 exhibited repetitive episodes of polymorphic

ventricular tachycardia clearly resembling torsades de pointes in humans (Figure 2). Up to 130 episodes of ventricular tachycardia per 24-hour were observed on telemetry recordings. The number of daily episodes tended to decrease after day 2. Four mice died during telemetry recordings (2 with arrhythmias and 2 without; 2 at day 1, 1 at day 3 and 1 at day 4). In every case, death resulted from progressive slowing of the idioventricular escape rhythm down to complete extinction. Thus, mice did not die from their arrhythmias but rather from extreme bradycardia (Figure 2C).

Molecular markers for hypertrophy and hemodynamics

CAVB induced a progressive increase in heart weight (Table 1) evidenced at day 2 post-CAVB. Increased heart weight was associated with alterations in the expression of genes encoding contractile proteins and markers of hypertrophy, also evidenced at day 2 (Figure 3). Skeletal α -actin and β -MHC, which are expressed at low levels in the healthy mouse heart, were significantly up-regulated. The expression of cardiac α -actin was also increased. In contrast, expression of ventricular type 2 myosin light chain (MLC2V) and cardiac troponin I was down-regulated. Finally, genes encoding brain natriuretic peptide (BNP) and procollagen were up-regulated. Thus, CAVB hearts underwent hypertrophic rearrangement after day 2 whereas ventricular arrhythmias occurred during the first 24 hours, *i.e.* before cardiac hypertrophy.

Using Millar catheters, we also evaluated left ventricular pressure, contractility (+dP/dt) and relaxation (-dP/dt) at D5 post-ablation. The systolic blood pressure was comparable in control and CAVB D5 mice (92.5 ± 5.4 mmHg *versus* 89.0 ± 4.3 mmHg, respectively; $n = 6$ and 4) whereas, as expected, diastolic pressure was lower in CAVB D5 animals (27.2 ± 0.9 *versus* 51.6 ± 3.9 mmHg; $p < 0.01$). Contractility was

conserved in CAVB D5 mice (+dP/dt was 6534 ± 620 mmHg/sec in control *versus* 6075 ± 1010 mmHg/sec in CAVB D5 mice) whereas relaxation was consistently decreased (-dP/dt: -6007 ± 425 mmHg/sec in control *versus* -4294 ± 281 mmHg/sec in CAVB D5; $p < 0.02$). We interpret these data as indicating compensated cardiac hypertrophy at day 5 post-CAVB.

Early remodeling of ion channel gene expression

An overview of gene expression data is provided by a two-way hierarchical clustering analysis of genes and cardiac tissues (Figure 4). In this global analysis, the samples are linked to a tree. The size of the tree branches indicates the distance between the clusters: higher is the branch size, more significant is the separation between the clusters. Hierarchical clustering showed that control mice clustered with sham mice. Consequently, in further experiments, mice in CAVB were compared to control mice. Hierarchical clustering also indicated that CAVB H12 mice separated from control or sham demonstrating early remodeling. CAVB H12 mice clustered together with most CAVB D1 mice but separately from CAVB D2 or D5 mice. CAVB D2 and D5 mice clustered together in a common tree branch. We interpreted these data as suggesting the existence of two separate phases for molecular remodeling: (i) an early phase in the first 24 hours in relation to electrical remodeling and; (ii) a later phase in relation to the hypertrophy process. Noteworthy, mice in CAVB for 12 hours presented their own specific pattern of expression with genes either up- or down-regulated in comparison with other groups (clusters C and D on Figure 4). Also, mice in CAVB for at least 48 hours (CAVB D2 and D5) exhibited their own distinct portrait (clusters A and B).

Figures 5-7 show the effects of CAVB on individual patterns of expression of a

subset of genes encoding ion channel subunits and Ca^{2+} homeostasis regulators, *i.e.* those with the larger expression changes. Results obtained for all investigated genes are presented in supplementary Table 2. Among the voltage-gated Na^+ channel subunits, the α -subunits Nav1.3 (*Scn3a* gene), Nav1.5 (*Scn5a*) and Nav2.3 (*Scn7a*) were transiently up-regulated whereas the β -subunit Nav β 1 (*Scn1b*) was transiently down-regulated (Figure 5). Similarly, expression of both connexins 40 (*Gja5*) and 43 (*Gja1*) were transiently decreased. On the other hand, Nav1.4 (*Scn4a*) was progressively down-regulated, reaching a stable level of expression at day 2. Among the voltage-gated Ca^{2+} channel subunits (Figure 6), Cav3.1 (*Cacna1g*) was transiently down-regulated in CAVB H12 mice. In contrast, the L-type Ca^{2+} channel subunit Cav1.2 (*Cacna1c*) remained stable for 48 hours and was down-regulated after 5 days. CAVB also induced a complex regulation of the expression of genes encoding regulators of Ca^{2+} homeostasis (Figure 6). The sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, SERCA2 (*Atp2a2*) and its regulator phospholamban (PLB; *Pln* gene) were down-regulated. Regulation of the type 2 ryanodine receptor (*RyR2*) and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger NCX1 (*Slc8a1*) were complex. *RyR2* expression first increased moderately (NS) before decreasing strongly at day 5. NCX1 expression was transiently up-regulated only at day 2. Finally, expression of type 1 calmodulin was moderately increased.

The expression of many voltage-gated K^+ channel subunits was also altered by CAVB (Figure 7). Among the α -subunits, Kv4.2 (*Kcnd2*) was transiently down-regulated at days 1 and 2 after AVB before its expression returned to control values at day 5. Other α -subunits were either up-regulated, such as Kv1.4 (*Kcna4*), Kv2.1 (*Kcnb1*) or KvLQT1 (*Kcnq1*) either rapidly (Kv2.1) or more progressively. Finally, Kv1.5 (*Kcna5*; data not shown) showed transient up-regulation: its expression

increased 12 hours after His bundle ablation and then decreased back to control values at day 1. In contrast, among the voltage-gated K⁺ channel β -subunits, only KChIP2 (*Kcnp2*) and minK (*Kcne1*) were regulated, both in a negative way. Among the inward rectifier K⁺ channels, one of the α -subunits forming the pore of acetylcholine-activated K⁺ channel I_{K,ACh}, Kir3.1 (*Kcnj3*) was down-regulated (data not shown). A similar pattern of regulation was observed for the cardiac sarcolemmal ATP-dependent K⁺ channel α - (Kir6.2; *Kcnj11*) and β -subunits (SUR2; *Abcc9*). Kir6.1 (*Kcnj8*) was also down-regulated, but only at day 5 (data not shown). Finally, the expression of only one 2-pore K⁺ channel, TASK (*Kcnk3*) was altered.

Functional correlation with molecular data

Myocardial hypertrophy has often been associated with a decreased expression of the transient outward current, I_{to}. In the mouse, I_{to} mainly results from the association between Kv4.2, the α -subunit, and KChIP2, its β -subunit. Because these two genes showed different patterns of regulation (one transient, Kv4.2, and one progressive, KChIP2), western blots and whole patch-clamp recordings were conducted to investigate the functional consequences of these changes. As illustrated in Figure 8A, Kv4.2 protein expression was transiently down-regulated whereas KChIP2 was progressively down-regulated to reach significance at day 5 only, as previously observed at the transcript level. As a consequence, the amplitude of I_{to} was reduced significantly at day 1 and then returned to control values at day 5 (Figure 8B).

Discussion

In the present study, we report a novel model of CAVB in the mouse obtained by ablating conduction at the His bundle level. The model shows two distinct phases of adaptation to abrupt bradycardia and presumably reduced cardiac output: (i) an initial phase of electrical remodeling associated with spontaneous episodes of polymorphic ventricular tachycardia which developed <24 hours post-AVB; (ii) a later phase >24 hours post-AVB in relation to structural remodeling and adaptive cardiac hypertrophy. This later phase is characterized by the expression of hypertrophic markers, increased cardiac weight but conserved contractility. Many molecular rearrangements, which occurred during this phase, are typical for myocardial hypertrophic processes. These include down-expression of RYR2, SERCA2 and phospholamban^{20,21,22} and also transient down-expression of Kv4.2^{23,24} and sustained expression of KChIP2²⁵ and minK.²⁶

During the initial phase of cardiac adaptation to idioventricular rhythm (<24-hours), electrical remodeling occurred in the absence of cell hypertrophy. Most remarkably, this initial phase is characterized by an early fall in the expression of Kv4.2 and KChIP2 visible at the level of mRNA, protein and at the functional level as a decrease in the fast inactivating transient outward current, $I_{to,f}$. Inversely to the dog, $I_{to,f}$ plays a major role to repolarize mouse ventricle short action potentials whereas the delayed K^+ currents, I_{Kr} and I_{Ks} , play little role if any. In the dog as in the rabbit, the prominent effect of CAVB is a reduction in the amplitude of I_{Kr} and I_{Ks} whereas $I_{to,f}$ is unaffected at least during the initial stages.^{6,8,9} Thus, depending on the species, reduction in the prominent repolarizing current (either the delayed rectifier or the transient outward current) is central to the electrical remodeling resulting from CAVB.

In rodent ventricles, KChIP2 is uniformly expressed, and regional differences in $I_{to,f}$ densities are correlated with heterogeneities in Kv4.2 expression.²⁷ The situation is different in the dog where the transmural gradient in $I_{to,f}$ is carried by differential expression of KChIP2.¹⁶ Thus in the mouse, Kv4.2 expression is the main determinant of $I_{to,f}$ whereas KChIP2 plays a less important role. This matches our findings where a transient decrease in Kv4.2 results in a transient decrease in $I_{to,f}$ in spite of a sustained decrease in KChIP2. It is difficult to establish whether early reduction in Kv4.2 and KChIP2 is a primary signal that precedes activation of hypertrophic markers or whether early and late down-regulation of these genes originated from different mechanisms. The signal that governs decreased expression of Kv4.2 and KChIP2 transcripts is at present unknown. It has been recently proposed that the homeodomain transcription factors IRX5 and IRX3 repress Kv4.2 expression.^{28,29} Kv4.2 expression has also been related to GATA4 expression.³⁰ Furthermore, MEF2a over expressing myocytes display a reduction in I_{to} consistent with a decrease in Kv4.2 mRNA expression.³¹ Positive regulation of KChIP2 expression by cAMP response element binding protein (CREB1) has also been recently reported.³² Jia and Takimoto have shown that KChIP2 mRNA level is controlled by the JNK and MEK-ERK mitogen-activated protein kinase pathways.³³ In the same line, expression of both Kv4.2 and KChIP2 is under control of the calcineurin/NFAT activity, which is required for their down-regulation.³⁴ Based on these findings, we compared the mRNA expression of certain members of the IRX, GATA, MEF2, CREB, AP-1 and NFAT families between control mice and mice in CAVB for 12 hours, 1 day, 2 days and 5 days (supplementary Table 2). In relation with the previously mentioned transcriptional regulations, we found an up-regulation as early as 12 h of IRX3 (more than 2 fold; $p < 0.001$ versus control group), ATF3

(almost 12 fold; $p < 0.01$), c-Fos (2 fold; $p < 0.01$) and no modification of NFATC3. Surprisingly, MEF2a was down-regulated by 44% ($p < 0.001$) as early as 12 hours after CAVB induction and GATA4 mRNA expression was not modified. Obviously, much more work should be conducted before the relation between transcription factors and expression of ion channel subunits generating I_{to} is elucidated.

QT interval prolongation and associated predisposition to torsades de pointes are a hallmark of strong bradycardia in patients^{35,36} and animal models.^{1,2,8,9} Our study confirms this finding in the mouse model with two major differences. First, in our model, arrhythmias occurred much earlier. This may be the consequence of the more profound degree of bradycardia as suggested previously in the rabbit model.^{8,9} Second, the ionic mechanisms might be different since ionic currents involved in mouse cardiac repolarization differ markedly from those in rabbits, dogs or humans. The mechanisms leading to polymorphic ventricular tachycardia in CAVB mice is debatable. Whether electrical remodeling and more specifically early decreased Kv4.2 and KChIP2 are a substrate for arrhythmogenesis in this model is unclear. Complete loss of I_{to} in KChIP2 knock-out mice has been reported to confer susceptibility to pacing-induced polymorphic ventricular tachycardia.³⁷ However, in our model, occurrence of arrhythmias precedes Kv4.2 and KChIP2 remodeling. Among the early regulated genes is *Kcne1* which is down-regulated. Interestingly, although *Kcne1*-gene product, the K^+ channel auxiliary subunit, minK, does not seem to play a major role in adult mouse cardiac repolarization,^{38,39,40} *Kcne1* knock-out mice exhibit higher susceptibility to ventricular⁴¹ arrhythmias. In this model, ventricular arrhythmias are favored by adrenergic stimulation and prevented by a Ca^{2+} channel inhibitor. *Kcne1* disruption leads to a wider spread of conduction velocities which could favor reentry, a likely mechanism for continued propagation of

torsades de pointes induced by early afterdepolarizations in the context of long QT.⁴² Other potentially proarrhythmic rearrangements include decreased Cx43 expression. Although this latter effect is modest in amplitude (< 50%) and thus is not expected to influence cardiac conduction and arrhythmogenesis in normal conditions, it might participate to the arrhythmogenic substrate in our model.⁴³ Finally, beside the arrhythmogenic potential of early ionic remodeling, it is most probable that the combination of strong bradycardia, prolonged ventricular repolarization and high sympathetic input (as assessed by the decrease in PP interval), that is expected to increase L-type Ca^{2+} current and disturb intracellular Ca^{2+} regulation, would be sufficient to induce early afterdepolarizations and arrhythmias.

In summary, we report a new model of CAVB in the mouse and describe the time-course of molecular remodeling, which evolves according to two phases: one early phase related to stress leading to ventricular arrhythmias and a later phase related to cardiac hypertrophy. The model provides a unique opportunity to link altered transcription pathways and ion channel remodeling. With the aim to elucidate arrhythmogenesis, further studies will be conducted with the CABV model by making use of mice knock-out for genes encoding key ion channels (e.g. *Kv4.2*^{-/-} or *KChIP2*^{-/-} mice) or transcription factors (e.g. *Irx5*^{-/-}), a powerful approach that is not possible with the dog or rabbit models.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Fondation de France (SD-DE) and the Agence Nationale de la Recherche (ANR "Cardiovasculaire, obésité, diabète; FC). The authors wish to thank Béatrice Le Ray, Marie-Jo Louérat and Agnès Carcouët (Inserm U533) for expert technical assistance. They also express their gratitude to Céline Fiset (Montreal Heart Institute) for helpful advice with Kv4.2 western blots.

References

- ¹ Vos MA, de Groot SH, Verduyn SC, van der Zande J, Leunissen HD, Cleutjens JP, van Bilsen M, Daemen MJ, Schreuder JJ, Allessie MA, and Wellens HJ. Enhanced susceptibility for acquired torsade de pointes arrhythmias in the dog with chronic, complete AV block is related to cardiac hypertrophy and electrical remodeling. *Circulation* 98: 1125-1135, 1998.
- ² van Opstal JM, Verduyn SC, Leunissen HD, de Groot SH, Wellens HJ, and Vos MA. Electrophysiological parameters indicative of sudden cardiac death in the dog with chronic complete AV-block. *Cardiovasc Res* 50: 354-361, 2001.
- ³ van Opstal JM, Schoenmakers M, Verduyn SC, de Groot SH, Leunissen JD, van Der Hulst FF, Molenschot MM, Wellens HJ, and Vos MA. Chronic amiodarone evokes no torsade de pointes arrhythmias despite QT lengthening in an animal model of acquired long-QT syndrome. *Circulation* 104: 2722-2727, 2001.
- ⁴ Thomsen MB, Verduyn SC, Stengl M, Beekman JD, de Pater G, van Opstal J, Volders PG, and Vos MA. Increased short-term variability of repolarization predicts d-sotalol-induced torsades de pointes in dogs. *Circulation* 110: 2453-2459, 2004.
- ⁵ Schoenmakers M, Ramakers C, van Opstal JM, Leunissen JD, Londono C, and Vos MA. Asynchronous development of electrical remodeling and cardiac hypertrophy in the complete AV block dog. *Cardiovasc Res* 59: 351-359, 2003.
- ⁶ Volders PG, Sipido KR, Vos MA, Spatjens RL, Leunissen JD, Carmeliet E, and Wellens HJ. Downregulation of delayed rectifier K(+) currents in dogs with chronic complete atrioventricular block and acquired torsades de pointes. *Circulation* 100:

2455-2461, 1999.

- ⁷ Sipido KR, Volders PG, de Groot SH, Verdonck F, Van de Werf F, Wellens HJ, and Vos MA. Enhanced Ca(2+) release and Na/Ca exchange activity in hypertrophied canine ventricular myocytes: potential link between contractile adaptation and arrhythmogenesis. *Circulation* 102: 2137-2144, 2000.
- ⁸ Tsuji Y, Opthof T, Yasui K, Inden Y, Takemura H, Niwa N, Lu Z, Lee JK, Honjo H, Kamiya K, and Kodama I. Ionic mechanisms of acquired QT prolongation and torsades de pointes in rabbits with chronic complete atrioventricular block. *Circulation* 106: 2012-2018, 2002.
- ⁹ Suto F, Zhu W, Cahill SA, Greenwald I, Navarro AL, and Gross GJ. Ventricular rate determines early bradycardic electrical remodeling. *Heart Rhythm* 2: 293-300, 2005.
- ¹⁰ Nerbonne JM, Nichols CG, Schwarz TL, and Escande D. Genetic manipulation of cardiac K(+) channel function in mice: what have we learned, and where do we go from here? *Circ Res* 89: 944-956, 2001.
- ¹¹ Lande G, Demolombe S, Bammert A, Moorman A, Charpentier F, and Escande D. Transgenic mice overexpressing human KvLQT1 dominant-negative isoform. Part II: Pharmacological profile. *Cardiovasc Res.* 2001;50:328-334.
- ¹² Marionneau C, Couette B, Liu J, Li H, Mangoni ME, Nargeot J, Lei M, Escande D, and Demolombe S. Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart. *J Physiol.* 2005;562:223-34.
- ¹³ Livak KJ, and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-

- time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25:402-408.
- ¹⁴ Rorabacher DB. Statistical Treatment for Rejection of Deviant Values: Critical Values of Dixon Q Parameter and Related Subrange Ratios at the 95 percent Confidence Level. *Anal Chem*. 1991;63:139-146.
- ¹⁵ Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, and Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;14:863-868.
- ¹⁶ Rosati B, Grau F, Rodriguez S, Li H, Nerbonne JM, and McKinnon D. Concordant expression of KChIP2 mRNA, protein and transient outward current throughout the canine ventricle. *J Physiol* 2003;548: 815-822.
- ¹⁷ Brunet S, Aimond F, Li H, Guo W, Eldstrom J, Fedida D, Yamada KA, and Nerbonne JM. Heterogeneous expression of repolarizing, voltage-gated K⁺ currents in adult mouse ventricles. *J Physiol*. 2004;559:103-120.
- ¹⁸ Le Bouter S, Demolombe S, Chambellan A, Bellocq C, Aimond F, Toumaniantz G, Lande G, Siavoshian S, Baro I, Pond AL, Nerbonne JM, Leger JJ, Escande D, and Charpentier F. Microarray analysis reveals complex remodeling of cardiac ion channel expression with altered thyroid status: relation to cellular and integrated electrophysiology. *Circ Res*. 2003;92:234-242.
- ¹⁹ Brouillette J, Clark RB, Giles WR, and Fiset C. Functional properties of K⁺ currents in adult mouse ventricular myocytes. *J Physiol* 2004;559:777-98.
- ²⁰ Tomaselli GF, and Marban E. Electrophysiological remodeling in hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 42: 270-283, 1999.

