

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : *Physiologie, Physiopathologie, Biologie Systémique Médicale*

Par

Franck CHIZELLE

Etudes fonctionnelles de mutations associées à des pathologies de la repolarisation ventriculaire

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 11 Octobre 2018

Unité de recherche : L'institut du thorax, IRS-UN, UMR INSERM U1087 / CNRS UMR 6291

Thèse N° :

Rapporteurs avant soutenance :

Nathalie Neyroud Chargé de recherche INSERM, Paris
Jean-Yves Le Guennec Professeur des Universités, Montpellier

Composition du Jury :

Président Jean-Jacques Schott	Directeur de recherche, INSERM, Nantes
Ana-Maria Gómez	Directrice de recherche INSERM, Châtenay-Malabry
Marie Demion	Maître de conférence universitaire, Montpellier
Olivier Bernus	Professeur des Universités, Bordeaux
Directeur de thèse Flavien Charpentier	Directeur de recherche INSERM, L'institut du thorax, Nantes

Remerciements

Ceux qui l'ont vécu vous le diront, la thèse est une véritable aventure, une vie dans la vie, faite de bons et de moins bons moments, que beaucoup comparent à des montagnes russes, ou à une sinusoïdale si l'on veut rester scientifique. Alors, maintenant au bout du chemin, j'aimerais remercier tous ceux qui durant cette aventure ont contribué à ce travail et m'ont aidé à remonter la pente quand il le fallait, et à ne pas la dégringoler dans les moments de doute.

Je remercie tout d'abord les personnes composant mon jury de thèse : Mr Jean-Jacques Schott, pour avoir accepté de présider ce jury et pour ses conseils et remarques toujours à propos. Mme Nathalie Neyroud et Mr Jean-Yves Le Guennec pour leurs conseils et corrections en tant que rapporteurs. Mme Marie Demion, Mme Ana-Maria Gómez et Mr Olivier Bernus pour avoir accepté de faire partie de mon jury en tant qu'examineurs. Merci également à Matteo Mangoni et Julien Barc pour m'avoir accompagné et conseillé scientifiquement.

Merci au professeur Hervé Le Marec et à Mr Richard Redon pour m'avoir accueilli au sein de l'unité.

Parce que pour espérer un jour dépasser le maître, ou ne serait-ce qu'arriver à sa cheville, l'élève a besoin d'un maître de qualité, ma profonde reconnaissance va à Mr Flavien Charpentier. Merci à vous d'avoir fait confiance dès son stage de Master 1 à cet étudiant un peu bourru sorti de sa campagne, et d'avoir renouvelé cette confiance par la suite. L'étudiant a énormément évolué, progressé et appris. Merci pour l'indépendance que tu (oui, je suis finalement arrivé à te tutoyer...) m'a donné tout en sachant être présent à bon escient pour distiller de précieux conseils, orientations ou encore connaissances scientifiques. J'espère avoir été à la hauteur. Merci.

Merci à Isabelle Baró et Gildas Loussouarn, pour votre aide et vos précieux conseils, « électrophysiologiquement » parlant, évidemment, mais pas que. Isabelle, ta rigueur, ton exigence et ta recherche de la perfection t'honorent, et nous devrions tous nous en inspirer. Gildas, ta passion pour la science et tes connaissances, tellement grandes, transpirent de chacune de tes interventions. Un peu égoïstement, j'avoue ne jamais avoir rechigné à faire irruption et vous déranger dans votre bureau, car je savais que j'en ressortirai toujours un peu plus savant qu'en y entrant.

Je remercie l'ensemble des personnes du laboratoire avec qui j'ai pu travailler, ou simplement parler et qui m'ont apporté durant cette thèse. Jérôme, pour m'avoir initié à ce beau monde qu'est la science. Je suis heureux de ton retour. Nadjat, pour ta curiosité scientifique qui pousse à progresser, pour tes potins, tes ragots, et pour ton aide lors des creux de la sinusoïdale. Tu sais tout ce que je te dois. Olfat, pour m'avoir appris de nombreuses choses, à commencer par le patch... Bel exploit ! Céline, pour ta sympathie et tes connaissances, notamment biochimiques, Aurore, pour l'immensité de choses que tu gères, Françoise, pour ta gentillesse et ton humour au quotidien, Stéphanie et Julien pour votre travail tellement précieux de gestion de l'animalerie, Maman Coco car sans toi je serais sans doute encore perdu dans les méandres de l'administration à l'heure actuelle, Gilles, Mickaël, Bérangère, Nathalie, Angélique, Agnès, Martine et Marie-France, Jean, Sébastien, ainsi que celles et ceux que j'ai omis de citer et à qui j'adresse par avance mes excuses... Merci à toutes et à tous.

Agnès... Une place à part dans ces remerciements n'est évidemment même pas encore assez pour montrer l'importance que tu as eu durant mon passage au laboratoire... Je te dois tellement. Tu as été mon bras droit, et même le gauche aussi parfois, lors de maintes expériences qu'il nous a fallu mener à bout et au cours desquelles notre complicité fut notre meilleur atout. Merci mille fois. Pour la gestion des animaux, parfaite, pour tes rires, ton soutien, ton savoir-faire, ton franc-parler, les gâteaux que tu m'as dépanné à 16h, et ceux que je t'ai volé, les verres bus ensemble, et tellement de chose encore. Merci.

Merci à cette formidable armée de thésards qui par leur rires et leur sourires ont rendu ces années tellement agréables. Florian, collègue de la toute première heure et avec qui j'ai fait tout ce parcours depuis les années de Licence et de Master, avec nos 2 compagnons Arnaud et Julien. Notre complicité, nos délires, nos fous rires, ont été autant de bouffées d'oxygène sans lesquelles nous aurions eu beaucoup plus de mal à avancer. Stéphan, mon bagnard, mon gars du cru comme nous aimons à le dire. J'ai trouvé en toi quelqu'un de précieux et avec qui je partage de rares valeurs, qui nous sont chères à tous les deux. Nos excès nous ont sans doute coûté des minutes de vie, mais les rires les ont largement compensés... Emeline, pour tout ce que tu sais... Justine, que j'ai adoré côtoyer et taquiner, Claire, toi qui es parvenu à supporter mes enfantillages quotidiens dans ton dos durant 3 ans, Andréa, Maxime, Zeina, Justine, Antoine, Alice, Damien, Martin.

Merci à ces nombreuses souris qui ont participé bien malgré elle à l'avancée de ces travaux. Et merci à Litchi qui, après avoir saisi l'importance qu'avaient ces petites bêtes dans mon travail, ne cesse de m'en rapporter à la maison... J'apprécie, mais je préfère encore tes ronronnements.

Un bond de quelques 600 km m'amène à remercier mes amis d'enfance. Que dire... ? Bastien et Rémi, mon noyau dur, ma Gaude, Flavien, Julien, Pierrot, Bibi, Loïc, Arthur, Marine, Martha, mes conscrits... De la maternelle de notre petit village niché au cœur des vignes à ma 8^{ème} année d'étude post-bac à Nantes, vous avez toujours été là. Ce fut un déchirement de m'éloigner de vous en 2012, mais chaque retour aux sources lors de mes vacances n'en a été que plus joyeux, fort et profitable. Il m'arrive encore parfois de me demander si vous mesurez bien l'importance que vous prenez dans mon parcours et dans ma vie plus globalement... Merci et à très bientôt.

Je n'écrirais pas ces lignes sans le soutien de ma famille, sans qui je ne serais pas devenu la personne que je suis aujourd'hui. Nicolas, je me souviens comme si c'était hier de ta colère à me voir rechigner à apprendre ma première leçon d'Anglais de collège. Cela a été un déclic. Et tu m'as tellement poussé et appris par la suite... Tu as été mon modèle durant la majeure partie de ma scolarité. Romain, j'admire tes valeurs de travail et la personne que tu es et je crois que nous nous ressemblons et partageons plus de choses qu'on ne veut bien le montrer...

J'aurais tellement aimé que tous mes grands-parents soient encore autour de moi pour voir ce que je suis devenu... Merci pour les valeurs que vous m'avez transmises. Papi, nous étions si semblables... Tu es parti pendant cette thèse, mais je suis sûr que je verrai tes yeux là-haut, briller de fierté le 11 Octobre lorsque je lèverai les yeux vers le ciel...

Papa, merci de me montrer que par l'abnégation et le travail, quiconque peut accomplir chaque objectif que la vie nous fixe. J'ai appris cela à tes côtés, et même si je suis incapable de te le dire, je t'admire, pour cette qualité et bien d'autres encore...

Maman, merci pour tout... Moi, comme mes frères, mesurons tous les sacrifices que tu as fait pour nous et que tu continues de faire. Merci pour ton soutien, dans mes actes bons comme dans mes grosses bêtises... Merci de m'avoir inculqué le respect, de m'avoir compris, toujours, et aidé, même quand il a fallu laisser s'éloigner ton dernier petit garçon, pour que je puisse m'épanouir. J'ose espérer te rendre, ne serait-ce qu'en partie, tout ce que tu m'as apporté...

Enfin, et de manière à garder le meilleur, et en l'occurrence la meilleure pour la fin, merci à celle qui me rend heureux et fais de moi ce que je suis aujourd'hui. Clémence, de l'aube de nos 20 ans à aujourd'hui, nous vivons heureux et épanouis les magnifiques moments que la vie nous procure, nous nous donnons l'un et l'autre cette force unique qui nous permet de surmonter toutes les épreuves de la vie, cette force qui nous a permis à tous les deux d'écrire une thèse. Tu es celle sur qui j'ai pu compter et me reposer, toujours, celle qui me permet, en un regard, de retrouver le sourire et de relativiser après une journée difficile, celle qui me permet de m'évader quand j'en ai besoin. Tu prends une part énorme dans la réalisation de ce travail, et tu sais tout ce que je te dois et ce que je t'ai fait endurer, merci... Je suis fier de toi, fier de partager ta vie et tellement heureux de pouvoir envisager le futur à tes côtés...

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Avant-propos

Chapitre 1 – État de l'art

I.	Activité électrique des cellules ventriculaires cardiaques	1
A.	Le potentiel d'action ventriculaire et les courants ioniques impliqués	1
1.	Phase 0 : La phase de dépolarisation.....	1
2.	Phase 1 : La phase de repolarisation précoce	2
3.	Phase 2 : La phase de plateau	2
5.	Phase 4 : Le potentiel de repos	3
B.	Le potentiel d'action à l'origine du couplage excitation-contraction	5
C.	Le décours du potentiel d'action, un substrat pour le déclenchement de troubles du rythme	6
II.	Le canal sodique Nav1.5	8
A.	Génétique des canaux Nav1.X	8
B.	Structure et fonction	9
C.	Le courant sodique I_{Na}	11
1.	La phase d'inactivation	12
2.	Le courant sodique persistant.....	12
D.	Régulation du canal Nav1.5	13
1.	Les sous-unités β régulatrices	14

2.	Les protéines d'ancrage.....	14
	a. L' α -actinine 2	14
	b. L'ankyrine-G.....	15
	c. La syntrophine α -1.....	15
	d. Les protéines MAGUK (membrane-associated guanylate kinases).....	16
	e. MOG1 (Multicopy Suppressor of gsp1).....	16
3.	Les protéines régulant l'activité de Nav1.5.....	16
	a. La calmoduline	17
	b. Autres protéines régulant l'activité de Nav1.5.....	17
4.	Les protéines kinases et phosphatases.....	18
	a. La CaMKII	18
	b. Les protéines kinase A (PKA), C (PKC), et Fyn	19
	c. Les protéines tyrosine phosphatases.....	20
III.	L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ NCX1	21
	A. La famille de gènes <i>SLC8</i>	21
	B. Structure et fonctionnement de NCX1	22
	C. Rôles physiologiques de NCX1	23
	1. Contribution électrique de NCX1	24
	2. Contribution de NCX1 à l'homéostasie calcique.....	24
	D. Mécanismes régulateurs de l'activité de NCX1	25
IV.	Homéostasies sodique et calcique dans le cardiomyocyte.....	27
	A. Homéostasie sodique.....	27
	1. Les acteurs des flux sodiques	27
	2. Perturbations de l'homéostasie sodique	29
	B. Homéostasie calcique.....	30
	1. Les acteurs des flux calciques	31

a.	La CaMKII	32
b.	La pompe SERCA et le PLB	34
c.	Le RyR.....	35
d.	Rôle des mitochondries.....	37
2.	Perturbations de l'homéostasie calcique	39
C.	Mécanismes arythmogènes impliquant des perturbations des homéostasies sodique et calcique.....	40
1.	Les post-dépolarisations précoces, ou EADs	41
2.	Les post-dépolarisations retardées, ou DADs	41
V.	Canalopathies cardiaques.....	43
A.	Les pathologies de la repolarisation ventriculaire.....	43
1.	Le syndrome du QT long	44
a.	Clinique	44
b.	Génétique du syndrome du QT long.....	45
c.	Le SQTl de type 3	47
i.	La souris <i>Scn5a</i> ^{+/ΔKPQ}	48
ii.	La souris <i>Scn5a</i> N1325S	49
iii.	La souris <i>Scn5a</i> ^{+/Δ1798insD}	50
d.	Traitements	52
2.	Le syndrome du QT court	53
a.	Clinique	53
b.	Génétique du syndrome du QT court.....	55
c.	Modèles d'étude du SQTc.....	56
i.	Les souris <i>Slc8a1</i> ^{-/-}	56
ii.	Les souris déficientes en carnitine.....	57
iii.	Les cellules <i>KCNH2</i> N588K.....	59
d.	Mécanismes arythmogènes dans le SQTc.....	60
3.	Le syndrome de repolarisation précoce.....	62

a. Clinique	63
b. Génétique du SRP	64
c. Mécanismes arythmogènes du SRP	64
d. Traitement	65
B. Pathologies associées à NCX1	65
C. Pathologies associées à Nav1.5	68
1. Le syndrome de Brugada.....	68
2. Les troubles progressifs de la conduction	71
3. Les syndromes chevauchants (overlap syndrome).....	71
4. Les dysfonctions du nœud sinusal (sick sinus syndrome).....	72
5. Les fibrillations ventriculaires idiopathiques	73
6. Les cardiomyopathies dilatées	73
Objectifs de la thèse.....	75
Chapitre 2 – MATÉRIEL ET METHODES	76
I. Projet 1 : Les souris <i>Scn5a</i>^{+/ΔQKP}, un nouveau modèle d'étude du SQTl de type 3 associé à une cardiomyopathie	77
A. L'électrocardiogramme	77
B. Analyses histologiques et morphologiques	77
C. Patch-clamp	78
1. Isolement des cardiomyocytes	79
2. Enregistrement des courants.....	79
D. Potentiels d'action	81
E. Imagerie calcique	82
1. Isolement des cardiomyocytes	82
2. Imagerie.....	82
F. Western blot.....	83

1.	Lyse et extraction protéique	83
2.	Western Blot.....	83
G.	Traitements pharmacologiques	84
H.	Immunohistochimie.....	84
I.	Échocardiographie	86
J.	Modèle mathématique de PA ventriculaire de souris	86
K.	Immunoprécipitation de Nav1.5 et son complexe macromoléculaire.....	87
II.	Projet 2 : Identification et caractérisation fonctionnelle des premiers variants rares sur le gène SLC8A1 associés à un SRP et un raccourcissement de l'intervalle QT	88
A.	Identification des mutations	88
B.	Culture cellulaire	89
1.	Plasmides.....	89
2.	Amplification et extraction d'ADN plasmidique	89
3.	Transfection.....	90
C.	Patch clamp	90
D.	Immunofluorescence	91
E.	Biotinylation	92
F.	Capture de ⁴⁵ Ca.....	93
G.	Modèles mathématiques de simulation <i>in silico</i>	94
H.	Analyses statistiques	94
	Chapitre 3 - RÉSULTATS	95
	Projet 1 : Les souris <i>Scn5a</i>^{+/ΔQKP}, un nouveau modèle d'étude du SQTTL de type 3 associé à une cardiomyopathie.....	96
I.	Résumé du projet	96

II.	Article	97
	Projet 2 : Identification et caractérisation fonctionnelle des premiers variants rares sur le gène <i>SLC8A1</i> associés à un SRP et un raccourcissement de l'intervalle QT.	160
I.	Résumé du projet	160
II.	Article	162
	Chapitre 4 - DISCUSSION GÉNÉRALE	205
I.	Projet 1 : Les souris <i>Scn5a</i>^{+/ΔQKP}, un nouveau modèle d'étude du SQTl de type 3 associé à une cardiomyopathie.	208
II.	Projet 2 : Identification et caractérisation fonctionnelle des premiers variants rares sur le gène <i>SLC8A1</i> associés à un SRP et un raccourcissement de l'intervalle QT.....	212
	Conclusion et perspectives.....	215
	Bibliographie.....	218

Liste des abréviations

- AMPC : Adénosine MonoPhosphate cyclique
- APD : *Action Potential Duration*, durée du potentiel d'action
- ATP : Adénosine Tri Phosphate
- ATX-II : Anemonia Sulcata Toxine II
- BAV : Bloc Auriculo-Ventriculaire
- BSA : Bovine Serum Albumine, Albumine Issue de Sérum Bovin
- CaM : Calmoduline
- CaMKII : *Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II*
- CBD : *Ca²⁺-Binding Domain*, domaine de liaison au Ca²⁺
- CKM : *Muscle-type Creatine Kinase*
- COS-7 : *CV-1 in Origin with SV40 genes*, fibroblastes immortalisés issus de rein de singe
- DAD : Delayed Afterdepolarization, post-dépolarisation retardée
- EAD : *Early Afterdepolarization*, post-dépolarisation précoce
- ECG : Électrocardiogramme
- FDA : *Food and Drug Administration*
- FGF : *Fibroblast Growth Factor*
- FHF : *Fibroblast Homologous Factor*
- FVI : Fibrillation Ventriculaire Idiopathique
- GAPDH : *Glyceraldéhyde Phosphate Déshydrogénase*
- GPD1L : *Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase-like Protein*
- HRP : *Horseradish Peroxydase*
- IPS-CM : *Induced-Pluripotent Stem cells derived cardiomyocytes*, cardiomyocytes dérivés de cellules souches pluripotentes induites
- MOG1 : *Multicopy Suppressor of gsp1*
- NKA : Na⁺/K⁺ ATPase
- PA : Potentiel d'action
- PBS : *Phosphate Buffer Saline*
- PCCD : *Progressive Cardiac Conduction Disease*, troubles progressifs de la conduction cardiaque
- PKA : Protéine Kinase A
- PKC : Protéine Kinase de type C
- PLB : Phospholamban

PMCA : *Plasma Membrane Ca²⁺ ATPase*

PRE : Période Réfractaire Effective

PTP : Protéine Tyrosine Phosphatase

QTc : Intervalle QT corrigé

ROS : *Reactive Oxygen Species*, espèces réactives de l'oxygène

RS : Réticulum Sarcoplasmique

RVOT : *Right Ventricular Outflow Tract*, chambre de chasse du ventricule droit

RyR : Récepteur à la ryanodine

SAP97 : *Synapse-associated Protein 97*

SBr : Syndrome de Brugada

SEM : Standard Error of the Mean, écart standard à la moyenne

SERCA : Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase

sMiCK : *sarcomeric Mitochondrial Creatine Kinase*

SQTC : Syndrome du QT Court

SQTL : Syndrome du QT Long

SRP : Syndrome de Repolarisation Précoce

TBS : *Tris Buffer Saline*

TBS-T : *Tris Buffer Saline* + 0,1 % de Tween

TGF- β : *Transforming Growth Factor β*

VD : Ventricule Droit

VG : Ventricule Gauche

[Ca²⁺]_i / [Na⁺]_i : Concentration en Ca²⁺ / Na⁺ libre intracellulaire

Liste des figures

Figure 1 : Les différents aspects du PA au sein du tissu myocardique	4
Figure 2: Potentiels d'action humain (gauche) et murin (droite) et courants ioniques impliqués	5
Figure 3 : Le couplage excitation-contraction cardiaque	6
Figure 4 : Structure du canal sodique Nav1.5	11
Figure 5 : Le courant sodique persistant	13
Figure 6 : Le canal sodique Nav1.5 : un complexe macromoléculaire	20
Figure 7 : Schéma des régions variables des gènes <i>SLC8A1</i> et <i>SLC8A3</i> et des variants d'épissage trouvés dans le cœur, le rein et le cerveau	21
Figure 8 : Structure et topologie de NCX1	23
Figure 9 : Le mécanisme d'échange $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de NCX1 en mode normal.....	23
Figure 10 : Contribution des différents acteurs protéiques à l'influx de Na^+ à l'intérieur du cardiomyocyte de lapin.....	28
Figure 11 : Transport du Na^+ et régulation de la $[\text{Na}^+]_i$ dans le cardiomyocyte	30
Figure 12 : La Ca^{2+} /Calmoduline-dépendante protéine kinase de type II (CaMKII)	33
Figure 13 : Régulation du PLB sous l'effet d'une phosphorylation	35
Figure 14 : Régulation de l'activité du RyR par les phosphorylations	37

Figure 15 : Les mitochondries : implications dans la régulation de l'homéostasie calcique et les troubles du rythme.	39
Figure 16 : Les perturbations des homéostasies sodique et calcique à la base des troubles du rythme	42
Figure 17 : Courants ioniques impliqués dans le SQTl	46
Figure 18 : Caractérisation de la souris <i>Scn5a</i>^{+/ΔKPQ}	49
Figure 19 : Caractérisation de la souris <i>Scn5a</i> N1325S	50
Figure 20 : Caractérisation de la souris <i>Scn5a</i>^{+/Δ1798insD}	51
Figure 21 : Courbes doses-réponse de 4 inhibiteurs du courant I_{NaLate} sur les courants sodiques et potassiques	53
Figure 22 : Courants ioniques impliqués dans le SQTc	54
Figure 23 : La mutation R370H de <i>SLC4A3</i> est responsable d'un SQTc	56
Figure 24 : Caractérisation de la souris <i>Slc8a1</i>^{-/-}	57
Figure 25 : Caractérisation des souris déficientes en carnitine	578
Figure 26 : Les cellules <i>KCNH2</i> N588K, modèle cellulaire de SQTc	60
Figure 27 : Les circuits de réentrées, un mécanisme arythmogène	602
Figure 28 : Phénotype électrocardiographique du SRP	623
Figure 29 : Hypothèse mécanistique du SRP	625

Figure 30 : Influence du courant I_{NCX} sur le potentiel d'action ventriculaire de cardiomyocytes de souris adultes..... 627

Figure 31 : Deux mécanismes proposés comme origine du SBr 70

Liste des tableaux

Tableau 1 : Distribution des courants et canaux ioniques impliqués dans la génération et la propagation de l'influx électrique..... 8

Tableau 2 : Transport des ions Na^+ dans le cardiomyocyte 28

Tableau 3 : Mutations associées à un SQTl..... 47

Tableau 4 : Mutations associées à un SQTc..... 55

Avant-propos

La mort subite engendre 60 000 décès chaque année en France et représente donc un enjeu de santé publique majeur. La mort subite d'origine cardiovasculaire prend une part importante dans ces décès, et est la conséquence d'un trouble du rythme ventriculaire dans plus de 80% des cas (Fondation cœur & recherche, 2017). Ces épisodes de tachycardie ou de fibrillation ventriculaire peuvent faire suite à des pathologies rythmiques sous-jacentes, acquises ou congénitales. Parmi ces dernières, les maladies de la repolarisation ventriculaire, telles que les syndromes du QT long et du QT court congénitaux, ou encore le syndrome de repolarisation précoce, sont très arythmogènes, et la prise en charge thérapeutique d'une partie des patients atteints de ces syndromes demeure difficile.

Des variations génétiques rares situées sur des gènes codant notamment pour des canaux ioniques ont été précédemment identifiées. Ainsi des mutations sur le gène *SCN5A*, qui code pour le canal sodique cardiaque Nav1.5, ont été liées au syndrome du QT long de type 3. Plusieurs variants sur le gène *SCN5A* induisent également des cardiomyopathies dilatées. Les modèles d'étude de cette pathologie étant peu nombreux, les mécanismes qui en sont à l'origine restent en partie à définir ce qui freine le développement de traitements adaptés. La première partie de ce travail repose sur l'étude d'un nouveau modèle murin porteur d'une mutation sur le gène *SCN5A* (delQKP 1510-1512), responsable d'un syndrome du QT long de type 3 associé à une cardiomyopathie dilatée : les souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP}.

La seconde partie de cette thèse concerne l'identification et la caractérisation fonctionnelle des tout premiers variants rares sur le gène *SLC8A1*, qui code pour l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ cardiaque NCX1, associés à une pathologie chez l'Homme. Ces nouvelles mutations sont responsables d'une autre pathologie de la repolarisation ventriculaire, un syndrome de repolarisation précoce associé à un raccourcissement de l'intervalle QT. La réexpression de ces mutations humaines en système hétérologue contribuera à établir le lien entre les conséquences fonctionnelles de ces mutants et le phénotype des patients.

Chapitre 1

État de l'art

I. **Activité électrique des cellules ventriculaires cardiaques**

A. **Le potentiel d'action ventriculaire et les courants ioniques impliqués**

L'activité électrique cardiaque naît dans les cellules du nœud sinusal, et se propage de cellules en cellules sous la forme de potentiels d'action (PA). Leur propagation rapide au sein du tissu myocardique, à travers les faisceaux de His puis des fibres de Purkinje, permet une contraction simultanée des ventricules droit et gauche, assurant la circulation sanguine dans l'ensemble de l'organisme. Sur le plan biophysique, le potentiel d'action correspond à une série de variations transitoires du potentiel transmembranaire de chaque cardiomyocyte. Ces variations sont dues à la somme de courants dépolarisants et hyperpolarisants, conduisant le potentiel transmembranaire des cellules vers des valeurs plus positives ou plus négatives respectivement.

Les acteurs moléculaires de ces courants ioniques entrants ou sortants sont des protéines formant des canaux ioniques, échangeurs ou transporteurs transmembranaires localisés au niveau du sarcolemme, dont l'ouverture et la fermeture dépendent du potentiel transmembranaire, des concentrations ioniques environnantes, ou encore des forces d'étirement exercées sur les cellules (Amin et al., 2010; Bartos et al., 2015; Nerbonne et Kass, 2005). Le déroulement du PA des cellules ventriculaires est divisé en 5 phases, numérotées de 0 à 4, et dont les caractéristiques et les différents acteurs moléculaires sont décrits ci-après.

1. Phase 0 : La phase de dépolarisation

C'est l'initiation du PA. Lors de cette phase, le potentiel transmembranaire du cardiomyocyte passe d'un potentiel de repos, autour de -80 mV, à un potentiel de $+30$ mV à $+40$ mV. Cette variation de potentiel se fait de façon extrêmement brusque et transitoire, via l'entrée massive d'ions Na^+ par les canaux sodiques voltage-dépendants Nav1.5, qui possèdent des cinétiques d'activation et d'inactivation rapides, de l'ordre de quelques millisecondes

(Fozzard, 2002). L'inactivation des canaux Nav1.5 marque la fin de la phase 0 du PA ventriculaire.

2. Phase 1 : La phase de repolarisation précoce

La variation de potentiel induite lors de la phase 0 entraîne l'apparition d'un courant potassique sortant transitoire (I_{to}) produit par les canaux potassiques Kv4.3 et Kv4.2 (pour la composante rapide de I_{to}) et les canaux Kv1.4 (pour la composante lente) (Nerbonne et Guo, 2002). Suite au fort influx de sodium lors de la phase précédente, l'échangeur Na^+/Ca^{2+} cardiaque NCX1, dont le mode de fonctionnement dépend en partie du gradient électrochimique environnant, fonctionne en mode inverse de façon transitoire à ce moment du PA (Blaustein et Lederer, 1999; Reeves et Hale, 1984). La sortie de 3 ions Na^+ pour l'entrée d'un ion Ca^{2+} qui en résulte produit un courant net sortant et participe donc aussi à la phase de repolarisation précoce. Cette brève repolarisation est responsable du décrochage visible lors de la phase 1 du PA.

3. Phase 2 : La phase de plateau

Cette phase, la plus longue du PA ventriculaire, résulte d'un équilibre entre des courants dépolarisants et repolarisants, et consiste en réalité en une lente repolarisation plutôt qu'en un plateau proprement dit. Durant ce laps de temps, l'influx de charges positives est créé par l'activation des canaux calciques de type L (Cav1.2) qui génèrent le courant $I_{Ca,L}$, ainsi que par l'échangeur NCX1 qui fonctionne alors dans son mode normal et génère un courant dépolarisant. La composante persistante du courant sodique passant par Nav1.5 ($I_{Na,late}$) participe également à cette phase de plateau. En contrepartie, la balance par les courants repolarisants est induite par l'ouverture des canaux potassiques à activation rapide (Kv11.1 ou hERG) et lente (Kv7.1), responsables des courants I_{Kr} et I_{Ks} respectivement (Bers et Perez-Reyes, 1999).

4. Phase 3 : La phase de repolarisation

L'entrée de calcium dans le cardiomyocyte lors de la phase 2 enclenche une libération massive de calcium du réticulum sarcoplasmique (RS) vers le cytosol via les récepteurs à la

ryanodine (RyR), par le mécanisme de « calcium-induced calcium release ». Cette forte hausse de la concentration en calcium libre intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$), contribue à l'inactivation des canaux Cav1.2, et donc à la fin de la phase dite de plateau. La persistance des courants repolarisants I_{Ks} et I_{Kr} ramène le potentiel transmembranaire vers des valeurs de plus en plus proches de -80 mV. La partie terminale de cette repolarisation est également due à l'apparition du courant I_{K1} via les canaux Kir2.1 majoritairement, et Kir2.2 et Kir2.3 dans une moindre mesure (Delmar, 1992).

5. Phase 4 : Le potentiel de repos

Le maintien du potentiel de repos au sein des cardiomyocytes est le fait de la présence du courant I_{K1} pendant la diastole. Un léger courant dépolarisant induit par l'échangeur NCX1 est également présent pendant cette période. Ce potentiel de repos sera maintenu jusqu'à la dépolarisation par le PA suivant, généré de façon automatique par les cellules du nœud sinusal, et transmis via les jonctions intercellulaires.

La morphologie des PA n'est pas identique dans toutes les zones du myocarde. Au-delà du fait que le décours du PA diffère selon la couche cellulaire concernée (voir le sous-chapitre IC), d'autres différences sont observables à plus grande échelle au sein du tissu cardiaque. La majorité d'entre elles réside dans la présence d'une pente de dépolarisation diastolique au sein des cellules douées d'une automaticité électrique que sont les cellules du nœud sinusal, du nœud auriculo-ventriculaire et, dans une moindre mesure, du système de conduction ventriculaire. Cette instabilité du potentiel de repos a été montrée comme résultant de l'activité des courants I_f , $I_{Ca,T}$ et I_{NCX} . De par l'activation des canaux Cav1.2, ces cellules possèdent une phase de dépolarisation, plus lente que celle observée lors de la phase de dépolarisation des PA de cardiomyocytes ventriculaires, dans lesquelles la phase 0 est régie par l'activation de Nav1.5 (Boyett et al., 2000). En comparaison des PA de cellules ventriculaires, les PA de cellules atriales non-automatiques sont plus courts, du fait d'une phase de plateau raccourcie, causée par un plus faible influx calcique. En outre, leur phase de repolarisation est moins brutale, cela s'expliquant par une participation moins importante des courants potassiques repolarisants (Nerbonne and Kass, 2005). Les différences d'aspects des PA au sein du tissu cardiaque, ainsi que leur contribution à la forme de l'électrocardiogramme (ECG), reflétant l'activité électrique de surface, sont illustrées dans la figure 1.

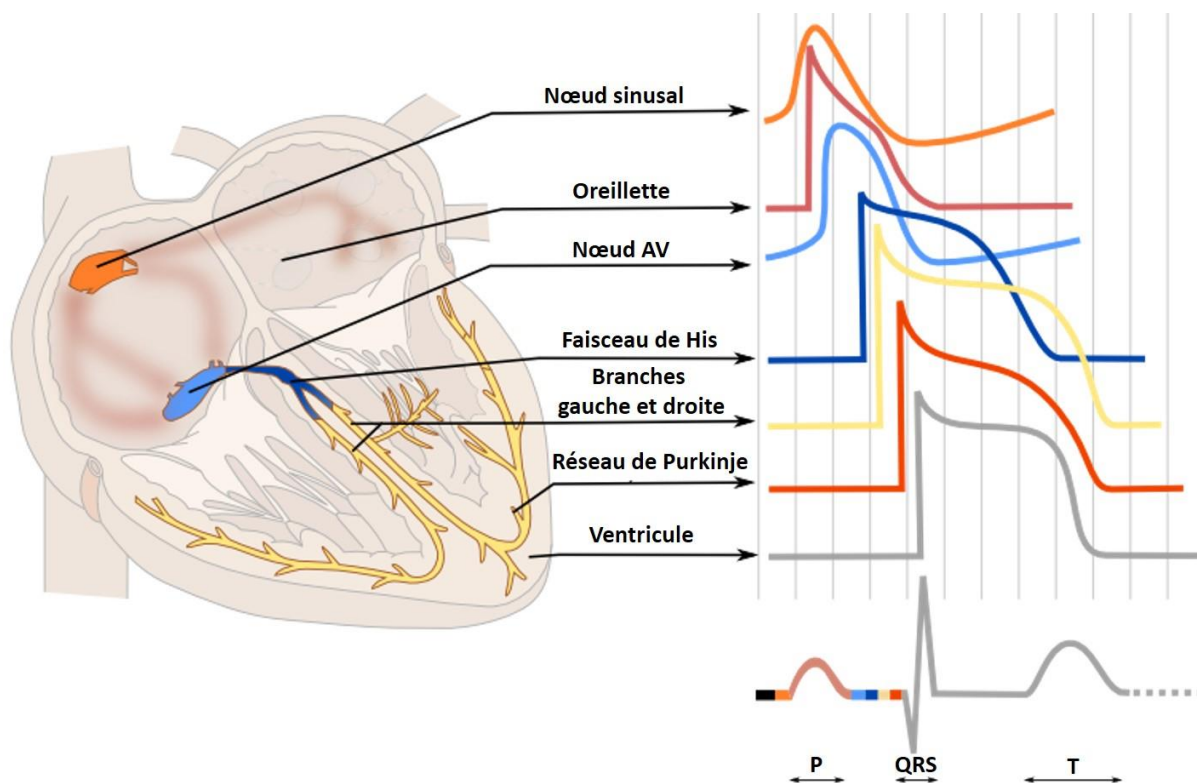


Figure 1 : Les différents aspects du PA au sein du tissu cardiaque. Le PA cardiaque est généré par les cellules du nœud sinusal, puis se propage le long du système de conduction. La morphologie du PA varie en fonction du type cellulaire, en termes de durée et d'aspect. L'ECG de surface reflète la somme des activités électriques de l'ensemble du myocarde. L'onde P correspond à la dépolarisation des oreillettes, le complexe QRS à la dépolarisation des ventricules, et l'onde T à la repolarisation ventriculaire.

La morphologie des PA varie également selon les espèces. Le décours des PA humains et murins n'est pas identique, cela s'expliquant par les différences de courants ioniques générant ces derniers (Figure 2). Si les phases 0 et 1 sont similaires, les phases 2 et 3 sont très différentes. La phase de plateau est absente chez la souris, tandis que les courants I_{Ks} et I_{Kr} sont pratiquement absents, alors qu'ils jouent un rôle prépondérant dans la phase de repolarisation humaine. Ce sont les courants $I_{Kslow 1}$ et $I_{Kslow 2}$ qui participent à la phase de repolarisation chez la souris (Nerbonne et al., 2001).

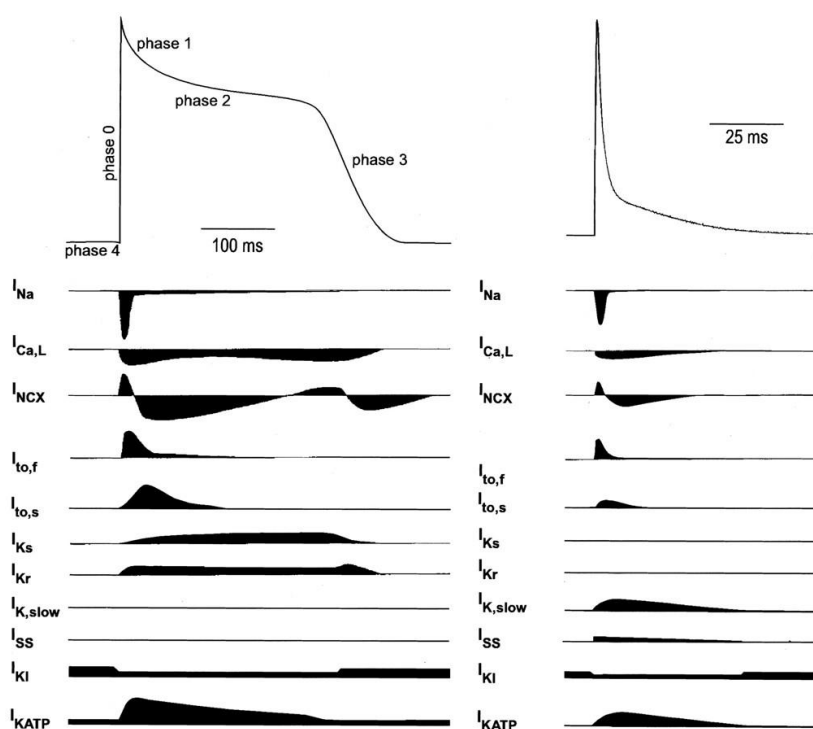


Figure 2: Potentiels d'action humain (gauche) et murin (droite) et courants ioniques impliqués. La phase 0, portée par le courant I_{Na} , initie le PA. Suite à une brève repolarisation précoce due aux courants potassiques I_{to} et à l'inactivation des canaux $Nav1.5$, une phase de plateau, d'équilibre entre des courants dépolarisants et repolarisants s'installe, celle-ci étant absente chez la souris. Le retour au potentiel de repos est induit par les courants I_{Kr} et I_{Ks} , quasiment nuls chez la souris, ce potentiel étant maintenu par la présence du courant I_{K1} . D'après Nerbonne et al., 2001.

B. Le potentiel d'action à l'origine du couplage excitation-contraction

La dépolarisation produite par l'ouverture des canaux $Nav1.5$ provoque l'ouverture des canaux $Cav1.2$. Ces derniers sont notamment localisés le long des tubules transverses (tubules t), en regard des $RyRs$, eux même situés à la membrane du RS (Scriven et al., 2000). L'activation des canaux $Cav1.2$ permet un afflux d'ions Ca^{2+} qui vont se lier aux $RyRs$ et engendrer leur ouverture. Cet évènement déclenche une sortie massive de Ca^{2+} du RS : c'est le phénomène de libération de calcium induite par le calcium ou « calcium-induced calcium release » (Fabiato, 1985). Le Ca^{2+} libéré se fixe alors à la troponine C, entraînant un changement de conformation de cette protéine. C'est seulement à l'issue de ce mouvement, qui permet le démasquage des sites d'interaction entre les filaments d'actine et de myosine, que ces deux protéines peuvent coulisser et aboutir au raccourcissement des sarcomères et donc à la contraction de la cellule (Figure 3) (Bers, 2002).

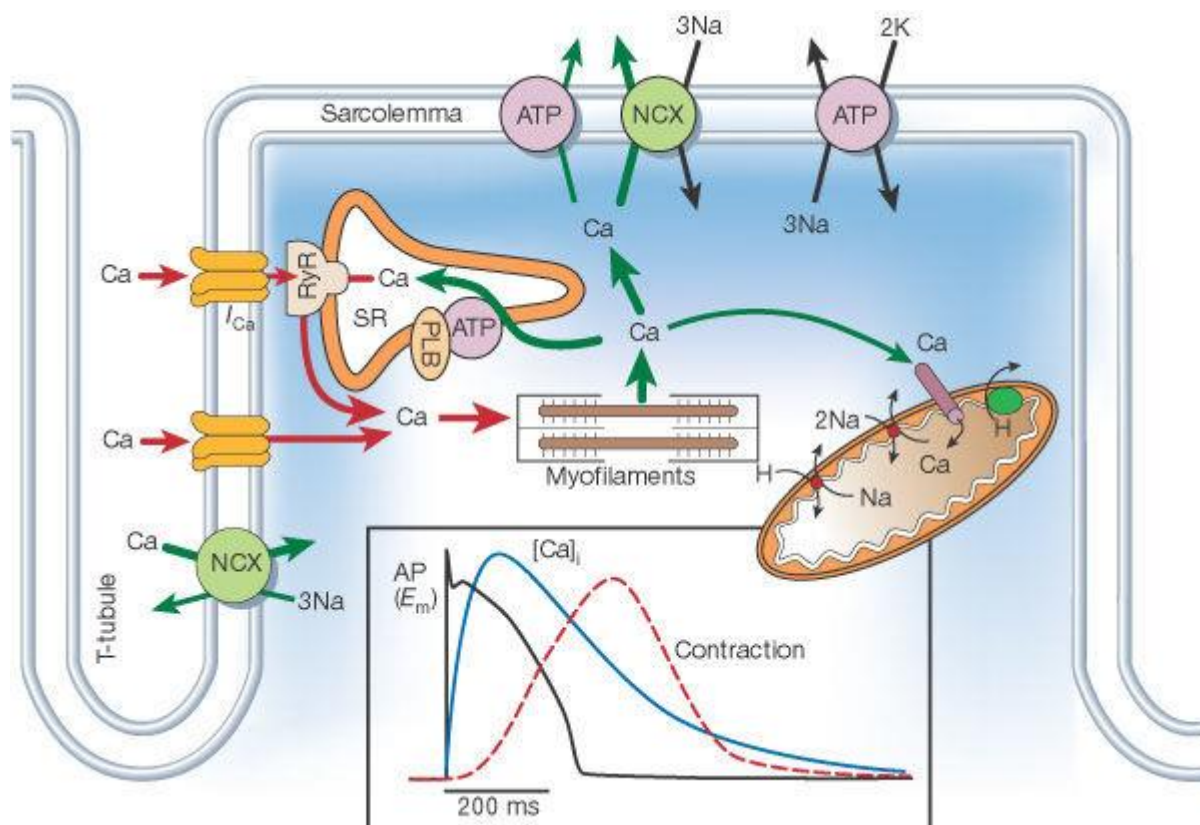


Figure 3 : Le couplage excitation-contraction cardiaque. La dépolarisation membranaire active les canaux Cav1.2. L'entrée de Ca^{2+} qui en résulte induit une libération massive de Ca^{2+} du RS. L'augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ permet la fixation de ce dernier à la troponine C, le mouvement de celle-ci provoquant l'interaction entre les filaments d'actine et de myosine et la contraction cellulaire. Le retour à une $[\text{Ca}^{2+}]_i$ normale met en œuvre une recapture du Ca^{2+} à l'intérieur du RS par la pompe SERCA (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase) ainsi qu'une extrusion via NCX1 et la PMCA (Plasma Membrane Ca^{2+} -ATPase). ATP : Adénosine TriPhosphate ; RyR : Ryanodine Receptor, Récepteur à la ryanodine ; PLB : Phospholamban. D'après Bers, 2002.

C. Le déroulement du potentiel d'action, un substrat pour le déclenchement de troubles du rythme

Comme décrit ci-avant, le déroulement du PA cardiaque est la résultante de l'activité d'une multitude d'acteurs moléculaires, chacun possédant une structure, une fonction ou encore une cinétique propre. Il n'est donc pas surprenant que l'altération d'un de ces acteurs suffise à perturber la genèse, la conduction ou encore le déroulement du PA et conduise à l'apparition d'une pathologie rythmique. Le potentiel arythmogène d'une modification de fonctionnement d'un des acteurs moléculaires impliqués dans le PA est en outre accentué par les hétérogénéités structurales et fonctionnelles qui existent au sein du tissu cardiaque, que celles-ci soient physiologiques ou pathologiques (Antzelevitch, 2007a; Wolk et al., 1999).

Par exemple, une hétérogénéité structurale peut être créée par l'apparition de fibrose autour des cardiomyocytes fonctionnels. Une telle zone perturbe et ralentit la propagation du

PA. La conduction électrique peut alors se trouver préservée dans certaines zones mais ralentie voire bloquée dans d'autres zones. L'influx électrique est alors susceptible de se propager au sein d'une boucle, un circuit fermé, créant un mécanisme dit de réentrée (de Bakker et al., 1993; Spach et Boineau, 1997). De telles zones constituent des foyers très arythmogènes et peuvent être à l'origine de tachycardies ou de fibrillations ventriculaires (Qu et Weiss, 2015).

Des hétérogénéités, non plus structurales mais électriques, et existant en dehors de tout contexte pathologique, sont présentes dans le myocarde, et constituent un substrat propice au déclenchement de troubles du rythme par l'apparition de circuits de réentrées. C'est le cas des hétérogénéités spatiales de la repolarisation, qui nous intéressent particulièrement ici. En effet, la repolarisation cardiaque ne s'effectue pas de manière tout à fait identique au sein de l'ensemble du tissu, que ce soit à l'échelle du cœur entier (variations de la repolarisation entre les oreillettes et les ventricules, inter-ventricules ou entre l'apex et la base) ou à l'échelle du tissu ventriculaire lui-même (variations de la repolarisation entre le pôle apical et le pôle basal ou transmuraux, entre l'endocarde et l'épicarde) (Antzelevitch, 2007b; Burton et Cobbe, 2001). De nombreuses études ont pu attribuer ces hétérogénéités de repolarisation chez l'Homme à des niveaux d'expression différents de canaux ioniques, qui expliquent les proportions de courants différentes au sein des cardiomyocytes (Tableau 1) (Boukens et al., 2009). Ces variations, qui concernent surtout l'amplitude des courants I_{Kr} , I_{Ks} , I_{to} , I_{NaLate} et I_{NCX} , sont responsables des particularités électriques des différentes couches de cellules et ont abouti à la distinction de 3 types cellulaires au sein du tissu ventriculaire : les cellules sous-endocardiques, mid-myocardiques et sous-épicaudiques (Antzelevitch et al., 1991). Brièvement, il est aujourd'hui démontré que ces 3 types cellulaires participent à l'hétérogénéité transmurale de repolarisation, citée comme substrat de plusieurs pathologies rythmiques. Les cellules M notamment, présentent des durées de PA supérieures aux 2 autres types cellulaires (Drouin et al., 1995), qui s'expliquent par une moins grande proportion de courant I_{Ks} (Liu et Antzelevitch, 1995; Szabó et al., 2005) et une augmentation des courants I_{NaLate} (Zygmunt et al., 2001) et I_{NCX} (Zygmunt et al., 2000).

Dans un contexte de pathologie de la repolarisation ventriculaire, un allongement ou un raccourcissement de la durée du PA peuvent donc être amplifiés et être à l'origine d'épisodes arythmiques lorsqu'ils se produisent dans de telles zones physiologiquement arythmogènes (Kuo et al., 1983).

Tableau 1 : Distribution des courants et canaux ioniques impliqués dans la génération et la propagation de l'influx électrique. D'après Boukens et al., 2009.

	Protéines	Gène codant	Distribution	Espèce	
Canaux ioniques	I_{Na}				
	Nav1.5	SCN5A	Epi  Endo	Humain, Rat, souris	
	I_{to}				
	Kv4.2	KCND2	Epi  Endo	Humain, chien, souris, cobaye	
	Kv4.3	KCND3	VG  VD	Humain, chien	
	KChIP2	KCNIP2	Epi  Endo VG  VD Apex  Base	Humain, chien Chien Humain, chien	
	I_{Ks}				
	KvLQT1	KCNQ1	Epi  Mid VG  VD Apex  Base	Humain, chien Chien Humain, chien	
	MinK	KCNE1	Epi  Mid VG  VD Apex  Base	Humain, chien Chien Humain, chien	
	I_{Kr}				
	HERG	KCNH2	Epi  Mid	Humain	
	MiRP-1	KCNE2	Epi  Mid	Humain, chien	
	Connexines	Cx43	GJA1	Epi  Endo VD  RVOT	Chien Lapin
		Cx40	GJA5	Epi  Endo	Souris

Endo : myocarde sous-endocardique ; Epi : myocarde sous-épicardique ; Mid : couche profonde du myocarde ; VD : ventricule droit ; VG : ventricule gauche ; RVOT : Right Ventricular Outflow Tract, chambre de chasse du ventricule droit

II. Le canal sodique Nav1.5

Le principal canal sodique cardiaque est composé de Nav1.5, la sous-unité α qui forme le pore du canal, et de ses sous-unités régulatrices (Rogart et al., 1989). Comme nous l'avons vu précédemment, il permet une entrée massive d'ions Na^+ dans le cardiomyocyte et est responsable de la genèse et de la propagation du PA à travers les oreillettes, le système de conduction auriculo-ventriculaire et les ventricules.

A. Génétique des canaux Nav1.X

Le canal Nav1.5 fait partie de la superfamille des canaux ioniques (Yu et Catterall, 2004). Il fut le premier membre de cette famille à être identifié mais le dernier à apparaître au cours de

l'évolution. Neuf gènes (*SCN1A* à *SCN8A* ; *SCN10A*) codent pour la famille des canaux sodiques voltages dépendants (Nav1.X), nommés de Nav1.1 à Nav1.9, et s'exprimant dans des tissus différents chez l'Homme (Goldin et al., 2000). Les sous unités Nav β , partenaires des canaux sodiques, sont codées par 4 gènes distincts : *SCN1B*, *SCN2B*, *SCN3B* et *SCN4B* (Xiao et al., 1999). En comparaison avec les autres canaux sodiques voltage-dépendants, les canaux Nav1.5, Nav1.8 et Nav1.9 forment un sous-groupe au sein de cette famille, de par leur similarité en termes de séquences, de paramètres biophysiques et de sensibilité à la tetrodotoxine, à laquelle ils sont environ 200 fois moins sensibles par rapport à l'autre sous-groupe de canaux. Ces différences de sensibilités à la tetrodotoxine s'expliquent par le changement d'un acide aminé dans la région du domaine I formant le pore du canal. Concernant Nav1.5, codé par le gène *SCN5A*, c'est la substitution d'un acide aminé phénylalanine par une cystéine en position 356 qui réduit grandement cette sensibilité (Satin et al., 1992; Sivilotti et al., 1997).

L'épissage du gène *SCN5A* est susceptible de mener à la production de 6 variants du canal sodique Nav1.5 (Nav1.5a à Nav1.5f), dont l'expression est régulée en fonction de l'espèce, ou du tissu. Leur activité électrophysiologique peut être nulle (Nav1.5b et Nav1.5f) ou sensiblement différente de par leur sensibilité au potentiel (Nav1.5a, Nav1.5d et Nav1.5e) par rapport à Nav1.5c qui est le variant majoritairement exprimé dans le cœur humain (Schroeter et al., 2010).

B. Structure et fonction

Nav1.5 est une protéine membranaire de 227 kDa constituée de 2016 acides aminés organisés en 4 domaines homologues (DI à DIV). Ces 4 domaines s'assemblent en une structure tridimensionnelle formant le pore du canal. Chacun des 4 domaines contient 6 segments transmembranaires (S1 à S6) connectés au domaine adjacent par des boucles intracytoplasmiques (Figure 4) (Catterall, 1984, 2000). Le segment S4 est composé d'acides aminés chargés positivement tous les 3 ou 4 acides aminés et permet donc la sensibilité au potentiel. La variation de potentiel parvenant à la membrane induit un mouvement de ce segment, qui cause l'ouverture du canal (Namadurai et al., 2015).

Les boucles reliant les segments 5 et 6 de chaque domaine constituent la structure par laquelle les ions Na⁺ pourront passer la membrane plasmique. Elle détermine donc les propriétés de conductance du canal et sa sélectivité aux ions Na⁺, conférée par le motif d'acides aminés DEKA (Tikhonov et Zhorov, 2011).

Comme décrit précédemment, le canal sodique Nav1.5 est responsable de la génération et de la propagation du PA cardiaque, en déclenchant la phase 0 lors de ce dernier. Il transite par

3 états : ouvert, inactivé puis fermé. Suite à l'ouverture qui suit la dépolarisation et lorsque celle-ci perdure, le canal passe en conformation inactive, état dans lequel il n'est plus capable de transporter des ions Na^+ . Les canaux doivent se réactiver, de façon à passer à l'état fermé, avant de pouvoir s'ouvrir de nouveau lors d'une prochaine dépolarisation (Dan M. Roden et al., 2002; Hodgkin et Huxley, 1952).

Une étude récente a démontré que les sous-unités α du canal s'assemblent et fonctionnent sous forme de dimères pour générer le courant I_{Na} . Cette interaction s'effectue au niveau des acides aminés 493 à 517, sur le segment transmembranaire 6 du domaine I. Ce site est très proche du site d'interaction de Nav1.5 avec une de ses protéines régulatrices, la protéine 14-3-3, cette dernière réduisant la formation de dimères de Nav1.5 et diminuant la densité de courant I_{Na} lorsqu'elle est inhibée (Clatot et al., 2017).

L'expression de Nav1.5 est hétérogène au sein du myocarde. En effet, des études ont pu montrer une plus forte densité de courant au sein des cellules sous-endocardiques en regard des cellules sous-épicardiques (Ashamalla et al., 2001; Szabó et al., 2005). L'enregistrement de PA *in situ* tend à confirmer ces observations.

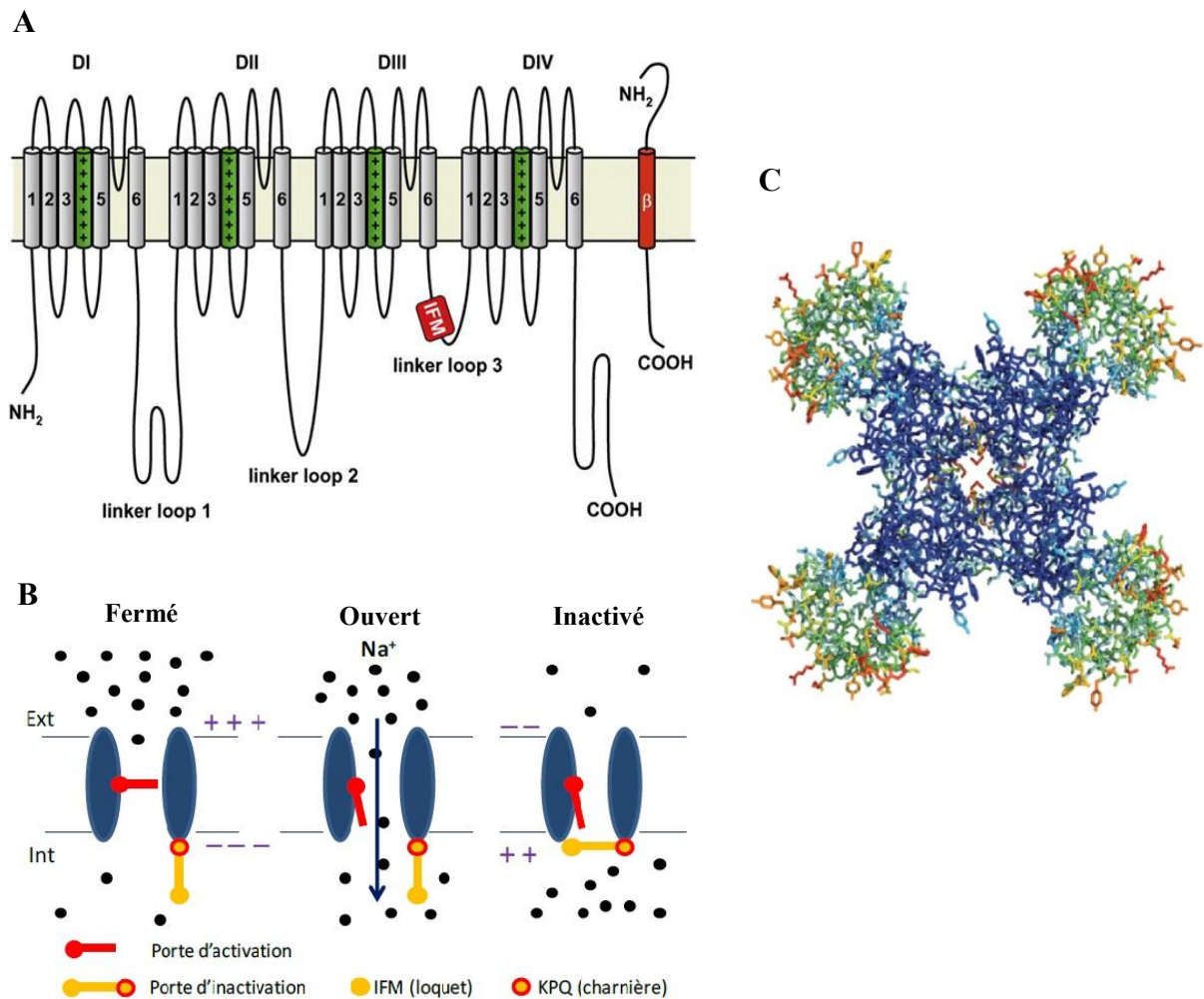


Figure 4 : Structure du canal sodique Nav1.5. **A.** La sous unité α du canal est composée de 4 domaines comprenant chacun 6 segments transmembranaires, le segment S4 jouant le rôle de senseur au potentiel. En rouge, une sous-unité β -régulatrice. D'après Abriel, 2007. **B.** La balle d'inactivation, constituée du motif de 3 acides aminés IFM, se lie à la partie intracellulaire du pore suite au repliement de la boucle reliant les domaines III et IV autour du motif KPQ, et permet l'inactivation de Nav1.5. **C.** Structure cristallographique du canal sodique bactérien NavAb . D'après Payandeh et al., 2011. DI à DIV : Domaines transmembranaires ; NH_2 : Extrémité N-terminale ; COOH : Extrémité C-terminale ; IFM : Triade d'acides aminés Isoleucine-Phénylalanine-Méthionine jouant le rôle de balle d'inactivation du canal.

C. Le courant sodique I_{Na}

Lorsqu'une dépolarisation de la membrane plasmique est détectée, le canal Nav1.5 s'active et s'inactive quasiment au même moment. La différence de cinétique entre ces deux phases, très rapide pour l'activation et plus lente pour l'inactivation, explique la forme du courant sodique. Le pic d'amplitude du courant est atteint très rapidement, en quelques millisecondes, tandis que l'inactivation met plus de temps à se terminer (Goldfarb, 2012).

1. La phase d'inactivation

Cette phase se réalise en 2 étapes : une phase d'inactivation rapide de quelques millisecondes, suivie d'une phase lente de l'ordre de plusieurs centaines de millisecondes (Goldin, 2003).

La boucle intracellulaire reliant les domaines III et IV joue le rôle de porte d'inactivation rapide. Le motif de 3 acides aminés IFM, en se liant à la partie intracellulaire du pore, permet de bloquer ce dernier et de faire passer le canal à l'état inactivé. Le motif d'acides aminés KPQ en position 1505 à 1507 jouerait le rôle de charnière pour cette porte d'inactivation, permettant le repliement de la boucle intracellulaire (Figure 4B). La partie C-terminale intracytoplasmique joue aussi un rôle dans l'inactivation du canal, notamment via l'interaction entre le motif IQ (acides aminés isoleucine et glutamine) et la calmoduline (CaM), qui permettrait de bloquer la porte d'inactivation (Patton et al., 1992; Stühmer et al., 1989).

Le mécanisme d'inactivation lente du canal Nav1.5 est moins bien décrit et semble indépendant de sa composante rapide. Néanmoins, plusieurs travaux indiquent que des structures telles que les parties N et C-terminales, ainsi que les boucles reliant les segments S4 et S5 sont impliquées dans ce phénomène (Balsler et al., 1996; Vilin et al., 1999). La phase d'inactivation lente n'est pas complète au sein des cellules du muscle cardiaque (O'Reilly et al., 1999; Richmond et al., 1998).

2. Le courant sodique persistant

Physiologiquement, un faible courant sodique persiste lors du PA suite à l'inactivation des canaux Nav1.5. En effet, une faible proportion de ces canaux se ré-ouvrent suite à la phase de dépolarisation, et sont responsables d'un courant persistant qui représente environ 0,5% du courant au pic en conditions normales (Figure 5) (Kiyosue et Arita, 1989; Maltsev et Undrovinas, 2006; Patlak et Ortiz, 1985). Ce courant a été le sujet de nombreuses études lors des 50 dernières années, en étant qualifié successivement de « courant de fenêtre » (Attwell et al., 1979), « courant à l'état stable » (Colatsky, 1982), « courant d'inactivation lente » (Carmeliet, 1987; Gintant et al., 1984), « courant retardé » (Wasserstrom et Salata, 1988), « courant lent » (Liu et al., 1992) ou encore « courant persistant » (Saint et al., 1992). Malgré sa faible amplitude, la forte résistance membranaire durant la phase de plateau du PA lui permet d'influer grandement sur la durée de ce dernier, ainsi que sur l'homéostasie sodique à l'intérieur

des cardiomyocytes (Makielski, 2009). La mesure de ce courant s'effectue 300 ms au moins après la dépolarisation. En dessous de ce temps, c'est plutôt une inactivation incomplète qui est mesurée, prenant en compte le ralentissement de la cinétique d'inactivation du canal. L'implication de ce courant dans un contexte de syndrome du QT long (SQTL) de type 3 a été largement démontrée, notamment via l'application de mexiletine ou de ranolazine, des inhibiteurs relativement spécifiques de ce courant I_{NaLate} , capables de réduire l'amplitude de ce courant et de raccourcir du même coup l'intervalle QTc chez les patients (Benhorin et al., 2000; Moss et al., 2008). En outre, plusieurs études ont pu corrélérer le SQTL de type 3 à des mutations induisant des gains de fonction de Nav1.5 via une augmentation du courant I_{NaLate} (Abriel et al., 2001; Bennett et al., 1995; Dumaine et al., 1996; Wang et al., 2008; Zhang et al., 2014).

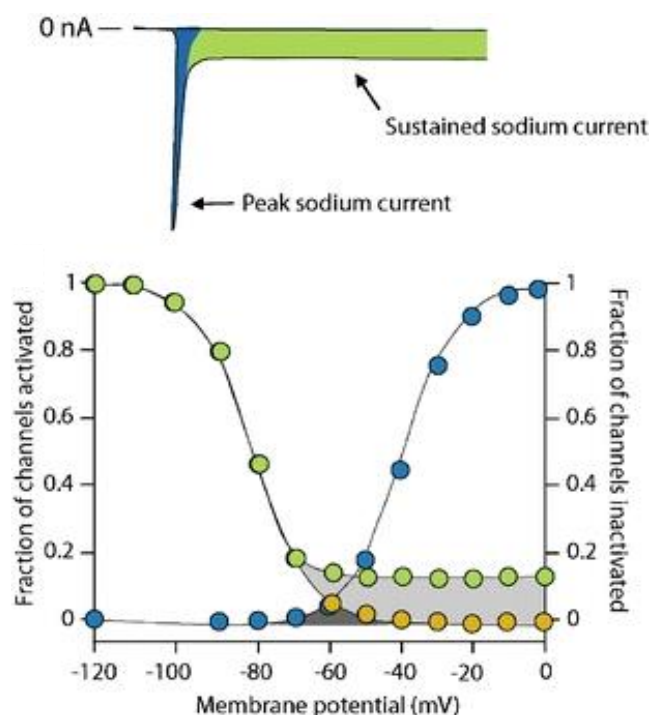


Figure 5 : Le courant sodique persistant. Haut : L'inactivation incomplète des canaux Nav1.5 provoque l'apparition d'un courant sodique entrant persistant. Bas : L'apparition d'un courant sodique persistant n'est pas due à un décalage de la courbe d'inactivation du courant I_{Na} . D'après Amin et al., 2010.

D. Régulation du canal Nav1.5

Le canal Nav1.5 fait partie d'un complexe macromoléculaire, et sa fonction est finement régulée par de nombreuses protéines partenaires. Parmi celles-ci, on trouve les sous-unités β régulatrices du canal, des protéines d'ancrage du canal à la membrane plasmique, des protéines

modifiant ses propriétés biophysiques, ou encore des enzymes modulant sa structure via des modifications post-traductionnelles (Figure 6) (Abriel et al., 2015).

1. Les sous-unités β régulatrices

Le canal Nav1.5 s'associe avec une ou plusieurs sous-unités β , de $\beta 1$ à $\beta 4$. Ces sous-unités sont des protéines transmembranaires et sont localisées de manière précise le long de la membrane plasmique. Dans le cœur de souris, les sous-unités $\beta 1$ et $\beta 2$ sont colocalisées au niveau des disques intercalaires et des tubules t, tandis que les sous-unités $\beta 3$ et $\beta 4$ sont exprimées seulement au niveau des tubules t et au niveau des disques intercalaires, respectivement (Maier et al., 2004). Ces acteurs moléculaires sont capables de moduler l'expression et les propriétés biophysiques du canal. Chez l'Homme, des mutations sur des gènes codant pour des sous-unités β de Nav1.5 sont responsables de maladies rythmiques cardiaques telles que le SQT (Medeiros-Domingo et al., 2007), le syndrome de Brugada (SBr), des troubles de conduction (Watanabe et al., 2008) ou encore des fibrillations atriales (Watanabe et al., 2009) ou ventriculaires idiopathiques (Valdivia et al., 2010).

2. Les protéines d'ancrage

Plusieurs protéines partenaires de Nav1.5 entrent en jeu pour un adressage optimal du canal à la membrane plasmique. Ces acteurs augmentent la densité de canaux exprimés à la surface cellulaire, sans modifier les paramètres biophysiques de ceux-ci.

a. L' α -actinine 2

L' α -actinine 2 est une protéine de structure qui a déjà été montrée comme interagissant et régulant l'adressage à la membrane de plusieurs canaux potassiques, notamment les canaux Kv1.5 (Steele et al., 2007). Elle est localisée au niveau des stries Z dans le cardiomyocyte, stries parfaitement observables sur des immunomarquages de cette protéine. Des expériences de pull-down ont pu démontrer son interaction avec Nav1.5 au niveau de la boucle intracellulaire reliant les domaines III et IV du canal, un endroit proche du site de la mutation delQKP 1507-1509 qui nous intéresse tout particulièrement (Ziane et al., 2010). La co-expression de l' α -actinine 2 avec Nav1.5 en cellules tsA201 augmente la densité de courant de Nav1.5 via une plus grande

expression sarcolemmique de ce dernier. Ce partenaire semble constituer un intermédiaire entre Nav1.5 et le complexe dystrophine/syntrophine ainsi qu'avec l'ankyrine G, et est de ce fait important pour l'intégrité du cytosquelette cellulaire (Ziane et al., 2010). Des mutations sur l' α -actinine 2 ont été corrélées avec des arythmies ventriculaires et une cardiomyopathie hypertrophique chez l'Homme (Chiu et al., 2010).

b. L'ankyrine-G

Les protéines de type ankyrine sont capables de transporter et d'ancrer d'autres protéines au réseau d'actine et de spectrine du cytosquelette cellulaire. Trois gènes, *ANK1-3* codent pour les protéines ankyrine 1, B et G respectivement ; seules les deux dernières sont exprimées au niveau cardiaque (Cunha et Mohler, 2006). Si aucune étude n'a démontré d'interaction directe entre Nav1.5 et l'ankyrine-B, c'est le cas pour l'ankyrine-G, au niveau de la boucle intracellulaire reliant les domaines II et III du canal (Lemaillet et al., 2003). L'ankyrine-G est localisée préférentiellement dans les disques intercalaires et est également liée aux protéines spectrine et CaMKII (Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II). Des études ont aussi démontré sa présence au sein du réseau de tubules t (Hund et al., 2010). Un défaut d'interaction entre Nav1.5 et l'ankyrine G peut mener à un défaut d'adressage du canal à la membrane plasmique, comme cela a été observé lors de l'expression dans des cardiomyocytes de rats d'une mutation induisant un SBr chez l'Homme (Mohler et al., 2004). Des variants rares sur le gène *ANK2* sont pour leur part corrélés à des troubles rythmiques variés parmi lesquels on retrouve notamment le SQTl de type 4 (Mohler et al., 2003).

c. La syntrophine α -1

La syntrophine α -1, exprimée à la membrane latérale des cardiomyocytes, fait le lien entre la partie C-terminale de Nav1.5 et la protéine dystrophine (Gavillet et al., 2006). Deux mutations faux-sens sur le gène *SNTA1*, qui code pour la syntrophine α -1, ont été identifiées chez des patients atteints d'un SQTl congénital, ce qui souligne le rôle de cette protéine dans la régulation de Nav1.5 (Ueda et al., 2008; Wu et al., 2008a). L'étude fonctionnelle de la mutation A390V sur la syntrophine α -1 a montré que ce variant conduit à une augmentation du courant I_{NaLate} , décrite comme conséquence d'une hausse de nitrosylation de Nav1.5. Une étude récente a pu montrer que l'interaction entre la partie N-terminale de Nav1.5 et la syntrophine α -1 augmente l'expression sarcolemmique de Nav1.5 mais aussi des canaux à rectification

entrante Kir2.1 et Kir2.2 (Matamoros et al., 2016). Ces travaux permettent de mieux comprendre les mécanismes régulant l'excitabilité et la propagation de l'influx électrique au niveau ventriculaire et soulignent encore une fois le rôle non-canonique de Nav1.5 et son implication dans un important complexe macromoléculaire.

d. Les protéines MAGUK (membrane-associated guanylate kinases)

Parmi les protéines de la famille MAGUK, la SAP97 (Synapse-associated Protein 97), exprimée aux jonctions cellules-cellules (Funke et al., 2005), est capable de réguler la localisation et la fonction de canaux potassiques cardiaques et induit une diminution de la densité de canaux Nav1.5 au sarcolemme lorsqu'elle voit son expression réduite (Petitprez et al., 2011). De façon similaire à ce qui a été démontré au sujet de la syntrophine α -1, la SAP97 interagit avec le complexe protéique rassemblant Nav1.5 et Kir2.1 pour réguler l'excitabilité cardiaque et la propagation de l'influx électrique dans le cœur. L'inhibition de SAP97 a pour effet de diminuer les densités de courant I_{K1} et I_{Na} (Milstein et al., 2012).

La protéine CASK (Ca²⁺/calmodulin-dépendant serine protein kinase) fait également partie des MAGUK et régule Nav1.5 en interagissant avec ce dernier sur sa partie C-terminale. Eichel et ses collaborateurs ont mis en évidence que la protéine CASK est responsable d'une réduction de l'adressage de Nav1.5 aux membranes latérales des cardiomyocytes (Eichel et al., 2016).

e. MOG1 (Multicopy Suppressor of gsp1)

La protéine MOG1, capable de réguler le trafic de protéines nucléaires, est exprimée au niveau cardiaque (Marfatia et al., 2001) et interagit avec Nav1.5 au niveau de la boucle reliant les domaines II et III (Wu et al., 2008b). MOG1 augmente la densité de courant I_{Na} , sans affecter les paramètres biophysiques du canal, suggérant que MOG1 favorise une expression sarcolemmique optimale de Nav1.5 (Kattygnarath et al., 2011).

3. Les protéines régulant l'activité de Nav1.5

A l'inverse des protéines d'ancrage, plusieurs acteurs moléculaires modulent la fonction de Nav1.5 via des modifications de ses paramètres biophysiques. Nous nous focalisons dans

ce travail sur la protéine CaM, dont nous avons montré l'implication dans le phénotype des souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP}.

a. La calmoduline

Il est aujourd'hui bien décrit que l'homéostasie calcique à l'intérieur des cardiomyocytes module la fonction de nombreux canaux ioniques, dont Nav1.5 (Pitt, 2007; Saimi et Kung, 2002). De par sa capacité à fixer des ions Ca^{2+} , la CaM joue le rôle de senseur de la concentration calcique libre intracellulaire (Chin et Means, 2000). La partie C-terminale de Nav1.5 possède un motif IQ, constitué d'une séquence consensus capable de fixer la CaM, et plusieurs études ont démontré une interaction directe entre ces deux acteurs protéiques (Deschênes et al., 2002; Kim et al., 2004; Tan et al., 2002; Wang et al., 2012). Les travaux de cristallographie de Wang et ses collaborateurs ont aussi mis à jour des interactions au sein d'un complexe ternaire CaM-FGF13-Nav1.5 via le motif IQ de celui-ci. Les conséquences de la liaison CaM-Nav1.5 sont controversées. Certaines études ont rapporté que la stabilité et la dépendance au potentiel de l'état inactivé de Nav1.5 étaient dépendantes de la CaM et du motif IQ (Kim et al., 2004; Motoike et al., 2004; Tan et al., 2002; Young et Caldwell, 2005). D'autres travaux ont démontré que la CaM n'était pas le seul senseur pour la régulation Ca^{2+} -dépendante de Nav1.5, puisqu'un domaine EF-hand, présent sur la partie C-terminale du canal, peut jouer ce rôle en liant les ions Ca^{2+} (Shah et al., 2006; Wingo et al., 2004). Le rôle de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sur la fonction de Nav1.5 a été étudié par l'équipe de Casini. Ils ont démontré que la conductance des canaux Nav1.5 est diminuée lorsque la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ est augmentée (Casini et al., 2009).

b. Autres protéines régulant l'activité de Nav1.5

En plus de la CaM, d'autres protéines sont capables de réguler l'activité de Nav1.5 en modulant les paramètres biophysiques du canal voire en augmentant la proportion de courant I_{NaLate} , comme c'est le cas de la cavéoline-3 (Cronk et al., 2007; Vatta et al., 2006), dont des mutations sont impliquées dans le SQTl, la mort subite du nourrisson, ou la cardiomyopathie hypertrophique (Cohen et al., 2004).

Les autres protéines sont susceptibles de réguler Nav1.5 en induisant un décalage des courbes d'activation ou d'inactivation, comme c'est le cas des protéines 14-3-3 (Allouis et al., 2006), FHF1B (Fibroblast growth factor Homologous Factor) (Liu et al., 2003), GPD1L (Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase-like Protein), dont des mutants ont été corrélés au SBr et à la mort

subite du nourrisson (London et al., 2007; Van Norstrand et al., 2007), téléthonine (Mazzone et al., 2008 ; Hayashi et al., 2004) pour une implication dans des cas de cardiomyopathies dilatées et hypertrophiques, plakophiline-2 (Sato et al., 2009 ; Gerull et al., 2004) pour une implication dans la dysplasie arythmogène du ventricule droit, desmogléine (Pilichou et al., 2006 et Rizzo et al., 2012) pour une implication dans un cas de dysplasie arythmogène du ventricule droit et $\alpha\beta$ -crystalline (Huang et al., 2016 ; Brodehl Andreas et al., 2017) pour une implication dans une forme de cardiomyopathie dilatée.

4. Les protéines kinases et phosphatases

En plus des protéines d'ancrage et des protéines modifiant les paramètres biophysiques de Nav1.5, des enzymes sont capables, par des modifications post-traductionnelles, de réguler l'activité de ce canal.

a. La CaMKII

Les protéines CaMKII sont des sérine/thréonine kinases exprimées dans de nombreux types cellulaires, au sein desquels elles traduisent une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire en phosphorylation de protéines cibles, dont font partie les canaux ioniques cardiaques (Couchonnal et Anderson, 2008). L'isoforme dominante dans le cœur est la CaMKII δ c (Maier, 2009), qui co-immunoprécipite et colocalise avec Nav1.5 dans le cœur (Wagner et al., 2006; Yoon et al., 2009), et cible plusieurs sites sur le canal, dont les sérines 516 et 571 ainsi que la thréonine 594. Cette interaction se fait au niveau de la première boucle intracellulaire de Nav1.5 (Ashpole et al., 2012; Hund et al., 2010). La CaMKII δ c voit son activité régie par la formation préalable d'un complexe Ca^{2+} -CaM, et est capable de phosphoryler d'autres acteurs moléculaires dans les cardiomyocytes (Hund et Mohler, 2015). Cette voie de signalisation CaMKII-dépendante et son implication dans les pathologies rythmiques cardiaques seront développées plus en détail dans la partie IV-B de cette introduction.

La surexpression de CaMKII δ c dans des souris transgéniques et des cardiomyocytes isolés de lapins est responsable d'un décalage de la courbe d'inactivation de Nav1.5 vers des potentiels plus hyperpolarisés, d'un ralentissement de la levée d'inactivation et d'une augmentation du courant I_{NaLate} (Aiba et al., 2010). Ces modifications biophysiques sont identiques à celles observées dans des modèles de SQT1 de type 3 (Kass, 2005).

La CaMKII δ c voit son activité augmentée dans des modèles animaux et humains d'insuffisance cardiaque (Maier, 2009; Maier et Bers, 2002). Dans l'autre sens, chez les souris transgéniques, la surexpression de CaMKII δ c induit une insuffisance cardiaque ainsi que des troubles du rythme ventriculaire (Maier et al., 2003; Wagner et al., 2006).

Ce faisceau d'observations démontre l'implication de cette protéine dans des contextes d'insuffisance cardiaque et de troubles du rythme, et en fait une cible privilégiée pour le développement de nouvelles thérapies cardioprotectrices (Couchonnal et Anderson, 2008).

b. Les protéines kinase A (PKA), C (PKC), et Fyn

Une stimulation neuro-hormonale des récepteurs β -adrénergiques active la PKA de façon AMPc-dépendante (Adénosine MonoPhosphate Cyclique), module les propriétés électriques cardiaques et produit des effets dromotropes (relatif à la vitesse de conduction de l'influx électrique), chronotropes (relatif à la fréquence cardiaque), inotropes (relatif à la force contractile du myocarde) et lusitropes (relatif à la relaxation cardiaque) positifs (Baker, 2014; Richardson et al., 1967). En contexte pathologique, la stimulation adrénérergique peut être un évènement arythmogène, notamment dans le cas du SQTl ou de cardiomyopathies. La modulation de la fonction des canaux ioniques joue un rôle dans ces évènements (Najafi et al., 2016).

En effet, la PKA est capable de phosphoryler plusieurs protéines cibles, parmi lesquels les canaux Cav1.2, la pompe SERCA (Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase), les RyRs, ou encore le canal sodique Nav1.5 (Lundby et al., 2013). Sur ce dernier, la PKA est responsable des phosphorylations sur les sérines 525 et 528 et régule les cinétiques d'activation de Nav1.5 (Murphy et al., 1996).

La PKC est aussi susceptible de réguler les cinétiques d'inactivation de Nav1.5, son activité dépendant cette fois d'une activation des récepteurs α 1-adrénergiques (Talosi et Kranias, 1992). Une activation de la PKC a été reliée à la survenue d'une cardiomyopathie dilatée et des défauts de contractilité. Les mécanismes sous-jacents ne sont pas totalement élucidés, mais les hypothèses d'une phosphorylation de Nav1.5 ou d'un dérèglement du métabolisme cellulaire et d'une hausse consécutive des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans la cellule sont proposées (Valdivia et al., 2009).

La protéine tyrosine kinase Fyn est, elle, responsable de la phosphorylation de Nav1.5 sur le site 1495, proche du motif IFM. Cette proximité peut expliquer le décalage de la courbe

d'inactivation de Nav1.5 vers des potentiels moins négatifs, observé lors d'études fonctionnelles en système de réexpression hétérologue (Ahern et al., 2005).

c. Les protéines tyrosine phosphatases

Les canaux ioniques ne sont pas seulement régulés par des phosphorylations, puisque également sujets à l'action de protéines tyrosine phosphatases.

La protéine PTPH1 est l'une d'entre elles et est capable de modifier les propriétés biophysiques de Nav1.5 suite à une co-expression en cellules HEK293 en décalant la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs. Cette action s'effectue par l'interaction avec un domaine PDZ localisé sur le canal Nav1.5, domaine formé par les 3 acides aminés de la protéine, en position 2014 à 2016 (Jespersen et al., 2006).

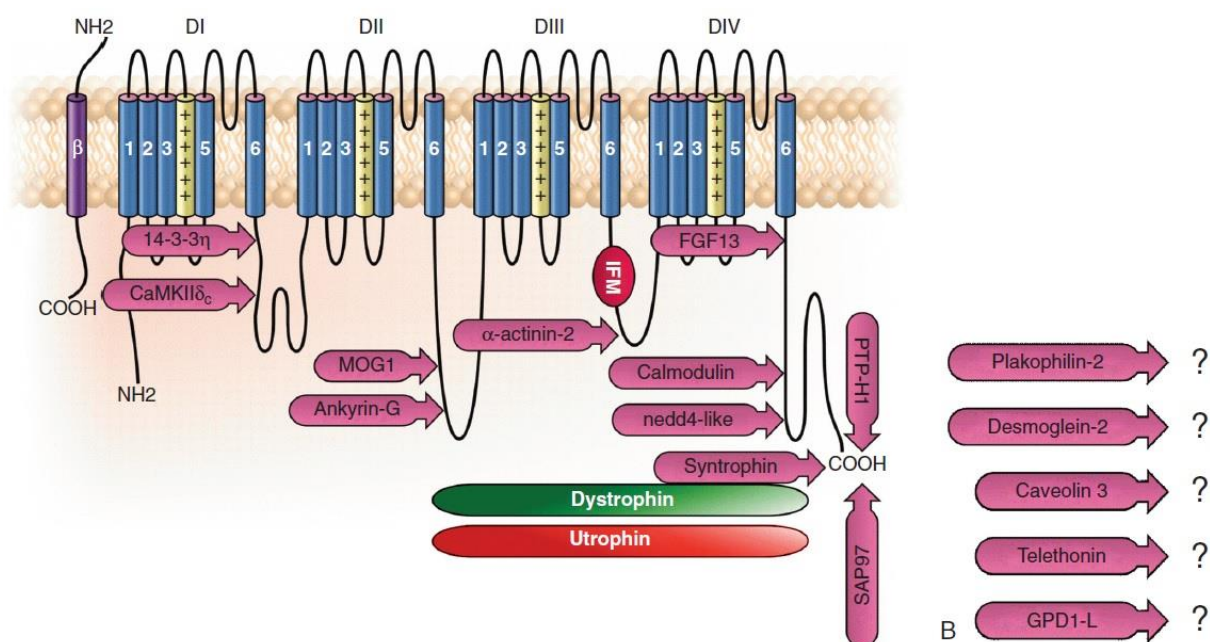


Figure 6 : Le canal sodique Nav1.5 : un complexe macromoléculaire. Le canal sodique Nav1.5 interagit avec de nombreux partenaires protéiques comprenant les sous-unités β -régulatrices, des protéines d'ancrage, des protéines régulant ses propriétés biophysiques, ou encore des enzymes modulant sa fonction par des modifications post-traductionnelles. D'après Abriel et al., 2015.

III. L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ NCX1

A. La famille de gènes *SLC8*

La famille de gènes *SLC8* code pour de nombreuses protéines échangeuses d'ions $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, qui permettent de réguler la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Blaustein et Lederer, 1999; Carafoli, 1987), et qui appartiennent à la famille des antiports $\text{Ca}^{2+}/\text{cation}$ (Lytton, 2007).

Chez les mammifères, 3 gènes *SLC8* différents ont été identifiés : *SLC8A1*, 2 et 3, qui codent respectivement les protéines NCX1 (Nicoll et al., 1990), 2 (Lee et al., 1994) et 3 (Nicoll et al., 1996). Le gène *SLC8B1* code lui pour la forme mitochondriale de l'échangeur, la protéine NCLX (Palty et al., 2010). Les 3 isoformes de NCX ont une expression tissu-spécifique, les isoformes NCX2 et NCX3 étant exprimées dans le cerveau et les muscles squelettiques, tandis que NCX1 est distribué dans pratiquement toutes les cellules de l'organisme, notamment les cardiomyocytes (Philipson et Nicoll, 2000).

Dix-sept variants d'épissage ont été décrits pour NCX1, et 5 pour NCX3, provenant de la combinaison de 6 petits exons (A, B, C, D, E et F) localisés sur une région de la grande boucle f intracytoplasmique de l'échangeur, tous les variants comprenant au moins l'exon A ou B. Les tissus excitables contiennent l'exon A (NCX1.1) tandis que d'autres organes tel que le rein (NCX1.3), contiennent l'exon B (Kofuji et al., 1994).

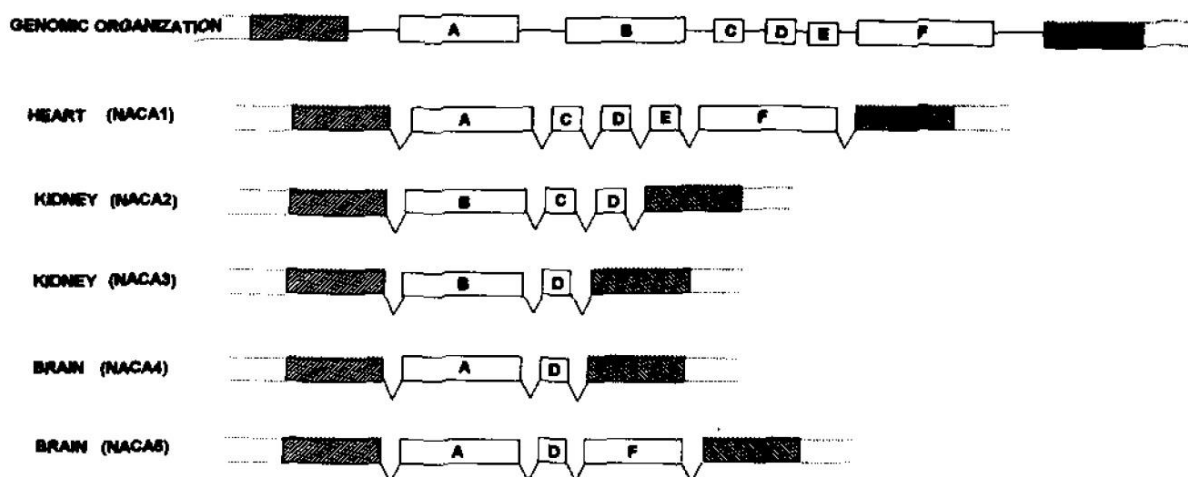


Figure 7 : Schéma des régions variables des gènes *SLC8A1* et *SLC8A3* et des variants d'épissage trouvés dans le cœur, le rein et le cerveau. L'organisation génomique des gènes *SLC8A1* et *SLC8A3* contient les 6 exons A à F. Chaque variant d'épissage contient forcément un des exons A ou B ainsi qu'une combinaison entre les exons C à F, aboutissant à 17 variants pour *SLC8A1* et 5 pour *SLC8A3*. Les zones noires représentent des régions conservées. D'après Kofuji et al., 1994.