-
- ²¹ Hill JA. Electrical remodeling in cardiac hypertrophy. *Trends Cardiovasc Med* 13: 316-322, 2003.
- ²² Janse MJ. Electrophysiological changes in heart failure and their relationship to arrhythmogenesis. *Cardiovasc Res* 61: 208-217, 2004.
- ²³ Takimoto K, Li D, Hershman KM, Li P, Jackson EK, and Levitan ES. Decreased expression of Kv4.2 and novel Kv4.3 K⁺ channel subunit mRNAs in ventricles of renovascular hypertensive rats. *Circ Res* 81: 533-539, 1997.
- ²⁴ Lee JK, Nishiyama A, Kambe F, Seo H, Takeuchi S, Kamiya K, Kodama I, and Toyama J. Downregulation of voltage-gated K(+) channels in rat heart with right ventricular hypertrophy. *Am J Physiol* 277: H1725-1731, 1999.
- ²⁵ Jia Y, and Takimoto K. Mitogen-activated protein kinases control cardiac KChIP2 gene expression. *Circ Res* 98: 386-393, 2006.
- ²⁶ Ramakers C, Vos MA, Doevendans PA, Schoenmakers M, Wu YS, Scicchitano S, Iodice A, Thomas GP, Antzelevitch C, and Dumaine R. Coordinated down-regulation of KCNQ1 and KCNE1 expression contributes to reduction of I(Ks) in canine hypertrophied hearts. *Cardiovasc Res* 57: 486-496, 2003.
- ²⁷ Guo W, Li H, Aimond F, Johns DC, Rhodes KJ, Trimmer JS, and Nerbonne JM. Role of heteromultimers in the generation of myocardial transient outward K⁺ currents. *Circ Res* 90: 586–593, 2002.
- ²⁸ 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,

- and Bruneau BG. The homeodomain transcription factor *Irx5* establishes the mouse cardiac ventricular repolarization gradient. *Cell* 123: 347-358, 2005.
- ²⁹ Rosati B, Grau F, and McKinnon D. Regional variation in mRNA transcript abundance within the ventricular wall. *J Mol Cell Cardiol* 40: 295-302, 2006.
- ³⁰ Jia Y, and 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* 60: 278-287, 2003.
- ³¹ Xu J, Gong NL, Bodi I, Aronow BJ, Backx PH, and Molkenin JD. Myocyte enhancer factors 2A and 2C induce dilated cardiomyopathy in transgenic mice. *J Biol Chem* 281: 9152-62, 2006.
- ³² Patberg KW, Obreztkhikova MN, Giardina SF, Symes AJ, Plotnikov AN, Qu J, Chandra P, McKinnon D, Liou SR, Rybin AV, Shlapakova I, Danilo P Jr, Yang J, and Rosen MR. The cAMP response element binding protein modulates expression of the transient outward current: implications for cardiac memory. *Cardiovasc Res* 68: 259-267, 2005.
- ³³ Jia Y, and Takimoto K. Mitogen-activated protein kinases control cardiac *KCHIP2* gene expression. *Circ Res* 98: 386-93, 2006.
- ³⁴ Rossow CF, Dilly KW, and Santana LF. Differential calcineurin/NFATc3 activity contributes to the Ito transmural gradient in the mouse heart. *Circ Res* 98: 1306-13, 2006.
- ³⁵ Kurita T, Ohe T, Marui N, Aihara N, Takaki H, Kamakura S, Matsuhisa M, and Shimomura K. Bradycardia-induced abnormal QT prolongation in patients with

- complete atrioventricular block with torsades de pointes. *Am J Cardiol* 69: 628-633, 1992.
- ³⁶ Gladman G, Davis AM, Fogelman R, Hamilton RM, and Gow RM. Torsade de pointes, acquired complete heart block and inappropriately long QT in childhood. *Can J Cardiol* 12: 683-685, 1996.
- ³⁷ 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, and 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* 107: 801-813, 2001.
- ³⁸ Drici MD, Arrighi I, Chouabe C, Mann JR, Lazdunski M, Romey G, and Barhanin J. Involvement of Isk-associated K⁺ channel in heart rate control of repolarization in a murine engineered model of Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Circ Res* 83: 95-102, 1998.
- ³⁹ Charpentier F, Mérot J, Riochet D, Le Marec H, and Escande D. Adult KCNE1-knockout mice exhibit a mild cardiac cellular phenotype. *Biochem Biophys Res Commun* 251: 806-810, 1998.
- ⁴⁰ Kupersmidt S, Yang T, Anderson ME, Wessels A, Niswender KD, Magnuson MA, and Roden DM. Replacement by homologous recombination of the minK gene with lacZ reveals restriction of minK expression to the mouse cardiac conduction system. *Circ Res* 84: 146-152, 1999.
- ⁴¹ Balasubramaniam R, Grace AA, Saumarez RC, Vandenberg JI, and Huang CL. Electrogram prolongation and nifedipine-suppressible ventricular arrhythmias in

mice following targeted disruption of KCNE1. *J Physiol* 552: 535-546, 2003.

⁴² el-Sherif N, Caref EB, Yin H, and Restivo M. The electrophysiological mechanism of ventricular arrhythmias in the long QT syndrome. Tridimensional mapping of activation and recovery patterns. *Circ Res* 79: 474-492, 1996.

⁴³ van Rijen HV, Eckardt D, Degen J, Theis M, Ott T, Willecke K, Jongsma HJ, Opthof T, and de Bakker JM. Slow conduction and enhanced anisotropy increase the propensity for ventricular tachyarrhythmias in adult mice with induced deletion of connexin43. *Circulation* 109: 1048-1055, 2004.

Figure legends

Figure 1. Radiofrequency catheter-mediated His bundle ablation. **A.** View of the radiofrequency catheter inside the right ventricular cavity (RV). **B.** Representative surface lead 1 ECG (I) and right ventricular electrogram (RV) during a radiofrequency shoot of 15 s at an intensity of 2 W. **C.** Representative lead 1 ECG (I) and right ventricular electrogram (RV) before and after His bundle ablation (after warming-up of the escape ventricular rhythm). Enlargement of the traces in the inset allows visualization of the His bundle activity. P, P wave; R, QRS complex; A, atrial activity; H, His bundle activity; V, ventricular activity.

Figure 2. Representative telemetric recordings of arrhythmias obtained in three different mice within 12 hours (panels A and B) and 4 days (94 hours; panel C) after atrioventricular node ablation. **A.** Ventricular escape rhythm with occurrence of extrasystoles and shorts runs of ventricular tachycardia (VT; arrows). **B.** Representative episode of a self-terminating "torsade de pointes"-like polymorphic VT. Runs of VT were observed in 6/9 mice. **C.** Terminal bradycardia associated to death. Disappearance of ventricular escape rhythm (at 14:34:27) preceded sinus node extinction 50 s later.

Figure 3. Expression of genes encoding contractile proteins and markers of hypertrophy (Y-axes) as a function of time after atrioventricular block (X-axes). Time 0 corresponds to control ventricles. Graphs show the relative quantification *versus* hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase gene (HPRT) (Y-axis). Data are means \pm sem from 6-7 left ventricles. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ *versus*

control left ventricles (time 0).

Figure 4. Two-way hierarchical clustering applied to 64 genes (vertical axis) and to left ventricular free walls isolated from sham mice (n = 5), control mice (n = 7) and mice in complete atrioventricular block for 12 h (CAVB H12; n = 7), 1 day (CAVB D1; n = 7), 2 days (CAVB D2; n = 7) and 5 days (CAVB D5; n = 7). The input consisted of Δ CT for each preparation and gene. Each gene is represented by a single row of colored boxes and each ventricular preparation by a single column. Each color patch represents gene expression level, with a continuum of expression levels from dark green (lowest) to bright red (highest). Grey boxes correspond to missing values. Five selected gene clusters are shown on the right (A-E). Clusters A and B contain genes that were, respectively, down-regulated and up-regulated in CAVB D2 and D5 mice. Clusters C and D discriminate H12 mice from the other groups.

Figure 5. Expression of genes encoding Na⁺ channel subunits, Connexins (Cx) and Na⁺/K⁺ ATPase subunits in left ventricle (Y-axes) as a function of time after atrioventricular block (X-axes). Same legend as in Figure 3.

Figure 6. Expression of genes encoding Ca²⁺ channel subunits and proteins involved in intracellular Ca²⁺ homeostasis in left ventricle (Y-axes) as a function of time after atrioventricular block (X-axes). Same legend as in Figure 3.

Figure 7. Expression of genes encoding K⁺ channel subunits in left ventricle (Y-axes) as a function of time after atrioventricular block (X-axes). Same legend as in Figure 3.

Figure 8. A. Top. Representative Western blots probed with anti-Kv4.2 and anti-KChIP2 antibodies in ventricular tissues collected from control mice (C) and mice in complete atrioventricular block for 12 h (CAVB H12), 24 h (CAVB D1), 2 days (CAVB D2) and 5 days (CAVB D5) respectively. The intensity of the signals obtained after treatment with anti-GAPDH antibody indicated that similar amounts of protein were loaded in the different wells. The molecular mass of the detected proteins is indicated on the right. **Bottom.** Corresponding bar graphs showing the average amount of proteins detected in left ventricular preparations of mice in atrioventricular block (in arbitrary units) as compared to control mice (value of 1). Data are means \pm sem of 4 values in each group. *, **, $p < 0.05$ and $p < 0.01$ *versus* control, respectively. **B. Top.** Representative traces of the transient outward current (I_{to}) in a control mouse and in mice in AV block for 1 (CAVB D1) and 5 (CAVB D5) days. The dotted line indicates the 0 current level. Horizontal bar, 200 ms; vertical bar, 2 pA/pF. **Bottom.** Corresponding bar graph showing the average current density for control ($n = 15$), CAVB D1 ($n = 13$) and CAVB D5 ($n = 14$) myocytes. *, $p < 0.05$ *versus* control.

Tables

Table 1:

ECG parameters of control mice and mice in complete atrioventricular block for 12 hours (CAVB 12h), 1 day (CAVB D1), 2 days (CAVB D2) and 5 days (CAVB D5).

	HW (mg)	PP (ms)	RR (ms)	QRS (ms)	QT (ms)
Control	142 ± 2		180 ± 7	12 ± 1	59 ± 3
CAVB 12h	144 ± 3	104 ± 4 ***	464 ± 42 ***	15 ± 1	97 ± 6 **
CAVB D1	146 ± 4	113 ± 3 ***	410 ± 30 ***	18 ± 1 *	94 ± 8 **
CAVB D2	165 ± 6 *	124 ± 5 ***	502 ± 45 ***	19 ± 1 ***	115 ± 3 ***
CAVB D5	179 ± 4 ***	128 ± 12 ***	456 ± 49 ***	17 ± 1 **	109 ± 13 ***

Abbreviations are: RR, RR interval duration; P, P wave duration; PR, PR interval duration; QRS, QRS complex duration; NS, non significant.

Data are expressed as means ± sem of 9 values for control, CAVB D1, CAVB D2 and CAVB D5 groups, and 8 values for the CAVB 12h group.

*, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001 *versus* corresponding value in control mice.

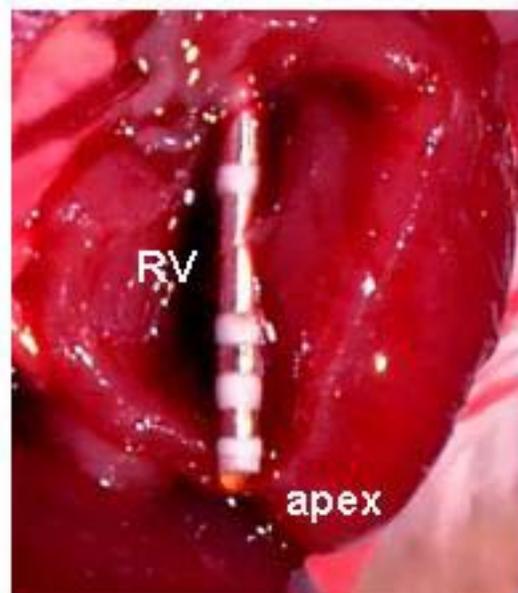
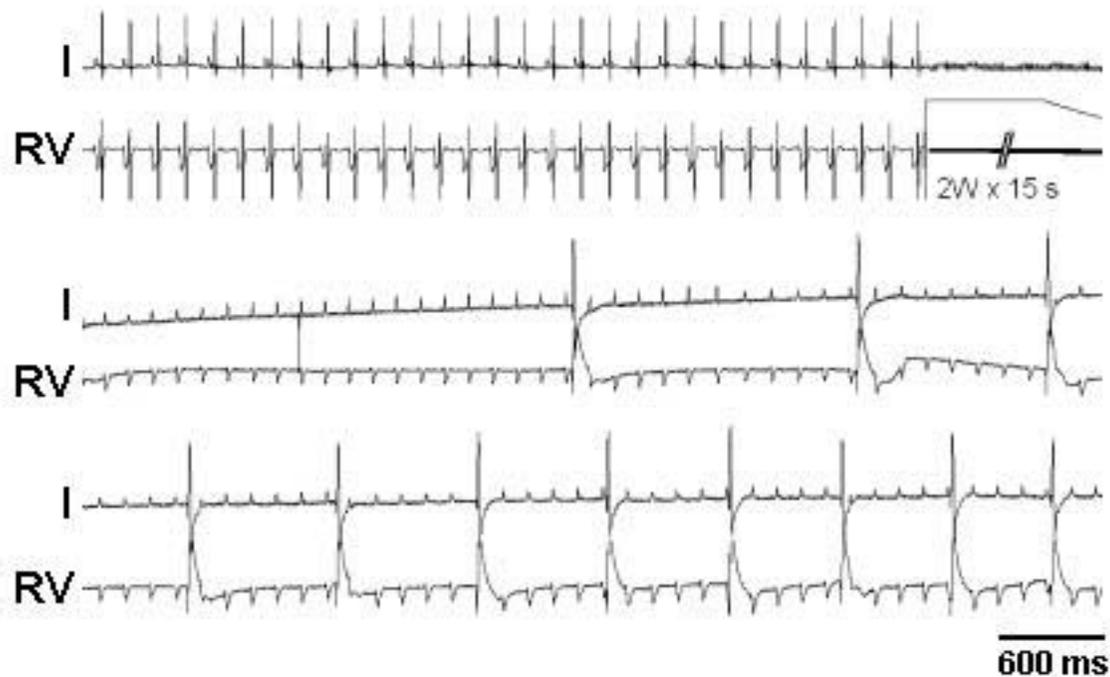
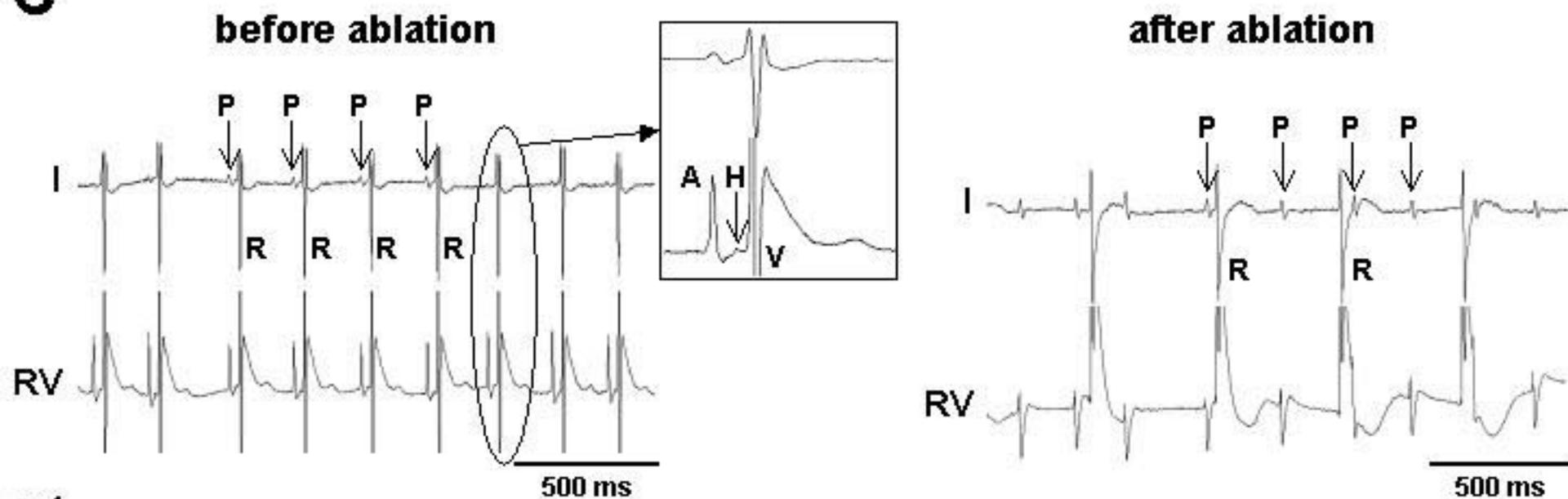
A**B****C**

Figure 1

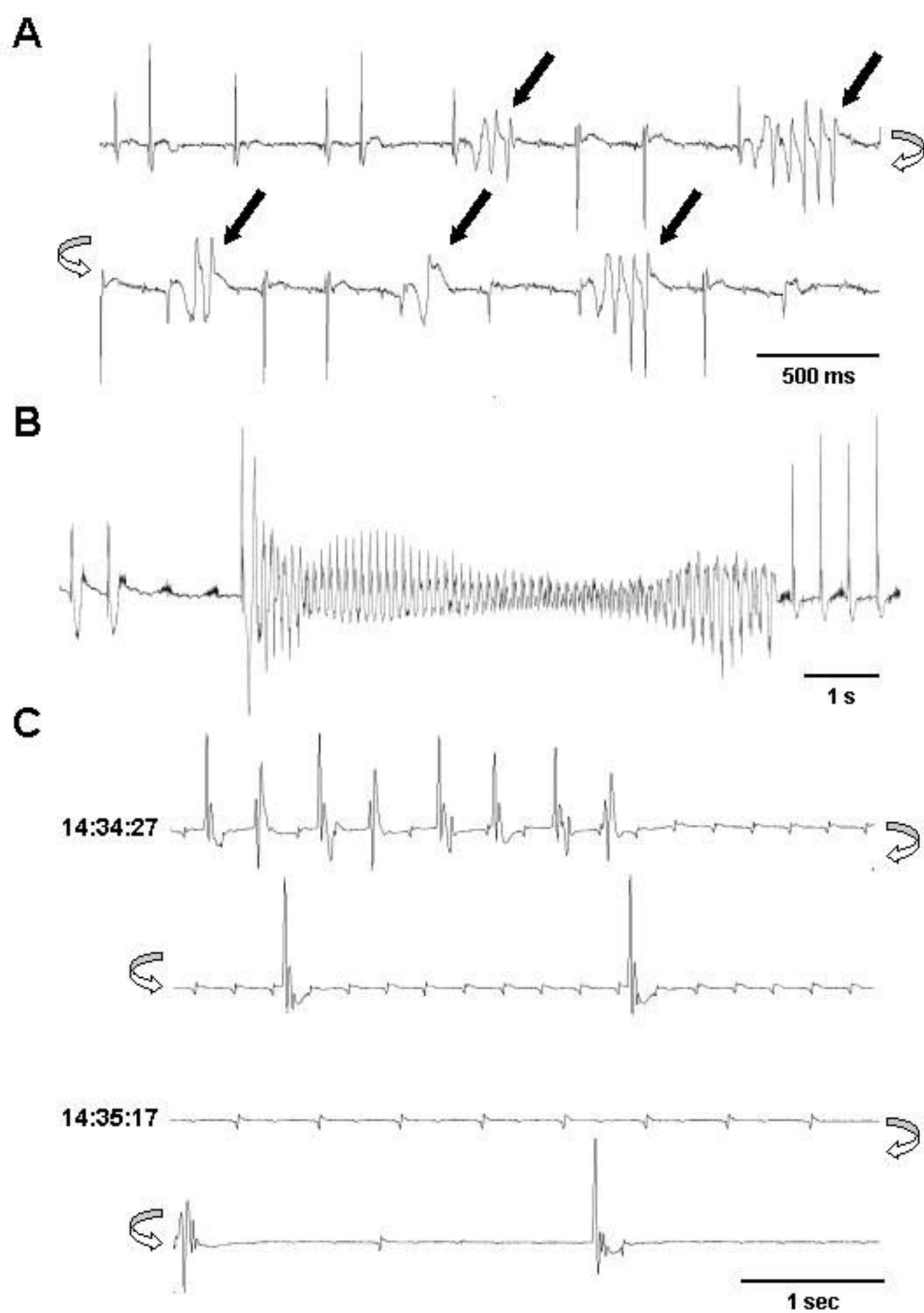


Figure 2

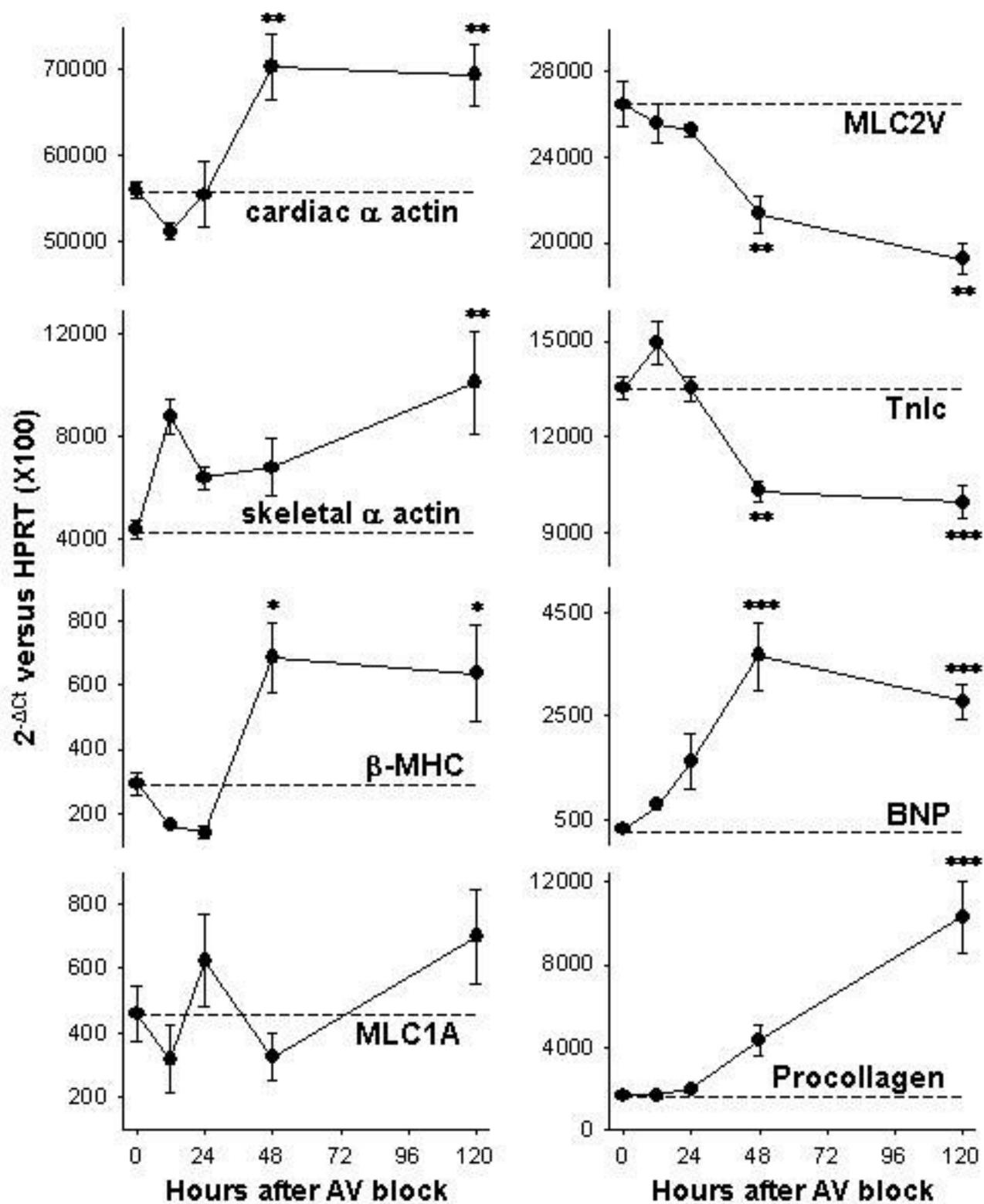


Figure 3

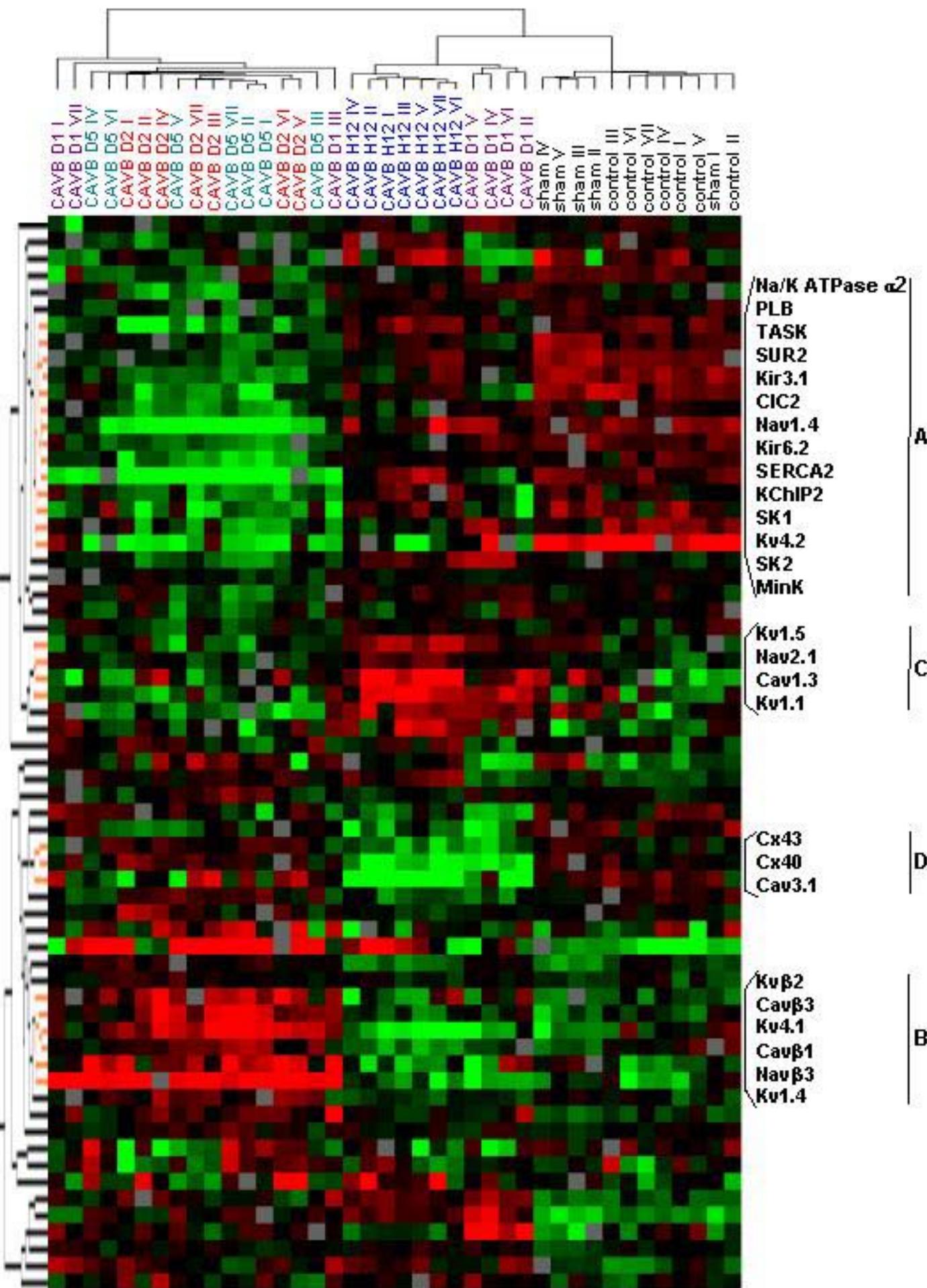


Figure 4

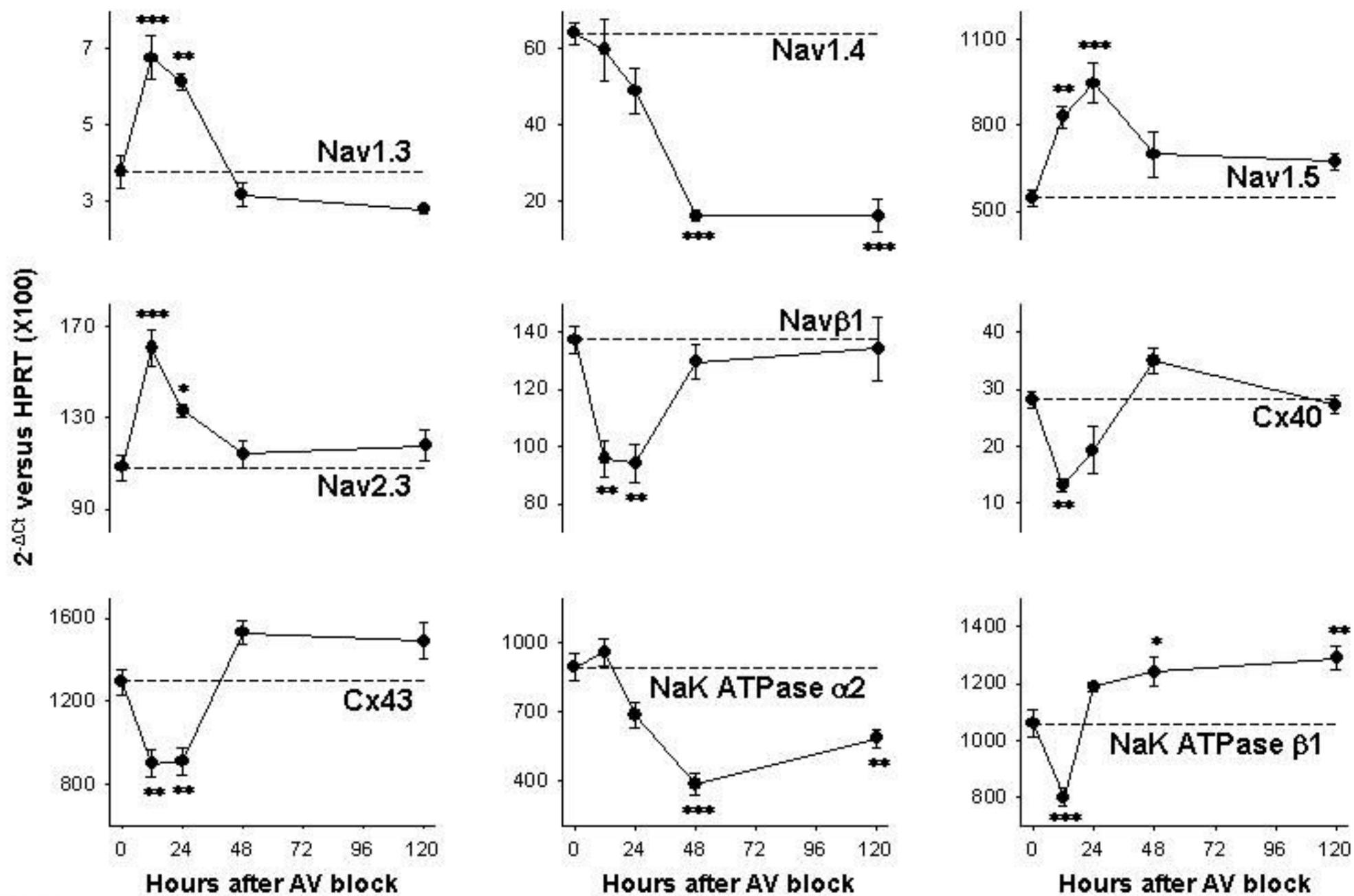


Figure 5

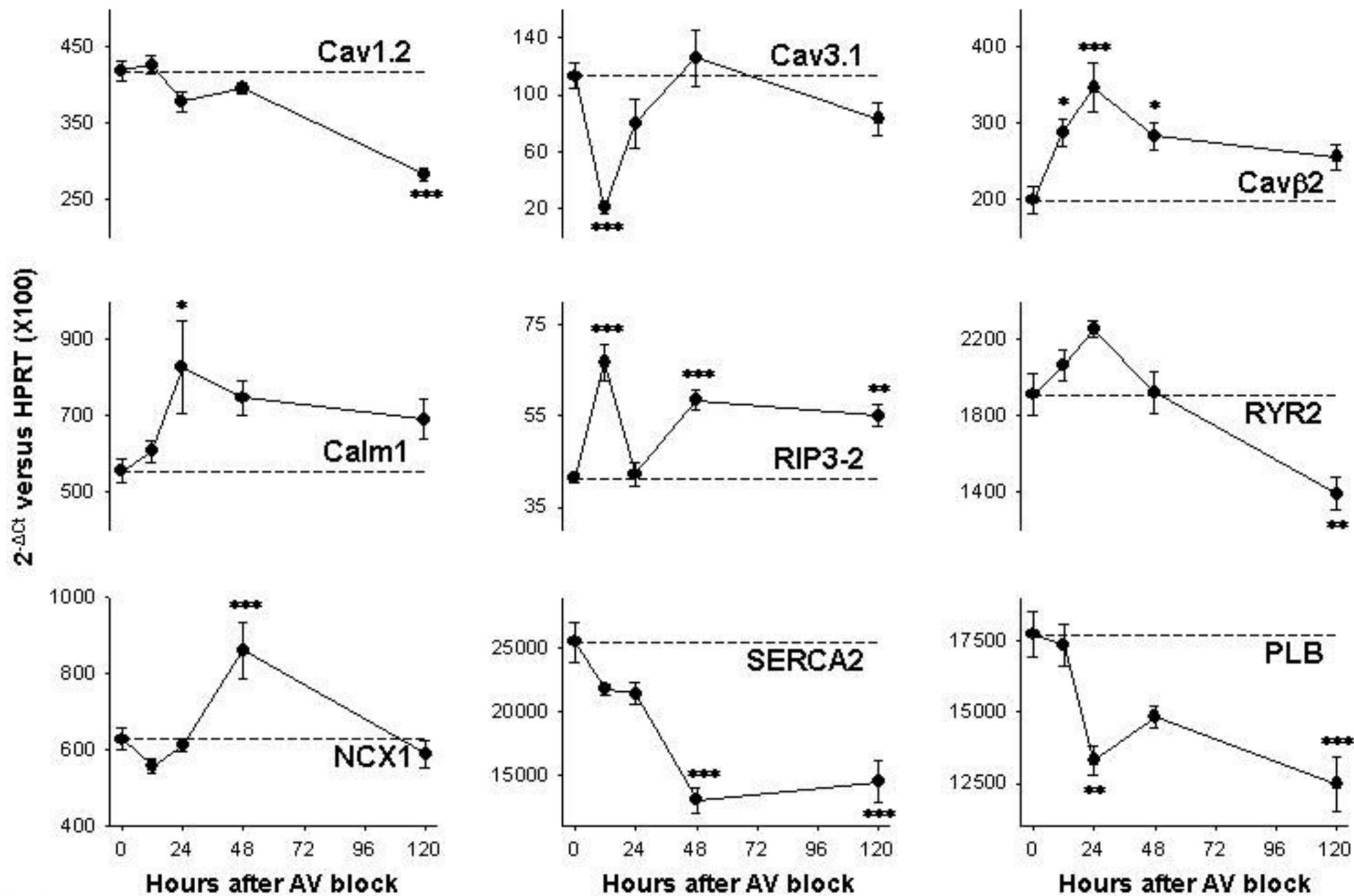


Figure 6

2^{-ΔΔCT} versus HPRT (X100)