B. Structure et fonctionnement de NCX1

L'échangeur NCX1 est une protéine transmembranaire, dont la structure n'est pas totalement certaine. Initialement décrit comme possédant 12 (Nicoll et al., 1990), 11 (Durkin et al., 1991) puis 9 segments transmembranaires (Nicoll et al., 1999), il est aujourd'hui quasiment accepté que NCX1 comprenne plutôt 10 segments transmembranaires, de façon similaire à l'échangeur bactérien (NCX_Mj) cristallisé chez *Methanococcus jannaschii* en 2012 (Figure 8) (Liao et al., 2012).

Les segments transmembranaires 5 et 6 sont reliés par une grande boucle régulatrice intracytoplasmique d'environ 500 acides aminés. Cette dernière contient une séquence auto-inhibitrice (XIP) de 20 acides aminés à son extrémité N-terminale (Li et al., 1991), ainsi que 2 domaines de liaison au Ca^{2+} (CBD1 et CBD2) (Hilge et al., 2006). La structure de l'échangeur est illustrée dans la figure 8. Les 2 régions où se réalise le passage des ions se trouvent entre les segments 2 et 3 (région α -1, lieu de passage des ions Na^+) et 7 et 8 (région α -2, lieu de passage des ions Ca^{2+}). L'échangeur possède 4 sites de fixation, 3 pour les ions Na^+ et 1 pour les ions Ca^{2+} , le passage de ces 2 espèces ioniques se faisant par deux voies différentes et de façon non-simultanée (Liao et al., 2012). Ce fonctionnement est appelé mécanisme de ping-pong ou consécutif (Niggli et Lederer, 1991) et est présenté dans la figure 9. Il est important de noter que le ratio de 3 ions Na^+ importés pour la sortie d'un ion Ca^{2+} de la cellule ne semble pas être le seul existant. En effet, en fonction des concentrations sodiques et calciques intra et extracellulaires, des modes de forte (entrée de 4 ions Na^+ pour la sortie d'un ou 2 ions Ca^{2+}) ou de faible conductance (ratio 1 : 1) de NCX1 ont pu être observés (Kang et Hilgemann, 2004). La structure tridimensionnelle de NCX1 révèle que 8 des 10 segments transmembranaires (2 à 5 et 7 à 10) forment une structure dense et perpendiculaire à la membrane plasmique tandis que les segments 1 et 6 sont légèrement à l'écart à chaque extrémité et inclinés à 45° , l'ensemble formant une structure symétrique. Les mouvements de rapprochement et d'éloignement des segments 1 et 6 avec le reste de la structure exposeraient les sites de fixation aux ions d'un côté ou de l'autre de la membrane, ce qui est en accord avec le mécanisme de translocation séparée des 2 espèces ioniques prises en charge par l'échangeur.

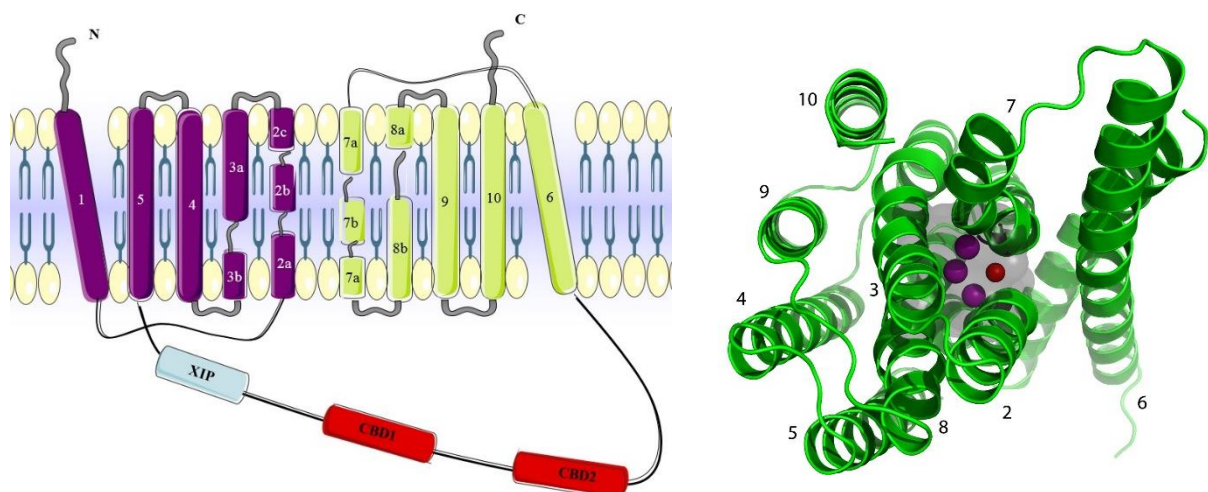


Figure 8 : Structure et topologie de NCX1. Gauche : L'échangeur NCX1 est constitué de 10 segments transmembranaires, les segments 5 et 6 étant séparés par la boucle f régulatrice sur laquelle on retrouve une séquence auto-inhibitrice ainsi que 2 domaines de liaison au Ca^{2+} . Droite : La structure cristallographique de NCX1 montre l'assemblage des segments transmembranaires en une structure tridimensionnelle au centre de laquelle transitent séquentiellement les 3 ions Na^+ (violet) et 1 ion Ca^{2+} (rouge). D'après Khananshvil, 2013. Les segments transmembranaires sont numérotés de 1 à 10. N et C : Extrémités N et C-terminales. XIP : Séquence auto-inhibitrice. CBD1 et 2 : Calcium Binding Domains, Domaines de liaison au Ca^{2+} .

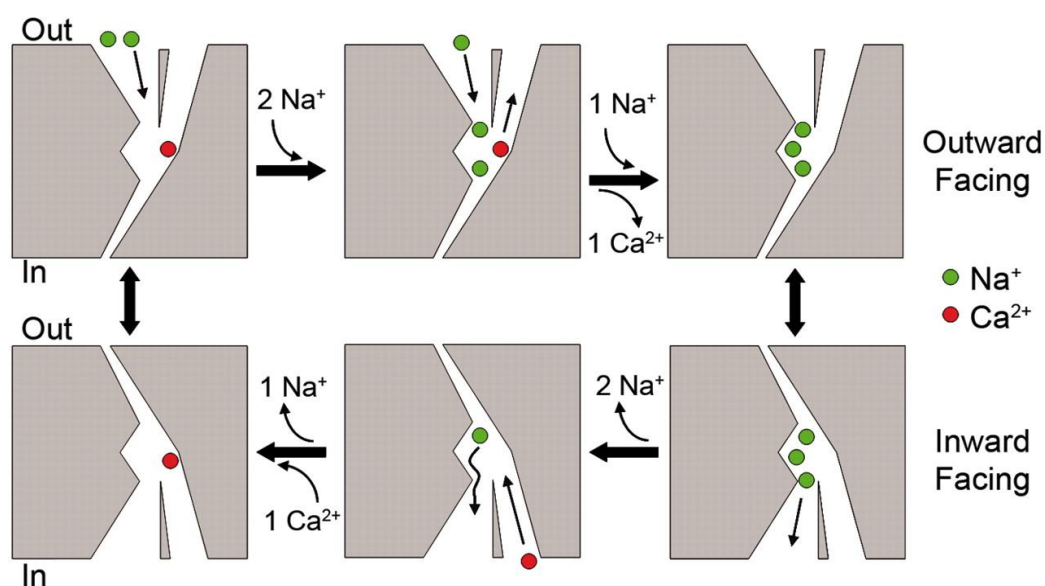


Figure 9 : Le mécanisme d'échange $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de NCX1 en mode normal. Le transport des ions Na^+ et Ca^{2+} à travers l'échangeur NCX1 se fait selon un mode ping-pong ou consécutif. En conformation ouverte vers l'extérieur, l'entrée de 2 et surtout d'un 3^{ème} ion Na^+ diminue l'affinité de l'ion Ca^{2+} en place pour son site de fixation. Suite au passage de l'échangeur en conformation ouverte vers le cytosol, les 3 Na^+ , exposés à un milieu à basse $[\text{Na}^+]_i$, sont libérés. Le départ du dernier ion Na^+ restaure la liaison d'un nouvel ion Ca^{2+} sur l'échangeur pour permettre ensuite son extrusion vers le milieu extracellulaire. D'après Liao et al., 2012.

C. Rôles physiologiques de NCX1

Les différentes isoformes d'échangeurs NCX contribuent à de multiples fonctions dans l'organisme, aussi variées que la vasoconstriction des cellules musculaires lisses (Zulian et al.,

2010), la sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas (Herchuelz et al., 2007), la sécrétion de neurotransmetteurs au niveau du système nerveux central (Kettenmann et al., 2011), la réabsorption du Ca^{2+} dans le rein (Jeon, 2008), ou encore la réponse immunitaire dans les cellules dendritiques et les lymphocytes B (Kim et al., 2012).

Les fonctions de NCX1 dans la physiologie cardiaque peuvent être divisées en 2 : un rôle électrique et un rôle de régulation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

1. Contribution électrique de NCX1

Au niveau ventriculaire, NCX1 contribue au décours du PA. Son fonctionnement en mode normal, qui aboutit à la sortie d'un ion Ca^{2+} pour l'entrée de 3 ions Na^+ , produit un courant net entrant dans le cardiomyocyte. Ce courant dépolarisant est présent durant la phase de plateau du PA. L'échangeur est aussi en partie responsable de la phase de repolarisation précoce, de par son bref fonctionnement en mode inverse durant cette phase, qui mène à un courant hyperpolarisant (Blaustein et Lederer, 1999; Reeves et Hale, 1984).

Au niveau atrial, l'activité de NCX1 est en partie responsable de l'automaticité des cellules du nœud sinusal, en participant à la pente de dépolarisation diastolique (Lakatta Edward G. et al., 2008).

La délétion totale du gène *Slc8a1* chez la souris ne permet pas la naissance de souriceaux du fait d'une absence de rythme cardiaque spontané (Wakimoto et al., 2000), tandis qu'un KO spécifique de NCX1 cardiaque permet le développement des souris jusqu'à l'âge adulte, ce qui suggère un rôle important de NCX pour l'apparition d'une fonction cardiaque optimale (Henderson et al., 2004).

2. Contribution de NCX1 à l'homéostasie calcique

La pompe PMCA (Plasma Membrane Ca^{2+} ATPase) et NCX1 sont les 2 principaux acteurs responsables de l'extrusion de Ca^{2+} de la cellule. La PMCA est plutôt active pour une régulation de fond, au repos, de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, tandis que NCX1 est capable de répondre à de fortes et transitoires variations de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Brini et Carafoli, 2011). L'échangeur NCX1 peut fonctionner en mode normal ou en mode inverse en fonction des concentrations calcique et sodique intracellulaires et du potentiel transmembranaire de la cellule. Dans certains contextes, et notamment dans le cas de l'insuffisance cardiaque, le fonctionnement en mode inverse de

l'échangeur peut prendre une plus grande part et donc faire varier la $[Na^+]_i$, ce qui fait de NCX1 un régulateur de l'homéostasie sodique (Bers, 2002).

L'échangeur mitochondrial NCLX contribue aussi aux homéostasies calcique et sodique dans le cytosol et les mitochondries, bien que son fonctionnement et sa régulation ne soient pas encore totalement compris (Mammucari et al., 2011).

D. Mécanismes régulateurs de l'activité de NCX1

Le fonctionnement de l'échangeur NCX1 est finement régulé par plusieurs paramètres, le principal étant la régulation ionique, la boucle f intracytoplasmique jouant un grand rôle dans ce phénomène.

NCX1 est régulé par les ions Ca^{2+} et Na^+ cytosoliques, sur des sites de fixation différents des sites de translocations de ces ions (Matsuoka et al., 1993, 1995). Les travaux de Hilge et ses collaborateurs ont permis d'identifier 2 CBDs, sur la boucle f régulatrice de l'échangeur, et l'interaction du Ca^{2+} avec ces domaines active NCX1 (Hilge et al., 2006). Une hausse de $[Ca^{2+}]_i$ lève l'inactivation de l'échangeur dépendante du Na^+ , et à l'inverse, une augmentation de $[Na^+]_i$ inactive NCX1 (Hilgemann et al., 1992). Le mécanisme d'inactivation du canal par le Na^+ n'est pas élucidé mais ne peut pas être expliqué par une liaison de Na^+ aux CBDs puisque le Na^+ n'affecte pas la liaison du Ca^{2+} aux CBDs (Boyman et al., 2011). Ces travaux ont par ailleurs démontré que NCX1 est également très sensible aux variations de pH intracellulaire, les protons pouvant se lier aux CBDs et entrer en compétition avec les ions Ca^{2+} , et donc que les CBDs pourraient jouer le rôle de senseurs au Ca^{2+} mais aussi au pH.

Des travaux ont démontré que le CBD1 possédait 4 sites de liaison au Ca^{2+} , quand le CBD2 n'en contient que 2 (Besserer et al., 2007; Johnson et al., 2008). Des études électrophysiologiques ont montré que parmi ces 6 sites de fixation au Ca^{2+} , seuls 2 sur le CBD1 et 1 sur le CBD2 jouaient un rôle dans la régulation de NCX1 par la $[Ca^{2+}]_i$. Ces deux domaines sont par ailleurs capables de réguler de façon synergique l'activité de NCX1, la séquence d'acides aminés liant les CBDs jouant un rôle important dans ce processus (Giladi et al., 2010; Ottolia et al., 2009). La fixation du Ca^{2+} sur les CBDs engendrerait une rigidification de l'ensemble comprenant ces 2 CBDs et les acides aminés qui les relient, produisant une stabilisation de la boucle f dans un état permettant la translocation des ions Na^+ et Ca^{2+} de part et d'autre de la membrane plasmique (Salinas et al., 2011). La présence de plusieurs sites de fixation au Ca^{2+} sur les CBDs ainsi que la possibilité pour ces derniers de fonctionner en synergie permet des modulations différentes de la fonctionnalité de l'échangeur autour d'une

large gamme de $[Ca^{2+}]_i$. Ces capacités sont indispensables au vu du rôle de NCX1 au sein du cardiomyocyte notamment, dans lequel les $[Ca^{2+}]_i$ varient de façon importante sur des durées courtes, notamment au niveau des diades et de l'espace sous-membranaire. Ainsi, seul 5% du courant d'échange I_{NCX} est détecté au repos tandis qu'une élévation de à 1-2 μM de la $[Ca^{2+}]_i$ permet une mesure de I_{NCX} maximale (Boyman et al., 2011). En plus de la modulation de l'activité de NCX1 via la liaison du Ca^{2+} aux CBDs, John et ses collaborateurs ont émis l'hypothèse qu'une dimérisation des protéines NCX1 pouvait contribuer à leur hausse d'activité (John et al., 2011).

Même si la régulation ionique de NCX1 semble être prépondérante pour sa fonctionnalité, cet échangeur est aussi susceptible de voir son activité ou son expression modulées par d'autres acteurs. Des régulations métaboliques par l'ATP, via la production de PIP2 qui peut interagir avec NCX1, ont été décrites (Hilgemann et Ball, 1996). C'est également le cas des créatine kinases sMiCK (sarcomeric Mitochondrial Creatine Kinase) et CKM (Muscle-type Creatine Kinase) pouvant réguler NCX1 suite à leur phosphorylation par la PKC (Yang et Kao, 2013).

La protéine CaM a été décrite comme interagissant avec la boucle régulatrice de NCX1 et régule son activité d'échangeur ionique (Chou et al., 2015).

Des régulations génétiques et épigénétiques de NCX1 ont aussi été mises à jour, notamment en contextes pathologiques tels que l'insuffisance cardiaque, où l'expression de NCX1 est généralement augmentée (Menick et al., 2007).

Enfin, NCX1 est sujet à la palmitoylation sur sa cystéine 739, l'absence de cette modification post-traductionnelle entraînant une résistance à l'inactivation de l'échangeur et donc une activité accrue en comparaison de la forme palmitoylée de la protéine (Reilly et al., 2015).

IV. Homéostasies sodique et calcique dans le cardiomyocyte

Les concentrations intracellulaires en ions Na^+ et Ca^{2+} influent grandement sur les fonctions électriques et contractiles des cardiomyocytes. Si ces 2 espèces ioniques génèrent un courant dépolarisant lors du PA de la cellule cardiaque, les flux de Ca^{2+} et de Na^+ ont des effets différents dans la cellule. Les flux de Ca^{2+} génèrent d'énormes différences de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, cette dernière pouvant être multipliée par 10 suite à la libération de Ca^{2+} . Ces fortes variations font du Ca^{2+} un remarquable second messenger régulant la contraction cellulaire et la transcription notamment. Les variations de $[\text{Na}^+]_i$ sont moins importantes et plus lentes et cette espèce ionique ne possède pas de rôle autre que son rôle dans l'électrophysiologie cellulaire. Cependant, de fortes $[\text{Na}^+]_i$ sont susceptibles d'influer sur le transport d'autres espèces ioniques comme le Ca^{2+} , comme cela se produit dans le cardiomyocyte en favorisant le fonctionnement en mode inverse de NCX1 (Despa et Bers, 2013).

Plusieurs acteurs moléculaires sont responsables de la régulation de ces concentrations ioniques, et des dysfonctionnements de ces acteurs peuvent mener à l'apparition de pathologies rythmiques, notamment des maladies de la repolarisation cardiaque.

Dans cette partie, nous nous attacherons à décrypter comment sont régulées ces processus et de quelle manière des dérèglements peuvent aboutir à des contextes pathologiques.

A. Homéostasie sodique

1. Les acteurs des flux sodiques

A l'état basal, la $[\text{Na}^+]_i$ est d'environ 10 mM quand la concentration sodique dans le milieu extracellulaire est d'environ 140 mM. La $[\text{Na}^+]_i$ augmente en parallèle de la fréquence de stimulation du cardiomyocyte, du fait de l'activation des canaux Nav1.5 et des échangeurs NCX1 (Cook et al., 1997). Sous stimulation, NCX1 contribue majoritairement à l'entrée de Na^+ dans le cardiomyocyte, ce qui est moins le cas au sein d'une cellule quiescente (figure 10). En plus de ce dernier et de l'échangeur NCX1, 2 autres protéines sont majoritairement responsables de flux de Na^+ au travers de la membrane plasmique des cardiomyocytes : l'échangeur Na^+/H^+ , responsable d'un influx d'ions Na^+ dans le cardiomyocyte, et la pompe Na^+/K^+ ATPase (NKA), qui extrude 3 ions Na^+ contre l'entrée de 2 ions K^+ en échange de la consommation d'ATP, et

maintient la $[Na^+]_i$ à des niveaux bas. Enfin, d'autres acteurs protéiques permettent le passage des ions Na^+ au travers de la membrane plasmique : les cotransporteurs Na^+/HCO_3^- et $Na^+/K^+/2Cl^-$, ainsi que l'antiport Na^+/Mg^{2+} , qui sont toutes des molécules responsables d'une entrée de Na^+ dans la cellule. L'ensemble des protéines transporteuses d'ions Na^+ dans le cardiomyocyte sont présentées dans le tableau 2 (pour une revue sur le sujet, voir Despa et Bers, 2013).

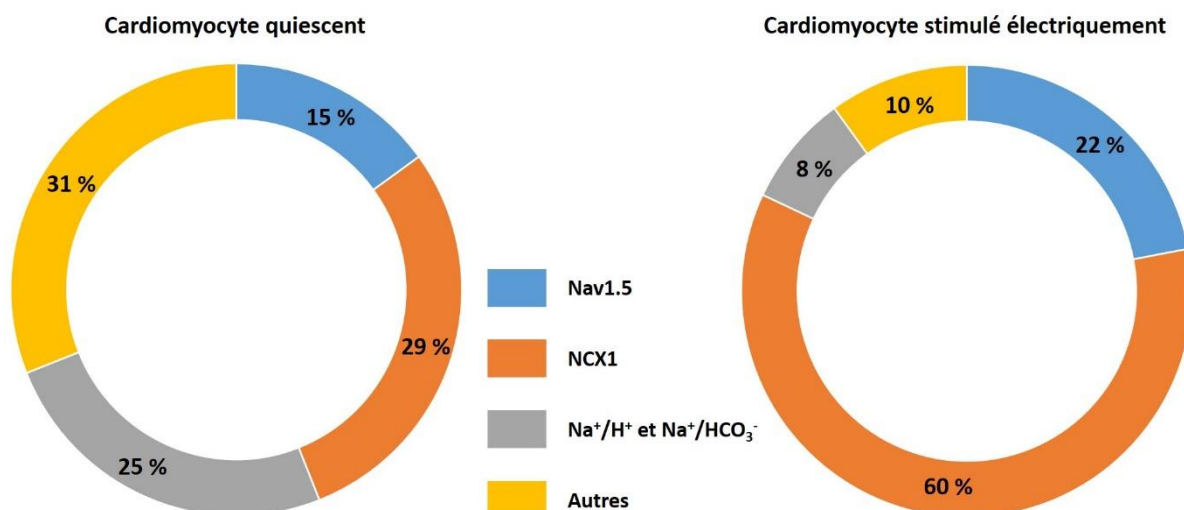


Figure 10 : Contribution des différents acteurs protéiques à l'influx de Na^+ à l'intérieur du cardiomyocyte de lapin. La part que prennent les différents canaux et échangeurs de Na^+ dans l'influx de Na^+ dépend de l'état de stimulation de la cellule. Sous une stimulation électrique à la fréquence de 1 Hz, NCX1 est majoritairement responsable de l'entrée de Na^+ dans le cardiomyocyte, ce qui n'est pas le cas dans une cellule quiescente. Modifié d'après Despa et Bers, 2013.

Tableau 2 : Transport des ions Na^+ dans le cardiomyocyte. D'après Despa et Bers, 2013

	Nickname	Transport and stoichiometry
<i>Na extrusion pathways</i>		
Na^+/K^+ -ATPase	Na^+ pump, I_{pump}	3 Na^+ :2 K^+ exchange
<i>Na⁺ influx pathways</i>		
Na^+ channel/current	I_{Na}	Uncoupled
Na^+/Ca^{2+} exchanger ^c	NCX	3 Na^+ :1 Ca^{2+} exchange ^d
Na^+/H^+ exchanger	NHE	1 Na^+ :1 H^+ exchange
Na^+/HCO_3^- cotransporter	NBC	1 Na^+ :1 HCO_3^- cotransport ^d
$Na^+/K^+/2Cl^-$ cotransporter	NKCC	1 Na^+ :1 K^+ :2 Cl^- cotransport
Na^+/Mg^{2+} antiporter	NaMgX	2 Na^+ :1 Mg^{2+} exchange

2. Perturbations de l'homéostasie sodique

Des perturbations de l'homéostasie sodique à l'intérieur du cardiomyocyte, et notamment une augmentation de la $[Na^+]_i$, ont déjà été corrélées à plusieurs pathologies cardiaques. Ainsi, plusieurs travaux réalisés sur des modèles animaux ou des échantillons humains ont démontré une hausse de $[Na^+]_i$ en présence d'une insuffisance cardiaque (Despa et al., 2002; Pieske et Houser, 2003; Pogwizd et al., 2003). Ceci est la cause d'une augmentation préalable de la $[Ca^{2+}]_i$, induite par 2 phénomènes : une diminution de la fonction de la pompe SERCA causant une baisse de la recapture du Ca^{2+} dans le RS, ainsi que la présence de fuite de Ca^{2+} du RS par les RyRs engendrant des sparks ou vagues calciques et contribuant donc à augmenter la $[Ca^{2+}]_i$. Cette élévation de la $[Ca^{2+}]_i$ augmente la fonctionnalité de NCX1, ce qui a pour conséquence une hausse de la $[Na^+]_i$, d'autant plus que l'expression de cet échangeur est souvent augmentée dans un contexte d'insuffisance cardiaque (Pogwizd et al., 2001). En outre, des désordres de l'homéostasie calcique intracellulaire sont susceptibles de modifier les cinétiques d'inactivation de Nav1.5 par l'intermédiaire de l'activation de la CaMKII notamment, également activable lors de la surproduction de ROS (Ashpole et al., 2012). L'excès de Na^+ dans les cellules myocardiques peut également avoir pour origine une activité accrue de l'échangeur Na^+/H^+ , induite par une acidose intracellulaire en présence d'insuffisance cardiaque. L'inhibition de cet échangeur, et la diminution de $[Na^+]_i$ qui en découle, permet d'ailleurs d'atténuer le développement d'une insuffisance cardiaque (Baartscheer et al., 2008). Enfin, l'efflux de Na^+ du cardiomyocyte peut également être un paramètre impacté dans le cas d'une insuffisance cardiaque, comme le montrent 2 études, dans lesquelles des diminutions de l'expression et de la fonction de la pompe Na^+/K^+ ATPase ont été démontrées (Kilic et al., 2005; Semb et al., 1998).

A l'inverse des études décrites ci-dessus, l'augmentation de $[Na^+]_i$ peut ne pas être un effet secondaire d'une pathologie déjà présente mais la cause primaire d'une dysfonction myocardique. C'est le cas dans les SQT1 de type 3, causées par des mutations ayant un effet gain de fonction sur le canal Nav1.5, en augmentant la proportion de courant I_{NaLate} (Antzelevitch et al., 2014). Cette hausse primaire de la $[Na^+]_i$ peut engendrer une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$, via un fonctionnement accru de NCX1 en mode inverse, et provoquer des désordres du cycle du Ca^{2+} , phénomène à la base de troubles rythmiques (Belardinelli et al., 2015). Les relations entre troubles des homéostasies sodique et calcique seront décrites plus

précisément par la suite. Le schéma présenté sur la figure 11 synthétise les modes de transports de Na^+ dans la cellule et les conséquences d'une augmentation de la $[\text{Na}^+]_i$.

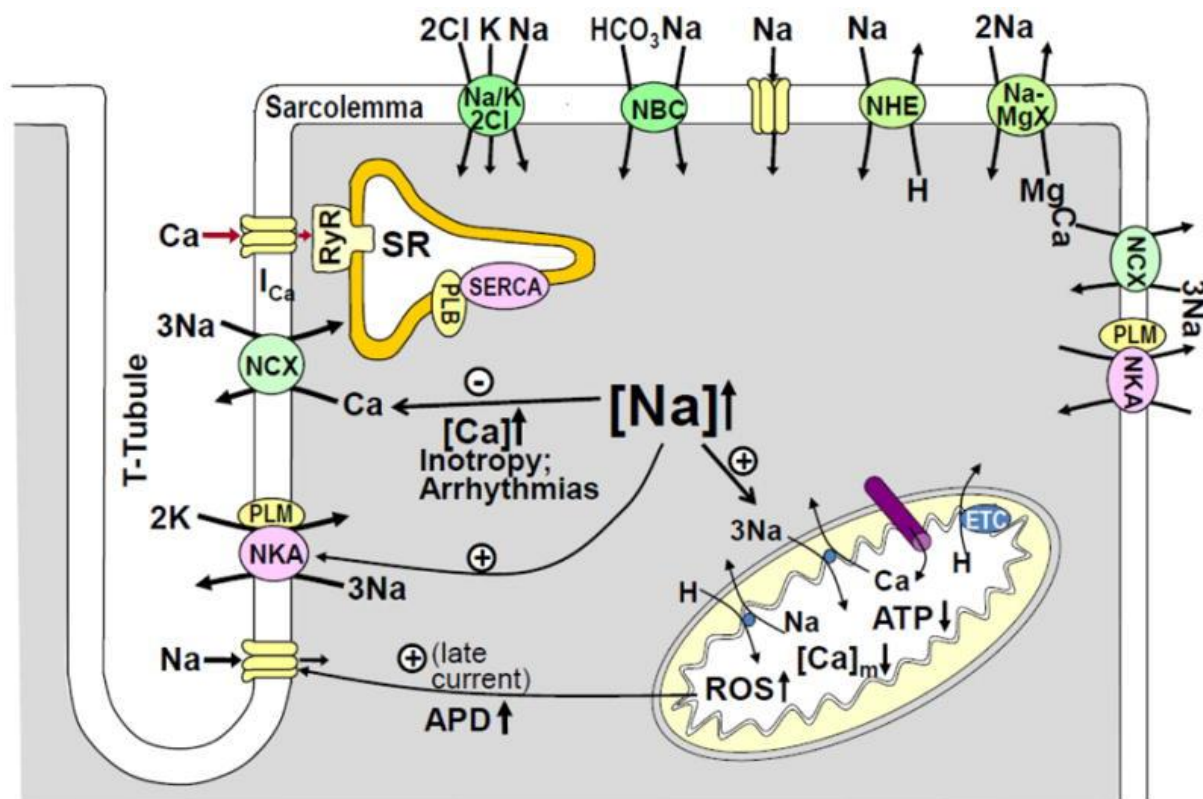


Figure 11 : Transport du Na^+ et régulation de la $[\text{Na}^+]_i$ dans le cardiomyocyte. Divers canaux, échangeurs et transporteurs, localisés au niveau du sarcolemme, du RS ou de la mitochondrie régulent la $[\text{Na}^+]_i$ dans le myocyte cardiaque. Une augmentation de la $[\text{Na}^+]_i$, pouvant être la cause ou la conséquence de pathologies rythmiques cardiaques, est responsable en particulier d'une hausse de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, à la base du déclenchement d'épisodes arythmiques à l'échelle du myocarde. D'après Despa et Bers, 2013. PLM : Phospholemman, régulateur de la pompe Na^+/K^+ ATPase. APD : Action Potential Duration, durée du PA.

B. Homéostasie calcique

Les variations cycliques de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dans les cardiomyocytes régissent les processus de contraction et de relaxation du cœur. Des dérégulations du cycle du Ca^{2+} mènent à des dysfonctions systoliques, diastoliques et à un remodelage pathologique. Dans cette partie, nous allons décrire les mécanismes moléculaires responsables de la régulation de l'homéostasie calcique à l'échelle cellulaire, et aborder les conséquences de perturbations du cycle du Ca^{2+} .

1. Les acteurs des flux calciques

La dépolarisation qui parvient à la membrane plasmique du cardiomyocyte permet un premier influx de Ca^{2+} dans le cytosol par l'ouverture des canaux Cav1.2. L'activation de ces canaux, localisés le long des tubules t, en regard des RyRs, engendre l'ouverture de ces derniers. Les canaux RyRs sont responsables d'une seconde augmentation de Ca^{2+} dans le compartiment cytosolique, beaucoup plus importante que la première, et provenant cette fois du RS. Cette sortie de Ca^{2+} est suffisante pour initier la force contractile via le mouvement des filaments d'actine et de myosine.

La relaxation de la cellule correspond à la diminution de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, ce qui se produit par 2 mécanismes principaux. Le premier est la recapture du Ca^{2+} cytosolique vers le RS par la pompe SERCA, responsable d'environ 75% de la diminution de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Le second mécanisme correspond à l'extrusion d'environ 15% du Ca^{2+} vers le milieu extracellulaire par NCX1, en échange de l'entrée d'ions Na^+ . La PMCA, participe également, mais de façon mineure, à l'extrusion du Ca^{2+} de la cellule. En conditions physiologiques, la quantité de Ca^{2+} entrant par les canaux Cav1.2 est extrudée par NCX1, et la quantité libérée par les RyRs correspond à celle recapturée par la pompe SERCA dans le RS, ce qui assure une balance équilibrée des flux de Ca^{2+} dans le cardiomyocyte.

Ces flux calciques peuvent être modulés, par exemple en réponse à une stimulation β -adrénergique, pour répondre aux besoins de l'organisme. Les catécholamines libérées lors d'une stimulation sympathique vont activer les récepteurs β_1 -adrénergiques et provoquer la production d'AMPc qui va activer la PKA, cette dernière induisant la phosphorylation de plusieurs cibles. Notamment, la phosphorylation de Cav1.2 augmente l'afflux de Ca^{2+} , tandis que la phosphorylation du PLB sur sa sérine 16 engendre la libération de cette petite protéine de la pompe SERCA et lève l'inhibition de celle-ci, ce qui favorise la recapture du Ca^{2+} dans le RS. En outre, l'élévation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durant chaque cycle contractile induit l'activation de la CaMKII par le complexe Ca^{2+} -CaM. La CaMKII est capable de phosphoryler le PLB sur sa thréonine 17 ce qui lève là encore l'inhibition de la pompe SERCA. La phosphorylation des RyRs, par la PKA sur les sérines 2808 et 2030 et par la CaMKII sur la sérine 2814, participe aussi à la modulation de l'homéostasie calcique. De multiples revues décrivent les mécanismes moléculaires mis en jeu lors du couplage excitation-contraction et notamment le rôle du Ca^{2+} dans ce dernier (Figure 3) (Bers, 2002; Eisner et al., 2017).

Dans le cadre de cette thèse, quelques-uns des acteurs moléculaires du cycle du Ca^{2+} nous intéressent plus particulièrement, de par leur implication dans les phénomènes arythmiques observés dans le cadre des maladies de la repolarisation cardiaque, et notamment du SQTL de type 3.

a. La CaMKII

La protéine CaMKII est composée de 3 domaines : un domaine N-terminal catalytique, un domaine de régulation, et le domaine C-terminal responsable de l'association à d'autres protéines (Figure 12) (Hoelz et al., 2003). Le domaine régulateur maintient l'activité du domaine catalytique de l'enzyme à un niveau réduit en conditions basales. Lors d'une hausse de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, un complexe Ca^{2+} -CaM se lie au domaine de régulation de la CaMKII ce qui a pour effet d'activer l'enzyme et de l'exposer à d'autres régulations augmentant son activité comme la phosphorylation (Braun et Schulman, 1995), la glycosylation (Erickson et al., 2013), l'oxydation (Erickson et al., 2008) ou encore la nitrosylation (Coultrap et Bayer, 2014). Suite à sa liaison avec le complexe Ca^{2+} -CaM, la CaMKII va s'autophosphoryler, ce qui permet de maintenir son activité catalytique en absence de CaM ou de Ca^{2+} .

Les cibles de la CaMKII sont nombreuses parmi les protéines impliquées dans le maintien des concentrations ioniques à l'intérieur de la cellule : les canaux Cav1.2 (Bers et Morotti, 2014) et Nav1.5 (Wagner et al., 2006), les RyRs (Camors et Valdivia, 2014), ainsi que des canaux potassiques (Mustroph et al., 2014) et chlore (Sellers et al., 2010). La phosphorylation des RyRs est connue pour favoriser l'ouverture de ces canaux (Hain et al., 1995), tandis que la phosphorylation de Nav1.5 par la CaMKII induit des pertes de fonction via des modifications des paramètres biophysiques du canal, exception faite du courant I_{NaLate} , qui voit sa proportion augmentée (Wagner et al., 2006).

Concernant le contexte pathologique, la CaMKII voit son expression et son activité augmentée dans plusieurs maladies cardiaques, incluant l'insuffisance cardiaque et les arythmies (Hoch et al., 1999; Kirchhefer et al., 1999; Yao et al., 2011; Zhang et Brown, 2004). Les souris transgéniques surexprimant la CaMKII présentent des troubles de la repolarisation associés à des épisodes de fibrillation ventriculaire. Ces animaux développent également rapidement une insuffisance cardiaque. Ce travail a pu démontrer que la surexpression de la CaMKII perturbe l'homéostasie calcique à l'intérieur des cardiomyocytes de ces souris, en augmentant notamment les fuites de Ca^{2+} du RS, un phénomène fortement arythmogène (Maier

et al., 2003). En parallèle, les souris invalidées pour la CaMKII au niveau cardiaque montrent une résistance à l'insuffisance cardiaque (Bucks et al., 2009).

Enfin, en plus de son action sur le canal sodique Nav1.5 et de son rôle dans la régulation de la $[Ca^{2+}]_i$, la CaMKII peut aussi être localisée au niveau nucléaire et activer la transcription de certains gènes, impliqués notamment dans l'hypertrophie cardiaque (Heineke et Molkenin,

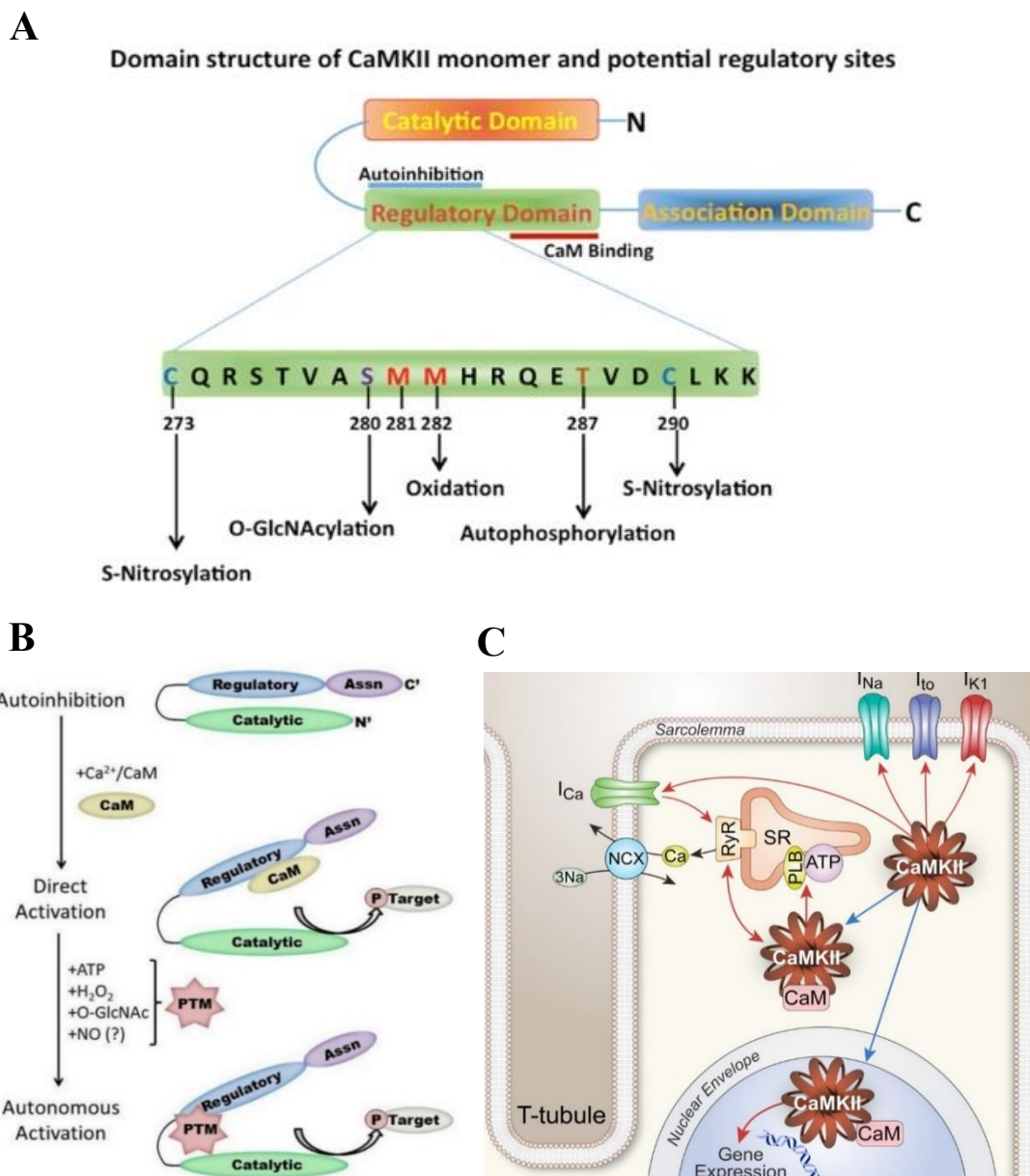


Figure 12: La Ca^{2+} /Calmoduline-dépendante protéine kinase de type II (CaMKII). **A.** Structure de la CaMKII et sites potentiels de régulation par des modifications post-traductionnelles. D'après Zhang, 2017. **B.** Mécanismes d'activation de la CaMKII. Suite à la levée de l'auto-inhibition par la fixation du complexe Ca^{2+} -CaM à la CaMKII, celle-ci peut être activée par une autophosphorylation, une oxydation, une O-GlcNAcylation ou une nitrosylation. La CaMKII possède dès lors une activité autonome indépendante de la présence du complexe Ca^{2+} -CaM. D'après Erickson, 2014. **C.** Cibles de la CaMKII dans le cardiomyocyte. La CaMKII est capable de réguler la fonction de plusieurs canaux, échangeurs ou protéines impliqués dans l'homéostasie calcique, ainsi que d'influer sur l'expression de certains gènes. D'après Swaminathan *et al.*, 2012. Assn : Domaine d'association de la CaMKII. PTM : Post-translational modifications, modifications post-traductionnelles.

2006) ou encore l'inflammation (Singh et al., 2012). La structure, les cibles, et la régulation de l'activité de la CaMKII sont illustrées dans la figure 12.

b. La pompe SERCA et le PLB

La pompe SERCA est responsable de la recapture dans le RS de la majeure partie du Ca^{2+} libéré dans le cytosol lors de la systole. Cette recapture se réalise contre le gradient chimique de Ca^{2+} , et consomme donc de l'ATP. Plusieurs isoformes de cette pompe existent dans l'organisme, la SERCA2a étant l'isoforme cardiaque (Periasamy et Kalyanasundaram, 2007). L'activité de cette pompe est régulée par le PLB, une petite protéine de 52 acides aminés, localisée à la membrane du RS (MacLennan et Kranias, 2003). Les monomères de PLB sont liés à la pompe SERCA et maintiennent une inhibition de celle-ci (Kranias et Hajjar, 2012). Le PLB peut être phosphorylé sur 3 sites distincts : la PKC est responsable d'une phosphorylation sur la sérine 10, tandis que la PKA ou la PKG exercent leur activité sur la sérine 16. Enfin, la CaMKII est susceptible d'ajouter un phosphate sur la thréonine 17 du PLB (Davis et al., 1990; Mattiazzi et al., 2005). Sous l'effet d'une phosphorylation, le PLB n'est plus lié à la pompe SERCA, ce qui lève l'inhibition de celle-ci et augmente donc le transport du Ca^{2+} vers le RS (Figure 13). Dans l'autre sens, le PLB peut aussi être déphosphorylé, notamment par la protéine calcineurine (Münch et al., 2002). Le PLB est en équilibre dynamique entre sa forme monomérique, la forme active, induisant l'inhibition de la pompe SERCA, et une forme pentamérique, peu voire pas active. Suite à une phosphorylation, le PLB est plus susceptible de s'assembler en pentamères, du fait de la modification du point isoélectrique de la protéine, levant ainsi l'inhibition de la recapture du Ca^{2+} (Figure13) (Simmerman et Jones, 1998).

Les études de modèles animaux génétiquement modifiés ont montré que des souris surexprimant la pompe SERCA voyaient le transport de Ca^{2+} vers le RS favorisé, tout comme la relaxation et la contraction myocardique, suggérant qu'une hausse d'expression de cette protéine est bien tolérée dans le cœur (Baker et al., 1998; He et al., 1997; Vetter et al., 2002). A l'inverse, les souris invalidées à l'état hétérozygote pour la pompe SERCA expriment un phénotype regroupant une diminution de la contractilité des cardiomyocytes et de la charge en Ca^{2+} du RS, une perturbation globale de l'homéostasie calcique, ainsi qu'une prédisposition à l'apparition d'une insuffisance cardiaque. Les souris KO à l'état homozygote pour la pompe SERCA meurent in utéro (Ji et al., 2000; Periasamy et al., 1999; Schultz et al., 2004).

D'autres modèles de souris, dans lesquels l'expression du PLB a été modifiée, ont également été des sujets d'études. De façon plutôt attendue, la surexpression du PLB est

associée à une diminution du transport du Ca^{2+} par la pompe SERCA et de la fonction ventriculaire gauche (Kadambi et al., 1996), quand la sous-expression de cette protéine augmente la charge en Ca^{2+} du RS et améliore la fonction cardiaque (Hoit et al., 1995; Luo et al., 1994).

Finalement, les nombreux travaux réalisés sur le couple SERCA-PLB ont démontré l'importance de ces protéines, et notamment du ratio d'expression PLB/SERCA (Kranias et Hajjar, 2012), dans la régulation de l'homéostasie calcique à l'intérieur du cardiomyocyte.

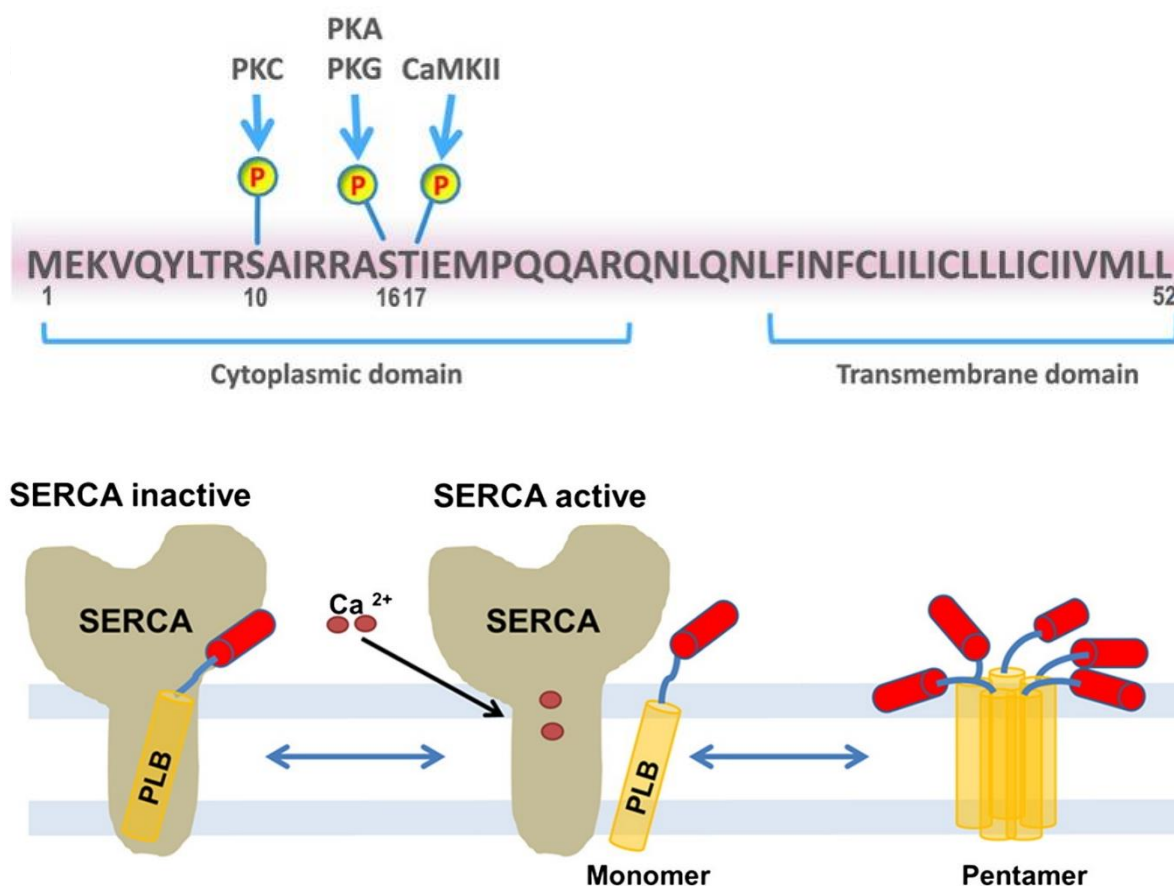


Figure 13 : Régulation du PLB sous l'effet d'une phosphorylation. En haut : Le PLB est susceptible d'être phosphorylé spécifiquement sur 3 sites distincts par les kinases PKA, PKC, PKG et CaMKII. D'après Cerra et Imbroglio, 2012. En bas : Sous l'effet d'une phosphorylation, le monomère de PLB n'interagit plus avec la pompe SERCA, ce qui lève l'inhibition de celle-ci et permet la recapture du Ca^{2+} vers le RS. Le PLB est susceptible de s'assembler en pentamères, une forme de « stockage » de cette protéine, peu voire pas active. D'après Shaikh *et al.*, 2016.

c. Le RyR

Le RyR est un canal ionique massif, formé d'un assemblage de 4 monomères de 565 kDa, localisé à la membrane du RS, et responsable de la libération de Ca^{2+} en grande quantité de ce dernier vers le cytosol. Il est activé, du côté cytosolique, par le Ca^{2+} issu des canaux Cav1.2. Au niveau de la lumière du RS, la calséquestrine et d'autres protéines senseurs de la

[Ca²⁺] sont responsables de l'activation des RyRs, (Terentyev et al., 2003) mais le RyR en lui-même semble également répondre à la [Ca²⁺] dans le RS (Chen et al., 2014). Ainsi, ce canal n'évolue pas seul au sein du cardiomyocyte mais fait partie d'un complexe macromoléculaire, au sein duquel on retrouve notamment la CaM, ou encore les protéines junctin, triadin et FKBP12.6 (Lanner et al., 2010).

Suite à une dépolarisation de la membrane plasmique du cardiomyocyte, le passage d'ions Ca²⁺ par les canaux Cav1.2 induit l'activation de RyRs au niveau du RS jonctionnel. Cette entrée d'ions Ca²⁺ peut provoquer l'ouverture de 30 à 300 RyRs et aboutir à la génération de sparks calciques, les événements élémentaires de libération de Ca²⁺ du RS par un groupe de RyRs (Peskoff et Langer, 1998). Durant la diastole, ces canaux sont normalement clos. Cependant, une probabilité existe pour l'ouverture spontanée d'un RyR, et, lorsque ce phénomène se produit, une petite libération de Ca²⁺ du RS est induite. Cette libération peut, ou non, provoquer l'ouverture d'un groupe de RyRs voisins par un pseudo-phénomène de libération de Ca²⁺ induite par le Ca²⁺ et générant un spark calcique (Cheng et al., 1993). Des libérations de Ca²⁺, produites par l'ouverture d'un ou de quelques RyRs, et insuffisantes pour aboutir à un spark, ont été décrites et nommées quarks calciques (Brochet et al., 2011; Lipp et Niggli, 1996).

A l'inverse, les sparks calciques peuvent être à l'origine d'une libération massive de Ca²⁺ capable de se propager à l'intérieur de la cellule cardiaque : la vague calcique. Une surcharge en Ca²⁺ du RS est propice à cet événement (Wier et al., 1997). La naissance d'une vague calcique spontanée, ou induite par une stimulation, et sa propagation, nécessite une activation synchrone de multiples clusters de RyRs, la distance entre chaque cluster de RyRs étant un facteur primordial pour cette synchronicité (Nivala et al., 2012).

La phosphorylation du RyR est un régulateur important de son activité. Ce canal est la cible de la PKA et de la CaMKII, notamment suite à une stimulation β -adrénergique (Camors et Valdivia, 2014). Les sites que ciblent ces enzymes ainsi que leurs conséquences physiologiques ont été largement débattus, et il apparaît que la sérine 2814 est ciblée par la CaMKII (Wehrens et al., 2004), tandis que la sérine 2808 semble être un site mixte (Wehrens et al., 2006), même si la phosphorylation PKA-dépendante de ce site ne semble pas ou peu impliquée dans l'insuffisance cardiaque (Houser, 2014). La sérine 2030 est quant à elle ciblée par la PKA (Xiao et al., 2006) (Figure 14). Globalement, l'hyperphosphorylation des RyRs augmente leur probabilité d'ouverture, ce qui est susceptible de provoquer des fuites de Ca²⁺ du RS et induire des épisodes arythmiques (Camors et Valdivia, 2014).

Des mutations sur le RyR ont été corrélées à des cas de tachycardies ventriculaires catécholaminergiques, une pathologie rythmique pouvant être létale et se déclenchant lors d'un stress, d'un effort ou d'une émotion intense (Zhao et al., 2015).

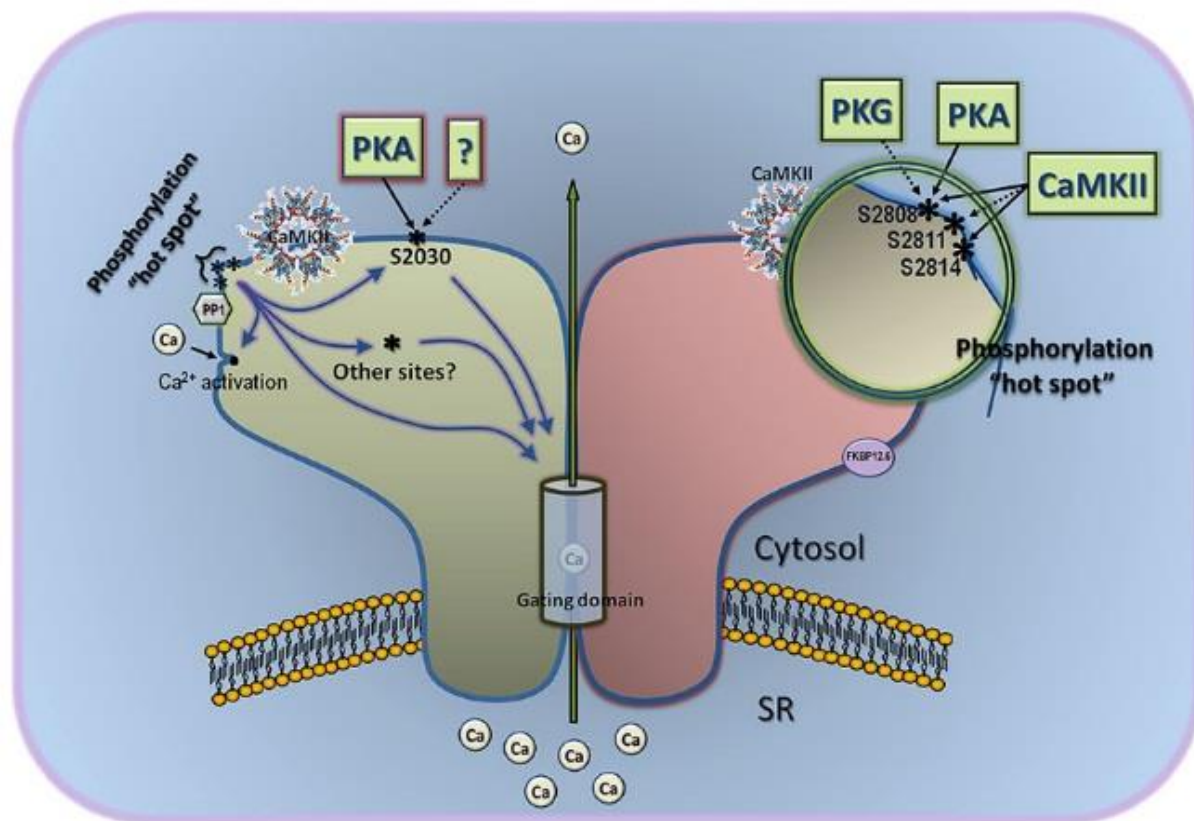


Figure 14 : Régulation de l'activité du RyR par les phosphorylations. Le RyR voit sa fonction régulée par des phosphorylations sur des sites multiples, ciblés par les protéines kinases PKA, PKG et CaMKII. Ces modifications post-traductionnelles favorisent la sortie de Ca^{2+} du RS vers le cytosol. D'après Camors et Valdivia, 2014.

d. Rôle des mitochondries

Dans le cardiomyocyte adulte, les mitochondries sont des organites intracellulaires majeurs, au nombre d'environ 7 000 par cellule et occupant 35% du volume cellulaire (Dedkova et Blatter, 2012). Les mitochondries possèdent un rôle important dans le couplage excitation-contraction en produisant l'énergie nécessaire sous forme d'ATP, mais aussi en régulant la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Liu et O'Rourke, 2009). En effet, une partie du Ca^{2+} libéré en masse lors du phénomène de libération de Ca^{2+} induite par le Ca^{2+} est recapturé à l'intérieur des mitochondries par des canaux calciques situés à la membrane de ces organites tels que les MCU (Mitochondrial Ca^{2+} Uniport), les RyR1 et les VDACs (Voltage-Dependent Anion Channel) (Min et al., 2012). Dans l'autre sens, la voie d'extrusion majeure du Ca^{2+} mitochondrial des cellules excitables réside

dans l'activité de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCLX) et dans une moindre mesure de l'échangeur $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ (HCX) (O-Uchi et al., 2012). Dans un contexte de surcharge calcique dans la mitochondrie, le Ca^{2+} est aussi extrudé via l'ouverture d'un large canal ionique non-spécifique, le mPTP, pour mitochondrial Permeability Transition Pore (Figure 15A).

En cas de dysfonctionnement, les mitochondries peuvent jouer un rôle important dans les pathologies rythmiques cardiaques, via une sous-production d'ATP, la perturbation de l'homéostasie calcique à l'échelle de la cellule entière, ou par une surproduction de ROS, ayant des effets sur le fonctionnement de nombreux canaux ioniques (Yang et al., 2014) (Figure 15B).

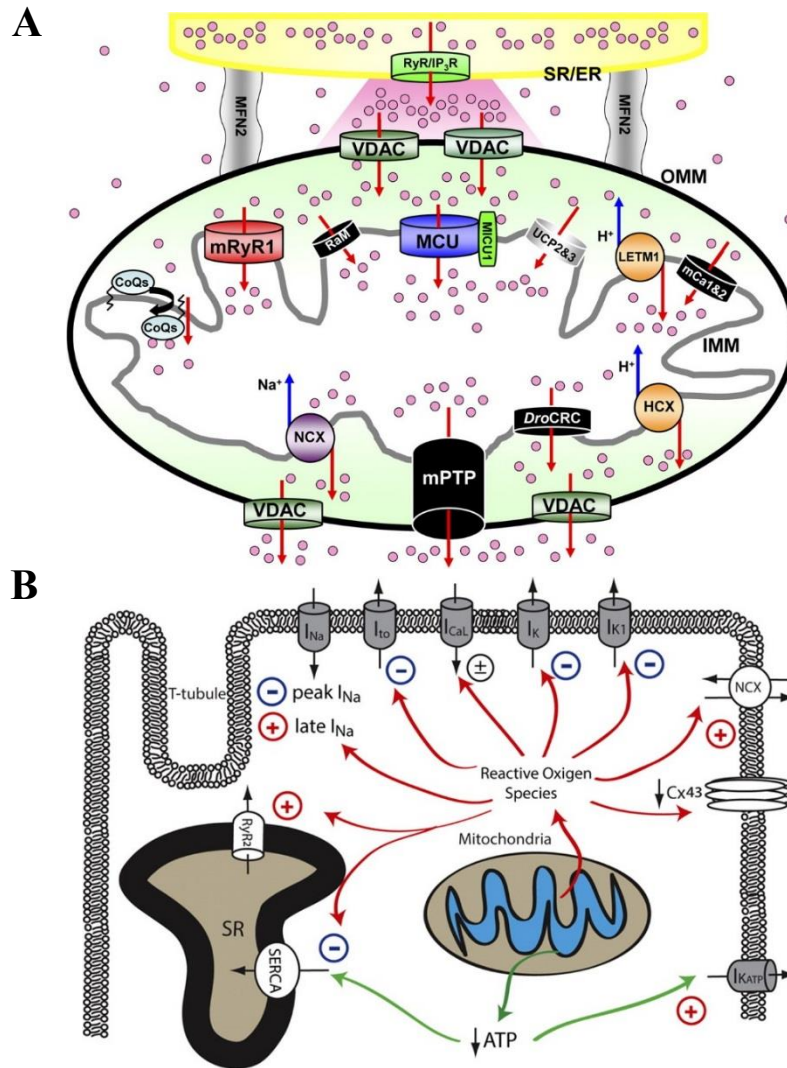


Figure 15 : Les mitochondries : implications dans la régulation de l'homéostasie calcique et les troubles du rythme. A. Mécanismes d'influx et d'efflux de Ca²⁺ de la mitochondrie. Le couplage entre le RS et les mitochondries participe à la recapture, par les canaux VDAC, RyR1 et MCU du Ca²⁺ libéré du RS (partie haute de la figure). Les canaux et échangeurs mPTP, NCX et HCX sont responsables de l'extrusion de Ca²⁺ vers le cytosol (partie basse de la figure). D'après O'Uchi et al., 2012. **B.** Une dysfonction mitochondriale induit une surproduction de ROS et réduit la synthèse d'ATP, ce qui module la fonctionnalité de nombreux canaux et échangeurs ioniques et favorise la survenue d'épisodes arythmiques. D'après Yang et al., 2014. IP₃R : Récepteurs à l'IP₃. MFN2 : Mitofusine 2. OMM : Outer Mitochondrial Membrane, Membrane externe mitochondriale. IMM : Inner Mitochondrial Membrane, Membrane interne mitochondriale. CoQs : Hydroxyl Coenzyme Q10. RaM : Rapid Mode of uptake, Mode de capture rapide. MICU1 : Mitochondrial Ca²⁺ Uptake 1, protéine de liaison au Ca²⁺. UCP 2 et 3 : UnCoupling proteins 2 et 3. LETM1 : Leucine-zipper EF-hand-containing Transmembrane protein 1. mCa1 et 2 : mitochondrial Ca²⁺ channels 1 et 2. DroCRC : Drosophila Ca²⁺ Release Channel, canal calcique présent chez la drosophile.

2. Perturbations de l'homéostasie calcique

Des désordres de l'homéostasie calcique intracellulaire ont été observés dans plusieurs pathologies cardiaques, incluant l'insuffisance cardiaque (Peano et Domeier, 2017) mais également des pathologies de la repolarisation ventriculaire comme le SQT1 de type 3 (Rivaud

et al., 2018). Ces perturbations aboutissent à une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$, par plusieurs moyens possibles. Dans le cas du SQTl de type 3, cela se produit par une hausse préalable de la $[Na^+]_i$, qui augmente l'expression de NCX1 et la fonction de ce dernier, notamment en mode inverse (Despa et Bers, 2013). L'insuffisance cardiaque aboutit à une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ par le biais d'une diminution de recapture du Ca^{2+} dans le RS (Kaye et al., 2008). Ces hausses de la $[Ca^{2+}]_i$ ont des conséquences mécaniques en augmentant l'interaction actine-myosine, ce qui engendre une augmentation de la tension myocardique en diastole : c'est la dysfonction diastolique (Coppini et al., 2013; Makielski et Farley, 2006; Maltsev et Undrovinas, 2008).

Comme nous avons pu le décrire plus tôt dans cette thèse, l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ a pour conséquence l'activation de nombreuses cibles impliquées dans l'activité électrique cardiaque, notamment la CaMKII. Ces conséquences peuvent mener à un remodelage de l'expression des protéines impliquées dans le cycle du Ca^{2+} , comme c'est le cas dans plusieurs modèles animaux de SQTl de type 3 ou d'insuffisance cardiaque, dans lesquelles des hausses d'expression de NCX, de la CaMKII et de ses formes actives, ou encore des formes phosphorylées du RyR et du PLB sont des signatures de ces pathologies (Xu et al., 2012; Yao et al., 2011; Zhang et al., 2011).

C. Mécanismes arythmogènes impliquant des perturbations des homéostasies sodique et calcique

Les paragraphes traités précédemment nous ont montré de quelles manières des perturbations des homéostasies sodique et calcique peuvent engendrer des pathologies cardiaques, notamment rythmiques. Les mécanismes moléculaires à l'origine de ces troubles du rythme ont été largement étudiés au cours des dernières années, et impliquent à la fois des augmentations des concentrations en ions Na^+ et Ca^{2+} dans le cardiomyocyte. Les post-dépolarisations précoces et retardées sont le fruit de dérégulations croisées de ces concentrations ioniques intracellulaires et illustrent parfaitement ce phénomène (Wagner et al., 2015) (Figure 16).

1. Les post-dépolarisations précoces, ou EADs

Les EADs se produisent pendant le PA et sont la conséquence d'augmentations de courants dépolarisants ou de réduction de courants hyperpolarisants (Bers, 2002). La phase de plateau du PA est plus particulièrement sujette à la survenue de ces événements, les courants repolarisants et dépolarisants étant petits et en équilibre à ce moment-là. De petites variations d'amplitudes de courants ioniques suffisent donc pour la génération d'EADs (Figure 16). Ces dernières sont des processus déclencheurs de tachycardies et de fibrillations ventriculaires, et peuvent survenir à des rythmes cardiaques lents, lorsque la durée du PA est prolongée (Weiss et al., 2010). C'est le cas dans des contextes de SQTl de type 3, dans lesquels le PA est drastiquement allongé du fait d'un courant I_{NaLate} trop important (Song et al., 2006; Wagner et al., 2011). Cette prolongation de la phase de plateau maintient le potentiel transmembranaire de la cellule à des valeurs permettant la réactivation des canaux Cav1.2, ce qui déclenche la dépolarisation alors que le PA n'est pas terminé (Antoons et al., 2007; January et Riddle, 1989).

Parallèlement aux EADs de phase 2 décrites ci-dessus, des EADs de type 3, se produisant pendant la phase 3 de repolarisation, ont été mises à jour. Ces dépolarisations prématurées sont causées cette fois par des libérations de Ca^{2+} du RS qui engendrent un courant dépolarisant via NCX1, amplifié ensuite par la réactivation des canaux Cav1.2 (Burashnikov et Antzelevitch, 1998; Volders et al., 2000).

2. Les post-dépolarisations retardées, ou DADs

Les DADs surviennent, au contraire des EADs, après la repolarisation complète du PA précédent, lors de la diastole. Ils sont la conséquence d'augmentations de la $[Ca^{2+}]_i$ à l'intérieur du RS ou cytosolique, ces deux phénomènes favorisant la probabilité d'ouverture des RyRs (Figure 16) (Bers, 2002). De façon physiologique, les sparks calciques sont générés simultanément lors de la systole. En cas de surcharge calcique dans le cardiomyocyte, des libérations spontanées de Ca^{2+} du RS via les RyRs vont survenir (Bers, 2014). Ceux-ci se trouvant face aux échangeurs NCX1 du sarcolemme, cette élévation locale de la $[Ca^{2+}]_i$ va modifier le gradient électrochimique au voisinage de ces échangeurs et générer un courant dépolarisant I_{NCX} (Schlotthauer et Bers, 2000). Si ce courant est assez ample, il est susceptible de générer une DAD de forte amplitude qui dépolarise la cellule à des valeurs de potentiel permettant l'activation du courant sodique, ce qui peut provoquer la genèse d'un nouveau PA, dit déclenché.

Au sein d'une cellule unique, les post-dépolarisations ne sont pas suffisantes pour provoquer la génération prématurée d'un PA, du fait des cellules environnantes qui maintiennent le potentiel transmembranaire de la cellule en question à un potentiel diastolique. Néanmoins, en conditions pathologiques, lorsque ces événements sont présents et synchrones dans plusieurs cellules, la région du cœur concernée peut être la source d'une contraction prématurée du myocarde (Xie et al., 2010).

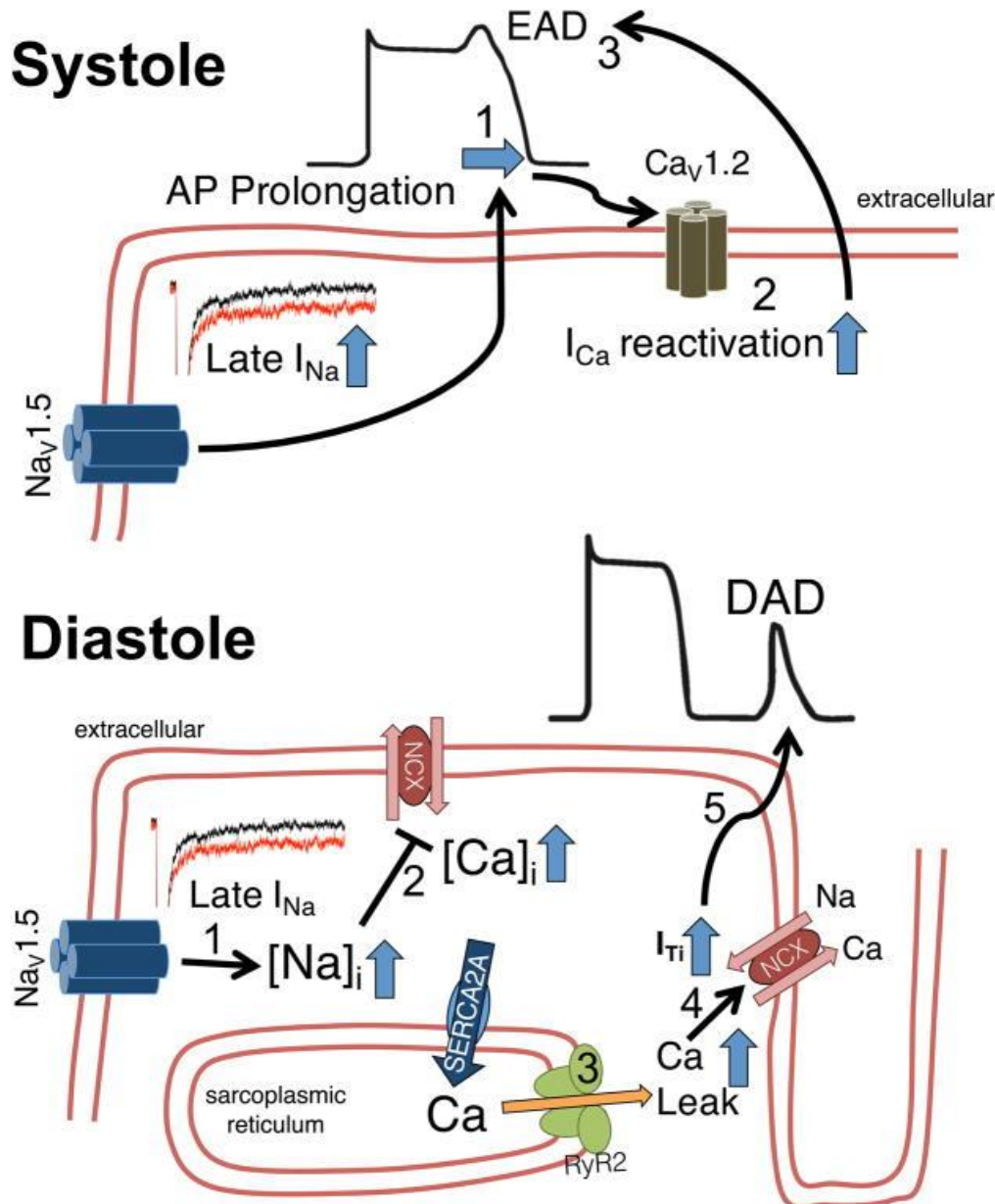


Figure 16 : Les perturbations des homéostasies sodique et calcique à la base des troubles du rythme. Lors de la systole (en haut) une entrée accrue d'ions Na⁺ allonge la durée du PA. La prolongation de la phase de plateau augmente la probabilité d'une réactivation des canaux Ca_v1.2, ce qui peut engendrer des EADs. Durant la diastole (en bas) l'entrée excessive de Na⁺ altère l'évacuation du Ca²⁺ par l'échangeur NCX. La hausse de la [Ca²⁺]_i qui en découle favorise des fuites de Ca²⁺ du RS, ce qui augmente le courant dépolarisant I_{NCX} et provoque des DADs. D'après Wagner et al., 2015. I_{Ti} : Transient inward current, courant entrant transitoire produit par l'activation de NCX1 suite à une libération de Ca²⁺ du RS.

V. Canalopathies cardiaques

A. Les pathologies de la repolarisation ventriculaire

Chez les patients atteints de troubles du rythme cardiaque, les épisodes arythmiques sont souvent provoqués par des anomalies de la repolarisation du myocarde et des modifications des périodes réfractaires effectives (PRE). Ces phénomènes sont la conséquence de perturbations des flux ioniques dans les cardiomyocytes causées par des anomalies génétiques ou acquises du fait d'un remodelage cardiaque pathologique, de l'action de substances pharmacologiques ou encore d'un désordre électrolytique au niveau systémique (Antzelevitch et Burashnikov, 2011). Les pathologies de la repolarisation ventriculaire peuvent être divisées en 2 types, mettant en jeu des mécanismes moléculaires distincts : les maladies dues à un défaut de repolarisation, et celles liées à un excès de repolarisation (Weiss et al., 2015).

En clinique, l'analyse de l'ECG, et notamment de la durée de l'intervalle QT, renseigne sur la fonction de la repolarisation ventriculaire. Cet intervalle est un marqueur de la durée du PA (Weidmann, 1951). Il varie en fonction du rythme cardiaque, et une correction de sa durée doit donc être effectuée avant interprétation. Les formules de Bazett (obtenue par division de l'intervalle QT par la racine carré de l'intervalle RR, elle surestime l'intervalle QT à des fréquences rapides et le sous-estime pour des fréquences lentes) et de Fridericia (obtenue par division de l'intervalle QT par la racine cubique de l'intervalle RR, elle fonctionne mieux pour des fréquences lentes), sont les plus fréquemment utilisées et permettent d'aboutir à un intervalle QT corrigé (QTc) (Bazett H. C., 2006). Chez la souris, la formule de Bazett est adaptée au rythme cardiaque élevé de l'animal et permet de calculer l'intervalle QTc selon la

formule suivante : $QTc = \frac{QT (ms)}{\sqrt{\frac{RR (ms)}{100}}}$ (Mitchell et al., 1998). Cependant, cette formule est

contestée par une étude récente réalisée sur des animaux vigils qui ne montrent aucune adaptation de la durée de l'intervalle QTc lors de variations de la fréquence cardiaque (Roussel et al., 2016a). Par la suite, les travaux de Mulla et ses collaborateurs ont démontré que cette relation n'existait que chez les animaux anesthésiés, chez lesquels la durée de l'intervalle QTc et des périodes réfractaires ventriculaires varient avec la fréquence cardiaque (Mulla et al., 2018). La durée de l'intervalle QT augmente avec l'âge et varie en fonction du sexe. La limite haute de l'intervalle QTc chez l'Homme est fixée à 440 ms pour les hommes et 460 ms pour les femmes. A l'inverse, une limite basse de 330 à 360 ms est admise pour parler d'intervalle QTc raccourci (Priori et al., 2015).

Dans cette partie, nous nous intéresserons aux pathologies de la repolarisation ventriculaire, en mettant l'accent sur le SQTl, le syndrome du QT court (SQTC) et le syndrome de repolarisation précoce (SRP), qui ont été les sujets des expérimentations réalisées lors de cette thèse.

1. Le syndrome du QT long

Le SQTl est caractérisé par un intervalle QTc anormalement long à l'ECG, supérieur à 450 ms, ce seuil différant légèrement entre les hommes et les femmes et n'étant pas tout à fait le même entre les études (Priori et al., 2015). La première forme héréditaire de ce syndrome a été découverte en 1957 par Jervell et Lange-Nielsen (Jervell et Lange-Nielsen, 1957). Ce syndrome est associé à une surdité bilatérale et possède une transmission de type autosomique récessive. C'est ensuite dans les années 1960 que Romano et Ward ont rapporté des familles souffrant de SQTl sans surdité, et avec une transmission autosomique dominante (Romano et al., 1963). La prévalence de ce syndrome est estimé à 1/2 000 individus (Schwartz et al., 2009).

a. Clinique

En clinique, un SQTl est diagnostiqué : (1) en présence d'un intervalle QTc supérieur à 480 ms sur plusieurs ECGs répétés ; (2) en présence d'une mutation pathogène identifiée et connue, sans que le critère de durée de l'intervalle QTc n'entre en compte ; (3) en présence d'un intervalle QTc compris dans les normes, sur la base de symptômes et d'un historique familial évocateur (Priori et al., 2015). Bien que la majeure partie des individus atteints restent asymptomatiques au cours de leur vie, 13% sont victimes d'une mort subite cardiaque et 36% de syncopes avant l'âge de 40 ans en absence de traitement (Priori et al., 2003), du fait du déclenchement d'arythmies ventriculaires. Ces symptômes sont déclenchés dans des contextes différents en fonction des désordres électriques à l'origine de la maladie : durant un exercice physique (SQTl de type 1), une émotion intense (SQTl de type 2) ou durant le sommeil (SQTl de type 3) (Schwartz et al., 2001).

En première intention, les traitements reposent sur l'administration de β -bloquants, contestés dans le cas de SQTl de type 3 (Ahn et al., 2017). La pose d'un défibrillateur implantable est conseillée chez les individus à haut risque d'arythmies létales, survivants d'un arrêt cardiaque antérieur, présentant des mutations causales connues et au phénotype sévère, ou pour lesquels les β -bloquants sont inefficaces (Priori et al., 2015).

b. Génétique du syndrome du QT long

Dans le cas du SQTl congénital, l'augmentation de la durée de l'intervalle QT, due à une prolongation du PA peut être la conséquence d'un excès de courants dépolarisants (I_{Na} ou $I_{Ca,L}$) ou d'un défaut de courants repolarisants (I_{Ks} , I_{Kr} , I_{K1}) (Figure 17) (Abriel et Zaklyazminskaya, 2013). A l'heure actuelle, 20 gènes différents, codant pour des acteurs moléculaires produisant ou modulant les courants cités ci-avant, ont été identifiés comme étant mutés dans des familles atteintes d'un SQTl (tableau 3) (Garcia-Elias et Benito, 2018). Les formes de SQTl à transmission autosomique dominante comprennent les SQTl de types 1 à 13. Parmi ces pathologies, les SQTl de type 1 (gène *KCNQ1* ; 40% des SQTl), 2 (gène *KCNH2* ; 30% des SQTl) et 3 (gène *SCN5A* ; 10% des SQTl) représentent à eux seuls 80% des SQTl (Bezzina et al., 2015). Parmi les formes autosomiques dominantes plus rares, 2 associent au QT long des défauts fonctionnels au niveau de multiples organes :

- le syndrome de Timothy (SQTl de type 8) (Splawski et al., 2005; 2004), très rare, est responsable, en plus des atteintes cardiaques, d'une syndactylie (malformation des doigts) et de défauts des systèmes nerveux et immunitaires. Ce syndrome est la conséquence de mutations sur le gène *CACNA1C*, aboutissant à un gain de fonction du canal Cav1.2.
- le syndrome d'Andersen (SQTl de type 7) (Andersen et al., 1971) induit quant à lui une faiblesse musculaire ainsi qu'un dimorphisme facial. Il est causé par des pertes de fonction de $K_{ir}2.1$, ayant comme origine des mutations sur les gènes *KCNJ2* (Haruna Yoshisumi et al., 2007) ou *KCNJ5* (Kokunai et al., 2014).

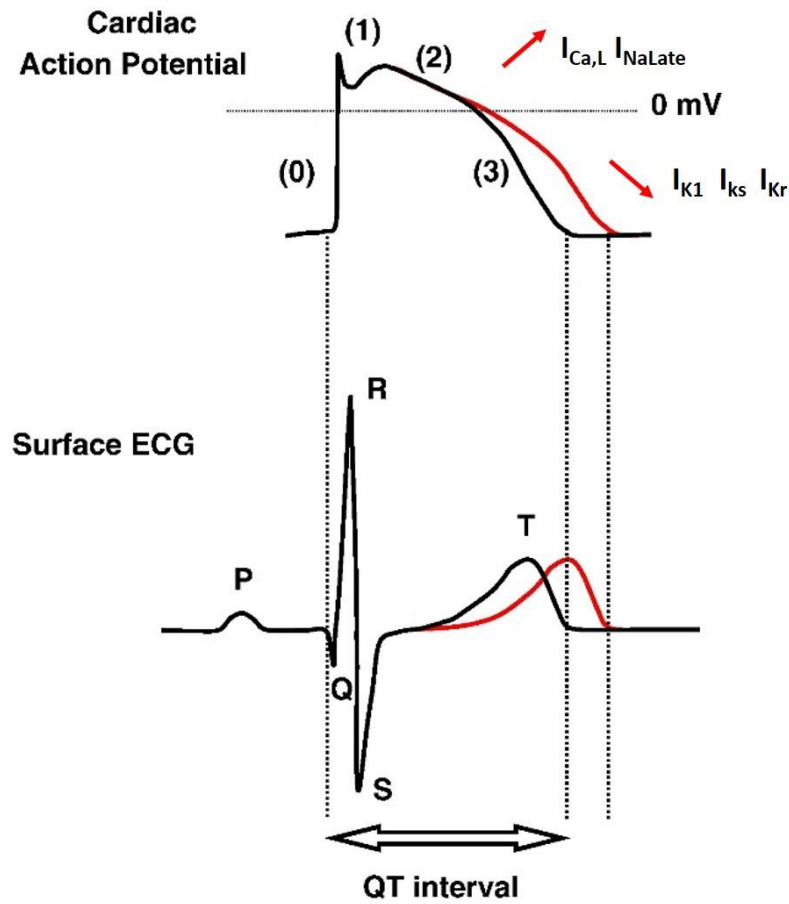


Figure 17 : Courants ioniques impliqués dans le SQTl. Des gains de fonction de courants dépolarisants ($I_{Ca,L}$ ou I_{NaLate}) ou des pertes de fonction de courants hyperpolarisants (I_{K1} , I_{Ks} ou I_{Kr}) sont à la base d'un allongement de la durée des PA (en haut) qui se traduira sur l'ECG (en bas) par un allongement de l'intervalle QT. Modifié d'après Abriel et Zaklyazminkaya, 2013. Les chiffres entre parenthèses représentent les différentes phases du PA ventriculaire humain.

Tableau 3 : Mutations associées à un SQTL. D'après Garcia-Elias et Benito, 2018.

Gene	Protein	Current	Effect	Function	Prevalence
GENES ENCODING ION CHANNEL SUBUNITS					
1. Major LQTS-susceptibility genes					
<i>KCNQ1</i>	Kv7.1 (α -subunit of the voltage-dependent K ⁺ channel)	$\downarrow I_{Ks}$	loss-of-function	mediator of the slow component of the delayed rectifying potassium I_{Ks} current	$\approx 40\%$ (LQT1)
<i>KCNH2</i>	Kv11.1/hERG (α -subunit of the voltage-dependent K ⁺ channel)	$\downarrow I_{Kr}$	loss-of-function	mediator of the rapid component of the delayed rectifying potassium I_{Kr} current	$\approx 30\%$ (LQT2)
<i>SCN5A</i>	Nav1.5 (α -subunit of the voltage-dependent Na ⁺ channel)	$\uparrow I_{Na}$	gain-of-function	mediator of the depolarizing inward sodium I_{Na} current	$\approx 10\%$ (LQT3)
2. Rare LQTS-susceptibility genes					
By reducing outward currents					
<i>KCNE1</i>	minK ($\beta 1$ -subunit of the voltage-dependent K ⁺ channel)	$\downarrow I_{Ks}$	loss-of-function	auxiliary protein modulator of Kv7.1 and the I_{Ks} current	<1%
<i>KCNE2</i>	MIRP1 ($\beta 2$ -subunit of the voltage-dependent K ⁺ channel)	$\downarrow I_{Kr}$	loss-of-function	auxiliary protein modulator of Kv11.1 and the I_{Kr} current	<1%
<i>KCNJ2</i>	Kir2.1 (inward rectifying K ⁺ channel)	$\downarrow I_{K1}$	loss-of-function, extra-cardiac manifestations	mediator of the inward rectifying potassium I_{K1} current	<1% (Andersen-Tawil syndrome, LQT7)
<i>KCNJ5</i>	Kir3.4 (G protein-activated inward rectifying K ⁺ channel 4)	$\downarrow I_{KAch}$	loss-of-function	mediator of the acetylcholine/adenosine-induced potassium I_{KAch} current	<1%
By increasing inward currents					
<i>SCN1B</i>	$\beta 1$ -subunit of the voltage-dependent Na ⁺ channel	$\uparrow I_{Na}$	gain-of-function	auxiliary protein modulator of Nav1.5 and the I_{Na} current	<1%
<i>SCN4B</i>	$\beta 4$ -subunit of the voltage-dependent Na ⁺ channel	$\uparrow I_{Na}$	gain-of-function	auxiliary protein modulator of Nav1.5 and the I_{Na} current	<1%
<i>CACNA1C</i>	Cav1.2 ($\alpha 1C$ -subunit of the voltage-dependent L-type Ca ²⁺ channel)	$\uparrow I_{CaL}$	gain-of-function, extra-cardiac manifestations	mediator of the inward calcium I_{CaL} current	<1% (Timothy syndrome, LQT8)
GENES ENCODING AUXILIARY PROTEINS					
By reducing outward currents					
<i>AKAP9</i>	A-kinase anchor protein-9	$\downarrow I_{Ks}$	disruption of Kv7.1/PKA interaction	scaffolding protein assembling PKA and Kv7.1	<1%
By increasing inward currents					
<i>ANK2</i>	ankyrin B	$\uparrow I_{CaL}$	disruption of Na ⁺ /K ⁺ exchanger, Na ⁺ /Ca ²⁺ exchanger/IP ₃ interaction	scaffolding protein assembling Na ⁺ /K ⁺ exchanger, Na ⁺ /Ca ²⁺ exchanger and IP ₃ receptor	<1%
<i>CALM1</i>	calmodulin (CaM)	$\uparrow I_{CaL}$	disorder in Cav1.2 functioning	essential Ca ²⁺ sensor, signal-transducing protein modulator of Cav1.2 (and others)	<1%
<i>CALM2</i>	calmodulin (CaM)	$\uparrow I_{CaL}$	disorder in Cav1.2 functioning	essential Ca ²⁺ sensor, signal-transducing protein modulator of Cav1.2 (and others)	<1%
<i>CALM3</i>	calmodulin (CaM)	$\uparrow I_{CaL}$	disorder in Cav1.2 functioning	essential Ca ²⁺ sensor, signal-transducing protein modulator of Cav1.2 (and others)	<1%
<i>SNTA1</i>	$\alpha 1$ -syntrophin	$\uparrow I_{Na}$	disruption of Nav1.5/NOS-PMCA4b complex interaction	scaffolding protein that associates Nav1.5 channels with the NOS-PMCA4b complex	<1%
<i>TRDN</i>	triadin	$\uparrow I_{CaL}$	reduction of I_{CaL} inactivation	regulator of ryanodine receptors and Cav1.2	<1%
Less established mechanisms					
<i>CAV3</i>	caveolin-3	$\uparrow I_{Na}?$ / $\downarrow I_{K1}?$	changes in membrane expression of Nav1.5/Kir2.1	scaffolding protein regulating ion channels in caveolae	<1%
<i>TRPM4</i>	Transient receptor potential melastatin 4		loss-of-function	regulator of conduction and cellular electrical activity which impact heart development	<1%
<i>RYR2</i>	ryanodine receptor 2 (RyR2)		<i>not described</i>	mediator of Ca ²⁺ release from the SR	<1%

↑: increased current; ↓: decreased current; ?: suspected but not confirmed mechanism.

c. Le SQTL de type 3

Le SQTL de type 3 est la conséquence de mutations sur le gène *SCN5A*, qui code pour la sous-unité α du canal sodique cardiaque voltage dépendant. Ces mutations sont responsables d'un gain de fonction de Nav1.5, qui prolonge le PA par l'augmentation du courant I_{NaLate} (Wang et al., 1995a). Ce phénomène est plus marqué à des rythmes cardiaques lents, ce qui explique que les épisodes arythmiques se produisent souvent en contexte de bradycardie, typiquement pendant le sommeil (Schwartz et al., 2001). L'augmentation de la durée du PA augmente la probabilité de survenues d'EADs, à la base des épisodes arythmiques dans le SQTL de type 3, et augmente la dispersion de repolarisation au sein du tissu cardiaque (Fabritz et al.,

2003a). Ces phénomènes favorisent l'excitation prématurée de régions ayant déjà perçu l'influx électrique et qui ne sont pas encore complètement repolarisées. Plus de 75 mutations sur le gène *SCN5A*, de type faux-sens pour la majeure partie d'entre elles, ont été identifiées et reliées à un SQTL de type 3 chez l'Homme (Garcia-Elias et Benito, 2018). Dans le but de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de ce syndrome, 3 modèles murins de SQTL de type 3 ont été générés et étudiés.

i. La souris *Scn5a*^{+/ Δ KPQ}

La délétion des acides aminés KPQ en position 1505-1507 sur Nav1.5 fut la première mutation sur *SCN5A* associée à un SQTL (Wang et al., 1995a). D'abord étudié en système de réexpression hétérologue, ce variant a été montré comme induisant une augmentation du courant I_{NaLate} (Wang et al., 1996). En 2001, Nuyens et ses collaborateurs ont généré un modèle de souris exprimant la délétion KPQ de Nav1.5 à l'état hétérozygote (Figure 18) (Nuyens et al., 2001). Ces souris possèdent un intervalle QTc prolongé à l'ECG et des troubles du rythme ventriculaire spontanés. Le PA, mesuré sur des cardiomyocytes isolés, voit sa durée augmentée, du fait d'une hausse du courant I_{NaLate} . Les canaux Nav1.5 mutés se réactivent plus rapidement, tandis qu'une hausse surprenante de la densité de courant I_{Na} au pic est mesurée, mais non retrouvée dans une autre étude sur le même modèle (Fredj et al., 2006a). La survenue d'EADs a été proposée comme mécanisme arythmogène à l'origine des troubles rythmiques chez les souris *Scn5a*^{+/ Δ KPQ}. Une étude plus récente a démontré qu'une stimulation cholinergique favorisait la survenue d'arythmies chez ces animaux, tandis qu'une stimulation β -adrénergique semble avoir un effet protecteur. L'administration de β -bloquants n'a pas d'effet dans ce modèle (Fabritz et al., 2010).

Sur une autre lignée de souris exprimant la même variation génétique, la mexiletine et la flécainide ont été montrées comme prévenant les troubles du rythme sur des cœurs isolés perfusés issus de ces animaux, au contraire des β -bloquants (Head et al., 2005; Stokoe et al., 2007). L'inhibition du courant $I_{Ca,L}$ par la nifédipine a montré des effets bénéfiques chez les souris *Scn5a*^{+/ Δ KPQ} en supprimant les EADs (Thomas et al., 2007). En plus de celles-ci, des travaux ont démontré que l'augmentation de la dispersion de repolarisation (Fabritz et al., 2003a; Stokoe et al., 2007) ainsi que des DADs (Fredj et al., 2006b) participaient aux phénomènes arythmiques dans ce modèle. Les souris *Scn5a*^{+/ Δ KPQ} montrent également des troubles rythmiques atriaux, comprenant une bradycardie et des pauses sinusales (Wu et al., 2012).

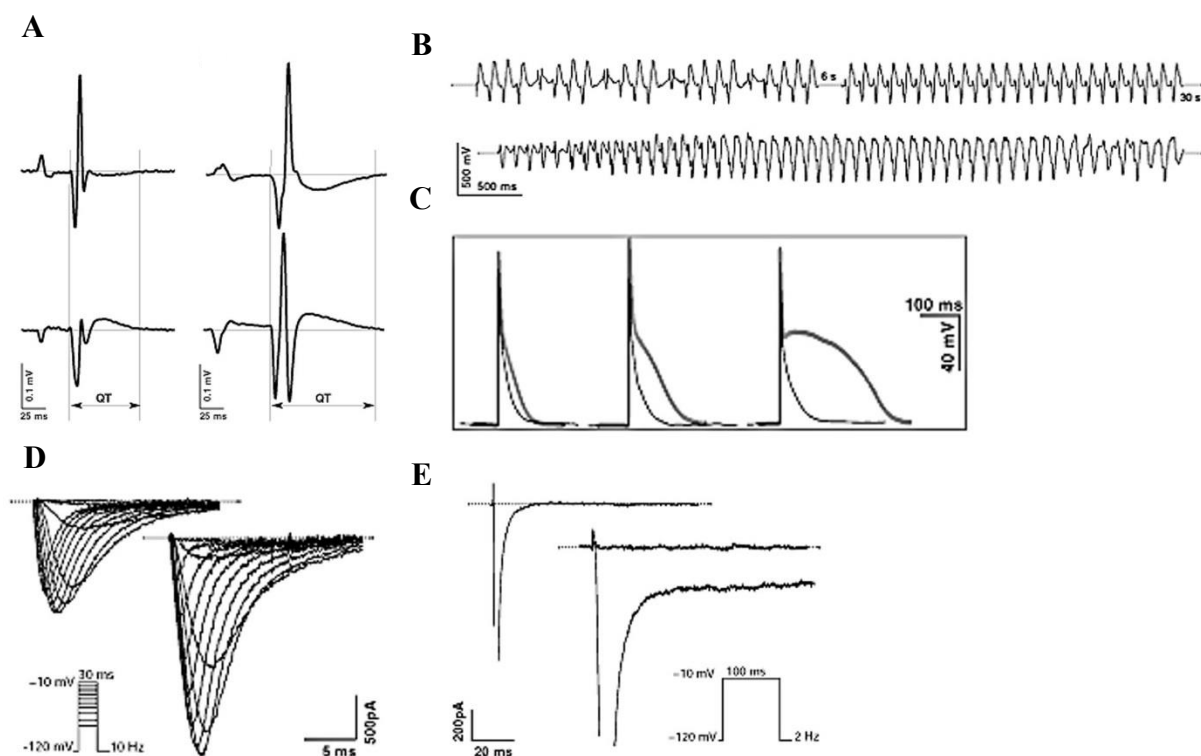


Figure 18 : Caractérisation de la souris *Scn5a*^{+ΔKPQ}. **A.** La souris *Scn5a*^{+ΔKPQ} (à droite) présente un intervalle QT prolongé en regard de souris sauvages (à gauche) sur les dérives aVL (en haut) et aVR (en bas). **B.** Extrasystoles ventriculaires spontanées suivies d'une tachycardie ventriculaire polymorphe enregistrées sur une souris *Scn5a*^{+ΔKPQ}. **C.** Potentiels d'actions enregistrés chez des souris *Scn5a*^{+/+} et *Scn5a*^{+ΔKPQ} à des durées de cycle de 200 ms (à gauche), 500 ms (au centre) et 1 000 ms (à droite). Les souris *Scn5a*^{+ΔKPQ} montrent un allongement de la durée du PA. **D.** L'amplitude du courant I_{Na} au pic est augmentée chez les souris *Scn5a*^{+ΔKPQ} (à droite) en comparaison des souris *Scn5a*^{+/+} (à gauche). **E.** Une augmentation du courant I_{NaLate} est observée chez les souris *Scn5a*^{+ΔKPQ}. D'après Nuyens et al., 2001.

ii. La souris *Scn5a* N1325S

Une autre mutation sur le gène *SCN5A* humaine a été identifiée en 1995 (Wang et al., 1995b) et est aussi responsable d'un gain de fonction de Nav1.5 via une augmentation du courant I_{NaLate} (Wang et al., 1996), la mutation N1325S. Des souris surexprimant la forme humaine mutée de Nav1.5 au niveau du cœur ont été générées et caractérisées (Figure 19) (Tian et al., 2004). Les souris *Scn5a* N1325S récapitulent le phénotype du SQT1, en présentant un intervalle QTc allongé, des arythmies ventriculaires, et des morts subites prématurées induites par des fibrillations ventriculaires. De façon surprenante, une augmentation du rythme cardiaque et un raccourcissement de l'intervalle PR est décrit chez ces animaux, ces phénomènes pouvant être causés par la surexpression du canal. Les cardiomyocytes isolés des souris *Scn5a* N1325S montrent une augmentation du courant I_{NaLate} , une inactivation retardée de Nav1.5, sans modification du courant au pic. Les PA sont prolongés, et des EADs sont

observées chez les animaux exprimant la mutation. Comme chez les souris *Scn5a*^{+/ Δ KPQ}, la mexiletine raccourcit la durée du PA et supprime les troubles du rythme. Plus récemment, des études ont démontré une apoptose accrue des cardiomyocytes, une fibrose cardiaque ainsi qu'une dysfonction contractile avec l'âge, associées à un remodelage des protéines du cycle du Ca²⁺. Ce remodelage comprend des augmentations d'expression des protéines NCX1, RyR et Cav1.2, ainsi qu'une suractivation de la CaMKII (Yao et al., 2011; Zhang et al., 2011).

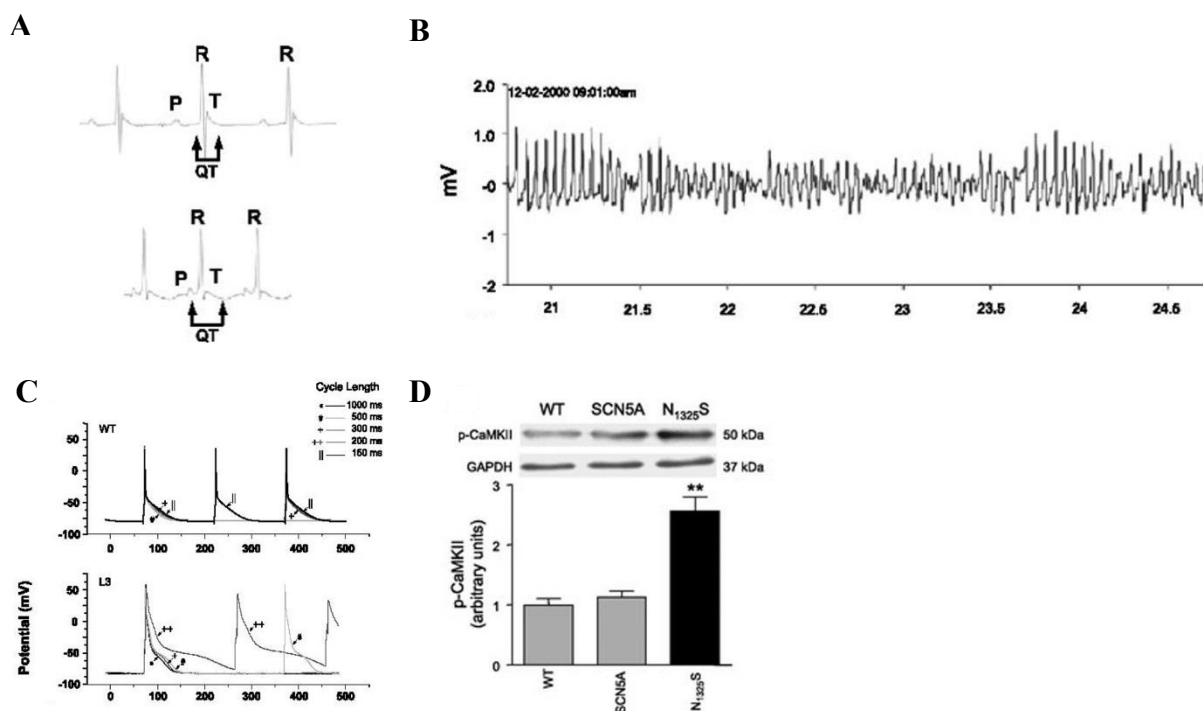


Figure 19 : Caractérisation de la souris *Scn5a* N1325S. **A.** Par rapport à une souris sauvage (en haut), la souris *Scn5a* N1325S (en bas) présente un rythme cardiaque accéléré et un intervalle QT prolongé. **B.** Enregistrement d'un épisode de tachycardie ventriculaire polymorphe chez une souris *Scn5a* N1325S. **C.** Le PA de cardiomyocytes isolés de souris *Scn5a* N1325S (en bas) est prolongé en comparaison de PA de souris sauvages (en haut) à différentes durées de cycle. **D.** Une suractivation de la CaMKII, visible par une hausse d'expression de sa forme phosphorylée (p-CaMKII) est observée chez les souris *Scn5a* N1325S. D'après Tian et al., 2004 et Yao et al., 2011.

iii. La souris *Scn5a*^{+/ Δ 1798insD}

En 1999, la mutation 1798insD sur le gène *SCN5A*, induisant un syndrome chevauchant comprenant un SQT et un SBr, a été découverte chez l'Homme (Bezzina et al., 1999). En 2006, les souris *Scn5a*^{+/ Δ 1795insD} exprimant la mutation équivalente ont été caractérisées sur un fond génétique FVB/N (Figure 20) (Remme et al., 2006). Ce modèle mime la pathologie retrouvée chez l'Homme, en présentant des intervalles PQ, QRS et QTc allongés en comparaison des souris sauvages, ainsi que des pauses sinusales. Les cardiomyocytes isolés de

ces animaux montrent un allongement de la phase de repolarisation du PA, une diminution de sa vitesse de dépolarisation et la survenue d'EADs. Concernant le courant sodique, une baisse de la densité de courant I_{Na} est en adéquation avec la diminution de la vitesse de dépolarisation observée sur les PA et le phénotype de SBr chez les patients. De plus, la mutation augmente le courant I_{NaLate} et ralentit les cinétiques d'inactivation de Nav1.5, ce qui est en lien avec le SQTL visualisé chez les individus porteurs de la mutation.

Sur un fond génétique 129Sv, quelques modifications phénotypiques sont observées en comparaison avec le fond FVB/N. Ces modifications concernent une diminution de l'expression de Nav1.5 et de certaines de ses sous-unités dans le ventricule gauche (Remme et al., 2009). La variation des manifestations phénotypiques en fonction du fond génétique des animaux est soulignée par cette étude. En particulier, l'expression de la sous-unité β_4 de Nav1.5 est très inférieure chez la souche de souris 129P2 en comparaison de souris de fond génétique FVB/N, ce qui peut expliquer que l'activation du courant I_{Na} ait lieu à des potentiels plus positifs

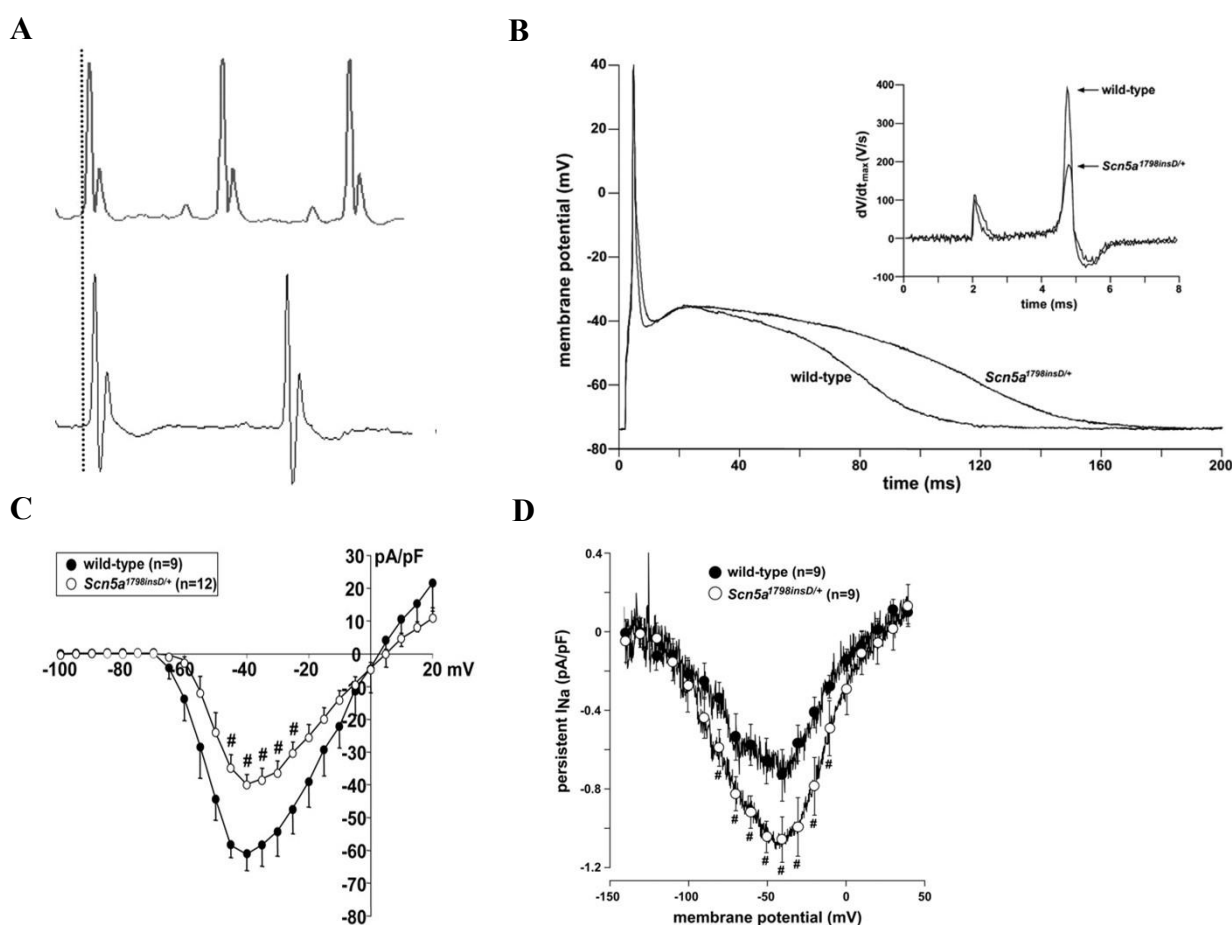


Figure 20 : Caractérisation de la souris $Scn5a^{+/1798insD}$. A. En regard des souris sauvages (en haut), les souris $Scn5a^{+/1798insD}$ présentent un allongement de l'intervalle QTc. B. La durée du PA est prolongé et la vitesse de dépolarisation diminuée chez les souris $Scn5a^{+/1798insD}$. C. L'amplitude du courant au pic est diminuée chez les souris $Scn5a^{+/1798insD}$ en comparaison des souris $Scn5a^{+/+}$. D. L'amplitude du courant I_{NaLate} est augmentée chez les souris $Scn5a^{+/1798insD}$. D'après Remme et al., 2006.

chez les souris 129P2. En outre, dans cette étude, ces souris présentent des intervalles PQ et QRS prolongés en comparaison des souris FVB/N, ainsi qu'une hausse de la durée du PA.

d. Traitements

Comme dit précédemment, les β -bloquants constituent le traitement de choix chez les patients souffrant d'un SQTL. Cependant, si leur administration a montré une efficacité certaine chez les patients atteints d'un SQTL de type 1 (Vincent et al., 2009), leur effet bénéfique chez les individus victimes d'un SQTL de type 3 est discuté (Priori et al., 2004). En effet, s'ils améliorent la perfusion du myocarde, la bradycardie qu'ils induisent pourrait potentiellement créer un terrain arythmogène chez ces patients. Du fait du gain de fonction de Nav1.5 à la base du phénotype chez les individus atteints d'un SQTL de type 3, un inhibiteur du canal Nav1.5, et plus spécifiquement du courant I_{NaLate} , peut être associé au traitement par β -bloquants (van den Berg et al., 2014). De tels inhibiteurs du courant I_{NaLate} ont été développés, comme la mexiletine, la flécainide ou la ranolazine. La mexiletine et la flécainide diminuent la proportion de courant I_{NaLate} mais aussi du pic de courant I_{Na} . La ranolazine est plus spécifique du courant I_{NaLate} que du courant au pic (Fredj et al., 2006a), mais possède également des effets inhibiteurs mineurs sur des canaux calciques et potassiques (Antzelevitch et al., 2014). Cette molécule, commercialisée sous le nom Ranexa®, a été approuvée par la FDA (Food and Drug Administration) en 2006 et par l'agence européenne des médicaments en 2008.

Deux inhibiteurs du courant I_{NaLate} de nouvelle génération ont vu le jour récemment, l'eleclazine (GS-6615) et le GS-(458)967. Ces inhibiteurs sont plus spécifiques du courant I_{NaLate} et efficaces à des doses inférieures en regard de la ranolazine (figure 21) (Belardinelli et al., 2013; Rajamani et al., 2016). L'eleclazine, a été développée en 2016 (Fuller et al., 2016) et diminue la courant I_{NaLate} de façon plus importante que la ranolazine en système de réexpression hétérologue, avec des effets comparables sur le courant au pic (El-Bizri et al., 2017). Cette molécule a montré des effets anti-arythmiques ex-vivo sur des cœurs de lapins en présence d'ATX-II (Anemonia sulcata toxin II, une toxine augmentant le courant I_{NaLate}) (Rajamani et al., 2016). Un essai clinique chez l'Homme, visant à étudier les effets bénéfiques potentiels de cette molécule dans un contexte de SQTL de type 3, sur l'hypertrophie cardiaque ainsi que sur la survenue de tachycardies et fibrillations ventriculaires a débuté mais a été interrompu. (Zablocki et al., 2016).

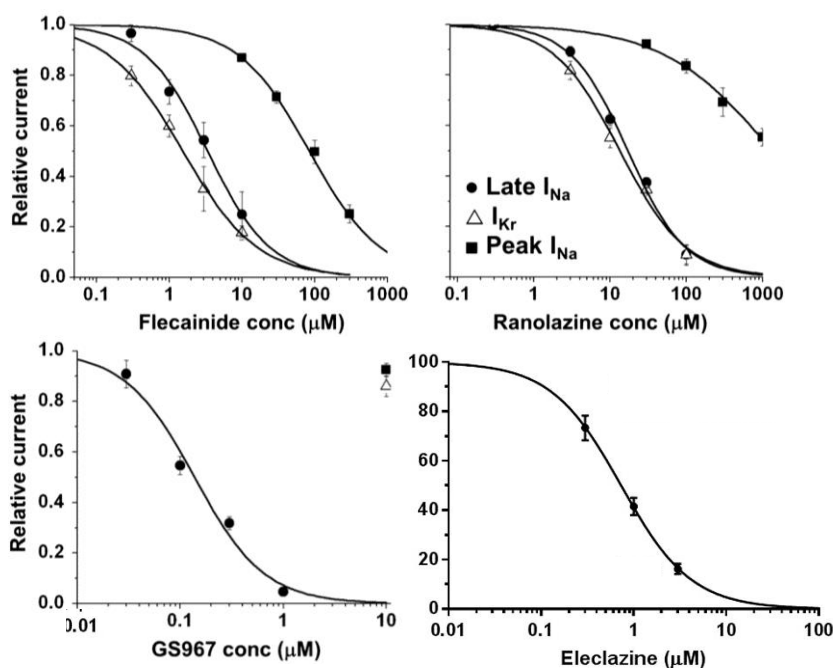


Figure 21 : Courbes doses-réponse de 4 inhibiteurs du courant I_{NaLate} sur les courants sodiques et potassiques. En haut : En comparaison de la flécainide, la ranolazine inhibe plus spécifiquement le courant I_{NaLate} , ces deux molécules affectant cependant en parallèle le courant I_{Kr} et le pic de courant I_{Na} . En bas : Le GS967 et l'eleclazine inhibent le courant I_{NaLate} à des doses inférieures. Pour le GS967, cela se fait sans effet délétère sur les autres courants. Les effets de l'eleclazine sur les courants I_{Kr} et sur le pic de courant I_{Na} sont à investiguer. D'après Belardinelli et al., 2013 et Rajamani et al., 2016.

2. Le syndrome du QT court

Décrit pour la première fois en 2000 (Gussak et al., 2000), le SQTC a été diagnostiqué dans environ 200 cas de 50 familles différentes jusqu'à aujourd'hui (Mazzanti et al., 2017). Ce syndrome constitue donc une maladie très rare, caractérisée par un intervalle QTc excessivement court sur l'ECG, reflétant un raccourcissement du PA à l'échelle du cardiomyocyte dû à un excès de repolarisation. Ces anomalies peuvent être à la base de troubles du rythme ventriculaires, aboutissant à des syncopes, voire des morts subites cardiaques (Gaita et al., 2003).

a. Clinique

Un SQTC est diagnostiqué en présence d'un intervalle QTc inférieur à 340 ms (Figure 22), ou bien inférieur à 360 ms en présence d'un des 4 critères suivants : (1) la présence d'une

mutation pathogène connue ; (2) un historique familial de SQTC ; (3) une mort subite cardiaque récupérée avant l'âge de 40 ans ; (4) un épisode de tachycardie ou de fibrillation ventriculaire (Priori et al., 2015). Plus de la moitié des patients présentant un SQTC à l'ECG restent asymptomatiques (Ackerman et al., 2011). Les recommandations cliniques prévoient l'implantation d'un défibrillateur chez les patients victimes de mort subite récupérée ou d'épisodes antérieurs de troubles du rythme ventriculaire. Le sotalol et la quinidine, des inhibiteurs des canaux potassiques, peuvent être utilisés chez les personnes asymptomatiques (Gaita et al., 2004; Priori et al., 2015).

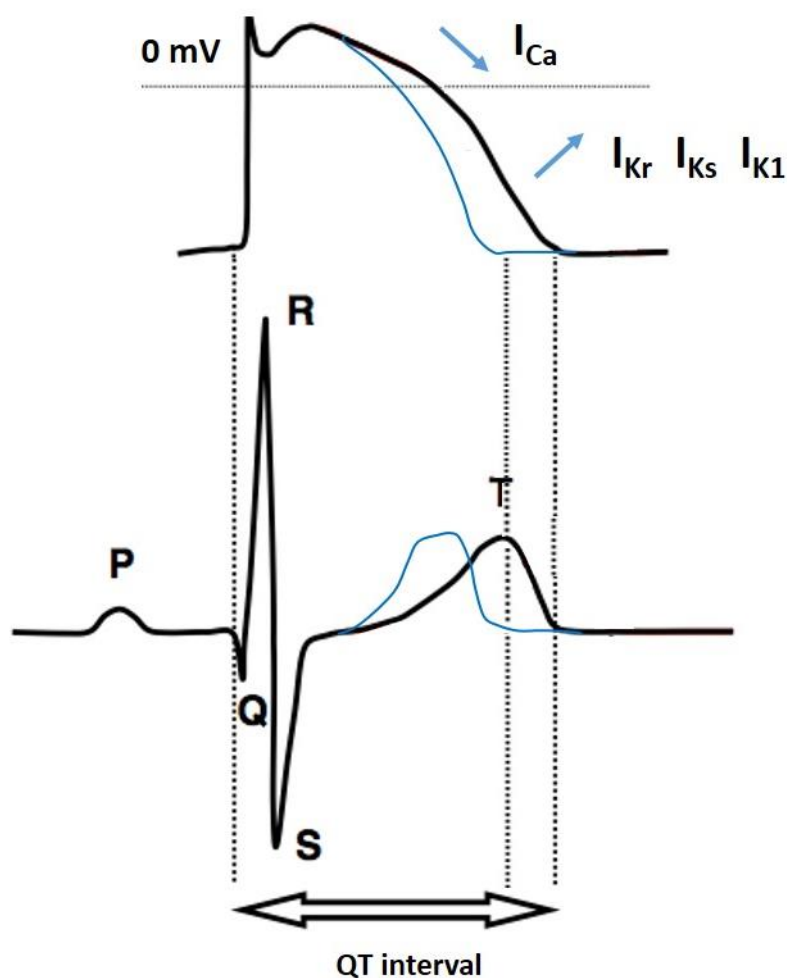


Figure 22 : Courants ioniques impliqués dans le SQTC. Des pertes de fonction de $I_{Ca,L}$ ou des gains de fonction de courants hyperpolarisants (I_{K1} , I_{Ks} ou I_{Kr}) sont à la base d'un raccourcissement de la durée des PA (en haut) et d'un raccourcissement de l'intervalle QT à l'ECG (en bas). Modifié d'après Abriel et Zaklyazminskaya, 2013.

b. Génétique du syndrome du QT court

Quinze pour cent des cas de SQTC sont expliqués par la présence de mutations sur des gènes codant pour des canaux ioniques cardiaques (Ackerman et al., 2011; Mazzanti et al., 2017). Jusqu'en 2017, 6 gènes, codant pour des canaux potassiques ou calciques et leurs sous-unités régulatrices, ont été décrits comme possédant des mutations induisant un SQTC congénital (Tableau 4) (Pérez Riera et al., 2013). Ces mutations ont une transmission autosomique dominante à forte pénétrance dans chacun des cas. En outre, des syndromes chevauchants regroupant un SQTC et un SBr ont été rapportés (Antzelevitch et al., 2007; Mazzanti et al., 2014). En 2017, un 7^{ème} type de SQTC congénital a été décrit au sein de 2 familles possédant une mutation faux-sens sur le gène *SLC4A3* (Figure 23) (Thorsen et al., 2017). Ce gène code pour l'échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ AE3, et l'expression de l'échangeur muté chez les individus de ces familles induit un SQTC et des fibrillations ventriculaires. L'expression de cette mutation en système de réexpression hétérologue induit des défauts d'adressage de la protéine mutée à la membrane plasmique et un défaut d'échange ionique. Une perte de fonction du gène *Slc4a3* dans le poisson zèbre provoque une hausse du pH intracellulaire, une diminution de la $[\text{Cl}^-]_i$ et un raccourcissement du PA. Ces modifications pourraient participer aux évènements arythmiques chez les patients exprimant cette mutation.

Tableau 5 : Mutations associées à un SQTC. D'après Pérez Riera et al., 2013

	QTc duration [ms]	Gene (cardiac ion channel)
SQT1	286 ± 6	<i>KCNH2</i> (IKr)
SQT2	302	<i>KCNQ1</i> (IKs)
SQT3	315–330	<i>KCNJ2</i> (IK1)
SQT4	331–370	<i>CACNB2b</i> (ICa)
SQT5	346–360	<i>CACNA1C</i> (ICa)
SQT6	329	<i>CACNA2D1</i> (ICa)

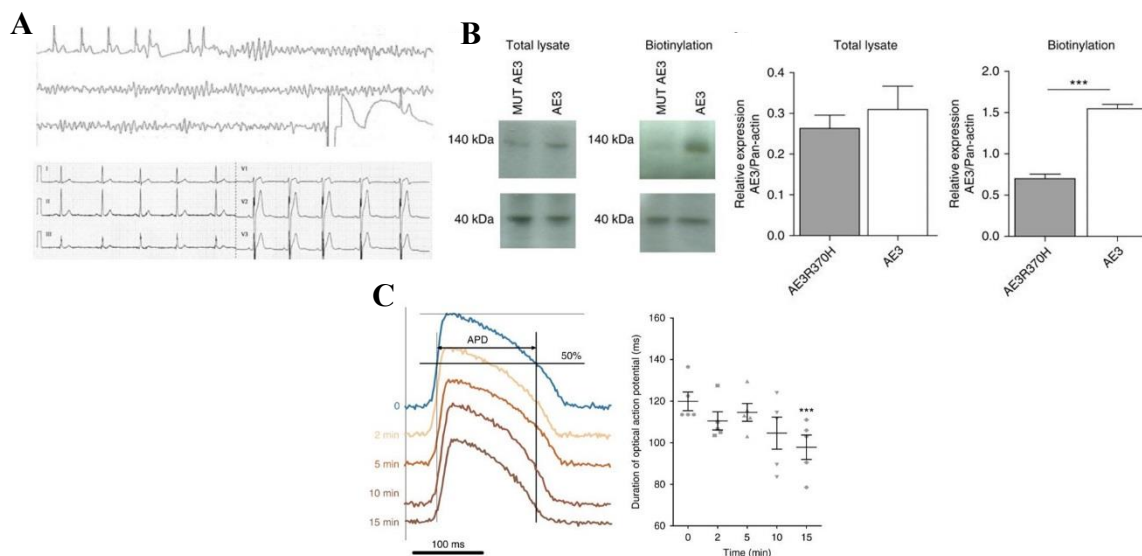


Figure 23 : La mutation R370H de *SLC4A3* est responsable d'un SQTC. A. La mutation sur l'échangeur AE3 ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$) induit un SQTC (en bas) et des fibrillations ventriculaires (en haut) chez l'Homme. **B.** Exprimée en système de réexpression hétérologue, la mutation engendre une perte de fonction via un défaut d'adressage de l'échangeur à la membrane plasmique, visualisée par des expériences de biotinylation. **C.** L'alcalinisation du milieu intracellulaire, conséquence de la perte de fonction de AE3, induit un raccourcissement de la durée du PA, mesurée *ex-vivo* sur des cœurs de lapins. D'après Thorsen et al., 2017.

c. Modèles d'étude du SQTC

Le SQTC ayant été découvert il y a moins de 20 ans, les modèles d'étude de cette pathologie demeurent peu nombreux. A ce jour, 2 modèles de souris présentent un SQTC : les souris invalidées à l'état homozygote pour le gène *Slc8a1*^{-/-} codant pour l'échangeur NCX1 (Imahashi et al., 2005) et les souris présentant un défaut d'internalisation de la carnitine suite à un traitement chronique avec du MET88 (Roussel et al., 2016b). En plus de ces modèles animaux, le premier modèle de SQTC utilisant des cardiomyocytes dérivés de cellules souches pluripotentes induites (IPS-CM, Induced-Pluripotent Stem cells derived cardiomyocytes) a été développé à partir de patients exprimant la mutation N588K sur le gène *KCNH2* (SQTL de type 1), et caractérisé très récemment (El-Battrawy et al., 2018). Ces 3 modèles seront décrits ci-après.

i. Les souris *Slc8a1*^{-/-}

L'invalidation du gène *Slc8a1* à l'échelle de l'organisme entier est létale *in utero* chez la souris (Wakimoto et al., 2000). Cependant, si l'invalidation n'est réalisée qu'au niveau cardiaque, les souris vivent jusqu'à l'âge adulte. Globalement, les souris *Slc8a1*^{-/-} semblent

s'adapter relativement bien à l'absence d'expression de NCX1 dans le myocarde. Plusieurs études sur ces animaux ont démontré un raccourcissement de l'intervalle QTc à l'ECG (Henderson et al., 2004; Pott et al., 2005, 2007a) et du PA des cardiomyocytes isolés, les mécanismes de ce raccourcissement ayant été attribués à une diminution du courant $I_{Ca,L}$ et surtout à une augmentation du courant I_{to} (Figure 24) (Pott et al., 2005, 2007a). Les cinétiques d'inactivation d' I_{to} sont ralenties, et l'expression du canal Kv4.2 et de la protéine partenaire KChIP sont augmentées. Plutôt que de s'adapter en augmentant l'efflux de Ca^{2+} par d'autres voies, le cardiomyocyte semble donc plutôt limiter l'influx de Ca^{2+} en l'absence de NCX1. La contractilité du myocarde est réduite de 25% chez les souris *Slc8a1*^{-/-}, sans atteinte structurale. Les transitoires calciques demeurent normaux dans ce modèle, comme les concentrations calciques cytosoliques et à l'intérieur du RS.

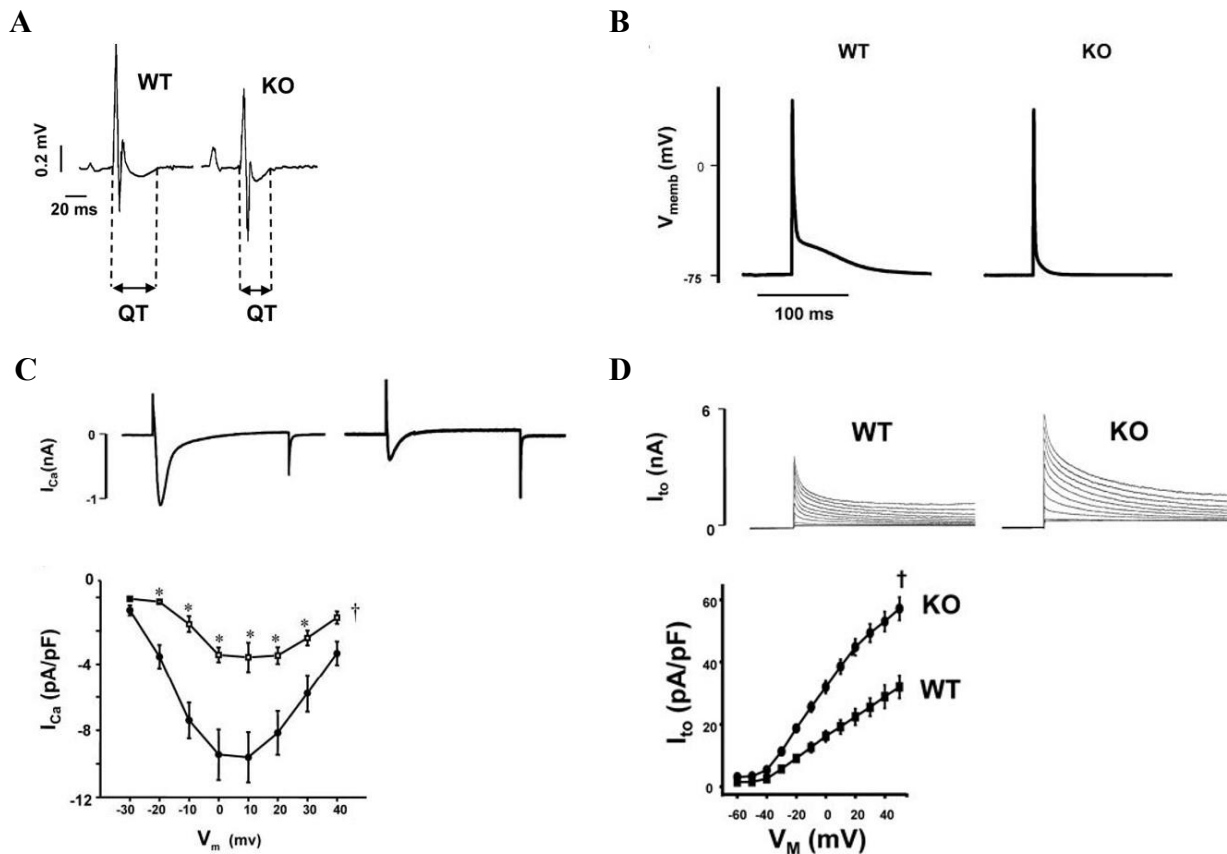


Figure 24 : Caractérisation de la souris *Slc8a1*^{-/-}. En regard de souris sauvages (WT, à gauche), les souris *Slc8a1*^{-/-} (KO, à droite) présentent **A.** un intervalle QTc et **B.** un PA raccourcis. **C.** La densité de courant $I_{Ca,L}$ est diminuée de 60% chez les souris *Slc8a1*^{-/-} par rapport aux souris sauvages. **D.** La densité de courant I_{to} est augmentée chez les souris *Slc8a1*^{-/-} en comparaison des souris sauvages. D'après Pott et al., 2005 et 2007a.

ii. Les souris déficientes en carnitine

Les acides gras à chaîne longue doivent être complexés à la carnitine pour diffuser à travers la membrane mitochondriale. Le transporteur OCTN2 est le transporteur de la carnitine,

et le MET88 est un inhibiteur compétitif de ce transporteur (Liepinsh et al., 2008; Ohashi et al., 2001). Des déficiences en carnitine chez l'Homme sont corrélées à l'apparition d'une cardiomyopathie hypertrophique (Morand et al., 1979) et à des troubles du rythme ventriculaire (Rijlaarsdam et al., 2004). Roussel et ses collaborateurs ont corrélié l'apparition d'un intervalle QTc raccourci chez des patients avec une déficience en carnitine, causée par une mutation sur OCTN2. Dans ce cas précis, la durée de l'intervalle QTc est normalisable par des prises régulières de L-carnitine, ce qui en fait le seul cas de SQTC traitable en ciblant la cause de la maladie et non ses symptômes. Ainsi, un modèle murin de SQTC a été développé, basé sur des souris déficiente en carnitine, en administrant du MET88 pendant 4 semaines aux animaux (Roussel et al., 2016b). Ce modèle a été caractérisé et montre que la déficience en carnitine induit effectivement un raccourcissement de l'intervalle QTc à l'ECG. De façon très intéressante, comme chez l'Homme, ces souris présentent une cardiomyopathie hypertrophique et des tachycardies et fibrillations ventriculaires (Figure 25). Les souris déficientes en carnitine représentent donc un bon modèle d'étude du SQTC et d'hypertrophie cardiaque pour la compréhension des mécanismes à l'origine de ces pathologies.

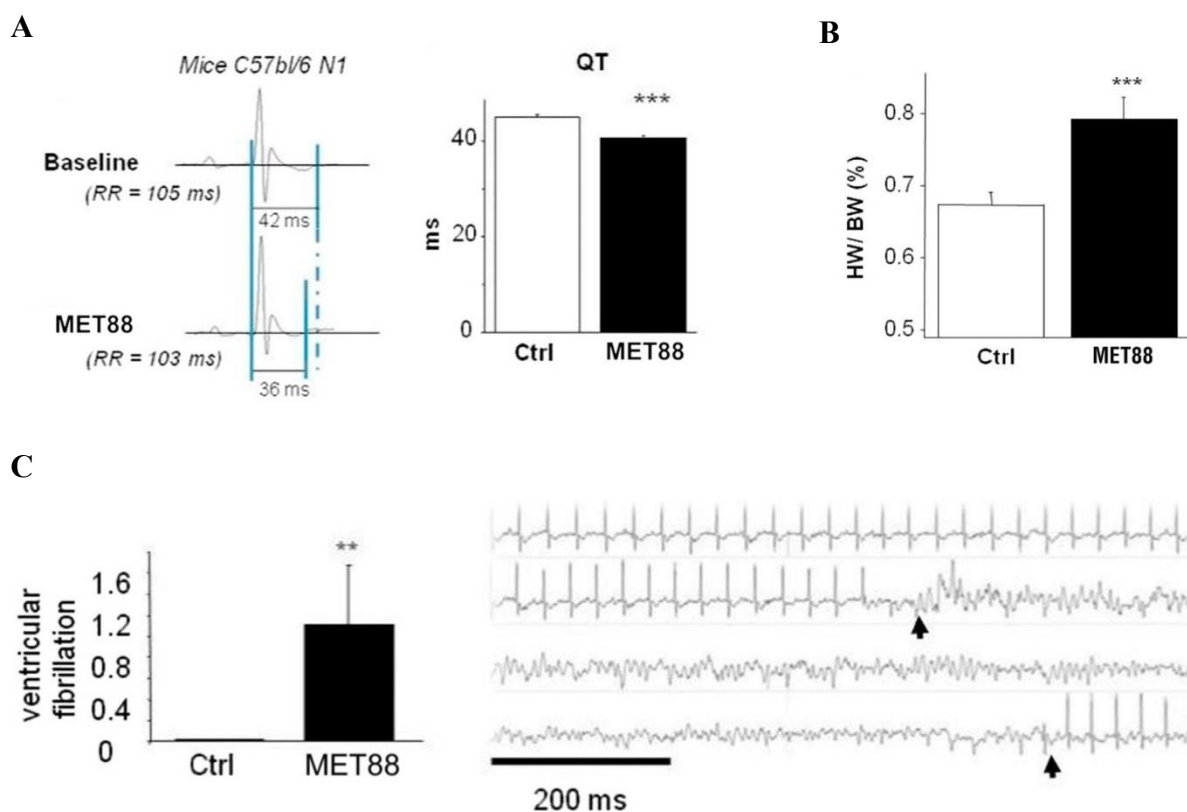


Figure 25 : Caractérisation des souris déficientes en carnitine. A. L'administration chronique de MET88 raccourci significativement l'intervalle QTc en regard du niveau de base. B. L'augmentation du ratio du poids du cœur sur le poids total suite à l'administration de MET88 montre l'apparition d'une hypertrophie cardiaque. C. La déficience en carnitine suite à l'administration de MET88 provoque l'apparition de troubles du rythme ventriculaire. D'après Roussel et al., 2016b.

iii. Les cellules *KCNH2* N588K

Les cellules *KCNH2* N588K sont des cardiomyocytes dérivés de cellules souches pluripotentes induites à partir de fibroblastes d'un patient présentant un SQTL de type 1 (El-Battrawy et al., 2018). Cet individu présente un intervalle QTc de 257 ms et s'est vu implanter un défibrillateur, celui-ci ayant délivré un choc justifié 19 mois après implantation suite au déclenchement d'un épisode de fibrillation ventriculaire. La caractérisation des cellules *KCNH2* N588K a montré un raccourcissement du PA lié à une augmentation de l'expression des canaux Kv11.1 et de la densité de courant I_{Kr} en comparaison de cellules dérivées d'individus sains. La mutation a également été montrée comme ayant un impact sur l'homéostasie calcique, en augmentant les $[Ca^{2+}]_i$ diastoliques et systoliques, en association avec une hausse de l'incidence d'évènements arythmogènes enregistrés sur les transitoires calciques des cellules exprimant la mutation. Dans ce modèle, comme en clinique, un traitement avec de la quinidine supprime ces évènements arythmogènes au cours des transitoires calciques suite à une induction par perfusion des cellules avec du carbachol (Figure 26).

Avec ce travail, El-Battrawy et ses collaborateurs ont mis en évidence que les cardiomyocytes dérivés de cellules souches de patients pouvaient constituer un nouveau modèle d'étude pour le SQTC. Cette étude a pu confirmer l'idée selon laquelle un raccourcissement du PA chez les patients souffrant de cette pathologie, et donc une diminution des PRE des cardiomyocytes, pouvait être à la base des troubles du rythme observés chez ces individus. En plus de cela, les auteurs ont aussi démontré des désordres de l'homéostasie calcique dans ce modèle cellulaire, faisant de ce phénomène un potentiel nouveau mécanisme arythmogène dans un contexte de SQTC.

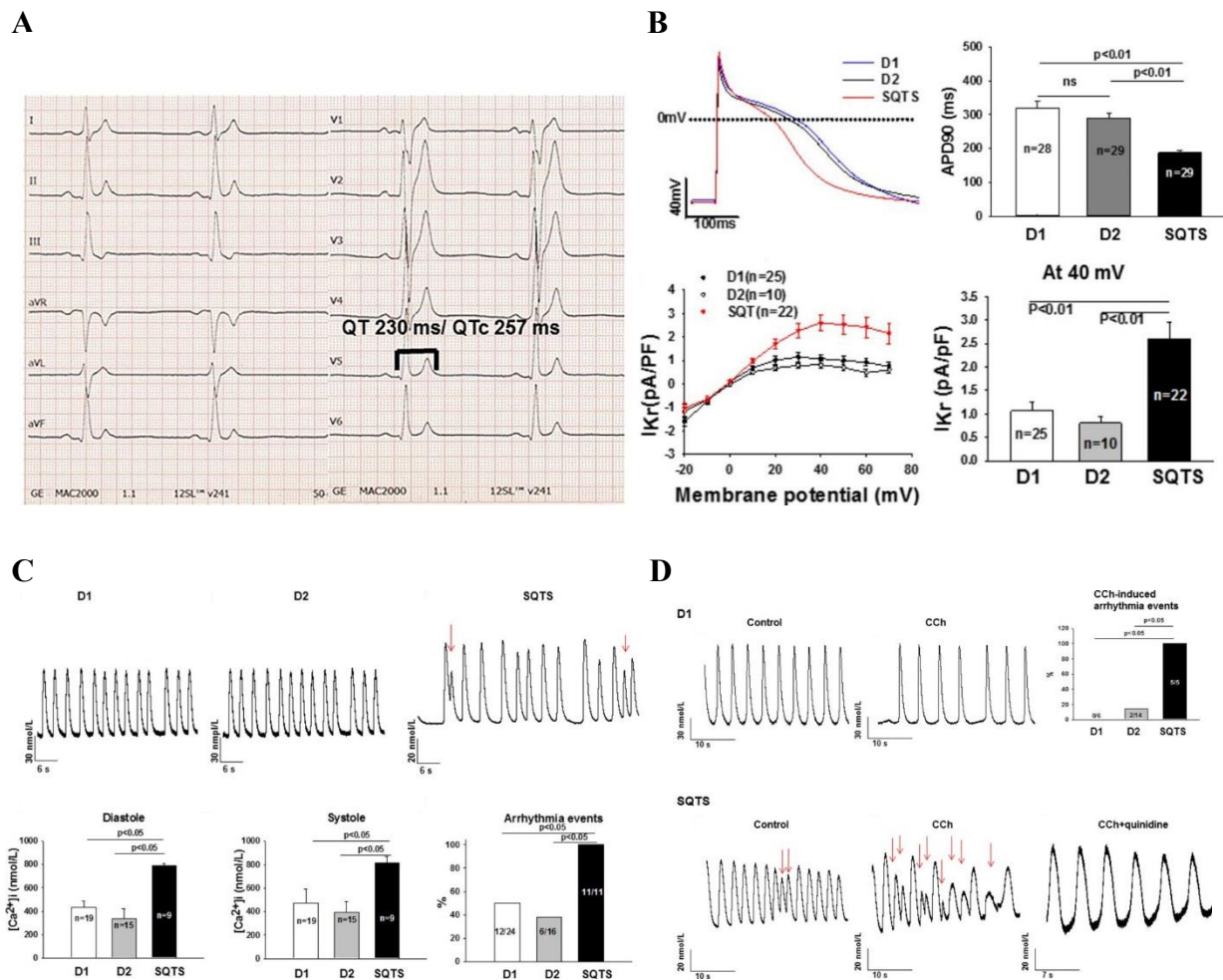


Figure 26 : Les cellules *KCNH2* N588K, modèle cellulaire de SQTC. **A.** Les individus porteurs de la mutation N588K sur le gène *KCNH2* présentent un SQTC à l'ECG. **B.** Les cardiomyocytes dérivés d'IPS d'un porteur de la mutation montrent un PA raccourci, dû à un gain de fonction du courant I_{Kr} en regard d'individus sains. **C.** La mutation engendre l'apparition d'événements arythmogènes lors de l'enregistrement de transitoires calciques (flèches rouges). **D.** L'incidence de ces événements, amplifiés par le carbachol, est normalisée par la perfusion de quinidine. D'après El-Battrawy et al., 2018. D1 et D2 : cardiomyocytes dérivés d'IPS de patients sains. SQTS : Short QT Syndrome, cardiomyocytes dérivés d'IPS d'un patient porteur de la mutation N588K. CCh : Carbachol.

d. Mécanismes arythmogènes dans le SQTC

Les mécanismes à l'origine des troubles du rythme retrouvés dans le SQTC sont moins bien connus que ceux impliqués dans le SQTl. Des travaux récents chez la souris ont démontré qu'une diminution des PRE était présente en même temps qu'un raccourcissement du PA induit par une hyperkaliémie (Tse et al., 2016). Cette diminution des PRE favorise la survenue d'épisodes rythmiques par des circuits de réentrées.

Ces derniers se définissent comme la circulation de l'influx électrique au sein d'une boucle fermée au sein du tissu cardiaque (Figure 27). Un tel circuit peut provoquer l'excitation répétitive des zones du myocarde comprises dans cette boucle (Comtois et al., 2005). Généralement, les circuits de réentrées sont formés par un obstacle pouvant être anatomique (par exemple une zone de fibrose suite à un infarctus) ou fonctionnel (une zone ischémique avec un défaut d'excitabilité). Pour qu'un tel circuit se forme, la durée de la conduction au sein de la boucle doit donc être supérieure à la durée de la PRE du tissu. Dans ce cas, l'influx électrique peut retourner à son site d'origine et démarrer un nouveau cycle. Ainsi, un raccourcissement du PA et des PRE dans le contexte du SQTC favorise la genèse de tels troubles rythmiques. Un long circuit d'un point de vue anatomique favorise donc les réentrées, puisque chaque région du circuit a plus de temps pour retrouver son excitabilité. Il est par exemple impossible d'induire une fibrillation ventriculaire soutenue dans le temps sur un ventricule droit humain si la masse du tissu est inférieure à 20% de la masse totale du myocarde (Wu et al., 1999). Dans le cas du SQTC, les phénomènes de réentrées ne sont pas causés par la présence d'un obstacle mais sont la conséquence d'un raccourcissement des PRE, entraînant probablement une activité électrique circulaire de type rotor.

Il n'est pas impossible que, en parallèle des diminutions des PRE, des troubles de l'homéostasie calcique constituent un mécanisme à la base des arythmies chez les patients atteints d'un SQTC. L'étude de El-Battrawy et ses collaborateurs a ouvert la voie à cette considération, en démontrant de façon surprenante des hausses des concentrations calciques diastoliques et systoliques dans leur modèle de SQTC basé sur des cardiomyocytes dérivés de cellules souches pluripotentes induites. A cela est associée une forte incidence d'évènements arythmogènes sur les transitoires calciques, s'apparentant à des EADs sur des enregistrements de PA (El-Battrawy et al., 2018). Ces observations seront à mettre en perspective avec les résultats obtenus au cours de cette thèse lors de pertes de fonction de NCX1 associées à un SRP et un raccourcissement de l'intervalle QT.

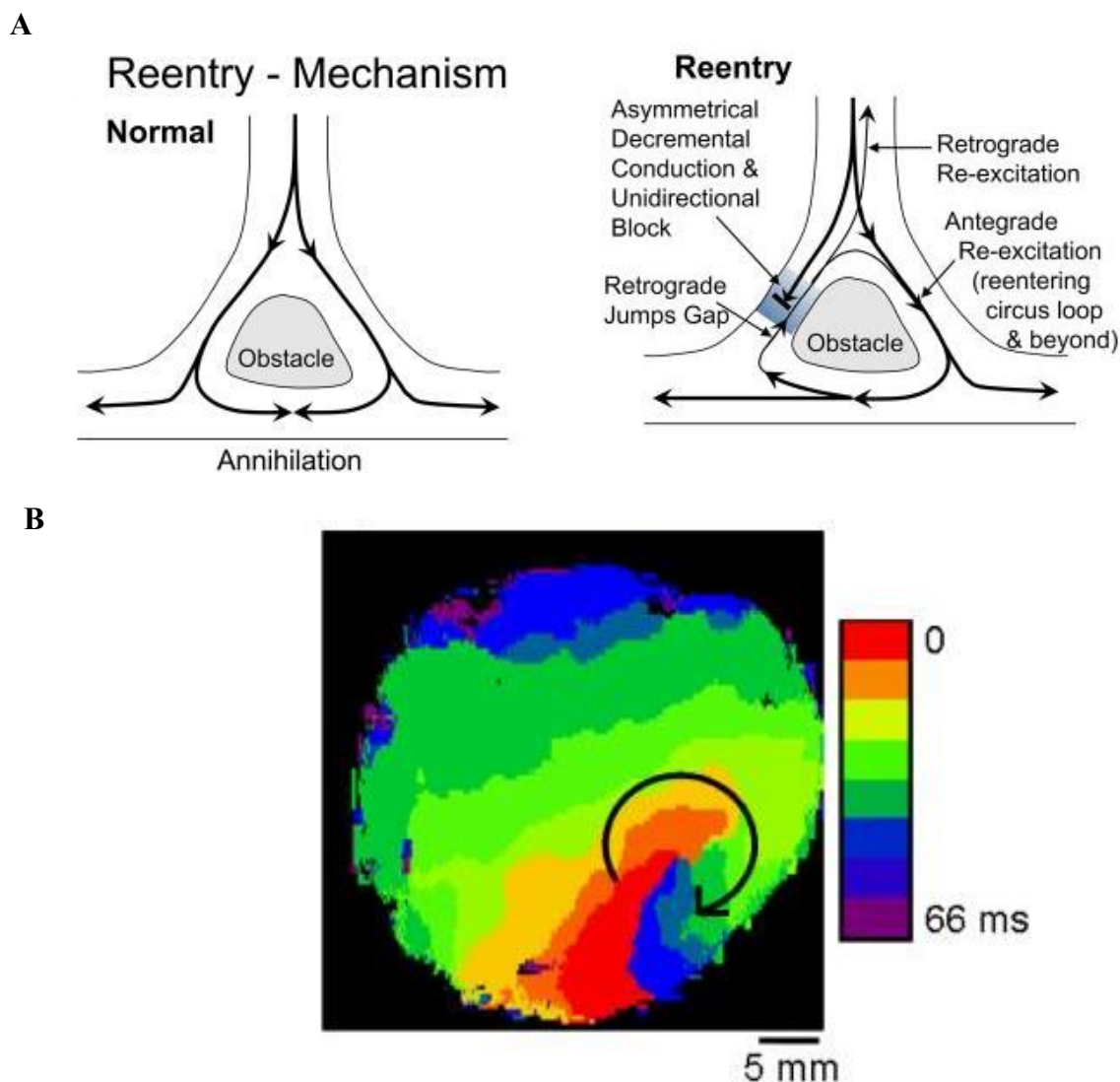


Figure 27 : Les circuits de réentrées, un mécanisme arythmogène. A. En présence d'un obstacle anatomique ou fonctionnel, au sein duquel la conduction est ralentie, la propagation de l'influx électrique peut se faire de façon normale (à gauche). Dans ce cas, l'influx électrique s'annule en aval de l'obstacle du fait des influx provenant de directions opposées. Si un bloc unidirectionnel existe d'un côté de l'obstacle, l'onde électrique peut emprunter une boucle autour de celui-ci et réexciter des régions en amont, créant un circuit de réentrée (à droite). D'après Wagner et al., 2015. B. Carte de l'activité électrique d'une région du myocarde. En absence d'obstacle au sein du tissu myocardique, un circuit de réentrée peut apparaître du fait d'une diminution des PRE. L'onde électrique, en se propageant de façon circulaire (flèche noire), peut réexciter une zone ayant déjà perçu l'influx électrique. L'échelle de couleur représente le temps de récupération (en ms) entre chaque passage de l'influx électrique au sein du circuit de réentrée. D'après Mandapati et al., 2000.

3. Le syndrome de repolarisation précoce

Le SRP fait partie, avec le SBr, des syndromes dits de l'onde J, caractérisés par une déflexion vers le haut au niveau de la jonction entre le complexe QRS et le segment ST sur l'ECG (Sethi et al., 2014).

a. Clinique

Le SRP a été considéré comme normal ou bénin depuis sa découverte en 1951 (Grant et al., 1951) jusqu'en 2000 quand Gussak et Antzelevitch ont proposé qu'il puisse être arythmogène par analogie avec le SBr (Gussak and Antzelevitch, 2000). C'est un peu plus tard que plusieurs études ont démontré une corrélation entre la présence d'un SRP à l'ECG et la survenue de morts subites cardiaques (Haïssaguerre et al., 2008) ou de fibrillations ventriculaires (Nam et al., 2010). Ce syndrome peut se manifester par une élévation du segment ST, un lien entre le complexe QRS et le segment ST (on parle alors de « slurring » ou de « slur ») ou par un décrochage de l'onde J vers le haut à la fin de l'onde S (on parle alors de « notching » ou de « notch ») sur les dérivation II et III à l'ECG et surtout sur les dérivation précordiales gauches V4, V5 et V6 (Figure 28) (Sethi et al., 2014). Un SRP est diagnostiqué lorsque la sus-élévation de la jonction QRS-ST observée à l'ECG est supérieure à 0,1 mV, en association avec la survenue de fibrillation ventriculaire ou d'une mort subite cardiaque récupérée (Priori et al., 2015). La prévalence d'un aspect de repolarisation précoce à l'ECG varie entre 3% et 24% au sein de la population générale, en fonction de la population étudiée et des méthodes d'analyse des ECGs (Nam et al., 2010).

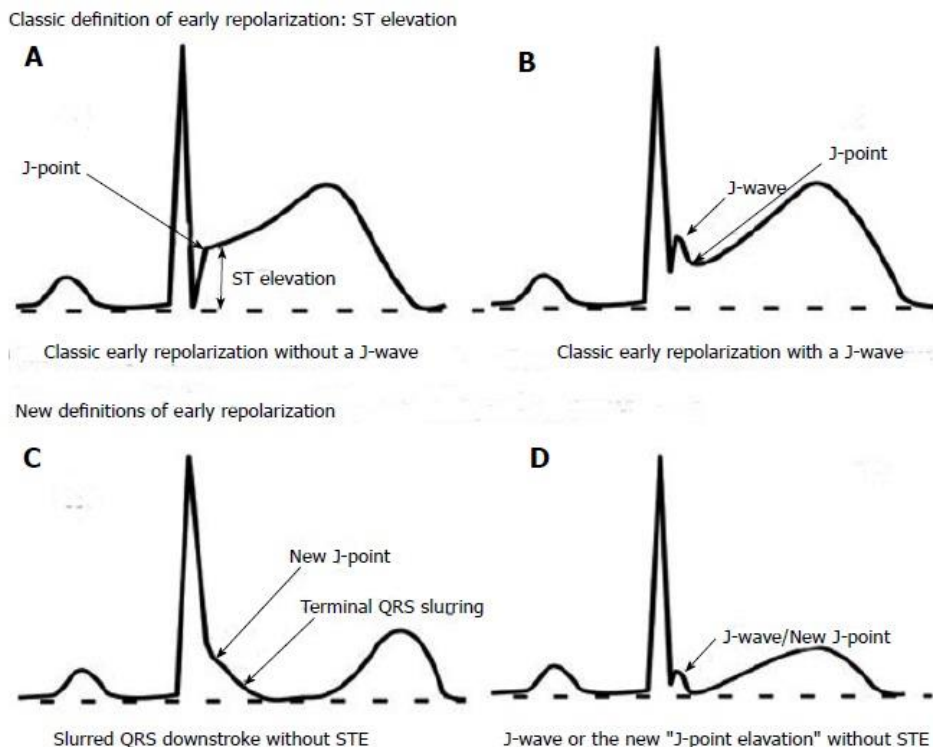


Figure 28 : Phénotype électrocardiographique du SRP. Le SRP peut se présenter sous différentes formes à l'ECG : **A.** Une élévation du segment ST, sans onde J. **B.** Une élévation du segment ST en présence d'une onde J. **C.** Une liaison entre le complexe QRS et le segment ST, ou « slur ». **D.** La présence d'une onde J sans élévation du segment ST, ou « notch ». D'après Ali et al., 2015.

b. Génétique du SRP

Les causes génétiques du SRP sont étudiées seulement depuis quelques années. Néanmoins, plusieurs études ont déjà démontré des liens de cause à effet entre des mutations sur les gènes *KCNJ8* (qui code pour le canal $K_{ir}6.1$, responsable du courant potassique sensible à l'ATP I_{KATP}) (Haïssaguerre et al., 2009a; Medeiros-Domingo et al., 2010), *CACNA1C*, *CACNB2* ou *CACNA2D1* (responsables de la génération du courant $I_{Ca,L}$) (Burashnikov et al., 2010) ou *SCN5A* (Watanabe et al., 2011a). Le gène *KCNJ8* code pour un canal potassique sensible à l'ATP, et la mutation S422L est responsable d'un gain de fonction de ce canal, traduit par une augmentation de la densité de courant I_{KATP} (Barajas-Martínez et al., 2012). A l'inverse, les variants identifiés sur les canaux calcique et sodique induisent des pertes de fonction de ces derniers (Burashnikov et al., 2010; Watanabe et al., 2011a).

c. Mécanismes arythmogènes du SRP

Les mécanismes physiopathologiques dans le contexte du SRP ne sont pas encore totalement compris. Le courant I_{to} semble jouer un rôle prépondérant dans cette pathologie. Plus particulièrement, dans le cas d'une moins grande densité de canaux potassiques au niveau du tissu sous-endocardique par rapport au tissu sous-épicaire ou mid-épicaire, un courant I_{to} plus prononcé dans ces dernières régions peut engendrer l'apparition d'une onde J à l'ECG (Li et al., 2002).

La participation d'anomalies locales de la dépolarisation et de perturbations de la repolarisation, identiques à celles observées dans les cas de SBr, peuvent également participer aux troubles du rythme observés dans un contexte de SRP (Figure 29) (Antzelevitch and Yan, 2010).

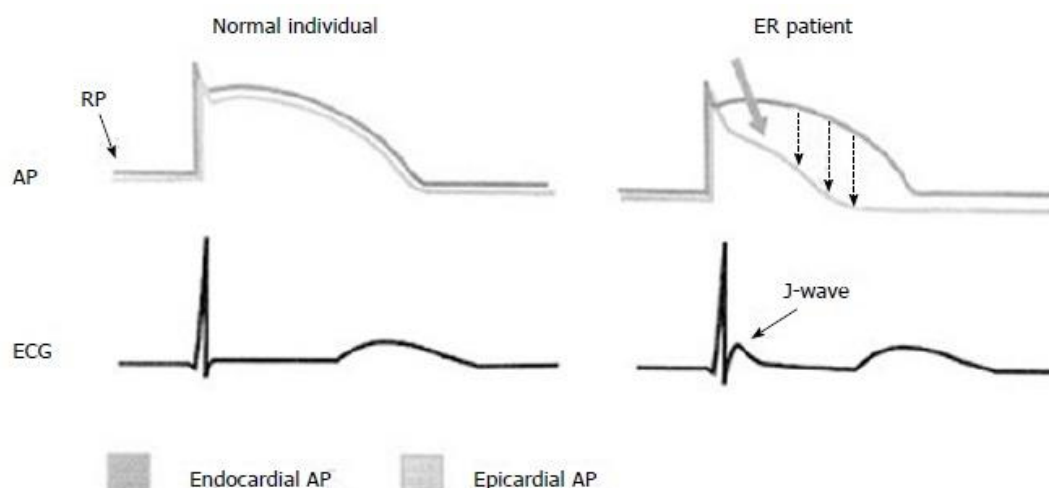


Figure 29 : Hypothèse mécanistique du SRP. Une amplification de la phase 1 et une abréviation de la phase 2 du PA seraient responsables de l'amplification du gradient transmural de repolarisation et de l'apparition d'une onde J et/ou d'une élévation du segment ST sur l'ECG. D'après Ali et al., 2015. ER : Early Repolarization, repolarisation précoce. AP : Action Potential, potentiel d'action. RP : Resting Potential, potentiel de repos.

d. Traitement

Sans autre symptôme qu'un ECG évocateur d'un SRP, cette pathologie est considérée comme bénigne et ne fait l'objet d'aucune recommandation clinique. Chez les patients présentant un aspect de repolarisation précoce à l'ECG associé à la survenue d'épisodes de fibrillation ventriculaire, l'administration aiguë de β -bloquants supprime les fibrillations ventriculaires tandis qu'un traitement aigu à la quinidine prévient l'incidence de ces arythmies (Haïssaguerre et al., 2009b). L'implantation d'un défibrillateur est envisagée chez les patients à fort risque arythmique.

B. Pathologies associées à NCX1

Aujourd'hui, aucune pathologie humaine n'a été décrite comme résultant directement d'une dysfonction de l'échangeur NCX1. Néanmoins, du fait de son rôle central dans la régulation de la $[Ca^{2+}]_i$, des modulations de la fonction ou de l'expression de NCX1 ont été observées de manière secondaire dans des contextes de troubles du rythme cardiaque ou d'insuffisance cardiaque. Il est notamment bien décrit que des libérations spontanées de Ca^{2+} du RS via les RyRs peuvent activer de façon excessive l'échange d'ions Na^+ et Ca^{2+} via NCX1,

et induire un courant entrant qui participe à l'apparition de troubles rythmiques (Sipido et al., 2006).

Plusieurs études ont pu démontrer une altération de l'expression ou de la fonction de NCX1 dans des contextes d'insuffisance cardiaque ou d'ischémie (Dutta et al., 2006; Sipido et al., 2002). A l'inverse, une surexpression de NCX1 ou une hausse de son activité peut participer à des phénomènes arythmogènes ou à une dysfonction contractile, mais aussi exercer des effets compensatoires par une meilleure extrusion du Ca^{2+} du cardiomyocyte (Sipido et al., 2006).

Dans le but de comprendre l'implication de NCX1 dans l'apparition de troubles du rythme, des modèles murins ont été générés et étudiés. Les souris invalidées à l'état homozygote au niveau du cœur pour le gène *Slc8a1* (souris *Slc8a1*^{-/-}) sont résistantes aux lésions suivant une ischémie/reperfusion, de par leur protection vis-à-vis d'une hausse de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Imahashi et al., 2005). Plus globalement, chez ces souris, le myocarde semble s'adapter assez remarquablement à l'absence d'échangeur NCX1, puisque ces animaux ne présentent que de modestes traits phénotypiques : une réduction faible de la fonction cardiaque à l'échographie, une baisse de la contractilité cardiaque, tandis qu'aucun remodelage n'est détecté en terme d'expression protéique, et que les transitoires calciques sont normaux, comme la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ et la charge en Ca^{2+} du RS. Un raccourcissement du PA est observé, corrélé à une diminution du courant entrant via les canaux Cav1.2, mais surtout dû à une augmentation du courant I_{to} . Plutôt que de s'adapter en activant d'autres mécanismes d'efflux de Ca^{2+} , les cardiomyocytes de souris *Slc8a1*^{-/-} s'adaptent donc en limitant l'influx de Ca^{2+} dans le cytosol (Henderson et al., 2004; Pott et al., 2005, 2007a). Dans un autre modèle de souris invalidées à l'état homozygote pour le gène *Slc8a1* au niveau ventriculaire, les auteurs ont pu corrélérer la baisse d'expression de NCX1 avec l'apparition d'une insuffisance cardiaque (Jordan et al., 2010). Au niveau des cellules responsables de l'activité pacemaker du myocarde, l'absence d'expression de NCX1 entraîne de façon non-surprenante une réduction du rythme cardiaque accompagnée d'épisodes arythmiques sévères (Herrmann et al., 2013).

Des souris surexprimant NCX1 à l'état homozygote spécifiquement dans le cœur ont été l'objet de plusieurs études. Ces souris présentent un phénotype regroupant une insuffisance cardiaque, des défauts de contractilité, ainsi qu'un allongement de la durée du PA du fait d'une augmentation du flux de Ca^{2+} entrant dans le cardiomyocyte, causée par une inactivation ralentie des canaux Cav1.2. Cette surexpression de NCX1 possède aussi des effets proarythmiques, via le déclenchement de post-dépolarisations précoces (Early After Depolarization, EAD) et retardées (Delayed After Depolarization, DAD) probablement causées

par des défauts de régulation de l'homéostasie calcique intracellulaire (Pott et al., 2005, 2007b; Reuter et al., 2002).

Le phénotype des souris sous-exprimant ou surexprimant NCX1, et notamment les modifications au niveau de la durée du PA ventriculaire, soulignent l'importance de cet acteur moléculaire dans la modulation des propriétés électriques cardiaques (figure 30).

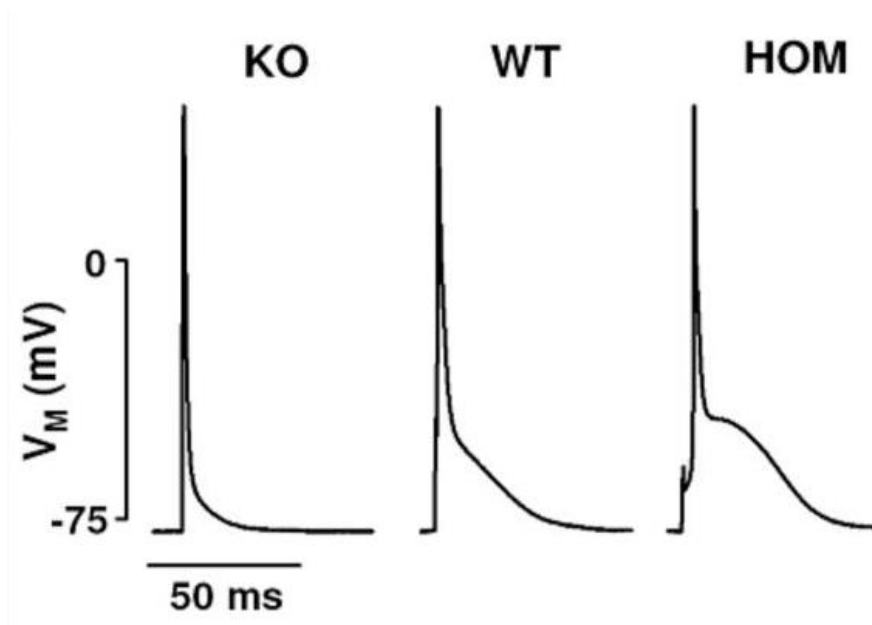


Figure 30 : Influence du courant I_{NCX} sur le potentiel d'action ventriculaire de cardiomyocytes de souris adultes. Le PA de souris invalidées à l'état homozygote pour le gène *Slc8a1* (KO, à gauche) présente une repolarisation plus rapide en comparaison d'un PA normal (WT, au centre). A l'inverse, la surexpression de *Slc8a1* (HOM, à droite) allonge la durée du PA. D'après Pott et al., 2011. V_M : Voltage membranaire

Comme dit précédemment, des hausses d'activité ou d'expression de NCX1 ont été largement observées dans des cas d'insuffisance cardiaque ou de troubles du rythme. De ce fait, un grand intérêt a été porté au développement d'inhibiteurs de l'activité de cet échangeur au cours des 40 dernières années. Plusieurs composés ont été générés, mais aucun ne permet aujourd'hui une inhibition spécifique de l'isoforme cardiaque de NCX1. De plus, même s'ils permettent une inhibition de NCX lors d'expériences de patch-clamp via une administration intracellulaire, ils sont impossibles à utiliser dans des contextes plus physiologiques du fait de leur mauvaise perméabilité à travers les membranes plasmiques (Annunziato et al., 2004). Le développement de nouveaux inhibiteurs spécifiques des différentes isoformes de NCX revêt donc un réel enjeu thérapeutique.

C. Pathologies associées à Nav1.5

Des dysfonctions de l'activité de Nav1.5 ont été identifiées comme causes de troubles du rythme, acquis ou congénitaux. Historiquement, la première canalopathie associée au canal sodique Nav1.5 fut le SQT1 de type 3 (Wang et al., 1995a). Un paragraphe est dédié à cette pathologie dans la section V-A-1. de cette introduction. Aujourd'hui, plusieurs autres maladies cardiaques ont été reliées à des atteintes de Nav1.5. Ces pathologies sont décrites ci-après, en mettant l'accent sur le rôle que peut jouer Nav1.5 dans chacune d'elles.

1. Le syndrome de Brugada

Le SBr est une maladie héréditaire de type autosomique dominante, à pénétrance très incomplète, prédisposant à la survenue de fibrillations ventriculaires, sans anomalie structurale du cœur détectable en clinique, et pouvant entraîner des syncopes et des morts subites cardiaques chez les patients, en grande majorité masculins (Garcia-Elias et Benito, 2018). Environ 20 à 30% des cas sont attribués à des mutations sur le gène *SCN5A* (Juang et Horie, 2016). En clinique, en plus de l'historique familial, cette pathologie est décelée lors de la réalisation d'un ECG par l'apparition d'une sus-élévation du segment ST associée à une inversion de l'onde T sur les dérivations précordiales droites. La durée de l'intervalle QT est normale. L'administration d'un inhibiteur de Nav1.5 tel que l'ajmaline ou la flécainide, ou la présence de fièvre peut aider à déceler un SBr non-visible lors de l'ECG basal (Priori et al., 2015).

Une large proportion des variants génétiques sur le gène *SCN5A* causant un SBr sont des mutations faux-sens, et des réductions du courant sodique I_{Na} sont à la base du phénotype observé. Ces diminutions de courant peuvent être tantôt dues à des défauts d'adressage au sarcolemme de Nav1.5, tantôt à des altérations des propriétés biophysiques du canal (Baroudi et al., 2001; Rook et al., 1999; Valdivia et al., 2004; Wang et al., 2000).

Deux mécanismes ont été proposés pour expliquer les causes cellulaires responsables de la survenue d'épisodes arythmiques chez les patients atteints de SBr (Figure 31). Le premier mécanisme repose sur la différence de durée du PA entre le myocarde sous-endocardique et le myocarde sous-épicaire, exagérée dans le cas d'une diminution du courant I_{Na} . Cette différence provient de la présence d'un gradient physiologique du courant repolarisant I_{to} , plus présent au niveau du tissu sous-épicaire que de dans la couche sous-endocardique, et qui explique la morphologie « spike and dome » du PA. Dans le cas d'un SBr, la diminution du

courant sodique induit un raccourcissement disproportionné du PA sous-épicaudique, qui aboutit à un gradient transmural de repolarisation, constituant ainsi un substrat pour des phénomènes de réentrées. Cette hypothèse, défendue par le groupe de Charles Antzelevitch, est basée notamment sur l'étude de préparations ventriculaires de chien (Antzelevitch, 1999; Antzelevitch et al., 1999; Yan et Antzelevitch, 1999).

La seconde hypothèse, soutenue par l'équipe d'Arthur Wilde, est basée sur l'idée qu'une réduction du courant I_{Na} induit un ralentissement de la conduction, exagéré dans une partie du myocarde, la chambre de chasse du ventricule droit, et donc une activation décalée dans le temps de cette dernière (Coronel et al., 2005; Meregalli et al., 2005; Tukkie et al., 2004; Zhang et al., 2007). Cette hypothèse est renforcée par des mesures cliniques de propagation de l'influx électrique au sein du cœur de patients (Postema et al., 2008, 2010), et par l'effet bénéfique de l'ablation de tissu sous-épicaudique au niveau de la chambre de chasse du ventricule droit (Nademanee et al., 2011).

Le débat est encore ouvert aujourd'hui pour savoir si ces deux hypothèses sont exclusives ou pourraient au contraire se compléter.

Les souris invalidées à l'état hétérozygote pour le gène *Scn5a* (souris *Scn5a*^{+/-}) représentent un modèle animal de SBr (Papadatos et al., 2002). Elles présentent des défauts de conduction aggravés par la flécaïnide (Leoni et al., 2010) et une propension à la survenue de troubles du rythme ventriculaires prenant leur origine dans la chambre de chasse du ventricule droit. Bien que ce modèle tende à supporter la deuxième hypothèse mécanistique comme cause des phénomènes arythmiques, l'absence d'une phase de plateau sur le PA de souris en fait un modèle sub-optimal pour tester la première hypothèse (Martin et al., 2010a, 2010b; Papadatos et al., 2002).

Ce modèle murin, par son phénotype, constitue également un modèle d'étude pour une autre pathologie liée à des mutations sur le gène *SCN5A* : les troubles progressifs de la conduction cardiaque (PCCD, Progressive Cardiac Conduction Disease).

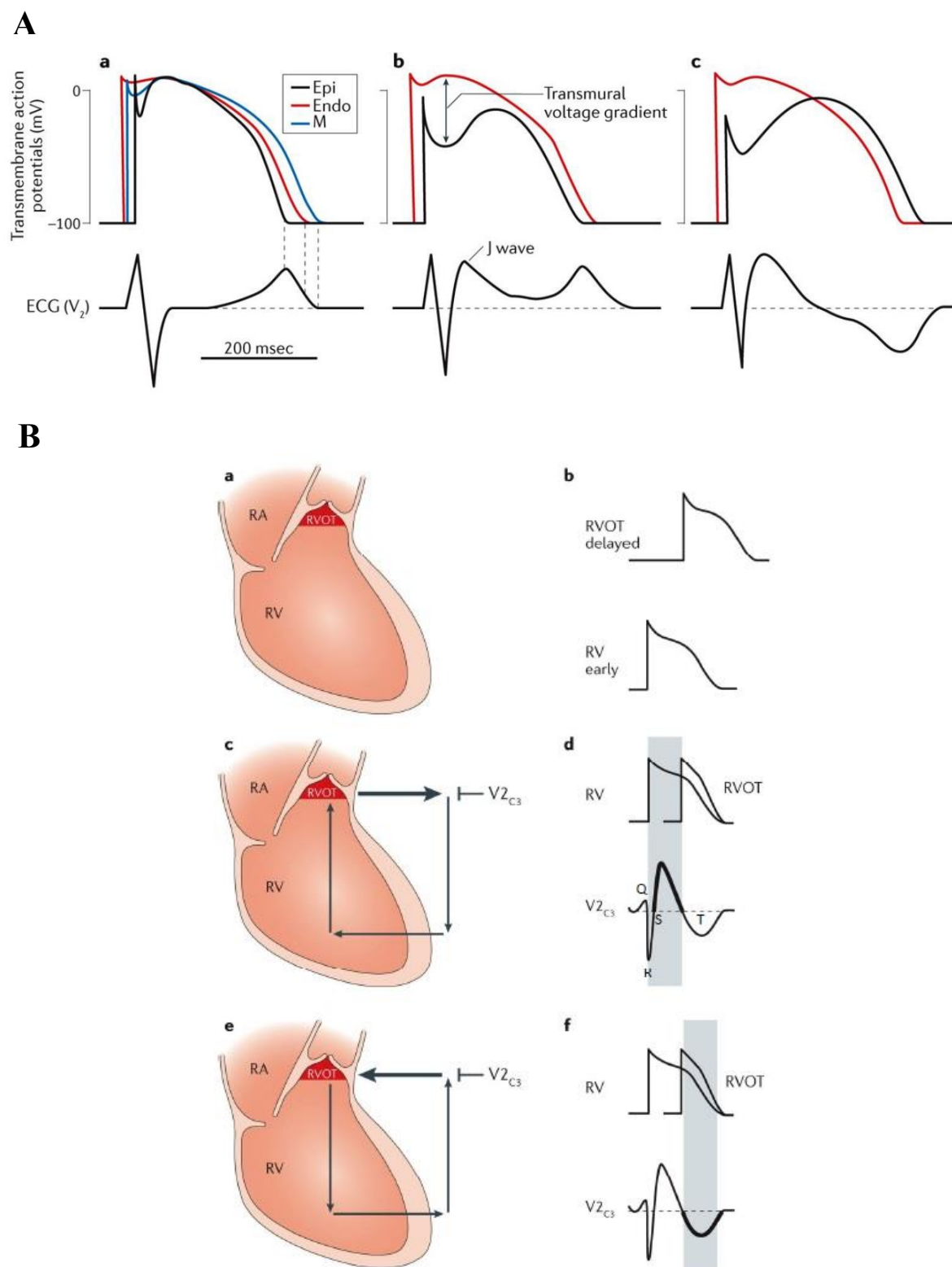


Figure 31 : Deux mécanismes proposés comme origine du SBr. **A.** Hypothèse de la repolarisation. Cette hypothèse repose sur l'existence d'un gradient transmural de repolarisation, qui serait à l'origine de la sus-élévation du segment ST sur l'ECG. **a.** PA d'individus sains. **b.** PA d'individus présentant un syndrome de repolarisation précoce. **c.** PA d'individus présentant un SBr. Epi : Myocarde sous-épicardique. Endo : Myocarde sous-endocardique. M : Cellules mid-myocardiques **B.** Hypothèse de la dépolarisation. Selon cette hypothèse, le retard de la dépolarisation de la chambre de chasse du ventricule droit et l'expression moindre de Nav1.5 serait à l'origine du phénotype observé sur l'ECG. RV : Right ventricle, ventricule droit. **a.** Schéma d'une coupe longitudinale du ventricule droit. **b.** Le PA du RVOT est retardé par rapport à celui de la paroi libre du ventricule droit. **c.** et **d.** L'influx électrique se propage du ventricule droit au RVOT, ce qui correspond au segment ST sur l'ECG. **e.** et **f.** Inversion du gradient de potentiel entre le ventricule droit et le RVOT. D'après Meregalli et al., 2005.

2. Les troubles progressifs de la conduction

La conduction cardiaque le long des réseaux de His et de Purkinje se ralentit avec l'âge. Ce phénomène pourrait avoir pour origine un processus pro-fibrotique apparaissant au fil du temps (Cheitlin, 2003). Cependant, ce phénomène peut être amplifié et lié à des mutations génétiques, en particulier sur le gène *SCN5A*, menant à des blocs auriculo-ventriculaires (BAV) et/ou une inexcitabilité atriale : ce sont les troubles progressifs de la conduction cardiaque (Wolf et Berul, 2006). En clinique, les patients peuvent présenter des symptômes dès l'enfance ou à l'âge adulte, allant de défauts de conduction à des blocs de branches droits ou gauches voire une évolution vers des BAV complets. Ces atteintes peuvent aboutir à des syncopes ou des morts subites.

Si la première mutation sur *SCN5A* corrélée à des troubles de conduction héréditaires, et identifiée par Jean-Jacques Schott et ses collaborateurs, mène à une perte de fonction totale du canal (Schott et al., 1999), plusieurs mutations faux-sens ont ensuite pu être mises à jour et caractérisées. Ces variants peuvent aboutir à des canaux Nav1.5 montrant des défauts complexes de leurs propriétés biophysiques, produisant des diminutions de densités de courants au pic à des potentiels physiologiques (Tan et al., 2001; Wang et al., 2002).

Au cours du vieillissement, les souris *Scn5a^{+/-}* voient leur intervalle QRS s'allonger à l'ECG et développent une fibrose progressive. Les phénomènes moléculaires sous-jacents sont en partie méconnus mais ont pu être corrélés à une augmentation d'expression du TGF- β et une baisse d'expression de la connexine 43, un acteur majeur des jonctions Gap aux disques intercalaires des cardiomyocytes (Derangeon et al., 2017; Hao et al., 2011; Royer et al., 2005). Il a été démontré que la sévérité du phénotype dans ce modèle était inversement proportionnelle au niveau d'expression de Nav1.5, sans que l'on connaisse l'origine de ces variations d'expression du canal sodique (Leoni et al., 2010).