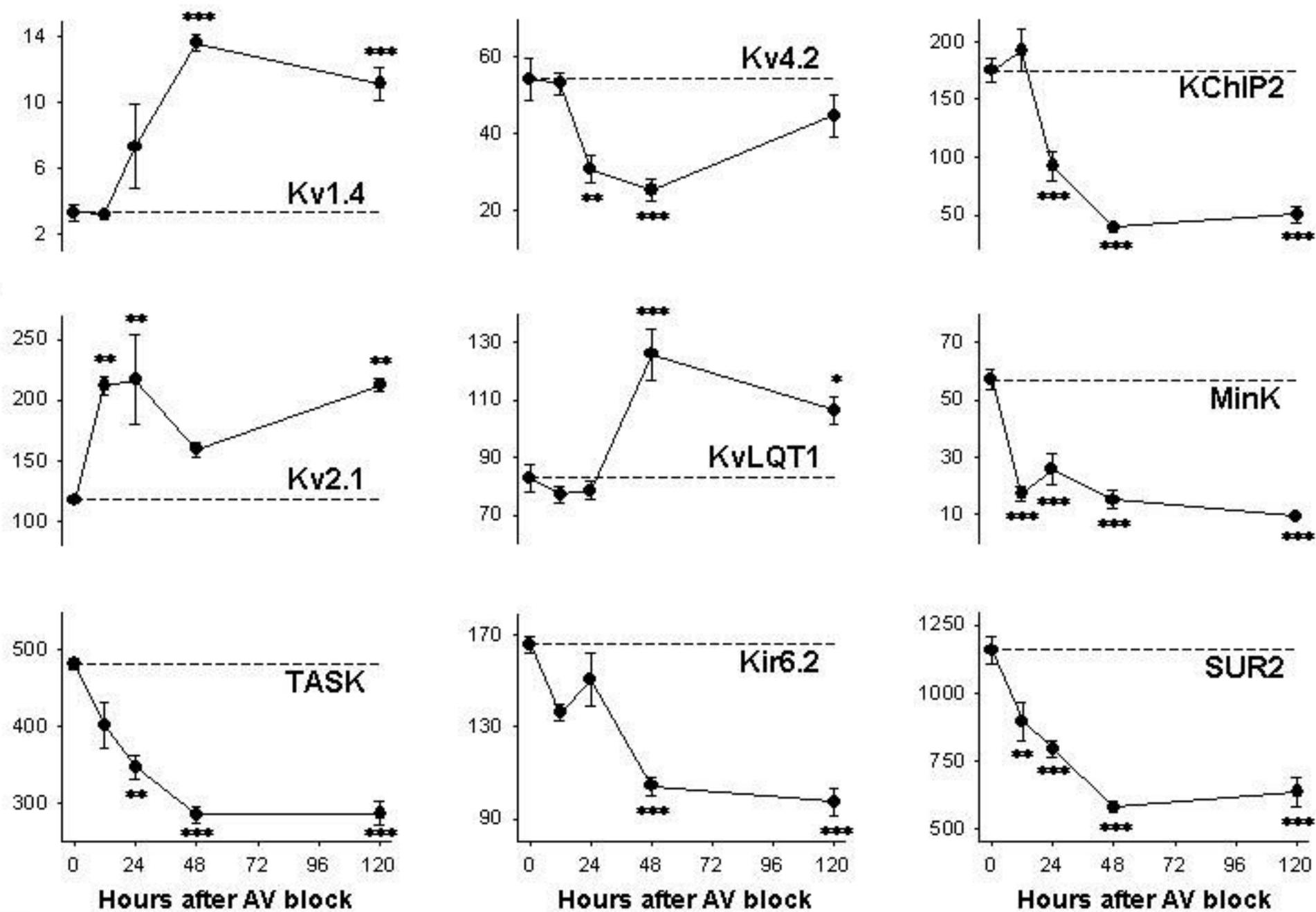


Figure 7

Références bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW et al. MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* 1999; 97(2):175-187.

Accili EA, Robinson RB, DiFrancesco D. Properties and modulation of If in newborn versus adult cardiac SA node. *Am J Physiol* 1997; 272(3 Pt 2):H1549-H1552.

Aellig NC, Balmer C, Dodge-Khatami A, Rahn M, Pretre R, Bauersfeld U. Long-term follow-up after pacemaker implantation in neonates and infants. *Ann Thorac Surg* 2007; 83(4):1420-1423.

Aggarwal SK, MacKinnon R. Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K⁺ channel. *Neuron* 1996; 16(6):1169-1177.

Akiyama T, Fozzard HA. Influence of potassium ions and osmolality on the resting membrane potential of rabbit ventricular papillary muscle with estimation of the activity and the activity coefficient of internal potassium. *Circ Res* 1975; 37(5):621-629.

Altomare C, Bucchi A, Camatini E, Baruscotti M, Viscomi C, Moroni A et al. Integrated allosteric model of voltage gating of HCN channels. *J Gen Physiol* 2001; 117(6):519-532.

Altomare C, Terragni B, Brioschi C, Milanese R, Pagliuca C, Viscomi C et al. Heteromeric HCN1-HCN4 channels: a comparison with native pacemaker channels from the rabbit sinoatrial node. *J Physiol* 2003; 549(Pt 2):347-359.

Angelo K, Jespersen T, Grunnet M, Nielsen MS, Klaerke DA, Olesen SP. KCNE5 induces time- and voltage-dependent modulation of the KCNQ1 current. *Biophys J* 2002; 83(4):1997-2006.

Antzelevitch C, Brugada P, Brugada J, Brugada R, Shimizu W, Gussak I et al. Brugada syndrome: a decade of progress. *Circ Res* 2002; 91(12):1114-1118.

Arinsburg SS, Cohen IS, Yu HG. Constitutively active Src tyrosine kinase changes gating of HCN4 channels through direct binding to the channel proteins. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006; 47(4):578-586.

Armstrong CM. Time course of TEA(+)-induced anomalous rectification in squid giant axons. *J Gen Physiol* 1966; 50(2):491-503.

Armstrong CM. Interaction of tetraethylammonium ion derivatives with the potassium channels of giant axons. *J Gen Physiol* 1971; 58(4):413-437.

Atger VM, de la Llera MM, Stoudt GW, Rodriguez WV, Phillips MC, Rothblat GH. Cyclodextrins as catalysts for the removal of cholesterol from macrophage foam cells. *J Clin Invest* 1997; 99(4):773-780.

- Azene EM, Xue T, Marban E, Tomaselli GF, Li RA. Non-equilibrium behavior of HCN channels: insights into the role of HCN channels in native and engineered pacemakers. *Cardiovasc Res* 2005; 67(2):263-273.
- Baker OS, Larsson HP, Mannuzzu LM, Isacoff EY. Three transmembrane conformations and sequence-dependent displacement of the S4 domain in shaker K⁺ channel gating. *Neuron* 1998; 20(6):1283-1294.
- Balla T. Pharmacology of phosphoinositides, regulators of multiple cellular functions. *Curr Pharm Des* 2001; 7(6):475-507.
- Balla T, Varnai P. Visualizing cellular phosphoinositide pools with GFP-fused protein-modules. *Sci STKE* 2002; 2002(125):L3.
- Barbuti A, Terragni B, Brioschi C, DiFrancesco D. Localization of f-channels to caveolae mediates specific beta2-adrenergic receptor modulation of rate in sinoatrial myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 42(1):71-78.
- Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M, Romey G. K(V)LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature* 1996; 384(6604):78-80.
- Barret C, Roy C, Montcourrier P, Mangeat P, Niggli V. Mutagenesis of the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP(2)) binding site in the NH(2)-terminal domain of ezrin correlates with its altered cellular distribution. *J Cell Biol* 2000; 151(5):1067-1080.
- Bauer A, McDonald AD, Nasir K, Peller L, Rade JJ, Miller JM et al. Inhibitory G protein overexpression provides physiologically relevant heart rate control in persistent atrial fibrillation. *Circulation* 2004; 110(19):3115-3120.
- Baukrowitz T, Schulte U, Oliver D, Herlitz S, Krauter T, Tucker SJ et al. PIP2 and PIP as determinants for ATP inhibition of K_{ATP} channels. *Science* 1998; 282(5391):1141-1144.
- Becq F, Verrier B, Chang XB, Riordan JR, Hanrahan JW. cAMP- and Ca²⁺-independent activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channels by phenylimidazothiazole drugs. *J Biol Chem* 1996; 271(27):16171-16179.
- Belloq C, van Ginneken AC, Bezzina CR, Alders M, Escande D, Mannens MM et al. Mutation in the KCNQ1 gene leading to the short QT-interval syndrome. *Circulation* 2004; 109(20):2394-2397.
- Bendahhou S, Marionneau C, Haurogne K, Larroque MM, Derand R, Szuts V et al. In vitro molecular interactions and distribution of KCNE family with KCNQ1 in the human heart. *Cardiovasc Res* 2005; 67(3):529-538.
- Benson DW. Genetics of atrioventricular conduction disease in humans. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2004; 280(2):934-939.
- Berridge MJ. Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem J* 1984; 220(2):345-360.

- Bessac BF, Fleig A. TRPM7 channel is sensitive to osmotic gradients in human kidney cells. *J Physiol* 2007; 582(Pt 3):1073-1086.
- Bezánilla F. The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev* 2000; 80(2):555-592.
- Bezánilla F. Voltage sensor movements. *J Gen Physiol* 2002; 120(4):465-473.
- Bian J, Cui J, McDonald TV. HERG K(+) channel activity is regulated by changes in phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate. *Circ Res* 2001; 89(12):1168-1176.
- Bogdanov KY, Vinogradova TM, Lakatta EG. Sinoatrial nodal cell ryanodine receptor and Na(+)-Ca(2+) exchanger: molecular partners in pacemaker regulation. *Circ Res* 2001; 88(12):1254-1258.
- Bohn G, Moosmang S, Conrad H, Ludwig A, Hofmann F, Klugbauer N. Expression of T- and L-type calcium channel mRNA in murine sinoatrial node. *FEBS Lett* 2000; 481(1):73-76.
- Boshart M, Weber F, Jahn G, Dorsch-Hasler K, Fleckenstein B, Schaffner W. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* 1985; 41(2):521-530.
- Boyett MR, Honjo H, Kodama I. The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovasc Res* 2000; 47(4):658-687.
- Brown HF, DiFrancesco D, Noble SJ. How does adrenaline accelerate the heart? *Nature* 1979; 280(5719):235-236.
- Brunner M, Kodirov SA, Mitchell GF, Buckett PD, Shibata K, Folco EJ et al. In vivo gene transfer of Kv1.5 normalizes action potential duration and shortens QT interval in mice with long QT phenotype. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285(1):H194-H203.
- Bucchi A, Plotnikov AN, Shlapakova I, Danilo P, Jr., Kryukova Y, Qu J et al. Wild-type and mutant HCN channels in a tandem biological-electronic cardiac pacemaker. *Circulation* 2006; 114(10):992-999.
- Bucchi A, Baruscotti M, Robinson RB, DiFrancesco D. Modulation of rate by autonomic agonists in SAN cells involves changes in diastolic depolarization and the pacemaker current. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 43(1):39-48.
- Busch AE, Varnum MD, North RA, Adelman JP. An amino acid mutation in a potassium channel that prevents inhibition by protein kinase C. *Science* 1992; 255(5052):1705-1707.
- Cai J, Yi FF, Li YH, Yang XC, Song J, Jiang XJ et al. Adenoviral gene transfer of HCN4 creates a genetic pacemaker in pigs with complete atrioventricular block. *Life Sci* 2007; 80(19):1746-1753.
- Calloe K, Nielsen MS, Grunnet M, Schmitt N, Jorgensen NK. KCNQ channels are involved in the regulatory volume decrease response in primary neonatal rat cardiomyocytes. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773(6):764-773.

- Cao F, Lin S, Xie X, Ray P, Patel M, Zhang X et al. In vivo visualization of embryonic stem cell survival, proliferation, and migration after cardiac delivery. *Circulation* 2006; 113(7):1005-1014.
- Catanchin A, Murdock CJ, Athan E. Pacemaker infections: a 10-year experience. *Heart Lung Circ* 2007; 16(6):434-439.
- Cerbai E, Pino R, Porciatti F, Sani G, Toscano M, Maccherini M et al. Characterization of the hyperpolarization-activated current, $I(f)$, in ventricular myocytes from human failing heart. *Circulation* 1997; 95(3):568-571.
- Cerbai E, Sartiani L, DePaoli P, Pino R, Maccherini M, Bizzarri F et al. The properties of the pacemaker current $I(F)$ in human ventricular myocytes are modulated by cardiac disease. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33(3):441-448.
- Cha A, Snyder GE, Selvin PR, Bezanilla F. Atomic scale movement of the voltage-sensing region in a potassium channel measured via spectroscopy. *Nature* 1999; 402(6763):809-813.
- Chen S, Wang J, Siegelbaum SA. Properties of hyperpolarization-activated pacemaker current defined by coassembly of HCN1 and HCN2 subunits and basal modulation by cyclic nucleotide. *J Gen Physiol* 2001; 117(5):491-504.
- Chen YH, Xu SJ, Bendahhou S, Wang XL, Wang Y, Xu WY et al. KCNQ1 gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation. *Science* 2003; 299(5604):251-254.
- Cheng Y, Zhang Y, McCammon JA. How does the cAMP-dependent protein kinase catalyze the phosphorylation reaction: an ab initio QM/MM study. *J Am Chem Soc* 2005; 127(5):1553-1562.
- Cho H, Kim YA, Yoon JY, Lee D, Kim JH, Lee SH et al. Low mobility of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate underlies receptor specificity of Gq-mediated ion channel regulation in atrial myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(42):15241-15246.
- Cho HC, Kashiwakura Y, Marban E. Creation of a biological pacemaker by cell fusion. *Circ Res* 2007; 100(8):1112-1115.
- Chouabe C, Neyroud N, Guicheney P, Lazdunski M, Romey G, Barhanin J. Properties of KvLQT1 K⁺ channel mutations in Romano-Ward and Jervell and Lange-Nielsen inherited cardiac arrhythmias. *EMBO J* 1997; 16(17):5472-5479.
- Chouabe C, Neyroud N, Richard P, Denjoy I, Hainque B, Romey G et al. Novel mutations in KvLQT1 that affect I_{Ks} activation through interactions with Isk. *Cardiovasc Res* 2000; 45(4):971-980.
- Clapham DE. Not so funny anymore: pacing channels are cloned. *Neuron* 1998; 21(1):5-7.
- Clemo HF, Baumgarten CM. Atrial natriuretic factor decreases cell volume of rabbit atrial and ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1991; 260(4 Pt 1):C681-C690.
- Coppolino MG, Dierckman R, Loijens J, Collins RF, Pouladi M, Jongstra-Bilen J et al. Inhibition of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase $I\alpha$ impairs localized actin remodeling and suppresses phagocytosis. *J Biol Chem* 2002; 277(46):43849-43857.

- Csernoch L, Bernengo JC, Szentesi P, Jacquemond V. Measurements of intracellular Mg²⁺ concentration in mouse skeletal muscle fibers with the fluorescent indicator mag-indo-1. *Biophys J* 1998; 75(2):957-967.
- Cukras CA, Jeliaskova I, Nichols CG. Structural and functional determinants of conserved lipid interaction domains of inward rectifying Kir6.2 channels. *J Gen Physiol* 2002; 119(6):581-591.
- Davies J, Spry CJ, Sapsford R, Olsen EG, de Perez G, Oakley CM et al. Cardiovascular features of 11 patients with eosinophilic endomyocardial disease. *Q J Med* 1983; 52(205):23-39.
- Davies MJ. Pathology of chronic A-V Block. *Acta Cardiol* 1976; Suppl 21:19-30.
- Decaffmeyer M, Lins L, Charlotiaux B, VanEyck MH, Thomas A, Brasseur R. Rational design of complementary peptides to the betaAmyloid 29-42 fusion peptide: an application of PepDesign. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1758(3):320-327.
- del Camino D, Yellen G. Tight steric closure at the intracellular activation gate of a voltage-gated K(+) channel. *Neuron* 2001; 32(4):649-656.
- Demolombe S, Baro I, Pereon Y, Bliet J, Mohammad-Panah R, Pollard H et al. A dominant negative isoform of the long QT syndrome 1 gene product. *J Biol Chem* 1998; 273(12):6837-6843.
- DiFrancesco D. Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu Rev Physiol* 1993; 55:455-472.
- DiFrancesco D, Mangoni M. Modulation of single hyperpolarization-activated channels (i(f)) by cAMP in the rabbit sino-atrial node. *J Physiol* 1994; 474(3):473-482.
- DiFrancesco D. Serious workings of the funny current. *Prog Biophys Mol Biol* 2006; 90(1-3):13-25.
- Ding S, Horn R. Slow photo-cross-linking kinetics of benzophenone-labeled voltage sensors of ion channels. *Biochemistry* 2001; 40(35):10707-10716.
- Ding S, Horn R. Tail end of the s6 segment: role in permeation in shaker potassium channels. *J Gen Physiol* 2002; 120(1):87-97.
- Ding WG, Toyoda F, Matsuura H. Regulation of cardiac IKs potassium current by membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem* 2004; 279(49):50726-50734.
- Doevendans PA, Daemen MJ, de Muinck ED, Smits JF. Cardiovascular phenotyping in mice. *Cardiovasc Res* 1998; 39(1):34-49.
- Donger C, Denjoy I, Berthet M, Neyroud N, Cruaud C, Bennaceur M et al. KVLQT1 C-terminal missense mutation causes a forme fruste long-QT syndrome. *Circulation* 1997; 96(9):2778-2781.