3. Les syndromes chevauchants (overlap syndrome)

Les PCCD dues à des mutations sur le gène *SCN5A* peuvent être associés à des phénotypes complexes rassemblant des caractéristiques de 2 ou plusieurs syndromes, tels que le SQTl de type 3 ou le SBr dans les familles porteuses de ces variants. On parle alors d'« overlap syndrome ». C'est le cas par exemple de la mutation 1795insD sur *SCN5A*, identifiée dans une famille dont certains membres présentent lors d'un ECG un phénotype regroupant un SQTl et un SBr, et qui cause, au niveau fonctionnel, une augmentation du

courant I_{NaLate} typique d'un SQTL de type 3. Ce mutant induit également une diminution des cinétiques d'inactivation lente et une réduction de la proportion de canaux Nav1.5 activables, plus proches de la mécanistique d'un SBr (Bezzina et al., 1999). Des modifications similaires de la fonction du canal sodique ont aussi été retrouvées pour la mutation E1784K, liée à un overlap syndrome incluant des porteurs atteints de SBr, de SQTL de type 3 ou d'une dysfonction sinusale (Makita et al., 2008). D'autres mutations sur le gène *SCN5A* provoquant un overlap syndrome ont été découvertes, avec des phénotypes différents entre les membres d'une même famille, comme c'est le cas pour la mutation G1406R (Kyndt et al., 2001) ou entre des membres porteurs de la même mutation mais issus de familles différentes (pour la mutation D1275N par exemple), soulignant l'importance du profil génétique de chaque individu dans les manifestations cliniques causées par une variation génétique (Watanabe et al., 2011a).

4. Les dysfonctions du nœud sinusal (sick sinus syndrome)

Si la majeure partie des mutations identifiées à ce jour sur le gène *SCN5A* sont responsables de troubles du rythme ventriculaires, des variants sur ce gène peuvent aussi induire des dysfonctions de l'activité électrique atriale. C'est le cas des maladies ou dysfonctions du nœud sinusal, qui peuvent évoluer vers une inexcitabilité atriale et une bradycardie pathologique. Ces maladies sont détectables à la lecture d'un ECG présentant une absence d'onde P ou un allongement de l'intervalle PR, et surviennent majoritairement chez des sujets avec un passif pro-arythmique (John et Kumar, 2016).

Les individus de familles atteintes d'une forme congénitale de dysfonction sinusale héritent d'une mutation induisant des dysfonctions sévères de Nav1.5 provenant d'un parent et d'une autre mutation sur le second allèle induisant un phénotype moins sévère, issue de l'autre parent (Benson et al., 2003).

Les mécanismes à l'origine de ces troubles rythmiques ont été étudiés, notamment via des modélisations *in silico*. Les PA simulés dans un contexte de perte de fonction de Nav1.5 sur des modèles multicellulaires montrent des défauts de transmission de l'influx électrique entre les cellules du nœud sino-atrial et les cellules environnantes (Butters et al., 2010). Ces prédictions sont en accord avec les observations réalisées sur les souris *Scn5a^{+/-}* (Lei et al., 2007).

5. Les fibrillations ventriculaires idiopathiques

Comme le SBr, les fibrillations ventriculaires idiopathiques (FVI) sont la cause de syncopes et de morts subites chez de jeunes adultes, en majeure partie de sexe masculin. La FVI est diagnostiquée dans 44% des cas de fibrillation ventriculaire en l'absence de défauts structuraux du myocarde et après avoir écarté la possibilité d'autres pathologies électriques primaires. Par définition, l'ECG basal chez les patients atteints de FVI est normal avant la survenue de l'épisode arythmique (Krahn et al., 2009; Rosso et al., 2008). Néanmoins, une étude suggère que ces individus présentent des durées d'intervalles QT dans la moyenne basse, voire plus courts en comparaison de patients sains (Viskin et al., 2004). En outre, les patients victimes de FVI sont décrits comme possédant une forte prévalence d'onde J à l'ECG (Haïssaguerre et al., 2009a).

La fibrillation ventriculaire est initiée par une extrasystole à couplage court, voire très court dans le cas de FVI, naissant dans les fibres de Purkinje du ventricule gauche dans 85% des cas, ou dans la chambre de chasse du ventricule droit dans les 15% des cas restants (Haïssaguerre et al., 2002a; Saba et al., 2011). Le traitement de choix pour les individus sujets à des épisodes de fibrillations ventriculaires réside dans l'implantation d'un défibrillateur (Zipes et al., 2006). L'ablation de la zone de tissu arythmogène par radiofréquence s'est aussi révélée efficace (Haïssaguerre et al., 2002b). Aucune recommandation pharmacologique n'est décrite pour les patients victimes de FVI, et plusieurs thérapies anti-arythmiques, incluant l'administration de β -bloquants, se sont révélées inefficaces. Néanmoins, quelques études concluent à un effet bénéfique de l'administration de quinidine, un inhibiteur des canaux potassiques et sodiques, sur la fréquence de survenue d'épisodes arythmiques (Belhassen et al., 1999).

6. Les cardiomyopathies dilatées

Cette atteinte structurale, qui représente une cause majeure de transplantation cardiaque, se caractérise par une dilatation des cavités cardiaques et une fonction systolique diminuée.

Les mutations situées sur des gènes codant pour des canaux ioniques sont classiquement la cause de troubles du rythme, tandis que les variants génétiques provoquant des atteintes structurales de type cardiomyopathies sont plutôt retrouvés sur des gènes codant des protéines contractiles ou sarcomériques. Certaines mutations sur *SCN5A* représentent cependant une exception, puisqu'à ce jour, 19 mutations sur ce gène ont été identifiées au sein de familles

présentant un phénotype associé à une cardiomyopathie dilatée (Shen et al., 2017). La pénétrance de ces mutations est souvent incomplète. Bon nombre de ces mutations ont été étudiées en systèmes de réexpression hétérologue. Certaines induisent des pertes de fonction de Nav1.5, comme c'est le cas des mutations R225W (Moreau et al., 2015), W156X (Bezzina et al., 2003) et T220I (Gui et al., 2010), tandis que d'autres n'ont pas de conséquence sur les propriétés biophysiques du canal (D1275N, R814W, R814Q, D159H, A1180V) (Ge et al., 2008). Ces atteintes peuvent être à l'origine de perturbations des homéostasies sodique et, indirectement, calcique dans le cardiomyocyte et mener à des dysfonctions myocardiques.

Parmi les mutations étudiées, la mutation R222Q, située dans le domaine de sensibilité au potentiel de Nav1.5, est responsable de troubles du rythme associés à une cardiomyopathie dilatée. Les auteurs émettent l'hypothèse que la localisation de la mutation dans le domaine de Nav1.5 sensible au potentiel serait en lien avec les anomalies structurales observées (Moreau et al., 2015). De telles mutations seraient responsables d'un changement conformationnel aboutissant à une fuite de courant via Nav1.5 à travers le domaine de sensibilité au potentiel, appelé courant omega. Le lien mécanistique entre la surcharge sodique ainsi produite et la dilatation des cavités cardiaques reste cependant à élucider. Une autre étude a émis l'idée que la dilatation myocardique observée chez les patients atteints de cette même mutation pouvait avoir pour origine la répétition de troubles du rythme, qui fragiliserait la structure du tissu cardiaque chez ces individus (Laurent et al., 2012).

Ces études mettent en évidence un rôle non seulement électrique, mais aussi structural joué par le canal sodique Nav1.5 dans le cardiomyocyte, sans doute via ses interactions avec de nombreuses protéines de structure, au sein d'un important complexe macromoléculaire.

Objectifs de la thèse

Cette thèse est axée sur l'étude de 2 pathologies de la repolarisation ventriculaire, le SQTl de type 3 et le SRP associé à un raccourcissement de l'intervalle QT. Plus précisément, ce travail vise à identifier les conséquences fonctionnelles de mutations identifiées chez l'Homme et conduisant à ces maladies. Ainsi, ce manuscrit est scindé en 2 parties.

La première partie repose sur la caractérisation d'un nouveau modèle murin de SQTl de type 3, développé pour étudier les conséquences de la délétion des acides aminés QKP1507-1509 retrouvée chez l'Homme. Cette mutation est responsable d'un SQTl de type 3 associé à des troubles de conduction, une cardiomyopathie dilatée et une forte incidence de mort subite. Les souris knock-in exprimant la mutation delQKP1510-1512 (*Scn5a*^{+/ Δ QKP}), équivalente de la mutation humaine, seront donc le sujet d'étude de ce premier projet. Ce dernier aura 2 objectifs majeurs:

- Caractériser ce nouveau modèle d'étude du SQTl de type 3 associé à une cardiomyopathie structurale.
- Démontrer que ces souris constituent un modèle approprié pour le développement d'agents pharmacologiques, notamment des inhibiteurs du courant I_{NaLate} .

La deuxième partie de ce projet concerne l'étude fonctionnelle des tous premiers variants rares sur le gène *SLC8A1* humain, qui code pour NCX1, corrélés à une pathologie. La pathologie en question est une maladie de la repolarisation ventriculaire : un SRP, associé à un raccourcissement de l'intervalle QT chez les individus porteurs de mutations. En réexprimant les mutations identifiées en système hétérologue, nous chercherons à répondre à 2 objectifs :

- Confirmer *in vitro* que des mutations de NCX1 peuvent impacter la fonctionnalité de cet échangeur.
- Faire le lien entre d'éventuelles dysfonctions de NCX1 et la pathologie observée chez les patients.

Chapitre 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Cette partie décrit l'ensemble des détails techniques relatifs aux expérimentations réalisées lors de cette thèse, y compris les techniques utilisées dans les 2 articles présentés dans le chapitre « Résultats ».

I. **Projet 1 : Les souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP}, un nouveau modèle**

d'étude du SQTl de type 3 associé à une cardiomyopathie.

A. L'électrocardiogramme

La caractérisation électrocardiographique des souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP} a été réalisée à 2 âges différents : 2 et 4 semaines. Les souris sont anesthésiées à l'isoflurane (*Abbott Laboratories, USA*). L'induction est réalisée dans une cage (2 à 2,5%) puis l'anesthésie est maintenue au masque (0,8 à 1%) sur un tapis chauffant à 37°C (*Harvard Apparatus, USA*). Des ECGs 6 dérivations sont enregistrés pendant 2 minutes en plaçant 4 électrodes 25 gauges en sous-cutanée au niveau des 4 membres de la souris, reliées à un convertisseur analogique (*IOX 1.585, EMKA Technologies, France*) et un logiciel d'acquisition et d'analyse (*ECG Auto v3.2.0.2, EMKA Technologies*). La durée des intervalles QRS et QT sont mesurés sur 3 complexes successifs sur la dérivation DI, puis moyennés. L'onde T est placée à la suite du complexe QRS, à l'endroit où le tracé rejoint la ligne isoélectrique. Le placement de l'onde T étant parfois difficile, les autres dérivations peuvent être utilisées pour un positionnement optimal. L'intervalle QT est corrigé en fonction du rythme cardiaque en utilisant la formule de Bazett modifiée pour la souris, $QT_c = QT / (RR/100)^{1/2}$, avec QT et RR exprimés en ms.

B. Analyses histologiques et morphologiques

Les souris sont euthanasiées par dislocation cervicale et le cœur, les poumons et le foie sont prélevés. Après détermination des ratios poids des poumons/poids du cœur et poids du cœur/longueur du tibia, les organes sont lavés avec du PBS (Phosphate Buffer Saline) et fixés dans du paraformaldéhyde 4% à 4°C pendant au moins 48 heures. Les échantillons sont

déshydratés dans des bains d'alcool de concentrations croissantes et passés dans 2 bains de paraffine grâce à un automate (*STP 120 Myr Microm Microtech*) avant d'être inclus dans des moules selon une orientation précise en fonction du plan de coupe désiré. Les blocs de paraffine sont refroidis sur une plaque à -15°C (*EC 350-2 ; Myr*) durant une heure puis conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation. Des coupes de $5\ \mu\text{m}$ sont réalisées au microtome (*HM 355S Microm Microtech ; France*) et des colorations hématoxyline-éosine, pour visualiser la structure du myocarde, ou au rouge picrosirius, pour quantifier la fibrose, sont réalisées.

La coloration hématoxyline-éosine permet de marquer les noyaux, basophiles, en violet tandis que le cytosol, acidophile, est marqué en rose. Les coupes, placées sur des lames de verre (*Starfrost Knittel Glass*), sont immergées 20 secondes dans l'hématoxyline de Harris (*DiaPath*), lavées dans l'eau distillée, puis placées pendant 30 secondes dans l'éosine (*DiaPath*) avant d'être rincées puis déshydratées par des bains d'alcool de concentrations croissantes (de 70° à 100°) puis placées 5 minutes dans 2 bains de Tissue-Clear® (*Sakura Finetek ; USA*) pour éliminer toute trace de paraffine.

Lors d'une coloration au rouge picrosirius, l'acide picrique se fixe au collagène, permettant de visualiser la fibrose. Après avoir été plongées dans un bain de rouge picrosirius pendant 1 heure (pour 1L, 20 g d'acide picrique + 1 g de rouge sirius, pH 2,0), les coupes sont décolorées pendant 120 secondes dans l'HCl 0,01 M, rincées et enfin déshydratées comme précédemment. Les coupes sont observées avec un microscope classique (*Nikon Eclipse E-600*) et les images acquises avec le logiciel NIS-Elements (*v4.10, Nikon, Japon*). Les épaisseurs de parois des ventricules droit et gauche sont quantifiées en moyennant 3 mesures sur chaque coupe : une réalisée proche de l'apex, une au milieu et une proche de la base. La fibrose cardiaque est quantifiée sur les 3 mêmes régions, et l'analyse s'effectue en utilisant le logiciel ImageJ 1.45b (*NIH Software*).

C. Patch-clamp

La technique de patch-clamp permet de mesurer les courants ioniques passant à travers la membrane plasmique d'une cellule. Dans ce projet, cette technique est réalisée sur des cardiomyocytes isolés de cœurs de souris *Scn5a^{+/+}* et *Scn5a^{+/ Δ QKP}*.

1. Isolement des cardiomyocytes

Une injection d'héparine en intra-péritonéale (600 UI/kg ; *Dakota Pharm*) est réalisée 10 minutes avant le sacrifice par dislocation cervicale de souris *Scn5a^{+/+}* ou *Scn5a^{+/ Δ QKP}* âgées de 2 ou 4 semaines. Le cœur est rapidement prélevé, avec un morceau d'artère aorte assez long pour permettre la canulation. Celle-ci est réalisée dans une solution de Tyrode tout juste décongelée contenant (en mM) : NaCl, 135; KCl, 4; NaH₂PO₄, 1,2; MgCl₂, 1,2; glucose, 11; HEPES, 10 (pH ajusté à 7,4 avec du NaOH). La canule est enfoncée dans l'aorte sur une distance raisonnable permettant la diffusion des solutions dans le réseau d'artères coronaires irriguant le tissu myocardique, le tout à un débit constant de 3 mL/minute. Le cœur ainsi canulé est maintenu à 37°C et perfusé pendant 2 minutes avec la solution utilisée pour la canulation. Une solution sans Ca²⁺ ajouté contenant 0,15 mg/mL de collagenase II (350 U/mg, *Worthington*) et 0,03 mg/mL de protéase XIV (4,7 U/mg, *Sigma*) est administrée pendant 7 à 10 minutes, jusqu'à ce que le cœur soit digéré. La digestion est stoppée via la perfusion durant 2 minutes d'une solution de Tyrode contenant 0,15 mM de CaCl₂. Le cœur digéré est récupéré et trituré délicatement dans la même solution. Les cellules isolées sont rincées et la concentration en Ca²⁺ est progressivement augmentée par des lavages consécutifs jusqu'à atteindre 1 mM. Les cardiomyocytes sont conservés dans cette solution jusqu'à leur utilisation. Pour les mesures de courants, des cardiomyocytes quiescents, lisses et avec des striations visibles sont sélectionnés.

2. Enregistrement des courants

Les mesures de courants sodiques sont réalisées en configuration cellule entière. Lors de l'enregistrement, les cardiomyocytes sont perfusés localement avec une solution contenant (en mM) : NaCl, 14 (pour la mesure du courant I_{Na} au pic) ou 140 (pour la mesure du courant I_{NaLate}); CsCl, 109 (pour la mesure du courant I_{Na} au pic) ou 5 (pour la mesure du courant I_{NaLate}); CoCl₂, 2,5; CaCl₂, 1; MgCl₂, 2; TEA-Cl, 25; glucose, 5; HEPES, 10 and mannitol, 20; (pH ajusté à 7,4 avec du CsOH).

Des pipettes de verre (*Sutter Instrument*) sont chauffées à l'aide d'une étireuse horizontale (*P-97* ; *Sutter Instrument*) et leur extrémité cirée pour diminuer le courant capacitif. La cire est remontée en utilisant une microforge (*MF 830 Narishige, Japon*). Les résistances des pipettes utilisées sont comprises entre 1,8 et 2,5 M Ω .

Les pipettes sont remplies d'une solution contenant (en mM) : CsCl, 50; CaCl₂, 1; Na-pyruvate, 5; MgCl₂, 3; Na₂ATP, 2,5; acide gluconique, 70; EGTA, 10; HEPES, 10; (pH ajusté à 7,2 avec du CsOH). Les enregistrements sont effectués à l'aide du logiciel d'acquisition pClamp (*Axon Instruments, Union City, CA, USA*) et d'un amplificateur (*Alembic Instruments, Montreal, QC, Canada*).

Le courant capacitif est causé par la charge des capacités électriques de la pipette et de la membrane plasmique, et est susceptible de gêner l'observation de signaux rapides, tels que l'activation du courant sodique. Sa cinétique de décroissance est liée aux résistances en série (R_s) et à la capacitance membranaire (C_m) selon la formule de la constante de temps : $\tau = R_s.C_m$. La compensation par l'amplificateur Alembic permet de diminuer R_s, ce qui a pour effet de réduire τ . Les cinétiques des courants capacitifs étant accélérées, ces derniers ne gêneront plus l'observation de I_{Na}.

Les mesures sont réalisées à température ambiante (20-22°C). Le courant I_{NaLate} est mesuré avec 140 mM de Na⁺ dans le milieu extracellulaire en tant que courant tétrodontoxine-sensible en effectuant une mesure à la fin d'une stimulation de 350 ms à -20 mV en présence de 30 μM de tétrodontoxine (*Tocris Bioscience*).

Les paramètres d'activation sont mesurés par un protocole de stimulation reposant sur des sauts de potentiels de 500 ms, de -120 mV à +40 mV par incréments de 5 mV. Chaque saut de potentiel est suivi d'un second de 20 ms à une valeur de -20 mV pour la mesure des paramètres d'inactivation du canal sodique.

Les données sont analysées avec les logiciels pClamp (*Axon Instruments*) et Prism5 (*GraphPad Software, Inc.*) La densité de courant est obtenue en divisant la valeur de courant enregistrée par la capacitance membranaire, reflétant la surface membranaire. Les courbes d'activation et d'inactivation de chaque cellule sont ajustées avec une équation de Boltzmann :

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

où $V_{\frac{1}{2}}$ est le potentiel de demi-activation ou de demi-inactivation et k la valeur de pente. Pour les cinétiques d'inactivation, une équation bi-exponentielle est utilisée :

$$y = y_0 + A_1 \left(1 - \exp\left(\frac{-t}{\tau_1}\right)\right) + A_2 \left(1 - \exp\left(\frac{-t}{\tau_2}\right)\right)$$

où A_1 et A_2 sont les phases lentes et rapides d'inactivation et τ_1 et τ_2 les constantes de temps des cinétiques d'inactivation rapide et lente.

D. Potentiels d'action

Les mesures de PA sont réalisées sur des préparations de ventricules droits et d'oreillettes gauches de souris âgées de 4 semaines. Suite à l'euthanasie par dislocation cervicale, les cœurs sont rapidement excisés et immergés dans une solution froide de Tyrode modifié contenant (en mM) : NaCl, 108; NaH_2PO_4 , 1,8; NaHCO_3 , 25; KCl, 27; MgCl_2 , 1; CaCl_2 , 0,6; glucose, 55 (pH ajusté à 7,4 ; 5% CO_2). Après dissection, les parois libres de ventricule droit ou d'oreillette gauche sont montées dans une chambre, face endocardique vers le haut, et perfusées avec une solution de Tyrode modifiée bullée avec 95% d' O_2 et 5% de CO_2 , chauffée à 37°C et contenant (en mM) NaCl, 120; NaHCO_3 , 27; NaH_2PO_4 , 1,2; KCl, 5,4; MgCl_2 , 1,2; CaCl_2 , 1,8; glucose, 10 (pH ajusté à 7,4 ; 5% CO_2). Le débit de perfusion est de 12 mL/min. Les préparations sont stimulées pendant 2 ms à une amplitude égale à 2 fois le seuil de stimulation avec des électrodes bipolaires en argent recouvertes de Teflon. Les PA sont enregistrés via des capillaires de verre en borosilicate (*Sutter Instrument*), chauffés à l'aide d'une étireuse horizontale (*P-97 ; Sutter Instrument*) pour obtenir une résistance comprise entre 15 et 25 M Ω une fois remplies d'une solution de KCl 3M. L'électrode de mesure est couplée à un amplificateur (*VF102 BioLogic, France*) et les données sont filtrées à 10 kHz puis acquises avec le logiciel iox1.8.0.18 (*EMKA Technologies*). Les PAs sont enregistrés à des durées de cycle de stimulation de 200 ms et leurs caractéristiques mesurées à l'état stable. Les paramètres mesurés sont le potentiel de repos, l'amplitude du PA, la vitesse maximum de dépolarisation lors de la phase 0 (dV/dt_{\max}), et la durée du PA à 30%, 50%, 70% et 90% de repolarisation. Ce protocole est appliqué dans des conditions basales puis après 10 minutes de perfusion avec 10 μM de ranolazine (*Tocris Bioscience*). Cette concentration est choisie sur la base d'études déjà publiées sur des modèles cellulaires (Rajamani et al., 2009) et sur les souris *Scn5a*^{+ Δ KPQ} (Fredj et al., 2006a).

E. Imagerie calcique

1. Isolement des cardiomyocytes

Des souris de 4 semaines sont anesthésiées par une injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (150 mg/kg). Les cœurs sont excisés rapidement et l'aorte est canulée dans une solution tout juste décongelée contenant (en mM) : NaCl, 113; KCl, 4,7; MgSO₄, 1,2; KH₂PO₄, 0,6; NaH₂PO₄, 0,6; NaHCO₃, 1,6; glucose, 20; HEPES, 10; taurine, 30 (pH ajusté à 7,4 avec du NaOH). Le cœur, maintenu à 37°C, est perfusé pendant 4 minutes avec cette solution puis pendant 7 à 10 minutes avec une solution de digestion pauvre en Ca²⁺ (0,1 mM) contenant de la libérase (26 U/mL, *TM Research Grade, Roche*). Les cœurs digérés sont triturés délicatement dans une solution stoppant la digestion, contenant 0,2 mM de CaCl₂ et 0,5 mg/mL de BSA (*Albumine de Sérum Bovin, A4503, Sigma*). Les cellules isolées sont lavées successivement dans des solutions de concentrations croissantes en Ca²⁺, jusqu'à atteindre une concentration de 1 mM. Des cardiomyocytes quiescents, lisses et dont les striations sont bien visibles sont sélectionnés pour les mesures.

2. Imagerie

Les transitoires calciques et les sparks calciques sont enregistrés sur des cardiomyocytes préalablement incubés durant 30 minutes avec une sonde calcique fluorescente (*Fluo-3 AM, 5 μM*) en dissolvant 50 μg de Fluo-3 AM dans 100 μL d'un mix DMSO-Acide pluronique F-127 (4 :1) et dans une solution contrôle contenant (en mM) : NaCl, 140; KCl, 4; CaCl₂, 1,8; MgCl₂, 1,1; HEPES, 10; glucose, 10 (pH ajusté à 7,4, avec du NaOH).

Pour l'enregistrement des transitoires calciques, les cellules sont stimulées à une fréquence de 0,5 Hz via 2 électrodes parallèles en platine. Les sparks calciques sont mesurés sur des cardiomyocytes quiescents après l'acquisition des transitoires. La charge en Ca²⁺ du RS est estimée par application de 10 mM de caféine après 1 minute de stimulation pour atteindre l'état stable. Les images sont acquises avec un microscope confocal (*Leica TCS SP8, objectif à immersion à eau, x63, ouverture numérique de 1,2*) en scannant la cellule avec un laser blanc le long d'une ligne parallèle à l'axe longitudinal de la cellule. La longueur d'onde d'excitation est de 505 nm et la longueur d'onde d'émission est au-delà de 510 nm.

L'analyse des images est réalisée avec le logiciel IDL (*Research System Inc.*), le signal étant corrigé par la fluorescence basale (F_0). Les valeurs de fluorescence sont normalisées par F_0 pour obtenir le ratio de fluorescence F/F_0 . Les sparks calciques sont détectés en utilisant un système de détection automatique selon leur amplitude en fonction de la fluorescence basale, pour éviter la détection de faux positifs (Cheng et al., 1999).

F. Western blot

L'expression protéique est mesurée dans le tissu ventriculaire gauche de souris *Scn5a*^{+/+} et *Scn5a*^{+/ Δ QKP} âgées de 2 et 4 semaines.

1. Lyse et extraction protéique

Après euthanasie des animaux par dislocation cervicale, la dissection est effectuée dans une solution froide contenant (en mM) : NaCl, 108; NaH₂PO₄, 1,8; NaHCO₃, 25; KCl, 27; MgCl₂, 1; CaCl₂, 0,6; glucose, 55 (pH ajusté à 7,4). Les ventricules gauches sont congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à utilisation. Les tissus sont broyés à 4°C dans un tampon de lyse contenant (en mM) : NaCl, 100, Tris-HCl, 50, EGTA, 2, Na₃VO₄, 2, 1% NP40 et des inhibiteurs de protéases et de phosphatases (pH ajusté à 7,4 avec du NaOH), et incubées pendant 20 minutes à 4°C sous agitation. Après une centrifugation (14 000g, 15 minutes, 4°C), le surnageant contenant les protéines est récupéré et un dosage colorimétrique de celles-ci est réalisé en se rapportant à une gamme étalon de concentrations connues (*BCA, Pierce-Thermoscientific*).

2. Western Blot

Quarante microgrammes de protéines sont repris dans un tampon contenant des agents réducteurs (*NuPage Sample Reducing Agent, Thermo Fisher Scientific*) et dénaturants (*NuPage LDS Sample Buffer, Thermo Fisher Scientific*), et séparés sur gel d'acrylamide SDS-PAGE (*4-20% Mini-PROTEAN[®] TGX Stain-Free[™] Precast Gels, Bio-Rad, France*). Après transfert sur une membrane de nitrocellulose (*Trans-Blot[®] Turbo[™] Nitrocellulose Transfer Packs, Bio-rad, France*), les membranes sont bloquées pendant 1 heure dans du TBS (Tris Buffer Saline)

contenant 0,1% de Tween 20 (TBS-T) et 5% de lait et incubées avec les anticorps primaires spécifiques de Nav1.5 (*D9J7S, Cell Signaling technology; 1:1000*), SERCA2 (*PA5-29380 Thermo Scientific; 1:2000*), Na⁺/Ca²⁺ exchanger NCX1 (*Santa Cruz Biotechnology; 1:1000*), CaMKII (*PA5-22168 Thermo Scientific; 1:1000*), p-CaMKII (*MA1-047 Thermo Scientific; 1:2000*), ox-CaMKII (*GTX36254 GeneTex; 1:1000*), phospholamban (PLB; *Santa Cruz Biotechnology; 1:1000*), pPLB-T17 (*Santa Cruz Biotechnology; 1:5000*), pPLB-S16 (*Santa Cruz Biotechnology; 1:1000*), type 2 ryanodine receptor (RyR2; *MA3-925 Thermo Scientific; 1:2000*), pRyR2-S2808 (*A010-30 Badrilla; 1:4000*), pRyR2-S2814 (*A010-31 Badrilla; 1:4000*), pRyR2-S2030 (*A010-32 Badrilla; 1:4000*), N-Cadherin (*4061, Cell Signaling technology; 1:1000*) et calmoduline (*CaM; 05-173 EMD Millipore; 1:1000*). Un anticorps anti-GAPDH (*Glyceraldéhyde Phosphate Déshydrogénase, Santa-Cruz Biotechnologies; 1:10 000*) est utilisé pour normaliser le signal obtenu par la quantité de protéines déposées dans chaque puits. Après 3 lavages de 10 minutes dans du TBS-T, les membranes sont incubées avec l'anticorps secondaire correspondant couplé à une peroxydase HRP (Horseradish Peroxydase) (*Santa Cruz ; 1 : 10 000*). Suite à 3 nouveaux lavages de 10 minutes dans du TBS-T, l'expression protéique est détectée par chemiluminescence (*ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare Amersham™, UK*). La quantification des signaux obtenus est réalisée à l'aide du logiciel Image Lab™ 5.2.1 (*Bio-Rad Software*).

G. Traitements pharmacologiques

Sous anesthésie à l'isoflurane (effectuée de la même manière que lors de la réalisation des ECGs) et suite à l'enregistrement d'un ECG basal de 2 minutes, une injection intrapéritonéale de ranolazine (30 mg/kg en bolus) ou de propranolol (0,3-1-3 mg/kg en bolus) est réalisée sur des souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP} de 4 semaines. L'effet du traitement est observé pendant 10 minutes suite à l'injection et comparé à l'ECG basal.

H. Immunohistochimie

Des analyses immunohistochimiques ont été réalisées sur des animaux de 2 et 4 semaines de manière à visualiser les potentiels effets structuraux de la mutation delQKP 1510-1512 au niveau tissulaire et à l'échelle du cardiomyocyte.

Pour ce qui est des marquages tissulaires, les cœurs de souris sont prélevés, rincés dans une solution saline avant d'être immergés rapidement dans de l'isopentane préalablement refroidi dans l'azote liquide. Les organes sont conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Suite à leur inclusion dans du Tissue-Tek® OCT™ (*Sakura Finetek ; USA*), des coupes de $6\ \mu\text{m}$ sont réalisées grâce à un cryostat (*Microm Microtech ; France*).

Concernant les marquages réalisés sur des cardiomyocytes, l'isolement de ces derniers est effectué de la même manière que lors des expériences d'imagerie calcique. Les cellules sont laissées à adhérer sur des lames de verres coatées avec de la gélatine de poisson (3%, *Sigma Aldrich*) pendant 1 heure à température ambiante.

Les coupes de cœur ou les cellules isolées reposant sur les lames sont fixées dans de l'acétone refroidi à -20°C pendant 10 minutes puis perméabilisées et bloquées pendant 30 minutes à température ambiante dans une solution de PBS contenant 10% de sérum normal de chèvre, 1% de BSA et 0,5% de triton X-100. Les échantillons sont incubés pendant 2 heures à température ambiante avec l'anticorps dirigé contre l' α -actinine 2 (*EA-53, Abcam, 1 : 200*) dilué dans du PBS avec 3% de sérum normal de chèvre, 1% de BSA et 0,5% de triton X-100. Suite à 3 rinçages dans du PBS, les échantillons sont placés durant 45 minutes en présence d'anticorps secondaire AlexaFluor®488 (*Life technologies ; 1 : 200*), dans le même tampon et à la même température. Enfin, après 3 nouveaux lavages de 5 minutes dans du PBS, les lames sont montées avec du ProLong Gold Antifade mountant contenant du DAPI (*Thermo Fisher Scientific*), marquant les noyaux cellulaires. Les lames peuvent ainsi être conservées à -80°C jusqu'à leur analyse en microscopie confocale.

Pour visualiser le réseau de tubules t, les cardiomyocytes fraîchement isolés sont placés dans des plaques Ibidi 8 puits (*μ -slide 8 Well, Ibidi®*), laissés à adhérer pendant 1 heure à température ambiante, puis incubés avec $10\ \mu\text{M}$ de Di-8 ANEPPS (*Invitrogen*) dans le noir. Les cellules sont lavées 3 fois dans la même solution que la dernière utilisée pour l'isolement avant l'observation au microscope confocal.

Les échantillons sont observés sur la plateforme MicroPiCell à l'aide d'un microscope confocal Nikon A1 (*objectif à immersion à huile, x60, ouverture numérique de 1,4, Nikon, France*) et les images capturées avec le logiciel NIS-Element (*v4.10, Nikon, Japon*).

L'analyse directionnelle de l'orientation des fibres d' α -actinine 2 et des tubules t est réalisée à l'aide du logiciel ImageJ 1.45b (*NIH Software*) comme décrit par Wagner et al. (Wagner et al., 2014). Le pourcentage de fibres d' α -actinine 2 et de tubules t orientés entre -45° et 135° est quantifié en utilisant l'axe longitudinal du cardiomyocyte comme référence. Le ratio

transversal/longitudinal est mesuré en considérant comme transversal ou longitudinal un marquage orienté entre 80° et 100° et entre -10° et 10° respectivement.

I. Échocardiographie

Des échocardiographies bidimensionnelles sont effectuées sur des souris de 4 semaines en utilisant l'appareil Vivid 7 Dimension ultrasonography (*GE Healthcare*) avec une sonde de 14 MHz. Les animaux sont anesthésiés à l'isoflurane (de la même manière que lors de la réalisation des ECGs). Pour investiguer un éventuel remodelage structural, le diamètre de la cavité ventriculaire gauche, et les épaisseurs des ventricules droit et gauche ainsi que du septum sont mesurées en grand axe en mode temps-mouvement (M mode). La fonction systolique est appréciée par le calcul de la fraction d'éjection (FES) selon la formule suivante :

$$FES = \frac{(VTD - VTS)}{VTD}$$

où VTD est le volume télédiastolique et VTS le volume télésystolique.

J. Modèle mathématique de PA ventriculaire de souris

L'effet de la délétion des acides aminés QKP en position 1510-1512 sur la sous-unité α de Nav1.5 est simulé sur le modèle de cellule unique de Pandit et ses collaborateurs (<http://models.cellml.org/electrophysiology>) (Pandit et al., 2001). Toutes les équations sont disponibles en ligne, seules les modifications apportées à ce modèle étant présentées ici. En partant du modèle *Scn5a*^{+/+}, la conductance (G_{Na}) est augmentée de 1,064 à 2 μ S pour obtenir une dV/dt_{max} d'environ 100 V/sec. La stimulation est raccourcie de 5 ms à 1 ms et son amplitude est augmentée de -0,6 à -3 nA pour garder la même quantité de charges injectées. La simulation est réalisée avec le logiciel OpenCell.

Pour le modèle *Scn5a*^{+ Δ QKP}, le courant I_{NaLate} (lorsque l'inactivation rapide est terminée) est réglé à 3% du courant I_{Na} au pic et les courbes de l'inactivation rapide et lente sont décalées de 6 mV vers des potentiels plus positifs, en accord avec les résultats de patch clamp obtenus sur les cardiomyocytes isolés de souris mutées.

Inactivation lente:

$$h_{\infty} = \frac{1 - 0,03}{1 + e^{\left(\frac{V_m + 76,1 - 6}{6,07}\right)}} + 0,03$$

Inactivation rapide:

$$j_{\infty} = \frac{1}{1 + e^{\left(\frac{V_m + 76,1 - 6}{6,07}\right)}}$$

Selon nos résultats obtenus *in vitro*, la constante de temps de l'inactivation rapide τ_h est voltage-indépendante entre -35 mV et 0 mV et correspond à la valeur de la condition *Scn5a^{+/+}* à -25 mV :

$\tau_h = 0.00210502$ si $V_m > -35$ mV, l'équation est donc identique à la condition *Scn5a^{+/+}*.

La constante de temps de l'inactivation lente τ_j est égale à 2 fois celle de la condition *Scn5a^{+/+}* à des potentiels supérieurs à -40 mV.

$\tau_j = 2 \times (0,01163 \frac{(1 + e^{-0,1(V_m + 32)})}{e^{-2,535 \times 10^{-7} V_m}})$, l'équation étant identique à la condition *Scn5a^{+/+}* aux autres potentiels.

De plus, le flux de Ca^{2+} passant par la pompe SERCA (J_{up}) est divisé par 3 pour correspondre à l'augmentation du temps de décroissance des transitoires calciques *in vitro* :

$$J_{up} = \frac{1}{3} \times K_{SR} \frac{v_{maxf} f_b - v_{maxr} r_b}{1 + f_b + r_b}$$

où K_{SR} est le facteur attribué au flux de Ca^{2+} passant par la pompe SERCA, V_{maxf} et V_{maxr} sont les vitesses de fonctionnement (en mM/sec) de la pompe en mode normal et en mode inverse respectivement et f_b et r_b les facteurs attribués à ces deux vitesses.

K. Immunoprécipitation de Nav1.5 et son complexe macromoléculaire

Dans le but d'analyser si les interactions entre les protéines faisant partie du complexe macromoléculaire impliquant Nav1.5 sont modifiées par la présence de la mutation, des immunoprécipitations de Nav1.5 ont été réalisées à partir des ventricules gauches de souris âgées de 2 et 4 semaines.

Le prélèvement des cœurs, la lyse et l'extraction protéique s'effectuent de la même manière que lors de la réalisation des western blots. Avant l'immunoprécipitation, 2 μ g d'anticorps dirigés contre Nav1.5 (*D9JS7, Cell Signaling*) sont liés à 25 μ L de billes magnétiques couplées à des protéines G (*Dynabeads® Protein G, Invitrogen*). Deux milligrammes de protéines sont incubés avec les anticorps couplés aux billes magnétiques

pendant 2 heures à 4°C sous agitation. Les billes sont récupérées et lavées rapidement 4 fois dans le tampon de lyse à 4°C et les complexes protéiques sont ensuite élués dans 25 µL d'un mix contenant des agents réducteurs (*NuPage Sample Reducing Agent, Thermo Fisher Scientific*) et dénaturants (*NuPage LDS Sample Buffer, Thermo Fisher Scientific*) en les chauffant à 99°C pendant 10 minutes. Les western blots sont enfin réalisés comme décrit précédemment sur les fractions précipitées ainsi que sur les lysats protéiques totaux.

II. Projet 2 : Identification et caractérisation fonctionnelle des premiers variants rares sur le gène *SLC8A1* associés à un SRP et un raccourcissement de l'intervalle QT.

A. Identification des mutations

L'identification des mutations a été réalisée par l'équipe I de génétique cardiovasculaire de l'institut du thorax.

Une approche combinée de séquençage d'exome haut débit sur des gènes cibles ou sur un panel de gènes candidats a été effectuée sur 5 cas index Français et 1 cas index Japonais présentant un aspect de repolarisation précoce associé à un raccourcissement de l'intervalle QTc et des fibrillations ventriculaires à l'ECG, et a abouti à l'identification de 5 variants sur le gène *SLC8A1* : c.delC 2060 (p.P687HfsX2), c.1733 A>G (p.E578G), c.2818 C>T (p.P940S), c.653 T>A (p.L218H) et c.2269 +2T>C (IVS8+2T>C). Les variants sont considérés comme rares de par leur fréquence d'apparition dans les bases de données de références Gnomad (<http://gnomad.broadinstitute.org>) qui sont inférieures à 1.10^{-4} . Les potentiels effets délétères des mutations identifiées ont été estimés à l'aide d'outils de prédiction bioinformatiques tels que SIFT et PolyPhen et des scores GERP et PHRED.

B. Culture cellulaire

Les mutations identifiées sur le gène *SLC8A1* ont été réexprimées, en parallèle de la séquence du gène sauvage, en système de réexpression hétérologue, les cellules COS-7 (CV-1 in Origin with SV40 genes, fibroblastes immortalisés issus de rein de singe).

1. Plasmides

Les plasmides contenant l'ADNc du gène *SLC8A1* humain sauvage (NM_021097.2) ou possédant les 4 différentes mutations testées fonctionnellement ont été fournis par la société OriGene, au sein d'un plasmide de type pcDNA3.1 (*pcDNATM3.1, V79020, OriGene*). Un plasmide dans lequel l'ADNc du gène *SLC8A1* est remplacé par une séquence codant la GFP (Green Fluorescent Protein) est également construit et co-transfecté lors des expériences de patch-clamp pour visualiser les cellules ayant intégré les plasmides.

Pour les expériences d'immunofluorescence et de biotinylation, du fait de la faible efficacité des anticorps commerciaux dirigés contre NCX1, un tag Myc a été placé au niveau de la boucle extracellulaire reliant les segments transmembranaires 2 et 3 de l'échangeur, la présence de ce dernier étant détectée grâce à l'utilisation d'un anticorps anti-Myc (*monoclonal anti-Myc tag antibody, 05-724, clone 4A6, Merck Millipore*).

2. Amplification et extraction d'ADN plasmidique

Les plasmides sont amplifiés en bactéries thermocompétentes DH5 α . L'ADN plasmidique est mélangé à 65 μ L de bactéries thermocompétentes dans un tube. Après 20 minutes sur glace, un choc thermique est opéré en plaçant le tube pendant 90 secondes à 42°C pour faire pénétrer les plasmides dans les bactéries. Ces dernières sont mises en présence de 500 μ L de milieu LB (*LB Broth, Sigma*) et incubées pendant 1 heure à 37°C sous agitation de manière à ce qu'elles expriment le gène de résistance à l'ampicilline inclus dans le plasmide. Après l'incubation, 50 μ L de la solution bactérienne sont étalés sur une boîte de pétri contenant du LB-agar solide et 50 μ g/mL d'ampicilline. Les boîtes sont placées pendant une nuit à 37°C pour permettre la pousse des bactéries ayant intégré le plasmide. Le lendemain, une colonie est prélevée et mise dans 3 mL de LB contenant 50 μ g/mL d'ampicilline. Après 3 à 5 heures

d'incubation à 37°C sous agitation, l'ensemble est versé dans un plus grand volume (50 mL) de LB avec ampicilline dans un erlenmeyer et incubé à 37°C sous agitation pendant 12 à 16 heures. La solution bactérienne est transférée dans un tube falcon 50 mL, centrifugée (4500 rpm, 15 minutes, 4°C), et seul le culot bactérien est conservé.

La lyse des bactéries et l'extraction d'ADN plasmidique s'effectue en suivant les instructions d'un kit commercial (*Quiagen Plasmid Midi Kit*). Une fois l'extraction d'ADN plasmidique terminée, ce dernier est dosé au Nanodrop (*Nanodrop® Thermo Fisher Scientific*) par mesure de la densité optique à 260 nm.

3. Transfection

Les transfections s'effectuent dans des boîtes de 35 mm (*Nunc, Thermo Scientific*) sur des cellules COS-7 confluentes à environ 60%. Toutes les expérimentations sont réalisées 48 heures post-transfection. Six microlitres d'agent de transfection (*FuGENE® 6 Transfection Reagent, Promega*) sont incubés avec 84 µL de milieu de culture (*DMEM High Glucose, 41966, Gibco™*) pendant 5 minutes. Deux microgrammes d'ADN plasmidique (10 µL d'ADN dilué à 200 ng/µL) sont mélangés au mix précédent et incubés pendant 25 minutes à température ambiante. Suite à cela, ce mélange (100 µL) est déposé sur les cellules en culture. Le milieu est changé 24 heures post-transfection.

En vue des expériences de patch-clamp, les cellules COS-7 sont co-transfectées avec 90% de *SLC8A1* sauvage ou muté et 10% de GFP de manière à visualiser les cellules ayant intégré les plasmides. Pour cette technique, qui nécessite des cellules isolées, les cellules sont dissociées à l'aide de trypsine et diluées 8 heures après le changement de milieu décrit précédemment, la veille de l'expérimentation, selon un protocole classique. Brièvement, les cellules sont lavées au PBS, décollées par l'action de la trypsine pendant 2 minutes à 37°C, puis individualisées par agitation, avant d'être diluées dans un milieu de culture neuf.

C. Patch clamp

Les cellules COS-7, exprimant NCX1 sauvage ou muté, sont utilisées 48 heures après la transfection. Les mesures de courants sodiques sont réalisées en configuration cellule entière.

Lors de l'enregistrement, les cardiomyocytes sont perfusés avec une solution maintenue à $36,2 \pm 0,2^\circ\text{C}$ contenant (en mM) : NaCl, 140; KCl, 5,4; CaCl₂, 1,8; MgCl₂, 1; NaH₂PO₄, 0,33; HEPES, 5; Glucose, 5,5; pH ajusté à 7,4).

Des pipettes de verre (*Sutter Instrument*) sont chauffées à l'aide d'une étireuse horizontale (*P-97*; *Sutter Instrument*) et leur extrémité cirée pour augmenter leur résistance et diminuer le courant capacitif. La cire est remontée en utilisant une microforge (*MF 830 Narishige, Japon*). Les résistances des pipettes utilisées sont comprises entre 1,8 et 2,5 MΩ.

Les pipettes sont remplies d'une solution contenant (en mM) : NaCl, 20; BAPTA, 20; CaCl₂, 13 (concentration en Ca²⁺ libre = 433 nM); CsCl₂, 120; MgCl₂, 3; acide aspartique, 50; MgATP, 5; HEPES, 10; pH ajusté à 7,2 avec du CsOH. Une fois que la configuration cellule entière est obtenue, une solution de perfusion contrôle est perfusée localement, contenant (en mM) : NaCl, 140; CaCl₂, 2; MgCl₂, 1; ouabaine, 0,02; nifédipine, 0,01; ryanodine, 0,2; HEPES, 5; pH ajusté à 7,2. L'enregistrement débute et des protocoles de stimulation sont envoyés jusqu'à l'obtention d'un état stable, à la suite duquel la même solution, contenant en plus 5 mM de Ni²⁺, est perfusée. Les enregistrements sont effectués à l'aide du logiciel d'acquisition pClamp (*Axon Instruments, Union City, CA, USA*) et d'un amplificateur (*Alembic Instruments, Montreal, QC, Canada*). Les résistances séries sont compensées à l'aide de l'amplificateur.

Le courant bidirectionnel I_{NCX} est mesuré en stimulant les cellules avec un protocole de rampe. En partant d'un potentiel de repos de -60 mV, une dépolarisation est effectuée jusqu'à +80 mV puis une rampe descendante est réalisée jusqu'à -120 mV avant de rejoindre le potentiel de repos, le tout à une vitesse de 640 mV/seconde. La rampe descendante entre +80 mV et -120 mV est utilisée pour construire les courbes d'intensité en fonction du potentiel transmembranaire (I-V). Neuf secondes séparent chaque protocole de rampe, un protocole étant donc déclenché toutes les 10 secondes.

Les données sont analysées avec les logiciels pClamp (*Axon Instruments*) et Prism5 (*GraphPad Software, Inc.*). La densité de courant est obtenue en divisant la valeur de courant enregistrée au potentiel de +50 mV par la capacitance membranaire, reflétant la surface membranaire.

D. Immunofluorescence

Les cellules COS-7 sont décollées et diluées 24 heures post-transfection puis réensemencées dans des plaques Ibidi 8 puits (*μ-slide 8 Well, Ibidi®*) pour atteindre environ 40% de confluence 48 heures après la transfection. Suite à 2 lavages au PBS, les cellules sont

saturées pendant 1 heure à température ambiante dans une solution de PBS contenant 1% de BSA et 3% de gélatine de poisson puis incubées durant 1 heure dans la même solution en présence d'un anticorps anti-myc (*monoclonal anti-Myc tag antibody, 05-724, clone 4A6, Merck Millipore*) avant d'être rincées 3 fois au PBS et fixées durant 10 minutes dans du paraformaldéhyde 4%. Trois nouveaux lavages au PBS sont réalisés avant que les cellules soient mises en contact de l'anticorps secondaire correspondant AlexaFluor®488 (*Life technologies ; 1 : 200*) pendant 1 heure à température ambiante. Les cellules sont lavées 3 fois avant d'être incubées 10 minutes dans du PBS et du réactif de Hoechst (*1/1 000, B2883, Sigma*), puis relavées. Les cellules sont conservées au maximum une semaine à 4°C dans du PBS contenant une faible concentration de paraformaldéhyde (0,4%) avant d'être observées au microscope confocal.

L'observation s'effectue sur la plateforme MicroPiCell, à l'aide d'un microscope confocal Nikon A1 (*objectif à immersion à huile, x60, ouverture numérique de 1,4, Nikon, France*) et les images sont capturées avec le logiciel NIS-Element (*v4.10, Nikon, Japon*).

E. Biotinylation

Pour les expériences de biotinylation, les cellules sont utilisées 48 heures après la transfection. Sur glace, elles sont lavées 2 fois avec du PBS avant d'être incubées avec 1 mL d'une solution de biotine à 0,5 mg/mL (*EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin, Thermo Fisher Scientific*) à 4°C pendant 30 minutes. Toujours sur glace et après 3 lavages des cellules avec une solution de Tris saline (Tris-HCl, 50 mM; NaCl, 150 mM; pH ajusté à 7,4), 200 µL de tampon de lyse comprenant (en mM) : NaCl, 100; Tris-HCl, 50; EGTA, 2; 1% Triton X-100, pH ajusté à 7,4, sont déposés sur les cellules. Ces dernières sont décollées avec un grattoir et placées dans des tubes sous rotation à 4°C pendant 20 minutes. Après une centrifugation (14 000g, 15 minutes, 4°C), le surnageant contenant les protéines est récupéré et un dosage colorimétrique de celles-ci est réalisé en se rapportant à une gamme étalon de concentrations connues (*BCA, Pierce-Thermoscientific*). Deux microgrammes de protéines, dont les protéines de surface précédemment biotinylées, sont incubés pendant 2 heures à 4°C avec 100 µL de billes d'agarose couplées à de la streptavidine (*Pierce™ Streptavidin Agarose, Thermo Fisher Scientific*), ces billes ayant été au préalable lavées 3 fois avec 1 mL du tampon de lyse utilisé ci-avant. Une fois l'incubation terminée, les complexes (billes-streptavidine-biotine-protéines sarcolemmiques) sont lavés 3 fois avec 1 mL de tampon de lyse, puis élués dans 70 µL d'un

mix contenant des agents réducteurs (*NuPage Sample Reducing Agent, Thermo Fisher Scientific*) et dénaturants (*NuPage LDS Sample Buffer, Thermo Fisher Scientific*) en les chauffant à 50°C pendant 30 minutes. Une dernière centrifugation permet de récupérer les protéines sarcolemmiques éluées, dans le surnageant, tout en se séparant des billes d'agarose. Les western blots sont enfin réalisés comme décrit précédemment sur les fractions biotinylées (protéines sarcolemmiques) ainsi que sur les lysats protéiques totaux. L'anticorps anti-myc (*monoclonal anti-Myc tag antibody, 05-724, clone 4A6, Merck Millipore*) est utilisé comme anticorps primaire pour le western blot. La protéine GAPDH, nous sert de témoin cytosolique, en étant présente dans la fraction totale et absente de la fraction sarcolemmique. A l'inverse, le récepteur à la transferrine fait office de contrôle sarcolemmique.

F. Capture de ^{45}Ca

Dans le but d'observer si la présence de mutations sur NCX1 altère la capture de Ca^{2+} dans les cellules via cet échangeur, des expériences de capture d'un isotope radioactif du calcium (^{45}Ca) ont été réalisées au Japon par l'équipe de Naomasa Makita, avec qui nous collaborons sur ce projet.

Ces expérimentations ont été réalisées sur des lignées de cellules COS-7 exprimant de façon stable les différentes mutations étudiées. Les cellules sontensemencées dans des plaques 12 puits et utilisées 24 heures après, à environ 80% de confluence, le nombre de cellules de départ étant scrupuleusement identiques entre les différentes conditions. Les cellules sont incubées durant 45 minutes dans un tampon contenant (en mM) : NaCl, 146; KCl, 4; CaCl_2 , 0,1; MgCl_2 , 2; HEPES, 10; Glucose, 10; 0,1% BSA; Ouabaine, 1; Monensine, 0,01; pH = 7,4), puis cette solution est aspirée et les cellules sont mises en présence du même tampon, dans lequel le NaCl est remplacé par du choline-Cl et le CaCl_2 par du ^{45}Ca , sans modifier les concentrations. Après 60 secondes d'incubation, 3 lavages avec du PBS sont effectués et les cellules sont lysées dans du tampon de lyse identique à celui utilisé pour les expériences de biotinylation. Après transfert des lysats dans des tubes, le réactif Ultima Gold™ (*PerkinElmer*) est ajouté pour pouvoir compter le nombre de scintillations radioactives en utilisant l'appareil Aloka LSC-5100 (*Aloka, Japon*).

G. Modèles mathématiques de simulation *in silico*

Dans l'objectif de faire le lien entre les résultats obtenus *in vitro* et le phénotype des individus porteurs des mutations sur le gène *SLC8A1*, 2 modèles mathématiques de simulation ont été utilisés. Dans ces 2 modèles, une simulation de 50% de perte de fonction de NCX1 (50% de protéines fonctionnelles) est réalisée et comparée à une condition dans laquelle 100% des échangeurs sont fonctionnels. Pour cela, un facteur 0,5 est attribué à l'équation régissant la conductance de NCX1 (G_{NCX}) dans chacun des modèles.

Dans un premier temps, le modèle de O'Hara (O'Hara et al., 2011) est utilisé pour simuler l'effet d'une perte de fonction de NCX1 sur l'aspect du PA d'une cellule ventriculaire humaine midmyocardique.

Le modèle tissulaire est basé sur la simulation de l'activité électrique d'une tranche de tissu myocardique, constitué de 60 cellules sous-épicaudiques, 45 cellules mid-myocardiques et 60 cellules sous-endocardiques (O'Hara et al., 2011). Ce modèle nous permet d'enregistrer l'aspect de pseudo-ECGs générés par cette couche de cellules myocardiques.

H. Analyses statistiques

Les données sont exprimées en moyennes \pm S.E.M. Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel Prism5 (*GraphPad Software, Inc.*). Des tests t de Student ou des tests U de Mann-Whitney sont utilisés pour comparer 2 groupes. Un test de Wilcoxon est réalisé pour la comparaison de valeurs appariées. Un test de log-rank et une analyse de Kaplan-Meier sont effectués pour l'analyse de survie. Pour des analyses impliquant plus de 2 groupes, un test ANOVA une voie ou un test de Kruskal-Wallis sont réalisés, avec un post-test de Bonferroni ou de Dunn quand cela est approprié. La comparaison de pourcentages est effectuée grâce à un test de Fisher. Une valeur de P inférieure à 0,05 est considérée comme significative.

Chapitre 3

RÉSULTATS

Projet 1 : Les souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP}, un nouveau modèle d'étude du SQT de type 3 associé à une cardiomyopathie.

I. Résumé du projet

Chez l'Homme, la mutation delQKP 1507-1509 de Nav1.5, codé par le gène *SCN5A*, a été reliée à un SQT de type 3 associé à des troubles de conduction, une cardiomyopathie dilatée et une mort subite prématurée. Dans le but de comprendre les conséquences de cette mutation et de développer un nouveau modèle d'étude préclinique du SQT de type 3 associé à une cardiomyopathie structurale, la souris knock-in *Scn5a*^{+/ Δ QKP}, exprimant la mutation équivalente (delQKP 1510-1512), a été générée.

Ce modèle a d'abord été caractérisé et mime le phénotype des individus porteurs de la mutation. En effet, les souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP} présentent un intervalle QTc allongé, des troubles de conduction ainsi que des arythmies ventriculaires dès l'âge de 2 semaines, suivis d'hypertrophie ventriculaire, puis d'insuffisance cardiaque et d'une mortalité précoce à 4 semaines. Comme cela avait pu être montré en système de réexpression hétérologue, la mutation augmente le courant I_{NaLate} dans des cardiomyocytes isolés. Le PA ventriculaire des souris mutées est prolongé. A 4 semaines, ces animaux montrent un remodelage du cycle du Ca^{2+} , incluant des transitoires calciques plus amples et aux cinétiques ralenties, ainsi qu'une hausse de la charge en Ca^{2+} du RS. Un remodelage de l'expression des protéines du cycle du Ca^{2+} est observé, ainsi qu'une inhibition de la voie CaMKII-dépendante, dont l'expression des formes actives est diminuée. L'incidence de vagues calciques spontanées dans les cardiomyocytes issus des souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP} est augmentée, en lien avec la survenue de post-dépolarisations précoces sur les enregistrements de PA. La ranolazine, à l'inverse du propranolol, raccourcit la durée de l'intervalle QTc chez les souris exprimant la mutation, et supprime les troubles du rythme.

Les souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP} récapitulent le phénotype observé chez l'Homme et constituent donc un nouveau modèle approprié pour la compréhension des mécanismes pathologiques du SQT

de type 3 associé à une cardiomyopathie structurale et pour le screening pharmacologique dans ce contexte.

II. Article

Ce travail a été publié dans le *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* le 23 Août 2018 :

Montnach, J., Chizelle, F., Belbachir, N., Castro, C., Li, L., Loussouarn, G., Toumaniantz, G., Carcouët, A., Meinzinger, A.J., Shmerling, D., et al. (2018). Arrhythmias precede cardiomyopathy and remodeling of Ca²⁺ handling proteins in a novel model of long QT syndrome. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 123, 13–25.

1 **Arrhythmias precede cardiomyopathy and remodeling of Ca²⁺ handling proteins in a novel**
2 **model of long QT syndrome**

3 Jérôme Montnach,^{1*} Franck F. Chizelle,^{1#} Nadjet Belbachir,¹ Claire Castro,¹ Linwei Li,³ Gildas
4 Loussouarn,¹ Gilles Toumaniantz,¹ Agnès Carcouët,¹ Anne Julia Meinzinger,⁴ Doron Shmerling,⁴ Jean-
5 Pierre Benitah,³ Ana Maria Gómez,³ Flavien Charpentier^{1,2§}, Isabelle Baró^{1§}

6 ¹ l'institut du thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, Nantes, France

7
8 ² l'institut du thorax, CHU Nantes, Nantes, France

9 ³INSERM, UMR S1180, Univ Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France.

10 ⁴PolyGene AG, Rümlang, Switzerland

11 * present address: Leon H Charney Division of Cardiology, New York University School of Medicine
12 (NYU-SoM), 522 First Avenue, Smilow 805, New York, NY 10016, USA.

13 Short title: Type 3 long QT syndrome and Ca²⁺ remodeling

14 Word Count: 7885

15 # Equal contribution

16 § Co-corresponding authors, jointly directed this work

17 Isabelle BARÓ

18 *l'institut du thorax*

19 Inserm UMR S1087, CNRS UMR C6291

20 IRS-UN, 8 quai Moncousu

21 44007 Nantes cedex 1, France

22 isabelle.baro@inserm.fr

23 Tel. +33 228 08 01 50; Fax. +33 228 08 01 30

24 or Flavien CHARPENTIER

25 same address

26 E-mail: flavien.charpentier@inserm.fr

27 Tel. +33 228 08 01 10 64; Fax. +33 228 08 01 30

28 **Abstract**

29 **Aim.** Deletion of QKP1507-1509 amino-acids in *SCN5A* gene product, the voltage-gated Na⁺ channel
30 Nav1.5, has been associated with a large phenotypic spectrum of type 3 long QT syndrome, conduction
31 disorder, dilated cardiomyopathy and high incidence of sudden death. The aim of this study was to
32 develop and characterize a novel model of type 3 long QT syndrome to study the consequences of the
33 QKP1507-1509 deletion. **Methods and results.** We generated a knock-in mouse presenting the
34 delQKP1510-1512 mutation (*Scn5a*^{+/ Δ QKP}) equivalent to human deletion. *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice showed
35 prolonged QT interval, conduction defects and ventricular arrhythmias at the age of 2 weeks, and,
36 subsequently, structural defects and premature mortality. The mutation increased Na⁺ window current
37 and generated a late Na⁺ current. Ventricular action potentials from *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice were prolonged.
38 At the age of 4 weeks, *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice exhibited a remodeling leading to [Ca²⁺]_i transients with higher
39 amplitude and slower kinetics, combined with enhanced SR Ca²⁺ load. SERCA2 expression was not
40 altered. However, total phospholamban expression was higher whereas the amount of Ca²⁺-calmodulin-
41 dependent kinase II (CaMKII)-dependent T17-phosphorylated form was lower, in hearts from 4-week-
42 old mice only. This was associated with a lower activity of CaMKII and lower calmodulin
43 expression. In addition, *Scn5a*^{+/ Δ QKP} cardiomyocytes showed larger Ca²⁺ waves, correlated with the presence of
44 afterdepolarizations during action potential recording. Ranolazine partially prevented action potential
45 and QT interval prolongation in 4-week-old *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice and suppressed arrhythmias. **Conclusion.**
46 The *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mouse model recapitulates the clinical phenotype of mutation carriers and provides new
47 and unexpected insights into the pathological development of the disease in patients carrying the
48 QKP1507-1509 deletion.

49

50 **Key words:** *Scn5a*, long QT syndrome, dilated cardiomyopathy, arrhythmias, intracellular Ca²⁺
51 homeostasis

52

Introduction

53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77

Long QT syndrome (LQTS) is a severe disorder of cardiac electrical activity. It is caused by delayed repolarization in ventricular cardiomyocytes, which results in a prolonged QT interval on the ECG and an increased susceptibility to polymorphic ventricular tachycardia and ventricular fibrillation. Mutations in genes encoding ion channels or their accessory subunits are linked to different types of LQTS.¹ Approximately 90% of LQTS mutations are in *KCNQ1* (LQTS1), *KCNH2* (LQTS2) and *SCN5A* (LQTS3) genes. Specifically, mutations in the *SCN5A*-encoded cardiac Na⁺ channel Nav1.5 commonly alter the fast inactivation process of the channel. Physiologically, Nav1.5 channels activate rapidly to generate a large transient inward Na⁺ current ($I_{Na,T}$) and inactivate within a few milliseconds. This current initiates the action potential of highly polarized cardiomyocytes. Nevertheless, the Na⁺ current also includes a much smaller sustained component, called late Na⁺ current ($I_{Na,L}$), which remains activated during the plateau phase of the action potential. LQTS3 mutations result in a marked slowing of Nav1.5 inactivation and increase of $I_{Na,L}$ that prolong the action potential.^{2,3} Deletion of amino acid residues 1507–1509 QKP, close to the first described KPQ1505-1507 deletion,⁴ has been identified in two families.^{5,6} This mutation is associated not only with LQTS3 but also with a broader phenotypic spectrum including conduction disorder, dilated cardiomyopathy (DCM) and a high incidence of sudden death.⁶ *In vitro* experiments in an heterologous expression system revealed that QKP1507-1509 deletion induced a larger $I_{Na,L}$.⁵ To characterize the effects of this deletion in a physiological environment, we generated a knock-in mouse model carrying the mouse equivalent (delQKP1510-1512; *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mouse) to the human QKP1507-1509 deletion. Heterozygous *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice share common features with patients, including long QT interval, ventricular arrhythmias, heart failure and increased risk of sudden death at a young age. We found that the deletion induces abnormal Ca²⁺ cycling

78 correlated with secondarily decreased Ca^{2+} -calmodulin dependent kinase II (CaMKII)
79 activation, most probably leading to altered expression and phosphorylation of key Ca^{2+}
80 handling proteins. This may constitute a remodeling due to the very early-observed electrical
81 abnormalities. Acute treatment with the $\text{I}_{\text{Na,L}}$ inhibitor ranolazine partially normalized QT
82 interval duration and suppressed arrhythmias with no effect on conduction, suggesting that it
83 could be appropriate to be used in patients with the QKP1507-1509 deletion.

84

85 **Methods**

86

87 A full description of the methods is available in the supplementary material online.

88

89 The *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mouse model was generated in PolyGene AG facilities, according to the Swiss
90 Federal Animal Protection Law. The experimental procedures were approved by the Cantonal
91 Veterinary Administration, Bern, Switzerland. We used Flp/FRT-mediated targeting to delete
92 residues 1510–1512 (QKP) in the *Scn5a* gene (see supplementary material online, methods and
93 Figure S1). Subsequent animal experiments were performed in the animal facility of Nantes
94 University Health Research Institute (*UTE – IRS-UN*) which has been accredited by the French
95 Ministry of Agriculture. The experimental procedures were approved by the regional ethic
96 committee (CEEA – Pays de la Loire, France) according to the Directive 2010/63/EU of the
97 European Union.

98

99 ***Electrocardiography.***

100 Six-lead ECGs were recorded on mice anesthetized with isoflurane with 25-gauge subcutaneous
101 electrodes on a computer through an analog-digital converter (IOX 1.585, EMKA
102 Technologies, France) for monitoring and off-line analysis (ECG Auto v3.2.0.2, EMKA
103 Technologies). ECGs were analyzed as previously described.⁷

104

105 ***Morphological and histological analysis.***

106 Mouse heart, lungs and liver were washed with PBS, fixed in 4% paraformaldehyde and
107 embedded in paraffin. Five-micrometer sections were stained with haematoxylin/eosin or
108 picrosirius red and examined with a classic light microscope.

109

Patch-clamp experiments.

Whole-cell patch-clamp technique was used to record sodium current in 4-week-old mouse cardiomyocytes (see supplementary material online for cell isolation method) using a VE-2 amplifier (Alembic Instruments, Montreal, QC, Canada). Series resistance was compensated. Activation, inactivation, recovery from inactivation and slow inactivation parameters were determined at room temperature (20-22°C) using conventional voltage-clamp protocols, from a holding potential of -120 mV and in the presence of 14 mM external Na⁺. All current measurements were normalized using the cell capacitance. Late sodium current was measured in the presence of 140 mM external Na⁺ as the 30 μmol/L tetrodotoxin-sensitive current at the end of a 350-ms step at -20 mV.

120

Action potential recordings.

Action potentials (AP) from left atrial and right ventricular free wall were recorded at 37 ± 0.5°C with borosilicate glass microelectrodes with 15-25-MΩ impedance when filled with 3 mol/L KCl. The preparations were superfused with a modified Tyrode solution, bubbled with 95% O₂-5% CO₂ gas mixture. Preparations were paced locally with 2-ms square wave pulses with amplitude of twice diastolic threshold. The resting potential (RP), the AP amplitude (APA), the maximum upstroke velocity of phase 0 of the AP (dV/dt_{max}) and the AP duration at 30% (APD₃₀), 50% (APD₅₀), 70% (APD₇₀) and 90% (APD₉₀) of full repolarization were measured under baseline conditions and after 10 min of superfusion with ranolazine (10 μmol/L; Tocris Bioscience, UK).

131

Calcium imaging.

[Ca²⁺]_i transients and Ca²⁺ sparks were recorded in 4-week-old mouse cardiomyocytes (see supplementary material online for cell isolation method) loaded for 30 minutes with fluorescent

135 Ca^{2+} dye (Fluo-3 AM, 5 $\mu\text{mol/L}$) and superfused with a control solution. To record $[\text{Ca}^{2+}]_i$
136 transients, cells were paced at 0.5 Hz by field stimulation. Spontaneous Ca^{2+} sparks were
137 obtained in quiescent cells after $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients recordings. SR Ca^{2+} load was estimated by
138 rapid caffeine application. Images were obtained with confocal microscopy. The line scan was
139 selected parallel to the longitudinal cell axis. The fluorescence values (F) were normalized by
140 the basal fluorescence (F_0) in order to obtain the fluorescence ratio (F/ F_0).

141

142 ***Western blot analysis.***

143 Protein samples were prepared from left ventricular free walls. Forty micrograms of proteins
144 were separated on SDS-PAGE gels and transferred on nitrocellulose membranes. Membranes
145 were blocked and incubated with primary antibodies targeted against Nav1.5 (D9J7S, Cell
146 Signaling technology; 1:1000), SERCA2 (PA5-29380 Thermo Scientific; 1:2000), $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$
147 exchanger NCX1 (Santa Cruz Biotechnology; 1:1000), CaMKII (PA5-22168 Thermo
148 Scientific; 1:1000), p-CaMKII (MA1-047 Thermo Scientific; 1:2000), ox-CaMKII (GTX36254
149 GeneTex; 1:1000), phospholamban (PLB; Santa Cruz Biotechnology; 1:1000), pPLB-T17
150 (Santa Cruz Biotechnology; 1:5000), pPLB-S16 (Santa Cruz Biotechnology; 1:1000), type 2
151 ryanodine receptor (RyR2; MA3-925 Thermo Scientific; 1:2000), pRyR2-S2808 (A010-30
152 Badrilla; 1:4000), pRyR2-S2814 (A010-31 Badrilla; 1:4000), pRyR2-S2030 (A010-32
153 Badrilla; 1:4000), N-cadherin (4061, Cell Signaling technology; 1:1000) and calmodulin (CaM;
154 05-173 EMD Millipore; 1:1000). In addition, an anti-GAPDH antibody (Santa-Cruz
155 Biotechnologies; 1:10000 dilution) was used as an external/internal control. Next, membranes
156 were incubated with the *ad hoc* secondary horseradish peroxidase (HRP) antibody (Santa Cruz;
157 1:10000). Incubation was followed by detection using chemiluminescence. Western-blot
158 quantification was performed with Image Lab™ 5.2.1 software (Bio-Rad Software).

159

160 Immunohistochemistry.

161 Heart cryosections and isolated cardiomyocytes were immunostained for α -actinin 2. The
162 samples were blocked and permeabilized before incubation with primary and secondary
163 antibodies. Sections were mounted using ProLong Gold Antifade mountant with DAPI
164 (Thermo Fischer Scientific) to counter-stain nuclei.

165 To visualize t-tubule network, freshly isolated cardiomyocytes were stained with Di-8 ANEPPS
166 (Invitrogen). The samples were imaged with a Nikon A1 confocal microscope (objective o.i.
167 60x, N.A. 1.4, Nikon) and captured with NIS-Elements software. Directional analysis of α -
168 actinin 2 and t-tubule staining were performed with ImageJ, as described by Wagner *et al.*⁸

169

170 Echocardiography

171 Two-dimensional echocardiography was performed on mice anaesthetized with isoflurane
172 using a Vivid 7 Dimension ultrasonography (GE Healthcare) with a 14-MHz transducer. Left
173 ventricular diameter and free wall thickness, as well as septal thickness, were measured from
174 long-axis images obtained by M-mode echocardiography. Systolic function was further
175 assessed by calculation of the ejection fraction.

176

177 Mathematical modeling of mouse ventricular action potentials

178 We used the 2001 single-cell mouse model of Pandit and collaborators
179 (<http://models.cellml.org/electrophysiology>). For the *Scn5a*^{+/ Δ QKP} model, late current was
180 assumed to represent 3% of the peak current⁹ and both fast and slow steady-state inactivation
181 curves were shifted by 6 mV to the depolarized potential, as experimentally observed (see figure
182 4C and supplementary material online, Supplemental table 1). Time constants of fast and slow
183 inactivation, τ_h and τ_j respectively, were also modified (see figure 3D) and SERCA2 Ca²⁺ flux

184 was reduced by 3 in order to correspond to the 3-fold increase of the $[Ca^{2+}]_i$ transient decay
185 time (see figure 5A).

186

187 ***Statistics.***

188 Data are expressed as mean \pm S.E.M. Statistical analysis was performed with Prism5 (GraphPad
189 Software, Inc.). Significant differences were determined with Student *t*-test or Mann-Whitney
190 U test for comparison of two groups. Wilcoxon test was used to compare paired values. Kaplan-
191 Meier analysis and log-rank test were used to compare the survival distributions. For more than
192 two groups, 1-way ANOVA or Kruskal-Wallis test was performed with Bonferroni or Dunn
193 post-test when appropriate. For percentage comparison, Fisher exact test was used. A *P* value
194 below 0.05 was considered significant.

195

196

196 **Results**

197 *Scn5a*^{+/+}-*Flp* and *Scn5a*^{+/ Δ QKP-neo} mice developed normally. Western blot analysis showed no
198 appreciable difference in ventricular expression of Nav1.5 protein between *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice
199 and WT mice (supplementary material online, Figure S2). Since no parameter allowed to
200 discriminate WT mice from *Scn5a*^{+/+}-*Flp* mice, we pooled these two groups in a single *Scn5a*^{+/+}
201 group (see below and supplementary material online, Figure S3).

202

203 ***Electrocardiographic phenotype and premature mortality in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice***

204 ECG was recorded at the age of 3-4 weeks in all mice studied and at 2 weeks for a subset of
205 mice. Figure 1A depicts representative examples of ECG recordings from 2- and 4-week-old
206 anesthetized mice in sinus rhythm. Only ~30% of 2-week-old and ~20% of 3-4-week-old
207 *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice were in sinus rhythm. In these mice, RR interval did not differ from that in
208 *Scn5a*^{+/+} mice at 2 (137 ± 3 ms, *n* = 25 for *Scn5a*^{+/+} mice *versus* 141 ± 5 ms, *n* = 9 for

209 *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice) or 4 (128 \pm 1 ms, n = 142 for *Scn5a*^{+/+} mice versus 126 \pm 4 ms, n = 22 for
210 *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice) weeks of age. However, *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice exhibited a marked prolongation
211 of QTc interval compared to *Scn5a*^{+/+} mice. Ventricular conduction as reflected by QRS
212 interval was also prolonged in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice compared to *Scn5a*^{+/+} mice (Figure 1B), while
213 atrial and atrioventricular conduction was not altered (data not shown). Most *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice,
214 even at the age of 2 weeks, exhibited rhythm disorders. Indeed, functional second-degree
215 atrioventricular block (fAVB), resulting from prolonged ventricular repolarization and
216 refractoriness, occurred in \sim 30% of *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice (2/6 and 32/102 at 2 and 3-4 weeks
217 respectively; Figure 1C). Spontaneous episodes of monomorphic and polymorphic premature
218 ventricular beats and/or tachycardia (PVB/VT) were also observed in \sim 30% of 2-week-old
219 *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice (2/6) and \sim 50% of 3-4-week-old *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice (48/102), whereas this was
220 almost absent in *Scn5a*^{+/+} mice (1/161 in 3-4-week-old *Scn5a*^{+/+} mice; Figure 1C). One event
221 of lethal ventricular fibrillation could be recorded in a 4-week-old *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mouse (Figure
222 1D). We failed to observe any atrial arrhythmia. In accordance with the pathology observed in
223 patients, *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice displayed shortened life expectancy compared to control mice
224 (median survival: 6.4 weeks; Figure 1E), without any difference between males and females.
225 The number of mice exhibiting tachyarrhythmias and AVB progressively decreased with
226 ageing, suggesting that mostly mice in sinus rhythm survived (Figure 1F).

227

228 ***Abnormal cardiac function in 4-week-old *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice***

229 Heterozygous *Scn5a*^{+/ Δ QKP} offspring were born at a Mendelian frequency. At the age of 2 and
230 4 weeks, they presented a small but significant lower body weight compared to *Scn5a*^{+/+} mice
231 (Figure 2A-a). Four-week-old *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice also displayed some symptoms of congestive
232 heart failure. Morphological examination of whole hearts and longitudinal sections from
233 *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice indicated significantly larger left ventricular free-wall thickness compared to

234 *Scn5a*^{+/+} mice at 10 weeks of age, but not at 2 or 4 weeks (Figure 2B). At the cellular level,
235 both α -actinin 2 and t-tubule network were disorganized at 4 but not 2 weeks of age in
236 *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice (supplementary material online, Figure S4). Consistently, heart weight/tibia
237 length ratio was significantly higher in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice compared to *Scn5a*^{+/+} mice at 4 weeks
238 (Figure 2A-b). *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice also exhibited cardiomyocytes hypertrophy, as indicated by
239 their larger cell capacitance (supplementary material online, Table S1). At the same age, the
240 echocardiography results show that both the septum and left ventricle free wall thickness was
241 already larger, probably due to incomplete relaxation of the beating heart (supplementary
242 material online, Figure S5). These structural alterations could be linked to altered Nav1.5
243 macromolecular complex, as reflected by the lower interaction of Nav1.5 with N-cadherin in
244 4-week old *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice compared to *Scn5a*^{+/+} mice (supplementary material online,
245 Figure S6). In addition, the atria of *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice frequently contained organized thrombi.
246 Lung weight/tibia length ratio was higher in 4-week-old *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice compared to
247 *Scn5a*^{+/+} mice but neither pulmonary congestion nor edema was observed (Figure 2C).
248 Regarding the right ventricular dysfunction, no significant alteration of the liver weight/tibia
249 length was detected (data not shown). However, histological analysis showed chronic
250 congestive liver with blood stasis in the capillary vessels between centroglobular and
251 periglobular veins in all *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice but not in *Scn5a*^{+/+} littermates (Figure 2D). Finally,
252 a small but significantly higher level of left ventricular fibrosis was observed in these animals
253 compared to *Scn5a*^{+/+} mice (Figure 2E).

254

255 ***Occurrence of a late Na⁺ current in Scn5a^{+/ Δ QKP} mice***

256 Figure 3A displays representative Na⁺ currents recorded from 4-week-old *Scn5a*^{+/+} and
257 *Scn5a*^{+/ Δ QKP} cardiomyocytes. Peak current density was not affected by the QKP deletion (Figure
258 3B) nor was the steady-state activation voltage dependence (Figure 3C and supplementary

259 material online, Table S1). Consistent with unchanged peak current density, the expression of
260 Nav1.5 protein, tested by immunoblotting, showed no appreciable difference between
261 *Scn5a*^{+/ Δ QKP} and *Scn5a*^{+/ $+$} mice (supplementary material online, Figure S2). Steady-state
262 inactivation was significantly shifted toward depolarized potentials in *Scn5a*^{+/ Δ QKP}
263 cardiomyocytes (Figure 3C and supplementary material online, Table S1). As a consequence,
264 the window current was increased. In addition, the slow and fast time constants of inactivation
265 were significantly higher in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} cardiomyocytes (Figure 3D). However, recovery from
266 inactivation was similar between the two groups (supplementary material online, Figure S7 and
267 Table S1). Finally, the TTX-sensitive late Na⁺ current measured at the end of a 350-ms
268 depolarizing step was much larger in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} cardiomyocytes (Figure 3E).

269

270 ***Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice exhibit prolonged action potentials and early afterdepolarizations**

271 Ventricular action potential duration (APD) was dramatically prolonged in 4-week-old
272 *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice (Figure 4A) at a pacing cycle length of 200 ms. *In silico* modelling showed
273 that it may be also the case at shorter pacing cycle lengths (100 ms, Figure S8). Ventricular
274 preparations from *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice displayed a depolarized resting membrane potential and a
275 lower action potential (AP) amplitude compared to *Scn5a*^{+/ $+$} mice (Figure 4B). There was also
276 a 35%-lower dV/dt_{max} in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} preparations compared to *Scn5a*^{+/ $+$} preparations (104 ± 20
277 V/s, n = 8, versus 159 ± 8 V/s, n = 8, respectively, *P* < 0.05, Student *t*-test). *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice
278 exhibited prolonged APD₃₀, APD₅₀, APD₇₀ and APD₉₀ with respect to *Scn5a*^{+/ $+$} mice (Figure
279 4C). Action potential prolongation was associated with the occurrence of early
280 afterdepolarizations in 9 out of 17 *Scn5a*^{+/ Δ QKP} ventricular preparations but in none of the
281 *Scn5a*^{+/ $+$} preparations (Figure 4D, see also supplementary material online, Figure S8A). Resting
282 membrane potential was also depolarized and AP durations prolonged in left atrial *Scn5a*^{+/ Δ QKP}
283 preparations (data not shown).

284

285 ***Scn5a^{+/ Δ QKP} mutation induces abnormal calcium cycling***

286 In the heart, intracellular Na⁺ concentration is a key modulator of Ca²⁺ homeostasis and
287 increased intracellular Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i) has been closely linked to arrhythmias.¹⁰ We
288 thus investigated the [Ca²⁺]_i homeostasis in ventricular cardiomyocytes of 4-week-old mice to
289 detect any additional impairment. Figure 5A shows representative confocal line-scan images
290 recorded from *Scn5a^{+/+}* and *Scn5a^{+/ Δ QKP}* cardiomyocytes that were field stimulated at 0.5 Hz.
291 The amplitude of [Ca²⁺]_i transients was moderately higher in *Scn5a^{+/ Δ QKP}* cardiomyocytes than
292 in *Scn5a^{+/+}* cardiomyocytes. They were also characterized by longer time-to-peak and decay
293 times (Figure 5A), all together suggesting a higher sarcoplasmic reticulum (SR) load and an
294 impairment of the Ca²⁺ recycling. We also recorded Ca²⁺ activity in quiescent cardiomyocytes
295 (Figure 5B). The percentage of cardiomyocytes exhibiting spontaneous Ca²⁺ waves and the
296 frequency of Ca²⁺ waves were higher in *Scn5a^{+/ Δ QKP}* mice than in *Scn5a^{+/+}* mice, accompanied
297 by a faster propagation speed ($139.9 \pm 2.6 \mu\text{m/s}$, $n = 99$ versus $92.7 \pm 6.6 \mu\text{m/s}$, $n = 10$; $P <$
298 0.001), confirming an impairment of the SR function. However, no change in Ca²⁺ wave
299 amplitude was observed (peak F/F₀, 2.6 ± 0.1 , $n = 101$ versus 2.7 ± 0.1 , $n = 10$). To analyze
300 arrhythmogenic elementary Ca²⁺ release through RyR2 channels, we recorded spontaneous
301 Ca²⁺ sparks in quiescent conditions. Although the mutation had no effect on Ca²⁺ spark
302 frequency [in s⁻¹.100 μm^{-1} , 0.3 ± 0.1 (10 *Scn5a^{+/ Δ QKP}* cardiomyocytes) versus 0.5 ± 0.1 (20
303 *Scn5a^{+/+}* cardiomyocytes)], Ca²⁺ sparks in *Scn5a^{+/ Δ QKP}* cardiomyocytes were higher (peak F/F₀,
304 2.3 ± 0.1 versus 1.9 ± 0.1 ; $P < 0.01$), wider (full width at half-maximum amplitude in μm , $3.1 \pm$
305 0.2 versus 2.0 ± 0.1 ; $P < 0.001$) and longer (full duration at half-maximum peak in ms,
306 47.8 ± 3.6 versus 35.8 ± 2.4 ; $P < 0.01$, 66 from *Scn5a^{+/ Δ QKP}* cardiomyocytes versus 152 from
307 *Scn5a^{+/+}* cardiomyocytes).

308 To investigate the mechanism involved in the enhanced [Ca²⁺]_i transient amplitude and time-

309 to-peak, we evaluated the amount of Ca^{2+} stored in the SR. The $\text{Scn5a}^{+\Delta\text{QKP}}$ cardiomyocytes
310 presented higher SR Ca^{2+} load (Figure 5C) without alterations of decay time of the caffeine-
311 evoked $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients (4208 ± 651 ms, $n = 6$ versus 4210 ± 656 ms in $\text{Scn5a}^{+/+}$ mice, $n = 12$),
312 indicating no modification of the sodium/calcium exchanger (NCX1) activity.
313 We also used an *in silico* model to further analyze the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ homeostasis. The model predicted
314 that the mutation leads to both higher diastolic $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient amplitude at 2000-
315 ms cycle length, in agreement with the experimental results (supplementary material online,
316 Figure S8). The model also allowed us to simulate the effects of the mutation on Ca^{2+}
317 homeostasis at more physiological cycle lengths for mice (100 and 200 ms). In these conditions,
318 both $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient amplitude and diastolic $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevations are exacerbated even if the SR
319 Ca^{2+} load is predicted to be lower (supplementary material online, Figure S8).

320

321 **Remodeling of key Ca^{2+} handling proteins in $\text{Scn5a}^{+\Delta\text{QKP}}$ mice**

322 As we observed electrocardiographic and calcium cycle abnormalities in $\text{Scn5a}^{+\Delta\text{QKP}}$ mice, we
323 investigated the expression of key Ca^{2+} handling proteins. As earlier suspected, NCX1
324 expression was similar in both groups at 4 weeks (Figure 6A). Despite lower Ca^{2+} recycling
325 kinetics, SERCA2 (Figure 6B; left) expression was also similar in both groups at the same age.
326 Since SERCA2 activity is regulated by phospholamban (PLB), its expression and
327 phosphorylation were tested by immunoblotting. Total PLB ventricular expression was
328 significantly higher at 4 weeks. However, its CaMKII-dependent phosphorylation at Thr17 was
329 significantly lower in $\text{Scn5a}^{+\Delta\text{QKP}}$ mice compared to $\text{Scn5a}^{+/+}$ mice (Figure 6B; right). These
330 alterations may underlie the prolongation of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient decay phase. The expression
331 of the ryanodine receptor (RyR2) was not altered in $\text{Scn5a}^{+\Delta\text{QKP}}$ mice. However, its level of
332 CaMKII-dependent phosphorylation at Ser2808 was lower (Figure 6C). PKA activity is not
333 modified in $\text{Scn5a}^{+\Delta\text{QKP}}$ mice, as reflected by the similar Ser16-phosphorylated PLB (pPLB-

334 S16) and Ser2030 phosphorylated RyR2 (pRyR2-2030) expression compared to *Scn5a*^{+/+} mice
335 (Figure 6B and 6C).

336 Recent studies have linked $I_{Na,L}$ with higher activity of CaMKII.¹¹ As shown in Figure 6D,
337 CaMKII ventricular expression was slightly, though significantly, higher in 2-week-old
338 *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice *versus* *Scn5a*^{+/+} mice. However, at the age of 4 weeks, no significant
339 difference in CaMKII ventricular expression was observed between *Scn5a*^{+/ Δ QKP} and *Scn5a*^{+/+}
340 mice. Moreover, using an antibody against phosphoThr287-CaMKII, the active form of
341 CaMKII, we found that CaMKII autophosphorylation (T287) in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice was lower
342 compared to *Scn5a*^{+/+} mice at 4 weeks (Figure 6D), consistent with the lower PLB and RyR2
343 phosphorylation. We also observed that the level of CaMKII oxidation (Met281-282) was also
344 lower in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice, confirming lower activity of CaMKII in this model. Because
345 CaMKII autophosphorylation and oxidation first require the formation of a Ca^{2+} -
346 calmodulin/CaMKII complex, we investigated the expression of calmodulin and found that it
347 was significantly lower in 4-week-old *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice (Figure 6E).

348 Most interestingly, none of the Ca^{2+} handling protein expression was modified at the age of two
349 weeks with the exception of CaMKII expression and oxidation, which were slightly higher.
350 However, the similar levels of phosphorylated CaMKII suggest that CaMKII activity was
351 slightly and transiently higher, when compared to *Scn5a*^{+/+} mice, in 2-week-old *Scn5a*^{+/ Δ QKP}
352 mice only. Altogether, our results strongly suggest that remodeling of the Ca^{2+} handling protein
353 expression observed at 4 weeks follows the electrical abnormalities that are already present at
354 2 weeks of age.