- Doyle DA, Morais CJ, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL et al. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 1998; 280(5360):69-77.
- Drewnowska K, Baumgarten CM. Regulation of cellular volume in rabbit ventricular myocytes: bumetanide, chlorothiazide, and ouabain. *Am J Physiol* 1991; 260(1 Pt 1):C122-C131.
- Du X, Zhang H, Lopes C, Mirshahi T, Rohacs T, Logothetis DE. Characteristic interactions with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate determine regulation of kir channels by diverse modulators. *J Biol Chem* 2004; 279(36):37271-37281.
- Ducarme P, Rahman M, Brasseur R. IMPALA: a simple restraint field to simulate the biological membrane in molecular structure studies. *Proteins* 1998; 30(4):357-371.
- Dumaine R, Antzelevitch C. Molecular mechanisms underlying the long QT syndrome. *Curr Opin Cardiol* 2002; 17(1):36-42.
- Eberhard M, Miyagawa K, Hermsmeyer K, Erne P. Effects of mibefradil on intracellular Ca²⁺ release in cultured rat cardiac fibroblasts and human platelets. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1995; 353(1):94-101.
- Edelberg JM, Aird WC, Rosenberg RD. Enhancement of murine cardiac chronotropy by the molecular transfer of the human beta2 adrenergic receptor cDNA. *J Clin Invest* 1998; 101(2):337-343.
- Edelberg JM, Huang DT, Josephson ME, Rosenberg RD. Molecular enhancement of porcine cardiac chronotropy. *Heart* 2001; 86(5):559-562.
- Ekblad L, Jergil B. Localization of phosphatidylinositol 4-kinase isoenzymes in rat liver plasma membrane domains. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1531(3):209-221.
- Elinder F, Mannikko R, Pandey S, Larsson HP. Mode shifts in the voltage gating of the mouse and human HCN2 and HCN4 channels. *J Physiol* 2006; 575(Pt 2):417-431.
- Elmqvist R. Review of early pacemaker development. *Pacing Clin Electrophysiol* 1978; 1(4):535-536.
- Enkvetchakul D, Loussouarn G, Makhina E, Shyng SL, Nichols CG. The kinetic and physical basis of K(ATP) channel gating: toward a unified molecular understanding. *Biophys J* 2000; 78(5):2334-2348.
- Ennis IL, Li RA, Murphy AM, Marban E, Nuss HB. Dual gene therapy with SERCA1 and Kir2.1 abbreviates excitation without suppressing contractility. *J Clin Invest* 2002; 109(3):393-400.
- Epand RF, Thomas A, Brasseur R, Vishwanathan SA, Hunter E, Epand RM. Juxtamembrane protein segments that contribute to recruitment of cholesterol into domains. *Biochemistry* 2006; 45(19):6105-6114.
- Er F, Larbig R, Ludwig A, Biel M, Hofmann F, Beuckelmann DJ et al. Dominant-negative suppression of HCN channels markedly reduces the native pacemaker current I(f) and

undermines spontaneous beating of neonatal cardiomyocytes. *Circulation* 2003; 107(3):485-489.

Fernandez D, Ghanta A, Kauffman GW, Sanguinetti MC. Physicochemical features of the HERG channel drug binding site. *J Biol Chem* 2004; 279(11):10120-10127.

Fisher RS, Spring KR. Intracellular activities during volume regulation by *Necturus* gallbladder. *J Membr Biol* 1984; 78(3):187-199.

Fodstad H, Swan H, Laitinen P, Piippo K, Paavonen K, Viitasalo M et al. Four potassium channel mutations account for 73% of the genetic spectrum underlying long-QT syndrome (LQTS) and provide evidence for a strong founder effect in Finland. *Ann Med* 2004; 36 Suppl 1:53-63.

Ford LE, Campbell NP. Effect of myocardial shortening velocity on duration of electrical and mechanical systole. S2T interval as measure of shortening rate. *Br Heart J* 1980; 44(2):179-183.

Franqueza L, Lin M, Shen J, Splawski I, Keating MT, Sanguinetti MC. Long QT syndrome-associated mutations in the S4-S5 linker of KvLQT1 potassium channels modify gating and interaction with minK subunits. *J Biol Chem* 1999; 274(30):21063-21070.

Franz MR, Burkhoff D, Yue DT, Sagawa K. Mechanically induced action potential changes and arrhythmia in isolated and in situ canine hearts. *Cardiovasc Res* 1989; 23(3):213-223.

Franz MR. Mechano-electrical feedback in ventricular myocardium. *Cardiovasc Res* 1996; 32(1):15-24.

Furman S, Robinson G. The use of an intracardiac pacemaker in the correction of total heart block. *Surg Forum* 1958; 9:245-248.

Gambhir A, Hangyas-Mihalyne G, Zaitseva I, Cafiso DS, Wang J, Murray D et al. Electrostatic sequestration of PIP₂ on phospholipid membranes by basic/aromatic regions of proteins. *Biophys J* 2004; 86(4):2188-2207.

Gamper N, Li Y, Shapiro MS. Structural requirements for differential sensitivity of KCNQ K⁺ channels to modulation by Ca²⁺/calmodulin. *Mol Biol Cell* 2005; 16(8):3538-3551.

Gamper N, Shapiro MS. Target-specific PIP(2) signalling: how might it work? *J Physiol* 2007; 582(Pt 3):967-975.

Garcia-Dorado D, Oliveras J. Myocardial oedema: a preventable cause of reperfusion injury? *Cardiovasc Res* 1993; 27(9):1555-1563.

Gonzalez C, Morera FJ, Rosenmann E, Alvarez O, Latorre R. S3b amino acid residues do not shuttle across the bilayer in voltage-dependent Shaker K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(14):5020-5025.

Graf EM, Heubach JF, Ravens U. The hyperpolarization-activated current I_f in ventricular myocytes of non-transgenic and beta2-adrenoceptor overexpressing mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2001; 364(2):131-139.

- Greger R. Ion transport mechanisms in thick ascending limb of Henle's loop of mammalian nephron. *Physiol Rev* 1985; 65(3):760-797.
- Groh WJ, Gibson KJ, Maylie JG. Hypotonic-induced stretch counteracts the efficacy of the class III antiarrhythmic agent E-4031 in guinea pig myocytes. *Cardiovasc Res* 1996; 31(2):237-245.
- Grunnet M, Jespersen T, Rasmussen HB, Ljungstrom T, Jorgensen NK, Olesen SP et al. KCNE4 is an inhibitory subunit to the KCNQ1 channel. *J Physiol* 2002; 542(Pt 1):119-130.
- Grunnet M, Jespersen T, MacAulay N, Jorgensen NK, Schmitt N, Pongs O et al. KCNQ1 channels sense small changes in cell volume. *J Physiol* 2003; 549(Pt 2):419-427.
- Grunnet M, Olesen SP, Klaerke DA, Jespersen T. hKCNE4 inhibits the hKCNQ1 potassium current without affecting the activation kinetics. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328(4):1146-1153.
- Guo J, Ono K, Noma A. A sustained inward current activated at the diastolic potential range in rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol* 1995; 483 (Pt 1):1-13.
- Guo J, Mitsuiye T, Noma A. The sustained inward current in sino-atrial node cells of guinea-pig heart. *Pflugers Arch* 1997; 433(4):390-396.
- Gupta RK, Gupta P, Moore RD. NMR studies of intracellular metal ions in intact cells and tissues. *Annu Rev Biophys Bioeng* 1984; 13:221-246.
- Gussak I, Brugada P, Brugada J, Wright RS, Kopecky SL, Chaitman BR et al. Idiopathic short QT interval: a new clinical syndrome? *Cardiology* 2000; 94(2):99-102.
- 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.
- Hamill OP. Twenty odd years of stretch-sensitive channels. *Pflugers Arch* 2006; 453(3):333-351.
- Hartwig JH, Bokoch GM, Carpenter CL, Janmey PA, Taylor LA, Toker A et al. Thrombin receptor ligation and activated Rac uncap actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human platelets. *Cell* 1995; 82(4):643-653.
- Hartzell HC. Regulation of cardiac ion channels by catecholamines, acetylcholine and second messenger systems. *Prog Biophys Mol Biol* 1988; 52(3):165-247.
- Heginbotham L, Lu Z, Abramson T, MacKinnon R. Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys J* 1994; 66(4):1061-1067.
- Heilmeyer LM, Jr., Vereb G, Jr., Vereb G, Kakuk A, Szivak I. Mammalian phosphatidylinositol 4-kinases. *IUBMB Life* 2003; 55(2):59-65.
- Hejtmancik MR, Herrmann GR, Shields AH, Wright JC. A clinical study of complete heart block. *Am Heart J* 1956; 52(3):369-378.

- Herrmann S, Stieber J, Hofmann F, Ludwig A. Temporally controlled deletion of the pacemaker channel HCN4 in the sinoatrial node. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2006; 372:313, Résumé non publié.
- Hermesmeyer K, Rulon R, Sperelakis N. Loss of the plateau of the cardiac action potential in hypertonic solutions. *J Gen Physiol* 1972; 59(6):779-793.
- Hernandez C.C., Zaika O., Tolstykh G., Shapiro M. S. Molecular Modeling and Binding of PIP2 to Kv7 K⁺ Channels. Résumé congrès : Biophysical Society 2008, Page Number in Print Abstract Issue: 282, Presentation Number: 1386-Pos.
- Heubach JF, Graf EM, Leutheuser J, Bock M, Balana B, Zahanich I et al. Electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells. *J Physiol* 2004; 554(Pt 3):659-672.
- Hilgemann DW, Ball R. Regulation of cardiac Na⁺,Ca²⁺ exchange and KATP potassium channels by PIP2. *Science* 1996; 273(5277):956-959.
- Hilgemann DW, Feng S, Nasuhoglu C. The complex and intriguing lives of PIP2 with ion channels and transporters. *Sci STKE* 2001; 2001(111):RE19.
- Hirahara K, Matsubayashi T, Matsuura H, Ehara T. Intracellular Mg²⁺ depletion depresses the delayed rectifier K⁺ current in guinea pig ventricular myocytes. *Jpn J Physiol* 1998; 48(1):81-89.
- Hirao M, Sato N, Kondo T, Yonemura S, Monden M, Sasaki T et al. Regulation mechanism of ERM (ezrin/radixin/moesin) protein/plasma membrane association: possible involvement of phosphatidylinositol turnover and Rho-dependent signaling pathway. *J Cell Biol* 1996; 135(1):37-51.
- Hirose K, Kadowaki S, Tanabe M, Takeshima H, Iino M. Spatiotemporal dynamics of inositol 1,4,5-trisphosphate that underlies complex Ca²⁺ mobilization patterns. *Science* 1999; 284(5419):1527-1530.
- Hodgkin AL, Huxley AF, Katz B. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* 1952; 116(4):424-448.
- Hoffmann EK, Simonsen LO. Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells. *Physiol Rev* 1989; 69(2):315-382.
- Hofman-Bang J, Jespersen T, Grunnet M, Larsen LA, Andersen PS, Kanters JK et al. Does KCNE5 play a role in long QT syndrome? *Clin Chim Acta* 2004; 345(1-2):49-53.
- Hong K, Piper DR, Diaz-Valdecantos A, Brugada J, Oliva A, Burashnikov E et al. De novo KCNQ1 mutation responsible for atrial fibrillation and short QT syndrome in utero. *Cardiovasc Res* 2005; 68(3):433-440.
- Horn R, Ding S, Gruber HJ. Immobilizing the moving parts of voltage-gated ion channels. *J Gen Physiol* 2000; 116(3):461-476.
- Huang CL, Feng S, Hilgemann DW. Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP2 and its stabilization by Gbetagamma. *Nature* 1998; 391(6669):803-806.

- Huang X, Yang P, Du Y, Zhang J, Ma A. Age-related down-regulation of HCN channels in rat sinoatrial node. *Basic Res Cardiol* 2007; 102(5):429-435.
- Hughes S, Marsh SJ, Tinker A, Brown DA. PIP(2)-dependent inhibition of M-type (Kv7.2/7.3) potassium channels: direct on-line assessment of PIP(2) depletion by Gq-coupled receptors in single living neurons. *Pflugers Arch* 2007.
- Hurley JH, Meyer T. Subcellular targeting by membrane lipids. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13(2):146-152.
- Huser J, Blatter LA, Lipsius SL. Intracellular Ca²⁺ release contributes to automaticity in cat atrial pacemaker cells. *J Physiol* 2000; 524 Pt 2:415-422.
- Irisawa H, Brown HF, Giles W. Cardiac pacemaking in the sinoatrial node. *Physiol Rev* 1993; 73(1):197-227.
- Ishii TM, Takano M, Xie LH, Noma A, Ohmori H. Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. *J Biol Chem* 1999; 274(18):12835-12839.
- Itoh T, Koshiba S, Kigawa T, Kikuchi A, Yokoyama S, Takenawa T. Role of the ENTH domain in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding and endocytosis. *Science* 2001; 291(5506):1047-1051.
- Jackson PS, Strange K. Volume-sensitive anion channels mediate swelling-activated inositol and taurine efflux. *Am J Physiol* 1993; 265(6 Pt 1):C1489-C1500.
- Janmey PA, Lindberg U. Cytoskeletal regulation: rich in lipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5(8):658-666.
- Janse MJ, Wit AL. Electrophysiological mechanisms of ventricular arrhythmias resulting from myocardial ischemia and infarction. *Physiol Rev* 1989; 69(4):1049-1169.
- Janse MK, Anderson RH, van Capelle FJ, Durrer D. A combined electrophysiological and anatomical study of the human fetal heart. *Am Heart J* 1976; 91(5):556-562.
- Jennings RB, Reimer KA, Steenbergen C. Myocardial ischemia revisited. The osmolar load, membrane damage, and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 1986; 18(8):769-780.
- Jensen HS, Callo K, Jespersen T, Jensen BS, Olesen SP. The KCNQ5 potassium channel from mouse: a broadly expressed M-current like potassium channel modulated by zinc, pH, and volume changes. *Brain Res Mol Brain Res* 2005; 139(1):52-62.
- Jervell A, Lange-Nielsen F. Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval and sudden death. *Am Heart J* 1957; 54(1):59-68.
- Jespersen T, Rasmussen HB, Grunnet M, Jensen HS, Angelo K, Dupuis DS et al. Basolateral localisation of KCNQ1 potassium channels in MDCK cells: molecular identification of an N-terminal targeting motif. *J Cell Sci* 2004; 117(Pt 19):4517-4526.
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Ruta V, Cadene M, Chait BT et al. X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 2003; 423(6935):33-41.

- Jiang Y, Ruta V, Chen J, Lee A, MacKinnon R. The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 2003; 423(6935):42-48.
- Jo SH, Leblais V, Wang PH, Crow MT, Xiao RP. Phosphatidylinositol 3-kinase functionally compartmentalizes the concurrent G(s) signaling during beta2-adrenergic stimulation. *Circ Res* 2002; 91(1):46-53.
- Johns DC, Nuss HB, Chiamvimonvat N, Ramza BM, Marban E, Lawrence JH. Adenovirus-mediated expression of a voltage-gated potassium channel in vitro (rat cardiac myocytes) and in vivo (rat liver). A novel strategy for modifying excitability. *J Clin Invest* 1995; 96(2):1152-1158.
- Kabanov A, Zhu J, Alakhov V. Pluronic block copolymers for gene delivery. *Adv Genet* 2005; 53:231-261.
- Kashiwakura Y, Cho HC, Barth AS, Azene E, Marban E. Gene transfer of a synthetic pacemaker channel into the heart: a novel strategy for biological pacing. *Circulation* 2006; 114(16):1682-1686.
- Kathofer S, Rockl K, Zhang W, Thomas D, Katus H, Kiehn J et al. Human beta(3)-adrenoreceptors couple to KvLQT1/MinK potassium channels in *Xenopus* oocytes via protein kinase C phosphorylation of the KvLQT1 protein. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2003; 368(2):119-126.
- Kaufmann RL, Lab MJ, Hennekes R, Krause H. Feedback interaction of mechanical and electrical events in the isolated mammalian ventricular myocardium (cat papillary muscle). *Pflugers Arch* 1971; 324(2):100-123.
- Kehat I, Khimovich L, Caspi O, Gepstein A, Shofti R, Arbel G et al. Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2004; 22(10):1282-1289.
- Kirk K, Ellory JC, Young JD. Transport of organic substrates via a volume-activated channel. *J Biol Chem* 1992; 267(33):23475-23478.
- Kiseleva I, Kamkin A, Wagner KD, Theres H, Ladhoff A, Scholz H et al. Mechanoelectric feedback after left ventricular infarction in rats. *Cardiovasc Res* 2000; 45(2):370-378.
- Kléber AG, Janse MJ, Fats VG. Normal and abnormal conduction in the heart. In: *Handbook of physiology. Section 2, The Cardiovascular system. Volume 1, The heart.* Oxford university press. 2001; 455-570.
- Kloda A, Lua L, Hall R, Adams DJ, Martinac B. Liposome reconstitution and modulation of recombinant N-methyl-D-aspartate receptor channels by membrane stretch. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(5):1540-1545.
- Kocic I, Hirano Y, Hiraoka M. Ionic basis for membrane potential changes induced by hypoosmotic stress in guinea-pig ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 2001; 51(1):59-70.
- Koschak A, Reimer D, Huber I, Grabner M, Glossmann H, Engel J et al. alpha 1D (Cav1.3) subunits can form l-type Ca²⁺ channels activating at negative voltages. *J Biol Chem* 2001; 276(25):22100-22106.