355

356 ***Acute pharmacological treatment of *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice***

357 Beta-blockers are commonly used for treating heart failure¹² and long QT syndrome.¹³
358 Therefore, we evaluated the effects of propranolol *in vivo*. Acute propranolol injection (0.3-1-

359 3 mg/kg) had no effect on the incidence of arrhythmias in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice (Figure 7A). In
360 contrast, acute injection of ranolazine (IP, 30 mg/kg), which inhibits $I_{Na,L}$, suppressed
361 arrhythmias (Figure 7B) and significantly decreased QTc interval in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice, without
362 affecting QRS duration (Figure 7C) or other ECG parameters (not shown). In *Scn5a*^{+/+} mice,
363 ranolazine had no effect on any ECG parameter (supplementary material online, Figure S9). *Ex*
364 *vivo*, ranolazine (10 μ mol/L) shortened APD₇₀ and APD₉₀ in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice (Figure 7D) and
365 decreased early afterdepolarizations and even suppressed them in 2/4 preparations *versus* 4/4
366 under baseline condition (Figure 7E).

367

368

Discussion

369 We have generated a knock-in mouse model carrying the delQKP1510-1512 mutation on *Scn5a*
370 gene, a mutation equivalent to the *SCN5A*-delQKP1507-1509 mutation identified in LQTS3
371 patients.^{5,6} Our study shows that 1) this model recapitulates the patients' clinical traits, *i.e.*
372 prolonged ventricular repolarization, conduction disorders, ventricular arrhythmias, cardiac
373 structural disorders and a high incidence of premature death; 2) the mutation-induced alterations
374 of Nav1.5 biophysical properties partly differ from those previously reported in an heterologous
375 expression system⁵ and lead to a larger window Na^+ current; 3) the dysfunction of Nav1.5 leads
376 to arrhythmias, which precede structural defects, Ca^{2+} handling abnormalities and CaMKII
377 downregulation; 4) ranolazine, an inhibitor of $I_{Na,L}$, partially normalizes repolarization of
378 *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice and suppresses arrhythmias.

379

380 The *SCN5A*-delQKP1507–1509 mutation was identified in two families. In the first one,⁵ the
381 variant induced a QT prolongation, bradycardia and a PR interval prolongation to borderline
382 values but neither arrhythmias, nor structural heart disease. In the second family,⁶ the phenotype
383 was more severe with marked QT prolongation, conduction disorders, *torsades de pointes*,

384 ventricular fibrillation and a high incidence of sudden death. In addition, the surviving mutation
385 carriers were diagnosed with DCM. Our study shows that *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice exhibit a similar
386 phenotype to that of the second family, with a markedly prolonged QT interval associated with
387 either 2:1 functional AVB or numerous episodes of ventricular tachycardia in a majority of
388 mice. AVB was due to a particularly prolonged ventricular refractoriness, as evidenced on the
389 ECG recordings (Figure 1C) by P waves preceding the T waves, rather than a true AV block
390 that is localized in the AV node. In addition, the mice exhibited a longer QRS duration, most
391 probably due lower Na⁺ channel availability when the cardiomyocyte resting membrane
392 potential is less polarized as shown experimentally on AP and predicted *in silico*. Moreover,
393 this model is characterized by high mortality at young age and signs of heart failure. The high
394 incidence of tachyarrhythmias in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice could account for the premature death, as
395 supported by one recorded fatal event of ventricular fibrillation. Alternatively, cardiac failure
396 cannot be excluded as the mechanism of death.

397 Our study confirms that the mutation induces a late Na⁺ current as previously described in a
398 heterologous expression system.⁵ But in contrast to this previous study, we did not observe a
399 shift of steady-state activation towards positive voltages and faster recovery from inactivation.
400 Moreover, we recorded a non-previously described shift of steady-state inactivation towards
401 positive voltages, which is consistent with the implication of DIII-DIV loop in inactivation
402 process¹⁴ and responsible for a larger Na⁺ window current. Discrepancies between heterologous
403 expression systems and cardiomyocytes isolated from knock-in mice were previously
404 reported,^{15,16} and the mouse models appeared to be more useful to elucidate the
405 pathophysiological mechanisms of the *SCN5A*-related diseases.

406

407 **Two phases of disease development**

408 *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mouse phenotype develops in two phases. The first one is mostly characterized by

409 electrical dysfunction. Indeed at 2 weeks of age, *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice only exhibit prolonged QT
410 interval and ventricular arrhythmias without any detectable signs of cardiac structural defects.
411 This phenotype can be explained by the abnormally large $I_{Na,L}$ and Na^+ window currents
412 observed in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice, which are responsible for AP prolongation and development of
413 early afterdepolarizations, a likely trigger for arrhythmias.¹⁷ This is consistent with other
414 *SCN5A* mutations involved in LQTS3.^{2,18,19} Similarly, mice with cardiac-specific expression of
415 human N1325S-*SCN5A* (N₁₃₂₅S mice) and knock-in mice carrying *Scn5a*-delKPQ1508-1510
416 mutation (equivalent to human first described delKPQ1505-1507 mutation) also showed AP
417 prolongation, EADS and spontaneous ventricular tachyarrhythmias.^{20,21} In the second phase,
418 this primary electrical defect is followed by cardiac structural defects and mechanical
419 dysfunction, *e.g.*, cardiomyocytes and left ventricular hypertrophy, histological signs of
420 congestive liver,²² organized thrombi in left atrium²³ and increased lung weight, which has been
421 also reported as a sign of heart failure in N₁₃₂₅S mice.²⁰ This strongly suggests that cardiac
422 structural defects are secondary to arrhythmias. This sequence of events has been previously
423 shown in patients with *SCN5A* p.R222Q mutation, in whom heart failure was secondary to
424 incessant multifocal ventricular tachyarrhythmias.²⁴

425 Cardiac hypertrophy in 10-week old *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice is not consistent with the DCM observed
426 in some human *SCN5A*-delQKP1507–1509 mutation carriers.⁶ *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice, if they would
427 survive arrhythmias, may develop a DCM, but this could not have been observed due to the
428 very shortened life expectancy of these animals. Another *SCN5A* mutation leading to the
429 deletion of phenylalanine in position 1486 has also been identified in patients exhibiting LQTS,
430 severe arrhythmias and reduced left ventricular function.²⁵ N₁₃₂₅S mice exhibit heart failure in
431 addition to long QT interval and ventricular arrhythmias and are characterized by a marked
432 cardiac fibrosis, which is less pronounced in our model. The age of development of the
433 structural disease is older in N₁₃₂₅S mice and is more consistent with the age of fibrosis

434 development in heterozygous *Scn5a* knockout (*Scn5a*^{+/-}) mice.²⁶ Thus, despite a more severe
435 phenotype observed in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice compared to N₁₃₂₅S mice, the smaller amount of
436 fibrous tissue could be explained by their young age.

437

438 **Abnormal Ca²⁺ homeostasis in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice**

439 Cardiac hypertrophy and mechanical dysfunction in 4-week-old *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice is
440 concomitant with alterations of Ca²⁺ homeostasis. Interestingly, *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice recapitulate
441 the alterations of expression and/or function of proteins involved in Ca²⁺ homeostasis
442 commonly found in hypertrophic cardiomyopathy. Indeed, although *Scn5a*^{+/ Δ QKP}
443 cardiomyocytes exhibited slower [Ca²⁺]_i transient decay time, evocative of a lower SERCA2
444 activity, they did exhibit increased [Ca²⁺]_i transient amplitude and SR Ca²⁺ content.

445 In the heart, intracellular Na⁺ concentration is a well-known modulator of Ca²⁺ homeostasis.¹⁰

446 The slowed I_{Na} inactivation, without alteration of the peak current, and the larger Na⁺ window
447 current most likely increase the total amount of Na⁺ entry in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} cardiomyocytes and
448 consequently the amount of Ca²⁺ by activating NCX1 reverse mode. It has been shown that
449 during the first part of the AP, the large Na⁺ current activates NCX1 in reverse mode,
450 contributing to triggering [Ca²⁺]_i transient.^{27,28} Thus the larger [Ca²⁺]_i transient amplitude in
451 *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice can be explained by larger amount of Na⁺ entry through the Na⁺ channel at
452 each twitch. Alternatively, at low pacing rates, it can be due to the increased SR Ca²⁺ load. But
453 this is most unlikely at more physiological rates for mice. Indeed, computer modeling shows
454 that although the [Ca²⁺]_i transient is still predicted to be of higher amplitude in *Scn5a*^{+/ Δ QKP}
455 mice than in WT mice at pacing cycle lengths of 200 and 100 ms, SR Ca²⁺ overload is prevented
456 by the lower SERCA2 activity, most likely because of a lower phospholamban CaMKII-
457 dependent phosphorylation. This is consistent with the lower M281-282 oxidation and T287
458 phosphorylation levels of CaMKII, observed in our model in contrast to what is observed when

459 the late Na⁺ current is pharmacologically induced by means of ATX-II^{29,30} and to what has been
460 shown in N₁₃₂₅S mice.³¹ This is also in contrast to what is commonly observed in heart failure.³²
461 One explanation for this discrepancy is the down regulation of calmodulin expression in
462 *Scn5a*^{+/ Δ QKP} cardiomyocytes at 4 weeks of age. Indeed, CaMKII is canonically activated by
463 calmodulin binding to its CaMKII binding site, which occurs when Ca²⁺ binds to CaM.³³ Lower
464 levels of calmodulin are thus expected to induce lower levels of CaMKII activation. The
465 mechanisms of the down regulation of calmodulin is unclear but might result from an adaptation
466 to the increased Na⁺ and Ca²⁺ influx during prolonged AP. Similarly, we did not observe any
467 abnormal PKA activity unlike when the late Na⁺ current is pharmacologically increased.³⁰
468 Anyhow, this is consistent with the absence of effect of β -blockers on the arrhythmias (see
469 below).

470 The longer [Ca²⁺]_i transient time to peak can be ascribed to poor excitation-contraction coupling
471 due to transverse tubule disorganization in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice, as observed in experimental
472 models of hypertrophy.³⁴ Non-canonical roles of voltage-gated sodium channels has already
473 been reviewed³⁵ and a recent study reveals the mechanisms by which Nav1.5 dysfunction can
474 induce cardiomyopathy³⁶. In link with these observations, structural remodeling could result
475 from cytoskeletal perturbation secondary to abnormal interactions between Nav1.5 and its
476 interacting proteins, including cytoskeletal proteins. Indeed, interaction of N-cadherin, a
477 component of the Nav1.5 macromolecular complex, with the sodium channel is drastically
478 lower in 4-week old *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice. Such a disturbed Nav1.5-N-cadherin interaction has
479 been involved in arrhythmogenic right ventricular dysplasia, another cardiomyopathy³⁶.
480 Moreover, QKP amino acids are located near the α -actinin-2 interaction site of Nav1.5,³⁷ and
481 *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice clearly show a disorganized α -actinin 2 network. Interestingly, mutations in
482 α -actinin-2 have been previously shown to induce both hypertrophic cardiomyopathy and
483 ventricular arrhythmias.³⁸

484

485 Ranolazine but not β -blockers suppresses spontaneous arrhythmias in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice

486 Ranolazine is a $I_{Na,L}$ inhibitor known to reduce QTc interval, and to suppress early
487 afterdepolarizations and *torsades de pointes*.³⁹ Our study shows that acute ranolazine shortens
488 QTc and normalizes heart rhythm of 4-week-old *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice, when cardiac remodeling
489 has already started. In contrast to other Nav1.5 blockers, ranolazine does not affect QRS
490 duration in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice. Similarly, Moss *et al.* showed that ranolazine shortens QTc
491 interval and improves diastolic dysfunction in LQTS3 patients, without affecting ventricular
492 conduction.⁴⁰ Moreover ranolazine may also exert an antiarrhythmic effect by inhibiting Na^+
493 overload, which would prevent $[Ca^{2+}]_i$ increase.

494 The recent guidelines for LQTS management indicate that β -blockers represent the first way to
495 use for patients.¹¹ In our study, propranolol alone had no beneficial effects on ventricular
496 arrhythmias, which is consistent with the fact that management of LQTS3 patients is more
497 complex than other LQTS patients (*e.g.* LQTS1). In fact, in LQTS3 patients, bisoprolol alone
498 has no beneficial effects, but significantly reduces arrhythmias when associated with
499 ranolazine.⁴¹ This effect might be directly linked to the inhibition of $I_{Na,L}$ and secondary
500 shortening of repolarization, but also to a decrease of Ca^{2+} overload as shown in *Scn5a*-
501 *delKPQ1507-1509* mutation.⁴² Whether chronic treatment with ranolazine in our model could
502 prevent remodeling of Ca^{2+} handling proteins and cardiac insufficiency remains to be
503 investigated. However, our results suggest that targeting $I_{Na,L}$ specifically may be sufficient to
504 limit potentially lethal arrhythmias. The main advantages of our model are the severity and the
505 rapid onset of the disease, which should facilitate pharmacological investigations not only for
506 deciphering the pathophysiological mechanisms of *SCN5A*-related DCM, but also for
507 preclinical screening of new antiarrhythmic drugs or late Na^+ current inhibitors.

508

509 To conclude, *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice recapitulate the clinical phenotype of patients carrying the
510 equivalent mutation, including QT prolongation, ventricular arrhythmias and structural
511 remodeling. Interestingly, the Nav1.5 functional defect is associated with a lower CaMKII
512 phosphorylation. The dysfunction of Nav1.5 leads to arrhythmias, which precede structural
513 defects and key Ca²⁺ handling proteins remodeling. This mouse model constitutes a useful tool
514 for preclinical screening of I_{Na,L} inhibitors.

515

516

Acknowledgements

517

518 The authors wish to thank Stéphanie Lemarchand-Mindé and Valentine Prat (Inserm UMR

519 S1087), as well as Florence Lefèbvre (Inserm UMR S1180) for their expert technical assistance.

520 The authors also thank the staff of the animal facility (UTE IRS-UN) and of the cell and tissue

521 imaging core facility (MicroPICell) of the *SFR François Bonamy*. UMR S1180 is member of

522 the Labex Lermite supported by the *Agence Nationale de la Recherche* (10-LABX-33).

523

524 **Conflict of interest:** none declared.

525

526

Funding

527 The research leading to these results has received funding from the European Community's

528 Seventh Framework Programme FP7/2007-2013 under grant agreement No. HEALTH-F2-

529 2009-241526, EUTrigTreat (IB, FC). It was also funded by the *Agence Nationale de la*

530 *Recherche* [ANR-13-BSV1-0023-01 to AMG, ANR-09-GENO-003-01 to IB, ANR-12-BSV1-

531 0013-01 to FC].

532

533

References

- 534 1. Amin AS, Pinto YM, Wilde AAM. Long QT syndrome: beyond the causal mutation. *J Physiol*
535 (*Lond*). 2013;**591**:4125–4139.
- 536 2. Wang DW, Yazawa K, George AL, Bennett PB. Characterization of human cardiac Na⁺ channel
537 mutations in the congenital long QT syndrome. *Proc Nat Acad Sci*. 1996;**93**:13200–13205.
- 538 3. Kambouris NG, Nuss HB, Johns DC, Tomaselli GF, Marban E, Balser JR. Phenotypic
539 Characterization of a Novel Long-QT Syndrome Mutation (R1623Q) in the Cardiac Sodium
540 Channel. *Circulation*. 1998;**97**:640–644.
- 541 4. Bennett PB, Yazawa K, Makita N, George AL Jr. Molecular mechanism for an inherited cardiac
542 arrhythmia. *Nature*. 1995;**376**:683–685.
- 543 5. Keller DI, Acharfi S, Delacrétaiz E, Benammar N, Rotter M, Pfammatter JP, Fressart V, Guicheney
544 P, Chahine M. A novel mutation in SCN5A, delQKP 1507-1509, causing long QT syndrome: role
545 of Q1507 residue in sodium channel inactivation. *J Mol Cell Cardiol*. 2003;**35**:1513–21.
- 546 6. Shi R, Zhang Y, Yang C, Huang C, Zhou X, Qiang H, Grace AA, Huang CLH, Ma A. The cardiac
547 sodium channel mutation delQKP 1507-1509 is associated with the expanding phenotypic spectrum
548 of LQT3, conduction disorder, dilated cardiomyopathy, and high incidence of youth sudden death.
549 *Europace*. 2008;**10**:1329–1335.
- 550 7. Royer A, van Veen TAB, Le Bouter S, Marionneau C, Griol-Charhbili V, Leoni A-L,
551 Steenman M, van Rijen HVM, Demolombe S, Goddard CA, Richer C, Escoubet B, Jarry-
552 Guichard T, Colledge WH, Gros D, de Bakker JMT, Grace AA, Escande D, Charpentier
553 F. Mouse model of SCN5A-linked hereditary Lenègre's disease: age-related conduction
554 slowing and myocardial fibrosis. *Circulation*. 2005;**111**:1738–1746.
- 555 8. Wagner E, Brandenburg S, Kohl T, Lehnart SE. Analysis of tubular membrane networks
556 in cardiac myocytes from atria and ventricles. *J Vis Exp*. 2014;**(92)**:e51823
- 557 9. Wang DW, Yazawa K, George AL Jr, Bennett PB. Characterization of human cardiac Na⁺
558 channel mutations in the congenital long QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

- 559 1996;**93**:13200-5.
- 560 10. Despa S, Bers DM. Na⁺ transport in the normal and failing heart - Remember the balance. *J Mol*
561 *Cell Cardiol.* 2013;**61**:2–10.
- 562 11. Wagner S, Dybkova N, Rasenack ECL, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P, Maier SKG, Zhang
563 T, Hasenfuss G, Brown JH, Bers DM, Maier LS. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II
564 regulates cardiac Na⁺ channels. *J Clin Invest.* 2006;**116**:3127-3138.
- 565 12. McMurray JJV, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Böhm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos
566 G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Køber L, Lip GYH, Maggioni AP, Parkhomenko
567 A, Pieske BM, Popescu BA, Rønnevik PK, Rutten FH, Schwitter J, Seferovic P, Stepinska J,
568 Trindade PT, Voors AA, Zannad F, Zeiher A, ESC Committee for Practice Guidelines. ESC
569 Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force
570 for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society
571 of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC.
572 *Eur Heart J.* 2012;**33**:1787–1847.
- 573 13. Priori SG, Wilde AA, Horie M, Cho Y, Behr ER, Berul C, Blom N, Brugada J, Chiang C-E, Huikuri
574 H, Kannankeril P, Krahn A, Leenhardt A, Moss A, Schwartz PJ, Shimizu W, Tomaselli G, Tracy
575 C. HRS/EHRA/APHRs Expert Consensus Statement on the Diagnosis and Management of Patients
576 with Inherited Primary Arrhythmia Syndromes. *Heart Rhythm.* 2013;**10**:1932–1963.
- 577 14. Ulbricht W. Sodium Channel Inactivation: Molecular Determinants and Modulation. *Physiol Rev.*
578 2005;**85**:1271–1301.
- 579 15. Remme CA, Verkerk AO, Nuyens D, van Ginneken ACG, van Brunschot S, Belterman CNW,
580 Wilders R, van Roon MA, Tan HL, Wilde AAM, Carmeliet P, de Bakker JMT, Veldkamp MW,
581 Bezzina CR. Overlap Syndrome of Cardiac Sodium Channel Disease in Mice Carrying the
582 Equivalent Mutation of Human SCN5A-1795insD. *Circulation.* 2006;**114**:2584–2594.
- 583 16. Watanabe H, Yang T, Stroud DM, Lowe JS, Harris L, Atack TC, Wang DW, Hipkens SB, Leake
584 B, Hall L, Kupersmidt S, Chopra N, Magnuson MA, Tanabe N, Knollmann BC, George AL,
585 Roden DM. Striking *In Vivo* Phenotype of a Disease-Associated Human SCN5A Mutation
586 Producing Minimal Changes *in Vitro*. *Circulation.* 2011;**124**:1001–1011.

- 587 17. Derangeon M, Montnach J, Baró I, Charpentier F. Mouse Models of SCN5A-Related Cardiac
588 Arrhythmias. *Front Physiol.* 2012;**3**:210.
- 589 18. Dumaine R, Wang Q, Keating MT, Hartmann HA, Schwartz PJ, Brown AM, Kirsch GE. Multiple
590 Mechanisms of Na⁺ Channel Linked Long-QT Syndrome. *Circ Res.* 1996;**78**:916–924.
- 591 19. Wehrens XH, Rossenbacker T, Jongbloed RJ, Gewillig M, Heidbüchel H, Doevendans PA, Vos
592 MA, Wellens HJJ, Kass RS. A Novel mutation L619F in the cardiac Na channel SCN5A associated
593 with long-QT syndrome (LQT3): a role for the I-II linker in inactivation gating. *Hum Mutat.*
594 2003;**21**:552.
- 595 20. Tian X-L, Yong SL, Wan X, Wu L, Chung MK, Tchou PJ, Rosenbaum DS, Van Wagoner DR,
596 Kirsch GE, Wang Q. Mechanisms by which SCN5A mutation N1325S causes cardiac arrhythmias
597 and sudden death in vivo. *Cardiovasc Res.* 2004;**61**:256–267.
- 598 21. Nuyens D, Stengl M, Dugarmaa S, Rossenbacker T, Compernelle V, Rudy Y, Smits JF, Flameng
599 W, Clancy CE, Moons L, Vos MA, Dewerchin M, Benndorf K, Collen D, Carmeliet E, Carmeliet
600 P. Abrupt rate accelerations or premature beats cause life-threatening arrhythmias in mice with
601 long-QT3 syndrome. *Nat Med.* 2001;**7**:1021–1027.
- 602 22. Moller S, Bernardi M. Interactions of the heart and the liver. *Eur Heart J.* 2013;**34**:2804–2811.
- 603 23. Antos CL, Frey N, Marx SO, Reiken S, Gaburjakova M, Richardson JA, Marks AR, Olson EN.
604 Dilated Cardiomyopathy and Sudden Death Resulting From Constitutive Activation of Protein
605 Kinase A. *Circ Res.* 2001;**89**:997–1004.
- 606 24. Laurent G, Saal S, Amarouch MY, Béziau DM, Marsman RFJ, Faivre L, Barc J, Dina C, Bertaux
607 G, Barthez O, Thauvin-Robinet C, Charron P, Fressart V, Maltret A, Villain E, Baron E, Mérot J,
608 Turpault R, Coudière Y, Charpentier F, Schott J-J, Loussouarn G, Wilde AAM, Wolf J-E, Baró I,
609 Kyndt F, Probst V. Multifocal Ectopic Purkinje-Related Premature Contractions. *J Am Coll*
610 *Cardiol.* 2012;**60**:144–156.
- 611 25. Yamamura K, Muneuchi J, Uike K, Ikeda K, Inoue H, Takahata Y, Shiokawa Y, Yoshikane Y,
612 Makiyama T, Horie M, Hara T. A novel SCN5A mutation associated with the linker between III
613 and IV domains of Nav1.5 in a neonate with fatal long QT syndrome. *Int J Cardiol.* 2010;**145**:61–
614 64.

- 615 26. Derangeon M, Montnach J, Cerpa CO, Jagu B, Patin J, Toumaniantz G, Girardeau A, Huang CLH,
616 Colledge WH, Grace AA, Baró I, Charpentier F. Transforming growth factor β receptor inhibition
617 prevents ventricular fibrosis in a mouse model of progressive cardiac conduction disease.
618 *Cardiovasc Res.* 2017;**113**:464–74.
- 619 27. Sipido KR, Maes M, Van de Werf F. Low Efficiency of Ca^{2+} Entry Through the $\text{Na}^{+}\text{-Ca}^{2+}$
620 Exchanger as Trigger for Ca^{2+} Release From the Sarcoplasmic Reticulum : A Comparison Between
621 L-Type Ca^{2+} Current and Reverse-Mode $\text{Na}^{+}\text{-Ca}^{2+}$ Exchange. *Circ Res.* 1997;**81**:1034–1044.
- 622 28. Bers DM. Calcium Cycling and Signaling in Cardiac Myocytes. *Annu Rev Physiol.* 2008;**70**:23–
623 49.
- 624 29. Sag CM, Mallwitz A, Wagner S, Hartmann N, Schotola H, Fischer TH, Ungeheuer N, Herting
625 J, Shah AM, Maier LS, Sossalla S, Unsöld B. Enhanced late I_{Na} induces proarrhythmogenic SR
626 Ca leak in a CaMKII-dependent manner. *J Mol Cell Cardiol.* 2014;**76**:94-105.
- 627 30. Fischer TH, Herting J, Mason FE, Hartmann N, Watanabe S, Nikolaev VO, Sprenger JU, Fan
628 P, Yao L, Popov AF, Danner BC, Schöndube F, Belardinelli L, Hasenfuss G, Maier LS, Sossalla
629 S. Late I_{Na} increases diastolic SR- Ca^{2+} -leak in atrial myocardium by activating PKA and CaMKII.
630 *Cardiovasc Res.* 2015;**107**(1):184-96.
- 631 31. Yao L, Fan P, Jiang Z, Viatchenko-Karpinski S, Wu Y, Kornyejev D, Hiraakawa R, Budas GR,
632 Rajamani S, Shryock JC, Belardinelli L. Nav1.5-dependent persistent Na^{+} influx activates CaMKII
633 in rat ventricular myocytes and N1325S mice. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2011;**301**(3):C577-86.
- 634 32. Luo M, Anderson ME. Mechanisms of altered Ca^{2+} handling in heart failure. *Circ Res.*
635 2013;**113**(6):690–708.
- 636 33. Hudmon A. & Schulman H. Structure–function of the multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent
637 protein kinase II. *Biochem J.* 2002;**364**:593–611.
- 638 34. Bénitah J-P, Kerfant BG, Vassort G, Richard S, Gómez AM. Altered communication between L-
639 type calcium channels and ryanodine receptors in heart failure. *Front Biosci.* 2002;**7**:e263–75.
- 640 35. Black JA, Waxman SG. Noncanonical roles of voltage-gated sodium channels. *Neuron.*
641 2013;**80**(2):280-91.

- 642 36. Te Riele AS, Agullo-Pascual E, James CA, Leo-Macias A, Cerrone M, Zhang M, Lin X, Lin B,
643 Sobreira NL, Amat-Alarcon N, Marsman RF, Murray B, Tichnell C, van der Heijden JF, Dooijes
644 D, van Veen TA, Tandri H, Fowler SJ, Hauer RN, Tomaselli G, van den Berg MP, Taylor MR,
645 Brun F, Sinagra G, Wilde AA, Mestroni L, Bezzina CR, Calkins H, Peter van Tintelen J, Bu L,
646 Delmar M, Judge DP. Multilevel analyses of SCN5A mutations in arrhythmogenic right ventricular
647 dysplasia/cardiomyopathy suggest non-canonical mechanisms for disease pathogenesis.
648 *Cardiovasc Res.* 2017;**113(1)**:102-111.
- 649 37. Ziane R, Huang H, Moghadaszadeh B, Beggs AH, Levesque G, Chahine M. Cell Membrane
650 Expression of Cardiac Sodium Channel Nav1.5 Is Modulated by α -Actinin-2 Interaction.
651 *Biochemistry.* 2010;**49**:166–178.
- 652 38. Chiu C, Bagnall RD, Ingles J, Yeates L, Kennerson M, Donald JA, Jormakka M, Lind JM,
653 Semsarian C. Mutations in Alpha-Actinin-2 Cause Hypertrophic Cardiomyopathy. *J Am Coll*
654 *Cardiol.* 2010; **55**:1127–1135.
- 655 39. Antzelevitch C. Arrhythmogenic mechanisms of QT prolonging drugs: Is QT prolongation really
656 the problem? *J Electrocardiol.* 2004;**37**:15–24.
- 657 40. Moss AJ, Zareba W, SCHWARZ KQ, Rosero S, McNitt S, Robinson JL. Ranolazine Shortens
658 Repolarization in Patients with Sustained Inward Sodium Current Due to Type-3 Long-QT
659 Syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2008;**19**:1289–1293.
- 660 41. van den Berg MP, van den Heuvel F, van Tintelen JP, Volders PGA, van Gelder IC. Successful
661 treatment of a patient with symptomatic long QT syndrome type 3 using ranolazine combined with
662 a beta-blocker. *Int J Cardiol.* 2014;**171**:90–92.
- 663 42. Lindegger N, Hagen BM, Marks AR, Lederer WJ, Kass RS. Diastolic transient inward current in
664 long QT syndrome type 3 is caused by Ca^{2+} overload and inhibited by ranolazine. *J Mol Cell*
665 *Cardiol.* 2009;**47**:326–334.

666

Figure legends

667

668 **Figure 1: Ventricular arrhythmias, long QT interval and premature mortality in**
669 ***Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice. A.** Representative lead I ECGs of 2-week (left) and 4-week old *Scn5a*^{+/ Δ QKP}
670 (+/+) and *Scn5a*^{+/ Δ QKP} (+/ Δ QKP) mice. Scale bars, 50 ms. **B.** QTc interval and QRS complex
671 duration in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} and *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice at the age of 2 weeks ($n = 19$ and 6 , respectively)
672 and 3-4 weeks ($n = 142$ and 22 , respectively). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ (Mann-Whitney test).
673 **C.** Top. Representative 2:1 functional atrioventricular block (fAVB) and episodes of ventricular
674 tachycardia recorded in 2-week (left) and 4-week old *Scn5a*^{+/ Δ QKP} (right) mice. Scale bars, 100
675 ms. Bottom. Incidence of fAVB (left) and premature ventricular beats and/or tachycardia
676 (PVB/VT, right) at the 2 ages in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} and *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice (same groups as in B).
677 * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ (Fisher exact test). **D.** Representative episode of ventricular
678 fibrillation recorded in a 4-week old *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mouse. Scale bar, 500 ms. **E.** The survival
679 curves show a significant increase in premature mortality in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice ($n = 19$)
680 compared to *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice ($n = 34$; *** $P < 0.001$; Log-rank test). **F.** Electrophysiological
681 follow-up of *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice between the age of 3 and 10 weeks.

682

683 **Figure 2: Cardiac structural remodeling in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice. A. a.** Body weight of *Scn5a*^{+/ Δ QKP}
684 and *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice at the age of 2 ($n = 13$ and 6 , respectively) and 4 weeks ($n = 113$ and 72 ,
685 respectively). * $P < 0.5$, *** $P < 0.001$ (Student t-test). **b.** Heart weight (mg) / tibia length (mm)
686 ratio (HW/TL) of *Scn5a*^{+/ Δ QKP} and *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice at 2 weeks ($n = 13$ and 6 , respectively) and 4
687 weeks ($n = 11$ and 13 , respectively). *** $P < 0.001$ (Mann Whitney test). **B.** Top.
688 Representative histological sections of *Scn5a*^{+/ Δ QKP} and *Scn5a*^{+/ Δ QKP} hearts at 2, 4 and 10 weeks
689 showing left ventricular hypertrophy in 10-week old *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice. Scale bar, 1 mm.
690 Bottom. Mean values of right (RV) and left ventricular (LV) transversal free-wall thicknesses

691 of 2, 4 and 10-week-old *Scn5a*^{+/+} (n = 6-12) and *Scn5a*^{+/ Δ QKP} (n = 4-5) mice observed by
 692 histology. * $P < 0.05$ (Mann-Whitney test). **C.** Histological sections of 4-week old *Scn5a*^{+/+} and
 693 *Scn5a*^{+/ Δ QKP} lungs do not show any differences (left, scale bar, 100 μ m), although lung weight
 694 (mg) / tibia length (mm) ratio (LW/TL) of *Scn5a*^{+/+} and *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice at 2 weeks (n = 20
 695 and 9, respectively) and 4 weeks (n = 11 and 13, respectively) indicates lung congestion at the
 696 second age. *** $P < 0.001$ (Mann Whitney test). **D.** Representative histological sections of 4-
 697 week old *Scn5a*^{+/+} and *Scn5a*^{+/ Δ QKP} livers show chronic congestion in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice with
 698 blood stasis in capillary vessels. Scale bar, 100 μ m. **E.** Left. Representative left ventricular
 699 sections stained with picosirius red from 4-week-old *Scn5a*^{+/+} and *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice. Scale bar,
 700 100 μ m. Right. Quantification of left ventricular fibrosis (mean percentage of collagen per
 701 histological section) measured in 12 *Scn5a*^{+/+} and 8 *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice. ** $P < 0.01$ (Mann
 702 Whitney test).

703

704 **Figure 3: Impaired Na⁺ current in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} cardiomyocytes.** **A.** Superimposed Na⁺
 705 currents during depolarization to various potentials from -80 mV to +25 mV (100-ms duration,
 706 0.2 Hz; holding potential: -120 mV) in 4-week old *Scn5a*^{+/+} and *Scn5a*^{+/ Δ QKP} cardiomyocytes.
 707 **B.** Current density-voltage relationships in *Scn5a*^{+/+} and *Scn5a*^{+/ Δ QKP} cardiomyocytes (n = 11
 708 and 9 from 6 mice per group). **C.** Superimposed steady-state activation (G/G_{\max} , voltage
 709 protocol as in A) and inactivation (I/I_{\max} at -20 mV after a 350-ms voltage prepulse, 0.2 Hz)
 710 curves of *Scn5a*^{+/+} (n = 11-18 from 6-10 mice) and *Scn5a*^{+/ Δ QKP} (n = 9 from 6 mice) Na⁺
 711 channels. Lines: Boltzmann fits of the data. Inset: increase of the window current in the
 712 presence of the mutation. **D.** Fast and slow inactivation kinetics of the Na⁺ current of *Scn5a*^{+/+}
 713 and *Scn5a*^{+/ Δ QKP} cardiomyocytes (n = 11 and 9 from 4 and 5 mice, respectively). * $P < 0.05$,
 714 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (protocol as in A, Bonferroni test). **E.** Left. Representative late Na⁺
 715 currents at -20 mV obtained by subtraction of the current before and after application of 30

716 $\mu\text{mol/L}$ tetrodotoxin (TTX) in *Scn5a*^{+/+} and *Scn5a*^{+/ Δ QKP} cardiomyocytes. Right. TTX-sensitive
717 late Na⁺ current measured at the end of a 350-ms pulse (at -20 mV) in *Scn5a*^{+/+} and *Scn5a*^{+/ Δ QKP}
718 cardiomyocytes ($n = 6$ from 5 and 3 mice, respectively). * $P < 0.05$ (Mann-Whitney test).

719

720 **Figure 4: *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice exhibit prolonged cardiac action potentials and early after-**
721 **depolarizations. A.** Representative ventricle action potentials (AP) from 4-week old *Scn5a*^{+/+}
722 and *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice recorded at a pacing cycle length of 200 ms. **B.** Resting membrane
723 potential (RMP) and AP amplitude (APA) in *Scn5a*^{+/+} and *Scn5a*^{+/ Δ QKP} ventricle preparations
724 ($n = 8$ in each group). * $P < 0.05$ (Mann-Whitney test). **C.** Ventricle AP durations at 30%
725 (APD₃₀), 50% (APD₅₀), 70% (APD₇₀) and 90% (APD₉₀) of full repolarization in *Scn5a*^{+/+} and
726 *Scn5a*^{+/ Δ QKP} ($n = 8$ in each group). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (Mann-Whitney
727 test). **D.** Example of early after-depolarization (EAD) observed in a *Scn5a*^{+/ Δ QKP} ventricle
728 preparation. Right. Distribution of *Scn5a*^{+/+} and *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice exhibiting EADs or not.
729 ** $P < 0.01$ (Fisher exact test).

730

731 **Figure 5: *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice exhibit cardiac Ca²⁺ handling defects. A.** Top. Representative
732 line scan recordings of [Ca²⁺]_i transients in *Scn5a*^{+/+} and *Scn5a*^{+/ Δ QKP} cardiomyocytes. Bottom.
733 Amplitude (F/F₀), time to peak and decay time of the [Ca²⁺]_i transient ($n = 20$ -21 from 4-3
734 mice). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (Student t-test). **B.** Left. Representative line scan
735 recordings of spontaneous Ca²⁺ waves in *Scn5a*^{+/+} and *Scn5a*^{+/ Δ QKP} cardiomyocytes ($n = 31$ and
736 23 from 4 and 3 mice, respectively). Right. Distribution of cardiomyocytes with or without
737 waves (top, Fisher exact test) and wave frequency (bottom, Mann-Whitney test), ** $P < 0.01$.
738 **C.** Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ load (SR load) in *Scn5a*^{+/+} and *Scn5a*^{+/ Δ QKP} cardiomyocytes
739 ($n = 14$ and 7 from 4 and 3 mice, respectively). ** $P < 0.01$ (Student t-test).

740

741 **Figure 6: Remodeling of cardiac Ca²⁺ handling proteins between the age of 2 and 4 weeks.**
742 Expression of (A) Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX1), (B) sarcoplasmic Ca²⁺ ATPase (SERCA2),
743 phospholamban (PLB), Thr17-phosphorylated PLB (pPLB-T17) and Ser16-phosphorylated
744 PLB (pPLB-S16), (C) ryanodine receptor (RyR2), Ser2808-phosphorylated RyR2 (pRyR2-
745 S2808), Ser2814-phosphorylated RyR2 (pRyR-S2814) and Ser2030-phosphorylated RyR2
746 (pRyR2-S2030), (D) Ca²⁺-calmodulin-dependent kinase II (CaMKII), Thr287-phosphorylated
747 CaMKII (p-CaMKII), and oxidized-CaMKII (oxCaMKII), and (E) calmodulin (CaM), in 2-
748 week and 4-week old *Scn5a*^{+/ Δ QKP} heart (n = 4-10). Protein expression is expressed as ratio to
749 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression and normalized to its
750 respective *Scn5a*^{+/+} ratio (n = 4-14). * *P* < 0.05 (Mann-Whitney test).

751

752 **Figure 7: Acute pharmacological treatment of *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice. A. Left. Representative**
753 **lead-I ECG at baseline and during propranolol treatment (IP, 0.3-1-3 mg/kg). Scale bar, 500**
754 **ms. Right. Incidence of premature ventricular beats and/or ventricular tachycardia (PVB/VT)**
755 **in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice (n = 9) at baseline and during propranolol treatment. B. Left.**
756 **Representative lead-I ECG at baseline and during ranolazine treatment (IP, 30 mg/kg). Scale**
757 **bar, 500 ms. Right. Incidence of PVB/VT in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice at baseline and during ranolazine**
758 **treatment (n = 14). * *P* < 0.05 (Fisher exact test). C. QTc interval and QRS complex duration**
759 **in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice (n = 14) at baseline and during ranolazine treatment. *** *P* < 0.001**
760 **(Wilcoxon test). D. Top. Representative examples of ventricular APs in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice at a**
761 **pacing cycle length of 200 ms before (Baseline) and after 10-min superfusion of ranolazine (10**
762 **μ mol/L). Bottom. APDs (as in 4C) in *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice before and after ranolazine exposure**
763 **(n = 4). * *P* < 0.05 (Wilcoxon test). E. Representative examples of ventricular EADs in**
764 ***Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice at a pacing cycle length of 200 ms before and after ranolazine exposure.**

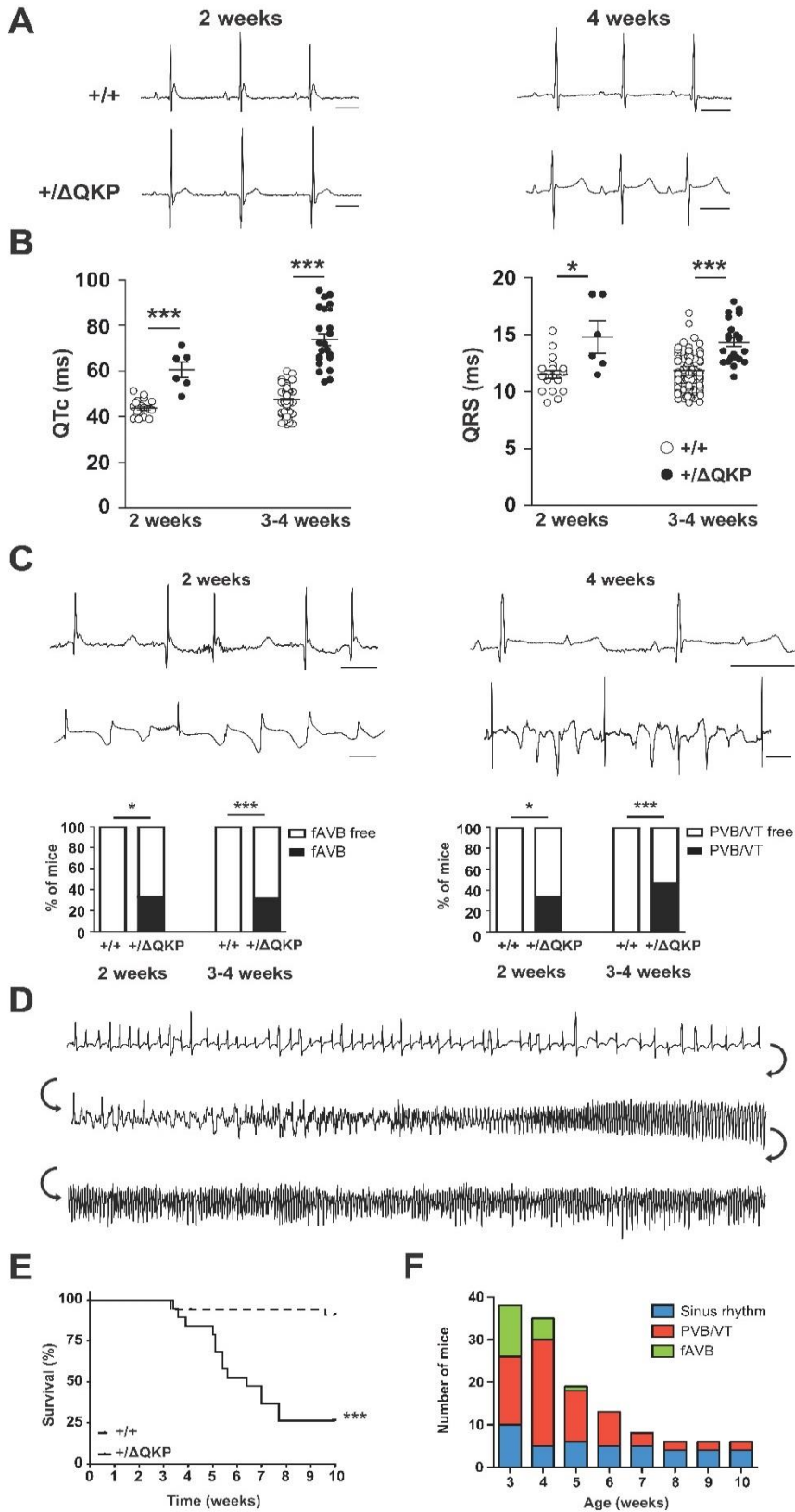


Figure 1

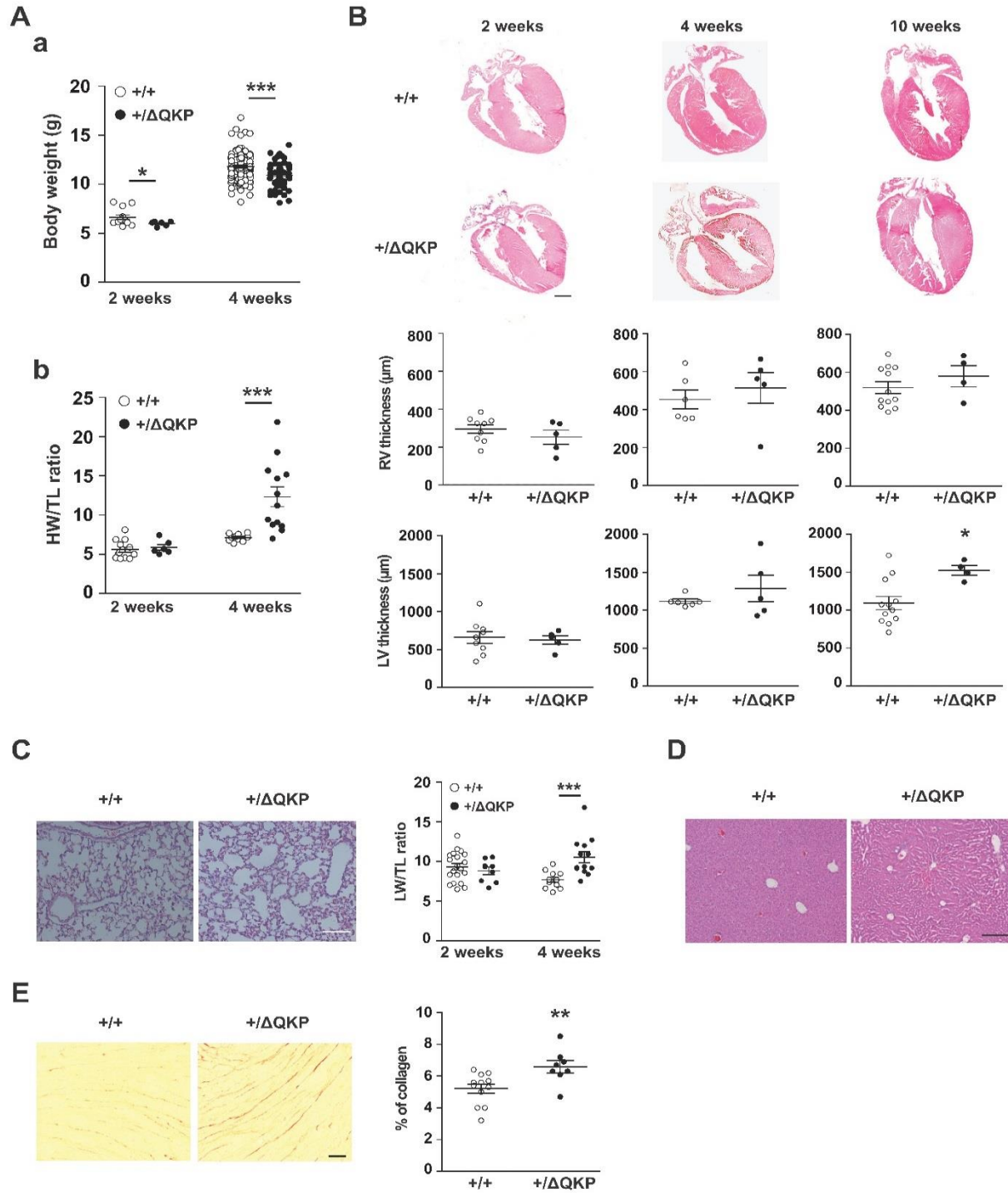


Figure 2

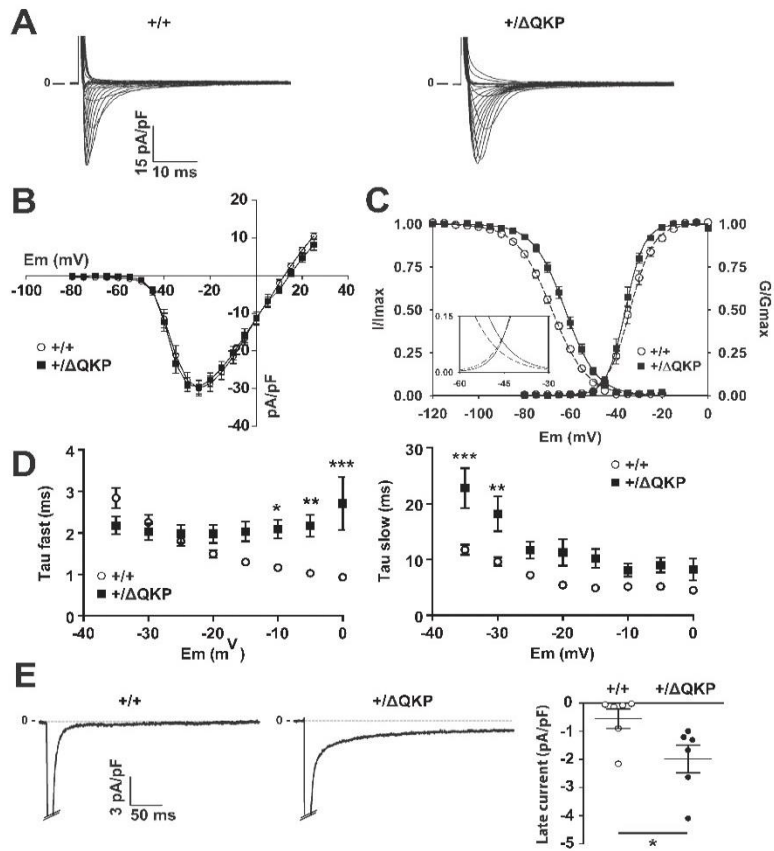


Figure 3

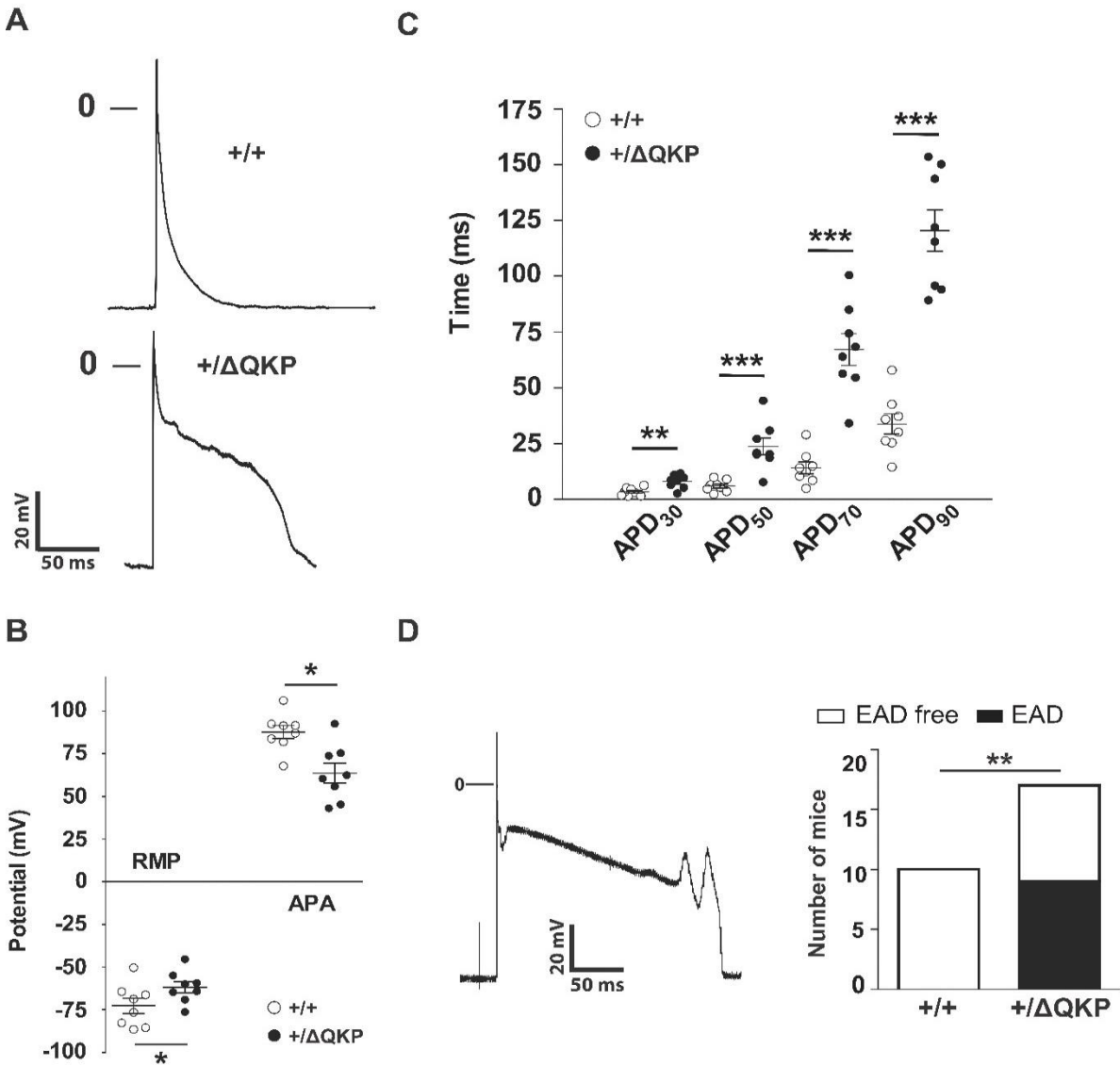


Figure 4

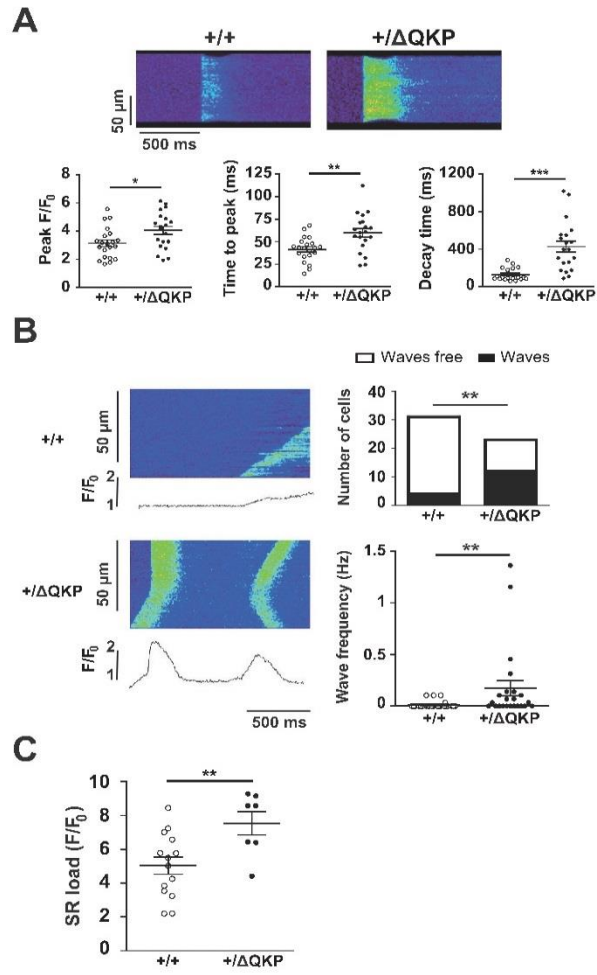


Figure 5

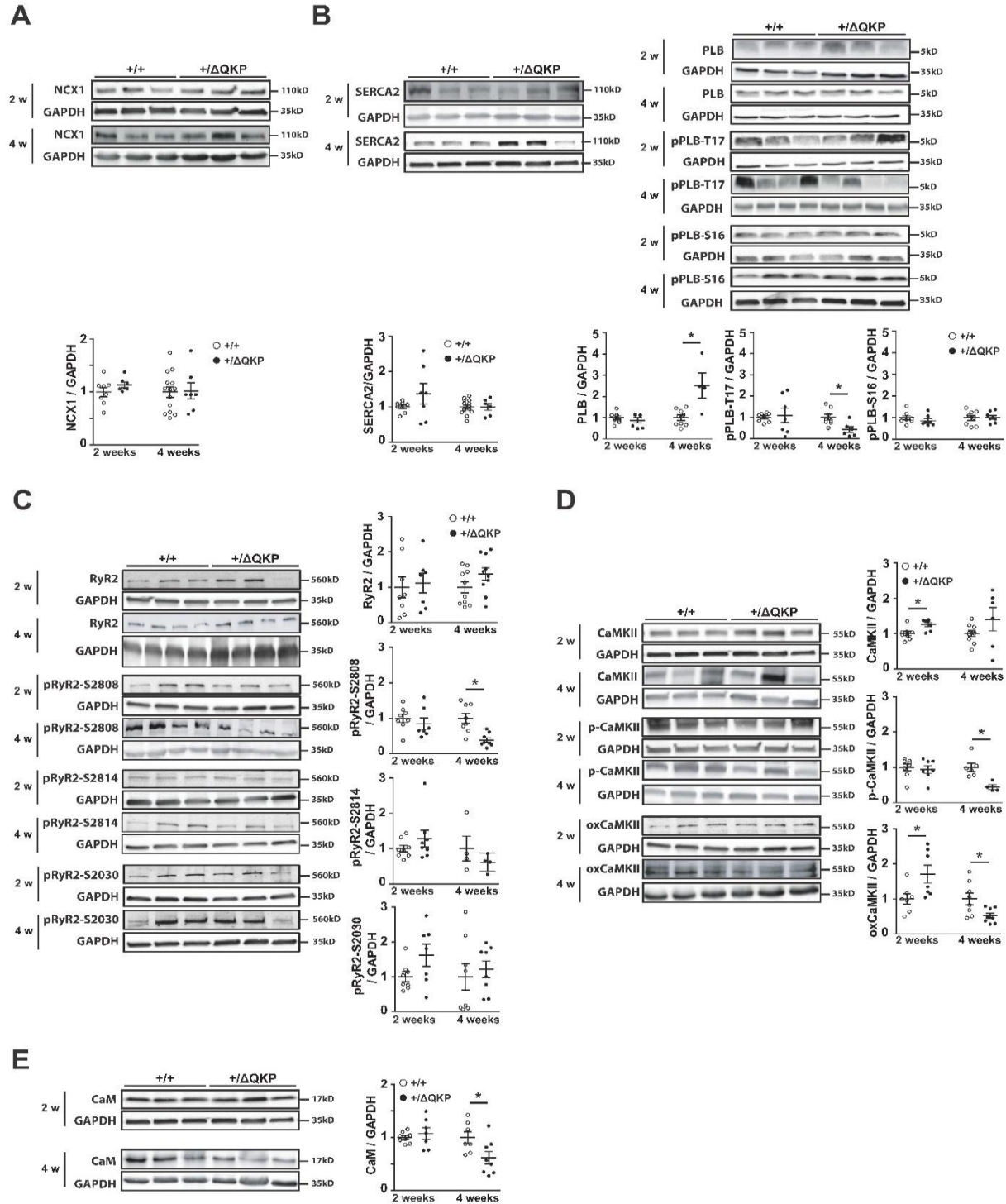


Figure 6

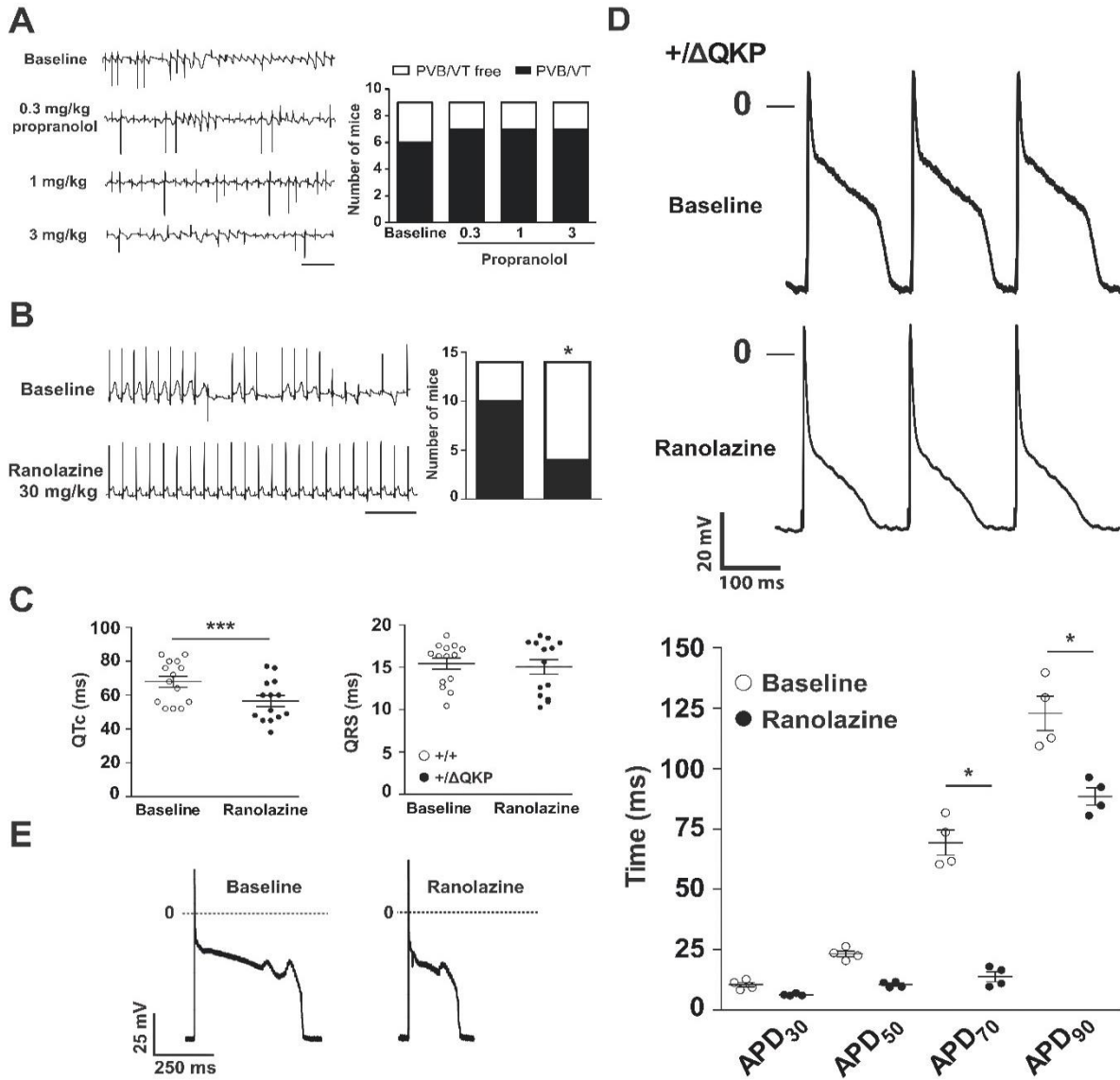


Figure 7

Online supplemental material

Supplemental methods

Generation of *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice.

We used Flp/FRT-mediated targeting to delete residues 1510–1512 (QKP) in exon 26 of the *Scn5a* gene (Supplemental Figure 1A). A *Scn5a* Δ QKP targeting vector was cloned based on a 129Sv-derived 10.6-kb BstBI/SpeI genomic subclone spanning exons 24–28. In exon 26, the nucleotides encoding QKP amino acids were deleted (CAG AAG CCC), and a silent BamHI site was introduced for screening and identification of the mutant allele. As an insertion site for the selection cassette (a neomycin resistance cassette flanked by FRT sites), a PstI restriction site 148 bp upstream of exon 26 was chosen. The neomycin cassette was inserted in counter-orientation, because of a cryptic splice site that causes mis-splicing, and consequently, a partial gene deletion or a hypomorph in the allele carrying the neo gene. 129Sv-derived embryonic stem cells harboring the deletion were injected into C57Bl/6 blastocysts. Four male chimeras were born and bred with Flp deleter mice. Agouti offspring with deleted neomycin cassette (expressing the deletion) showed a high mortality at 5-7 weeks of age, whereas offspring carrying the *Scn5a* Δ QKP allele as well as the neomycin cassette were healthy. All genotypes appeared in Mendelian rates, and the full coincidence of mortality and genotype was highly suggestive of a high linkage of morbidity with the *Scn5a* Δ QKP allele (mortality at 31-60 days in 15/15 *Scn5a* Δ QKP F1 mice; no premature mortality in 20 *Scn5a*^{+/ Δ QKP-neo} mice, and no premature mortality in 35 wild type offspring; another 8 wild type F1 offspring were eliminated upon weaning and screening). Therefore, all mice used in the present study resulted from mating between *Scn5a*^{+/ Δ QKP-neo} and *Flp*-deleter mice. Mice were bred from a mixed 129Sv X C57Bl/6 background toward a C57Bl/6J background (F2 to F10 generations; most experiments performed on F4-F5 generations). Genotyping was done using the 5' GCAGCCTGAAGAGCCCTTAATG 3' (E102.8) and 5' AAGGGAGAGGCTCAGGTGAAC-3' (E102.9) primers to identify *Scn5a*^{+/+} and *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice, and

25 5' GCAGCCTGAAGAGCCCTTAATG 3' and 5' GAAGGGGCCACCAAAGAACG 3' (P-#127) primers to
26 identify *Scn5a*^{+/ Δ QKP-neo} mice (Supplemental Figure 1B).

27
28 **Electrocardiography.**
29 Mice were anaesthetized with isoflurane (Abbott Laboratories, USA) for ECG recording. Anesthetic
30 induction was achieved at 2% to 2.5% isoflurane for 2.5 to 3 min, and anesthesia was maintained at 0.8%
31 to 1.0%. Body temperature was maintained at 37°C with a heating pad (Harvard Apparatus, USA). Six-lead
32 ECG was recorded with 25-gauge subcutaneous electrodes on a computer through an analog-digital
33 converter (IOX 1.585, EMKA Technologies, France) for monitoring and off-line analysis (ECG Auto
34 v3.2.0.2, EMKA Technologies). ECGs were analyzed as previously described.¹ QT intervals were corrected
35 for heart rate using Bazett formula modified specifically for mice, $QTc = QT/(RR/100)^{1/2}$, with QT and RR
36 measured in ms.

37
38 **Morphological and histological analysis.**
39 Mice were euthanized by cervical dislocation and lungs, liver and heart were isolated. Lung weight/tibia
40 length and heart weight/tibia length ratios were determined. Then, the heart, lungs and liver were washed
41 with PBS, fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Serial sections of 5 μ m were stained
42 with haematoxylin/eosin or picosirius red as previously described.² Sections were examined with a classic
43 light microscope (Nikon Eclipse E-600) and pictures acquired with NIS-Elements software (v4.10, Nikon,
44 Japan). Right and left ventricular transversal free-wall thicknesses were quantified by averaging three
45 measurements for each heart: one close to the apex, one in the middle and one close to the base.

46
47 **Patch-clamp experiments.**

48 *Isolation of cardiomyocytes.* Four-week-old mice were heparinized (600 IU/kg i.p.) and killed by cervical
49 dislocation. The heart was quickly excised and the aorta was cannulated in cold Ca^{2+} -free Tyrode solution
50 containing (in mmol/L): NaCl, 135; KCl, 4; NaH_2PO_4 , 1.2; MgCl_2 , 1.2; glucose, 11; HEPES, 10 (pH 7.4
51 with NaOH), and perfused for 2 minutes in a Langendorff system (37°C) with the same solution. Then, the
52 heart was perfused with a low-calcium solution (0.1 mmol/L) containing 0.15 mg/mL collagenase II
53 (350 U/mg, Worthington) and 0.03 mg/mL protease XIV (4.7 U/mg, Sigma) for 7-10 minutes. Stop solution
54 (Tyrode solution with 0.15 mmol/L CaCl_2) was used for 2 minutes and the digested heart was gently chopped
55 and triturated in the same solution. Isolated cells were washed in this solution and calcium concentration
56 was progressively increased up to 1 mmol/L after 30 min and kept in this solution at room temperature
57 before use. Quiescent, rod-shaped cells with clear cross-striations and smooth surface were selected for
58 current measurements.

59 *Electrophysiological recording.* Whole-cell patch-clamp technique was used to record sodium current. The
60 cells were locally superfused during I_{Na} recordings with solution contained (in mmol/L) NaCl, 14 or 140;
61 CsCl, 109 or 5; CoCl_2 , 2.5; CaCl_2 , 1; MgCl_2 , 2; TEA-Cl, 25; glucose, 5; HEPES, 10 and mannitol, 20;
62 (pH 7.4 with CsOH). The pipette solution was filled with (in mmol/L): CsCl, 50; CaCl_2 , 1; Na-pyruvate, 5;
63 MgCl_2 , 3; Na_2ATP , 2.5; gluconic acid, 70; EGTA, 10; HEPES, 10; (pH 7.2 with CsOH). pClamp software
64 (Axon Instruments, Union City, CA, USA) and a VE-2 (Alembic Instruments, Montreal, QC, Canada) were
65 used for recordings. Series resistance was compensated.

66 Data were analyzed using pClamp (Axon Instruments) and Prism5 (GraphPad Software, Inc.). Activation,
67 inactivation, recovery from inactivation and slow inactivation parameters were determined at room
68 temperature (20-22°C) using conventional voltage-clamp protocols, from a holding potential of -120 mV
69 and in the presence of 14 mM external Na^+ . All current measurements were normalized using the cell
70 capacitance. To quantify the voltage dependence of steady-state activation, data from individual cells were
71 fitted with the Boltzmann function. For steady-state inactivation, a modified Boltzmann function was used:

72

$$I = \frac{I_{\max} - I_{\text{late}}}{\left(1 + e^{-\frac{E_{pp} - V_{\frac{1}{2}inact}}{K}}\right)} + I_{\text{late}}$$

73 where $I_{\max} - I_{\text{late}}$ is the inactivating component and I_{late} , the non-inactivating component of the Na^+ current
74 during the test-pulse.

75 Data for the recovery from inactivation was fitted by a 2-exponential function. Persistent sodium current
76 was measured in the presence of 140 mM external Na^+ as the 30 $\mu\text{mol/L}$ tetrodotoxin-sensitive current at
77 the end of a 350-ms step at -20 mV.

78

79 **Action potential recordings.**

80 For these experiments, mice of either sex were used at the age of 4 weeks. After euthanasia by cervical
81 dislocation, the heart was quickly removed and immersed in a cold modified Tyrode solution containing (in
82 mmol/L): NaCl, 108; NaH_2PO_4 , 1.8; NaHCO_3 , 25; KCl, 27; MgCl_2 , 1; CaCl_2 , 0.6; glucose, 55 (pH 7.4 with
83 5% CO_2). After careful dissection, left atrial or right ventricular free wall was mounted in a tissue bath
84 chamber, the endocardial surface facing up, and superfused with a modified Tyrode solution, bubbled with
85 95% O_2 -5% CO_2 gas mixture, warmed to $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ and containing (in mmol/L): NaCl, 120; NaHCO_3 , 27;
86 NaH_2PO_4 , 1.2; KCl, 5.4; MgCl_2 , 1.2; CaCl_2 , 1.8; glucose, 10 (pH 7.4 with 5% CO_2). The flow rate in the
87 tissue chamber was 12 ml/min. Preparations were paced with 2-ms square wave pulses with amplitude of
88 twice diastolic threshold through bipolar Teflon-coated silver electrodes. Action potentials (AP) were
89 recorded with borosilicate glass microelectrodes (resistances 15–25 $\text{M}\Omega$ when filled with 3 mol/L KCl)
90 coupled to a VF102 amplifier (BioLogic, France), digitized with an EMKA-converter, and displayed with
91 iox 1.8.0.18 software (10 kHz sampling, EMKA Technologies). APs were recorded at a pacing cycle length
92 of 200 ms. AP characteristics were measured at steady state. We measured the resting potential (RP), the
93 AP amplitude (APA), the maximum upstroke velocity of phase 0 of the AP (dV/dt_{\max}) and the AP duration
94 at 30% (APD_{30}), 50% (APD_{50}), 70% (APD_{70}) and 90% (APD_{90}) of full repolarization. This protocol was

95 performed under baseline conditions and after 10 min of superfusion with ranolazine (Tocris Bioscience,
96 UK) at a concentration of 10 $\mu\text{mol/L}$. This concentration was chosen on the basis of comparative
97 pharmacological data published in mammalian heterologous expression system² and on *Scn5a*^{+/ Δ KPQ} mice.⁴

98

99 **Calcium imaging.**

100 *Isolation of cardiomyocytes.* Four-week-old mice were anesthetized with intraperitoneal pentobarbital
101 injection (150 mg/kg). The hearts were quickly excised and the aorta were cannulated in cold solution
102 containing (in mmol/L): NaCl, 113; KCl, 4.7; MgSO₄, 1.2; KH₂PO₄, 0.6; NaH₂PO₄, 0.6; NaHCO₃, 1.6;
103 glucose, 20; HEPES, 10; taurine, 30 (pH 7.4 with NaOH), and perfused for 4 minutes in a Langendorff
104 system (37°C) with the same solution. Then, the heart was perfused with a low-calcium solution (0.1
105 mmol/L) containing Liberase (26 U/ml; TM Research Grade, Roche) for 7-10 minutes. Digested heart was
106 gently triturated in stop solution (solution with 0.2 mmol/L CaCl₂ and BSA 0.5 mg/ml). Isolated cells were
107 washed and calcium concentration was progressively increased to 1 mmol/L. Quiescent, rod-shaped cells
108 with clear cross-striations and smooth surface were selected for current measurements. Only rod-shaped
109 cells, quiescent when unstimulated and excitable were used for the experiments.

110 *Imaging.* [Ca²⁺]_i transients and Ca²⁺ sparks were recorded in intact myocytes loaded for 30 minutes with
111 fluorescent Ca²⁺ dye (Fluo-3 AM, 5 $\mu\text{mol/L}$) by dissolving Fluo-3 AM (50 μg) in 100 μl of DMSO-Pluronic
112 F-127 mixture (4:1 weight),⁵ and in control perfusion solution (in mmol/L): NaCl, 140; KCl, 4; CaCl₂, 1.8;
113 MgCl₂, 1.1; HEPES, 10; glucose, 10 (pH 7.4, with NaOH). To record [Ca²⁺]_i transients, cells were excited
114 at 0.5 Hz by field stimulation using two parallel platinum electrodes. Spontaneous Ca²⁺ sparks were obtained
115 in quiescent cells after [Ca²⁺]_i transients recordings. SR Ca²⁺ load was estimated by rapid caffeine (10
116 mmol/L) application, after 1 min of stimulation to reach the steady state. Images were obtained with
117 confocal microscopy (Leica TCS SP8, objective w.i. 63x, n.a. 1.2) by scanning the cell with a white laser.
118 Fluorescence was excited at 505 nm and emissions were collected at >510 nm. The line scan was selected

119 parallel to the longitudinal cell axis. Image analyses were performed by homemade routines using IDL
120 software (Research System Inc.). Images were corrected for background fluorescence. The fluorescence
121 values (F) were normalized by the basal fluorescence (F_0) in order to obtain the fluorescence ratio (F/F_0).
122 Ca^{2+} sparks were detected using an automated detection system,⁶ and as an amplitude of fluorescence
123 fourfold the standard deviation of the image. This criterion limited the detection of false events while
124 detecting most Ca^{2+} sparks. Rising time was measured as the time between maximum and minimum values
125 of the second derivative of the fluorescence transient corresponding to the Ca^{2+} spark.

126

127 **Western blot analysis.**

128 Protein samples were prepared from left ventricular free walls. Tissues were snap-frozen in liquid nitrogen,
129 homogenized in ice-cold lysis buffer containing (in mmol/L): NaCl, 100, Tris-HCl, 50, EGTA, 2, Na_3VO_4 ,
130 2, 1% NP40 and protease inhibitors (pH 7.5 with NaOH) and centrifuged at 14000 x g for 15 minutes. Forty
131 micrograms of proteins were separated on SDS-PAGE gels (4-15% Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™
132 Precast Gels, Bio-Rad, France) and transferred on nitrocellulose membranes (Trans-Blot® Turbo™
133 Nitrocellulose Transfer Packs, Bio-Rad, France). Membranes were blocked and incubated with primary
134 antibodies targeted against Nav1.5 (D9J7S, Cell Signaling technology; 1:1000), SERCA2 (PA5-29380
135 Thermo Scientific; 1:2000), Na^+/Ca^{2+} exchanger NCX1 (Santa Cruz Biotechnology; 1:1000), CaMKII
136 (PA5-22168 Thermo Scientific; 1:1000), p-CaMKII (MA1-047 Thermo Scientific; 1:2000), ox-CaMKII
137 (GTX36254 GeneTex; 1:1000), phospholamban (PLB; Santa Cruz Biotechnology; 1:1000), pPLB-T17
138 (Santa Cruz Biotechnology; 1:5000), pPLB-S16 (Santa Cruz Biotechnology; 1:1000), type 2 ryanodine
139 receptor (RyR2; MA3-925 Thermo Scientific; 1:2000), pRyR2-S2808 (A010-30 Badrilla; 1:4000), pRyR2-
140 S2814 (A010-31 Badrilla; 1:4000), pRyR2-S2030 (A010-32 Badrilla; 1:4000), N-cadherin (4061, Cell
141 Signaling technology; 1:1000) and calmodulin (CaM; 05-173 EMD Millipore; 1:1000). In addition, an anti-
142 GAPDH antibody (Santa-Cruz Biotechnologies; 1:10000 dilution) was used as an external/internal control.

143 Next, membranes were incubated with the *ad hoc* secondary horseradish peroxidase (HRP) antibody (Santa
144 Cruz; 1:10000). Incubation was followed by detection using chemiluminescence (ECL™ Prime Western
145 Blotting Detection Reagent, GE Healthcare Amersham™, UK). Western-blot quantification was performed
146 with Image Lab™ 5.2.1 software (Bio-Rad Software).

147

148

149 **Acute pharmacological treatments.**

150 For these experiments, *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice were used at the age of 3 weeks. Baseline ECG was recorded for
151 2 min before intraperitoneal (IP) injection of ranolazine (30 mg/kg)⁷ or propranolol (0.3-1-3 mg/kg) and
152 measurements were acquired for 10 min post-drug administration. Maximum effect on ECG parameters was
153 measured and compared to ECG parameters before drug administration.

154

155 **Immunohistochemistry.**

156 Six μ m-width heart cryosections and isolated cardiomyocytes were immunostained for α -actinin 2 using
157 monoclonal antibody (clone EA-53, Sigma Aldrich) and Alexa Fluor 488 goat anti-mouse antibody IgG
158 (Invitrogen). To realize cryosections, the hearts were removed, immediately snap-frozen in isopentane and
159 conserved at -80°C until sections were included in Tissue-Tek OCT compound (Sakura) and cut. Heart
160 sections were fixed in cold acetone for 10 minutes while isolated cells were fixed in 4% paraformaldehyde.
161 The samples were put on slides, and then blocked and permeabilized in a solution containing 1% BSA, 0.5%
162 X100 Triton and 10% normal goat serum for 30 minutes at room temperature. The slides were incubated
163 with primary antibody (1/200) for 2 hours, washed three times with PBS and then incubated with secondary
164 antibody (1/200) for 45 minutes at room temperature. After three 5-minute washes, slides were mounted
165 using ProLong Gold Antifade mountant with DAPI (Thermo Fischer Scientific) to counter-stain nuclei.

166 To visualize t-tubules network, freshly isolated cardiomyocytes were put on 8-well Ibidi microslides,
167 incubated with 10 μ M Di-8 ANEPPS (Invitrogen) in the dark at room temperature, and washed three times
168 before observation.

169 The samples were imaged with a Nikon A1 confocal microscope (objective o.i. 60x, N.A. 1.4, Nikon,
170 France) and captured with NIS-Elements software.

171 Directional analysis of α -actinin 2 and t-tubules staining were performed with ImageJ, as described by
172 Wagner *et al.*⁸ Percentage of α -actinin 2 or t-tubules oriented between -45° and 135° were quantified by
173 using cell longitudinal axis as reference. Transversal/longitudinal ratios were measured by considering as
174 transversal or longitudinal the staining oriented between 80° and 100° and -10° and 10° respectively.

175

176 **Echocardiography**

177 Two-dimensional echocardiography was performed on mice using a Vivid 7 Dimension ultrasonography
178 (GE Healthcare) with a 14-MHz transducer. Mice were anaesthetized with isoflurane (Abbott Laboratories,
179 USA). Anesthetic induction was achieved at 5% isoflurane for 2.5 to 3 min, and anesthesia was maintained
180 at 2.5%. In order to observe a possible structural remodeling, left ventricular diameter and free wall
181 thickness, as well as septal thickness, were measured from long-axis images obtained by M-mode
182 echocardiography. Systolic function was further assessed by calculation of the ejection fraction.

183

184 **Mathematical modeling of mouse ventricular action potentials - Single-cell model**

185 We used the 2001 mouse model of Pandit and collaborators⁹. All the equations are found in the website,
186 only the model modifications are shown here. On the *Scn5a*^{+/+} model, G_{Na} was increased from 1.064 to 2 μ S
187 to obtain a dV/dt_{max} of around 100 V/sec. Stimulation was shortened from 5 ms to 1 ms and its amplitude
188 was increased from -0.6 to -3 nA to keep the same amount of injected charges. The model was run using
189 OpenCell. Maximum step size was 0.001 s. For the *Scn5a*^{+ Δ QKP} model, the late Na^+ current (when fast

190 inactivation is complete) represented 3% of the peak current¹⁰ and both fast and slow steady-state
 191 inactivation curves were shifted by 6 mV to the depolarized potential, as observed in figure 3:

192 Slow inactivation:

$$193 \quad h_{\infty} = \frac{1 - 0.03}{1 + e^{\left(\frac{V_m + 76.1 - 6}{6.07}\right)}} + 0.03$$

194 Fast inactivation:

$$195 \quad j_{\infty} = \frac{1}{1 + e^{\left(\frac{V_m + 76.1 - 6}{6.07}\right)}}$$

196 From figure 3 also, time constant of fast inactivation, τ_h is voltage independent between -35 and 0 mV and
 197 corresponds to the *Scn5a*^{+/+} value at -25 mV:

$$198 \quad \tau_h = 0.00210502 \text{ if } V_m > -40 \text{ mV, else } \tau_h \text{ equation as for } \textit{Scn5a}^{+/+}.$$

199 Time constant of slow inactivation, τ_j is twice as much in the *Scn5a*^{+/+} model if $V_m > -40$ mV:

$$200 \quad \tau_j = 2 \times (0.01163 \frac{(1 + e^{-0.1(V_m + 32)})}{e^{-2.535 \times 10^{-7} V_m}}), \text{ else } \tau_j \text{ equation as for } \textit{Scn5a}^{+/+}.$$

201 In addition, SERCA2 Ca²⁺ flux was reduced by 3 in order to correspond to the 3-time increase of the [Ca²⁺]_i
 202 transient decay time (see figure 5A), as following:

$$203 \quad J_{up} = \frac{1}{3} \times K_{SR} \frac{v_{maxf} f_b - v_{maxr} r_b}{1 + f_b + r_b}$$

204 See Pandit *et al.*¹¹, for variables and constants definitions.

205

206 Immunoprecipitations of Nav1.5 channel complexes

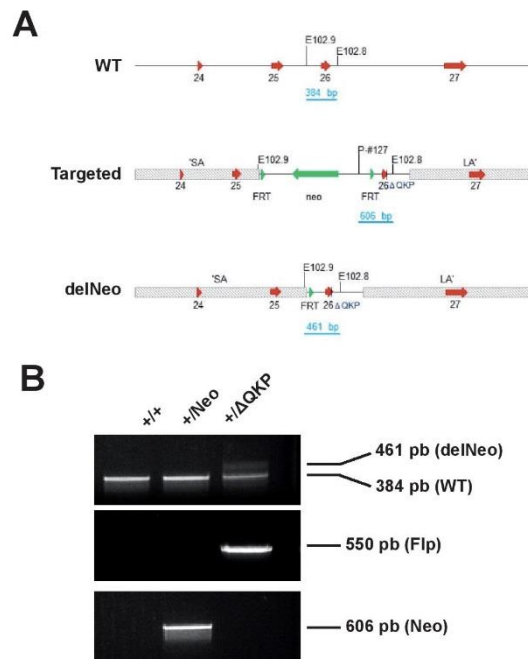
207 Flash-frozen left ventricles from *Scn5a*^{+/+} and *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice were homogenized in ice-cold lysis buffer
 208 containing (in mmol/L): NaCl, 100, Tris-HCl, 50, EGTA, 2, Na₃VO₄, 2, 1% NP40 and protease inhibitors
 209 (pH 7.5 with NaOH). Prior to the immunoprecipitation, 2 μ g of Nav1.5 antibodies (α Nav1.5, Cell

210 Signalling, D9J7S) were cross-linked to 25 μ l of protein G-magnetic beads. After a 20-minute rotation at
211 4°C, 2 mg of ventricular soluble protein fractions and antibody-coupled beads were mixed for 2 hours at
212 4°C. Magnetic beads were then collected and washed rapidly four times with ice-cold lysis buffer, and
213 isolated protein complexes were eluted from the beads in a mix containing NuPAGE sample reducing agent
214 and NuPAGE LDS sample buffer (1X) at 99°C for 10 minutes. Western blots were then realized as described
215 above on immunoprecipitated fractions and total lysates.

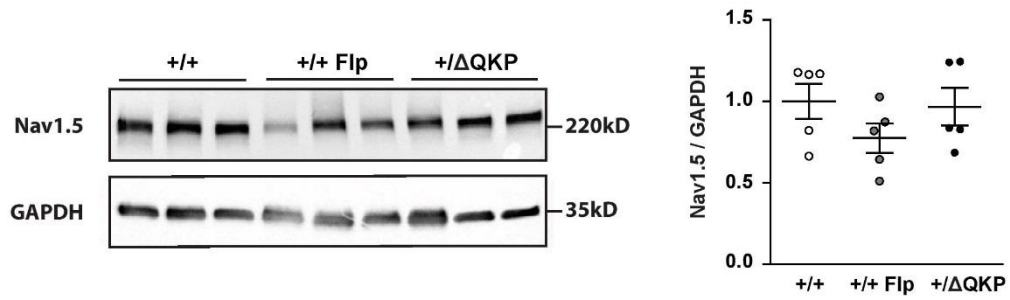
216 **Supplemental table 1: Effects of QKP deletion on sodium channel biophysical parameters.**

	cell capacitance	current density	activation		inactivation		recovery from inactivation		
	(pF)	late at –20 mV (pA/pF)	$V_{1/2}$ (mV)	K (mV)	$V_{1/2}$ (mV)	K (mV)	A_{fast} (%)	τ_{fast} (ms)	τ_{slow} (ms)
<i>Scn5a</i> ^{+/+}	136.4±7.9 (23)	–0.6±0.3 (6)	–33.9±1.0 (11)	4.6±0.1 (11)	–68.2±0.7 (18)	–7.5±0.3 (18)	83.7±1.4 (11)	3.3±0.4 (11)	43.4±8.4 (11)
<i>Scn5a</i> ^{+/ΔQKP}	238.3±13.5*** (13)	–2.0±0.5* (6)	–35.3±1.1 (9)	3.9±0.2** (9)	–62.3±1.0*** (9)	–6.7±0.2 (9)	77.0±2.9 (5)	3.0±0.2 (5)	30.3±2.2 (5)

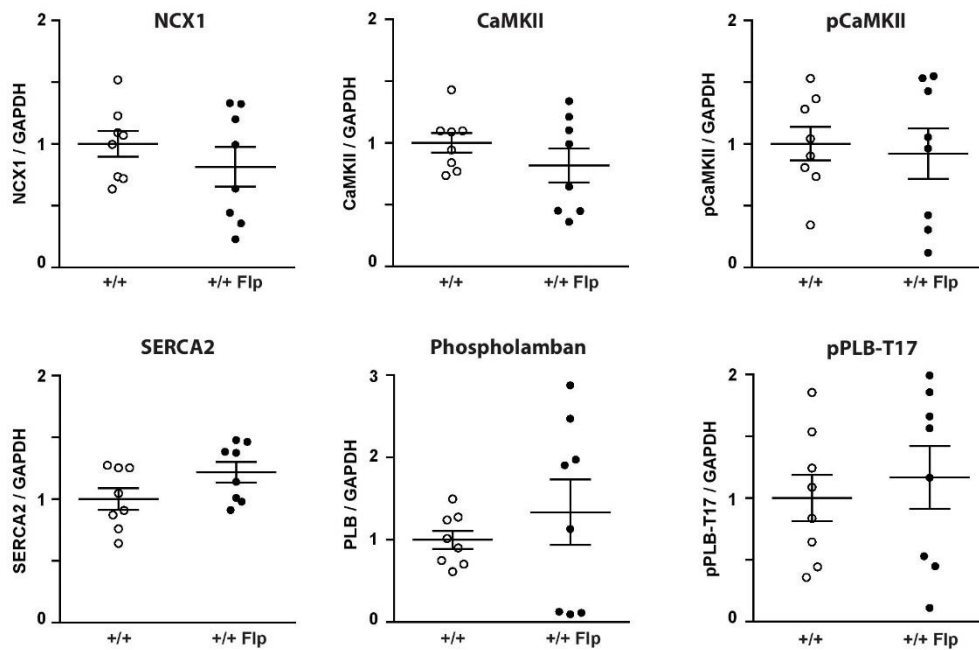
217 $V_{1/2}$ and K; voltage for half-activation or -inactivation of the Na⁺ current and slope of steady-state activation and inactivation curves, respectively;218 A_{fast} and τ_{fast} : coefficient and time constant, respectively, of the fast component of reactivation kinetics, τ_{slow} : time constant of the slow component.219 (n): number of cells; * P< 0.05; ** P< 0.01; *** P< 0.001 vs. *Scn5a*^{+/+} (Mann-Whitney test).