- Kozak JA, Matsushita M, Nairn AC, Cahalan MD. Charge screening by internal pH and polyvalent cations as a mechanism for activation, inhibition, and rundown of TRPM7/MIC channels. *J Gen Physiol* 2005; 126(5):499-514.
- Kubota T, Horie M, Takano M, Yoshida H, Otani H, Sasayama S. Role of KCNQ1 in the cell swelling-induced enhancement of the slowly activating delayed rectifier K(+) current. *Jpn J Physiol* 2002; 52(1):31-39.
- Kurata Y, Matsuda H, Hisatome I, Shibamoto T. Effects of pacemaker currents on creation and modulation of human ventricular pacemaker: theoretical study with application to biological pacemaker engineering. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292(1):H701-H718.
- Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T et al. Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997; 390(6655):45-51.
- Kurokawa J, Motoike HK, Kass RS. TEA(+)-sensitive KCNQ1 constructs reveal pore-independent access to KCNE1 in assembled I(Ks) channels. *J Gen Physiol* 2001; 117(1):43-52.
- Kurokawa J, Motoike HK, Rao J, Kass RS. Regulatory actions of the A-kinase anchoring protein Yotiao on a heart potassium channel downstream of PKA phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(46):16374-16378.
- Lab MJ. Mechanoelectric feedback (transduction) in heart: concepts and implications. *Cardiovasc Res* 1996; 32(1):3-14.
- Lamas GA, Lee KL, Sweeney MO, Silverman R, Leon A, Yee R et al. Ventricular pacing or dual-chamber pacing for sinus-node dysfunction. *N Engl J Med* 2002; 346(24):1854-1862.
- Lan WZ, Wang PY, Hill CE. Modulation of hepatocellular swelling-activated K⁺ currents by phosphoinositide pathway-dependent protein kinase C. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 291(1):C93-103.
- Lang F, Busch GL, Ritter M, Volkl H, Waldegger S, Gulbins E et al. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev* 1998; 78(1):247-306.
- Larsen TH, Dalen H, Boyle R, Souza MM, Lieberman M. Cytoskeletal involvement during hypo-osmotic swelling and volume regulation in cultured chick cardiac myocytes. *Histochem Cell Biol* 2000; 113(6):479-488.
- Lassing I, Lindberg U. Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin. *Nature* 1985; 314(6010):472-474.
- Lee MP, Hu RJ, Johnson LA, Feinberg AP. Human KVLQT1 gene shows tissue-specific imprinting and encompasses Beckwith-Wiedemann syndrome chromosomal rearrangements. *Nat Genet* 1997; 15(2):181-185.
- Lemmon MA, Ferguson KM. Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem J* 2000; 350 Pt 1:1-18.
- Lemmon MA. Phosphoinositide recognition domains. *Traffic* 2003; 4(4):201-213.

- Lenegre J, Moreau P. Chronic auriculo-ventricular block. Anatomical, clinical and histological study. *Arch Mal Coeur Vaiss* 1963; 56:867-888.
- Lentz BR, Lee JK. Poly(ethylene glycol) (PEG)-mediated fusion between pure lipid bilayers: a mechanism in common with viral fusion and secretory vesicle release? *Mol Membr Biol* 1999; 16(4):279-296.
- Lerman BB, Engelstein ED, Burkhoff D. Mechanoelectrical feedback: role of beta-adrenergic receptor activation in mediating load-dependent shortening of ventricular action potential and refractoriness. *Circulation* 2001; 104(4):486-490.
- Lev M. The normal anatomy of the conduction system in man and its pathology in atrioventricular block. *Ann N Y Acad Sci* 1964; 111:817-829.
- Levine TP, Munro S. Targeting of Golgi-specific pleckstrin homology domains involves both PtdIns 4-kinase-dependent and -independent components. *Curr Biol* 2002; 12(9):695-704.
- Li-Smerin Y, Hackos DH, Swartz KJ. A localized interaction surface for voltage-sensing domains on the pore domain of a K⁺ channel. *Neuron* 2000; 25(2):411-423.
- Li Y, Gamper N, Shapiro MS. Single-channel analysis of KCNQ K⁺ channels reveals the mechanism of augmentation by a cysteine-modifying reagent. *J Neurosci* 2004; 24(22):5079-5090.
- Li Y, Gamper N, Hilgemann DW, Shapiro MS. Regulation of Kv7 (KCNQ) K⁺ channel open probability by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Neurosci* 2005; 25(43):9825-9835.
- Liaw J, Lin Y. Evaluation of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) (PEO-PPO-PEO) gels as a release vehicle for percutaneous fentanyl. *J Control Release* 2000; 68(2):273-282.
- Liggett SB, Tepe NM, Lorenz JN, Canning AM, Jantz TD, Mitarai S et al. Early and delayed consequences of beta(2)-adrenergic receptor overexpression in mouse hearts: critical role for expression level. *Circulation* 2000; 101(14):1707-1714.
- Lim CH, Schoonderwoerd K, Kleijer WJ, de Jonge HR, Tilly BC. Regulation of the cell swelling-activated chloride conductance by cholesterol-rich membrane domains. *Acta Physiol (Oxf)* 2006; 187(1-2):295-303.
- Lin G, Cai J, Jiang H, Shen H, Jiang X, Yu Q et al. Biological pacemaker created by fetal cardiomyocyte transplantation. *J Biomed Sci* 2005; 12(3):513-519.
- Ling K, Doughman RL, Firestone AJ, Bunce MW, Anderson RA. Type I gamma phosphatidylinositol phosphate kinase targets and regulates focal adhesions. *Nature* 2002; 420(6911):89-93.
- Lins L, Charlotheaux B, Heinen C, Thomas A, Brasseur R. "De novo" design of peptides with specific lipid-binding properties. *Biophys J* 2006; 90(2):470-479.
- Liou HH, Zhou SS, Huang CL. Regulation of ROMK1 channel by protein kinase A via a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(10):5820-5825.

- 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):267-279.
- 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):729-738.
- Liu J, Zuo X, Yue P, Guo W. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate mediates the targeting of the exocyst to the plasma membrane for exocytosis in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 2007; 18(11):4483-4492.
- Liu Y, Holmgren M, Jurman ME, Yellen G. Gated access to the pore of a voltage-dependent K⁺ channel. *Neuron* 1997; 19(1):175-184.
- Liu Y, Casey L, Pike LJ. Compartmentalization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in low-density membrane domains in the absence of caveolin. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 245(3):684-690.
- Lock H, Valverde MA. Contribution of the Isk (MinK) potassium channel subunit to regulatory volume decrease in murine tracheal epithelial cells. *J Biol Chem* 2000; 275(45):34849-34852.
- Logothetis DE, Lupyan D, Rosenhouse-Dantsker A. Diverse Kir modulators act in close proximity to residues implicated in phosphoinositide binding. *J Physiol* 2007; 582(Pt 3):953-965.
- London RE. Methods for measurement of intracellular magnesium: NMR and fluorescence. *Annu Rev Physiol* 1991; 53:241-258.
- Long SB, Campbell EB, MacKinnon R. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* 2005; 309(5736):897-903.
- Lopes CM, Zhang H, Rohacs T, Jin T, Yang J, Logothetis DE. Alterations in conserved Kir channel-PIP2 interactions underlie channelopathies. *Neuron* 2002; 34(6):933-944.
- Loussouarn G, Pike LJ, Ashcroft FM, Makhina EN, Nichols CG. Dynamic sensitivity of ATP-sensitive K(+) channels to ATP. *J Biol Chem* 2001; 276(31):29098-29103.
- Loussouarn G, Rose T, Nichols CG. Structural basis of inward rectifying potassium channel gating. *Trends Cardiovasc Med* 2002; 12(6):253-258.
- Loussouarn G, Park KH, Bellocq C, Baro I, Charpentier F, Escande D. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PIP2, controls KCNQ1/KCNE1 voltage-gated potassium channels: a functional homology between voltage-gated and inward rectifier K⁺ channels. *EMBO J* 2003; 22(20):5412-5421.
- Lu Z, Klem AM, Ramu Y. Ion conduction pore is conserved among potassium channels. *Nature* 2001; 413(6858):809-813.
- Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F, Biel M. A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* 1998; 393(6685):587-591.

Ludwig A, Zong X, Stieber J, Hullin R, Hofmann F, Biel M. Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *EMBO J* 1999; 18(9):2323-2329.

Ludwig A, Budde T, Stieber J, Moosmang S, Wahl C, Holthoff K et al. Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2. *EMBO J* 2003; 22(2):216-224.

Lupoglazoff JM, Denjoy I, Neyroud N, Guicheney P, Casasoprana A, Coumel P. [Congenital long QT syndrome]. *Presse Med* 1998; 27(21):1029-1034.

Ma YC, Huang XY. Novel regulation and function of Src tyrosine kinase. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59(3):456-462.

MacKinnon R. Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* 1991; 350(6315):232-235.

Macri V, Accili EA. Structural elements of instantaneous and slow gating in hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *J Biol Chem* 2004; 279(16):16832-16846.

Maier SK, Westenbroek RE, Yamanushi TT, Dobrzynski H, Boyett MR, Catterall WA et al. An unexpected requirement for brain-type sodium channels for control of heart rate in the mouse sinoatrial node. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(6):3507-3512.

Maltsev VA, Vinogradova TM, Lakatta EG. The emergence of a general theory of the initiation and strength of the heartbeat. *J Pharmacol Sci* 2006; 100(5):338-369.

Mangoni ME, Nargeot J. Properties of the hyperpolarization-activated current (I_f) in isolated mouse sino-atrial cells. *Cardiovasc Res* 2001; 52(1):51-64.

Mangoni ME, Couette B, Bourinet E, Platzer J, Reimer D, Striessnig J et al. Functional role of L-type Cav1.3 Ca²⁺ channels in cardiac pacemaker activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(9):5543-5548.

Mangoni ME, Traboulsie A, Leoni AL, Couette B, Marger L, Le Quang K et al. Bradycardia and slowing of the atrioventricular conduction in mice lacking Ca_v3.1/α1G T-type calcium channels. *Circ Res* 2006; 98(11):1422-1430.

Mangrum JM, DiMarco JP. The evaluation and management of bradycardia. *N Engl J Med* 2000; 342(10):703-709.

Mannikko R, Pandey S, Larsson HP, Elinder F. Hysteresis in the voltage dependence of HCN channels: conversion between two modes affects pacemaker properties. *J Gen Physiol* 2005; 125(3):305-326.

Mark MD, Herlitz S. G-protein mediated gating of inward-rectifier K⁺ channels. *Eur J Biochem* 2000; 267(19):5830-5836.

Marx SO, Kurokawa J, Reiken S, Motoike H, D'Armiento J, Marks AR et al. Requirement of a macromolecular signaling complex for beta adrenergic receptor modulation of the KCNQ1-KCNE1 potassium channel. *Science* 2002; 295(5554):496-499.

- Maskarinec SA, Hannig J, Lee RC, Lee KY. Direct observation of poloxamer 188 insertion into lipid monolayers. *Biophys J* 2002; 82(3):1453-1459.
- Matsuura H, Ehara T, Ding WG, Omatsu-Kanbe M, Isono T. Rapidly and slowly activating components of delayed rectifier K(+) current in guinea-pig sino-atrial node pacemaker cells. *J Physiol* 2002; 540(Pt 3):815-830.
- Mazhari R, Nuss HB, Aroundas AA, Winslow RL, Marban E. Ectopic expression of KCNE3 accelerates cardiac repolarization and abbreviates the QT interval. *J Clin Invest* 2002; 109(8):1083-1090.
- McCormack K, Tanouye MA, Iverson LE, Lin JW, Ramaswami M, McCormack T et al. A role for hydrophobic residues in the voltage-dependent gating of Shaker K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(7):2931-2935.
- McLaughlin S, Wang J, Gambhir A, Murray D. PIP(2) and proteins: interactions, organization, and information flow. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2002; 31:151-175.
- McLaughlin S, Murray D. Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. *Nature* 2005; 438(7068):605-611.
- Meijler FL, Janse MJ. Morphology and electrophysiology of the mammalian atrioventricular node. *Physiol Rev* 1988; 68(2):608-647.
- Melman YF, Um SY, Krumerman A, Kagan A, McDonald TV. KCNE1 binds to the KCNQ1 pore to regulate potassium channel activity. *Neuron* 2004; 42(6):927-937.
- Miake J, Marban E, Nuss HB. Biological pacemaker created by gene transfer. *Nature* 2002; 419(6903):132-133.
- Michels G, Er F, Khan I, Sudkamp M, Herzig S, Hoppe UC. Single-channel properties support a potential contribution of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels and I_f to cardiac arrhythmias. *Circulation* 2005; 111(4):399-404.
- 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):151-157.
- Milano CA, Allen LF, Rockman HA, Dolber PC, McMinn TR, Chien KR et al. Enhanced myocardial function in transgenic mice overexpressing the beta 2-adrenergic receptor. *Science* 1994; 264(5158):582-586.
- Miquerol L, Meysen S, Mangoni M, Bois P, van Rijen HV, Abran P et al. Architectural and functional asymmetry of the His-Purkinje system of the murine heart. *Cardiovasc Res* 2004; 63(1):77-86.
- Missan S, Linsdell P, McDonald TF. Role of kinases and G-proteins in the hyposmotic stimulation of cardiac IKs. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1758(10):1641-1652.
- Mitsuiye T, Shinagawa Y, Noma A. Sustained inward current during pacemaker depolarization in mammalian sinoatrial node cells. *Circ Res* 2000; 87(2):88-91.

- Mohler PJ, Schott JJ, Gramolini AO, Dilly KW, Guatimosim S, duBell WH et al. Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature* 2003; 421(6923):634-639.
- Moosmang S, Stieber J, Zong X, Biel M, Hofmann F, Ludwig A. Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *Eur J Biochem* 2001; 268(6):1646-1652.
- Morelle B, Salmon JM, Vigo J, Viallet P. Are intracellular ionic concentrations accessible using fluorescent probes? The example of Mag-indo-1. *Cell Biol Toxicol* 1994; 10(5-6):339-344.
- Nadler MJ, Hermosura MC, Inabe K, Perraud AL, Zhu Q, Stokes AJ et al. LTRPC7 is a Mg.ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. *Nature* 2001; 411(6837):590-595.
- Nasuhoglu C, Feng S, Mao J, Yamamoto M, Yin HL, Earnest S et al. Nonradioactive analysis of phosphatidylinositides and other anionic phospholipids by anion-exchange high-performance liquid chromatography with suppressed conductivity detection. *Anal Biochem* 2002; 301(2):243-254.
- Nazir SA, Lab MJ. Mechanoelectric feedback in the atrium of the isolated guinea-pig heart. *Cardiovasc Res* 1996; 32(1):112-119.
- 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):944-956.
- Neyroud N, Richard P, Vignier N, Donger C, Denjoy I, Demay L et al. Genomic organization of the KCNQ1 K⁺ channel gene and identification of C-terminal mutations in the long-QT syndrome. *Circ Res* 1999; 84(3):290-297.
- Nicolas CS, Parka KH, El Harchi A, Camonis J, Kass RS, Escande D, Mérot J, Loussouarn G, Le Bouffant F, Baró I. IKs response to PKA-dependent KCNQ1 phosphorylation requires direct interaction with microtubules. *En préparation*
- Niu P, Huang CX, Zhao YQ, Yang B, Zhao QY, Wang T et al. [Recombinant plasmid pIRES2-EGFP-HCN2 improved pacing function in canine model of sick sinus syndrome]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* 2006; 34(12):1126-1130.
- Niwa N, Yasui K, Opthof T, Takemura H, Shimizu A, Horiba M et al. 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. The surprising heart: a review of recent progress in cardiac electrophysiology. *J Physiol* 1984; 353:1-50.
- Noda M, Shimizu S, Tanabe T, Takai T, Kayano T, Ikeda T et al. Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 1984; 312(5990):121-127.

- Nof E, Luria D, Brass D, Marek D, Lahat H, Reznik-Wolf H et al. 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):463-470.
- Nuss HB, Johns DC, Kaab S, Tomaselli GF, Kass D, Lawrence JH et al. Reversal of potassium channel deficiency in cells from failing hearts by adenoviral gene transfer: a prototype for gene therapy for disorders of cardiac excitability and contractility. *Gene Ther* 1996; 3(10):900-912.
- Nuss HB, Marban E, Johns DC. Overexpression of a human potassium channel suppresses cardiac hyperexcitability in rabbit ventricular myocytes. *J Clin Invest* 1999; 103(6):889-896.
- Oliver D, Lien CC, Soom M, Baukowitz T, Jonas P, Fakler B. Functional conversion between A-type and delayed rectifier K⁺ channels by membrane lipids. *Science* 2004; 304(5668):265-270.
- Otway R, Vandenberg JI, Guo G, Varghese A, Castro ML, Liu J et al. Stretch-sensitive KCNQ1 mutation A link between genetic and environmental factors in the pathogenesis of atrial fibrillation? *J Am Coll Cardiol* 2007; 49(5):578-586.
- Panaghie G, Abbott GW. The role of S4 charges in voltage-dependent and voltage-independent KCNQ1 potassium channel complexes. *J Gen Physiol* 2007; 129(2):121-133.
- Papadatos GA, Wallerstein PM, Head CE, Ratcliff R, Brady PA, Benndorf K et al. 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):6210-6215.
- 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):749-753.
- Pape HC. Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu Rev Physiol* 1996; 58:299-327.
- Park KH, Piron J, Dahimene S, Merot J, Baro I, Escande D et al. Impaired KCNQ1-KCNE1 and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate interaction underlies the long QT syndrome. *Circ Res* 2005; 96(7):730-739.
- Parker JC. In defense of cell volume? *Am J Physiol* 1993; 265(5 Pt 1):C1191-C1200.
- Pereon Y, Demolombe S, Baro I, Drouin E, Charpentier F, Escande D. Differential expression of KvLQT1 isoforms across the human ventricular wall. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278(6):H1908-H1915.
- Perozo E, Cortes DM, Cuello LG. Three-dimensional architecture and gating mechanism of a K⁺ channel studied by EPR spectroscopy. *Nat Struct Biol* 1998; 5(6):459-469.
- Perozo E. New structural perspectives on K(+) channel gating. *Structure* 2002; 10(8):1027-1029.
- Perozo E. Gating prokaryotic mechanosensitive channels. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7(2):109-119.