Supplemental figure 1: generation of *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice. **A.** Scheme of the different alleles of the *Scn5a* locus. For selection of homologously recombined ES cells, an FRT-flanked neomycin resistance cassette (green) was used. After Flp mediated recombination (delNeo, lower panel), the neomycin resistance cassette was excised, leaving a single FRT site upstream of exon 26. The primer binding sites used for genotyping are indicated in black, and the resulting PCR products in light blue bars. **B.** PCR screening of *Scn5a*^{+/+}, *Scn5a*^{+/ Δ QKP-neo} and *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mice.

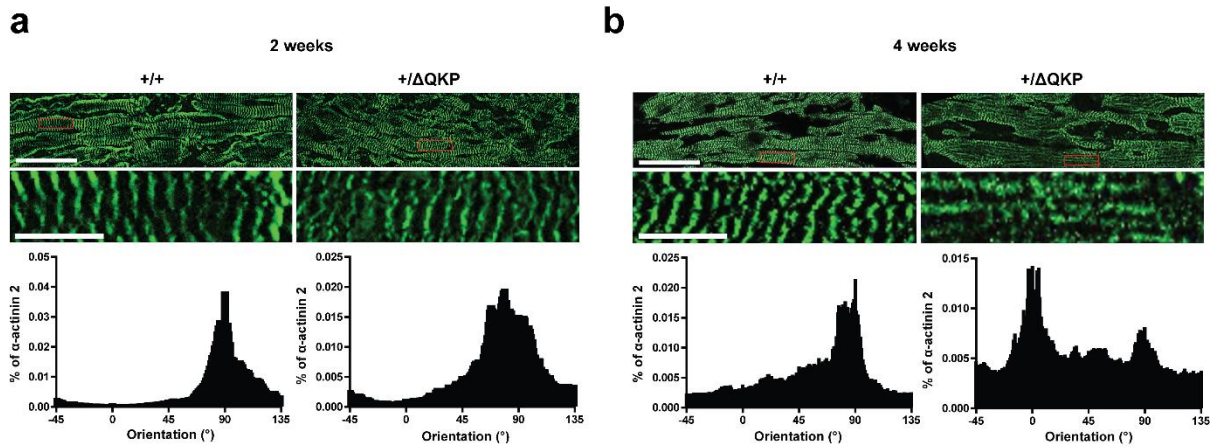


Supplemental figure 2: expression of cardiac Nav1.5. Nav1.5 expression in *Scn5a*^{+/+}, *Scn5a*^{+/+}-*Flp*, *Scn5a*^{+/ΔQKP-neo} and *Scn5a*^{+/ΔQKP} hearts. Protein level expressed as ratio to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression and normalized to the *Scn5a*^{+/+} ratio (n = 4-5 in each group). * $P < 0.05$ versus WT (Kruskal-Wallis test).

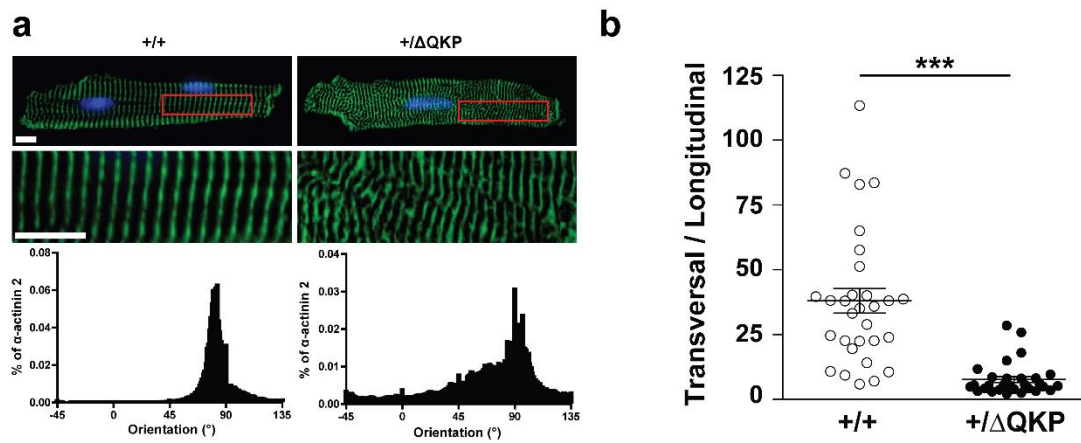


Supplemental figure 3: similar ventricle Ca²⁺ handling protein expression in *Scn5a*^{+/+} and *Scn5a*^{+/+}-*Flp* mice. Expression of Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX1), Ca²⁺-calmodulin-dependent kinase II (CaMKII), phosphoThr-287 CaMKII (pCaMKII), sarcoplasmic Ca²⁺ ATPase (SERCA2), phospholamban (PLB), and Thr17-phosphorylated PLB (pPLB-T17) in *Scn5a*^{+/+}-*Flp* heart. Protein expression is expressed as ratio to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression and normalized to its respective *Scn5a*^{+/+} ratio (n = 8 in each group).

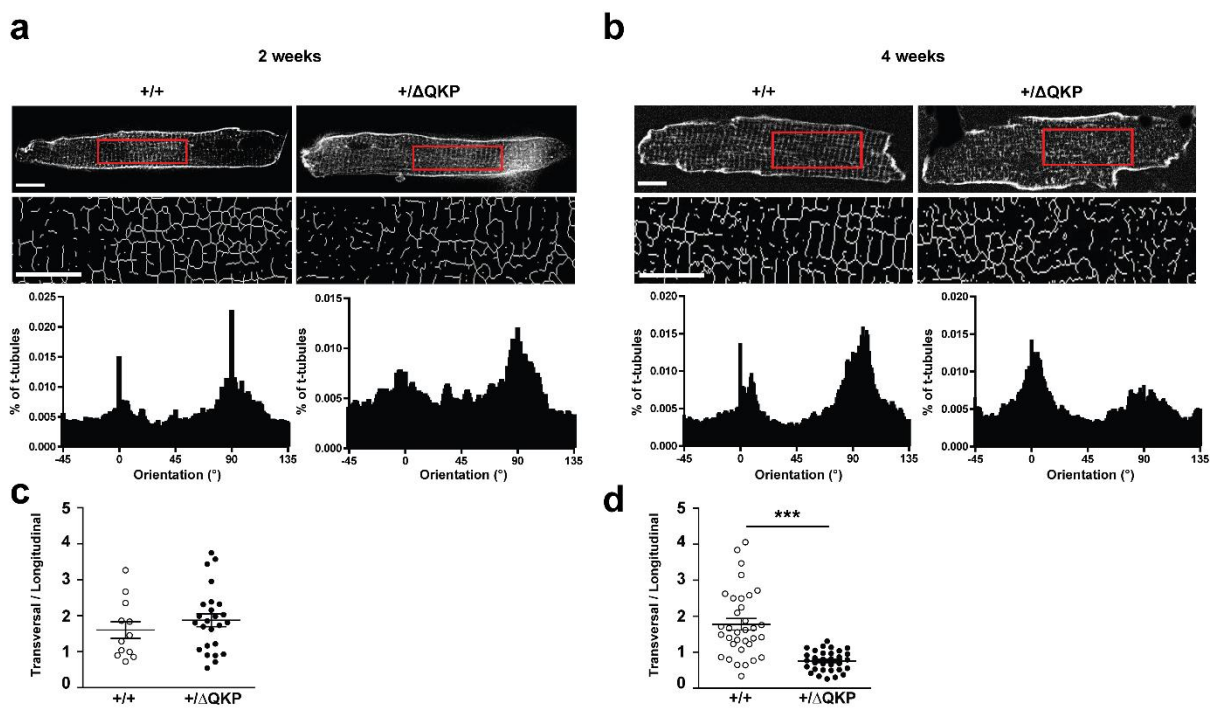
A



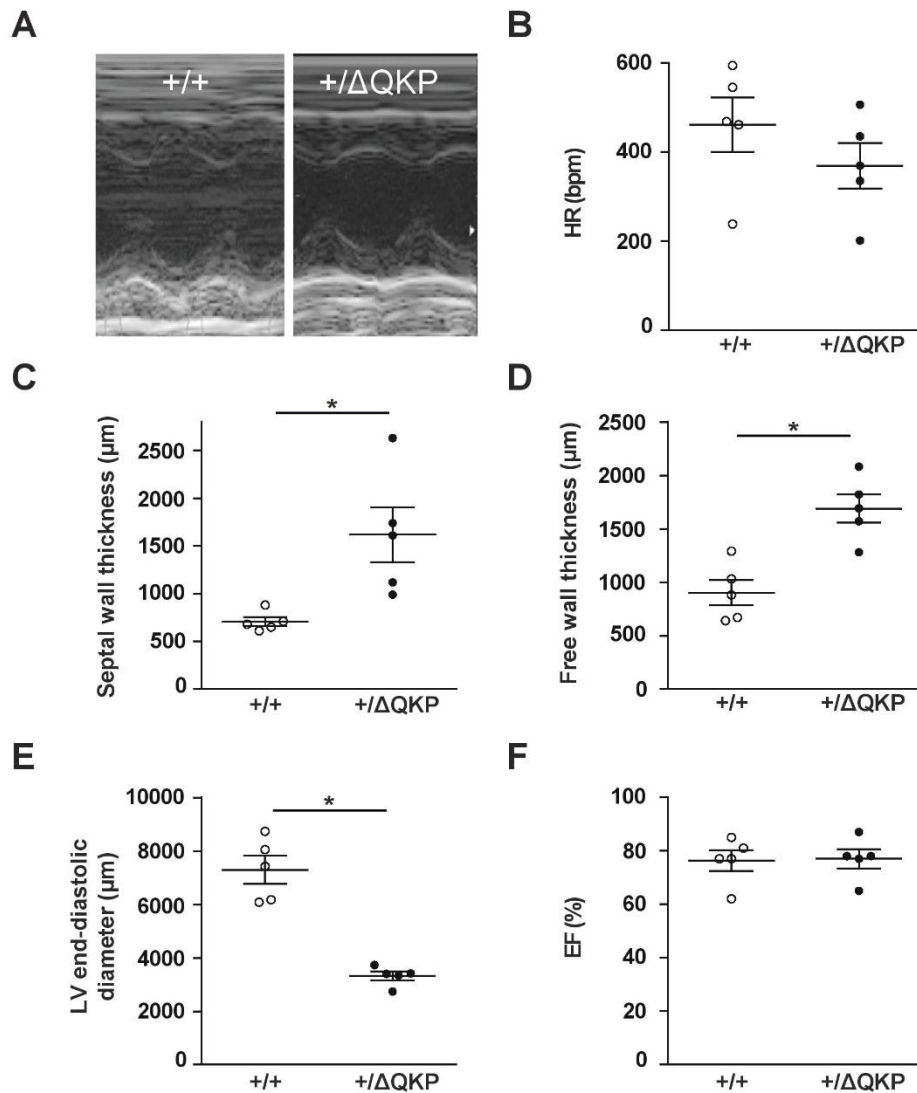
B



C

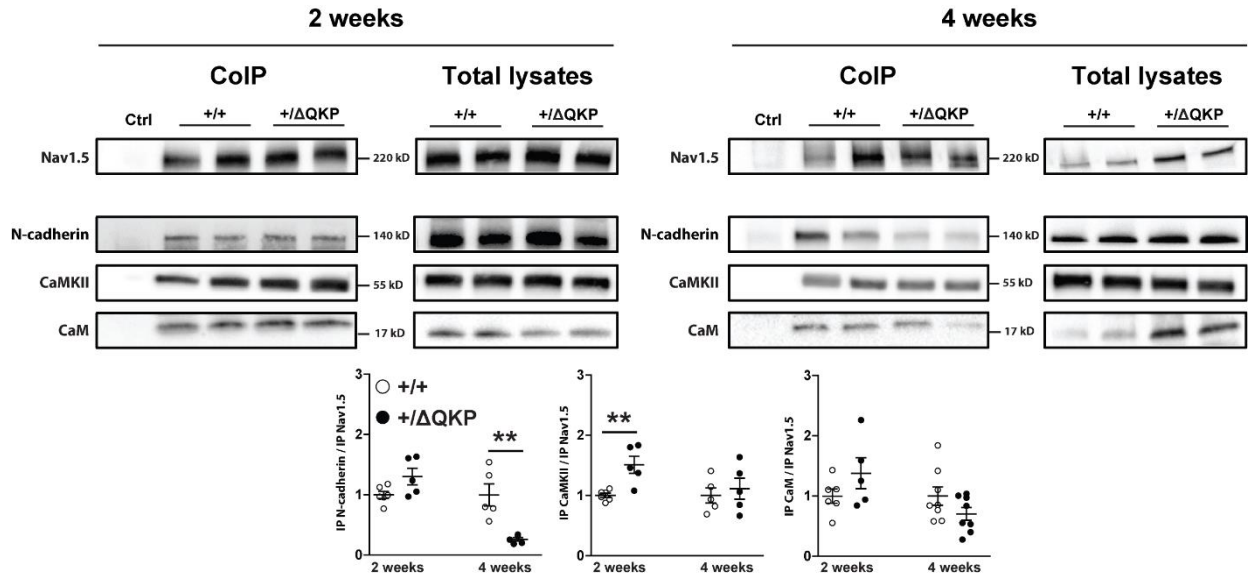


Supplemental figure 4: α -actinin 2 and t-tubule networks are disorganized in 4- but not 2-week-old $Scn5a^{+/\Delta QKP}$ mice. **A.** Top: Representative α -actinin 2 (green) immunostained histological sections from 2-week-old (**a**) and 4-week-old (**b**) $Scn5a^{+/+}$ (left) and $Scn5a^{+/\Delta QKP}$ mice (right). Scale bars = 75 μ m. Bottom: zoom of the red frames and corresponding graphs showing the percentages of α -actinin 2 oriented between -45° and 135° compared to longitudinal cell axis. Scale bars = 10 μ m. **B. (a)** Top: Representative α -actinin 2 immunostained cardiomyocytes isolated from 4-week-old $Scn5a^{+/+}$ (left) and $Scn5a^{+/\Delta QKP}$ mice (right). Nuclei are stained in blue. Bottom: zoom of the red frames and corresponding graphs showing the percentages of α -actinin 2 oriented between -45° and 135° compared to longitudinal cell axis. Scale bars, 10 μ m. **(b)** Transversal / longitudinal ratio of α -actinin 2 fibers compared to longitudinal cell axis measured on 30 cardiomyocytes from 3 different mice in each group. *** $P < 0.001$ (Student t-test). **C.** Top: representative di-8-ANEPPS-stained cardiomyocytes isolated from 2-week-old (**a**) and 4-week-old (**b**) $Scn5a^{+/+}$ (left) and $Scn5a^{+/\Delta QKP}$ mice (right). Scale bars, 10 μ m. Bottom: zoom of the red frames and graphs showing the percentages of t-tubules oriented between -45° and 135° compared to longitudinal cell axis. Scale bars, 7.5 μ m. Transversal / longitudinal ratio of t-tubules compared to longitudinal cell axis measured on 25-38 cardiomyocytes from 2-week-old (**c**) and 4-week-old (**d**) mice (3 mice per group). *** $P < 0.001$ (Student t-test).

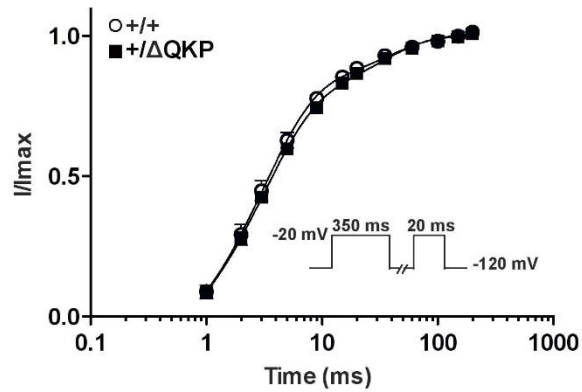


Supplemental figure 5: signs of left ventricular hypertrophy in *Scn5a*^{+ΔQKP} mice. (A)

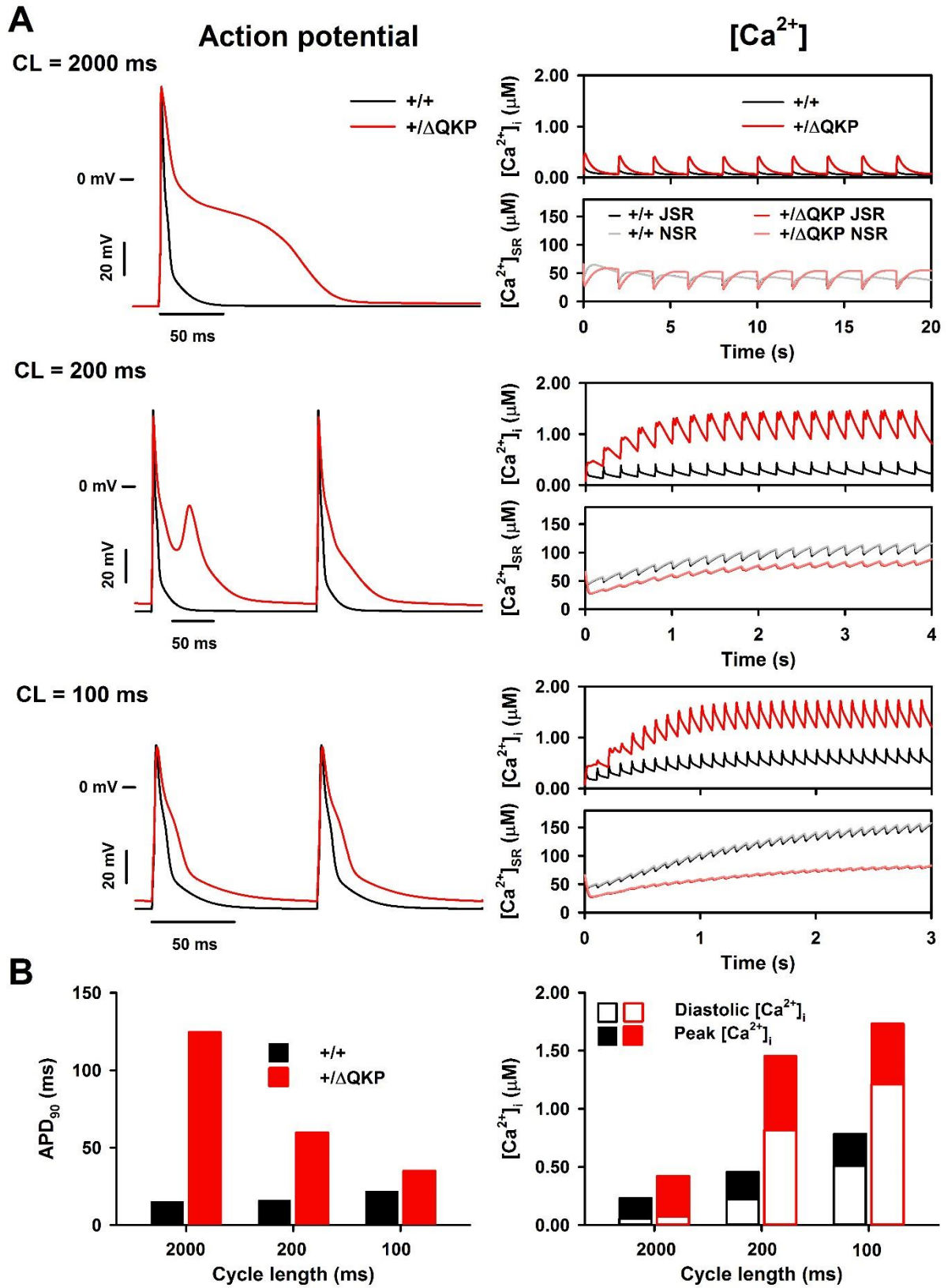
Representative 2-D echocardiography images of the left ventricle of 4-week old *Scn5a*^{+/+} and *Scn5a*^{+ΔQKP} mice in sinus rhythm. Heart rate (HR) (B), structural remodeling (C, D and E) and systolic function (F) were assessed (n = 5 in each group). * P < 0.05 (Mann-Whitney test).



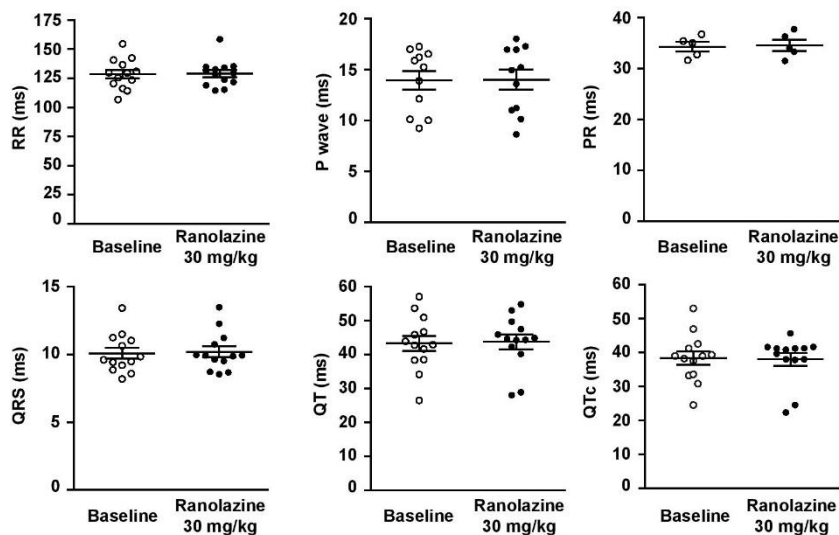
Supplemental figure 6: Changes in interactions of Nav1.5 and various components of the Nav1.5 macromolecular complex in *Scn5a*^{+/ΔQKP} mice. Representative Nav1.5, N-cadherin, Ca²⁺-calmodulin-dependent kinase II (CaMKII) and calmodulin (CaM) western blots of immunoprecipitated proteins and total lysates from left ventricles of 2-week (left) and 4-week (right) old *Scn5a*^{+/+} and *Scn5a*^{+/ΔQKP} mice (n = 5–8) probed with anti-Nav1.5 rabbit monoclonal antibody. Protein abundance is expressed as the ratio of precipitated protein signal to precipitated Nav1.5, normalized to the mean ratio in the *Scn5a*^{+/+} condition. ** P < 0.01 (Mann-Whitney test).



Supplemental figure 7: recovery from inactivation of cardiac Na⁺ current. Fractional recovery from inactivation in *Scn5a*^{+/+}, and *Scn5a*^{+/ΔQKP} cardiomyocytes (n = 11 from 6 mice and 5 from 3 mice, respectively) measured using a twin protocol (inset, 0.2 Hz). The data are the mean fractional current measured during the 2nd depolarization pulse following a repolarization to -120 mV for various durations after the 1st depolarization pulse.



Supplemental figure 8: *in silico* model of $Scn5a^{+\Delta QKP}$ predicts an increase of both APD₉₀ and $[Ca^{2+}]_i$ compared to wildtype condition at cycle lengths of 2000, 200 and 100 ms. A. Left panels: simulated action potentials of $Scn5a^{+/+}$ and $Scn5a^{+\Delta QKP}$ ventricular cardiomyocytes at steady-state at cycle lengths of 2000 ms (top), 200 ms (middle) or 100 ms (bottom). **Right panels:** respective cytoplasmic ($[Ca^{2+}]_i$; top) and junctional, (JSR), and non-junctional (NSR) sarcoplasmic reticulum $[Ca^{2+}]$, ($[Ca^{2+}]_{SR}$; bottom) until steady-state. Initial values of the models correspond to the CellML default values. **B.** Simulated values of APD₉₀ (left panel) and of diastolic and peak $[Ca^{2+}]_i$ (right panel) in $Scn5a^{+/+}$ and $Scn5a^{+\Delta QKP}$ cardiomyocytes at cycle lengths of 2000, 200 and 100 ms at steady-state.



Supplemental figure 9: ranolazine has no cardiac effect in $Scn5a^{+/+}$ mice. ECG parameters in $Scn5a^{+/+}$ mice at baseline and 10 min after ranolazine injection (IP, 30 mg/kg, n = 5-13).

References

- 1 Royer A, van Veen TAB, Le Bouter S, Marionneau C, Griol-Charhbili V, Leoni A-L, Steenman M, van Rijen HVM, Demolombe S, Goddard CA, Richer C, Escoubet B, Jarry-Guichard T, Colledge WH, Gros D, de Bakker JMT, Grace AA, Escande D, Charpentier F. Mouse model of SCN5A-linked hereditary Lenègre's disease: age-related conduction slowing and myocardial fibrosis. *Circulation*. 2005;**111**:1738–1746.
- 2 Derangeon M, Montnach J, Cerpa CO, Jagu B, Patin J, Toumaniantz G, Girardeau A, Huang CLH, Colledge WH, Grace AA, Baró I, Charpentier F. Transforming growth factor β receptor inhibition prevents ventricular fibrosis in a mouse model of progressive cardiac conduction disease. *Cardiovasc Res*. 2017;**113**:464-474.
- 3 Rajamani S, El-Bizri N, Shryock JC, Makielski JC, Belardinelli L. Use-dependent block of cardiac late Na^+ current by ranolazine. *Heart Rhythm*. 2009;**6**:1625–1631.
- 4 Fredj S, Sampson KJ, Liu H, Kass RS. Molecular basis of ranolazine block of LQT-3 mutant sodium channels: evidence for site of action. *Br J Pharmacol*. 2009;**148**:16–24.
- 5 Gómez AM, Cheng H, Lederer WJ, Bers DM. Ca^{2+} diffusion and sarcoplasmic reticulum transport both contribute to $[\text{Ca}^{2+}]_i$ decline during Ca^{2+} sparks in rat ventricular myocytes. *J Physiol (Lond)*. 1996;**496 (Pt 2)**:575–581.
- 6 Cheng H, Song LS, Shirokova N, Gonzalez A, Lakatta EG, Ríos E, Stern MD. Amplitude distribution of calcium sparks in confocal images: theory and studies with an automatic detection method. *Biophys J*. 1999;**76**:606–617.
- 7 Williams S, Pourrier M, McAfee D, Lin S, Fedida D. Ranolazine improves diastolic function in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014;**306**:H867–H881.
- 8 Wagner E, Brandenburg S, Kohl T, Lehnart SE. Analysis of tubular membrane networks in cardiac myocytes from atria and ventricles. *J Vis Exp*. 2014;**(92)**:e51823.

- 9 Pandit SV, Clark RB, Giles WR, Demir SS. 2001 - Mouse ventricular myocyte model, <https://models.cellml.org/exposure/ea62c9c8a502afe364350d353ebf4dd5> 12th January 2017.
CellML author: Catherine Lloyd.
- 10 Wang DW, Yazawa K, George AL Jr, Bennett PB. Characterization of human cardiac Na⁺ channel mutations in the congenital long QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;**93**:13200-13205.
- 11 Pandit SV, Clark RB, Giles WR, Demir SS. A mathematical model of action potential heterogeneity in adult rat left ventricular myocytes. *Biophys J*. 2001;**81**:3029-3051.

Projet 2 : Identification et caractérisation fonctionnelle des premiers variants rares sur le gène *SLC8A1* associés à un SRP et un raccourcissement de l'intervalle QT.

I. Résumé du projet

Le SRP et le SQTc sont des pathologies rythmiques cardiaques rares diagnostiquées respectivement à l'ECG par une élévation de la jonction QRS-ST > 0,1 mV associée à la survenue de fibrillation ventriculaire et un intervalle QTc raccourci. Ces maladies sont associées à un risque élevé de fibrillation ventriculaire et de mort subite cardiaque. Sept types de SQTc congénitaux ont été décrits à ce jour chez l'Homme, liés à des mutations sur des gènes codants pour des canaux potassiques ou calciques, et dernièrement à un gène codant pour un échangeur chlore/bicarbonate. Un autre SQTc congénital, dû à une mutation sur OCTN2, un transporteur de la carnitine, a été identifié en 2016, mais les mécanismes liant la concentration de L-carnitine à la durée de l'intervalle QTc ne sont pas encore compris. Seulement 5 gènes, codant pour des canaux calciques, potassiques ou sodiques, ont été liés à un SRP, et le risque arythmique parmi les patients présentant un aspect de repolarisation précoce à l'ECG est difficile à mesurer. L'objectif de cette étude est de caractériser les effets fonctionnels de mutations nouvellement identifiées sur le gène *SLC8A1*, corrélées à un SRP associé à un raccourcissement de l'intervalle QT chez plusieurs patients.

Grâce à une approche combinant un séquençage d'exome haut débit direct ou sur un panel de gènes candidats codant pour des canaux ioniques ou leurs partenaires, 5 variants rares ont été identifiés sur le gène *SLC8A1*, qui code pour l'échangeur cardiaque $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ NCX1, chez 5 cas index Français et 1 cas index Japonais (le même variant est retrouvé chez 2 individus Français non-apparentés). Ces individus présentent un aspect de repolarisation précoce à l'ECG, associé à un intervalle QTc raccourci et des épisodes de fibrillation ventriculaire. NCX1 participe à la régulation de l'homéostasie calcique dans le cardiomyocyte en extrudant 1 ion

Ca^{2+} de la cellule contre l'entrée de 3 ions Na^+ . Cet influx net de charges positives dans la cellule produit un courant entrant dépolarisant pendant la phase plateau du PA cardiaque. Une étude de patch clamp réalisée sur des cellules COS-7 transfectées avec l'ADNc de *SLC8A1* sauvage ou possédant les 4 mutations étudiées fonctionnellement a montré que ces mutants diminuent la densité de courant I_{NCX} de 65% à 95%. Des mesures de capture de Ca^{2+} radioactif par les cellules exprimant l'échangeur muté ont démontré des perturbations de la prise en charge du Ca^{2+} *via* NCX1. Ces pertes de fonction de l'échangeur ont été corrélées à des défauts d'expression sarcolemmique de NCX1 pour 3 des 4 mutants, détectés visuellement par immunofluorescence et quantifiés par des analyses biochimiques. Dans le but de comprendre comment des mutations sur NCX1 pouvaient être responsables de pathologies chez l'Homme, une simulation de perte de fonction de 50% de NCX1, les patients étant porteurs hétérozygotes des mutations, a été effectuée à l'aide d'un modèle *in silico* de PA et de pseudo-ECG. Un raccourcissement de la durée du PA et de l'intervalle QT est prédit. La modélisation met également en évidence des perturbations du décours des transitoires calciques à l'échelle cellulaire et l'apparition d'un aspect de repolarisation précoce sur le pseudo-ECG

Pour conclure, les premières mutations sur le gène *SLC8A1* responsables d'une pathologie chez l'Homme ont été identifiées et induisent un SRP associé à un raccourcissement de l'intervalle QTc. L'étude fonctionnelle de ces variants a démontré que des pertes de fonction de NCX1 sont susceptibles de provoquer des perturbations électriques ainsi qu'au niveau de l'homéostasie calcique dans le cardiomyocyte. La modulation de la fonction de NCX1 pourrait donc constituer une nouvelle cible thérapeutique dans un contexte de SRP, de SQTC ou de fibrillation ventriculaire.

II. Article

L'article portant sur le projet n°2 est en cours de préparation. Une version est néanmoins présentée ci-dessous.

1 **Early repolarization syndrome and shortened QT interval associated with loss-of-**
2 **function of the NCX1 exchanger**

3 Franck F. Chizelle^{1*}, Taisuke Ishikawa^{2*}, Julien Barc^{1*}, Florence Kyndt¹, Jean-Baptiste Gourraud³,
4 Vincent Probst³, Gildas Loussouarn¹, Richard Redon^{1,3}, Naomasa Makita^{2#}, Flavien Charpentier^{1#},
5 Jean-Jacques Schott^{1,3#§}

6 ¹ l'institut du thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, Nantes, France

7 ² Department of Molecular Physiology, Nagasaki University, Japan

8 ³ l'institut du thorax, CHU Nantes, Nantes, France

9 Short title: NCX1 mutations, early repolarization syndrome and short QT syndrome

10 Word count: 7809

11 * # Equal contribution

12 § Corresponding author

13 Jean-Jacques SCHOTT

14 *l'institut du thorax*

15 Inserm UMR S1087, CNRS UMR C6291

16 IRS-UN, 8 quai Moncousu

17 44007 Nantes cedex 1, France

18 jean-jacques.schott@inserm.fr

19 Tel. +33 228 08 01 51

20

21 **Abstract**

22

23 **Background.** Early repolarization (ER) syndrome (ERS) and short QT syndrome (SQTS) are rare
24 arrhythmogenic cardiac diseases diagnosed on the ECG by a QRS-ST junction elevation and a shortened
25 QT interval respectively. They are associated with an increased risk of ventricular fibrillation (VF) and
26 sudden death. Seven types of congenital SQTS have been described so far, due to mutations in genes
27 encoding for potassium or calcium channels and lastly for a chloride-bicarbonate exchanger. Five genes,
28 encoding for potassium, sodium or calcium channels, have been linked to congenital ERS so far but
29 arrhythmic risk among patients presenting an ER pattern on the ECG is difficult to predict. The aim of
30 this study was to describe the role of newly identified mutations in *SLC8A1* gene associated with ERS
31 and shortened QT interval.

32 **Methods and results.** By applying a combined high throughput exome, gene-panel and direct
33 sequencing approach, we identified 5 rare variants in the *SLC8A1* gene, encoding the cardiac $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$
34 exchanger (NCX1), in 5 French index cases and 1 Japanese index case, all presenting shortened QT
35 intervals associated with early repolarization pattern on the ECG and VF. NCX1 participates in Ca^{2+}
36 homeostasis in cardiomyocytes by extruding 1 Ca^{2+} ion driven by the entry of 3 Na^+ ions. This net influx
37 of positive charges into the cardiomyocyte is responsible for a depolarizing current during the plateau
38 phase of the cardiac action potential. Patch-clamp experiments realized in COS-7 cells transfected with
39 wild-type or mutated *SLC8A1* cDNA showed that 4 mutations tested functionally decrease I_{NCX} current
40 densities by 65% to more than 95% and the fifth was predicted to disrupt a splicing donor site. Ca^{2+}
41 homeostasis disturbances were investigated by measuring radioactive Ca^{2+} uptake and demonstrated
42 defects of Ca^{2+} uptake in cells expressing mutated NCX1. Immunofluorescence and biotinylation assays
43 show a trafficking defect at the plasma membrane for 3 out of the 4 NCX1 mutants studied.

44 To further characterize how mutations in the *SLC8A1* gene could lead to a shortened QT in patients, we
45 simulated the effects of a 50% loss of function of NCX1 in an *in silico* model of ventricular action
46 potential, in a single cell and a 165-cells transmural wedge. In 50% loss of function simulation,
47 shortening of action potential and QT interval durations are predicted, in addition to the appearance of
48 an ER pattern on the pseudo-ECG. This model also enlightens disturbances in the time-course of Ca^{2+}
49 transients.

50 **Conclusion.** We identified the first mutations in *SLC8A1* responsible for an ER and a shortened QT
51 interval on the ECG associated with VF. The functional study of these variants has demonstrated losses
52 of function of NCX1, leading to electrical disorders and disturbances of Ca²⁺ homeostasis. NCX1 could
53 constitute a new therapeutic strategy in the context of ERS and SQTS.

54

55 **Key words:** *SLC8A1*, NCX1, short QT syndrome, early repolarization syndrome, Ca²⁺ homeostasis,
56 ventricular fibrillation.

Introduction

57

58

59 Among cardiac repolarization diseases, the short QT syndrome (SQTS), first described in 2000¹, is a
60 highly lethal rare cardiac electrical disease which has been diagnosed in approximately 200 cases
61 worldwide until today². It is characterized by an abnormally short repolarization phase of the ventricular
62 action potential, which results in a shortened QT interval on the ECG and an increased risk of ventricular
63 fibrillation (VF). A SQTS is diagnosed in the presence of a corrected QT interval (QTc) < 340 ms, or <
64 360 ms in the presence of either family/clinical history or an identified pathogenic mutation³. Until 2017,
65 6 types of congenital SQTS had been described, due to gain-of-function mutations in genes encoding
66 potassium channels (*KCNH2*^{4,5}, *KCNQ1*⁶, and *KCNJ2*⁷) or to loss-of-function mutations in genes
67 encoding L-type calcium channel subunits (*CACNB2b*, *CACNA1C* and *CACNA2D1*^{8,9}). In 2017,
68 Thorsen et al., discovered that a loss-of-activity mutation in the *SLC4A3* gene, which encodes for the
69 Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger, was responsible for a type 7 SQTS associated with VF in 2 families, probably by
70 increasing pHi, which results in a shortening of the action potential duration¹⁰. More recently, a study
71 based on induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes from patients suffering from type 1
72 SQTS, highlighted, in addition to a shortening of action potential duration, disturbances in Ca²⁺
73 homeostasis to be a part of the pathophysiological mechanisms inducing the SQTS in patients¹¹.

74 Early repolarization (ER) is defined by an elevation (> 0.1 mV) of the QRS-ST junction and
75 characterized by a QRS slurring or notching on the ECG present in 2-10% of the general population¹².
76 ER has been associated with an increased risk of VF or resuscitated cardiac arrest and has been reported
77 as an early repolarization syndrome (ERS)^{13,14}. Mutations in genes encoding for Cav1.2 (*CACNA1C*,
78 *CACNB2b* and *CACNA2D1*)¹⁵, responsible for a decrease in I_{Ca,L}, or in *KCNJ8*¹⁶ and *SCN5A*¹⁷ genes
79 have already been linked to ERS. ER and shortened QT interval can occur together in patients. Indeed,
80 the frequency of ER has already been shown to be higher in patients with SQTS¹⁸. Conversely, a
81 shortened QT interval is observed in individuals suffering from ERS¹⁹.

82 NCX1, the cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger, participates in the regulation of Ca²⁺ homeostasis in the
83 cardiomyocyte by extruding 1 Ca²⁺ ion for the entry of 3 Na⁺ ions, thus generating a net influx of positive

84 charges into the cardiomyocyte which is responsible for a depolarizing current during the plateau phase
85 of the cardiac action potential. Very interestingly, in the mouse, heart specific knockout of *Slc8a1* gene,
86 which encodes NCX1, results in a shortening of both action potential and QTc durations^{20,21}.

87 By applying a combined high throughput exome, gene-panel and direct sequencing approach on patients
88 presenting with shortened QT interval and ER associated with VF, we identified 3 missense variants, 1
89 truncating variant and 1 splice site variant in the *SLC8A1* gene. Functional characterization of 4 of these
90 mutants, performed by expressing human WT or mutated *SLC8A1* cDNA in COS-7 cells, showed that
91 all the mutants tested are responsible for NCX1 loss of function by decreasing the exchange current I_{NCX} .
92 For 3 out of the 4 mutants, we demonstrated that these losses of function are due to trafficking defects
93 of the mutated proteins. A decrease in Ca^{2+} uptake in cells expressing the different mutations was also
94 observed compared to those expressing the WT form of NCX1. Finally, *in silico* simulation of the 65%
95 to 95% NCX1 loss of function measured *in vitro* highlighted altered $[Ca^{2+}]$ during Ca^{2+} transients and
96 recapitulated the phenotype observed in patients by shortening both action potential and QT durations
97 and inducing the appearance of an ER pattern on the pseudo-ECG.

98

Methods

99 *Patient phenotyping*

100 This study conforms to the Declaration of Helsinki. It was conducted in accordance with the French
101 guidelines for genetic research and with the approval of the local medical ethics committees. Informed
102 written consent was obtained from all patients. Baseline 12-lead ECGs were recorded at a paper speed
103 of 25 mm/s. Echocardiography or cardiac MRI have been performed and did not reveal any structural
104 abnormalities. Quantitative and qualitative ECG parameters have been measured independently by an
105 experienced cardiologist.

106

107 *Genetic analysis*

108 Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using standard protocols. The French
109 cases were sequenced using a high throughput gene-panel sequencing and direct sequencing of the 10
110 coding exons of *SLC8A1* (NM_021097.2). Primers are available on request. Gene panel design,
111 sequencing and filtering was performed as previously described²². Variants identified were further
112 considered if they were rare ($MAF < 1.10^{-4}$) in the non-Finnish European or East Asian or in all
113 population included in the Gnomad database (<http://gnomad.broadinstitute.org>) and if they modified the
114 primary sequence of the protein. Variant annotation has been completed with prediction tools such as
115 SIFT and PolyPhen and prioritization scores such as GERP and PHRED. Putative splicing site variant
116 have been tested with two independent algorithms available through
117 www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html and <http://www.umd.be/HSF3>.

118

119 *cDNA constructs*

120 Human WT and mutant *SLC8A1* (NM_021097.2) cDNAs, coding for WT and mutant NCX1, were
121 provided by OriGene in a pcDNA3.1 vector (*pcDNATM3.1, V79020, OriGene*). For immunofluorescence
122 experiments and biotinylation assays, due to the poor efficacy of antibodies directed against NCX1, a

123 myc-tag sequence was inserted on the extracellular loop between transmembrane segments 2 and 3 of
124 the exchanger.

125

126 ***Transfection***

127 COS-7 cells obtained from the American Type Culture Collection were cultured in Dulbecco's modified
128 Eagle's medium (*GIBCO*) supplemented with 10% foetal calf serum and antibiotics (100 IU/ml
129 penicillin and 100 µg/ml streptomycin) at 5% CO₂ and 95% air, maintained at 37°C in a humidified
130 incubator. For patch clamp experiments and biotinylation assays, two micrograms of GFP-containing
131 plasmid DNA (pEGFP-N3, *Clontech*, used as a negative control) or a pcDNA3.1 plasmid, encoding WT
132 NCX1 or one of the 4 mutants tested (P687HfsX2, E578G, P940S, or L218H) were transfected using
133 FuGene 6 (*Roche Molecular Biochemical*) according to the standard protocol recommended by the
134 manufacturer. For patch-clamp experiments, cells were cotransfected with 90% of WT or mutant
135 pcDNA3.1-NCX1 (1.8 µg) and 10% of GFP cDNA (0.2 µg) as a reporter gene. Cells were used 48 hours
136 after transfection.

137 To establish HEK293 stable cell lines, the cDNA of WT or mutated *SLC8A1* was transfected into
138 HEK293 cells using Lipofectamine™2000 (*Invitrogen, San Diego, CA*) as directed by the manufacturer.
139 To select stably transfected cells, geneticin (*G418 sulfate*) at a concentration of 800 µg/ml was added
140 for approximately 15 days, at which time surviving single colonies were isolated and cultured with 400
141 µg/ml of geneticin for 1–3 weeks.

142

143 ***Cellular Electrophysiology***

144 For patch-clamp measurements, cells were mounted on the stage of an inverted microscope and
145 constantly superfused with a Tyrode solution containing (in mM): NaCl, 140; KCl, 5.4; CaCl₂, 1.8;
146 MgCl₂, 1; NaH₂PO₄, 0.33; glucose, 5.5; HEPES, 5 (pH 7.4) at a rate of 2 mL/min. The bath temperature
147 was maintained at 36.2±0.2°C. Stimulation and data recording were performed with Axon pClamp 10
148 through a Digidata 1440A A/D converter (*Molecular Devices*) using an Alembic VE-2 amplifier

149 (*Alembic Instrument*). Patch pipettes (tip resistance: 1.8–2.5 M Ω) were pulled from soda lime glass
150 capillaries (*Kimble-Chase*) and filled with a solution containing (in mM): NaCl, 20; BAPTA, 20; CaCl₂,
151 13 (433 nM free Ca²⁺); CsCl₂, 120; MgCl₂, 3; aspartic acid, 50; MgATP, 5; ryanodine, 0.2; HEPES, 10
152 (pH 7.2 with CsOH). Once the whole-cell configuration was achieved, the cells were locally perfused
153 with an extracellular solution containing (in mM): NaCl, 140; CaCl₂, 2; MgCl₂, 1; ouabain, 0.02;
154 nifedipine, 0.01; HEPES, 5 (pH 7.2 with CsOH). I_{NCX} was detected as a 5 mM NiCl₂-sensitive current.
155 Series resistance was compensated.

156 The current-voltage (I-V) relationship were obtained by applying voltage ramps to the cell. The
157 membrane was initially depolarized from a holding potential of -60 mV to +80 mV then hyperpolarized
158 from +80 to -120 mV and then depolarized back to -60 mV at a constant rate of 640 mV/s. The
159 descending ramp (from +80 to -120 mV) was plotted in the I-V relationship. Ca²⁺ current (I_{Ca}), K⁺
160 currents, Na⁺/K⁺ pump current and Ca²⁺ release channels of the sarcoplasmic reticulum were blocked
161 by nifedipine, Cs⁺, ouabain and ryanodine, respectively. The current amplitude was measured at +50
162 mV and normalized to cell capacitance to obtain the current density.

163

164 ⁴⁵Ca²⁺ uptake measurements

165 Ca²⁺ uptake experiments were performed on HEK293 cells stably expressing WT or mutated NCX1
166 grown under geneticin. Two millions cells per well were seeded on 12 well plates. Twenty four hours
167 after passage, cells were incubated for 40-50 minutes in BSS buffer containing (in mM): NaCl, 146;
168 KCl, 4; CaCl₂, 0.1; MgCl₂, 2; HEPES, 10; Glucose, 10; Ouabain, 1; Monensin, 0.01; 0.1% BSA, pH 7.4.
169 Cells were then incubated in modified BSS buffer with equimolar substitution of NaCl by Choline-Cl
170 and of CaCl₂ by ⁴⁵CaCl₂ for exactly 1 minute. After 3 washes with PBS, cells were lysed with RIPA
171 buffer containing (in mM): NaCl, 150; Tris-HCl, 50; 1% NP40; 0.1% SDS; 0.5% deoxycholate;
172 complete protease inhibitor mixture from Roche Diagnostics. After transferring the liquid into new tubes,
173 mix scintillation cocktail Ultima Gold™ (*PerkinElmer*) was added and the tubes were shaken vigorously.
174 ⁴⁵Ca radioactivity was quantified by liquid scintillation counter Aloka LSC-5100 (*Aloka, Japan*).

175

176 ***Immunofluorescence***

177 COS-7 cells immunostaining was performed in Ibidi μ -slide (*μ -slide 8 Well, Ibidi®*). After 2 washes
178 with PBS, cells were incubated during 1 hour in blocking buffer (PBS containing 1% BSA and 3% fish
179 gelatin). Cells were then incubated during 1 hour at room temperature with anti-myc primary antibody
180 (*mouse monoclonal anti-Myc tag antibody, 05-724, clone 4A6, Merck Millipore; 1:200*) diluted in
181 blocking buffer. After 3 washes with PBS, cells were fixed during 10 minutes in 4% paraformaldehyde.
182 Cells were washed 3 times in PBS and stained with fluorescent secondary antibody (*AlexaFluor®488,*
183 *Life technologies; 1:200*) for 1 hour at room temperature in blocking buffer. After washes, cells were
184 incubated during 10 minutes with Hoechst B2883 (*Sigma; 1:1,000*) diluted in PBS to counterstain nuclei,
185 washed again twice and conserved in PBS with 0.4% paraformaldehyde until observation. The samples
186 were imaged with a Nikon A1 confocal microscope (*objective o.i. 60x, N.A. 1.4, Nikon, France*) and
187 captured with NIS-Elements software (*v4.10, Nikon, Japan*).

188

189 ***Cell surface biotinylation assays and Western blots***

190 COS-7 cells grown in 35-mm dishes were washed twice with cold PBS, incubated with 0.5 mg/mL EZ-
191 Link Sulfo-NHS-SS-Biotin (*Pierce*) in PBS, pH 7.4, for 30 minutes on ice, and washed 3 times with a
192 Tris–saline solution (10 mmol/L Tris, pH 7.4, 120 mmol/L NaCl) to quench the biotinylation reaction.
193 Two hundreds microliters per dish of lysis buffer containing (in mM): NaCl, 100; Tris-HCl, 50; EGTA,
194 2; Na₃VO₄, 1; NaF, 50; PMSF, 1; complete protease inhibitor mixture from Roche Diagnostics and 1%
195 Triton X-100, pH 7.4 were added and the cells were detached from the dishes and lysed at 4°C during
196 20 minutes on a rotating wheel. The detergent-soluble fraction was collected after a centrifugation
197 (14,000g, 15 min, 4°C) and protein concentration was assayed (*Pierce BCA protein assay kit; Thermo*
198 *Fisher Scientific*). To purify biotinylated cell-surface proteins, 2 μ g of detergent-soluble cell lysates
199 were incubated during 2 hours at 4°C with 100 μ L of NeutrAvidin-conjugated agarose beads (*Pierce*).
200 The complexes were washed 3 times with lysis buffer and the proteins were cleaved and denaturated for
201 30 minutes at 50°C in 70 μ L of a mix containing reducing (*NuPage Sample Reducing Agent, Thermo*
202 *Fisher Scientific*) and denaturing (*NuPage LDS Sample Buffer, Thermo Fisher Scientific*) agents. After

203 centrifugation, eluted proteins were separated from the beads, collected and analysed by Western blot
 204 in parallel to total cell lysates, for which 40 µg of proteins per well were loaded. Both sarcolemmal
 205 fraction and total cell lysate were separated on SDS-PAGE gels (4-20% Mini-PROTEAN® TGX Stain-
 206 Free™ Precast Gels, Bio-Rad, France) and transferred on nitrocellulose membranes (Trans-Blot®
 207 Turbo™ Nitrocellulose Transfer Packs, Bio-Rad, France). Membranes were blocked and incubated with
 208 primary antibodies targeted against Myc tag (05-724, clone 4A6, Merck Millipore; 1:1,000), transferrin
 209 receptor (13-6800, Thermo Fisher Scientific; 1:1,000) and GAPDH (Santa-Cruz Biotechnologies;
 210 1:10,000). Next, membranes were incubated with the *ad hoc* secondary horseradish peroxidase (HRP)
 211 antibody (Santa Cruz Biotechnologies; 1:10,000). Incubation was followed by detection using
 212 chemiluminescence (ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare Amersham™,
 213 UK). Signals of sarcolemmal fractions were normalized with respect to transferrin receptor staining and
 214 then normalized to the control condition. Western-blot quantification was performed with Image Lab™
 215 5.2.1 software (Bio-Rad Software).

216

217 *In silico simulations*

218 We used the 2011 single human ventricular cell model of O’Hara and collaborators²³ to simulate the
 219 effect of NCX1 loss of function on ventricular action potential (AP) and Ca²⁺ homeostasis. According
 220 to our results obtained *in vitro* (Figure 2), we tested the effect of a 50% decrease in NCX1 function. The
 221 model was run using OpenCell (<https://www.cellml.org/tools/opencell>). All the equations are found in
 222 the publication of O’Hara *et al.*, only the model modifications are shown here. For the mutated NCX1
 223 models, a factor of 0.5 was attributed to NCX1 current I_{NCX} . Thus, the equation become:

$$224 \quad I_{NCX} = 0.5 \cdot (I_{NCX,i} + I_{NCX,ss})$$

$$225 \quad \text{with } I_{NCX,i} = \overline{G_{NCX}} \cdot 0.8 \cdot allo_i \cdot (z_{Na} \cdot J_{NCX,Na,i} + z_{Ca} \cdot J_{NCX,Ca,i})$$

$$226 \quad \text{and } I_{NCX,ss} = \overline{G_{NCX}} \cdot 0.2 \cdot allo_{ss} \cdot (z_{Na} \cdot J_{NCX,Na,ss} + z_{Ca} \cdot J_{NCX,Ca,ss})$$

227 See O’Hara *et al.*²³, for definition of variables and constants.

228 To test the effect of NCX1 loss of function on pseudo-ECG, the transmural wedge model of O'Hara *et*
229 *al.*²⁰ was used. It is based on a wedge comprising 60 sub-epicardial cells, 45 mid-myocardial cells and
230 60 sub-endocardial cells.

231

232 ***Statistics***

233 Data are expressed as mean \pm S.E.M. Statistical analysis was performed with Prism5 (*GraphPad*
234 *Software, Inc.*). Each variant was compared to the control condition by using Student *t*-test or Mann-
235 Whitney U test for comparison of two groups. A *P* value below 0.05 was considered significant.

236

Results

237 *Clinical reports and genetic investigations*

238 Specific ECG patterns have been observed among 6 patients (5 French and 1 Japanese) presenting an
239 early repolarization pattern in the inferior/lateral leads associated or not with a shortened QT interval
240 (average QT: 308 ms \pm 19 ms; QTc: 319 ms \pm 7 ms) and with a high and narrow T-wave in V2-V3. No
241 structural abnormality could be detected by cardiac echography or MRI. They have been diagnosed on
242 average at 32 \pm 6 years old and 5/6 are males. Furthermore among them, 3 experienced an episode of
243 VF and 3 others presented syncope or palpitation (Table 1). Seven family members of 2 probands have
244 been recruited and ECGs have been recorded. In both families, the brother and the mother of the proband
245 were also presenting ECGs indices in favour of a QT shortening, a high and narrow T-wave and J-wave
246 elevation (Figure 1A and 1D and supplemental figure 1).

247 Genetic investigation identified rare (MAF < 1/1000) variants in the gene *SLC8A1*. Among the 6
248 probands, 4 carry a missense variant among p.E578G, p.P940S, and p.L218H (p.P940S has been found
249 in 2 unrelated French probands), one carries a frameshift variant (p.P687HfsX2) leading to a premature
250 stop codon and one carries a splice site (IVS8+2T>C) variant 2 nucleotides after exon 8 (Figure 1).
251 These 5 genetic variants affect highly conserved residues (Gerp Score: 5.7 \pm 0.1) and their prediction
252 score of pathogenicity is high (PHRED: 29.9 \pm 1.93). Segregation study among the pedigree presented
253 in figure 1A and 1D reveals a perfect concordance between the phenotype and the genotype. The
254 IVS8+2T>C variant is predicted (www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html; <http://www.umd.be/HSF3>) to
255 disrupt a donor splicing site after exon #8.

256

257 *NCX1 variants induce a decrease in I_{NCX}*

258 We tested the ability of p.E578G, p.P940S, p.L218H and p.P687HfsX2 variants to affect the current
259 generated by NCX1 (*I_{NCX}*) during a voltage ramp protocol. Figure 2 displays whole-cell voltage-clamp
260 analysis performed in COS-7 cells expressing WT or mutated NCX1. After recording the baseline
261 current, 5 mM Ni²⁺ were applied, permitting the calculation of the Ni²⁺-sensitive current, which
262 corresponds to *I_{NCX}* (Figure 2A). COS-7 cells transfected with GFP alone (control cells) showed little,

263 if any, I_{NCX} (Figure 2B). All variants induced a decrease in I_{NCX} (Figure 2C-F). Since all cells groups
264 had comparable membrane capacitance (Supplemental Figure 2B), average current densities à +50 mV
265 were calculated in order to compare the effects of the different variants. As shown in Figure 2G (see
266 also supplemental figure 2A), current densities were decreased by 65% in cells expressing p.P687HfsX2
267 and p.E578G variants in comparison to WT NCX1, and to almost 100% in cells expressing p. P940S
268 and p. L218H variants.

269

270 ***SLC8A1 variants decrease radioactive Ca^{2+} uptake through NCX1***

271 The effects of the variants on NCX1 function were further evaluated by measuring intracellular Na-
272 dependent $^{45}Ca_o$ uptake. COS-7 cells stably expressing NCX1 WT or NCX1 with the 4 mutations studied
273 were loaded with ^{45}Ca , a radioactive Ca^{2+} isotope, in a free Na^+ medium. After cell lysis, the amount of
274 ^{45}Ca captured by NCX1 exchanger was estimated by liquid scintillation counting. Na^+ -dependent Ca^{2+}
275 uptake was significantly decreased in cells expressing the 4 NCX1 mutants in comparison to COS-7
276 cells expressing WT NCX1 and reached the level of control cells transfected with an empty pcDNA 3.1
277 plasmid (Figure 3). These data show that *SLC8A1* mutations are responsible for severe disturbances of
278 the reverse mode of the Na/Ca exchanger.

279

280 ***Lower sarcolemmal expression of mutated NCX1***

281 To obtain molecular details on mutated NCX1 losses of function, we investigated their sarcolemmal
282 expression in transiently transfected COS-7 cells. We initially compared the anti-myc immunostaining
283 patterns of COS-7 cells expressing WT or mutated NCX1 (Figure 4A). We first observed that the NCX1
284 p.E578G mutant shows a peripheral staining that matches the sarcolemma, similar to what was observed
285 in the WT NCX1 condition. In contrast, the 3 other mutants tested showed a qualitatively different
286 staining. Indeed, p.L218H and p.P687HfsX2 mutants, the latter leading to a truncated NCX1 protein
287 (see below), showed either an absence of fluorescence or a weak staining compared to the WT condition.
288 Moreover the staining, when present, was cytosolic or located in the perinuclear space rather than in the
289 sarcolemma, suggesting trafficking defects for these 2 NCX1 mutants. The p.P940S mutant exhibited a

290 heterogeneous phenotype with some transfected cells presenting a sarcolemmal WT-like NCX1 staining
291 whereas other cells displayed misdirected proteins, as for p.L218H and p.P687HfsX2 mutants.

292 To quantify the loss of mutated NCX1 sarcolemmal expression observed in immunofluorescence
293 analysis, we performed biotinylation assays followed by western blot analysis. We observed WT or
294 mutated NCX1 expression in both total cell lysates and biotinylated fraction (Figure 4B). No changes
295 were observed in the total protein expression, except for the p.P687HfsX2 NCX1 mutant, which leads
296 to a stop codon at two thirds of the protein (Figure 4B, total protein fraction). For this condition, we did
297 not observe any signal at the theoretical NCX1 molecular weight (110 kDa) on the blot, whereas a
298 truncated form of NCX1 (< 110 kDa) is detected in the total fraction. Concerning the biotinylated
299 fraction, we observed that the 3 mutants that had shown defects in sarcolemmal NCX1 expression in
300 immunofluorescence experiments (p.P687HfsX2, p.P940S and p.L218H) consistently showed a lower
301 sarcolemmal expression in comparison to WT NCX1 (Figure 4C). This is not the case for the p.E578G
302 mutant. Taken together, these results indicate that trafficking defects could be at the origin of the
303 measured functional NCX1 losses of function for 3 out of the 4 mutants tested.

304

305 *In silico modelling of NCX1 loss of function*

306 With the aim of establishing a link between the NCX1 losses of function demonstrated *in vitro* and the
307 patients' phenotype, we performed a computational simulation of the mutations effects on the human
308 cardiac action potentials and pseudo-ECG. We first used an *in silico* single ventricular cardiomyocyte
309 model in which we simulated the effects of a 50% loss of I_{NCX} in M cells. At steady state (1,000th action
310 potential, cf. supplemental figure 4) and at a cycle length of 1,000 ms, this decrease in exchange current
311 is predicted to induce a 21 ms shortening of the mid-myocardial ventricular action potential at 90% of
312 complete repolarization (APD_{90} ; 329 ms for 100% I_{NCX} condition *versus* 308 ms for 50% I_{NCX} condition;
313 Figure 5A). By affecting the same parameters on the transmural wedge model of O'Hara and
314 collaborators, we observed that a shortening in the action potential duration leads to a shortening of the
315 QT interval on pseudo-ECGs at the 1 000th beat (Figure 5B). Very interestingly, an ER pattern is
316 predicted to appear on the pseudo-ECG. The shortening of the action potential is predicted to be present

317 also in sub-endocardial and sub-epicardial cells at a cycle length of 1,000 ms and, to a lesser extent, at
318 a cycle length of 500 ms (supplemental Figure 3A and 3B). At this latter frequency, the QT interval
319 duration seems to be only slightly decreased in the 50% I_{NCX} condition compared to the 100% I_{NCX}
320 condition (supplemental Figure 3C).

321 Due to the physiological role of NCX1 in the regulation of Ca^{2+} homeostasis, we analysed the predicted
322 time course of $[Ca^{2+}]_i$ transients when I_{NCX} is decreased to 50%. At a cycle length of 1 000 ms, the model
323 predicts a progressive increase with time of the peak $[Ca^{2+}]_i$, leading to a 2 fold higher $[Ca^{2+}]_i$ in 50%
324 I_{NCX} condition compared to 100% I_{NCX} condition when the steady state is reached in M cells (Figure 5C).
325 This phenomenon is also observed in sub-endocardial and sub-epicardial cells (supplemental Figure 4).

326

Discussion

327

328 In this study, we show the association between variants in the *SLC8A1* gene, which encodes NCX1, and
329 a form of ERS associated with shortened QT interval and VF. We also demonstrate that those variants
330 lead to NCX1 loss of function, which can be explained by lower NCX1 sarcolemmal expression for
331 three out of the four variants tested. Finally, our *in silico* simulation show that a 50% decrease in I_{NCX} ,
332 consistent with our *in vitro* results, can induce not only a shortening of ventricular action potentials and
333 thus, a shortening of the QT interval, but also the appearance of an ER pattern on the pseudo-ECG. It
334 also highlights disturbances in Ca^{2+} cycle as a potential arrhythmogenic mechanism in NCX1-related
335 ERS and SQTS.

336 To our knowledge, this study is the first to report NCX1 as a novel gene involved in an inherited cardiac
337 arrhythmic disease. A previous study investigating the effects of a NCX1-truncating mutation generated
338 in zebrafish reported the occurrence of cardiac fibrillation in these animals,²⁴ but no mutation had been
339 described so far in human. Yet, alterations in NCX1 expression and/or function have already been
340 indirectly linked to cardiac diseases. In particular, higher NCX1 function and expression has been
341 reported in the context of cardiac repolarization disease²⁵ or heart failure^{26,27}. Moreover, NCX1 has been
342 shown to play a key role in arrhythmogenic events through the generation of delayed
343 afterdepolarizations²⁸.

344 All *SLC8A1* variants that we investigated led to a partial to complete loss of function of NCX1. The
345 NCX1 exchanger is the major Ca^{2+} extrusion pathway in cardiac cells and acts in an electrogenic manner,
346 by extruding 1 Ca^{2+} ion for the entry of 3 Na^{+} ions. This net influx of positive charges in the
347 cardiomyocyte generates a depolarizing current during the plateau phase of the action potential. A loss
348 of function of NCX1 is thus not surprising in the context of the patients' phenotype characterized by an
349 early repolarization pattern and a QT interval shortening. Consistently, cardiac specific knockout of the
350 *SLC8A1* gene in mouse induces a shortening of both action potential and QTc interval durations in

351 isolated cardiomyocytes and on ECG recordings respectively^{20,21}. Conversely, mice with cardiac NCX1
352 overexpression exhibit a prolonged action potential duration²⁹. Thus, the decrease in I_{NCX} observed with
353 the 4 NCX1 mutants studied here possibly shortens action potential duration by reducing the
354 depolarizing current during the plateau phase of the action potential and can be, at least in part, at the
355 origin of the QTc interval shortening in the patients. This hypothesis is supported by our *in silico* data
356 showing a shortening in action potential and QTc interval durations in conditions in which I_{NCX} is
357 reduced by 50%, which corresponds to the haploinsufficiency expected in the patients with the most
358 severe mutations. However, the action potential and QT interval shortening predicted by the model is
359 rather modest compared to what is observed in most patients. This suggests that other mechanisms might
360 be involved. Actually, this is what is observed in knockout mice, in which part of the action potential
361 shortening is due to (i) a reduction of the amplitude and an acceleration of the inactivation of the L-type
362 Ca^{2+} current and (ii) an increase in Kv4.2 expression leading to a larger transient outward K^+ current,
363 one of the main repolarizing currents in mouse^{20,21}.

364 Our study also correlated mutations in the *SLC8A1* gene with ERS. Little is known about the
365 mechanisms responsible for this pathology. ERS has been proposed to result from abnormally large
366 transmural differences in the magnitude of the early repolarization phase of the cardiac action potential
367 and could be caused by an increase in transient outward K^+ current (I_{to})³⁰. We can hypothesize that in
368 our case, NCX1 loss of function can lead to a higher I_{to} current and induce an early repolarization pattern.
369 The mathematical model predicts a small increase in I_{to} , concomitant with the ER pattern on the pseudo-
370 ECG. Both phenomena are predicted to be particularly small but an additional increase in I_{to} due an
371 increased expression of the underlying channel subunits, as observed in cardiac-specific NCX1
372 knockout mice^{20,21}, cannot be excluded. Moreover, a decrease in I_{NCX} has been proposed to participate
373 in the mechanisms leading to a J point elevation during hypercalcemia³¹. This phenomenon could be the
374 consequence of increased transmural differences in the action potential notch, due to the I_{NCX}
375 heterogeneity through the ventricular wall³².

376 As demonstrated with the p.A39V mutation in Cav1.2⁸ and with the mutation p.R370H in AE3
377 exchanger¹⁰ that induce congenital SQTs, defects in sarcolemmal expression or trafficking defects is
378 likely to be at the origin of the observed NCX1 losses of function in 3 out of our 4 NCX1 mutants,
379 leading to a haploinsufficiency in the affected patients. On the other hand, p.E578G mutant, when
380 expressed in COS-7 cells, exhibits only a 50% decrease in I_{NCX} and Ca^{2+} uptake and a WT-like
381 sarcolemmal localization and expression. Thus, we can hypothesize that the loss of function due to the
382 expression of the p.E578G mutant can originate from alteration in Na^+ and/or Ca^{2+} transport, as it is
383 thought to be the case in others SQTs-related mutations that do not impact the trafficking of the mutated
384 protein^{8,9}. This idea is supported by the fact that this missense mutation, which replaces a negatively
385 charged amino acids by a neutral one, is located in the second Ca^{2+} binding domain of NCX1. Point
386 mutations in this Ca^{2+} binding domain have already been shown to almost entirely abolish Ca^{2+} binding³³.
387 As seen in immunofluorescence and biochemical results, p.P940S mutant shows a heterogeneous
388 phenotype concerning its expression, with some cells presenting a sarcolemmal expression of the
389 mutated NCX1 protein whereas others exhibit a lower sarcolemmal expression. These differences could
390 be linked to the use of a suboptimal heterologous overexpression system model in this study.

391 Among the 4 NCX1 mutants studied, the p.P687HfsX2 mutant shows only a 50% reduction in exchange
392 current measured by patch clamp experiments compared to the WT NCX1 condition. The persistent I_{NCX}
393 observed in COS-7 cells expressing p. P687HfsX2 mutant is confusing since this mutation leads to a
394 truncated protein and almost no signal is observed in immunofluorescence experiments. As the protein
395 is truncated after the fifth transmembrane segment among the 10 segments comprising NCX1, one can
396 hypothesize that the amount of current observed in this condition could be due to a dimerization of
397 truncated exchangers that would produce a residual current, reminiscent of dimerization of full-length
398 NCX1 described in the literature³⁴.

399 *In silico* simulation of APs and ECGs predicts that a 50% reduction of I_{NCX} leads to abnormal Ca^{2+}
400 transients in cardiac cells, with a 2-fold increase in $[Ca^{2+}]_i$ at the peak of $[Ca^{2+}]_i$ transients. Disturbances

401 in the time course of $[Ca^{2+}]_i$ transients have already been observed when a truncating NCX1 mutation is
402 induced in a zebrafish model of cardiac fibrillation²¹. Recently, a higher incidence of early and delayed
403 afterdepolarization-like events on $[Ca^{2+}]_i$ transients recordings has also been shown in the first induced
404 pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes model of SQTs¹¹. Taken together, these data and ours
405 suggest that, in addition to a shortening of the action potential duration and thus of the refractory periods
406 in cardiac cells, Ca^{2+} homeostasis disturbances could be involved in the mechanism of arrhythmias in
407 SQTs.

408 Our study has certain limitations that need to be considered. First, genetic investigations have only been
409 performed by exome sequencing in Japanese cases whereas the French cases have been tested using a
410 panel gene screening or direct Sanger sequencing approach. Even if 5 different mutations in the *SLC8A1*
411 gene from different families have been correlated with a SQTs or ERS associated with VF (with
412 p.P940S variant found in 2 unrelated probands) after precluding any other mutation in genes encoding
413 ion channels or partner proteins, genome-wide (coding regions) sequencing would have been a more
414 rigorous approach to ensure the causality of the variants. Moreover, the variant located in a splice site
415 was not functionally characterized. Exon trapping assays are in progress to determine if the mutation
416 leads to splicing defects. Furthermore, the functional characterization of the mutations was performed
417 in a heterologous overexpression system, in a quite different context to that of a cardiomyocyte, and this
418 can account for some discrepancies observed in our study. Future studies in knock-in mice and induced
419 pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes models would help to understand the pathophysiological
420 mechanisms of *SLC8A1*-related ERS and SQTs in a more relevant environment.

421 To conclude, we reveal *SLC8A1* as a new gene involved in genetically- inherited human diseases. We
422 identified 5 mutations responsible for an ER pattern and a shortened QT interval on the ECG associated
423 with VF. Those mutations lead to NCX1 losses of function probably due to defects in sarcolemmal
424 expression of the exchanger in 3 out of 5 mutants tested. *In silico* simulation of the mutation effects
425 predicts shortening in both action potential and QT durations, associated with the appearance of an ER

426 pattern on pseudo ECG and that Ca^{2+} transients disturbances could participate to the mechanisms at the
427 origin of the phenotype observed in patients.

428

Acknowledgements

429

430 The authors wish to thank the cell and tissue imaging core facility (MicroPICell) of the *SFR François*
431 *Bonamy*.

432 We are most grateful to the Genomics and Bioinformatics Core Facility of Nantes (GenoBiRD,
433 Biogenouest) for its technical support.

434

435 **Conflict of interest:** none declared.

436

Funding

438 The research leading to these results has received funding from the Fondation pour la Recherche
439 Médicale (DEQ20140329545) (Jean-Jacques Schott) and from the National Agency for Research
440 (ANR-GENSUD-14-CE10-0001) and the Regional Council of Pays-de-la-Loire (Richard Redon).
441 Julien Barc was supported by the H2020-MSCA-IF-2014 Program of the European Commission
442 (RISTRAD-661617).

443

References

444

445 1. Gussak, I. *et al.* Idiopathic short QT interval: a new clinical syndrome? *Cardiology* **94**, 99–102 (2000).

446 2. Mazzanti, A., Underwood, K., Nevelev, D., Kofman, S. & Priori, S. G. The new kids on the block of

447 arrhythmogenic disorders: Short QT syndrome and early repolarization. *J. Cardiovasc.*

448 *Electrophysiol.* **28**, 1226–1236 (2017).

449 3. Priori, S. G. *et al.* 2015 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias

450 and the prevention of sudden cardiac deathThe Task Force for the Management of Patients with

451 Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death of the European Society of

452 Cardiology (ESC)Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology

453 (AEPC). *Eur Heart J* **36**, 2793–2867 (2015).

454 4. Brugada, R. *et al.* Sudden death associated with short-QT syndrome linked to mutations in

455 HERG. *Circulation* **109**, 30–35 (2004).

456 5. Hong, K., Bjerregaard, P., Gussak, I. & Brugada, R. Short QT syndrome and atrial fibrillation caused

457 by mutation in KCNH2. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **16**, 394–396 (2005).

458 6. Bellocq, C. *et al.* Mutation in the KCNQ1 gene leading to the short QT-interval

459 syndrome. *Circulation* **109**, 2394–2397 (2004).

460 7. Priori, S. G. *et al.* A novel form of short QT syndrome (SQT3) is caused by a mutation in the KCNJ2

461 gene. *Circ. Res.* **96**, 800–807 (2005).

462 8. Antzelevitch, C. *et al.* Loss-of-Function Mutations in the Cardiac Calcium Channel Underlie a New

463 Clinical Entity Characterized by ST-Segment Elevation, Short QT Intervals, and Sudden Cardiac

464 Death. *Circulation* **115**, 442–449 (2007).

- 465 9. Templin, C. *et al.* Identification of a novel loss-of-function calcium channel gene mutation in short
 466 QT syndrome (SQTS6). *Eur. Heart J.* **32**, 1077–1088 (2011).
- 467 10. Thorsen, K. *et al.* Loss-of-activity-mutation in the cardiac chloride-bicarbonate exchanger AE3
 468 causes short QT syndrome. *Nat Commun* **8**, 1696 (2017).
- 469 11. El-Battrawy, I. *et al.* Modeling Short QT Syndrome Using Human-Induced Pluripotent Stem Cell-
 470 Derived Cardiomyocytes. *J Am Heart Assoc* **7**, (2018).
- 471 12. Sethi, K.K., Sethi, K. & Chutani, S.K. Early repolarisation and J wave syndromes. *Indian Heart J.*
 472 **66**, 443-52 (2014).
- 473 13. Nam, G.B., Ko, K.H., Kim, J., Park, K.M., Rhee, K.S., Choi, K.J., Kim, Y.H. & Antzelevitch, C.
 474 Mode of onset of ventricular fibrillation in patients with early repolarization pattern vs. Brugada
 475 syndrome. *Eur. Heart J.* **31**, 330-9 (2010).
- 476 14. Haïssaguerre, M., Derval, N., Sacher, F., Jesel, L., Deisenhofer, I., de Roy, L., Pasquié, J.L., Nogami,
 477 A., Babuty, D., Yli-Mayry, S., De Chillou, C., Scanu, P., Mabo, P., Matsuo, S., Probst, V., Le Scouarnec,
 478 S., Defaye, P., Schlaepfer, J., Rostock, T., Lacroix, D., Lamaison, D., Lavergne, T., Aizawa, Y., Englund,
 479 A., Anselme, F., O'Neill, M., Hocini, M., Lim, K.T., Knecht, S., Veenhuyzen, G.D., Bordachar, P.,
 480 Chauvin, M., Jais, P., Coureau, G., Chene, G., Klein, G.J. & Clémenty, J. Sudden cardiac arrest
 481 associated with early repolarization. *N. Engl. J. Med.* **358**, 2016-23 (2008).
- 482 15. Burashnikov, E., Pfeiffer, R., Barajas-Martinez, H., Delpón, E., Hu, D., Desai, M., Borggrefe,
 483 M., Häissaguerre, M., Kanter, R., Pollevick, G.D., Guerchicoff, A., Laiño, R., Marieb, M., Nademanee,
 484 K., Nam, G.B., Robles, R., Schimpf, R., Stapleton, D.D., Viskin, S., Winters, S., Wolpert, C., Zimmern,
 485 S., Veltmann, C. & Antzelevitch, C. Mutations in the cardiac L-type calcium channel associated with
 486 inherited J-wave syndromes and sudden cardiac death. *Heart Rhythm.* **7**, 1872-82 (2010).

- 487 16. Haïssaguerre, M., Chatel, S., Sacher, F., Weerasooriya, R., Probst, V., Loussouarn, G., Horlitz, M.,
 488 Liersch, R., Schulze-Bahr, E., Wilde, A., Kääh, S., Koster, J., Rudy, Y., Le Marec, H. & Schott, J.J.
 489 Ventricular fibrillation with prominent early repolarization associated with a rare variant of
 490 KCNJ8/KATP channel. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **20**, 93-8 (2009).
- 491 17. Watanabe, H., Nogami, A., Ohkubo, K., Kawata, H., Hayashi, Y., Ishikawa, T., Makiyama,
 492 T., Nagao, S., Yagihara, N., Takehara, N., Kawamura, Y., Sato, A., Okamura, K., Hosaka, Y., Sato,
 493 M., Fukae, S., Chinushi, M., Oda, H., Okabe, M., Kimura, A., Maemura, K., Watanabe, I., Kamakura,
 494 S., Horie, M., Aizawa, Y., Shimizu, W. & Makita, N. Electrocardiographic characteristics and SCN5A
 495 mutations in idiopathic ventricular fibrillation associated with early repolarization. *Circ. Arrhythm.*
 496 *Electrophysiol.* **4**, 874-81 (2011).
- 497 18. Watanabe, H., Makiyama, T., Koyama, T., Kannankeril, P.J., Seto, S., Okamura, K., Oda, H., Itoh,
 498 H., Okada, M., Tanabe, N., Yagihara, N., Kamakura, S., Horie, M., Aizawa, Y. & Shimizu W. High
 499 prevalence of early repolarization in short QT syndrome. *Heart Rhythm* **7**, 647–652 (2010).
- 500 19. Ghosh, S., Cooper, D.H., Vijayakumar, R., Zhang, J., Pollak, S., Haïssaguerre, M. & Rudy, Y. Early
 501 repolarization associated with sudden death: insights from noninvasive electrocardiographic imaging.
 502 *Heart Rhythm* **7**, 534–537 (2010).
- 503 20. Pott, C., Philipson, K. D. & Goldhaber, J. I. Excitation-contraction coupling in Na⁺-Ca²⁺ exchanger
 504 knockout mice: reduced transsarcolemmal Ca²⁺ flux. *Circ. Res.* **97**, 1288–1295 (2005).
- 505 21. Pott, C. *et al.* Mechanism of shortened action potential duration in Na⁺-Ca²⁺ exchanger knockout
 506 mice. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **292**, C968–973 (2007).
- 507 22. Le Scouarnec, S., Karakachoff, M., Gourraud, J.-B., Lindenbaum, P., Bonnaud, S., Portero, V.,
 508 Duboscq-Bidot, L., Daumy, X., Simonet, F., Teusan, R., Baron, E., Violleau, J., Persyn, E., Bellanger,
 509 L., Barc, J., Chatel, S., Martins, R., Mabo, P., Sacher, F., Haïssaguerre, M., Kyndt, F., Schmitt, S.,

- 510 Béziau, S., Le Marec, H., Dina, C., Schott, J.J., Probst, V. & Redon R. Testing the burden of rare
 511 variation in arrhythmia-susceptibility genes provides new insights into molecular diagnosis for Brugada
 512 syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 2757–2763 (2015).
- 513 23. O’Hara, T., Virág, L., Varró, A. & Rudy, Y. Simulation of the undiseased human cardiac ventricular
 514 action potential: model formulation and experimental validation. *PLoS Comput. Biol.* **7**, e1002061
 515 (2011).
- 516 24. Langenbacher, A. D. *et al.* Mutation in sodium–calcium exchanger 1 (NCX1) causes cardiac
 517 fibrillation in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 17699–17704 (2005).
- 518 25. Zhang, T. *et al.* LQTS mutation N1325S in cardiac sodium channel gene SCN5A causes
 519 cardiomyocyte apoptosis, cardiac fibrosis and contractile dysfunction in mice. *Int. J. Cardiol.* **147**, 239–
 520 245 (2011).
- 521 26. Sipido, K. R., Volders, P. G. A., Vos, M. A. & Verdonck, F. Altered Na/Ca exchange activity in
 522 cardiac hypertrophy and heart failure: a new target for therapy? *Cardiovasc. Res.* **53**, 782–805 (2002).
- 523 27. Xu, L. *et al.* Analysis of Na(+)/Ca(2+) exchanger (NCX) function and current in murine cardiac
 524 myocytes during heart failure. *Mol. Biol. Rep.* **39**, 3847–3852 (2012).
- 525 28. Pogwizd, S. M., Schlotthauer, K., Li, L., Yuan, W. & Bers, D. M. Arrhythmogenesis and Contractile
 526 Dysfunction in Heart Failure: Roles of Sodium-Calcium Exchange, Inward Rectifier Potassium Current,
 527 and Residual β -Adrenergic Responsiveness. *Circulation Research* **88**, 1159–1167 (2001).
- 528 29. Pott, C., Goldhaber, J. I. & Philipson, K. D. Homozygous Overexpression of the Na⁺-Ca²⁺
 529 Exchanger in Mice. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1099**, 310–314 (2007).
- 530 30. Benito, B., Guasch, E., Rivard, L. & Nattel, S. Clinical and mechanistic issues in early repolarization:
 531 of normal variants and lethal arrhythmia syndromes. *J. Am. Coll. Cardiol.* **5**, 1177-86 (2010).

- 532 31. Sonoda, K., Watanabe, H., Hisamatsu, T., Ashihara, T., Ohno, S., Hayashi, H., Horie, M., &
533 Minamino, T. High Frequency of Early Repolarization and Brugada-Type Electrocardiograms in
534 Hypercalcemia. *Ann Noninvasive Electrocardiol* **21**, 30–40 (2016).
- 535 32. Gaborit, N., Le Bouter, S., Szuts, V., Varro, A., Escande, D., Nattel, S. & Demolombe, S. Regional
536 and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart. *J. Physiol.*
537 **582**, 675–693 (2007).
- 538 33. Levitsky, D. O., Nicoll, D. A. & Philipson, K. D. Identification of the high affinity Ca²⁺-binding
539 domain of the cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchanger. *J. Biol. Chem.* **269**, 22847–22852 (1994).
- 540 34. John, S. A., Ribalet, B., Weiss, J. N., Philipson, K. D. & Ottolia, M. Ca²⁺-dependent structural
541 rearrangements within Na⁺-Ca²⁺ exchanger dimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 1699–1704
542 (2011).

543

544 **Table 1: Clinical parameters of the patients carrying rare variants in *SLC8A1* gene**

Variants	Protein	p.P687HfsX2	IVS8+2T>C	p.E578G	p.P940S		p.L218H
	Nucleotide	c. 2060 delC	2269+2T>C	c. 1733 A>G	c. 2828 C>T		c. 653 T>A
Age (years)		18	31	32	55	15	43
Diagnosis		SQT + JW	SQT + JW	SQT + JW	SQT	JW	SQT + JW
VF		VF + RCA	No, syncope	VF + RCA	No, palpitation + angor	No, syncope	VF
ECG	QTc (ms)	286	317	329	320	336	331
	ER	Slur	Slur & notch	Slur	No	Slur	Slur & notch

545

546 Abbreviations are: SQT, short QT interval; JW, J wave; VF, ventricular fibrillation; RCA, resuscitated cardiac arrest; ER, early repolarization

547

548

Figure legends549 **Figure 1: Electrocardiographic patterns and identification of rare variants in patients with early**550 **repolarization syndrome (ERS) and shortened QT interval. A.** Top. Sequencing result showing551 deletion of a nucleotide C at position 2060 in the *SLC8A1* gene. Bottom. Pedigree of the family with the552 c.delC 2060 variant in the *SLC8A1* gene. Squares represent males and circles represent females.

553 Individuals presenting an ER pattern and/or a shortened QT interval are in black whereas others are in

554 white. Mutation carriers are marked by +/- whereas non-carriers are marked by -/-. The proband is

555 marked with an arrow. He had a QTc of 286 ms and ER patterns (red arrows). He also had episodes of

556 VF and a resuscitated cardiac arrest. **B.** Top. Sequencing result showing the variant c.1733 A>G in the557 *SLC8A1* gene. Bottom. Representative ECG of an index case presenting with an ERS (ER patterns are

558 indicated by red arrows) associated with a shortened QT interval (QTc = 329 ms). The patient had a

559 resuscitated cardiac arrest. **C.** Top. Sequencing result showing the variant c.2818 C>T in the *SLC8A1*560 gene. Bottom. Representative ECG of an individual carrying the variant c.2818 C>T in the *SLC8A1*561 gene. He presented a QTc of 336 ms and ER patterns (red arrows). **D.** Top. Pedigree of a family with562 the c.2269 +2T>C variant in the *SLC8A1* gene. Bottom. Representative ECG of the proband, who

563 showed an ERS (ER patterns are indicated by red arrows) associated with a short QT interval (QTc =

564 317 ms). **E.** Representative ECG of an individual carrying the c.653 T>A variant in the *SLC8A1* gene.565 He showed a QTc of 331 ms, an ER pattern (red arrows) and episodes of VF. **F.** Scheme of NCX1

566 showing the location of 4 newly identified variants. Numbers indicate the 10 transmembrane segments

567 of the exchanger. XIP: 20-amino acids auto-inhibitory segment. CBD1/2: Ca²⁺-binding domains on the

568 intracellular regulatory f-loop of NCX1.

569

570 **Figure 2: NCX1 variants induce a decrease in NCX1 current (I_{NCX}).** **A-F.** Representative I_{NCX} traces571 before and during cell perfusion with 5 mM Ni²⁺ (left) and corresponding I-V curves obtained from the572 +80 mV to -120 mV voltage ramp (right), in COS-7 cells transfected with WT NCX1 (**A**), GFP (**B**),573 p.P687HfsX2 NCX1 (**C**), p.E578G NCX1 (**D**), p.P940S NCX1 (**E**) and p.L218H NCX1 (**F**). Green574 curves: before Ni²⁺ perfusion. Red curves: during Ni²⁺ perfusion. Blue curves: Ni²⁺-sensitive current. **G.**575 I_{NCX} current densities calculated at +50 mV in each condition (n = 10-15 cells). ** *P* < 0.01, *** *P* <576 0.001 *versus* NCX1 WT (Mann-Whitney U test).

577

578 **Figure 3: NCX1 variants reduce Ca^{2+} uptake through NCX1.** Na/Ca exchange was measured as
579 intracellular Na-dependent $^{45}\text{Ca}_o$ uptake. The graph shows the individual values ($n = 6-42$ experiments)
580 and corresponding mean \pm SEM of ^{45}Ca oscillations (in counts per minute) in COS-7 stably expressing
581 WT NCX1, p.P687HfsX2 NCX1, p.E578G NCX1, p.P940S NCX1 or p.L218H NCX1. Cells transfected
582 with empty plasmid (pcDNA3.1) were used as controls. *** $P < 0.001$ versus NCX1 WT (Mann-
583 Whitney U test).

584

585 **Figure 4: Defects in sarcolemmal expression of 3 out of 4 NCX1 mutants.** **A.** Representative three-
586 dimensional acquisition of immunostained COS-7 cells expressing myc-tagged (green) WT NCX1,
587 p.E578G NCX1, p.P687HfsX2 NCX1, p.P940S NCX1 or p.L218H NCX1. Nuclei are stained in blue.
588 The graphs above each picture represent the pixel intensity of the nucleus (blue curve) and of the myc-
589 tagged exchanger (green curve) along the white dash line. Scale bar = 10 μm . **B.** Representative Western
590 blots of myc-tagged NCX1 (double bands, red arrows) of the total (top) and biotinylated (bottom)
591 fractions from transfected COS-7 cells. Western Blot analyses of glyceraldehyde-3-phosphate
592 dehydrogenase (GAPDH) confirmed that biotinylated fractions were not contaminated by cytoplasmic
593 proteins whereas GAPDH was present in total cell lysates (TCL). Transferrin receptor (TransR), which
594 is sarcolemmal, acted as a second control and was concentrated in the biotinylated fraction. **C.** NCX1
595 expression from biotinylated fraction of each sample was normalized to TransR expression in the same
596 blot and then expressed relative to WT NCX1 ($n = 4-29$ transfections). * $P < 0.05$ versus WT NCX1
597 (Mann-Whitney U test).

598

599 **Figure 5: *In silico* model of NCX1 loss of function predicts a shortening of both APD_{90} and QT**
600 **durations and changes in Ca^{2+} transients.** **A.** Simulated 1 000th action potentials with $I_{\text{NCX}} = 100\%$
601 (black) or 50% (red) of its WT maximal conductance at steady-state at a cycle length of 1,000 ms (left)
602 and corresponding simulated values of APD_{90} (right) obtained from the single human mid-myocardial
603 ventricular cell model. **B.** The transmural wedge model, comprising sub-epicardial, mid-myocardial and
604 sub-endocardial cells (left), predicts a shortening of the QT interval duration in 50% I_{NCX} conditions
605 compared to 100% I_{NCX} condition at steady-state (1,000th beat). The model also predicts the appearance

606 of an ER pattern (red arrow) on the pseudo-ECG when I_{NCX} is reduced by 50%. **C.** Superimposed 1st to
607 100th $[Ca^{2+}]_i$ transients (left) and representation of 1st to 500th $[Ca^{2+}]_i$ transients with time until steady-
608 state (right) in 100% or 50% I_{NCX} conditions. Note that the $[Ca^{2+}]_i$ at the peak of $[Ca^{2+}]_i$ transients is
609 predicted to reach more than 2 μM in 50% I_{NCX} condition *versus* about 1.2 μM in the control condition.

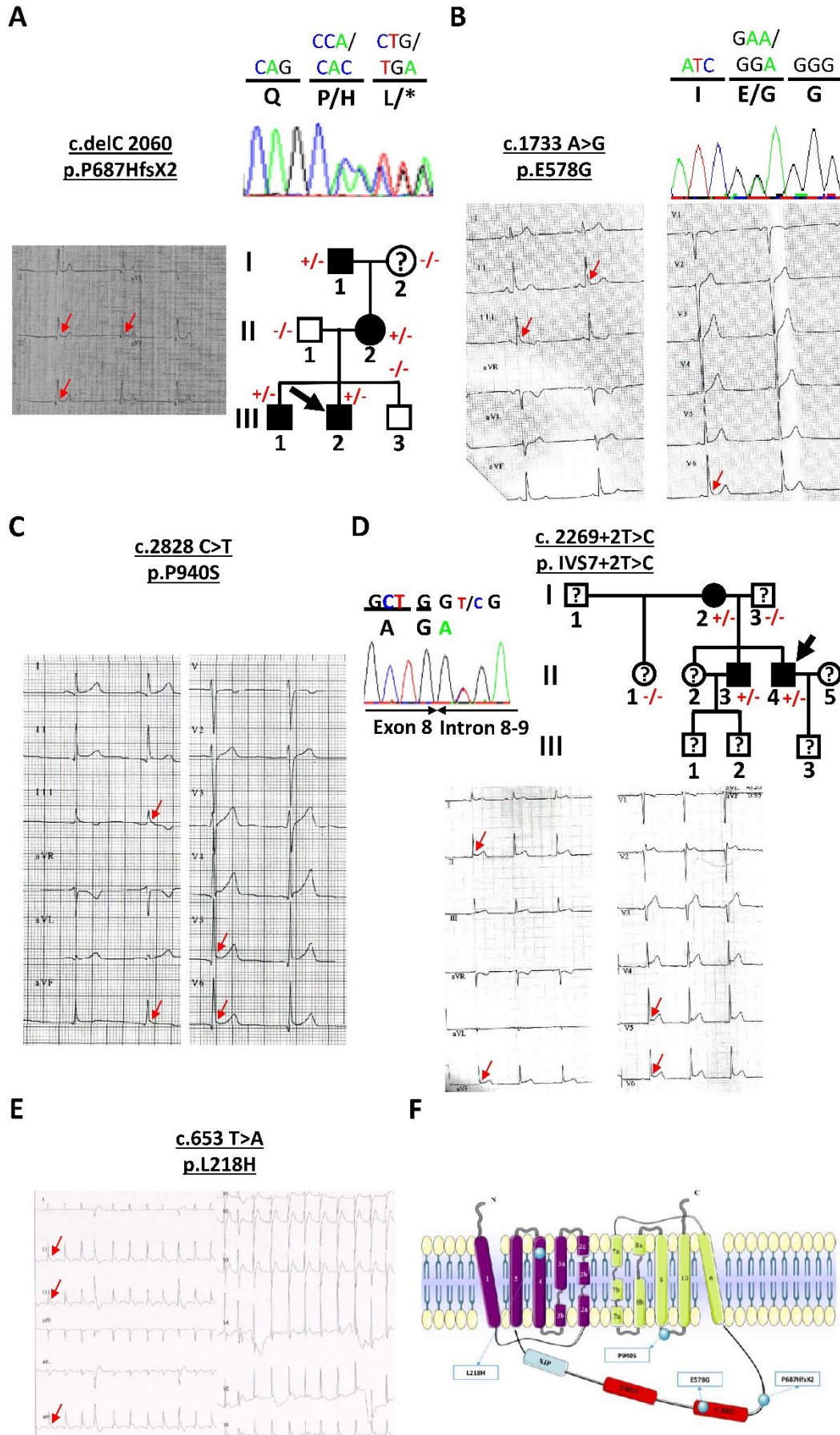


Figure 1

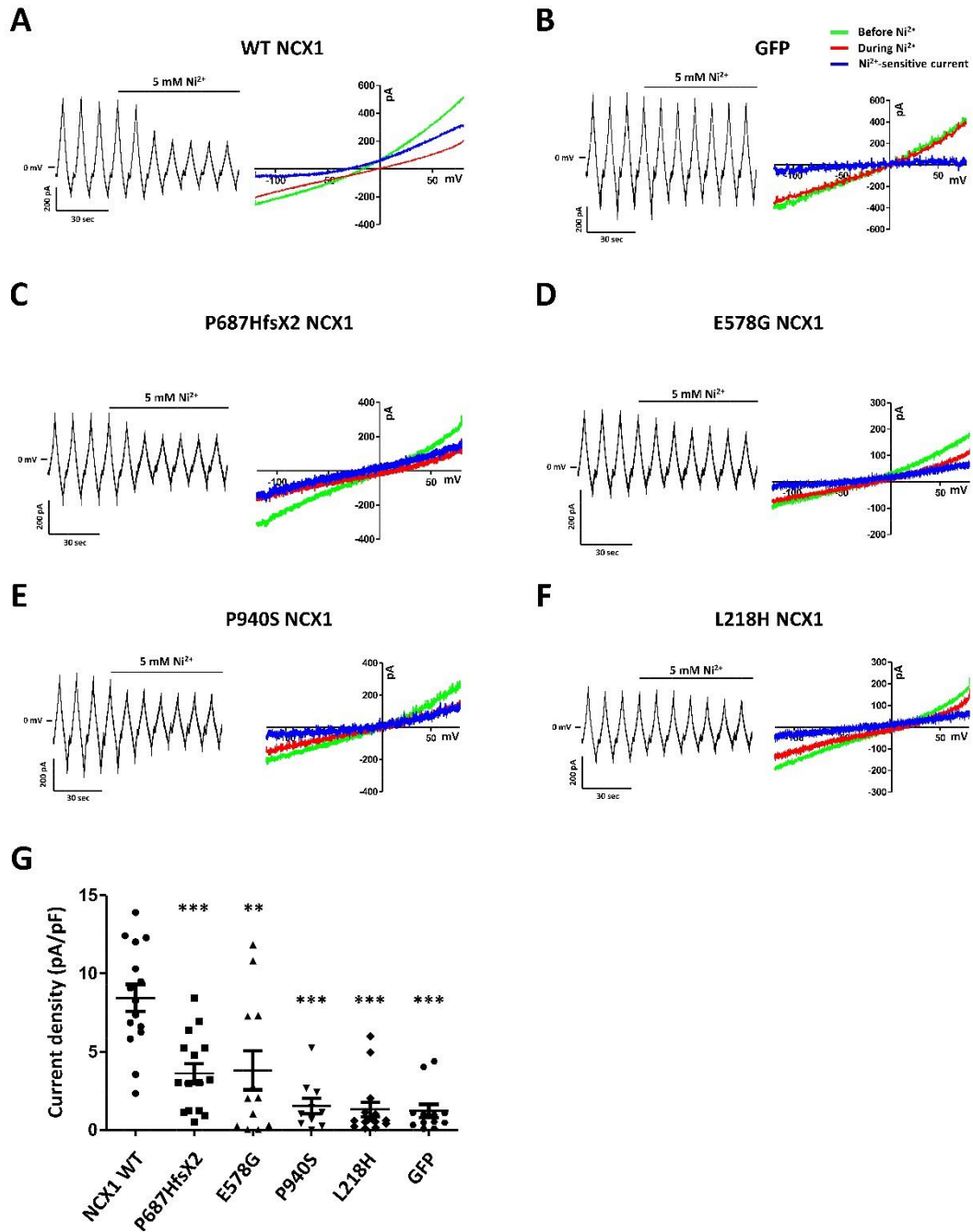


Figure 2

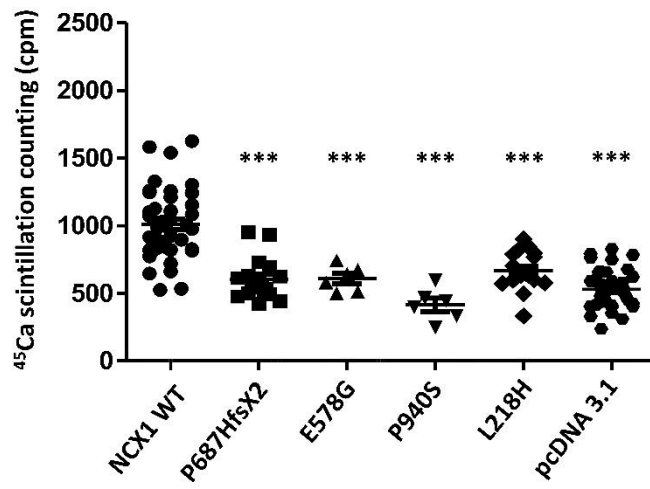


Figure 3

A

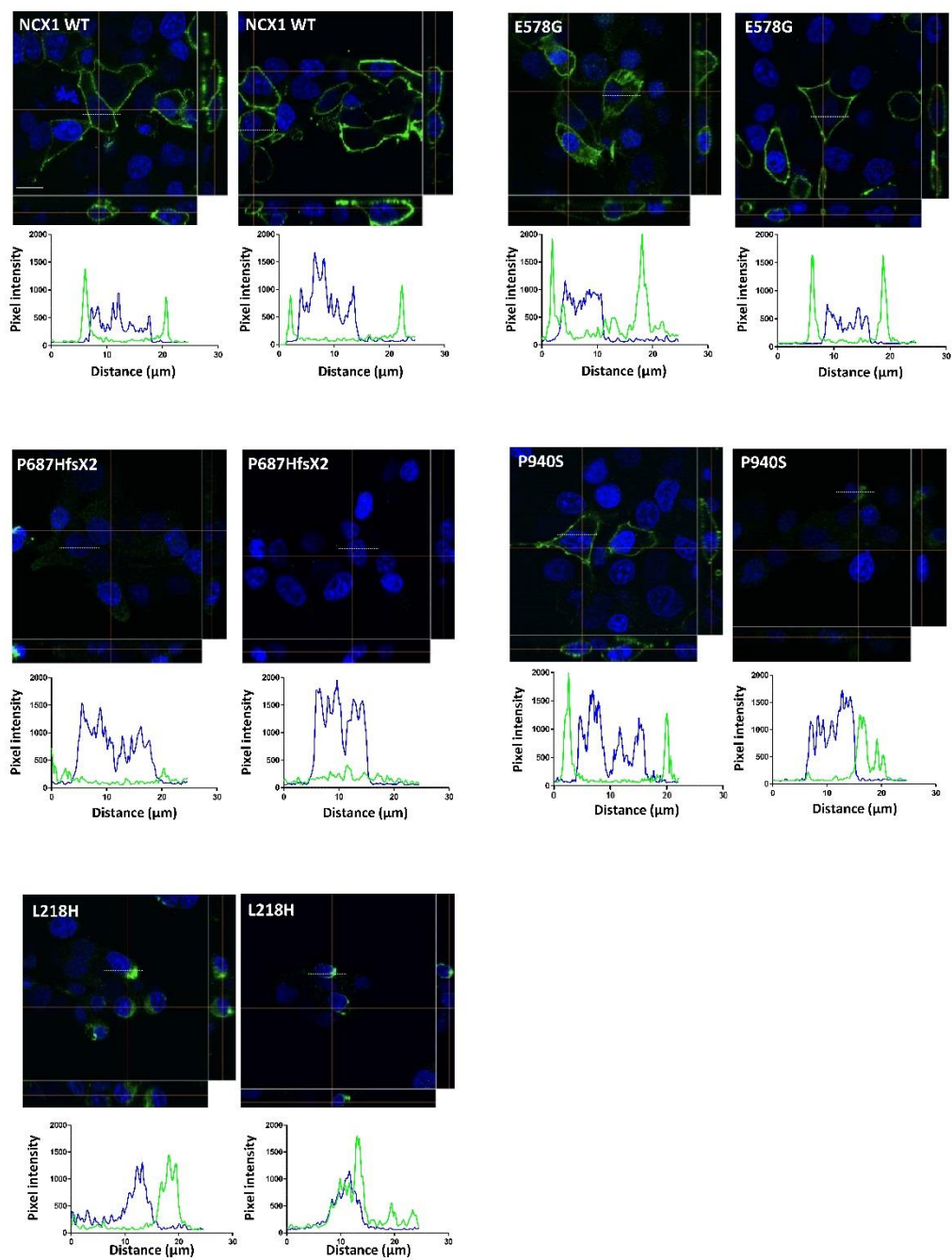


Figure 4 (1)

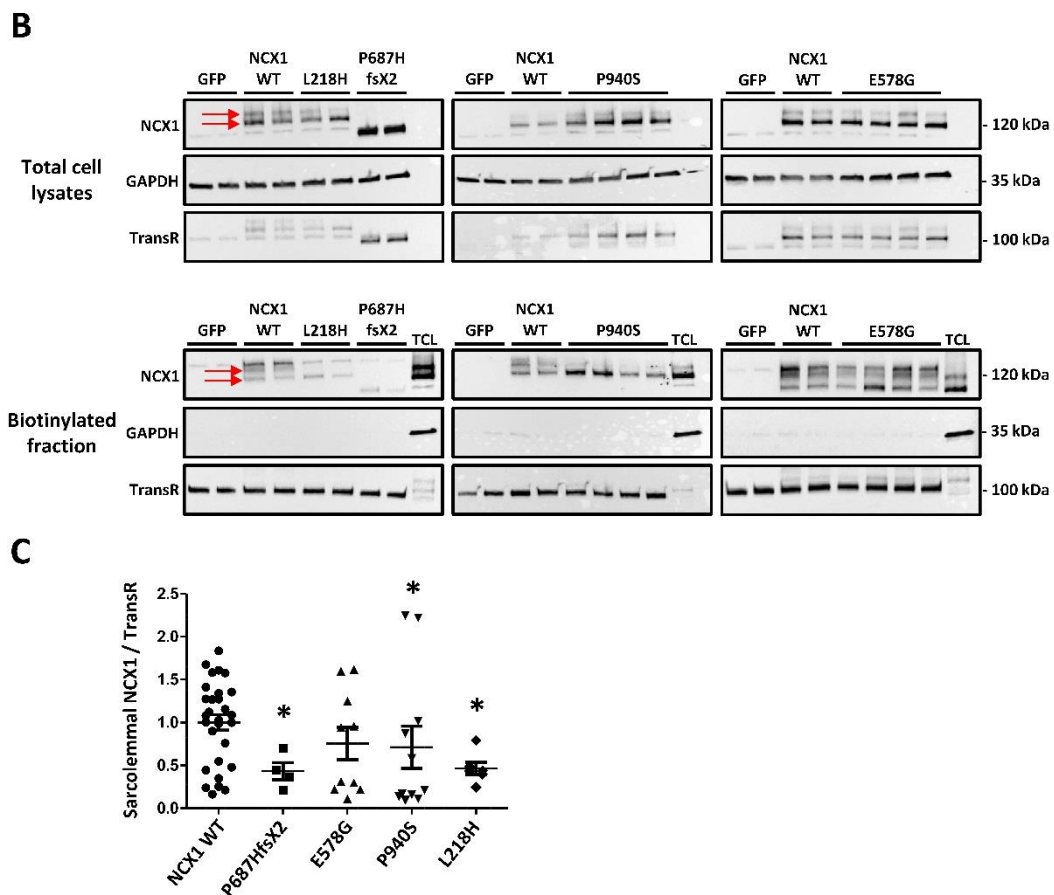


Figure 4 (2)

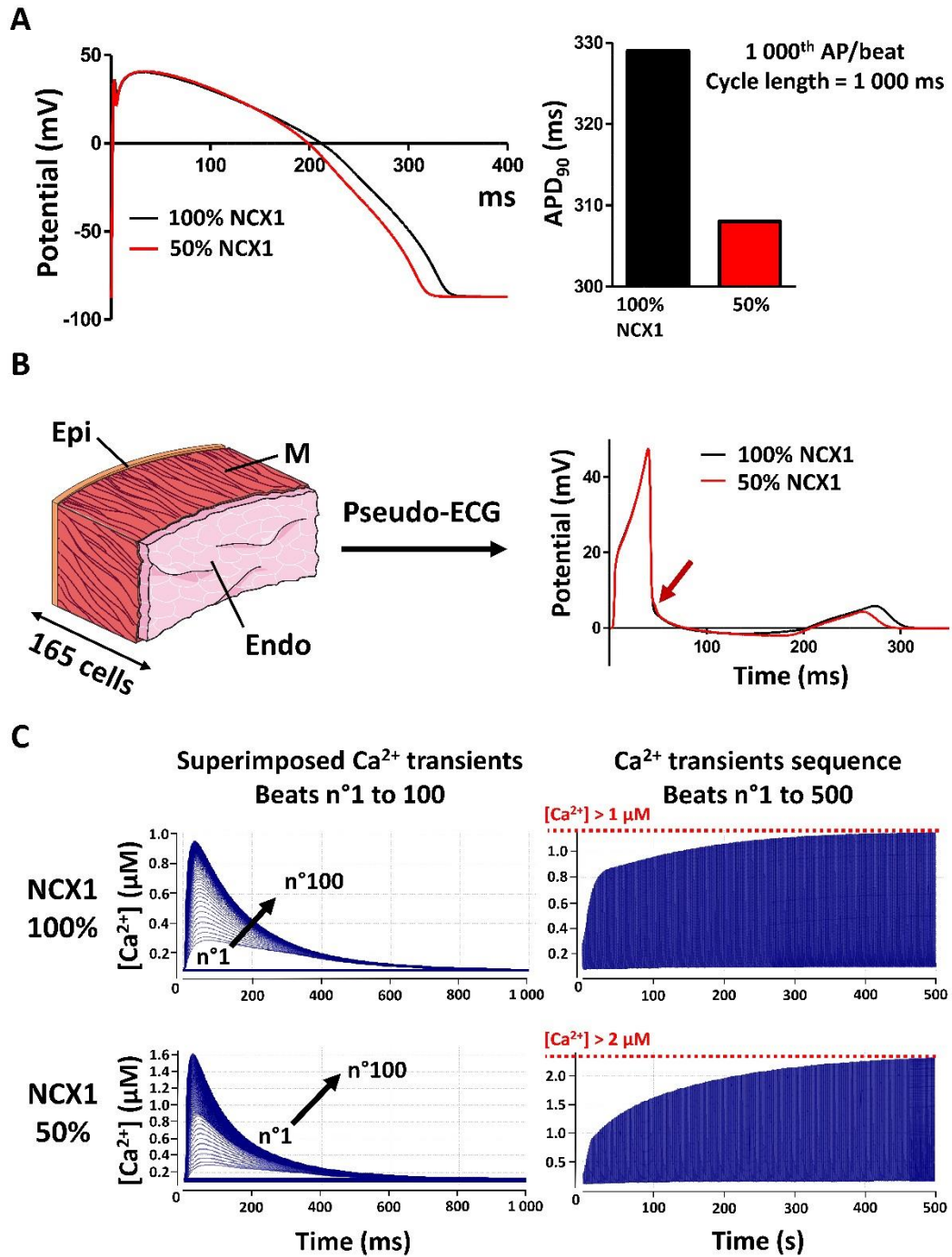


Figure 5

1 **Early repolarization syndrome and shortened QT interval associated with loss-of-**
2 **function of the NCX1 exchanger**

3 Franck F. Chizelle^{1*}, Taisuke Ishikawa^{2*}, Julien Barc^{1*}, Florence Kyndt¹, Jean-Baptiste Gourraud³,
4 Vincent Probst³, Gildas Loussouarn¹, Richard Redon^{1,3}, Naomasa Makita^{2#}, Flavien Charpentier^{1#},
5 Jean-Jacques Schott^{1,3#5}

6
7 **Online supplemental data**

8 **Supplemental figure 1: Electrocardiographic patterns of 2 affected relatives in pedigrees**
9 **expressing the c.delC 2060 or c.2269 +2T>C variant in the *SLC8A1* gene. A.** Representative ECGs
10 of the proband's mother (II-2, ER patterns are indicated by red arrows, QTc = 376 ms) and brother (III-
11 1, QTc = 316 ms) expressing the c.delC 2060 variant in the *SLC8A1* gene. **B.** Representative ECGs of
12 the proband's mother (I-2, ER patterns are indicated by red arrows, QTc = 402 ms) and brother (II-3,
13 QTc = 346 ms) expressing the c. 2269 +2T>C variant in the *SLC8A1* gene.

14
15 **Supplemental figure 2: NCX1 mutations induce a decrease in I_{NCX} without changes in COS-7 cells**
16 **membrane capacitances. A.** Average data of I_{NCX} at various potentials during the ramp protocol,
17 measured as the Ni^{2+} -sensitive current (n = 10-15 cells). **B.** COS-7 membrane capacitances calculated
18 in the different conditions.

19
20 **Supplemental figure 3: Predicted NCX1 loss-of-function effects on action potential duration of**
21 **sub-endocardial, mid-myocardial and sub-epicardial cardiomyocytes and on pseudo-ECG at**
22 **1,000 ms and 500 ms cycle lengths. A.** Simulated 1,000th action potentials from human sub-endocardial
23 (top), mid-myocardial (middle) and sub-epicardial (bottom) ventricular cardiomyocytes with I_{NCX} =
24 100% (black) or 50% (red) of its WT maximal conductance at steady-state at cycle length of 1,000 ms
25 (left) or 500 ms (right) and **B.** corresponding simulated values of APD₉₀. **C.** Simulated pseudo-ECG at
26 steady-state (1,000th beat) from the transmural wedge model in conditions of I_{NCX} = 100% (black) or
27 50% (red) of its WT maximal conductance, at cycle lengths of 1 000 ms (left) or 500 ms (right).

28

29 **Supplemental figure 4: Predicted mutations effects on Ca^{2+} transients in sub-endocardial, mid-**
30 **myocardial and sub-epicardial cardiomyocytes at 1 000 ms cycle length.** Superimposed 1st to 100th
31 Ca^{2+} transients (left) and representation of 1st to 500th Ca^{2+} transients with time until steady-state (right)
32 in 100% or 50% I_{NCX} conditions in cardiomyocytes from sub-endocardial, mid-myocardial and sub-
33 epicardial. Note that the $[\text{Ca}^{2+}]$ at the peak of Ca^{2+} transients is predicted to be 2 times higher in 50%
34 I_{NCX} condition *versus* the control condition in the 3 cell types.

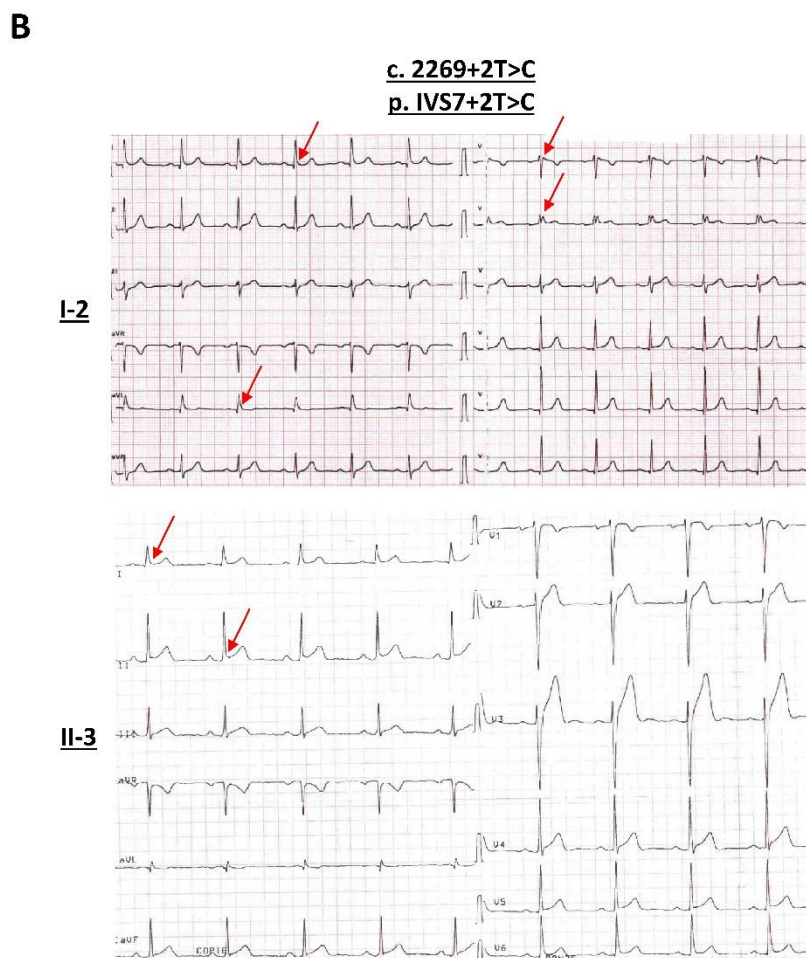
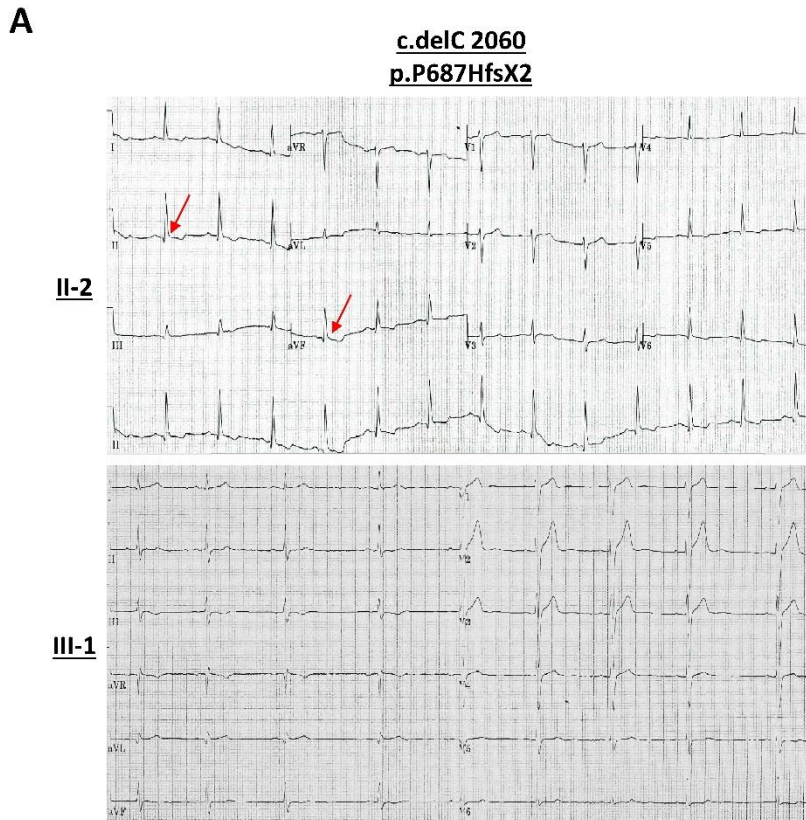


Figure S1

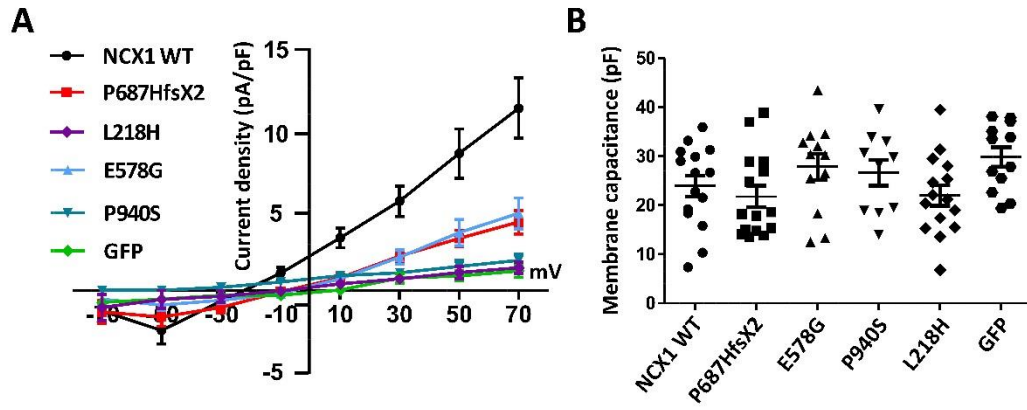


Figure S2

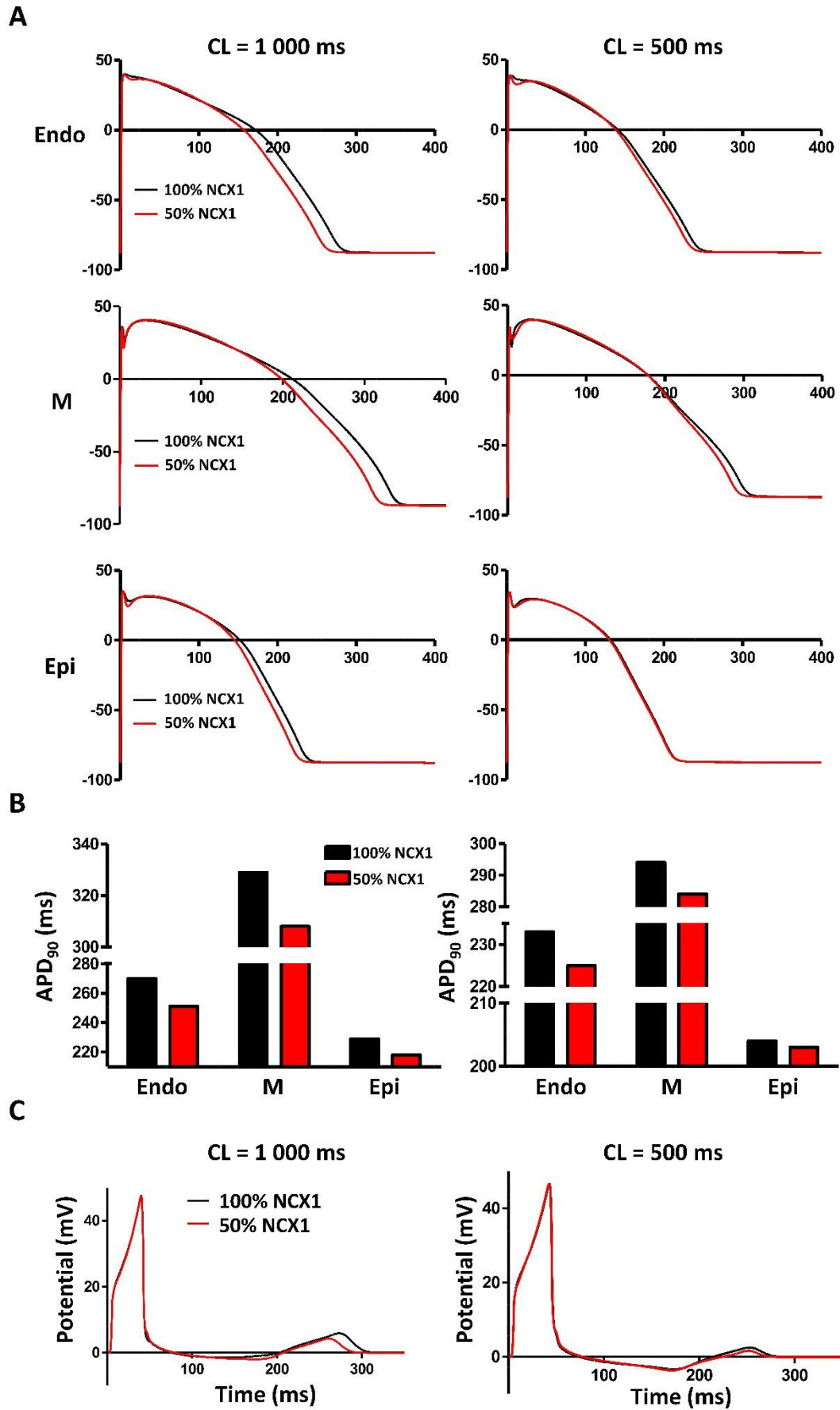


Figure S3

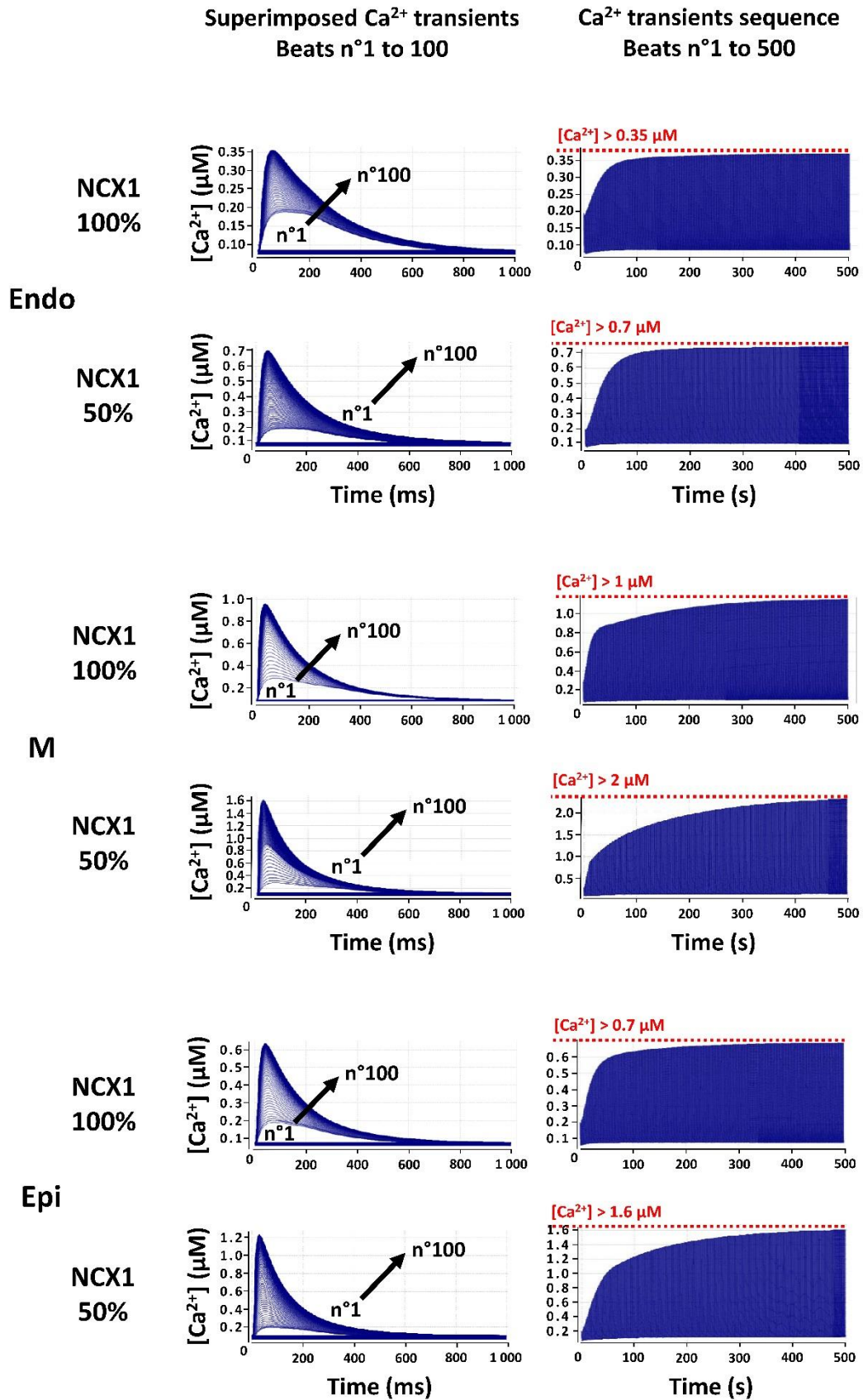


Figure S4

Chapitre 4

DISCUSSION GÉNÉRALE

Discussion générale

L'activité électrique cardiaque est régie par le fonctionnement de canaux, échangeurs ou transporteurs ioniques exprimés à la membrane plasmique des cardiomyocytes. L'activité de ces protéines est finement régulée, notamment par le gradient électrochimique environnant ou l'interaction avec des protéines partenaires. La présence de mutations sur des gènes codant pour ces canaux ou échangeurs peut être responsable de troubles du rythme cardiaque héréditaires, incluant des pathologies perturbant la repolarisation cardiaque, comme le SQTL, le SRP ou le SQTC. L'identification et la caractérisation fonctionnelle de mutations induisant de telles pathologies chez les patients permettent de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques sous-jacents. En outre, cela facilite une prise en charge personnalisée des individus en fonction du gène muté et de la protéine dont la fonction est altérée.

Des mutations de type gain de fonction sur le gène *SCN5A*, qui code pour Nav1.5, sont responsables du SQTL de type 3, qui représente environ 10% des SQTL congénitaux, parfois associés à des atteintes structurales du myocarde. La prise en charge pharmacologique des patients souffrant d'un SQTL de type 3 est discutée, notamment au vu du développement de nouveaux inhibiteurs de Nav1.5. Ces molécules, qui ciblent de façon plus ou moins spécifique la composante persistante du courant sodique passant par Nav1.5, semblent avoir des effets bénéfiques sur les patients, particulièrement en regard des β -bloquants classiquement prescrits en clinique, en remplacement ou en association avec ces derniers. Le nombre restreint de modèles d'étude du SQTL de type 3 freine le développement de thérapies pour cette pathologie.

Le SRP et le SQTC sont des maladies dont la découverte est beaucoup plus récente et les mécanismes physiopathologiques encore mal compris. Comme le SQTL, elles sont associées à un phénotype sévère chez les individus atteints, et prédisposent à un risque élevé de mort subite cardiaque. Seuls 7 gènes ont été liés à des SQTC congénitaux et 5 à des SRP jusqu'à aujourd'hui, et des études complémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre l'origine de ces maladies et développer des traitements pharmacologiques en vue d'une meilleure prise en charge des patients.

Ainsi, au cours de cette thèse, le premier objectif a été de caractériser un nouveau modèle d'étude de SQTL de type 3 associé à une cardiomyopathie structurale : les souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP}. Suite à cette caractérisation, ce travail a porté sur l'identification des mécanismes

moléculaires à l'origine de la pathologie dans ce modèle, ainsi que sur l'administration de molécules pharmacologiques aux effets potentiellement bénéfiques sur le phénotype de ces animaux.

Le second projet a visé à identifier et à réaliser la caractérisation fonctionnelle des premières mutations sur le gène *SLC8A1*, qui code pour l'échangeur cardiaque NCX1, induisant une pathologie chez l'Homme : un SRP associé à un raccourcissement de l'intervalle QT.

I. Projet 1 : Les souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP}, un nouveau modèle

d'étude du SQTl de type 3 associé à une cardiomyopathie.

Au cours du premier projet de cette thèse, la caractérisation des souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP} a montré que ces animaux mimaient assez fidèlement le phénotype observé chez les patients porteurs de la mutation 1507-1509 delQKP sur *SCN5A*. En effet, nous avons pu montrer que les souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP} présentent un allongement de l'intervalle QTc, des défauts de conduction et des troubles du rythme ventriculaire dès l'âge de 2 semaines, suivis de défauts structuraux visibles à 4 semaines et d'une mortalité prématurée. L'étude des mécanismes moléculaires sous-jacents a montré qu'une augmentation du courant I_{NaLate} était à l'origine de l'allongement du PA. De plus, des perturbations du cycle du Ca^{2+} sont mises en jeu, incluant des transitoires calciques plus amples et aux cinétiques ralenties, associés à une plus grande charge en Ca^{2+} du RS. L'étude de l'expression des protéines clés du cycle du Ca^{2+} a mis en évidence une diminution d'activation de la CaMKII, allant de pair avec une diminution de la phosphorylation des cibles de cette dernière. Plus en amont dans cette voie de signalisation, une diminution d'expression de la CaM semble être à l'origine de cette baisse d'activité de la CaMKII. En outre, une hausse de l'incidence de vagues calciques spontanées est corrélée à la présence d'EADs sur les enregistrements de PA ventriculaires. La ranolazine, au contraire des β -bloquants, prévient partiellement la prolongation des PA et de l'intervalle QTc dans ce modèle.

Il est intéressant de noter que, comme chez les patients porteurs de la mutation, les souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP} présentent une certaine hétérogénéité phénotypique. En effet, parmi les individus des 2 familles dans laquelle ségrége la mutation 1507-1509 delQKP, certains possèdent un allongement de l'intervalle QTc associés à des syncopes, mais sans altérations structurales du myocarde ni mort subite (Keller et al., 2003). En 2008, Shi et ses collaborateurs ont identifié la même mutation chez des individus au phénotype beaucoup plus sévère, incluant des épisodes de fibrillation ventriculaire fréquents chez des sujets très jeunes, une cardiomyopathie dilatée, et des morts subites dans les 3 générations de la famille étudiée (Shi et al., 2008). Les souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP}, pour leur part, présentent donc, au vu des symptômes décrits ci-dessus, un phénotype s'apparentant plutôt à celui de la deuxième famille étudiée. Néanmoins, certaines de ces souris décèdent très tôt (une médiane de survie de 5,4 semaines est observée) tandis qu'environ 20% de leur congénères survivent jusqu'à 10 semaines, une majorité de ce dernier

groupe montrant un rythme sinusal à l'ECG. La survenue de tachycardies ou fibrillations ventriculaires semble donc être corrélée à une mort prématurée de ces animaux. D'autre part, l'hypertrophie du myocarde mesurée chez les souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP} n'est pas retrouvée chez tous les individus. Nous n'avons malheureusement pas encore pu corrélérer l'âge de la mort des animaux avec les atteintes structurales du cœur, du fait de la difficulté de dater précisément le décès de l'animal et de prélever le cœur assez rapidement après l'observation de celui-ci. Le modèle semble donc montrer, comme chez les patients, une certaine hétérogénéité phénotypique.

L'origine de l'allongement de l'intervalle QTc chez les souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP} réside dans l'augmentation du courant I_{NaLate} , comme cela avait pu être montré pour la même mutation en système de réexpression hétérologue (Keller et al., 2003). Cependant, alors que Keller et ses collaborateurs avaient démontré un décalage de la courbe d'activation de Nav1.5 vers des potentiels plus positifs, nous avons plutôt observé un décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus positifs. Cela est en accord avec la localisation de la délétion, au niveau de la boucle reliant les domaines III et IV du canal, qui joue un rôle important dans le processus d'inactivation de ce dernier (Ulbricht, 2005).

Les défauts structuraux et les anomalies du cycle du Ca^{2+} semblent apparaître dans un second temps, à la suite des troubles du rythme. Ces observations laissent à penser que l'apparition d'un bloc auriculo-ventriculaire et la répétition de tachycardies ou de fibrillations ventriculaires pourraient fragiliser la structure du cœur, et mener aux atteintes structurales de celui-ci. Une étude sur la mutation R222Q de *SCN5A* appuie cette théorie puisque, selon ses auteurs, la répétition d'épisodes arythmiques chez les porteurs de ce mutant est la cause de la cardiomyopathie dilatée observée chez ces individus. En effet, dans cette étude, la prévention des arythmies prévient, voire fait régresser, la cardiomyopathie dilatée (Laurent et al., 2012).

A l'échelle cellulaire, les cardiomyocytes isolés de souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP} montrent des défauts du déroulement des transitoires calciques. La simulation *in silico* des effets de la mutation prédit en outre une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ diastolique. Ces désordres de l'homéostasie calcique intracellulaire sont sans doute la conséquence de l'augmentation de la $[Na^+]_i$ causée par la hausse du courant I_{NaLate} . Ce phénomène a déjà été décrit, et repose sur une augmentation de la fonctionnalité et/ou de l'expression de NCX1. En effet, la variation du gradient

électrochimique dans le compartiment sous membranaire induit une augmentation de la fonctionnalité de l'échangeur en mode inverse, qui va alors extruder plus d'ions Na^+ et donc faire entrer plus de Ca^{2+} dans le cytosol (Bers, 2008; Sipido et al., 1997). Ceci illustre bien les liens entre des désordres des homéostasies sodique et calcique pouvant survenir dans un contexte de troubles du rythme cardiaque, et souligne le rôle clé joué par NCX1 dans la transition entre une hausse de la $[\text{Na}^+]_i$ et des désordres subséquents de l'homéostasie calcique.

Les perturbations de l'homéostasie calcique observées sont associées à un remodelage de l'expression des protéines du cycle du Ca^{2+} , et notamment d'une diminution de l'expression de la CaM, qui pourrait avoir pour conséquence la diminution de l'activation de la CaMKII que nous avons pu démontrer. Ces observations vont à l'encontre de ce qui est habituellement décrit dans d'autres modèles d'insuffisance cardiaque (Luo and Anderson, 2013) ou chez les souris exprimant *SCN5A-N1325S* (Yao et al., 2011). Cependant, la formation préalable d'un complexe Ca^{2+} -CaM est indispensable à l'activation de cette voie, et les modèles précédemment cités ne rapportent pas ce phénomène. La diminution d'expression de CaM pourrait constituer un remodelage adaptatif du fait de l'augmentation des influx de Na^+ et de Ca^{2+} durant le PA, que l'on sait prolongé. D'autre part, la CaM interagit avec Nav1.5 (Deschênes et al., 2002; Kim et al., 2004; Tan et al., 2002; Wang et al., 2012), et même si aucune modification de l'interaction entre celle-ci et Nav1.5 n'est observée chez les souris *Scn5a^{+ΔQKP}*, d'autres protéines comme la N-Cadherin voient leur interaction avec Nav1.5 modifiée dans notre modèle. De plus, une désorganisation des réseaux d' α -actinine 2 et de tubules t ont été démontrés. Cela souligne le rôle non-canonique de Nav1.5 dans la structure des cellules cardiaques, et les modifications d'interaction entre Nav1.5 et les composants du complexe macromoléculaire dont il fait partie pourraient participer aux défauts structuraux décrits dans notre étude. De telles altérations ont d'ailleurs été suggérées comme étant impliquées dans la dysplasie arythmogène du ventricule droit, un autre type de cardiomyopathie (Te Riele et al., 2017).

L'administration de β -bloquants constitue le traitement de choix pour les patients souffrant d'un SQTl (Priori et al., 2015). Cependant, lorsque celui-ci est causé par des mutations sur *SCN5A*, leur administration est discutée. Comme dans une autre étude chez l'Homme sur des patients atteints d'un SQTl de type 3 (Moss et al., 2008), la ranolazine a montré des effets bénéfiques en administration aigue sur les souris *Scn5a^{+ΔQKP}*. Ces effets peuvent être la conséquence d'une inhibition du courant I_{NaLate} , ce qui souligne la nécessité de développer de nouveaux inhibiteurs du courant I_{NaLate} , dans la lignée des molécules de dernière

génération comme le GS967. Les souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP} sont actuellement utilisées comme modèle d'étude du SQTl de type 3 associé à une cardiomyopathie structurale, pour analyser si une administration chronique d'inhibiteurs du courant I_{NaLate} permet de prévenir l'apparition des troubles du rythme et les atteintes structurales.

II. Projet 2 : Identification et caractérisation fonctionnelle

des premiers variants rares sur le gène *SLC8A1* associés à un SRP et un raccourcissement de l'intervalle QT.

La seconde partie de cette thèse a consisté à réaliser la caractérisation fonctionnelle des premiers variants rares sur le gène *SLC8A1*. Un séquençage d'exome haut débit sur des gènes cibles ou sur un panel de gènes candidats codant pour des canaux ou échangeurs ioniques cardiaques et leurs protéines partenaires a été réalisé sur des patients présentant un aspect de repolarisation précoce à l'ECG, associé à un raccourcissement de l'intervalle QTc et la survenue d'épisodes de fibrillation ventriculaire. Six cas index ont ainsi pu être identifiés, possédant chacun une mutation sur le gène *SLC8A1*, qui code pour NCX1. La caractérisation fonctionnelle de 4 de ces variants en système de réexpression hétérologue a permis de montrer que les mutations aboutissaient à des pertes de fonction sévères de NCX1, de l'ordre de 65% à 95%, au niveau électrique (diminution de la densité de courant I_{NCX}) et au niveau de l'internalisation du Ca^{2+} *via* l'échangeur, en comparaison de la forme humaine sauvage de NCX1. Ces pertes de fonction ont été corrélées à des diminutions de l'expression sarcolemmique de NCX1 pour 3 des 4 mutations étudiées. Pour comprendre de quelle manière ces mutations de *SLC8A1* pouvaient être responsables du phénotype observé chez les patients porteurs des variants, les effets d'une perte de fonction de 50% de NCX1 ont été simulés à l'aide d'un modèle informatique. Cette simulation prédit, comme chez les patients, l'apparition d'un aspect de repolarisation précoce sur le pseudo-ECG, ainsi qu'un raccourcissement de l'intervalle QT, ayant comme origine une diminution de la durée du PA ventriculaire. En outre, ce modèle a également prédit des défauts au niveau du décours des transitoires calciques à l'échelle du cardiomyocyte. Finalement, ce travail a permis de faire émerger un nouveau gène impliqué dans le SRP associé à un raccourcissement de l'intervalle QT, et a mis à jour NCX1 comme potentielle cible thérapeutique dans ce contexte.

Des augmentations de la fonction ou de l'expression de NCX1 ont déjà été décrites dans d'autres pathologies cardiaques, telles que l'insuffisance cardiaque (Sipido et al., 2002; Xu et al., 2012) ou le SQTl (Zhang et al., 2011). Cependant, à l'inverse de notre étude, ces modifications se trouvent être secondaires, causées par une pathologie cardiaque déjà établie et

de cause connue. Un seul modèle comprenant une mutation sur *SLC8A1* a été généré, chez le poisson zèbre, et montre, de façon intéressante, l'apparition de fibrillations cardiaque chez ces animaux (Langenbacher et al., 2005).

Notre étude est en accord avec les données relevées chez les souris *Slc8a1*^{-/-}, dans lesquelles l'absence de NCX1 est la cause, de façon assez logique, d'un raccourcissement de la durée du PA ventriculaire (Pott et al., 2005, 2007a). Les souris surexprimant NCX1 au niveau du cœur présentent, elles, un allongement du PA ventriculaire, semblable à ce qui est retrouvé dans le cas d'un SQT (Pott et al., 2007b).

Peu d'études décrivant des SQT congénitaux se sont intéressées aux mécanismes moléculaires (autres que des modifications du courant passant par la protéine mutée) mis en jeu pour expliquer le phénotype présent chez les patients. Néanmoins, comme c'est le cas pour 3 des 4 mutations étudiées dans cette thèse, 2 études ont démontré que des défauts d'expression sarcolemmique des protéines mutées étaient responsables du phénotype décrit. Ces travaux concernent des mutations perte de fonction touchant le canal Cav1.2 (Antzelevitch et al., 2007) et l'échangeur Cl⁻/HCO₃⁻ (Thorsen et al., 2017). Le cas de la mutation E578G de NCX1, qui provoque des pertes de fonction de NCX1 sans défauts de localisation de l'échangeur, implique probablement d'autres mécanismes physiopathologiques. Du fait de la localisation de la mutation, qui remplace un acide aminé chargé négativement par un acide aminé neutre sur un domaine de liaison au Ca²⁺, il est envisageable que cette mutation induise des défauts biophysiques de NCX1 et perturbe le transport des ions Ca²⁺ et/ou Na⁺. Un tel phénomène est d'ailleurs observé lorsque des mutations ponctuelles sont induites sur ce domaine de liaison, avec une abolition quasiment totale du transport de Ca²⁺ via l'échangeur muté (Levitsky et al., 1994).

La mutation P687HfsX2 de NCX1 provoque une expression sarcolemmique quasiment nulle de l'échangeur, un phénomène plus ou moins attendu puisque cette mutation induit une protéine tronquée comprenant seulement environ 2 tiers de la séquence d'acides aminés totale de la protéine native. Cependant, de façon surprenante, lorsque cette mutation est exprimée en cellules COS-7, un courant d'échange I_{NCX} non-nul est mesuré, équivalent à 50% de celui mesuré dans la condition sauvage. Une hypothèse pour expliquer la présence de ce courant réside dans une potentielle dimérisation des protéines NCX1 tronquées. En effet, un tel phénomène concernant NCX1 a déjà été décrit dans la littérature (John et al., 2011). Cependant, il n'est pas à exclure que ce résultat, plutôt contre-intuitif, soit la cause du modèle utilisé dans

notre travail. En effet, des différences entre les résultats obtenus relatifs à l'étude d'une même mutation dans différents modèles ont déjà été relevées, notamment entre les systèmes de réexpression hétérologues et les souris knock-in (Watanabe et al., 2011a).

Un travail sur le premier modèle de SQTC basé sur l'utilisation de cardiomyocytes dérivés de cellules souches pluripotentes induites de patients atteints d'un SQTC congénital dû à une mutation sur le gène *KCNH2*, a révélé un potentiel nouveau mécanisme physiopathologique pouvant être à la source du phénotype des patients (El-Battrawy et al., 2018). Dans cette étude, les auteurs ont relevé que, en plus des diminutions des durées des périodes réfractaires, des désordres de l'homéostasie calcique intracellulaire pourraient faire partie du phénotype des patients victimes d'un SQTC congénital. En particulier, une forte incidence d'évènements arythmogènes sur l'enregistrement de transitoires calciques est observée sur les cellules dérivées de patients exprimant la mutation, ainsi qu'une hausse des $[Ca^{2+}]_i$ diastoliques et systoliques. Dans notre travail, la modélisation *in silico* des effets de pertes de fonction de NCX1 a aussi prédit des modifications du déroulement des transitoires calciques, ce qui corrobore le fait que des modifications des $[Ca^{2+}]_i$ pourraient participer aux mécanismes physiopathologiques dans un contexte de raccourcissement de l'intervalle QTc.

Les travaux réalisés au cours du second projet de cette thèse, mis en perspective avec les autres études s'intéressant au SQTC et aux modèles de souris surexprimant ou sous-exprimant NCX1, appuient l'idée selon laquelle NCX1 pourrait devenir une cible pharmacologique dans un contexte de maladie de la repolarisation cardiaque. En effet, le développement d'inhibiteurs de NCX1, dans le cas d'un SQTL, ou d'activateurs, dans le cas d'un SQTC, pourrait revêtir un réel enjeu thérapeutique. De telles molécules activatrices et inhibitrices de NCX1 ont été développées au cours des 40 dernières années (Annunziato et al., 2004; Reuter et al., 2002). Cependant, ces molécules manquent de sélectivité et aucune n'est capable de différencier les différentes isoformes et variants d'épissages de NCX1. Compte tenu des nombreux rôles autres que cardiaques joués par les différentes isoformes de NCX, il est nécessaire d'augmenter la sélectivité des inhibiteurs ou activateurs de NCX. De plus, il sera indispensable de prendre en compte, au moment d'utiliser de telles molécules et de statuer sur leur ratio bénéfice/risque, leur action non-seulement sur l'activité électrique du myocarde mais également sur l'homéostasie calcique intracellulaire.

Conclusion et perspectives

Ces travaux de thèse ont permis d'améliorer les connaissances concernant les mécanismes physiopathologiques de maladies de la repolarisation ventriculaire prédisposant à la survenue de mort subite cardiaque. Notre étude a été scindée en 2 parties, basées chacune sur un modèle d'étude distinct. La première partie a porté sur la caractérisation d'un nouveau modèle de SQTl de type 3 basé sur des souris knock-in, la compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu, et le test de molécules pharmacologiques à potentiels effets bénéfiques. La seconde partie a permis d'identifier des mutations sur le gène *SLC8A1* responsables d'un SRP associé à un raccourcissement de l'intervalle QTc. La caractérisation fonctionnelle de ces mutants a ensuite été réalisée en système de réexpression hétérologue.

Au cours de ces travaux, nous avons pu voir qu'à l'intérieur des cardiomyocytes, de fines régulations des flux de Na^+ et de Ca^{2+} influent sur les propriétés électriques et mécaniques du myocarde. Des dérégulations des homéostasies sodique et calcique intracellulaires contribuent aux mécanismes physiopathologiques de maladies rythmiques cardiaques, et une meilleure compréhension de ces phénomènes aiderait au développement de nouvelles thérapies. Nous avons pu voir que de telles dérégulations des flux de Na^+ et de Ca^{2+} dans le cardiomyocyte étaient retrouvées dans le SQTl et le SQTc. L'échangeur NCX1 étant la seule protéine responsable d'un échange d'ions Na^+ et d'ions Ca^{2+} , le développement d'inhibiteurs et d'activateurs spécifiques de l'isoforme cardiaque de cet échangeur pourrait constituer de potentielles pistes thérapeutiques. La génération de telles molécules nécessitera cependant dans un premier temps de comprendre quels sont les mécanismes moléculaires et cellulaires de régulation spécifiques des différentes isoformes et variants d'épissage de NCX. Des études sur les relations structure-fonction des différentes isoformes et variants de l'échangeur, et notamment de leur boucle régulatrice, serviront sans doute au design de nouvelles molécules plus spécifiques. De plus, un modèle permettant un screening haut-débit d'inhibiteurs ou d'activateurs de NCX1 devra être développé.

Les 2 projets traités au cours de cette thèse ont pu mettre en évidence la complémentarité des deux modèles d'étude choisis dans la compréhension des mécanismes à l'origine de pathologies de la repolarisation ventriculaire, en vue du développement de nouvelles thérapies. Un modèle cellulaire de surexpression nous a permis de tester *in vitro*, lors d'une première approche, les conséquences de mutations nouvellement identifiées, sur la fonction et l'expression de la protéine impactée, en l'occurrence NCX1, et de mettre en avant cette dernière comme potentielle nouvelle cible thérapeutique. Un modèle murin nouvellement développé,

basé sur une mutation déjà connue, a permis de tester des molécules thérapeutiques *in vivo* basées sur l'identification préalable des mécanismes physiopathologiques mis en jeu.

Il serait intéressant de tester l'effet d'au moins une des mutations de NCX1 nouvellement identifiées induisant un SQTC dans un modèle de souris knock-in. La génération d'une telle lignée de souris est actuellement en cours. L'étude de ces animaux nous permettra de compléter l'étude effectuée en cellules COS-7 dans un contexte plus physiologique et d'explorer les mécanismes physiopathologiques du SRP associé à un raccourcissement de l'intervalle QTc lié à des mutations sur le gène *SLC8A1*. En particulier, des expériences de cartographie électrique sur des cœurs isolés perfusés nous permettraient de valider la diminution de la durée des PRE comme étant à l'origine des arythmies dans cette pathologie. De plus, des enregistrements des sparks et vagues calciques sur des cardiomyocytes isolés permettraient de renforcer ou infirmer l'hypothèse selon laquelle des troubles de l'homéostasie calcique intracellulaire feraient partie des mécanismes physiopathologiques dans le SRP et le SQTC. Toujours sur des cellules isolées, il serait intéressant d'analyser si, comme chez les souris *Slc8a1^{-/-}*, une perte de fonction de NCX1 est corrélée à une diminution du courant $I_{Ca,L}$ et à une hausse du courant I_{to} , des mécanismes décrits comme étant à la base du raccourcissement de la durée du PA.

A l'heure actuelle, les modèles d'étude basés sur des cardiomyocytes dérivés d'iPSC de patients permettent de s'orienter vers le développement de traitements plus personnalisés. La génération de telles lignées à partir de patients possédant une mutation sur le gène *SLC8A1* pourraient également permettre l'étude des mécanismes moléculaires mis en jeu dans le SRP associé à un raccourcissement de l'intervalle QT et de développer des traitements personnalisés, possiblement basés sur des activateurs de NCX1. Cependant, ce modèle possède lui aussi ses propres limites, notamment concernant le niveau de maturité de ces cellules. En particulier, les cardiomyocytes dérivés d'iPSC présentent un manque de tubules t, une organisation sarcomérique réduite et des différences au niveau de l'influx et de l'efflux de Ca^{2+} en regard de cardiomyocytes adultes, ce qui est dommageable pour l'étude de pathologies mettant en jeu des potentiels troubles de l'homéostasie calcique intracellulaire (Garg et al., 2018). L'étude de cardiomyocytes dérivés d'iPSC sous forme de tissu, sans individualisation des cellules par une digestion enzymatique, pourrait permettre à la fois de réduire ces défauts d'organisation, mais aussi de réaliser des études de la conduction électrique au sein de ce tissu pour mettre en évidence là aussi d'éventuelles modifications de la durée des PRE.

Au cours de cette thèse, nous avons pu voir que les mécanismes arythmogènes du SQTl et du SQTC aboutissant à l'apparition de fibrillations ventriculaires semblaient être différents.

Pour le premier, la survenue d'EADs (Fabritz et al., 2003b) semble être le phénomène déclencheur des épisodes arythmiques, tandis qu'une diminution des PRE paraît en être la cause dans un contexte de SQTC (Tse et al., 2016). Néanmoins, si ces 2 pathologies présentent des phénotypes opposés au niveau du décours du PA, ce dernier étant prolongé dans un cas et raccourci dans l'autre, les conséquences de ces modifications aboutissent dans les 2 cas à une dispersion transmurale de la repolarisation au sein de la paroi myocardique (Tse et al., 2017). En effet, l'augmentation ou la diminution de la durée du PA entraîne une hausse de l'écart maximal des durées des PA entre les différentes couches des parois ventriculaires, cela favorisant la réexcitation du tissu myocardique. Cette observation pose la question de l'utilisation de l'intervalle QTc comme marqueur du risque arythmique en clinique et de son manque de précision notamment. D'autres marqueurs, plus représentatifs de la dispersion de l'intervalle QT, ont donc été proposés, prenant en compte l'intervalle entre le pic et la fin de l'onde T, et sont plus adaptés à l'évaluation du risque arythmique dans le cadre de pathologies de la repolarisation ventriculaire (Xia et al., 2005). Ainsi, la poursuite de la compréhension des mécanismes physiopathologiques dans des contextes de maladies de la repolarisation cardiaque permettra d'affiner l'évaluation du risque arythmique chez les patients.

Bibliographie

Abriel, H. (2007). Roles and regulation of the cardiac sodium channel Nav1.5: Recent insights from experimental studies. *Cardiovasc Res* 76, 381–389.

Abriel, H., and Zaklyazminskaya, E.V. (2013). Cardiac channelopathies: genetic and molecular mechanisms. *Gene* 517, 1–11.

Abriel, H., Cabo, C., Wehrens, X.H., Rivolta, I., Motoike, H.K., Memmi, M., Napolitano, C., Priori, S.G., and Kass, R.S. (2001). Novel arrhythmogenic mechanism revealed by a long-QT syndrome mutation in the cardiac Na⁽⁺⁾ channel. *Circ. Res.* 88, 740–745.

Abriel, H., Rougier, J.-S., and Jalife, J. (2015). Ion Channel Macromolecular Complexes in Cardiomyocytes: Roles in Sudden Cardiac Death. *Circulation Research* 116, 1971–1988.

Ackerman, M.J., Priori, S.G., Willems, S., Berul, C., Brugada, R., Calkins, H., Camm, A.J., Ellinor, P.T., Gollob, M., Hamilton, R., et al. (2011). HRS/EHRA expert consensus statement on the state of genetic testing for the channelopathies and cardiomyopathies: this document was developed as a partnership between the Heart Rhythm Society (HRS) and the European Heart Rhythm Association (EHRA). *Europace* 13, 1077–1109.

Ahern, C.A., Zhang, J.-F., Wookalis, M.J., and Horn, R. (2005). Modulation of the cardiac sodium channel Nav1.5 by Fyn, a Src family tyrosine kinase. *Circ. Res.* 96, 991–998.

Ahn, J., Kim, H.J., Choi, J.-I., Lee, K.N., Shim, J., Ahn, H.S., and Kim, Y.-H. (2017). Effectiveness of beta-blockers depending on the genotype of congenital long-QT syndrome: A meta-analysis. *PLoS ONE* 12, e0185680.

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

Ali, A., Butt, N., and Sheikh, A.S. (2015). Early repolarization syndrome: A cause of sudden cardiac death. *World J Cardiol* 7, 466–475.

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

Amin, A.S., Asghari-Roodsari, A., and Tan, H.L. (2010). Cardiac sodium channelopathies. *Pflugers Arch.* 460, 223–237.

Andersen Ellen Damgaard, Krasilnikoff Peter A., and Overvad Hans (1971). Intermittent muscular weakness, extrasystoles, and multiple developmental anomalies. *Acta Paediatrica* 60, 559–564.

Annunziato, L., Pignataro, G., and Renzo, G.F.D. (2004). Pharmacology of Brain Na⁺/Ca²⁺ Exchanger: From Molecular Biology to Therapeutic Perspectives. *Pharmacol Rev* 56, 633–654.

Antoons, G., Volders, P.G.A., Stankovicova, T., Bitó, V., Stengl, M., Vos, M.A., and Sipido, K.R. (2007). Window Ca²⁺ current and its modulation by Ca²⁺ release in hypertrophied cardiac myocytes from dogs with chronic atrioventricular block. *J. Physiol. (Lond.)* 579, 147–160.

Antzelevitch, C. (1999). Ion channels and ventricular arrhythmias: cellular and ionic mechanisms underlying the Brugada syndrome. *Curr. Opin. Cardiol.* 14, 274–279.

Antzelevitch, C. (2007a). Heterogeneity and cardiac arrhythmias: an overview. *Heart Rhythm* 4, 964–972.

Antzelevitch, C. (2007b). Role of spatial dispersion of repolarization in inherited and acquired sudden cardiac death syndromes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293, H2024–H2038.

Antzelevitch, C., and Burashnikov, A. (2011). Overview of Basic Mechanisms of Cardiac Arrhythmia. *Card Electrophysiol Clin* 3, 23–45.

Antzelevitch, C., and Yan, G.-X. (2010). J wave syndromes. *Heart Rhythm* 7, 549–558.

Antzelevitch, C., Sicouri, S., Litovsky, S.H., Lukas, A., Krishnan, S.C., Di Diego, J.M., Gintant, G.A., and Liu, D.W. (1991). Heterogeneity within the ventricular wall. Electrophysiology and pharmacology of epicardial, endocardial, and M cells. *Circ. Res.* 69, 1427–1449.

Antzelevitch, C., Yan, G.X., and Shimizu, W. (1999). Transmural dispersion of repolarization and arrhythmogenicity: the Brugada syndrome versus the long QT syndrome. *J Electrocardiol* 32 *Suppl*, 158–165.

Antzelevitch, C., Pollevick, G.D., Cordeiro, J.M., Casis, O., Sanguinetti, M.C., Aizawa, Y., Guerchicoff, A., Pfeiffer, R., Oliva, A., Wollnik, B., et al. (2007). Loss-of-function mutations in the cardiac calcium channel underlie a new clinical entity characterized by ST-segment elevation, short QT intervals, and sudden cardiac death. *Circulation* 115, 442–449.

Antzelevitch, C., Nesterenko, V., Shryock, J.C., Rajamani, S., Song, Y., and Belardinelli, L. (2014). The role of late I_{Na} in development of cardiac arrhythmias. *Handb Exp Pharmacol* 221, 137–168.

Ashamalla, S.M., Navarro, D., and Ward, C.A. (2001). Gradient of sodium current across the left ventricular wall of adult rat hearts. *J. Physiol. (Lond.)* 536, 439–443.

Ashpole, N.M., Herren, A.W., Ginsburg, K.S., Brogan, J.D., Johnson, D.E., Cummins, T.R., Bers, D.M., and Hudmon, A. (2012). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) regulates cardiac sodium channel NaV1.5 gating by multiple phosphorylation sites. *J. Biol. Chem.* 287, 19856–19869.

Attwell, D., Cohen, I., Eisner, D., Ohba, M., and Ojeda, C. (1979). The steady state TTX-sensitive (“window”) sodium current in cardiac Purkinje fibres. *Pflugers Arch.* 379, 137–142.

Baartscheer, A., Hardziyenka, M., Schumacher, C.A., Belterman, C.N.W., van Borren, M.M.G.J., Verkerk, A.O., Coronel, R., and Fiolet, J.W.T. (2008). Chronic inhibition of the Na⁺/H⁺ - exchanger causes regression of hypertrophy, heart failure, and ionic and electrophysiological remodelling. *Br. J. Pharmacol.* 154, 1266–1275.

Backs, J., Backs, T., Neef, S., Kreusser, M.M., Lehmann, L.H., Patrick, D.M., Grueter, C.E., Qi, X., Richardson, J.A., Hill, J.A., et al. (2009). The delta isoform of CaM kinase II is required for pathological cardiac hypertrophy and remodeling after pressure overload. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 2342–2347.

Baker, A.J. (2014). Adrenergic signaling in heart failure: a balance of toxic and protective effects. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* *466*, 1139–1150.

Baker, D.L., Hashimoto, K., Grupp, I.L., Ji, Y., Reed, T., Loukianov, E., Grupp, G., Bhagwat, A., Hoit, B., Walsh, R., et al. (1998). Targeted overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase increases cardiac contractility in transgenic mouse hearts. *Circ. Res.* *83*, 1205–1214.

Balser, J.R., Nuss, H.B., Chiamvimonvat, N., Pérez-García, M.T., Marban, E., and Tomaselli, G.F. (1996). External pore residue mediates slow inactivation in mu 1 rat skeletal muscle sodium channels. *J. Physiol. (Lond.)* *494 (Pt 2)*, 431–442.

Barajas-Martínez, H., Hu, D., Ferrer, T., Onetti, C.G., Wu, Y., Burashnikov, E., Boyle, M., Surman, T., Urrutia, J., Veltmann, C., et al. (2012). Molecular genetic and functional association of Brugada and early repolarization syndromes with S422L missense mutation in KCNJ8. *Heart Rhythm* *9*, 548–555.

Baroudi, G., Pouliot, V., Denjoy, I., Guicheney, P., Shrier, A., and Chahine, M. (2001). Novel mechanism for Brugada syndrome: defective surface localization of an SCN5A mutant (R1432G). *Circ. Res.* *88*, E78–E83.

Bartos, D.C., Grandi, E., and Ripplinger, C.M. (2015). Ion Channels in the Heart. *Compr Physiol* *5*, 1423–1464.

Bazett H. C. (2006). An analysis of the time-relations of electrocardiograms. *Annals of Noninvasive Electrocardiology* *2*, 177–194.

Belardinelli, L., Liu, G., Smith-Maxwell, C., Wang, W.-Q., El-Bizri, N., Hirakawa, R., Karpinski, S., Li, C.H., Hu, L., Li, X.-J., et al. (2013). A Novel, Potent, and Selective Inhibitor of Cardiac Late Sodium Current Suppresses Experimental Arrhythmias. *J Pharmacol Exp Ther* *344*, 23–32.

Belardinelli, L., Giles, W.R., Rajamani, S., Karagueuzian, H.S., and Shryock, J.C. (2015). Cardiac late Na⁺ current: proarrhythmic effects, roles in long QT syndromes, and pathological relationship to CaMKII and oxidative stress. *Heart Rhythm* *12*, 440–448.

Belhassen, B., Viskin, S., Fish, R., Glick, A., Setbon, I., and Eldar, M. (1999). Effects of electrophysiologic-guided therapy with Class IA antiarrhythmic drugs on the long-term outcome of patients with idiopathic ventricular fibrillation with or without the Brugada syndrome. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* *10*, 1301–1312.

Benhorin, J., Taub, R., Goldmit, M., Kerem, B., Kass, R.S., Windman, I., and Medina, A. (2000). Effects of flecainide in patients with new SCN5A mutation: mutation-specific therapy for long-QT syndrome? *Circulation* *101*, 1698–1706.

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

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

Bers, D.M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* *415*, 198–205.

Bers, D.M. (2008). Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu. Rev. Physiol.* *70*, 23–49.

Bers, D.M. (2014). Cardiac sarcoplasmic reticulum calcium leak: basis and roles in cardiac dysfunction. *Annu. Rev. Physiol.* *76*, 107–127.

Bers, D.M., and Morotti, S. (2014). Ca²⁺ current facilitation is CaMKII-dependent and has arrhythmogenic consequences. *Front Pharmacol* 5, 144.

Bers, D.M., and Perez-Reyes, E. (1999). Ca channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca influx and intracellular Ca release. *Cardiovasc. Res.* 42, 339–360.

Bers, D.M., Barry, W.H., and Despa, S. (2003). Intracellular Na⁺ regulation in cardiac myocytes. *Cardiovasc. Res.* 57, 897–912.

Besserer, G.M., Ottolia, M., Nicoll, D.A., Chaptal, V., Cascio, D., Philipson, K.D., and Abramson, J. (2007). The second Ca²⁺-binding domain of the Na⁺ Ca²⁺ exchanger is essential for regulation: crystal structures and mutational analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 18467–18472.

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

Bezzina, C.R., Rook, M.B., Groenewegen, W.A., Herfst, L.J., van der Wal, A.C., Lam, J., Jongasma, H.J., Wilde, A.A.M., and Mannens, M.M.A.M. (2003). Compound heterozygosity for mutations (W156X and R225W) in SCN5A associated with severe cardiac conduction disturbances and degenerative changes in the conduction system. *Circ. Res.* 92, 159–168.

Bezzina, C.R., Lahrouchi, N., and Priori, S.G. (2015). Genetics of sudden cardiac death. *Circ. Res.* 116, 1919–1936.

Blaustein, M.P., and Lederer, W.J. (1999). Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol. Rev.* 79, 763–854.

Boukens, B.J.D., Christoffels, V.M., Coronel, R., and Moorman, A.F.M. (2009). Developmental Basis for Electrophysiological Heterogeneity in the Ventricular and Outflow Tract Myocardium As a Substrate for Life-Threatening Ventricular Arrhythmias. *Circulation Research* 104, 19–31.

Boyett, M.R., Honjo, H., and Kodama, I. (2000). The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovasc. Res.* 47, 658–687.

Boyman, L., Hagen, B.M., Giladi, M., Hiller, R., Lederer, W.J., and Khananshvili, D. (2011). Proton-sensing Ca²⁺ binding domains regulate the cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *J. Biol. Chem.* 286, 28811–28820.

Braun, A.P., and Schulman, H. (1995). The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu. Rev. Physiol.* 57, 417–445.

Brini, M., and Carafoli, E. (2011). The plasma membrane Ca²⁺ ATPase and the plasma membrane sodium calcium exchanger cooperate in the regulation of cell calcium. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.

Brochet, D.X.P., Xie, W., Yang, D., Cheng, H., and Lederer, W.J. (2011). Quarky calcium release in the heart. *Circ. Res.* 108, 210–218.

Brodehl Andreas, Gaertner-Rommel Anna, Klauke Bärbel, Grewe Simon Andre, Schirmer Ilona, Peterschröder Andreas, Faber Lothar, Vorgerd Matthias, Gummert Jan, Anselmetti Dario, et al. (2017). The novel α B-crystallin (CRYAB) mutation p.D109G causes restrictive cardiomyopathy. *Human Mutation* 38, 947–952.

Burashnikov, A., and Antzelevitch, C. (1998). Acceleration-induced action potential prolongation and early afterdepolarizations. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 9, 934–948.

Burashnikov, E., Pfeiffer, R., Barajas-Martinez, H., Delpón, E., Hu, D., Desai, M., Borggrefe, M., Häissaguerre, M., Kanter, R., Pollevick, G.D., et al. (2010). Mutations in the cardiac L-type calcium channel associated with inherited J-wave syndromes and sudden cardiac death. *Heart Rhythm* 7, 1872–1882.

Burton, F.L., and Cobbe, S.M. (2001). Dispersion of ventricular repolarization and refractory period. *Cardiovasc. Res.* 50, 10–23.

Butters, T.D., Aslanidi, O.V., Inada, S., Boyett, M.R., Hancox, J.C., Lei, M., and Zhang, H. (2010). Mechanistic links between Na⁺ channel (SCN5A) mutations and impaired cardiac pacemaking in sick sinus syndrome. *Circ. Res.* *107*, 126–137.

Camors, E., and Valdivia, H.H. (2014). CaMKII regulation of cardiac ryanodine receptors and inositol triphosphate receptors. *Front Pharmacol* *5*, 101.

Carafoli, E. (1987). Intracellular calcium homeostasis. *Annu. Rev. Biochem.* *56*, 395–433.

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

Casini, S., Verkerk, A.O., van Borren, M.M.G.J., van Ginneken, A.C.G., Veldkamp, M.W., de Bakker, J.M.T., and Tan, H.L. (2009). Intracellular calcium modulation of voltage-gated sodium channels in ventricular myocytes. *Cardiovasc. Res.* *81*, 72–81.

Catterall, W.A. (1984). The molecular basis of neuronal excitability. *Science* *223*, 653–661.

Catterall, W.A. (2000). From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* *26*, 13–25.

Cerra, M.C., and Imbrogno, S. (2012). Phospholamban and cardiac function: a comparative perspective in vertebrates. *Acta Physiol (Oxf)* *205*, 9–25.

Cheitlin, M.D. (2003). Cardiovascular physiology-changes with aging. *Am J Geriatr Cardiol* *12*, 9–13.

Chen, W., Wang, R., Chen, B., Zhong, X., Kong, H., Bai, Y., Zhou, Q., Xie, C., Zhang, J., Guo, A., et al. (2014). The ryanodine receptor store-sensing gate controls Ca²⁺ waves and Ca²⁺-triggered arrhythmias. *Nat. Med.* *20*, 184–192.

Cheng, H., Lederer, W.J., and Cannell, M.B. (1993). Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science* *262*, 740–744.

- Cheng, H., Song, L.S., Shirokova, N., González, A., Lakatta, E.G., Ríos, E., and Stern, M.D. (1999). Amplitude distribution of calcium sparks in confocal images: theory and studies with an automatic detection method. *Biophys. J.* *76*, 606–617.
- Chin, D., and Means, A.R. (2000). Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol.* *10*, 322–328.
- Chiu, C., Bagnall, R.D., Ingles, J., Yeates, L., Kennerson, M., Donald, J.A., Jormakka, M., Lind, J.M., and Semsarian, C. (2010). Mutations in alpha-actinin-2 cause hypertrophic cardiomyopathy: a genome-wide analysis. *J. Am. Coll. Cardiol.* *55*, 1127–1135.
- Chou, A.-C., Ju, Y.-T., and Pan, C.-Y. (2015). Calmodulin Interacts with the Sodium/Calcium Exchanger NCX1 to Regulate Activity. *PLoS One* *10*.
- Clatot, J., Hoshi, M., Wan, X., Liu, H., Jain, A., Shinlapawittayatorn, K., Marionneau, C., Ficker, E., Ha, T., and Deschênes, I. (2017). Voltage-gated sodium channels assemble and gate as dimers. *Nat Commun* *8*.
- Cohen, A.W., Hnasko, R., Schubert, W., and Lisanti, M.P. (2004). Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol. Rev.* *84*, 1341–1379.
- Colatsky, T.J. (1982). Mechanisms of action of lidocaine and quinidine on action potential duration in rabbit cardiac Purkinje fibers. An effect on steady state sodium currents? *Circ. Res.* *50*, 17–27.
- Comtois, P., Kneller, J., and Nattel, S. (2005). Of circles and spirals: bridging the gap between the leading circle and spiral wave concepts of cardiac reentry. *Europace* *7 Suppl 2*, 10–20.
- Cook, S.J., Chamunorwa, J.P., Lancaster, M.K., and O'Neill, S.C. (1997). Regional differences in the regulation of intracellular sodium and in action potential configuration in rabbit left ventricle. *Pflugers Arch.* *433*, 515–522.

Coppini, R., Ferrantini, C., Yao, L., Fan, P., Del Lungo, M., Stillitano, F., Sartiani, L., Tosi, B., Suffredini, S., Tesi, C., et al. (2013). Late sodium current inhibition reverses electromechanical dysfunction in human hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* *127*, 575–584.

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

Couchonnal, L.F., and Anderson, M.E. (2008). The role of calmodulin kinase II in myocardial physiology and disease. *Physiology (Bethesda)* *23*, 151–159.

Coultrap, S.J., and Bayer, K.U. (2014). Nitric oxide induces Ca²⁺-independent activity of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII). *J. Biol. Chem.* *289*, 19458–19465.

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

Cunha, S.R., and Mohler, P.J. (2006). Cardiac ankyrins: Essential components for development and maintenance of excitable membrane domains in heart. *Cardiovasc. Res.* *71*, 22–29.

Dan M. Roden, Jeffrey R. Balsler, Alfred L. George Jr., and Anderson, M.E. (2002). Cardiac Ion Channels. *Annual Review of Physiology* *64*, 431–475.

Davis, B.A., Edes, I., Gupta, R.C., Young, E.F., Kim, H.W., Steenaart, N.A., Szymanska, G., and Kranias, E.G. (1990). The role of phospholamban in the regulation of calcium transport by cardiac sarcoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biochem.* *99*, 83–88.

De Bakker, J.M., Van Capelle, F.J., Janse, M.J., Tasseron, S., Vermeulen, J.T., de Jonge, N., and Lahpor, J.R. (1993). Slow conduction in the infarcted human heart. “Zigzag” course of activation. *Circulation* *88*, 915–926.

Dedkova, E.N., and Blatter, L.A. (2012). Measuring mitochondrial function in intact cardiac myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *52*, 48–61.

Delmar M. (1992). Role of Potassium Currents on Cell Excitability in Cardiac Ventricular Myocytes. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* *3*, 474–486.

Derangeon, M., Montnach, J., Cerpa, C.O., Jagu, B., Patin, J., Toumaniantz, G., Girardeau, A., Huang, C.L.H., Colledge, W.H., Grace, A.A., et al. (2017). Transforming growth factor β receptor inhibition prevents ventricular fibrosis in a mouse model of progressive cardiac conduction disease. *Cardiovasc. Res.* *113*, 464–474.

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

Despa, S., and Bers, D.M. (2013). Na⁺ transport in the normal and failing heart - remember the balance. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *61*, 2–10.

Despa, S., Islam, M.A., Weber, C.R., Pogwizd, S.M., and Bers, D.M. (2002). Intracellular Na⁽⁺⁾ concentration is elevated in heart failure but Na/K pump function is unchanged. *Circulation* *105*, 2543–2548.

Drouin, E., Charpentier, F., Gauthier, C., Laurent, K., and Le Marec, H. (1995). Electrophysiologic characteristics of cells spanning the left ventricular wall of human heart: evidence for presence of M cells. *J. Am. Coll. Cardiol.* *26*, 185–192.

Dumaine, R., Wang, Q., Keating, M.T., Hartmann, H.A., Schwartz, P.J., Brown, A.M., and Kirsch, G.E. (1996). Multiple mechanisms of Na⁺ channel--linked long-QT syndrome. *Circ. Res.* *78*, 916–924.

Durkin, J.T., Ahrens, D.C., Pan, Y.C., and Reeves, J.P. (1991). Purification and amino-terminal sequence of the bovine cardiac sodium-calcium exchanger: evidence for the presence of a signal sequence. *Arch. Biochem. Biophys.* *290*, 369–375.