- Petit-Jacques J, Bois P, Bescond J, Lenfant J. Mechanism of muscarinic control of the high-threshold calcium current in rabbit sino-atrial node myocytes. *Pflugers Arch* 1993; 423(1-2):21-27.
- Pian P, Bucci A, Robinson RB, Siegelbaum SA. Regulation of gating and rundown of HCN hyperpolarization-activated channels by exogenous and endogenous PIP₂. *J Gen Physiol* 2006; 128(5):593-604.
- Piao L, Ho WK, Earm YE. Actin filaments regulate the stretch sensitivity of large-conductance, Ca²⁺-activated K⁺ channels in coronary artery smooth muscle cells. *Pflugers Arch* 2003; 446(5):523-528.
- Piccini M, Vitelli F, Seri M, Galletta LJ, Moran O, Bulfone A et al. KCNE1-like gene is deleted in AMME contiguous gene syndrome: identification and characterization of the human and mouse homologs. *Genomics* 1999; 60(3):251-257.
- Piippo K, Swan H, Pasternack M, Chapman H, Paavonen K, Viitasalo M et al. A founder mutation of the potassium channel KCNQ1 in long QT syndrome: implications for estimation of disease prevalence and molecular diagnostics. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37(2):562-568.
- Pike LJ, Casey L. Localization and turnover of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in caveolin-enriched membrane domains. *J Biol Chem* 1996; 271(43):26453-26456.
- Pike LJ, Miller JM. Cholesterol depletion delocalizes phosphatidylinositol bisphosphate and inhibits hormone-stimulated phosphatidylinositol turnover. *J Biol Chem* 1998; 273(35):22298-22304.
- Pine MB, Brooks WW, Nosta JJ, Abelmann WH. Hydrostatic forces limit swelling of rat ventricular myocardium. *Am J Physiol* 1981; 241(5):H740-H747.
- Pitard B, Bello-Roufai M, Lambert O, Richard P, Desigaux L, Fernandes S et al. Negatively charged self-assembling DNA/poloxamine nanospheres for in vivo gene transfer. *Nucleic Acids Res* 2004; 32(20):e159.
- Pleumsamran A, Kim D. Membrane stretch augments the cardiac muscarinic K⁺ channel activity. *J Membr Biol* 1995; 148(3):287-297.
- Plotnikov AN, Sosunov EA, Qu J, Shlapakova IN, Anyukhovskiy EP, Liu L et al. Biological pacemaker implanted in canine left bundle branch provides ventricular escape rhythms that have physiologically acceptable rates. *Circulation* 2004; 109(4):506-512.
- Plotnikov AN, Shlapakova I, Szabolcs MJ, Danilo P, Jr., Lorell BH, Potapova IA et al. Xenografted adult human mesenchymal stem cells provide a platform for sustained biological pacemaker function in canine heart. *Circulation* 2007; 116(7):706-713.
- Potapova I, Plotnikov A, Lu Z, Danilo P, Jr., Valiunas V, Qu J et al. Human mesenchymal stem cells as a gene delivery system to create cardiac pacemakers. *Circ Res* 2004; 94(7):952-959.
- Potet F, Scott JD, Mohammad-Panah R, Escande D, Baro I. AKAP proteins anchor cAMP-dependent protein kinase to KvLQT1/IsK channel complex. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280(5):H2038-H2045.

- Priori SG, Bloise R, Crotti L. The long QT syndrome. *Europace* 2001; 3(1):16-27.
- Protas L, DiFrancesco D, Robinson RB. L-type but not T-type calcium current changes during postnatal development in rabbit sinoatrial node. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281(3):H1252-H1259.
- Pusch M. Increase of the single-channel conductance of KvLQT1 potassium channels induced by the association with minK. *Pflugers Arch* 1998; 437(1):172-174.
- Pusch M, Magrassi R, Wollnik B, Conti F. Activation and inactivation of homomeric KvLQT1 potassium channels. *Biophys J* 1998; 75(2):785-792.
- Qu J, Barbuti A, Protas L, Santoro B, Cohen IS, Robinson RB. HCN2 overexpression in newborn and adult ventricular myocytes: distinct effects on gating and excitability. *Circ Res* 2001; 89(1):E8-14.
- Qu J, Plotnikov AN, Danilo P, Jr., Shlapakova I, Cohen IS, Robinson RB et al. Expression and function of a biological pacemaker in canine heart. *Circulation* 2003; 107(8):1106-1109.
- Qu J, Kryukova Y, Potapova IA, Doronin SV, Larsen M, Krishnamurthy G et al. MiRP1 modulates HCN2 channel expression and gating in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2004; 279(42):43497-43502.
- Raucher D, Stauffer T, Chen W, Shen K, Guo S, York JD et al. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate functions as a second messenger that regulates cytoskeleton-plasma membrane adhesion. *Cell* 2000; 100(2):221-228.
- Ravn LS, Hofman-Bang J, Dixen U, Larsen SO, Jensen G, Haunso S et al. Relation of 97T polymorphism in KCNE5 to risk of atrial fibrillation. *Am J Cardiol* 2005; 96(3):405-407.
- Redfern DA, Gericke A. pH-dependent domain formation in phosphatidylinositol polyphosphate/phosphatidylcholine mixed vesicles. *J Lipid Res* 2005; 46(3):504-515.
- Rees SA, Vandenberg JI, Wright AR, Yoshida A, Powell T. Cell swelling has differential effects on the rapid and slow components of delayed rectifier potassium current in guinea pig cardiac myocytes. *J Gen Physiol* 1995; 106(6):1151-1170.
- Rentschler S, Vaidya DM, Tamaddon H, Degenhardt K, Sassoon D, Morley GE et al. Visualization and functional characterization of the developing murine cardiac conduction system. *Development* 2001; 128(10):1785-1792.
- Richard P, Bossard F, Desigaux L, Lanctin C, Bello-Roufai M, Pitard B. Amphiphilic block copolymers promote gene delivery in vivo to pathological skeletal muscles. *Hum Gene Ther* 2005; 16(11):1318-1324.
- Rigg L, Terrar DA. Possible role of calcium release from the sarcoplasmic reticulum in pacemaking in guinea-pig sino-atrial node. *Exp Physiol* 1996; 81(5):877-880.
- Robinson RB, Yu H, Chang F, Cohen IS. Developmental change in the voltage-dependence of the pacemaker current, *if*, in rat ventricle cells. *Pflugers Arch* 1997; 433(4):533-535.

- Rohacs T, Lopes CM, Jin T, Ramdya PP, Molnar Z, Logothetis DE. Specificity of activation by phosphoinositides determines lipid regulation of Kir channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(2):745-750.
- Romani AM, Matthews VD, Scarpa A. Parallel stimulation of glucose and Mg(2+) accumulation by insulin in rat hearts and cardiac ventricular myocytes. *Circ Res* 2000; 86(3):326-333.
- Romano C. Congenital cardiac arrhythmia. *Lancet* 1965; 1:658-659.
- Romey G, Attali B, Chouabe C, Abitbol I, Guillemare E, Barhanin J et al. Molecular mechanism and functional significance of the MinK control of the KvLQT1 channel activity. *J Biol Chem* 1997; 272(27):16713-16716.
- Roth MG. Phosphoinositides in constitutive membrane traffic. *Physiol Rev* 2004; 84(3):699-730.
- Rothblat GH, Llera-Moya M, Atger V, Kellner-Weibel G, Williams DL, Phillips MC. Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. *J Lipid Res* 1999; 40(5):781-796.
- Rozelle AL, Machesky LM, Yamamoto M, Driessens MH, Insall RH, Roth MG et al. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin-based movement of raft-enriched vesicles through WASP-Arp2/3. *Curr Biol* 2000; 10(6):311-320.
- Rubart M, Pasumarthi KB, Nakajima H, Soonpaa MH, Nakajima HO, Field LJ. Physiological coupling of donor and host cardiomyocytes after cellular transplantation. *Circ Res* 2003; 92(11):1217-1224.
- Ruhparwar A, Tebbenjohanns J, Niehaus M, Mengel M, Irtel T, Kofidis T et al. Transplanted fetal cardiomyocytes as cardiac pacemaker. *Eur J Cardiothorac Surg* 2002; 21(5):853-857.
- Runnels LW, Yue L, Clapham DE. The TRPM7 channel is inactivated by PIP(2) hydrolysis. *Nat Cell Biol* 2002; 4(5):329-336.
- Rybin VO, Xu X, Lisanti MP, Steinberg SF. Differential targeting of beta -adrenergic receptor subtypes and adenylyl cyclase to cardiomyocyte caveolae. A mechanism to functionally regulate the cAMP signaling pathway. *J Biol Chem* 2000; 275(52):41447-41457.
- Sackin H. A stretch-activated K⁺ channel sensitive to cell volume. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(5):1731-1735.
- Sakai H, Nakamura F, Kuno M. Synergetic activation of outwardly rectifying Cl⁻ currents by hypotonic stress and external Ca²⁺ in murine osteoclasts. *J Physiol* 1999; 515 (Pt 1):157-168.
- Salter MW, Kalia LV. Src kinases: a hub for NMDA receptor regulation. *Nat Rev Neurosci* 2004; 5(4):317-328.
- Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A, Shen J, Spector PS, Atkinson DL et al. Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature* 1996; 384(6604):80-83.

- Santagata S, Boggon TJ, Baird CL, Gomez CA, Zhao J, Shan WS et al. G-protein signaling through tubby proteins. *Science* 2001; 292(5524):2041-2050.
- Santoro B, Grant SG, Bartsch D, Kandel ER. Interactive cloning with the SH3 domain of N-src identifies a new brain specific ion channel protein, with homology to eag and cyclic nucleotide-gated channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(26):14815-14820.
- Santoro B, Liu DT, Yao H, Bartsch D, Kandel ER, Siegelbaum SA et al. Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell* 1998; 93(5):717-729.
- Sarkadi B, Parker JC. Activation of ion transport pathways by changes in cell volume. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1071(4):407-427.
- Sasaki N, Mitsuiye T, Wang Z, Noma A. Increase of the delayed rectifier K⁺ and Na⁽⁺⁾-K⁺ pump currents by hypotonic solutions in guinea pig cardiac myocytes. *Circ Res* 1994; 75(5):887-895.
- Sasano T, McDonald AD, Kikuchi K, Donahue JK. Molecular ablation of ventricular tachycardia after myocardial infarction. *Nat Med* 2006; 12(11):1256-1258.
- Satoh H, Tsuchida K. Comparison of a calcium antagonist, CD-349, with nifedipine, diltiazem, and verapamil in rabbit spontaneously beating sinoatrial node cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 21(5):685-692.
- Satoh H. Role of T-type Ca²⁺ channel inhibitors in the pacemaker depolarization in rabbit sino-atrial nodal cells. *Gen Pharmacol* 1995; 26(3):581-587.
- Schafer DA, Jennings PB, Cooper JA. Dynamics of capping protein and actin assembly in vitro: uncapping barbed ends by polyphosphoinositides. *J Cell Biol* 1996; 135(1):169-179.
- Schmitt N, Schwarz M, Peretz A, Abitbol I, Attali B, Pongs O. A recessive C-terminal Jervell and Lange-Nielsen mutation of the KCNQ1 channel impairs subunit assembly. *EMBO J* 2000; 19(3):332-340.
- Schroeder BC, Waldegger S, Fehr S, Bleich M, Warth R, Greger R et al. A constitutively open potassium channel formed by KCNQ1 and KCNE3. *Nature* 2000; 403(6766):196-199.
- Schulze-Bahr E, Neu A, Friederich P, Kaupp UB, Breithardt G, Pongs O et al. Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease. *J Clin Invest* 2003; 111(10):1537-1545.
- Schulze D, Krauter T, Fritzenschaft H, Soom M, Baukrowitz T. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) modulation of ATP and pH sensitivity in Kir channels. A tale of an active and a silent PIP₂ site in the N terminus. *J Biol Chem* 2003; 278(12):10500-10505.
- Seeböhm G, Westenskow P, Lang F, Sanguinetti MC. Mutation of colocalized residues of the pore helix and transmembrane segments S5 and S6 disrupt deactivation and modify inactivation of KCNQ1 K⁺ channels. *J Physiol* 2005; 563(Pt 2):359-368.

Seifert R, Scholten A, Gauss R, Mincheva A, Lichter P, Kaupp UB. Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(16):9391-9396.

Seoh SA, Sigg D, Papazian DM, Bezanilla F. Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K⁺ channel. *Neuron* 1996; 16(6):1159-1167.

Sesti F, Goldstein SA. Single-channel characteristics of wild-type IKs channels and channels formed with two minK mutants that cause long QT syndrome. *J Gen Physiol* 1998; 112(6):651-663.

Shi W, Wymore R, Yu H, Wu J, Wymore RT, Pan Z et al. Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues. *Circ Res* 1999; 85(1):e1-e6.

Shieh CC, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev* 2000; 52(4):557-594.

Shinagawa Y, Satoh H, Noma A. The sustained inward current and inward rectifier K⁺ current in pacemaker cells dissociated from rat sinoatrial node. *J Physiol* 2000; 523 Pt 3:593-605.

Shyng SL, Nichols CG. Membrane phospholipid control of nucleotide sensitivity of KATP channels. *Science* 1998; 282(5391):1138-1141.

Shyng SL, Cukras CA, Harwood J, Nichols CG. Structural determinants of PIP(2) regulation of inward rectifier K(ATP) channels. *J Gen Physiol* 2000; 116(5):599-608.

Sigg D, Bezanilla F. Total charge movement per channel. The relation between gating charge displacement and the voltage sensitivity of activation. *J Gen Physiol* 1997; 109(1):27-39.

Sigworth FJ. Voltage gating of ion channels. *Q Rev Biophys* 1994; 27(1):1-40.

Silverman HS, Di Lisa F, Hui RC, Miyata H, Sollott SJ, Hanford RG et al. Regulation of intracellular free Mg²⁺ and contraction in single adult mammalian cardiac myocytes. *Am J Physiol* 1994; 266(1 Pt 1):C222-C233.

Smith JA, Vanoye CG, Jr AL, Meiler J, Sanders CR. Structural Models for the KCNQ1 Voltage-Gated Potassium Channel. *Biochemistry* 2007; 46(49):14141-14152.

Splawski I, Tristani-Firouzi M, Lehmann MH, Sanguinetti MC, Keating MT. Mutations in the hminK gene cause long QT syndrome and suppress IKs function. *Nat Genet* 1997; 17(3):338-340.

Splawski I, Shen J, Timothy KW, Vincent GM, Lehmann MH, Keating MT. Genomic structure of three long QT syndrome genes: KVLQT1, HERG, and KCNE1. *Genomics* 1998; 51(1):86-97.

Splawski I, Shen J, Timothy KW, Lehmann MH, Priori S, Robinson JL et al. Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation* 2000; 102(10):1178-1185.

- Starace DM, Stefani E, Bezanilla F. Voltage-dependent proton transport by the voltage sensor of the Shaker K⁺ channel. *Neuron* 1997; 19(6):1319-1327.
- Stauffer TP, Ahn S, Meyer T. Receptor-induced transient reduction in plasma membrane PtdIns(4,5)P₂ concentration monitored in living cells. *Curr Biol* 1998; 8(6):343-346.
- Steenbergen C, Hill ML, Jennings RB. Cytoskeletal damage during myocardial ischemia: changes in vinculin immunofluorescence staining during total in vitro ischemia in canine heart. *Circ Res* 1987; 60(4):478-486.
- Steinberg SF. beta(2)-Adrenergic receptor signaling complexes in cardiomyocyte caveolae/lipid rafts. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 37(2):407-415.
- Stieber J, Herrmann S, Feil S, Loster J, Feil R, Biel M et al. 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):15235-15240.
- Stieber J, Hofmann F, Ludwig A. Pacemaker channels and sinus node arrhythmia. *Trends Cardiovasc Med* 2004; 14(1):23-28.
- Strange K, Jackson PS. Swelling-activated organic osmolyte efflux: a new role for anion channels. *Kidney Int* 1995; 48(4):994-1003.
- Suh BC, Hille B. Recovery from muscarinic modulation of M current channels requires phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis. *Neuron* 2002; 35(3):507-520.
- Suh BC, Hille B. Regulation of ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Curr Opin Neurobiol* 2005; 15(3):370-378.
- Suh BC, Hille B. Electrostatic interaction of internal Mg²⁺ with membrane PIP₂ Seen with KCNQ K⁺ channels. *J Gen Physiol* 2007; 130(3):241-256.
- Suzuki A, Bosnjak ZJ, Kwok WM. The effects of isoflurane on the cardiac slowly activating delayed-rectifier potassium channel in Guinea pig ventricular myocytes. *Anesth Analg* 2003; 96(5):1308-15, table.
- Taggart P, Sutton PM. Cardiac mechano-electric feedback in man: clinical relevance. *Prog Biophys Mol Biol* 1999; 71(1):139-154.
- Tai KK, Goldstein SA. The conduction pore of a cardiac potassium channel. *Nature* 1998; 391(6667):605-608.
- Takeshita K, Fujimori T, Kurotaki Y, Honjo H, Tsujikawa H, Yasui K et al. Sinoatrial node dysfunction and early unexpected death of mice with a defect of klotho gene expression. *Circulation* 2004; 109(14):1776-1782.
- Takumi T, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning of a membrane protein that induces a slow voltage-gated potassium current. *Science* 1988; 242(4881):1042-1045.
- Tall EG, Spector I, Pentylala SN, Bitter I, Rebecchi MJ. Dynamics of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in actin-rich structures. *Curr Biol* 2000; 10(12):743-746.