- Dutta, M., Hanna, E., Das, P., and Steinhubl, S.R. (2006). Incidence and prevention of ischemic stroke following myocardial infarction: review of current literature. *Cerebrovasc. Dis.* 22, 331–339.
- Eichel, C.A., Beuriot, A., Chevalier, M.Y.E., Rougier, J.-S., Louault, F., Dilanian, G., Amour, J., Coulombe, A., Abriel, H., Hatem, S.N., et al. (2016). Lateral Membrane-Specific MAGUK CASK Down-Regulates NaV1.5 Channel in Cardiac Myocytes. *Circ. Res.* 119, 544–556.
- Eisner, D.A., Caldwell, J.L., Kistamás, K., and Trafford, A.W. (2017). Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. *Circulation Research* 121, 181–195.
- El-Battrawy, I., Lan, H., Cyganek, L., Zhao, Z., Li, X., Buljubasic, F., Lang, S., Yücel, G., Sattler, K., Zimmermann, W.-H., et al. (2018). Modeling Short QT Syndrome Using Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Journal of the American Heart Association* 7, e007394.
- El-Bizri, N., Xie, C., Liu, L., Limberis, J., Krause, M., Hirakawa, R., Nguyen, S., Tabuena, D.R., Belardinelli, L., and Kahlig, K.M. (2017). Eleclazine exhibits enhanced selectivity for LQT3-associated late INa. *Heart Rhythm*.
- Erickson, J.R. (2014). Mechanisms of CaMKII activation in the heart. *Front. Pharmacol.* 5, 59.
- Erickson, J.R., Joiner, M.A., Guan, X., Kutschke, W., Yang, J., Oddis, C.V., Bartlett, R.K., Lowe, J.S., O'Donnell, S.E., Aykin-Burns, N., et al. (2008). A Dynamic Pathway for Calcium-Independent Activation of CaMKII by Methionine Oxidation. *Cell* 133, 462–474.
- Erickson, J.R., Pereira, L., Wang, L., Han, G., Ferguson, A., Dao, K., Copeland, R.J., Despa, F., Hart, G.W., Ripplinger, C.M., et al. (2013). Diabetic hyperglycaemia activates CaMKII and arrhythmias by O-linked glycosylation. *Nature* 502, 372–376.
- Fabiato, A. (1985). Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. *J. Gen. Physiol.* 85, 247–289.

Fabritz, L., Kirchhof, P., Franz, M.R., Nuyens, D., Rossenbacker, T., Ottenhof, A., Haverkamp, W., Breithardt, G., Carmeliet, E., and Carmeliet, P. (2003a). Effect of pacing and mexiletine on dispersion of repolarisation and arrhythmias in DeltaKPQ SCN5A (long QT3) mice. *Cardiovasc. Res.* *57*, 1085–1093.

Fabritz, L., Kirchhof, P., Franz, M.R., Eckardt, L., Mönnig, G., Milberg, P., Breithardt, G., and Haverkamp, W. (2003b). Prolonged action potential durations, increased dispersion of repolarization, and polymorphic ventricular tachycardia in a mouse model of proarrhythmia. *Basic Res. Cardiol.* *98*, 25–32.

Fabritz, L., Damke, D., Emmerich, M., Kaufmann, S.G., Theis, K., Blana, A., Fortmüller, L., Laakmann, S., Hermann, S., Aleynichenko, E., et al. (2010). Autonomic modulation and antiarrhythmic therapy in a model of long QT syndrome type 3. *Cardiovasc. Res.* *87*, 60–72.

Fozzard, H.A. (2002). Cardiac sodium and calcium channels: a history of excitatory currents. *Cardiovasc. Res.* *55*, 1–8.

Fredj, S., Lindegger, N., Sampson, K.J., Carmeliet, P., and Kass, R.S. (2006a). Altered Na⁺ channels promote pause-induced spontaneous diastolic activity in long QT syndrome type 3 myocytes. *Circ. Res.* *99*, 1225–1232.

Fredj, S., Sampson, K.J., Liu, H., and Kass, R.S. (2006b). Molecular basis of ranolazine block of LQT-3 mutant sodium channels: evidence for site of action. *Br. J. Pharmacol.* *148*, 16–24.

Fuller, H., Justo, F., Nearing, B.D., Kahlig, K.M., Rajamani, S., Belardinelli, L., and Verrier, R.L. (2016). Eleclazine, a new selective cardiac late sodium current inhibitor, confers concurrent protection against autonomically induced atrial premature beats, repolarization alternans and heterogeneity, and atrial fibrillation in an intact porcine model. *Heart Rhythm* *13*, 1679–1686.

Funke, L., Dakoji, S., and Brecht, D.S. (2005). Membrane-associated guanylate kinases regulate adhesion and plasticity at cell junctions. *Annu. Rev. Biochem.* *74*, 219–245.

Gaita, F., Giustetto, C., Bianchi, F., Wolpert, C., Schimpf, R., Riccardi, R., Grossi, S., Richiardi, E., and Borggrefe, M. (2003). Short QT Syndrome: a familial cause of sudden death. *Circulation* *108*, 965–970.

Gaita, F., Giustetto, C., Bianchi, F., Schimpf, R., Haissaguerre, M., Calò, L., Brugada, R., Antzelevitch, C., Borggrefe, M., and Wolpert, C. (2004). Short QT syndrome: pharmacological treatment. *J. Am. Coll. Cardiol.* *43*, 1494–1499.

Garcia-Elias, A., and Benito, B. (2018). Ion Channel Disorders and Sudden Cardiac Death. *Int J Mol Sci* *19*.

Garg, P., Garg, V., Shrestha, R., Sanguinetti, M.C., Kamp, T.J., and Wu, J.C. (2018). Human Induced Pluripotent Stem Cell–Derived Cardiomyocytes as Models for Cardiac Channelopathies: A Primer for Non-Electrophysiologists. *Circulation Research* *123*, 224–243.

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

Ge, J., Sun, A., Paajanen, V., Wang, S., Su, C., Yang, Z., Li, Y., Wang, S., Jia, J., Wang, K., et al. (2008). Molecular and clinical characterization of a novel SCN5A mutation associated with atrioventricular block and dilated cardiomyopathy. *Circ Arrhythm Electrophysiol* *1*, 83–92.

Gerull, B., Heuser, A., Wichter, T., Paul, M., Basson, C.T., McDermott, D.A., Lerman, B.B., Markowitz, S.M., Ellinor, P.T., MacRae, C.A., et al. (2004). Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Nat. Genet.* *36*, 1162–1164.

Giladi, M., Boyman, L., Mikhasenko, H., Hiller, R., and Khananshvil, D. (2010). Essential Role of the CBD1-CBD2 Linker in Slow Dissociation of Ca²⁺ from the Regulatory Two-domain Tandem of NCX1. *J. Biol. Chem.* *285*, 28117–28125.

Gintant, G.A., Datyner, N.B., and Cohen, I.S. (1984). Slow inactivation of a tetrodotoxin-sensitive current in canine cardiac Purkinje fibers. *Biophys. J.* *45*, 509–512.

Goldfarb, M. (2012). Voltage-gated sodium channel-associated proteins and alternative mechanisms of inactivation and block. *Cell. Mol. Life Sci.* *69*, 1067–1076.

Goldin, A.L. (2003). Mechanisms of sodium channel inactivation. *Curr. Opin. Neurobiol.* *13*, 284–290.

Goldin, A.L., Barchi, R.L., Caldwell, J.H., Hofmann, F., Howe, J.R., Hunter, J.C., Kallen, R.G., Mandel, G., Meisler, M.H., Netter, Y.B., et al. (2000). Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* *28*, 365–368.

Grant, R.P., Estes, E.H., and Doyle, J.T. (1951). Spatial vector electrocardiography; the clinical characteristics of S-T and T vectors. *Circulation* *3*, 182–197.

Gui, J., Wang, T., Jones, R.P.O., Trump, D., Zimmer, T., and Lei, M. (2010). Multiple loss-of-function mechanisms contribute to SCN5A-related familial sick sinus syndrome. *PLoS ONE* *5*, e10985.

Gussak, I., and Antzelevitch, C. (2000). Early repolarization syndrome: clinical characteristics and possible cellular and ionic mechanisms. *J Electrocardiol* *33*, 299–309.

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

Hain, J., Onoue, H., Mayrleitner, M., Fleischer, S., and Schindler, H. (1995). Phosphorylation modulates the function of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum from cardiac muscle. *J. Biol. Chem.* *270*, 2074–2081.

Haïssaguerre, M., Shoda, M., Jaïs, P., Nogami, A., Shah, D.C., Kautzner, J., Arentz, T., Kalushe, D., Lamaison, D., Griffith, M., et al. (2002a). Mapping and ablation of idiopathic ventricular fibrillation. *Circulation* *106*, 962–967.

Haïssaguerre, M., Shah, D.C., Jaïs, P., Shoda, M., Kautzner, J., Arentz, T., Kalushe, D., Kadish, A., Griffith, M., Gaita, F., et al. (2002b). Role of Purkinje conducting system in triggering of idiopathic ventricular fibrillation. *Lancet* 359, 677–678.

Haïssaguerre, M., Derval, N., Sacher, F., Jesel, L., Deisenhofer, I., de Roy, L., Pasquié, J.-L., Nogami, A., Babuty, D., Yli-Mayry, S., et al. (2008). Sudden cardiac arrest associated with early repolarization. *N. Engl. J. Med.* 358, 2016–2023.

Haïssaguerre, M., Sacher, F., Nogami, A., Komiya, N., Bernard, A., Probst, V., Yli-Mayry, S., Defaye, P., Aizawa, Y., Frank, R., et al. (2009a). Characteristics of recurrent ventricular fibrillation associated with inferolateral early repolarization role of drug therapy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 53, 612–619.

Haïssaguerre, M., Chatel, S., Sacher, F., Weerasooriya, R., Probst, V., Lousouarn, G., Horlitz, M., Liersch, R., Schulze-Bahr, E., Wilde, A., et al. (2009b). Ventricular fibrillation with prominent early repolarization associated with a rare variant of KCNJ8/KATP channel. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 20, 93–98.

Hao, X., Zhang, Y., Zhang, X., Nirmalan, M., Davies, L., Konstantinou, D., Yin, F., Dobrzynski, H., Wang, X., Grace, A., et al. (2011). TGF- β 1-mediated fibrosis and ion channel remodeling are key mechanisms in producing the sinus node dysfunction associated with SCN5A deficiency and aging. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 4, 397–406.

Haruna Yoshisumi, Kobori Atsushi, Makiyama Takeru, Yoshida Hidetada, Akao Masaharu, Doi Takahiro, Tsuji Keiko, Ono Seiko, Nishio Yukiko, Shimizu Wataru, et al. (2007). Genotype-phenotype correlations of KCNJ2 mutations in Japanese patients with Andersen-Tawil syndrome. *Human Mutation* 28, 208–208.

Hayashi, T., Arimura, T., Itoh-Satoh, M., Ueda, K., Hohda, S., Inagaki, N., Takahashi, M., Hori, H., Yasunami, M., Nishi, H., et al. (2004). Tcap gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 44, 2192–2201.

He, H., Giordano, F.J., Hilal-Dandan, R., Choi, D.J., Rockman, H.A., McDonough, P.M., Bluhm, W.F., Meyer, M., Sayen, M.R., Swanson, E., et al. (1997). Overexpression of the rat

sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase gene in the heart of transgenic mice accelerates calcium transients and cardiac relaxation. *J. Clin. Invest.* *100*, 380–389.

Head, C.E., Balasubramaniam, R., Thomas, G., Goddard, C.A., Lei, M., Colledge, W.H., Grace, A.A., and Huang, C.L.-H. (2005). Paced electrogram fractionation analysis of arrhythmogenic tendency in DeltaKPQ Scn5a mice. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* *16*, 1329–1340.

Heineke, J., and Molkentin, J.D. (2006). Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 589–600.

Henderson, S.A., Goldhaber, J.I., So, J.M., Han, T., Motter, C., Ngo, A., Chantawansri, C., Ritter, M.R., Friedlander, M., Nicoll, D.A., et al. (2004). Functional adult myocardium in the absence of Na⁺-Ca²⁺ exchange: cardiac-specific knockout of NCX1. *Circ. Res.* *95*, 604–611.
Herchuelz, A., Kamagate, A., Ximenes, H., and Van Eylen, F. (2007). Role of Na/Ca exchange and the plasma membrane Ca²⁺-ATPase in beta cell function and death. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1099*, 456–467.

Herrmann, S., Lipp, P., Wiesen, K., Stieber, J., Nguyen, H., Kaiser, E., and Ludwig, A. (2013). The cardiac sodium-calcium exchanger NCX1 is a key player in the initiation and maintenance of a stable heart rhythm. *Cardiovasc. Res.* *99*, 780–788.

Hilge, M., Aelen, J., and Vuister, G.W. (2006). Ca²⁺ regulation in the Na⁺/Ca²⁺ exchanger involves two markedly different Ca²⁺ sensors. *Mol. Cell* *22*, 15–25.

Hilgemann, D.W., and Ball, R. (1996). Regulation of cardiac Na⁺,Ca²⁺ exchange and KATP potassium channels by PIP₂. *Science* *273*, 956–959.

Hilgemann, D.W., Collins, A., and Matsuoka, S. (1992). Steady-state and dynamic properties of cardiac sodium-calcium exchange. Secondary modulation by cytoplasmic calcium and ATP. *J. Gen. Physiol.* *100*, 933–961.

Hoch, B., Meyer, R., Hetzer, R., Krause, E.G., and Karczewski, P. (1999). Identification and expression of delta-isoforms of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ. Res.* *84*, 713–721.

Hodgkin, A.L., and Huxley, A.F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol. (Lond.)* *117*, 500–544.

Hoelz, A., Nairn, A.C., and Kuriyan, J. (2003). Crystal Structure of a Tetradecameric Assembly of the Association Domain of Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Kinase II. *Molecular Cell* *11*, 1241–1251.

Hoit, B.D., Khoury, S.F., Kranias, E.G., Ball, N., and Walsh, R.A. (1995). In vivo echocardiographic detection of enhanced left ventricular function in gene-targeted mice with phospholamban deficiency. *Circ. Res.* *77*, 632–637.

Houser, S.R. (2014). Role of RyR2 phosphorylation in heart failure and arrhythmias: protein kinase A-mediated hyperphosphorylation of the ryanodine receptor at serine 2808 does not alter cardiac contractility or cause heart failure and arrhythmias. *Circ. Res.* *114*, 1320–1327; discussion 1327.

Huang, Y., Wang, Z., Liu, Y., Xiong, H., Zhao, Y., Wu, L., Yuan, C., Wang, L., Hou, Y., Yu, G., et al. (2016). α B-Crystallin Interacts with Nav1.5 and Regulates Ubiquitination and Internalization of Cell Surface Nav1.5. *J. Biol. Chem.* *291*, 11030–11041.

Hund, T.J., and Mohler, P.J. (2015). Role of CaMKII in cardiac arrhythmias. *Trends Cardiovasc. Med.* *25*, 392–397.

Hund, T.J., Koval, O.M., Li, J., Wright, P.J., Qian, L., Snyder, J.S., Gudmundsson, H., Kline, C.F., Davidson, N.P., Cardona, N., et al. (2010). A β (IV)-spectrin/CaMKII signaling complex is essential for membrane excitability in mice. *J. Clin. Invest.* *120*, 3508–3519.

Imahashi, K., Pott, C., Goldhaber, J.I., Steenbergen, C., Philipson, K.D., and Murphy, E. (2005). Cardiac-specific ablation of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger confers protection against ischemia/reperfusion injury. *Circ. Res.* *97*, 916–921.

January, C.T., and Riddle, J.M. (1989). Early afterdepolarizations: mechanism of induction and block. A role for L-type Ca²⁺ current. *Circ. Res.* *64*, 977–990.

Jeon, U.S. (2008). Kidney and calcium homeostasis. *Electrolyte Blood Press* 6, 68–76.

Jervell, A., and Lange-Nielsen, F. (1957). Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval and sudden death. *Am. Heart J.* 54, 59–68.

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

Ji, Y., Lalli, M.J., Babu, G.J., Xu, Y., Kirkpatrick, D.L., Liu, L.H., Chiamvimonvat, N., Walsh, R.A., Shull, G.E., and Periasamy, M. (2000). Disruption of a single copy of the SERCA2 gene results in altered Ca²⁺ homeostasis and cardiomyocyte function. *J. Biol. Chem.* 275, 38073–38080.

John, R.M., and Kumar, S. (2016). Sinus Node and Atrial Arrhythmias. *Circulation* 133, 1892–1900.

John, S.A., Ribalet, B., Weiss, J.N., Philipson, K.D., and Ottolia, M. (2011). Ca²⁺-dependent structural rearrangements within Na⁺-Ca²⁺ exchanger dimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 1699–1704.

Johnson, E., Bruschiweiler-Li, L., Showalter, S.A., Vuister, G.W., Zhang, F., and Brüschiweiler, R. (2008). Structure and dynamics of Ca²⁺-binding domain 1 of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in the presence and in the absence of Ca²⁺. *J. Mol. Biol.* 377, 945–955.

Jordan, M.C., Henderson, S.A., Han, T., Fishbein, M.C., Philipson, K.D., and Roos, K.P. (2010). Myocardial function with reduced expression of the sodium-calcium exchanger. *J. Card. Fail.* 16, 786–796.

Juang, J.-M.J., and Horie, M. (2016). Genetics of Brugada syndrome. *J Arrhythm* 32, 418–425.

Kadambi, V.J., Ponniah, S., Harrer, J.M., Hoit, B.D., Dorn, G.W., Walsh, R.A., and Kranias, E.G. (1996). Cardiac-specific overexpression of phospholamban alters calcium kinetics and resultant cardiomyocyte mechanics in transgenic mice. *J. Clin. Invest.* *97*, 533–539.

Kang, T.M., and Hilgemann, D.W. (2004). Multiple transport modes of the cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Nature* *427*, 544–548.

Kass, R.S. (2005). The channelopathies: novel insights into molecular and genetic mechanisms of human disease. *J. Clin. Invest.* *115*, 1986–1989.

Kattygnarath, D., Maugenre, S., Neyroud, N., Balse, E., Ichai, C., Denjoy, I., Dilanian, G., Martins, R.P., Fressart, V., Berthet, M., et al. (2011). MOG1Clinical Perspective: A New Susceptibility Gene for Brugada Syndrome. *Circulation: Genomic and Precision Medicine* *4*, 261–268.

Kaye, D.M., Hoshijima, M., and Chien, K.R. (2008). Reversing advanced heart failure by targeting Ca²⁺ cycling. *Annu. Rev. Med.* *59*, 13–28.

Keller, D.I., Acharfi, S., Delacrétaz, E., Benammar, N., Rotter, M., Pfammatter, J.P., Fressart, V., Guicheney, P., and Chahine, M. (2003). A novel mutation in SCN5A, delQKP 1507-1509, causing long QT syndrome: role of Q1507 residue in sodium channel inactivation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *35*, 1513–1521.

Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M., and Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiol. Rev.* *91*, 461–553.

Khananshvili, D. (2013). The SLC8 gene family of sodium–calcium exchangers (NCX) – Structure, function, and regulation in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine* *34*, 220–235.

Kilic, A., Velic, A., De Windt, L.J., Fabritz, L., Voss, M., Mitko, D., Zwiener, M., Baba, H.A., van Eickels, M., Schlatter, E., et al. (2005). Enhanced activity of the myocardial Na⁺/H⁺ exchanger NHE-1 contributes to cardiac remodeling in atrial natriuretic peptide receptor-deficient mice. *Circulation* *112*, 2307–2317.

Kim, B., Takeuchi, A., Koga, O., Hikida, M., and Matsuoka, S. (2012). Pivotal role of mitochondrial Na^+ - Ca^{2+} exchange in antigen receptor mediated Ca^{2+} signalling in DT40 and A20 B lymphocytes. *J. Physiol. (Lond.)* 590, 459–474.

Kim, J., Ghosh, S., Liu, H., Tateyama, M., Kass, R.S., and Pitt, G.S. (2004). Calmodulin mediates Ca^{2+} sensitivity of sodium channels. *J. Biol. Chem.* 279, 45004–45012.

Kirchhefer, U., Schmitz, W., Scholz, H., and Neumann, J. (1999). Activity of cAMP-dependent protein kinase and Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human hearts. *Cardiovasc. Res.* 42, 254–261.

Kiyosue, T., and Arita, M. (1989). Late sodium current and its contribution to action potential configuration in guinea pig ventricular myocytes. *Circ. Res.* 64, 389–397.

Kofuji, P., Lederer, W.J., and Schulze, D.H. (1994). Mutually exclusive and cassette exons underlie alternatively spliced isoforms of the Na/Ca exchanger. *J. Biol. Chem.* 269, 5145–5149.

Kokunai, Y., Nakata, T., Furuta, M., Sakata, S., Kimura, H., Aiba, T., Yoshinaga, M., Osaki, Y., Nakamori, M., Itoh, H., et al. (2014). A Kir3.4 mutation causes Andersen-Tawil syndrome by an inhibitory effect on Kir2.1. *Neurology* 82, 1058–1064.

Krahn, A.D., Healey, J.S., Chauhan, V., Birnie, D.H., Simpson, C.S., Champagne, J., Gardner, M., Sanatani, S., Exner, D.V., Klein, G.J., et al. (2009). Systematic assessment of patients with unexplained cardiac arrest: Cardiac Arrest Survivors With Preserved Ejection Fraction Registry (CASPER). *Circulation* 120, 278–285.

Kranias, E.G. (1985). Regulation of calcium transport by protein phosphatase activity associated with cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 260, 11006–11010.

Kranias, E.G., and Hajjar, R.J. (2012). Modulation of Cardiac Contractility by the Phospholamban/SERCA2a Regulator. *Circulation Research* 110, 1646–1660.

Kuo, C.S., Munakata, K., Reddy, C.P., and Surawicz, B. (1983). Characteristics and possible mechanism of ventricular arrhythmia dependent on the dispersion of action potential durations. *Circulation* *67*, 1356–1367.

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

Lakatta Edward G., Vinogradova Tatiana M., and Maltsev Victor A. (2008). The Missing Link in the Mystery of Normal Automaticity of Cardiac Pacemaker Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* *1123*, 41–57.

Langenbacher, A.D., Dong, Y., Shu, X., Choi, J., Nicoll, D.A., Goldhaber, J.I., Philipson, K.D., and Chen, J.-N. (2005). Mutation in sodium–calcium exchanger 1 (NCX1) causes cardiac fibrillation in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 17699–17704.

Lanner, J.T., Georgiou, D.K., Joshi, A.D., and Hamilton, S.L. (2010). Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *2*, a003996.

Laurent, G., Saal, S., Amarouch, M.Y., Béziau, D.M., Marsman, R.F.J., Faivre, L., Barc, J., Dina, C., Bertaux, G., Barthez, O., et al. (2012). Multifocal ectopic Purkinje-related premature contractions: a new SCN5A-related cardiac channelopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* *60*, 144–156.

Lee, S.L., Yu, A.S., and Lytton, J. (1994). Tissue-specific expression of Na⁺-Ca²⁺ exchanger isoforms. *J. Biol. Chem.* *269*, 14849–14852.

Lei, M., Zhang, H., Grace, A.A., and Huang, C.L.-H. (2007). SCN5A and sinoatrial node pacemaker function. *Cardiovasc. Res.* *74*, 356–365.

Lemaillet, G., Walker, B., and Lambert, S. (2003). Identification of a conserved ankyrin-binding motif in the family of sodium channel alpha subunits. *J. Biol. Chem.* *278*, 27333–27339.

Leoni, A.-L., Gavillet, B., Rougier, J.-S., Marionneau, C., Probst, V., Le Scouarnec, S., Schott, J.-J., Demolombe, S., Bruneval, P., Huang, C.L.H., et al. (2010). Variable Na(v)1.5 protein expression from the wild-type allele correlates with the penetrance of cardiac conduction disease in the *Scn5a*(+/-) mouse model. *PLoS ONE* 5, e9298.

Levitsky, D.O., Nicoll, D.A., and Philipson, K.D. (1994). Identification of the high affinity Ca(2+)-binding domain of the cardiac Na(+)-Ca²⁺ exchanger. *J. Biol. Chem.* 269, 22847–22852.

Li, G.-R., Lau, C.-P., Ducharme, A., Tardif, J.-C., and Nattel, S. (2002). Transmural action potential and ionic current remodeling in ventricles of failing canine hearts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 283, H1031–H1041.

Li, Z., Nicoll, D.A., Collins, A., Hilgemann, D.W., Filoteo, A.G., Penniston, J.T., Weiss, J.N., Tomich, J.M., and Philipson, K.D. (1991). Identification of a peptide inhibitor of the cardiac sarcolemmal Na(+)-Ca²⁺ exchanger. *J. Biol. Chem.* 266, 1014–1020.

Liao, J., Li, H., Zeng, W., Sauer, D.B., Belmares, R., and Jiang, Y. (2012). Structural insight into the ion-exchange mechanism of the sodium/calcium exchanger. *Science* 335, 686–690.

Liepinsh, E., Vilskersts, R., Skapare, E., Svalbe, B., Kuka, J., Cirule, H., Pugovics, O., Kalvinsh, I., and Dambrova, M. (2008). Mildronate decreases carnitine availability and up-regulates glucose uptake and related gene expression in the mouse heart. *Life Sciences* 83, 613–619.

Lipp, P., and Niggli, E. (1996). Submicroscopic calcium signals as fundamental events of excitation--contraction coupling in guinea-pig cardiac myocytes. *J. Physiol. (Lond.)* 492 (Pt 1), 31–38.

Liu, D.W., and Antzelevitch, C. (1995). Characteristics of the delayed rectifier current (IKr and IKs) in canine ventricular epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes. A weaker IKs contributes to the longer action potential of the M cell. *Circ. Res.* 76, 351–365.

- Liu, T., and O'Rourke, B. (2009). Regulation of mitochondrial Ca²⁺ and its effects on energetics and redox balance in normal and failing heart. *J. Bioenerg. Biomembr.* *41*, 127–132.
- Liu, C., Dib-Hajj, S.D., Renganathan, M., Cummins, T.R., and Waxman, S.G. (2003). Modulation of the cardiac sodium channel Nav1.5 by fibroblast growth factor homologous factor 1B. *J. Biol. Chem.* *278*, 1029–1036.
- Liu, Y.M., DeFelice, L.J., and Mazzanti, M. (1992). Na channels that remain open throughout the cardiac action potential plateau. *Biophys. J.* *63*, 654–662.
- London, B., Michalec, M., Mehdi, H., Zhu, X., Kerchner, L., Sanyal, S., Viswanathan, P.C., Pfahnl, A.E., Shang, L.L., Madhusudanan, M., et al. (2007). Mutation in glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like gene (GPD1-L) decreases cardiac Na⁺ current and causes inherited arrhythmias. *Circulation* *116*, 2260–2268.
- Lundby, A., Andersen, M.N., Steffensen, A.B., Horn, H., Kelstrup, C.D., Francavilla, C., Jensen, L.J., Schmitt, N., Thomsen, M.B., and Olsen, J.V. (2013). In vivo phosphoproteomics analysis reveals the cardiac targets of β -adrenergic receptor signaling. *Sci Signal* *6*, rs11.
- Luo, M., and Anderson, M.E. (2013). Mechanisms of altered Ca²⁺ handling in heart failure. *Circ. Res.* *113*, 690–708.
- Luo, W., Grupp, I.L., Harrer, J., Ponniah, S., Grupp, G., Duffy, J.J., Doetschman, T., and Kranias, E.G. (1994). Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation. *Circ. Res.* *75*, 401–409.
- Lytton, J. (2007). Na⁺/Ca²⁺ exchangers: three mammalian gene families control Ca²⁺ transport. *Biochem. J.* *406*, 365–382.
- MacLennan, D.H., and Kranias, E.G. (2003). Calcium: Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *4*, 566.
- Maier, L.S. (2009). Role of CaMKII for signaling and regulation in the heart. *Front Biosci (Landmark Ed)* *14*, 486–496.

- Maier, L.S., and Bers, D.M. (2002). Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *34*, 919–939.
- Maier, L.S., Zhang, T., Chen, L., DeSantiago, J., Brown, J.H., and Bers, D.M. (2003). Transgenic CaMKII δ C overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca²⁺ handling: reduced SR Ca²⁺ load and activated SR Ca²⁺ release. *Circ. Res.* *92*, 904–911.
- Maier, S.K.G., Westenbroek, R.E., McCormick, K.A., Curtis, R., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (2004). Distinct subcellular localization of different sodium channel alpha and beta subunits in single ventricular myocytes from mouse heart. *Circulation* *109*, 1421–1427.
- Makielski, J.C. (2009). “Late sodium current: a mechanism for angina, heart failure, and arrhythmia.” *J Cardiovasc Pharmacol* *54*, 279–286.
- Makielski, J.C., and Farley, A.L. (2006). Na⁽⁺⁾ current in human ventricle: implications for sodium loading and homeostasis. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* *17 Suppl 1*, S15–S20.
- Makita, N., Behr, E., Shimizu, W., Horie, M., Sunami, A., Crotti, L., Schulze-Bahr, E., Fukuhara, S., Mochizuki, N., Makiyama, T., et al. (2008). The E1784K mutation in SCN5A is associated with mixed clinical phenotype of type 3 long QT syndrome. *J. Clin. Invest.* *118*, 2219–2229.
- Maltsev, V.A., and Undrovinas, A. (2008). Late sodium current in failing heart: friend or foe? *Prog. Biophys. Mol. Biol.* *96*, 421–451.
- Maltsev, V.A., and Undrovinas, A.I. (2006). A multi-modal composition of the late Na⁺ current in human ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* *69*, 116–127.
- Mammucari, C., Patron, M., Granatiero, V., and Rizzuto, R. (2011). Molecules and roles of mitochondrial calcium signaling. *Biofactors* *37*, 219–227.
- Mandapati, R., Skanes, A., Chen, J., Berenfeld, O., and Jalife, J. (2000). Stable microreentrant sources as a mechanism of atrial fibrillation in the isolated sheep heart. *Circulation* *101*, 194–199.

Marfatia, K.A., Harreman, M.T., Fanara, P., Vertino, P.M., and Corbett, A.H. (2001). Identification and characterization of the human MOG1 gene. *Gene* 266, 45–56.

Martin, C.A., Zhang, Y., Grace, A.A., and Huang, C.L.-H. (2010a). Increased right ventricular repolarization gradients promote arrhythmogenesis in a murine model of Brugada syndrome. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 21, 1153–1159.

Martin, C.A., Zhang, Y., Grace, A.A., and Huang, C.L.-H. (2010b). In vivo studies of *Scn5a*^{+/-} mice modeling Brugada syndrome demonstrate both conduction and repolarization abnormalities. *J Electrocardiol* 43, 433–439.

Matamoros, M., Pérez-Hernández, M., Guerrero-Serna, G., Amorós, I., Barana, A., Núñez, M., Ponce-Balbuena, D., Sacristán, S., Gómez, R., Tamargo, J., et al. (2016). Nav1.5 N-terminal domain binding to $\alpha 1$ -syntrophin increases membrane density of human Kir2.1, Kir2.2 and Nav1.5 channels. *Cardiovasc. Res.* 110, 279–290.

Matsuoka, S., Nicoll, D.A., Reilly, R.F., Hilgemann, D.W., and Philipson, K.D. (1993). Initial localization of regulatory regions of the cardiac sarcolemmal Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 3870–3874.

Matsuoka, S., Nicoll, D.A., Hryshko, L.V., Levitsky, D.O., Weiss, J.N., and Philipson, K.D. (1995). Regulation of the cardiac Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger by Ca²⁺. Mutational analysis of the Ca⁽²⁺⁾-binding domain. *J. Gen. Physiol.* 105, 403–420.

Mattiazzi, A., Mundiña-Weilenmann, C., Guoxiang, C., Vittone, L., and Kranias, E. (2005). Role of phospholamban phosphorylation on Thr17 in cardiac physiological and pathological conditions. *Cardiovasc. Res.* 68, 366–375.

Mazzanti, A., Kanthan, A., Monteforte, N., Memmi, M., Bloise, R., Novelli, V., Miceli, C., O'Rourke, S., Borio, G., Zienciuk-Krajka, A., et al. (2014). Novel insight into the natural history of short QT syndrome. *J. Am. Coll. Cardiol.* 63, 1300–1308.

Mazzanti, A., Underwood, K., Nevelev, D., Kofman, S., and Priori, S.G. (2017). The new kids on the block of arrhythmogenic disorders: Short QT Syndrome and early repolarization. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.*

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

Medeiros-Domingo, A., Kaku, T., Tester, D.J., Iturralde-Torres, P., Itty, A., Ye, B., Valdivia, C., Ueda, K., Canizales-Quinteros, S., Tusié-Luna, M.T., et al. (2007). SCN4B-Encoded Sodium Channel β 4 Subunit in Congenital Long-QT Syndrome. *Circulation* *116*, 134–142.

Medeiros-Domingo, A., Tan, B.-H., Crotti, L., Tester, D.J., Eckhardt, L., Cuoretti, A., Kroboth, S.L., Song, C., Zhou, Q., Kopp, D., et al. (2010). Gain-of-function mutation S422L in the KCNJ8-encoded cardiac K(ATP) channel Kir6.1 as a pathogenic substrate for J-wave syndromes. *Heart Rhythm* *7*, 1466–1471.

Menick, D.R., Renaud, L., Buchholz, A., Müller, J.G., Zhou, H., Kappler, C.S., Kubalak, S.W., Conway, S.J., and Xu, L. (2007). Regulation of Ncx1 gene expression in the normal and hypertrophic heart. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1099*, 195–203.

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

Milstein, M.L., Musa, H., Balbuena, D.P., Anumonwo, J.M.B., Auerbach, D.S., Furspan, P.B., Hou, L., Hu, B., Schumacher, S.M., Vaidyanathan, R., et al. (2012). Dynamic reciprocity of sodium and potassium channel expression in a macromolecular complex controls cardiac excitability and arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, E2134–E2143.

Min, C.K., Yeom, D.R., Lee, K.-E., Kwon, H.-K., Kang, M., Kim, Y.-S., Park, Z.Y., Jeon, H., and Kim, D.H. (2012). Coupling of ryanodine receptor 2 and voltage-dependent anion channel 2 is essential for Ca^{2+} transfer from the sarcoplasmic reticulum to the mitochondria in the heart. *Biochem. J.* *447*, 371–379.

- Mitchell, G.F., Jeron, A., and Koren, G. (1998). Measurement of heart rate and Q-T interval in the conscious mouse. *Am. J. Physiol.* *274*, H747–H751.
- Mohler, P.J., Schott, J.-J., Gramolini, A.O., Dilly, K.W., Guatimosim, S., duBell, W.H., Song, L.-S., Haurogné, K., Kyndt, F., Ali, M.E., et al. (2003). Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature* *421*, 634–639.
- Mohler, P.J., Rivolta, I., Napolitano, C., LeMaillet, G., Lambert, S., Priori, S.G., and Bennett, V. (2004). Nav1.5 E1053K mutation causing Brugada syndrome blocks binding to ankyrin-G and expression of Nav1.5 on the surface of cardiomyocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 17533–17538.
- Morand, P., Despert, F., Carrier, H.N., Saudubray, B.M., Fardeau, M., Romieux, B., Fauchier, C., and Combe, P. (1979). [Lipidic myopathy with severe cardiomyopathy caused by a generalized carnitine deficiency. Favourable course during carnitine hydrochloride treatment]. *Arch Mal Coeur Vaiss* *72*, 536–544.
- Moreau, A., Gosselin-Badaroudine, P., Delemotte, L., Klein, M.L., and Chahine, M. (2015). Gating pore currents are defects in common with two Nav1.5 mutations in patients with mixed arrhythmias and dilated cardiomyopathy. *J. Gen. Physiol.* *145*, 93–106.
- Moss, A.J., Zareba, W., Schwarz, K.Q., Rosero, S., McNitt, S., and Robinson, J.L. (2008). Ranolazine shortens repolarization in patients with sustained inward sodium current due to type-3 long-QT syndrome. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* *19*, 1289–1293.
- Motoike, H.K., Liu, H., Glaaser, I.W., Yang, A.-S., Tateyama, M., and Kass, R.S. (2004). The Na⁺ channel inactivation gate is a molecular complex: a novel role of the COOH-terminal domain. *J. Gen. Physiol.* *123*, 155–165.
- Mulla, W., Gillis, R., Murninkas, M., Hadar klapper-goldstein, H., Gabay, H., Mor, M., Elyagon, S., Liel-Cohen, N., Bernus, O., and Etzion, Y. (2018). Unanesthetized rodents demonstrate insensitivity of QT interval and ventricular refractory period to pacing cycle length. *Physiology*.

Münch, G., Bölck, B., Karczewski, P., and Schwinger, R.H.G. (2002). Evidence for calcineurin-mediated regulation of SERCA 2a activity in human myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *34*, 321–334.

Murphy, B.J., Rogers, J., Perdichizzi, A.P., Colvin, A.A., and Catterall, W.A. (1996). cAMP-dependent phosphorylation of two sites in the alpha subunit of the cardiac sodium channel. *J. Biol. Chem.* *271*, 28837–28843.

Mustroph, J., Maier, L.S., and Wagner, S. (2014). CaMKII regulation of cardiac K channels. *Front Pharmacol* *5*, 20.

Nademanee, K., Veerakul, G., Chandanamatta, P., Chaothawee, L., Ariyachaipanich, A., Jirasirojanakorn, K., Likittanasombat, K., Bhuripanyo, K., and Ngarmukos, T. (2011). Prevention of ventricular fibrillation episodes in Brugada syndrome by catheter ablation over the anterior right ventricular outflow tract epicardium. *Circulation* *123*, 1270–1279.

Najafi, A., Sequeira, V., Kuster, D.W.D., and van der Velden, J. (2016). β -adrenergic receptor signalling and its functional consequences in the diseased heart. *Eur. J. Clin. Invest.* *46*, 362–374.

Nam, G.-B., Ko, K.-H., Kim, J., Park, K.-M., Rhee, K.-S., Choi, K.-J., Kim, Y.-H., and Antzelevitch, C. (2010). Mode of onset of ventricular fibrillation in patients with early repolarization pattern vs. Brugada syndrome. *Eur. Heart J.* *31*, 330–339.

Namadurai, S., Yereddi, N.R., Cusdin, F.S., Huang, C.L.H., Chirgadze, D.Y., and Jackson, A.P. (2015). A new look at sodium channel β subunits. *Open Biol* *5*, 140192.

Nerbonne, J.M., and Guo, W. (2002). Heterogeneous expression of voltage-gated potassium channels in the heart: roles in normal excitation and arrhythmias. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* *13*, 406–409.

Nerbonne, J.M., and Kass, R.S. (2005). Molecular Physiology of Cardiac Repolarization. *Physiological Reviews* *85*, 1205–1253.

Nerbonne, J.M., Nichols, C.G., Schwarz, T.L., and Escande, D. (2001). Genetic Manipulation of Cardiac K⁺ Channel Function in Mice: What Have We Learned, and Where Do We Go From Here? *Circulation Research* 89, 944–956.

Nicoll, D.A., Longoni, S., and Philipson, K.D. (1990). Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger. *Science* 250, 562–565.

Nicoll, D.A., Quednau, B.D., Qui, Z., Xia, Y.R., Lusic, A.J., and Philipson, K.D. (1996). Cloning of a third mammalian Na⁺-Ca²⁺ exchanger, NCX3. *J. Biol. Chem.* 271, 24914–24921.

Nicoll, D.A., Ottolia, M., Lu, L., Lu, Y., and Philipson, K.D. (1999). A New Topological Model of the Cardiac Sarcolemmal Na⁺-Ca²⁺ Exchanger. *J. Biol. Chem.* 274, 910–917.

Niggli, E., and Lederer, W.J. (1991). Molecular operations of the sodium-calcium exchanger revealed by conformation currents. *Nature* 349, 621–624.

Nivala, M., de Lange, E., Rovetti, R., and Qu, Z. (2012). Computational modeling and numerical methods for spatiotemporal calcium cycling in ventricular myocytes. *Front Physiol* 3, 114.

Nuyens, D., Stengl, M., Dugarmaa, S., Rossenbacker, T., Compennolle, V., Rudy, Y., Smits, J.F., Flameng, W., Clancy, C.E., Moons, L., et al. (2001). Abrupt rate accelerations or premature beats cause life-threatening arrhythmias in mice with long-QT3 syndrome. *Nat Med* 7, 1021–1027.

O'Hara, T., Virág, L., Varró, A., and Rudy, Y. (2011). Simulation of the undiseased human cardiac ventricular action potential: model formulation and experimental validation. *PLoS Comput. Biol.* 7, e1002061.

Ohashi, R., Tamai, I., Nezu, J., Nikaido, H., Hashimoto, N., Oku, A., Sai, Y., Shimane, M., and Tsuji, A. (2001). Molecular and Physiological Evidence for Multifunctionality of Carnitine/Organic Cation Transporter OCTN2. *Mol Pharmacol* 59, 358–366.

- O'Reilly, J.P., Wang, S.-Y., Kallen, R.G., and Wang, G.K. (1999). Comparison of slow inactivation in human heart and rat skeletal muscle Na⁺ channel chimaeras. *J Physiol* 515, 61–73.
- Ottolia, M., Nicoll, D.A., and Philipson, K.D. (2009). Roles of two Ca²⁺-binding domains in regulation of the cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchanger. *J. Biol. Chem.* 284, 32735–32741.
- O-Uchi, J., Pan, S., and Sheu, S.-S. (2012). Perspectives on: SGP symposium on mitochondrial physiology and medicine: molecular identities of mitochondrial Ca²⁺ influx mechanism: updated passwords for accessing mitochondrial Ca²⁺-linked health and disease. *J. Gen. Physiol.* 139, 435–443.
- Palty, R., Silverman, W.F., Hershinkel, M., Caporale, T., Sensi, S.L., Parnis, J., Nolte, C., Fishman, D., Shoshan-Barmatz, V., Herrmann, S., et al. (2010). NCLX is an essential component of mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 436–441.
- Pandit, S.V., Clark, R.B., Giles, W.R., and Demir, S.S. (2001). A mathematical model of action potential heterogeneity in adult rat left ventricular myocytes. *Biophys. J.* 81, 3029–3051.
- Papadatos, G.A., Wallerstein, P.M.R., Head, C.E.G., Ratcliff, R., Brady, P.A., Benndorf, K., Saumarez, R.C., Trezise, A.E.O., Huang, C.L.-H., Vandenberg, J.I., et al. (2002). Slowed conduction and ventricular tachycardia after targeted disruption of the cardiac sodium channel gene *Scn5a*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 6210–6215.
- Patlak, J.B., and Ortiz, M. (1985). Slow currents through single sodium channels of the adult rat heart. *J. Gen. Physiol.* 86, 89–104.
- Patton, D.E., West, J.W., Catterall, W.A., and Goldin, A.L. (1992). Amino acid residues required for fast Na⁽⁺⁾-channel inactivation: charge neutralizations and deletions in the III-IV linker. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 10905–10909.
- Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N., and Catterall, W.A. (2011). The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* 475, 353–358.

Peana, D., and Domeier, T.L. (2017). Cardiomyocyte Ca²⁺ homeostasis as a therapeutic target in heart failure with reduced and preserved ejection fraction. *Curr Opin Pharmacol* 33, 17–26.

Pérez Riera, A.R., Paixão-Almeida, A., Barbosa-Barros, R., Yanowitz, F.G., Baranchuk, A., Dubner, S., and Palandri Chagas, A.C. (2013). Congenital short QT syndrome: landmarks of the newest arrhythmogenic cardiac channelopathy. *Cardiol J* 20, 464–471.

Periasamy, M., and Kalyanasundaram, A. (2007). SERCA pump isoforms: Their role in calcium transport and disease. *Muscle & Nerve* 35, 430–442.

Periasamy, M., Reed, T.D., Liu, L.H., Ji, Y., Loukianov, E., Paul, R.J., Nieman, M.L., Riddle, T., Duffy, J.J., Doetschman, T., et al. (1999). Impaired cardiac performance in heterozygous mice with a null mutation in the sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase isoform 2 (SERCA2) gene. *J. Biol. Chem.* 274, 2556–2562.

Peskoff, A., and Langer, G.A. (1998). Calcium concentration and movement in the ventricular cardiac cell during an excitation-contraction cycle. *Biophys. J.* 74, 153–174.

Petitprez, S., Zmoos, A.-F., Ogradnik, J., Balse, E., Raad, N., El-Haou, S., Albesa, M., Bittihn, P., Luther, S., Lehnart, S.E., et al. (2011). SAP97 and dystrophin macromolecular complexes determine two pools of cardiac sodium channels Nav1.5 in cardiomyocytes. *Circ. Res.* 108, 294–304.

Philipson, K.D., and Nicoll, D.A. (2000). Sodium-calcium exchange: a molecular perspective. *Annu. Rev. Physiol.* 62, 111–133.

Pieske, B., and Houser, S.R. (2003). [Na⁺]_i handling in the failing human heart. *Cardiovasc. Res.* 57, 874–886.

Pilichou, K., Nava, A., Basso, C., Beffagna, G., Bauce, B., Lorenzon, A., Frigo, G., Vettori, A., Valente, M., Towbin, J., et al. (2006). Mutations in desmoglein-2 gene are associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circulation* 113, 1171–1179.

Pitt, G.S. (2007). Calmodulin and CaMKII as molecular switches for cardiac ion channels. *Cardiovasc. Res.* 73, 641–647.

Pogwizd, S.M., Schlotthauer, K., Li, L., Yuan, W., and Bers, D.M. (2001). Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness. *Circ. Res.* 88, 1159–1167.

Pogwizd, S.M., Sipido, K.R., Verdonck, F., and Bers, D.M. (2003). Intracellular Na in animal models of hypertrophy and heart failure: contractile function and arrhythmogenesis. *Cardiovasc. Res.* 57, 887–896.

Postema, P.G., van Dessel, P.F.H.M., de Bakker, J.M.T., Dekker, L.R.C., Linnenbank, A.C., Hoogendijk, M.G., Coronel, R., Tijssen, J.G.P., Wilde, A.A.M., and Tan, H.L. (2008). Slow and discontinuous conduction conspire in Brugada syndrome: a right ventricular mapping and stimulation study. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 1, 379–386.

Postema, P.G., van Dessel, P.F.H.M., Kors, J.A., Linnenbank, A.C., van Herpen, G., Ritsema van Eck, H.J., van Geloven, N., de Bakker, J.M.T., Wilde, A.A.M., and Tan, H.L. (2010). Local depolarization abnormalities are the dominant pathophysiologic mechanism for type 1 electrocardiogram in brugada syndrome a study of electrocardiograms, vectorcardiograms, and body surface potential maps during ajmaline provocation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 55, 789–797.

Pott, C., Philipson, K.D., and Goldhaber, J.I. (2005). Excitation-contraction coupling in Na⁺-Ca²⁺ exchanger knockout mice: reduced transsarcolemmal Ca²⁺ flux. *Circ. Res.* 97, 1288–1295.

Pott, C., Goldhaber, J.I., and Philipson, K.D. (2007a). Homozygous Overexpression of the Na⁺-Ca²⁺ Exchanger in Mice. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1099, 310–314.

Pott, C., Ren, X., Tran, D.X., Yang, M.-J., Henderson, S., Jordan, M.C., Roos, K.P., Garfinkel, A., Philipson, K.D., and Goldhaber, J.I. (2007b). Mechanism of shortened action potential duration in Na⁺-Ca²⁺ exchanger knockout mice. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 292, C968–C973.

Pott, C., Eckardt, L., and Goldhaber, J.I. (2011). Triple Threat: The Na⁺/Ca²⁺ Exchanger in the Pathophysiology of Cardiac Arrhythmia, Ischemia and Heart Failure. *Curr Drug Targets* 12, 737–747.

Pott, C., Muszynski, A., Ruhe, M., Bögeholz, N., Schulte, J.S., Milberg, P., Mönnig, G., Fabritz, L., Goldhaber, J.I., Breithardt, G., et al. (2012). Proarrhythmia in a non-failing murine model of cardiac-specific Na⁺/Ca²⁺ exchanger overexpression: whole heart and cellular mechanisms. *Basic Res. Cardiol.* 107, 247.

Priori, S.G., Schwartz, P.J., Napolitano, C., Bloise, R., Ronchetti, E., Grillo, M., Vicentini, A., Spazzolini, C., Nastoli, J., Bottelli, G., et al. (2003). Risk stratification in the long-QT syndrome. *N. Engl. J. Med.* 348, 1866–1874.

Priori, S.G., Napolitano, C., Schwartz, P.J., Grillo, M., Bloise, R., Ronchetti, E., Moncalvo, C., Tulipani, C., Veia, A., Bottelli, G., et al. (2004). Association of long QT syndrome loci and cardiac events among patients treated with beta-blockers. *JAMA* 292, 1341–1344.

Priori, S.G., Blomström-Lundqvist, C., Mazzanti, A., Blom, N., Borggrefe, M., Camm, J., Elliott, P.M., Fitzsimons, D., Hatala, R., Hindricks, G., et al. (2015). 2015 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: The Task Force for the Management of Patients with Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology (ESC) Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC). *European Heart Journal* 36, 2793–2867.

Qu, Z., and Weiss, J.N. (2015). Mechanisms of ventricular arrhythmias: from molecular fluctuations to electrical turbulence. *Annu. Rev. Physiol.* 77, 29–55.

Rajamani, S., El-Bizri, N., Shryock, J.C., Makielski, J.C., and Belardinelli, L. (2009). Use-dependent block of cardiac late Na⁽⁺⁾ current by ranolazine. *Heart Rhythm* 6, 1625–1631.

Rajamani, S., Liu, G., El-Bizri, N., Guo, D., Li, C., Chen, X., Kahlig, K.M., Mollova, N., Elzein, E., Zablocki, J., et al. (2016). The novel late Na⁺ current inhibitor, GS-6615 (eleclazine) and its anti-arrhythmic effects in rabbit isolated heart preparations. *Br J Pharmacol* 173, 3088–3098.

Reeves, J.P., and Hale, C.C. (1984). The stoichiometry of the cardiac sodium-calcium exchange system. *J. Biol. Chem.* *259*, 7733–7739.

Reilly, L., Howie, J., Wypijewski, K., Ashford, M.L.J., Hilgemann, D.W., and Fuller, W. (2015). Palmitoylation of the Na/Ca exchanger cytoplasmic loop controls its inactivation and internalization during stress signaling. *FASEB J.* *29*, 4532–4543.

Remme, C.A., Verkerk, A.O., Nuyens, D., Ginneken, A.C.G. van, Brunschot, S. van, Belterman, C.N.W., Wilders, R., Roon, M.A. van, Tan, H.L., Wilde, A.A.M., et al. (2006). Overlap Syndrome of Cardiac Sodium Channel Disease in Mice Carrying the Equivalent Mutation of Human SCN5A-1795insD. *Circulation* *114*, 2584–2594.

Remme, C.A., Scicluna, B.P., Verkerk, A.O., Amin, A.S., van Brunschot, S., Beekman, L., Deneer, V.H.M., Chevalier, C., Oyama, F., Miyazaki, H., et al. (2009). Genetically determined differences in sodium current characteristics modulate conduction disease severity in mice with cardiac sodium channelopathy. *Circ. Res.* *104*, 1283–1292.

Reuter, H., Henderson, S.A., Han, T., Matsuda, T., Baba, A., Ross, R.S., Goldhaber, J.I., and Philipson, K.D. (2002). Knockout Mice for Pharmacological Screening: Testing the Specificity of Na⁺-Ca²⁺ Exchange Inhibitors. *Circulation Research* *91*, 90–92.

Reuter, H., Han, T., Motter, C., Philipson, K.D., and Goldhaber, J.I. (2004). Mice overexpressing the cardiac sodium-calcium exchanger: defects in excitation–contraction coupling. *The Journal of Physiology* *554*, 779–789.

Richardson, D.W., Kontos, H.A., Raper, A.J., and Patterson, J.L. (1967). Modification by Beta-Adrenergic Blockade of the Circulatory Responses to Acute Hypoxia in Man*. *Journal of Clinical Investigation* *46*, 77–85.

Richmond, J.E., Featherstone, D.E., Hartmann, H.A., and Ruben, P.C. (1998). Slow inactivation in human cardiac sodium channels. *Biophys J* *74*, 2945–2952.

Rijlaarsdam, R.S., van Spronsen, F.J., Bink-Boelkens, M.T.E., Reijngoud, D.-J., Wanders, R.J.A., Niezen-Koning, K.E., Van der Sluijs, F.H., Dorland, B., and Beaufort-Krol, G.C.M. (2004). Ventricular fibrillation without overt cardiomyopathy as first presentation of organic cation transporter 2-deficiency in adolescence. *Pacing Clin Electrophysiol* 27, 675–676.

Rivaud, M.R., Baartscheer, A., Verkerk, A.O., Beekman, L., Rajamani, S., Belardinelli, L., Bezzina, C.R., and Remme, C.A. (2018). Enhanced late sodium current underlies pro-arrhythmic intracellular sodium and calcium dysregulation in murine sodium channelopathy. *Int. J. Cardiol.* 263, 54–62.

Rizzo, S., Lodder, E.M., Verkerk, A.O., Wolswinkel, R., Beekman, L., Pilichou, K., Basso, C., Remme, C.A., Thiene, G., and Bezzina, C.R. (2012). Intercalated disc abnormalities, reduced Na(+) current density, and conduction slowing in desmoglein-2 mutant mice prior to cardiomyopathic changes. *Cardiovasc. Res.* 95, 409–418.

Rogart, R.B., Cribbs, L.L., Muglia, L.K., Kephart, D.D., and Kaiser, M.W. (1989). Molecular cloning of a putative tetrodotoxin-resistant rat heart Na⁺ channel isoform. *PNAS* 86, 8170–8174.

Romano, C., Gemme, G., and Pongiglione, R. (1963). [Rare cardiac arrhythmias of the pediatric age. ii. syncopal attacks due to paroxysmal ventricular fibrillation. (presentation of 1st case in italian pediatric literature)]. *Clin Pediatr (Bologna)* 45, 656–683.

Rook, M.B., Bezzina Alshinawi, C., Groenewegen, W.A., van Gelder, I.C., van Ginneken, A.C., Jongasma, H.J., Mannens, M.M., and Wilde, A.A. (1999). Human SCN5A gene mutations alter cardiac sodium channel kinetics and are associated with the Brugada syndrome. *Cardiovasc. Res.* 44, 507–517.

Rosso, R., Kogan, E., Belhassen, B., Rozovski, U., Scheinman, M.M., Zeltser, D., Halkin, A., Steinvil, A., Heller, K., Glikson, M., et al. (2008). J-point elevation in survivors of primary ventricular fibrillation and matched control subjects: incidence and clinical significance. *J. Am. Coll. Cardiol.* 52, 1231–1238.

Roussel, J., Champeroux, P., Roy, J., Richard, S., Fauconnier, J., Le Guennec, J.-Y., and Thireau, J. (2016a). The Complex QT/RR Relationship in Mice. *Sci Rep* 6, 25388.

Roussel, J., Labarthe, F., Thireau, J., Ferro, F., Farah, C., Roy, J., Horiuchi, M., Tardieu, M., Lefort, B., François Benoist, J., et al. (2016b). Carnitine deficiency induces a short QT syndrome. *Heart Rhythm* 13, 165–174.

Royer, A., van Veen, T.A.B., Le Bouter, S., Marionneau, C., Griol-Charhbili, V., Léoni, A.-L., Steenman, M., van Rijen, H.V.M., Demolombe, S., Goddard, C.A., et al. (2005). Mouse model of SCN5A-linked hereditary Lenègre's disease: age-related conduction slowing and myocardial fibrosis. *Circulation* 111, 1738–1746.

Saba, M.M., Salim, M., Hood, R.E., Dickfeld, T.-M., and Shorofsky, S.R. (2011). Idiopathic ventricular fibrillation in a 10-year-old boy: technical aspects of radiofrequency ablation and utility of antiarrhythmic therapy. *Pacing Clin Electrophysiol* 34, e85–e89.

Saimi, Y., and Kung, C. (2002). Calmodulin as an ion channel subunit. *Annu. Rev. Physiol.* 64, 289–311.

Saint, D.A., Ju, Y.K., and Gage, P.W. (1992). A persistent sodium current in rat ventricular myocytes. *J. Physiol. (Lond.)* 453, 219–231.

Salinas, R.K., Bruschweiler-Li, L., Johnson, E., and Bruschweiler, R. (2011). Ca²⁺ binding alters the interdomain flexibility between the two cytoplasmic calcium-binding domains in the Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *J. Biol. Chem.* 286, 32123–32131.

Satin, J., Kyle, J.W., Chen, M., Bell, P., Cribbs, L.L., Fozzard, H.A., and Rogart, R.B. (1992). A Mutant of TTX-Resistant Cardiac Sodium Channels with TTX-Sensitive Properties. *Science* 256, 1202–1205.

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

Schlotthauer, K., and Bers, D.M. (2000). Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release causes myocyte depolarization. Underlying mechanism and threshold for triggered action potentials. *Circ. Res.* *87*, 774–780.

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

Schroeter, A., Walzik, S., Blechschmidt, S., Haufe, V., Benndorf, K., and Zimmer, T. (2010). Structure and function of splice variants of the cardiac voltage-gated sodium channel $\text{Na}(\text{v})1.5$. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *49*, 16–24.

Schultz, J.E.J., Glascock, B.J., Witt, S.A., Nieman, M.L., Nattamai, K.J., Liu, L.H., Lorenz, J.N., Shull, G.E., Kimball, T.R., and Periasamy, M. (2004). Accelerated onset of heart failure in mice during pressure overload with chronically decreased SERCA2 calcium pump activity. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *286*, H1146–H1153.

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., et al. (2001). Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation* *103*, 89–95.

Schwartz, P.J., Stramba-Badiale, M., Crotti, L., Pedrazzini, M., Besana, A., Bosi, G., Gabbarini, F., Goulene, K., Insolia, R., Mannarino, S., et al. (2009). Prevalence of the Congenital Long-QT Syndrome. *Circulation* *120*, 1761–1767.

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

Sellers, Z.M., De Arcangelis, V., Xiang, Y., and Best, P.M. (2010). Cardiomyocytes with disrupted CFTR function require CaMKII and Ca^{2+} -activated Cl^{-} channel activity to maintain contraction rate. *J. Physiol. (Lond.)* *588*, 2417–2429.

- Semb, S.O., Lunde, P.K., Holt, E., Tønnessen, T., Christensen, G., and Sejersted, O.M. (1998). Reduced myocardial Na⁺, K⁽⁺⁾-pump capacity in congestive heart failure following myocardial infarction in rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *30*, 1311–1328.
- Sethi, K.K., Sethi, K., and Chutani, S.K. (2014). Early repolarisation and J wave syndromes. *Indian Heart J* *66*, 443–452.
- Shah, V.N., Wingo, T.L., Weiss, K.L., Williams, C.K., Balser, J.R., and Chazin, W.J. (2006). Calcium-dependent regulation of the voltage-gated sodium channel hH1: intrinsic and extrinsic sensors use a common molecular switch. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 3592–3597.
- Shaikh, S.A., Sahoo, S.K., and Periasamy, M. (2016). Phospholamban and sarcolipin: Are they functionally redundant or distinct regulators of the Sarco(Endo)Plasmic Reticulum Calcium ATPase? *J. Mol. Cell. Cardiol.* *91*, 81–91.
- Shen, C., Xu, L., Han, S., Dong, Z., Zhao, X., Wang, S., Qian, S., Li, B., Ma, X., Wang, P., et al. (2017). Novel idiopathic DCM-related SCN5A variants localised in DI-S4 predispose electrical disorders by reducing peak sodium current density. *J. Med. Genet.*
- Shi, R., Zhang, Y., Yang, C., Huang, C., Zhou, X., Qiang, H., Grace, A.A., Huang, C.L.-H., and Ma, A. (2008). The cardiac sodium channel mutation delQKP 1507-1509 is associated with the expanding phenotypic spectrum of LQT3, conduction disorder, dilated cardiomyopathy, and high incidence of youth sudden death. *Europace* *10*, 1329–1335.
- Simmerman, H.K., and Jones, L.R. (1998). Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol. Rev.* *78*, 921–947.
- Singh, M.V., Swaminathan, P.D., Luczak, E.D., Kutschke, W., Weiss, R.M., and Anderson, M.E. (2012). MyD88 mediated inflammatory signaling leads to CaMKII oxidation, cardiac hypertrophy and death after myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *52*, 1135–1144.
- Sipido, K.R., Maes, M., and Van de Werf, F. (1997). Low efficiency of Ca²⁺ entry through the Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger as trigger for Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum. A

comparison between L-type Ca^{2+} current and reverse-mode $\text{Na}^{(+)}\text{-Ca}^{2+}$ exchange. *Circ. Res.* *81*, 1034–1044.

Sipido, K.R., Volders, P.G.A., Vos, M.A., and Verdonck, F. (2002). Altered Na/Ca exchange activity in cardiac hypertrophy and heart failure: a new target for therapy? *Cardiovasc. Res.* *53*, 782–805.

Sipido, K.R., Varro, A., and Eisner, D. (2006). Sodium calcium exchange as a target for antiarrhythmic therapy. *Handb Exp Pharmacol* 159–199.

Sivilotti, L., Okuse, K., Akopian, A.N., Moss, S., and Wood, J.N. (1997). A single serine residue confers tetrodotoxin insensitivity on the rat sensory-neuron-specific sodium channel SNS. *FEBS Letters* *409*, 49–52.

Song, Y., Shryock, J.C., Wagner, S., Maier, L.S., and Belardinelli, L. (2006). Blocking late sodium current reduces hydrogen peroxide-induced arrhythmogenic activity and contractile dysfunction. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *318*, 214–222.

Spach, M.S., and Boineau, J.P. (1997). Microfibrosis produces electrical load variations due to loss of side-to-side cell connections: a major mechanism of structural heart disease arrhythmias. *Pacing Clin Electrophysiol* *20*, 397–413.

Splawski, I., Timothy, K.W., Decher, N., Kumar, P., Sachse, F.B., Beggs, A.H., Sanguinetti, M.C., and Keating, M.T. (2005). Severe arrhythmia disorder caused by cardiac L-type calcium channel mutations. *PNAS* *102*, 8089–8096.

Steele, D.F., Eldstrom, J., and Fedida, D. (2007). Mechanisms of cardiac potassium channel trafficking. *J. Physiol. (Lond.)* *582*, 17–26.

Stokoe, K.S., Thomas, G., Goddard, C.A., Colledge, W.H., Grace, A.A., and Huang, C.L.-H. (2007). Effects of flecainide and quinidine on arrhythmogenic properties of *Scn5a*^{+/Delta} murine hearts modelling long QT syndrome 3. *J. Physiol. (Lond.)* *578*, 69–84.

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

Swaminathan, P.D., Purohit, A., Hund, T.J., and Anderson, M.E. (2012). Calmodulin-dependent protein kinase II: linking heart failure and arrhythmias. *Circ. Res.* 110, 1661–1677.

Szabó, G., Szentandrassy, N., Bíró, T., Tóth, B.I., Czifra, G., Magyar, J., Bányász, T., Varró, A., Kovács, L., and Nánási, P.P. (2005). Asymmetrical distribution of ion channels in canine and human left-ventricular wall: epicardium versus midmyocardium. *Pflugers Arch.* 450, 307–316.

Talosi, L., and Kranias, E.G. (1992). Effect of alpha-adrenergic stimulation on activation of protein kinase C and phosphorylation of proteins in intact rabbit hearts. *Circ. Res.* 70, 670–678.

Tan, H.L., Bink-Boelkens, M.T., Bezzina, C.R., Viswanathan, P.C., Beaufort-Krol, G.C., van Tintelen, P.J., van den Berg, M.P., Wilde, A.A., and Balser, J.R. (2001). A sodium-channel mutation causes isolated cardiac conduction disease. *Nature* 409, 1043–1047.

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

Terentyev, D., Viatchenko-Karpinski, S., Györke, I., Volpe, P., Williams, S.C., and Györke, S. (2003). Calsequestrin determines the functional size and stability of cardiac intracellular calcium stores: Mechanism for hereditary arrhythmia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 11759–11764.

Te Riele, A.S.J.M., Agullo-Pascual, E., James, C.A., Leo-Macias, A., Cerrone, M., Zhang, M., Lin, X., Lin, B., Sobreira, N.L., Amat-Alarcon, N., et al. (2017). Multilevel analyses of SCN5A mutations in arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy suggest non-canonical mechanisms for disease pathogenesis. *Cardiovasc. Res.* 113, 102–111.

Thomas, G., Gurung, I.S., Killeen, M.J., Hakim, P., Goddard, C.A., Mahaut-Smith, M.P., Colledge, W.H., Grace, A.A., and Huang, C.L.-H. (2007). Effects of L-type Ca²⁺ channel antagonism on ventricular arrhythmogenesis in murine hearts containing a modification in the Scn5a gene modelling human long QT syndrome 3. *J. Physiol. (Lond.)* 578, 85–97.

Thorsen, K., Dam, V.S., Kjaer-Sorensen, K., Pedersen, L.N., Skeberdis, V.A., Jurevičius, J., Treinys, R., Petersen, I.M.B.S., Nielsen, M.S., Oxvig, C., et al. (2017). Loss-of-activity-mutation in the cardiac chloride-bicarbonate exchanger AE3 causes short QT syndrome. *Nat Commun* 8, 1696.

Tian, X.-L., Yong, S.L., Wan, X., Wu, L., Chung, M.K., Tchou, P.J., Rosenbaum, D.S., Van Wagoner, D.R., Kirsch, G.E., and Wang, Q. (2004). Mechanisms by which SCN5A mutation N1325S causes cardiac arrhythmias and sudden death in vivo. *Cardiovasc. Res.* 61, 256–267.

Tikhonov, D.B., and Zhorov, B.S. (2011). Possible roles of exceptionally conserved residues around the selectivity filters of sodium and calcium channels. *J. Biol. Chem.* 286, 2998–3006.

Tse, G., Sun, B., Wong, S.T., Tse, V., and Yeo, J.M. (2016). Anti-arrhythmic effects of hypercalcemia in hyperkalemic, Langendorff-perfused mouse hearts. *Biomed Rep* 5, 301–310.

Tse, G., Chan, Y.W.F., Keung, W., and Yan, B.P. (2017). Electrophysiological mechanisms of long and short QT syndromes. *Int J Cardiol Heart Vasc* 14, 8–13.

Tukkie, R., Sogaard, P., Vleugels, J., de Groot, I.K.L.M., Wilde, A.A.M., and Tan, H.L. (2004). Delay in right ventricular activation contributes to Brugada syndrome. *Circulation* 109, 1272–1277.

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

Ulbricht, W. (2005). Sodium channel inactivation: molecular determinants and modulation. *Physiol. Rev.* 85, 1271–1301.

Valdivia, C.R., Tester, D.J., Rok, B.A., Porter, C.-B.J., Munger, T.M., Jahangir, A., Makielski, J.C., and Ackerman, M.J. (2004). A trafficking defective, Brugada syndrome-causing SCN5A mutation rescued by drugs. *Cardiovasc. Res.* *62*, 53–62.

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

Valdivia, C.R., Medeiros-Domingo, A., Ye, B., Shen, W.-K., Algiers, T.J., Ackerman, M.J., and Makielski, J.C. (2010). Loss-of-function mutation of the SCN3B-encoded sodium channel β_3 subunit associated with a case of idiopathic ventricular fibrillation. *Cardiovasc. Res.* *86*, 392–400.

Van den Berg, M.P., Van den Heuvel, F., Van Tintelen, J.P., Volders, P.G.A., and Van Gelder, I.C. (2014). Successful treatment of a patient with symptomatic long QT syndrome type 3 using ranolazine combined with a beta-blocker. *Int. J. Cardiol.* *171*, 90–92.

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

Vatta, M., Ackerman, M.J., Ye, B., Makielski, J.C., Ughanze, E.E., Taylor, E.W., Tester, D.J., Balijepalli, R.C., Foell, J.D., Li, Z., et al. (2006). Mutant caveolin-3 induces persistent late sodium current and is associated with long-QT syndrome. *Circulation* *114*, 2104–2112.

Vetter, R., Rehfeld, U., Reissfelder, C., Weiss, W., Wagner, K.-D., Günther, J., Hammes, A., Tschöpe, C., Dillmann, W., and Paul, M. (2002). Transgenic overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase improves reticular Ca²⁺ handling in normal and diabetic rat hearts. *FASEB J.* *16*, 1657–1659.

Vilin, Y.Y., Makita, N., George, A.L., and Ruben, P.C. (1999). Structural determinants of slow inactivation in human cardiac and skeletal muscle sodium channels. *Biophys. J.* *77*, 1384–1393.

Vincent, G.M., Schwartz, P.J., Denjoy, I., Swan, H., Bithell, C., Spazzolini, C., Crotti, L., Piippo, K., Lupoglazoff, J.-M., Villain, E., et al. (2009). High efficacy of beta-blockers in long-QT syndrome type 1: contribution of noncompliance and QT-prolonging drugs to the occurrence of beta-blocker treatment “failures.” *Circulation* *119*, 215–221.

Viskin, S., Zeltser, D., Ish-Shalom, M., Katz, A., Glikson, M., Justo, D., Tekes-Manova, D., and Belhassen, B. (2004). Is idiopathic ventricular fibrillation a short QT syndrome? Comparison of QT intervals of patients with idiopathic ventricular fibrillation and healthy controls. *Heart Rhythm* *1*, 587–591.

Volders, P.G., Vos, M.A., Szabo, B., Sipido, K.R., de Groot, S.H., Gorgels, A.P., Wellens, H.J., and Lazzara, R. (2000). Progress in the understanding of cardiac early afterdepolarizations and torsades de pointes: time to revise current concepts. *Cardiovasc. Res.* *46*, 376–392.

Wagner, E., Brandenburg, S., Kohl, T., and Lehnart, S.E. (2014). Analysis of tubular membrane networks in cardiac myocytes from atria and ventricles. *J Vis Exp* e51823.

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

Wagner, S., Ruff, H.M., Weber, S.L., Bellmann, S., Sowa, T., Schulte, T., Anderson, M.E., Grandi, E., Bers, D.M., Backs, J., et al. (2011). Reactive oxygen species-activated Ca/calmodulin kinase II δ is required for late I(Na) augmentation leading to cellular Na and Ca overload. *Circ. Res.* *108*, 555–565.

Wagner, S., Maier, L.S., and Bers, D.M. (2015). Role of sodium and calcium dysregulation in tachyarrhythmias in sudden cardiac death. *Circ. Res.* *116*, 1956–1970.

Wakimoto, K., Kobayashi, K., Kuro-O, M., Yao, A., Iwamoto, T., Yanaka, N., Kita, S., Nishida, A., Azuma, S., Toyoda, Y., et al. (2000). Targeted disruption of Na⁺/Ca²⁺ exchanger gene leads to cardiomyocyte apoptosis and defects in heartbeat. *J. Biol. Chem.* *275*, 36991–36998.

Wang, C., Chung, B.C., Yan, H., Lee, S.-Y., and Pitt, G.S. (2012). Crystal structure of the ternary complex of a NaV C-terminal domain, a fibroblast growth factor homologous factor, and calmodulin. *Structure* 20, 1167–1176.

Wang, D.W., Yazawa, K., George, A.L., and Bennett, P.B. (1996). Characterization of human cardiac Na⁺ channel mutations in the congenital long QT syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 13200–13205.

Wang, D.W., Makita, N., Kitabatake, A., Balsler, J.R., and George, A.L. (2000). Enhanced Na(+) channel intermediate inactivation in Brugada syndrome. *Circ. Res.* 87, E37–E43.

Wang, D.W., Viswanathan, P.C., Balsler, J.R., George, A.L., and Benson, D.W. (2002). Clinical, genetic, and biophysical characterization of SCN5A mutations associated with atrioventricular conduction block. *Circulation* 105, 341–346.

Wang, D.W., Crotti, L., Shimizu, W., Pedrazzini, M., Cantu, F., De Filippo, P., Kishiki, K., Miyazaki, A., Ikeda, T., Schwartz, P.J., et al. (2008). Malignant perinatal variant of long-QT syndrome caused by a profoundly dysfunctional cardiac sodium channel. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 1, 370–378.

Wang, Q., Shen, J., Li, Z., Timothy, K., Vincent, G.M., Priori, S.G., Schwartz, P.J., and Keating, M.T. (1995a). Cardiac sodium channel mutations in patients with long QT syndrome, an inherited cardiac arrhythmia. *Hum. Mol. Genet.* 4, 1603–1607.

Wang, Q., Shen, J., Splawski, I., Atkinson, D., Li, Z., Robinson, J.L., Moss, A.J., Towbin, J.A., and Keating, M.T. (1995b). SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* 80, 805–811.

Wasserstrom, J.A., and Salata, J.J. (1988). Basis for tetrodotoxin and lidocaine effects on action potentials in dog ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.* 254, H1157–H1166.

Watanabe, H., Koopmann, T.T., Le Scouarnec, S., Yang, T., Ingram, C.R., Schott, J.-J., Demolombe, S., Probst, V., Anselme, F., Escande, D., et al. (2008). Sodium channel β 1 subunit

mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans. *J. Clin. Invest.* *118*, 2260–2268.

Watanabe, H., Darbar, D., Kaiser, D.W., Jiramongkolchai, K., Chopra, S., Donahue, B.S., Kannankeril, P.J., and Roden, D.M. (2009). Mutations in sodium channel β 1- and β 2-subunits associated with atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol* *2*, 268–275.

Watanabe, H., Nogami, A., Ohkubo, K., Kawata, H., Hayashi, Y., Ishikawa, T., Makiyama, T., Nagao, S., Yagihara, N., Takehara, N., et al. (2011a). Electrocardiographic characteristics and SCN5A mutations in idiopathic ventricular fibrillation associated with early repolarization. *Circ Arrhythm Electrophysiol* *4*, 874–881.

Watanabe, H., Yang, T., Stroud, D.M., Lowe, J.S., Harris, L., Atack, T.C., Wang, D.W., Hipkens, S.B., Leake, B., Hall, L., et al. (2011b). Striking in Vivo Phenotype of a Disease-Associated Human SCN5A Mutation Producing Minimal Changes in Vitro. *Circulation* *124*, 1001–1011.

Wehrens, X.H.T., Lehnart, S.E., Reiken, S.R., and Marks, A.R. (2004). Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ. Res.* *94*, e61–e70.

Wehrens, X.H.T., Lehnart, S.E., Reiken, S., Vest, J.A., Wronska, A., and Marks, A.R. (2006). Ryanodine receptor/calcium release channel PKA phosphorylation: a critical mediator of heart failure progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 511–518.

Weidmann, S. (1951). Effect of current flow on the membrane potential of cardiac muscle. *J. Physiol. (Lond.)* *115*, 227–236.

Weiss, J.N., Garfinkel, A., Karagueuzian, H.S., Chen, P.-S., and Qu, Z. (2010). Early Afterdepolarizations and Cardiac Arrhythmias. *Heart Rhythm* *7*, 1891–1899.

Weiss, J.N., Garfinkel, A., Karagueuzian, H.S., Nguyen, T.P., Olcese, R., Chen, P.-S., and Qu, Z. (2015). Perspective: a dynamics-based classification of ventricular arrhythmias. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *82*, 136–152.

- Wier, W.G., ter Keurs, H.E., Marban, E., Gao, W.D., and Balke, C.W. (1997). Ca²⁺ “sparks” and waves in intact ventricular muscle resolved by confocal imaging. *Circ. Res.* *81*, 462–469.
- Wingo, T.L., Shah, V.N., Anderson, M.E., Lybrand, T.P., Chazin, W.J., and Balsler, J.R. (2004). An EF-hand in the sodium channel couples intracellular calcium to cardiac excitability. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *11*, 219–225.
- Wolf, C.M., and Berul, C.I. (2006). Inherited conduction system abnormalities--one group of diseases, many genes. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* *17*, 446–455.
- Wolk, R., Cobbe, S.M., Hicks, M.N., and Kane, K.A. (1999). Functional, structural, and dynamic basis of electrical heterogeneity in healthy and diseased cardiac muscle: implications for arrhythmogenesis and anti-arrhythmic drug therapy. *Pharmacol. Ther.* *84*, 207–231.
- Wu, G., Ai, T., Kim, J.J., Mohapatra, B., Xi, Y., Li, Z., Abbasi, S., Purevjav, E., Samani, K., Ackerman, M.J., et al. (2008a). alpha-1-syntrophin mutation and the long-QT syndrome: a disease of sodium channel disruption. *Circ Arrhythm Electrophysiol* *1*, 193–201.
- Wu, J., Zhang, Y., Zhang, X., Cheng, L., Lammers, W.J., Grace, A.A., Fraser, J.A., Zhang, H., Huang, C.L.-H., and Lei, M. (2012). Altered sinoatrial node function and intra-atrial conduction in murine gain-of-function Scn5a+/ Δ KPQ hearts suggest an overlap syndrome. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *302*, H1510–H1523.
- Wu, L., Yong, S.L., Fan, C., Ni, Y., Yoo, S., Zhang, T., Zhang, X., Obejero-Paz, C.A., Rho, H.-J., Ke, T., et al. (2008b). Identification of a new co-factor, MOG1, required for the full function of cardiac sodium channel Nav 1.5. *J. Biol. Chem.* *283*, 6968–6978.
- Wu, T.J., Yashima, M., Doshi, R., Kim, Y.H., Athill, C.A., Ong, J.J., Czer, L., Trento, A., Blanche, C., Kass, R.M., et al. (1999). Relation between cellular repolarization characteristics and critical mass for human ventricular fibrillation. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* *10*, 1077–1086.

Xia, Y., Liang, Y., Kongstad, O., Holm, M., Olsson, B., and Yuan, S. (2005). Tpeak-Tend interval as an index of global dispersion of ventricular repolarization: evaluations using monophasic action potential mapping of the epi- and endocardium in swine. *J Interv Card Electrophysiol* *14*, 79–87.

Xiao, B., Zhong, G., Obayashi, M., Yang, D., Chen, K., Walsh, M.P., Shimoni, Y., Cheng, H., Ter Keurs, H., and Chen, S.R.W. (2006). Ser-2030, but not Ser-2808, is the major phosphorylation site in cardiac ryanodine receptors responding to protein kinase A activation upon beta-adrenergic stimulation in normal and failing hearts. *Biochem. J.* *396*, 7–16.

Xiao, Z.-C., Ragsdale, D.S., Malhotra, J.D., Mattei, L.N., Braun, P.E., Schachner, M., and Isom, L.L. (1999). Tenascin-R Is a Functional Modulator of Sodium Channel β Subunits. *J. Biol. Chem.* *274*, 26511–26517.

Xie, Y., Sato, D., Garfinkel, A., Qu, Z., and Weiss, J.N. (2010). So little source, so much sink: requirements for afterdepolarizations to propagate in tissue. *Biophys. J.* *99*, 1408–1415.

Xu, L., Chen, J., Li, X.-Y., Ren, S., Huang, C.-X., Wu, G., Li, X.-Y., and Jiang, X.-J. (2012). Analysis of Na(+)/Ca(2+) exchanger (NCX) function and current in murine cardiac myocytes during heart failure. *Mol. Biol. Rep.* *39*, 3847–3852.

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

Yang, Y.-C., and Kao, L.-S. (2013). Regulation of sodium-calcium exchanger activity by creatine kinase. *Adv. Exp. Med. Biol.* *961*, 163–173.

Yang, K.-C., Bonini, M.G., and Dudley, S.C. (2014). Mitochondria and arrhythmias. *Free Radic. Biol. Med.* *71*, 351–361.

Yao, L., Fan, P., Jiang, Z., Viatchenko-Karpinski, S., Wu, Y., Korniyev, D., Hirakawa, R., Budas, G.R., Rajamani, S., Shryock, J.C., et al. (2011). Nav1.5-dependent persistent Na⁺ influx

activates CaMKII in rat ventricular myocytes and N1325S mice. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* *301*, C577–C586.

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

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

Yu, F.H., and Catterall, W.A. (2004). The VGL-Chanome: A Protein Superfamily Specialized for Electrical Signaling and Ionic Homeostasis. *Sci. STKE* *2004*, re15.

Zablocki, J.A., Elzein, E., Li, X., Koltun, D.O., Parkhill, E.Q., Kobayashi, T., Martinez, R., Corkey, B., Jiang, H., Perry, T., et al. (2016). Discovery of Dihydrobenzoxazepinone (GS-6615) Late Sodium Current Inhibitor (Late INaI), a Phase II Agent with Demonstrated Preclinical Anti-Ischemic and Antiarrhythmic Properties. *J. Med. Chem.*

Zhang, P. (2017). CaMKII: The molecular villain that aggravates cardiovascular disease. *Exp Ther Med* *13*, 815–820.

Zhang, T., and Brown, J.H. (2004). Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc. Res.* *63*, 476–486.

Zhang, T., Yong, S.L., Drinko, J.K., Popović, Z.B., Shryock, J.C., Belardinelli, L., and Wang, Q.K. (2011). LQTS mutation N1325S in cardiac sodium channel gene SCN5A causes cardiomyocyte apoptosis, cardiac fibrosis and contractile dysfunction in mice. *Int. J. Cardiol.* *147*, 239–245.

Zhang, Y., Wang, J., Chang, S., Zhou, N., Xing, H., Wang, L., Huang, C., Ma, A., Huang, C.L.-H., Lei, M., et al. (2014). The SCN5A mutation A1180V is associated with electrocardiographic features of LQT3. *Pediatr Cardiol* *35*, 295–300.

Zhang, Z.-S., Tranquillo, J., Neplioueva, V., Bursac, N., and Grant, A.O. (2007). Sodium channel kinetic changes that produce Brugada syndrome or progressive cardiac conduction system disease. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 292, H399–H407.

Zhao, Y.-T., Valdivia, C.R., Gurrola, G.B., Hernández, J.J., and Valdivia, H.H. (2015). Arrhythmogenic mechanisms in ryanodine receptor channelopathies. *Sci China Life Sci* 58, 54–58.

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

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., et al. (2006). ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death--executive summary: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for Management of Patients with Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death) Developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. *Eur. Heart J.* 27, 2099–2140.

Zulian, A., Baryshnikov, S.G., Linde, C.I., Hamlyn, J.M., Ferrari, P., and Golovina, V.A. (2010). Upregulation of Na⁺/Ca²⁺ exchanger and TRPC6 contributes to abnormal Ca²⁺ homeostasis in arterial smooth muscle cells from Milan hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 299, H624–H633.

Zygmunt, A.C., Goodrow, R.J., and Antzelevitch, C. (2000). I(NaCa) contributes to electrical heterogeneity within the canine ventricle. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 278, H1671–H1678.

Zygmunt, A.C., Eddlestone, G.T., Thomas, G.P., Nesterenko, V.V., and Antzelevitch, C. (2001). Larger late sodium conductance in M cells contributes to electrical heterogeneity in canine ventricle. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 281, H689–H697.

Titre : Etudes fonctionnelles de mutations associées à des pathologies de la repolarisation ventriculaire

Mots clés : Repolarisation ventriculaire, syndrome du QT long, syndrome du QT court, syndrome de repolarisation précoce, Nav1.5, NCX1, homéostasies calcique et sodique.

Résumé : La mort subite engendrée par des troubles du rythme cardiaque est souvent due à des anomalies de la repolarisation ventriculaire, qui peuvent être d'origine génétique.

Dans la première partie de cette thèse nous avons caractérisé un nouveau modèle murin de syndrome du QT long congénital de type 3 associé à une cardiomyopathie: la souris *Scn5a*^{+/ Δ QKP}. Ce modèle récapitule les conséquences de la mutation équivalente humaine sur le gène *SCN5A* (delQKP 1507-1509) : la présence d'un intervalle QT prolongé, des troubles de la conduction, des tachycardies et fibrillations ventriculaires, associés à des altérations structurales cardiaques et une mort prématurée. La mutation induit une augmentation du courant sodique persistant, et des perturbations du cycle du calcium. Des inhibiteurs du courant sodique persistant raccourcissent l'intervalle QT, améliorent la conduction cardiaque et réduisent les troubles du rythme dans ce modèle.

La seconde partie du travail a permis l'identification et la caractérisation des tout premiers variants rares sur le gène *SLC8A1*, codant pour l'échangeur Na⁺/Ca²⁺ sarcolemmique NCX1, induisant une pathologie chez l'Homme : un syndrome de repolarisation précoce associé à un raccourcissement de l'intervalle QTc. L'expression de ces variants génétiques en système de réexpression hétérologue montrent des pertes de fonction sévères du courant d'échange I_{NCX} et de la prise en charge du calcium par NCX1. Des défauts d'expression sarcolemmique de NCX1 expliquent ces pertes de fonction pour une partie des variants. La simulation *in silico* de ces pertes de fonction récapitule le phénotype observé chez les patients à l'ECG, *via* un raccourcissement de la phase de repolarisation du potentiel d'action ventriculaire.

Ces deux projets mettent en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques chez les patients atteints de pathologies de la repolarisation ventriculaire.

Titre: Functional studies of mutations associated with cardiac repolarization diseases

Key words: Ventricular repolarization, long QT syndrome, short QT syndrome, early repolarization syndrome, Nav1.5, NCX1, calcium and sodium homeostasis.

Abstract: Arrhythmias-induced cardiac sudden death is often due to ventricular repolarization abnormalities, which can be congenital.

In the first part of this thesis, we have characterized a new murine model of congenital type 3 long QT syndrome associated with a cardiomyopathy: the *Scn5a*^{+/ Δ QKP} mouse. This model recapitulates the consequences of the equivalent human mutation in the *SCN5A* gene (delQKP 1507-1509): the presence of a prolonged QT interval, conduction disorders, tachycardias and ventricular fibrillations, associated with cardiac structural defects and premature mortality. The mutation induces an increase of the persistent sodium current and perturbations of calcium cycle. Pharmacological inhibitors of the persistent sodium current shorten QT interval, improve cardiac conduction and reduce arrhythmias in this model.

The second part of the thesis has permitted the identification and the functional characterization of the very first rare variants in the *SLC8A1* gene, which encodes the sarcolemmal Na⁺/Ca²⁺ exchanger NCX1, associated with a pathology in human: an early repolarization syndrome associated with shortened QT interval. The expression of these variants in heterologous expression systems shows severe losses of function of both the exchange current I_{NCX} and the NCX1-related calcium uptake. Defects in NCX1 sarcolemmal expression explain these losses of function for part of the variants. *In silico* simulation of these losses of function recapitulates the phenotype observed in patients' ECGs, by shortening the repolarization phase of the ventricular action potential. These two projects reveal new therapeutic targets in patients with ventricular repolarization diseases.