- Tang CY, Papazian DM. Transfer of voltage independence from a rat olfactory channel to the *Drosophila* ether-a-go-go K⁺ channel. *J Gen Physiol* 1997; 109(3):301-311.
- Taouil K, Hannaert P. Evidence for the involvement of K⁺ channels and K⁽⁺⁾-Cl⁻ cotransport in the regulatory volume decrease of newborn rat cardiomyocytes. *Pflugers Arch* 1999; 439(1-2):56-66.
- Tapper AR, George AL, Jr. Location and orientation of minK within the I(Ks) potassium channel complex. *J Biol Chem* 2001; 276(41):38249-38254.
- Terrenoire C, Clancy CE, Cormier JW, Sampson KJ, Kass RS. Autonomic control of cardiac action potentials: role of potassium channel kinetics in response to sympathetic stimulation. *Circ Res* 2005; 96(5):e25-e34.
- Thomas A, Deshayes S, Decaffmeyer M, Van Eyck MH, Charloteaux B, Brasseur R. Prediction of peptide structure: how far are we? *Proteins* 2006; 65(4):889-897.
- Tolias KF, Hartwig JH, Ishihara H, Shibasaki Y, Cantley LC, Carpenter CL. Type Ialpha phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase mediates Rac-dependent actin assembly. *Curr Biol* 2000; 10(3):153-156.
- Trachtman H. Cell volume regulation: a review of cerebral adaptive mechanisms and implications for clinical treatment of osmolal disturbances. I. *Pediatr Nephrol* 1991; 5(6):743-750.
- Tranum-Jensen J, Janse MJ, Fiolet WT, Krieger WJ, D'Alnoncourt CN, Durrer D. Tissue osmolality, cell swelling, and reperfusion in acute regional myocardial ischemia in the isolated porcine heart. *Circ Res* 1981; 49(2):364-381.
- Tristani-Firouzi M, Sanguinetti MC. Voltage-dependent inactivation of the human K⁺ channel KvLQT1 is eliminated by association with minimal K⁺ channel (minK) subunits. *J Physiol* 1998; 510 (Pt 1):37-45.
- Tristani-Firouzi M, Chen J, Sanguinetti MC. Interactions between S4-S5 linker and S6 transmembrane domain modulate gating of HERG K⁺ channels. *J Biol Chem* 2002; 277(21):18994-19000.
- Trudeau MC, Warmke JW, Ganetzky B, Robertson GA. HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family. *Science* 1995; 269(5220):92-95.
- Tsang SY, Lesso H, Li RA. Dissecting the structural and functional roles of the S3-S4 linker of pacemaker (hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-modulated) channels by systematic length alterations. *J Biol Chem* 2004; 279(42):43752-43759.
- Tse HF, Xue T, Lau CP, Siu CW, Wang K, Zhang QY et al. Bioartificial sinus node constructed via in vivo gene transfer of an engineered pacemaker HCN Channel reduces the dependence on electronic pacemaker in a sick-sinus syndrome model. *Circulation* 2006; 114(10):1000-1011.
- Ueda K, Nakamura K, Hayashi T, Inagaki N, Takahashi M, Arimura T et al. Functional characterization of a trafficking-defective HCN4 mutation, D553N, associated with cardiac arrhythmia. *J Biol Chem* 2004; 279(26):27194-27198.

- Vaccari T, Moroni A, Rocchi M, Gorza L, Bianchi ME, Beltrame M et al. The human gene coding for HCN2, a pacemaker channel of the heart. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1446(3):419-425.
- van der WJ, Habets R, Varnai P, Balla T, Jalink K. Monitoring agonist-induced phospholipase C activation in live cells by fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 2001; 276(18):15337-15344.
- van Rheenen J, Achame EM, Janssen H, Calafat J, Jalink K. PIP2 signaling in lipid domains: a critical re-evaluation. *EMBO J* 2005; 24(9):1664-1673.
- van Rijen HV, van Veen TA, van Kempen MJ, Wilms-Schopman FJ, Potse M, Krueger O et al. Impaired conduction in the bundle branches of mouse hearts lacking the gap junction protein connexin40. *Circulation* 2001; 103(11):1591-1598.
- van Rijen HV, de Bakker JM, van Veen TA. Hypoxia, electrical uncoupling, and conduction slowing: Role of conduction reserve. *Cardiovasc Res* 2005; 66(1):9-11.
- Van Wagoner DR. Mechanosensitive gating of atrial ATP-sensitive potassium channels. *Circ Res* 1993; 72(5):973-983.
- Vandenberg JJ, Rees SA, Wright AR, Powell T. Cell swelling and ion transport pathways in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 1996; 32(1):85-97.
- vanTol BL, Missan S, Crack J, Moser S, Baldrige WH, Linsdell P et al. Contribution of KCNQ1 to the regulatory volume decrease in the human mammary epithelial cell line MCF-7. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 293(3):C1010-C1019.
- Varnai P, Balla T. Visualization of phosphoinositides that bind pleckstrin homology domains: calcium- and agonist-induced dynamic changes and relationship to myo-[3H]inositol-labeled phosphoinositide pools. *J Cell Biol* 1998; 143(2):501-510.
- Varnum MD, Busch AE, Bond CT, Maylie J, Adelman JP. The min K channel underlies the cardiac potassium current IKs and mediates species-specific responses to protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(24):11528-11532.
- Verbalis JG, Gullans SR. Hyponatremia causes large sustained reductions in brain content of multiple organic osmolytes in rats. *Brain Res* 1991; 567(2):274-282.
- Verheijck EE, Wilders R, Joyner RW, Golod DA, Kumar R, Jongsma HJ et al. Pacemaker synchronization of electrically coupled rabbit sinoatrial node cells. *J Gen Physiol* 1998; 111(1):95-112.
- Verkerk AO, Wilders R, Coronel R, Ravensloot JH, Verheijck EE. Ionic remodeling of sinoatrial node cells by heart failure. *Circulation* 2003; 108(6):760-766.
- Vinogradova TM, Bogdanov KY, Lakatta EG. beta-Adrenergic stimulation modulates ryanodine receptor Ca(2+) release during diastolic depolarization to accelerate pacemaker activity in rabbit sinoatrial nodal cells. *Circ Res* 2002; 90(1):73-79.

- Vinogradova TM, Zhou YY, Maltsev V, Lyashkov A, Stern M, Lakatta EG. Rhythmic ryanodine receptor Ca²⁺ releases during diastolic depolarization of sinoatrial pacemaker cells do not require membrane depolarization. *Circ Res* 2004; 94(6):802-809.
- Vinogradova TM, Maltsev VA, Bogdanov KY, Lyashkov AE, Lakatta EG. Rhythmic Ca²⁺ oscillations drive sinoatrial nodal cell pacemaker function to make the heart tick. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1047:138-156.
- Viswanathan PC, Coles JA, Jr., Sharma V, Sigg DC. Recreating an artificial biological pacemaker: insights from a theoretical model. *Heart Rhythm* 2006; 3(7):824-831.
- Wang J, Arbuzova A, Hangyas-Mihalyne G, McLaughlin S. The effector domain of myristoylated alanine-rich C kinase substrate binds strongly to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem* 2001; 276(7):5012-5019.
- Wang KW, Goldstein SA. Subunit composition of minK potassium channels. *Neuron* 1995; 14(6):1303-1309.
- Wang L, Feng ZP, Kondo CS, Sheldon RS, Duff HJ. Developmental changes in the delayed rectifier K⁺ channels in mouse heart. *Circ Res* 1996; 79(1):79-85.
- Wang Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millholland JM, VanRaay TJ et al. Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet* 1996; 12(1):17-23.
- Wang W, Xia J, Kass RS. MinK-KvLQT1 fusion proteins, evidence for multiple stoichiometries of the assembled Isk channel. *J Biol Chem* 1998; 273(51):34069-34074.
- Wang Z, Mitsuiye T, Noma A. Cell distension-induced increase of the delayed rectifier K⁺ current in guinea pig ventricular myocytes. *Circ Res* 1996; 78(3):466-474.
- Ward OC. A new familial cardiac syndrome in children. *J Ir Med Assoc* 1964; 54:103-106.
- Watt SA, Kular G, Fleming IN, Downes CP, Lucocq JM. Subcellular localization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate using the pleckstrin homology domain of phospholipase C delta1. *Biochem J* 2002; 363(Pt 3):657-666.
- Whalley DW, Hool LC, Ten Eick RE, Rasmussen HH. Effect of osmotic swelling and shrinkage on Na⁽⁺⁾-K⁺ pump activity in mammalian cardiac myocytes. *Am J Physiol* 1993; 265(5 Pt 1):C1201-C1210.
- Whitaker GM, Angoli D, Nazzari H, Shigemoto R, Accili EA. HCN2 and HCN4 isoforms self-assemble and co-assemble with equal preference to form functional pacemaker channels. *J Biol Chem* 2007; 282(31):22900-22909.
- White RE, Hartzell HC. Magnesium ions in cardiac function. Regulator of ion channels and second messengers. *Biochem Pharmacol* 1989; 38(6):859-867.
- Wilde AA, Bezzina CR. Genetics of cardiac arrhythmias. *Heart* 2005; 91(10):1352-1358.

- Wollnik B, Schroeder BC, Kubisch C, Esperer HD, Wieacker P, Jentsch TJ. Pathophysiological mechanisms of dominant and recessive KVLQT1 K⁺ channel mutations found in inherited cardiac arrhythmias. *Hum Mol Genet* 1997; 6(11):1943-1949.
- Wu DM, Jiang M, Zhang M, Liu XS, Korolkova YV, Tseng GN. KCNE2 is colocalized with KCNQ1 and KCNE1 in cardiac myocytes and may function as a negative modulator of I(K_s) current amplitude in the heart. *Heart Rhythm* 2006; 3(12):1469-1480.
- Xiang Y, Rybin VO, Steinberg SF, Kobilka B. Caveolar localization dictates physiologic signaling of beta 2-adrenoceptors in neonatal cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2002; 277(37):34280-34286.
- Xiao RP, Cheng H, Zhou YY, Kuschel M, Lakatta EG. Recent advances in cardiac beta(2)-adrenergic signal transduction. *Circ Res* 1999; 85(11):1092-1100.
- Xu H, Barry DM, Li H, Brunet S, Guo W, Nerbonne JM. Attenuation of the slow component of delayed rectification, action potential prolongation, and triggered activity in mice expressing a dominant-negative Kv2 alpha subunit. *Circ Res* 1999; 85(7):623-633.
- Yang N, George AL, Jr., Horn R. Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels. *Neuron* 1996; 16(1):113-122.
- Yang T, Kanki H, Roden DM. Phosphorylation of the IKs channel complex inhibits drug block: novel mechanism underlying variable antiarrhythmic drug actions. *Circulation* 2003; 108(2):132-134.
- Yang WP, Levesque PC, Little WA, Conder ML, Shalaby FY, Blannar MA. KvLQT1, a voltage-gated potassium channel responsible for human cardiac arrhythmias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(8):4017-4021.
- Yang Y, Sigworth FJ. Single-channel properties of IKs potassium channels. *J Gen Physiol* 1998; 112(6):665-678.
- Yang ZF, Sun Y, Li CZ, Wang HW, Wang XJ, Zheng YQ et al. Reduced sinoatrial cAMP content plays a role in postnatal heart rate slowing in the rabbit. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; 33(8):757-762.
- Yarov-Yarovoy V, Baker D, Catterall WA. Voltage sensor conformations in the open and closed states in ROSETTA structural models of K(+) channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(19):7292-7297.
- Yasuda Y, Matsuura H, Ito M, Matsumoto T, Ding WG, Horie M. Regulation of the muscarinic K⁺ channel by extracellular ATP through membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in guinea-pig atrial myocytes. *Br J Pharmacol* 2005; 145(2):156-165.
- Yellen G. The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* 2002; 419(6902):35-42.
- Young KW, Garro MA, Challiss RA, Nahorski SR. NMDA-receptor regulation of muscarinic-receptor stimulated inositol 1,4,5-trisphosphate production and protein kinase C activation in single cerebellar granule neurons. *J Neurochem* 2004; 89(6):1537-1546.

- Yu H, Chang F, Cohen IS. Pacemaker current exists in ventricular myocytes. *Circ Res* 1993; 72(1):232-236.
- Yu H, Wu J, Potapova I, Wymore RT, Holmes B, Zuckerman J et al. MinK-related peptide 1: A beta subunit for the HCN ion channel subunit family enhances expression and speeds activation. *Circ Res* 2001; 88(12):E84-E87.
- Zeng WZ, Li XJ, Hilgemann DW, Huang CL. Protein kinase C inhibits ROMK1 channel activity via a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2003; 278(19):16852-16856.
- Zhang H, He C, Yan X, Mirshahi T, Logothetis DE. Activation of inwardly rectifying K⁺ channels by distinct PtdIns(4,5)P₂ interactions. *Nat Cell Biol* 1999; 1(3):183-188.
- Zhang H, Holden AV, Boyett MR. Sustained inward current and pacemaker activity of mammalian sinoatrial node. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2002; 13(8):809-812.
- Zhang H, Craciun LC, Mirshahi T, Rohacs T, Lopes CM, Jin T et al. PIP(2) activates KCNQ channels, and its hydrolysis underlies receptor-mediated inhibition of M currents. *Neuron* 2003; 37(6):963-975.
- Zhang J, Rasmusson RL, Hall SK, Lieberman M. A chloride current associated with swelling of cultured chick heart cells. *J Physiol* 1993; 472:801-820.
- Zhang L, Lee JK, John SA, Uozumi N, Kodama I. Mechanosensitivity of GIRK channels is mediated by protein kinase C-dependent channel-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate interaction. *J Biol Chem* 2004; 279(8):7037-7047.
- Zhou BY, Ye Z, Chen G, Gao ZP, Zhang YA, Cheng L. Inducible and reversible transgene expression in human stem cells after efficient and stable gene transfer. *Stem Cells* 2007; 25(3):779-789.
- Zhou YY, Yao JA, Tseng GN. Role of tyrosine kinase activity in cardiac slow delayed rectifier channel modulation by cell swelling. *Pflugers Arch* 1997; 433(6):750-757.
- Zhou YY, Yang D, Zhu WZ, Zhang SJ, Wang DJ, Rohrer DK et al. Spontaneous activation of beta(2)- but not beta(1)-adrenoceptors expressed in cardiac myocytes from beta(1)beta(2) double knockout mice. *Mol Pharmacol* 2000; 58(5):887-894.
- Zolles G, Klocker N, Wenzel D, Weisser-Thomas J, Fleischmann BK, Roeper J et al. Pacemaking by HCN channels requires interaction with phosphoinositides. *Neuron* 2006; 52(6):1027-1036.
- Zong X, Eckert C, Yuan H, Wahl-Schott C, Abicht H, Fang L et al. A novel mechanism of modulation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels by Src kinase. *J Biol Chem* 2005; 280(40):34224-34232.

Création d'un pacemaker biologique cardiaque - Régulation physiologique du canal KCNQ1/KCNE1

Chez des souris en bloc auriculo-ventriculaire (BAVc), nous avons créé un pacemaker biologique cardiaque grâce à un vecteur non-viral. Cinq jours avant l'obtention du BAVc par ablation du faisceau de His, les plasmides codant le canal ionique HCN2 responsable du courant de pacemaker, I_f , et le récepteur β_2 -adrénergique, sont mélangés au vecteur tétronic 304 et injectés dans la paroi du ventricule gauche. Le rythme d'échappement ventriculaire des souris HCN2-Adrb2 est significativement plus rapide que celui des souris *sham* et est stabilisé jusqu'à 40 jours. Ce pacemaker biologique est régulé par la stimulation sympathique et permet d'augmenter la survie des souris.

Le $PI(4,5)P_2$ régule l'activité du canal KCNQ1-KCNE1, responsable du courant potassique I_{Ks} , en stabilisant l'état d'ouverture du canal. De très nombreuses mutations du canal KCNQ1 sont responsables du syndrome du QT long à l'origine de troubles du rythme cardiaque. Nous avons démontré que l'implication de trois formes mutantes de KCNQ1 (R243H, R555C et R539W) dans le syndrome du QT long, s'explique par une diminution de l'affinité de KCNQ1 pour le PIP_2 .

L'osmosensibilité du canal KCNQ1 est une voie physiologique prépondérante de la réponse des cellules cardiaques aux variations osmotiques. La caractérisation des réponses aux variations d'osmolarité du canal KCNQ1-KCNE1 et des trois canaux mutants caractérisés par une faible affinité pour le PIP_2 , suggère que l'osmosensibilité de KCNQ1-KCNE1 ne passe par l'étirement de la membrane plasmique mais implique une variation du volume cellulaire provoquant une régulation de la concentration de Mg^{2+} , et donc une variation du PIP_2 disponible.

Mots-clés : thérapie génique, canal HCN, récepteur adrénergique, bloc cardiaque, canal KCNQ1, PIP_2 , osmolarité, syndrome du QT long

Abstract

Cardiac biological pacemaker engineering - Physiological regulation of KCNQ1/KCNE1 channel

In a mouse model of complete atrioventricular block (CAVB), we generate a functional ventricular pacemaker by non-viral gene delivery. Five days before catheter-mediated radiofrequency His bundle ablation, plasmids coding cyclic nucleotide-gated HCN2 channel (*Hcn2*), responsible for the pacemaker current, I_f , and the β_2 -adrenergic receptor (*Adrb2*), are mixed with the tetronic 304 vector and injected in the wall of the left ventricle. The escape ventricular rhythm in HCN2-Adrb2 mice is significantly faster than in sham mice and is stabilized until 40 days. This biological pacemaker is regulated by sympathetic input, and improves life expectancy in this mouse model of CAVB.

$PI(4,5)P_2$ regulates KCNQ1-KCNE1 potassium channel activity, which underlies the potassium current I_{Ks} , by stabilizing the open state of the channel. Various mutations of the KCNQ1 channel are responsible for the long QT syndrome, characterized by cardiac arrhythmias. We demonstrated that the involvement of three mutant forms of KCNQ1 (R243H, R555C and R539W) in the long QT syndrome, can be explained by a reduced PIP_2 affinity of KCNQ1 channels.

The osmosensitivity of KCNQ1 channel is of physiological relevance in cardiac cells in response to osmotic variations. The characterization of the response to osmotic variations of the wild-type and three mutant KCNQ1-KCNE1 channels characterized by a weak PIP_2 affinity, suggests that the osmosensitivity of KCNQ1-KCNE1 does not involve membrane stretching but a variation of the cellular volume provoking a variation of the Mg^{2+} concentration, and thus a regulation of available PIP_2 .

Keywords : gene therapy, HCN channel, adrenergic receptor, heart block, KCNQ1 channel, PIP_2 , osmolarity, long QT syndrome